

MARIA ELIEIDY GOMES DE OLIVEIRA

**QUEIJO DE COALHO CAPRINO ADICIONADO DE
BACTÉRIAS LÁTICAS: ELABORAÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE
POTENCIAL PROBIÓTICO**

RECIFE/PE

2013

Maria Elieidy Gomes de Oliveira

**Queijo de coalho caprino adicionado de bactérias lácticas:
elaboração, caracterização e avaliação *in vitro* de potencial
probiótico**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor em Nutrição.

Orientador: Prof^o Dr^o Evandro Leite de Souza

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga

Recife/PE
2013

Catálogo na publicação
Bibliotecária: Gláucia Cândida, CRB4-1662

O48q Oliveira, Maria Elieidy Gomes de.
Queijo de coalho caprino adicionado de bactérias láticas: elaboração, caracterização e avaliação in vitro de potencial probiótico / Maria Elieidy Gomes de Oliveira. – Recife: O autor, 2013.
152 folhas : il. ;30 cm.

Orientador: Evandro Leite de Souza.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2013.
Inclui bibliografia, apêndices e anexos.

1. Caprino Criação. 2. Derivados do leite. 3. Alimento Funcional. 4. Probiótico. I. Souza, Evandro Leite de (Orientador). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2013-043)

Maria Elieidy Gomes de Oliveira

**Queijo de coalho caprino adicionado de bactérias lácticas: elaboração,
caracterização e avaliação *in vitro* de potencial probiótico**

Tese aprovada em: 28 de fevereiro de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga
(DN/CCS – Universidade Federal da Paraíba)

Profª Drª Marciane Magnani
(DEA/CT – Universidade Federal da Paraíba)

Profª Drª Roberta de Albuquerque Bento
(DN/CAV – Universidade Federal de Pernambuco)

Profª Drª Elizabeth do Nascimento
(DN/CCS – Universidade Federal de Pernambuco)

Profª Drª Margarida Angélica da Silva Vasconcelos
(DN/CCS – Universidade Federal de Pernambuco)

Recife/PE
2013

*A Deus, por cada etapa vencida!
Aos meus pais, em especial a minha mãe,
Eliete, por todo o amor, dedicação, apoio,
incentivo e paciência.
Ao meu irmão amado, Eurialys, motivo de
alegria e força no meu dia a dia.
A todos aqueles que passaram em minha
vida e deixaram um pouco de si e levaram
um pouquinho de mim.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida. Agradeço e enalteço por ter me conduzido e me dado forças durante este período e por todas as etapas e obstáculos vencidos.

A meus pais, Eliete e Arnaud, por tudo que representam para mim. A minha mãe agradeço pelo amor incondicional, dedicação, preocupação, apoio, incentivo e paciência. Ao meu pai, pela dedicação em me instruir e pelos bons conselhos dados a mim.

Ao meu amado irmão e cunhada querida, Eurialys e Karoll, pelo companheirismo, carinho, atenção, alegrias compartilhadas e por tudo que já vivemos juntos.

A todos os meus familiares que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui. Meu muito obrigada!

A minha “segunda família”, Sr. Genival e D. Helenira (pais de coração), Eduardo e Paulo Henrique (irmãos para uma vida toda), pois como já dizia Shakespeare *“Com o tempo aprendes que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias. E o que importa não é o que tens na vida, mas quem tens na vida. E que bons amigos são a família que permitirmos escolher”*. E eu escolhi vocês! Obrigada por tudo que representam para mim, pela amizade, pelo carinho, apoio, incentivo, torcida, conselhos, alegrias outrora compartilhadas. Meus sinceros agradecimentos.

Ao meu orientador, Profº Drº Evandro Leite de Souza, por ter acreditado em mim e ter me aceitado como sua orientanda, pelos valiosos ensinamentos e direcionamentos, pelo exemplo de profissional responsável, comprometido e dedicado que sempre foi para todos nós, pela paciência, oportunidade, confiança, orientação e disponibilidade sempre quando solicitado.

À minha co-orientadora e “mãe amiga”, Profª Drª Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga, pelo seu exemplo de profissionalismo e, acima de tudo, de pessoa, pelas orientações, pelos conselhos, apoio, incentivo, vitórias alcançadas, alegrias compartilhadas, amizade, confiança... Nossa história iniciou-se há um tempinho atrás, ainda como técnica

responsável pelo Laboratório de Bromatologia/UFPB. Iniciava-se ali uma história de cumplicidade, admiração, carinho e muito respeito. Obrigada por ter me proporcionado a oportunidade de obter tantos aprendizados, tantas conquistas e imensas alegrias. Espero poder continuar sempre ao seu lado!

À minha “irmã amiga” e tão essencial ao desenvolvimento deste trabalho, Estefânia Fernandes Garcia, por toda sua dedicação, empenho, colaboração nos ensaios laboratoriais, compreensão, atenção, conselhos e apoio em tudo. Você foi “minhas mãos” e “meus pés” quando eu mais precisei. Foi meu ombro amigo em todos os sentidos. Só você sabe como foi difícil chegar aqui, porque você viveu tudo isso comigo... tudo mesmo. Não tenho palavras que cheguem perto da dimensão da minha gratidão por ti, amiga. Sem você eu não teria conseguido. Meu muito obrigada!

À Tayanna Bernardo e Suênia Félix, pela amizade, companheirismo e colaboração na execução desta pesquisa.

Em especial à responsável por eu chegar até aqui, professora Dr^a Maria Lúcia da Conceição, pois foi quem primeiro me acolheu na graduação, e me deu esse imenso privilégio de conhecer a pesquisa científica e que me mostrou esse mundo que tanto amo hoje: O Laboratório. Pelo exemplo de humildade, dignidade, dedicação, inteligência, garra e perseverança. Amiga fiel e companheira, obrigada por todas as oportunidades, conselhos, ensinamentos, alegrias, incentivo e apoio. Pelas instruções e auxílio nos ensaios microbiológicos *in vitro* e por abrir as portas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (DN/CCS/UFPB), me fazendo sentir em casa. Você faz parte desta história.

À Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (UFPB), profa. PhD Marta Suely Madruga, pela disponibilidade, apoio, valiosas instruções e sugestões para o meu trabalho. Pela abertura concedida para utilização do Laboratório de Análise Química de Alimentos (LAQA) e Laboratório de Ácidos Graxos (LAG). Muito obrigada!

À professora Dr^a Roberta de Albuquerque Bento, por toda atenção sempre dispensada e por vir me acompanhando desde a qualificação do meu projeto. Por todo seu empenho em sempre melhorar o trabalho, pelas valiosas considerações e correções. Muito obrigada!

Às componentes da minha banca examinadora, professoras Dr^a Marciane Magnani, Dr^a Margarida Angélica e Dr^a Elizabeth do Nascimento, pelas valiosas considerações e correções para o enriquecimento e aperfeiçoamento da tese.

A Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, nas pessoas da ex-coordenadora, professora Dr^a Monica Osório, e atual coordenador, professor Dr^o Raul Manhães, pela oportunidade concedida para a realização do Doutorado. Agradeço a todos os professores pelos ensinamentos essenciais e às funcionárias Cecília Arruda e Neci Nascimento, por toda gentileza, atenção e disponibilidade sempre quando solicitadas. Agradeço em especial à professora Tânia Stamford que para mim sempre foi um exemplo de pessoa digna, sábia, responsável, dedicada, comprometida com a ciência de uma maneira muito bela e difícil de ver nos dias de hoje. Obrigada por ser um exemplo para todos nós, professora!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), pelo apoio financeiro na realização desta pesquisa.

Aos amigos da pós-graduação Marina, Marcos, Raquel, Rafael, Simone e em especial a Jailane e Juliana, pela amizade, ajudas mútuas, torcida, apoio, incentivo, enfim, por tudo que vivemos e sobrevivemos nesta fase de nossas vidas.

Agradeço em especial a duas amigas que para mim são como irmãs, a Juliana Késsia, por ter me acolhido literalmente quando cheguei a UFCG em Cuité/PB. Por toda sua amizade, cumplicidade, respeito, atenção, companheirismo e conselhos. Amiga, você é para mim um exemplo de força, garra e determinação. Obrigada por tudo! À Ingrid Dantas, minha “Bárbie” especial. Nas horas de aflição, de desânimo, em que achamos que já não temos mais forças e nem sabemos o caminho certo para seguir, Deus nos envia anjos que iluminam os nossos caminhos. E você, amiga, é e sempre foi esse Anjo em minha vida. Obrigada por ter me feito acreditar que eu seria capaz de ultrapassar todas as barreiras e por ter me ajudado nos momentos mais difíceis dessa trajetória. A minha gratidão por você é imensa e nada do que eu fale dimensionará o meu carinho e admiração por você. Muito obrigada!

Aos funcionários e amigos dos Laboratórios de Bromatologia e Microbiologia de Alimentos da UFPB, Sr. Heronides e D. Salete, pelos sorrisos arrancados de meu rosto em bate papos descontraídos sempre quando era possível, pela atenção, dedicação e apoio quando precisei.

À Heloisa Ângelo, Náthalee Cavalcanti, Meiryéle Nazaré, Rafaela Beltrão, Mônica Lima, Tamires Machado, Otaviana Tabosa, Mayra Cavalcanti, Arthur da Gama, José Gomes, Felipe Almeida, Gabrielle Ferreira, Ilsa Barbosa, Ertha Janine, Mércia Galvão, Bárbara Nascimento, Mayara Barbosa, Quênia Gramile, Taiz Siqueira, Gustavo Ravy, André Luiz, Yasmim Régis, Suéllen Matias, Renata Marinho, Rayssa Bezerril, Geíza Alves e Ítala Viviane, amigos especiais de ontem, hoje e para sempre, pela amizade, carinho, atenção, preocupação, ajuda, alegrias vividas, incentivo e apoio. Por tudo que já vivemos juntos, meu muito obrigada.

Aos amigos dos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos e Bromatologia (UFPB), Nelson Justino, Ana Caroliny, Camila Veríssimo, Nereide Serafim, Jossana Sousa, Priscila Dinah, Eryka Alves, Neusa Lygia, Isabelle Luz, Adassa Gama, Larissa Lima, Andreza Moraes, Francisco Cesino, Jacieny Janne, Amanda Marília, Heloisa Almeida, Karla Kalígia, Fabícia França, Francieli Araújo, Mayara Sabedot e Ana Sansha, pela amizade, ajudas mútuas, torcida, apoio, incentivo, por tudo que vivemos nestes ambientes nesta fase de nossas vidas.

Aos colegas de trabalho da UFCG: Vanille Pessoa, Poliana Palmeira, Jefferson Carneiro, Ana Paula, Flavia Negromonte, Karis Guimarães, Anna Ferla, Camila Carolina, Júlia Beatriz e Maria Emília; e em especial às amigas amadas Nilcimelly Rodrigues, Marília Frazão, Carolina Gondim e Janaína Dantas, pela amizade, incentivo, torcida, alegrias compartilhadas e conquistas alcançadas juntas.

À professora Evelise Andreatta Monzani Perna, da Faculdade de Jaguariúna – FAJ/SP, pela gentileza e atenção sempre dispensada em me dar as melhores orientações quanto à realização da análise de Índice Proteolítico.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, aqui fica o meu agradecimento.

"Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá."

Ayrton Senna

RESUMO

O queijo coalho é um queijo semiduro amplamente consumido na região Nordeste do Brasil. Sua produção envolve tradicionalmente o uso de coalho, sendo que adição de culturas probióticas neste tipo de matriz alimentar pode ser uma alternativa para atender a crescente demanda por novos produtos alimentícios com propriedades funcionais. O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de elaborar e caracterizar os aspectos físico-químicos, tecnológicos, microbiológicos, sensoriais e o potencial probiótico de queijo tipo coalho caprino, durante o armazenamento refrigerado de 21 dias. O efeito da adição de culturas lácticas isoladas e em co-cultura sobre as características de qualidade dos queijos foi avaliado nos tempos 1, 7, 14 e 21 dias, considerando os seguintes tratamentos T1: queijo adicionado de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (queijo padrão); T2: queijo adicionado de *Lactobacillus acidophilus*; T3: queijo adicionado de *Lactobacillus paracasei*; T4: queijo adicionado de *Bifidobacterium lactis* e T5: queijo adicionado da co-cultura de todas as cepas probióticas testadas. Os efeitos de proteção da matriz constituída pelo queijo sobre a viabilidade das bactérias probióticas testadas, quando aplicadas isoladamente, foi avaliado em condições gastrointestinais simuladas: boca (solução de saliva artificial), esôfago-estômago (suco gástrico artificial), duodeno (suco intestinal artificial) e íleo. Ainda, foi avaliada a efeito inibitório das bactérias probióticas frente às bactérias patogênicas *S. aureus* e *L. monocytogenes* adicionadas quando inoculadas conjuntamente ao queijo. Todos os queijos elaborados apresentaram elevada luminosidade (L^*), com predomínio da cor amarela (b^*). As características físico-químicas (umidade, extrato seco total, lactose e acidez em ácido láctico), de textura instrumental e o índice de proteólise variaram entre os tratamentos empregados para produção dos queijos, sendo que aqueles elaborados com culturas probióticas (T2, T3, T4 e T5) apresentaram maior aceitação que o queijo padrão (T1). As contagens de bactérias ácido lácticas foram superiores a 10^7 UFC/g nos queijos durante todo o período estudado. Ao final do ensaio de digestão em condições simuladas foi observada uma redução ($p < 0,05$) nas contagens de todas as cepas probióticas testadas (5,5 – 6,0 log UFC/g). Nos ensaios de efeito inibitório foi observado que *L. paracasei* e *B. lactis* reduziram o crescimento de *S. aureus* e *L. monocytogenes* inoculados no queijo coalho. Os resultados do presente estudo evidenciam que a adição de *L. acidophilus*, *L. paracasei* e *B. lactis* não afeta negativamente as características próprias do queijo coalho caprino, permanecendo viáveis ao longo do armazenamento refrigerado por 21 dias. Pode-se inferir que o queijo coalho caprino pode ser um bom carreador destas cepas probióticas e, particularmente, *L. paracasei* e *B. lactis* poderiam ser utilizados como culturas protetoras para retardar o crescimento de *S. aureus* e *L. monocytogenes* neste tipo de queijo, aumentando a segurança e vida de prateleira do produto.

Palavras-chave: caprinocultura. derivados lácteos. alimentos funcionais. micro-organismos probióticos. condições gastrointestinais. efeito antibacteriano.

ABSTRACT

The coalho cheese is a semi-hard cheese widely consumed in Northeast Brazil. Its production involves the use of traditional rennet and the addition of probiotic cultures, and this type of food matrix may be an alternative to meet the growing demand for new functional products. This study was developed with the objective to manufacture and characterize the physico-chemical, technological, microbiological, sensory and potential probiotic properties of coalho goat cheeses, during refrigerated storage for 21 days. The effect of adding lactic cultures alone and in co-culture on the quality of the cheeses were evaluated at 1, 7, 14 and 21 days, considering the following T1: cheese added of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (standard cheese), T2: cheese added of *Lactobacillus acidophilus*; T3: cheese added of *Lactobacillus paracasei*; T4: cheese added of *Bifidobacterium lactis* and T5: cheese added of a co-culture of all probiotic strains tested. The protective effects of the matrix consisting of the cheese on the viability of the probiotic bacteria tested, when applied alone, was evaluated in simulated gastrointestinal conditions: mouth (artificial saliva), esophagus-stomach (artificial gastric juice), duodenal (intestinal juice artificial) and ileum. Furthermore, the inhibitory effects of probiotic bacteria tested against the pathogenic bacteria *S. aureus* and *L. monocytogenes* in cheese matrix was also evaluated. All cheeses showed high brightness (L *), with a predominance of yellow color (b *). The physico-chemical (moisture, total solids, lactose and acidity in lactic acid), instrumental texture and proteolysis rate ranged among the treatments used for cheese production, and cheeses made with the probiotic cultures (T2, T3, T4 and T5) presented a higher acceptance relative to the standard cheese (T1). The lactic acid bacteria counts were greater than 10⁷ CFU/g in cheeses throughout the assessed storage intervals. At the end of the test in simulated conditions of digestion reductions were observed (p < 0.05) in the counts of all probiotic strains tested (5.5 to 6.0 log CFU/g). In tests of the inhibitory effect it was observed that *L. paracasei* and *B. lactis* reduced the growth of *S. aureus* and *L. monocytogenes* when inoculated in coalho cheese. The results of this study showed that the addition of *L. acidophilus*, *L. paracasei* and *B. lactis* did not adversely affect the proper characteristics of coalho goat cheese, and these bacteria remained viable during cold storage for 21 days. It can be inferred that the coalho goat cheese can be a good carrier of these probiotic strains and, particularly, *L. paracasei* and *B. lactis* could be used as protective cultures to delay the growth of *S. aureus* and *L. monocytogenes* in this type of cheese, increasing the safety and shelf life of the product.

Key-words: goat raising. dairy products. functional foods. probiotic microorganisms. gastrointestinal conditions. antibacterial effect.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Coleta e pasteurização do leite: (A) Parte do rebanho de cabras leiteiras da UFPB – Campus III; (B) Leite caprino embalado; (C) Pasteurização.....	45
Figura 2 -	Materiais para fabricação do queijo e teste do coágulo: (A) Ácido láctico; (B) Cultura liofilizada; (C) Cloreto de cálcio; (D) Coalho; (E) Teste de corte da coalhada.....	46
Figura 3 -	Processamento dos queijos: (A) Corte da massa com lira; (B) Homogeneização da massa; (C) Retirada de soro; (D) Acondicionamento da massa em fôrmas perfuradas.....	46
Figura 4 -	Processamento, embalagem e armazenamento: (A) Prensagem; (B) Viragem; (C) Selamento a vácuo; (D) Queijo de coalho caprino em armazenamento a 10 °C.....	46
Figura 5 -	Esquema da análise de capacidade de derretimento.....	50

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Composição química (%) do leite de cabra e outros animais.....	20
Quadro 2 -	Aminoácidos essenciais (g/100g) existente no leite de cabra e no leite de vaca.....	22
Quadro 3 -	Principais aditivos alimentares com potencial funcional.....	33
Quadro 4 -	Condições de processamento utilizadas em cada etapa de digestão simulada.....	53

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO.....	14
2 PERGUNTA CONDUTORA/HIPÓTESE.....	16
3 OBJETIVOS.....	17
4 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
4.1 CAPRINOCULTURA LEITEIRA E O LEITE CAPRINO.....	18
4.2 QUEIJOS: ASPECTOS GERAIS E TECNOLÓGICOS.....	23
4.3 ALIMENTOS FUNCIONAIS: PROBIÓTICOS.....	32
4.4 QUEIJOS COMO VEÍCULO DE MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS.....	39
5. MATERIAS E MÉTODOS.....	44
5.1 COLETA DOS MATERIAIS.....	44
5.2 ELABORAÇÃO DOS QUEIJOS CAPRINOS.....	44
5.3 AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO E SINERESE DOS QUEIJOS.....	46
5.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	47
5.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	47
5.6 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS.....	49
5.7 ANÁLISE SENSORIAL.....	51
5.8 TESTES <i>IN VITRO</i> DA VIABILIDADE PROBIÓTICA DOS QUEIJOS TIPO COALHO CAPRINOS.....	52
5.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	57
6 RESULTADOS - ARTIGOS ORIGINAIS.....	58
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	121
8 PERSPECTIVAS.....	123
REFERENCIAS.....	124
APÊNDICES.....	145
ANEXOS.....	149

1 APRESENTAÇÃO

A caprinocultura no Nordeste do Brasil apresenta obstáculos que dificultam, sobremaneira, a sustentabilidade desse segmento, principalmente aqueles vinculados à pequena produção. Tal fato decorre, principalmente, da pouca eficiência dos atuais sistemas de produção praticados, bem como, da inexistência de tecnologias de processamento dos produtos derivados, da forma ineficaz de gerenciamento da atividade, da insuficiente capacitação e da pouca organização dos produtores (GASPAR et al., 2011; QUEIROGA et al., 2013).

As perspectivas para os pequenos e médios produtores rurais com menor nível de instrução, que utilizam baixo nível de tecnologia, apontam para um quadro de dificuldades crescentes, que se não alterado, pode conduzir a sua extinção. Por esta razão, as diferentes estâncias governamentais vêm planejando e colocando em prática diversas estratégias para recuperar e soerguer a economia regional, através da geração de tecnologias e capacitação dos produtores rurais. No que concerne a caprinocultura leiteira, são imprescindíveis pesquisas direcionadas aos aspectos de manejo do rebanho; melhoria da qualidade do leite produzido; e elaboração de estratégias de melhoria do beneficiamento e acondicionamento dos produtos derivados.

O leite de cabra destaca-se por apresentar elementos importantes para a nutrição humana como matérias orgânicas e nitrogenadas; caseína e albumina; gordura insaturada; sais minerais e vitaminas; em soma a presença de fermentos lácticos, os quais apresentam propriedades favoráveis à digestão, bem como para defesa do trato gastrointestinal contra a ação de bactérias patogênicas (HAENLEIN, 2004). A partir do leite caprino podem ser obtidos produtos como queijos, iogurtes e bebidas lácteas, utilizando-se de processos simples e acessíveis aos pequenos produtores, sendo essa uma alternativa para o aumento no consumo de produtos de origem caprina, e para a agregação de valor a tais produtos (SANTOS et al., 2011).

A exigência por alimentos com composição nutricional equilibrada e que possam oferecer benefícios adicionais à saúde é manifestada pelos consumidores atuais e, dentro deste contexto, os alimentos com potencial probiótico ganham cada vez mais a atenção do consumidor (ANNUNZIATA; VECCHIO, 2013; SAAD et al., 2013). Em virtude desta procura, o mercado de laticínios probióticos tem crescido rapidamente em todo o mundo e continua em plena expansão.

A definição aceita internacionalmente para probióticos refere-se a micro-organismos vivos que, administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001; SANDERS, 2003). Para que possam proporcionar os efeitos benéficos, esses micro-organismos devem sobreviver ao longo do trato gastrointestinal, tolerando o ácido, bile e enzimas gástricas e, em seguida, aderir e colonizar o epitélio intestinal (HUANG; ADAMS, 2004; KAILASAPATHY; CHIN, 2000). Desta forma, as propriedades funcionais dos probióticos podem ser influenciadas pela matriz alimentar utilizada como transportadora destas cepas, a qual poderá trazer um efeito protetor destes micro-organismos até que os mesmos possam atingir o trato intestinal em contagens viáveis e, assim, mediar os seus efeitos benéficos para o consumidor (OUWEHAND et al., 2001; RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010). Além disso, os micro-organismos probióticos podem apresentar atividade antimicrobiana e serem utilizados como alternativas para prevenir ou inibir o crescimento de patógenos e a deterioração dos alimentos por bactérias e fungos (AHMADOVA et al., 2013; MADUREIRA et al., 2011b; PAN et al., 2009; THARMARAJ; SHAH, 2009).

A utilização conjunta de *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp. tem sido estudada em leites e bebidas fermentadas (BEDANI; ROSSI; SAAD, 2013; CASTRO et al., 2013; GUEIMONDE et al., 2004; WANG; YU; CHOU, 2004) e queijos variados (SOUZA et al., 2008; BURITI; CARDARELLI; SAAD, 2008; GOMES et al., 2011; MINERVINI et al., 2012). Entretanto, as pesquisas referentes à adição de culturas probióticas em queijos estão, em sua maioria, voltadas para queijos finos, a exemplo de Cheddar, Cottage, Crescenza e cremoso, havendo uma escassez de relato de estudos relacionados a queijos mais populares no nordeste, como o tipo coalho. Ressalta-se, que tais estudos enfatizam principalmente a tecnologia de fabricação de queijos obtidos a partir de leite bovino, bem como os efeitos das culturas lácticas nas características destes produtos, não havendo até o presente momento estudos direcionados ao papel protetor do queijo coalho na sobrevivência das bactérias ácido lácticas em condições similares às aquelas encontradas no trato gastrointestinal de humanos, bem como do efeito inibitório destas cepas contra bactérias patogênicas neste tipo de queijo.

Neste contexto, o presente estudo representa uma possibilidade de obtenção de informações ainda ausentes na literatura científica, no que diz respeito à tecnologia de fabricação de queijo tipo coalho caprino adicionado de culturas lácticas com potencial probiótico e sua influência nas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais, bem como na avaliação do seu potencial probiótico *in vitro*.

2 PERGUNTAS CONDUTORAS E HIPÓTESES

2.1 PERGUNTAS CONDUTORAS

O queijo tipo coalho caprino permite a sobrevivência e o crescimento das bactérias probióticas *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* e *Bifidobacterium lactis* durante o processamento e armazenamento refrigerado, respectivamente?

O queijo tipo coalho caprino adicionado de bactérias lácticas probióticas pode ser considerado um alimento probiótico, com base na contagem das células viáveis destas culturas, até o final de sua vida de prateleira?

A adição das culturas lácticas probióticas influencia as características tecnológicas, físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do queijo tipo coalho caprino durante o armazenamento refrigerado?

O queijo tipo coalho caprino apresenta efeito protetor sobre a sobrevivência dos micro-organismos quando expostos a condições simuladas do trato gastrointestinal?

As bactérias ácido lácticas adicionadas ao queijo tipo coalho caprino inibem as bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* ao longo do armazenamento refrigerado?

2.2 HIPÓTESES

O queijo tipo coalho caprino apresenta-se como um bom carreador de culturas lácticas probióticas, permitindo contagens maiores que 10^7 UFC/g destes micro-organismos ao longo do período de armazenamento, além de sua adição influenciar de forma positiva nas características tecnológicas, físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do produto. Ainda, o queijo tipo coalho caprino pode atuar como uma matriz protetora das bactérias lácticas probióticas ao longo do trato gastrointestinal, possibilitando que alcancem o cólon em contagens viáveis e assim possam mediar os seus efeitos benéficos para o consumidor. Espera-se também que as culturas ácido lácticas adicionadas ao queijo tipo coalho caprino apresentem efeito inibitório frente às bactérias patogênicas contaminantes do produto, aumentando a sua segurança e vida de prateleira.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Elaborar e caracterizar os aspectos tecnológicos e de qualidade, bem como o potencial funcional de queijos caprinos tipo coalho adicionados de bactérias probióticas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Elaborar diferentes queijos caprinos tipo coalho adicionados de *L. acidophilus*, *L. paracasei* e *B. lactis* isolados e em co-cultura;
- ✓ Determinar o rendimento e sinerese dos queijos caprinos tipo coalho convencional e adicionado das bactérias lácticas testadas;
- ✓ Caracterizar as variáveis físico-químicas, microbiológicas, sensoriais e tecnológicas nos queijos elaborados, armazenados durante 21 dias sob refrigeração;
- ✓ Analisar a sobrevivência das bactérias probióticas adicionadas ao queijo tipo coalho caprino quando expostas às condições simuladas do trato gastrointestinal;
- ✓ Avaliar o efeito inibitório das bactérias ácido lácticas ensaiadas, adicionadas isoladamente ao queijo caprino tipo coalho, frente às bactérias patogênicas *S. aureus* e *L. monocytogenes*, durante armazenamento refrigerado.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 CAPRINOCULTURA LEITEIRA E O LEITE CAPRINO

A espécie caprina encontra-se difundida em todo o mundo, exceto nas regiões polares, com 74% dos rebanhos distribuídos nas regiões tropicais e áridas. Constitui-se espécie de expressiva importância econômica graças à sua rusticidade, que permite uma melhor adaptação às adversidades do meio, contribuindo para o desenvolvimento das zonas rurais, ressaltando-se a qualidade dos produtos que fornecem para a alimentação (DUBEUF; MORAND-FEHR; RUBINO, 2004).

Dados da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) estimam que o rebanho caprino mundial em 2011 era na cifra de 876 milhões de cabeças, com 1,1% deste efetivo distribuído no Brasil. A região Nordeste contribui com 94% do rebanho brasileiro, onde se aplica, predominantemente, o sistema de criação extensivo. Embora este número seja expressivo, a caprinocultura leiteira ainda apresenta níveis reduzidos de desempenho, principalmente quando é comparada com outros países da Europa, que detêm rebanhos menores que o brasileiro, mas apresentam consideráveis produções leiteiras (FAOSTAT, 2013).

Em 2011, a produção leiteira no Brasil foi de mais de 32 milhões de toneladas, sendo produzidas cerca de 44.000 toneladas de queijos. No mesmo ano, a produção nacional de leite caprino alcançou 148.000 toneladas. A Região Nordeste contribui com 90% da produção nacional de leite caprino, entretanto, observa-se uma baixa produtividade dos rebanhos, causada pela falta de disponibilidade de tecnologias, aliada aos produtos de baixa qualidade e a desarticulação da cadeia produtiva, constituindo-se em fatores de entrave na caprinocultura desta região. Com uma produção diária de 14 mil litros, a Paraíba é o maior produtor de leite de cabra do País (BRASIL, 2007, FAOSTAT, 2013; GONZALO, 2013). Este fato esteve relacionado, principalmente, ao incentivo de Programas Governamentais à Caprinocultura, como exemplo, pode-se citar o “Programa Leite da Paraíba”, que tem como responsabilidade a distribuição de 120 mil litros de leite de cabra e de vaca por dia às famílias carentes do Estado (GOVERNO DO ESTADO DA PARAÍBA, 2009), gestantes, nutrízes e idosos.

É importante salientar que a pecuária de caprinos sempre se apresentou como atividade promissora para o desenvolvimento econômico brasileiro, desempenhando um importante papel socioeconômico nas regiões semiáridas, por proporcionar renda direta, além

de representar uma excelente fonte alimentar. Um incremento desta cultura deveu-se, principalmente, às ações conjuntas de instituições de pesquisa, governos e associações de criadores, os quais procuraram melhorar o potencial leiteiro do rebanho e fomentar o desempenho da indústria de laticínios. Além disso, projetos envolvendo a mobilização conjunta dos participantes do processo produtivo podem ser capazes de viabilizar a caprinocultura leiteira como atividade eficiente, rentável e de grande impacto social, principalmente na zona rural (RODRIGUES; QUINTANS, 2003).

Entretanto, a indústria de laticínios caprinos no Brasil ainda enfrenta problemas, devido a vários fatores, dentre eles: pequeno plantel de caprinos voltados para produção leiteira, falta de conhecimento dos produtos de leite caprino e costume alimentar restritivo por grande maioria da população. Aliado a isto ocorre a precariedade da tecnologia usualmente aplicada no Brasil, e a não utilização de padrões de controle higiênico-sanitário para leite de cabra e seus derivados, constituindo-se como os principais entraves à agroindústria especializada em produtos lácteos de caprinos, estando a expansão deste setor vinculada à melhoria da estrutura de comercialização e à aplicação de tecnologia adequada aos padrões de qualidade exigidos (SIMPLÍCIO; WANDER, 2003). Assim, em decorrência desta produção e da falta de estrutura específica para o seu beneficiamento, a maior parte da produção leiteira caprina tem sido comercializada na forma de leite pasteurizado congelado, beneficiado artesanalmente pelo criador, na zona rural (QUEIROGA, 2004).

Com o surgimento de novas formas organizacionais na região Nordeste, a caprinocultura leiteira no Brasil poderá alcançar números jamais vistos, pois esta região possui vantagens comparativas que propiciam a construção de atividades competitivas, o que pode tornar o Nordeste um grande exportador de leite e derivados, não só para outras regiões, como também para outros países (QUEIROGA; COSTA; BISCONTINI, 2006).

Face ao promissor mercado nacional e internacional para produtos caprinos, o aproveitamento racional dos animais e produtos, como o leite e seus derivados, resultará em índices satisfatórios quanto a sua aceitação pelos consumidores. Dentre os produtos de industrialização mais frequentes a partir do leite caprino, pode-se citar o leite integral pasteurizado e congelado; leite em pó; os iogurtes, naturais ou com frutas; as bebidas lácteas, os queijos, com suas diversas variedades; além de cosméticos como: sabonetes, xampus, condicionadores, cremes hidratantes e loções elaborados a partir do leite *in natura* (BELTRÃO FILHO, 1999; SIMPLÍCIO; WANDER, 2003).

A legislação brasileira define leite de cabra como “produto normal, fresco e integral, obtido da ordenha completa e ininterrupta de animais sadios, bem alimentados e em repouso” (BRASIL, 1999a).

Dentre os vários tipos de leite, o caprino destaca-se por apresentar vários elementos importantes para a nutrição humana como matérias orgânicas e nitrogenadas, caseína e albumina, necessárias à constituição dos tecidos e sangue; gordura insaturada, que contribui para circulação sanguínea; sais minerais, necessários para a formação do esqueleto; e ainda, vitaminas e fermentos lácticos, sendo estes últimos favoráveis à digestão e capazes de exercer ação de defesa frente à ação de bactérias patogênicas a nível intestinal (PARK et al., 2007; HAENLEIN, 2004).

De um modo geral, a composição do leite varia de acordo com a raça, as condições ambientais, estágio de lactação, a alimentação, os cuidados dispensados ao animal, o ciclo esteral, o estado de saúde, a idade e a quantidade de leite produzida (ALVES; PINHEIRO, 2003; CRUZ; SANTOS; CRUZ, 2004). No Quadro 1 podem ser observadas as diferenças na composição do leite de cabra quando comparado a de outros animais.

Quadro 1 – Composição química (%) do leite de cabra e outros animais.

ESPÉCIES	NUTRIENTES (%)				
	Umidade	Proteínas	Lipídeos	Lactose	Minerais
Cabra ¹	86,9	3,8	4,1	4,6	0,8
Vaca ¹	88,0	3,5	3,7	5,0	0,7
Búfala ¹	81,0	5,2	8,7	3,1	0,6
Coelha ¹	54,3	18,5	12,8	2,3	3,6
Ovelha ²	80,1	6,0	8,5	4,2	1,2
Mulher ²	88,5	1,5	3,3	6,5	0,2
Égua ²	90,4	2,0	1,2	6,0	0,4

Fontes: ¹Vieira (1995), ²Bueno (2005).

A qualidade nutricional do leite de cabra está relacionada à sua composição química, sendo constituída de proteínas de alto valor biológico e ácidos graxos essenciais, ressaltando-se também o seu conteúdo mineral. Entre os ácidos graxos, destaca-se o ácido linoléico conjugado (CLA), sendo considerado componente nutracêutico da gordura do leite, por apresentar atividades anticarcinogênica e antiteratogênica; habilidade para redução de efeitos catabólicos da estimulação imune; redução de reservas corporais de gordura, e ainda,

promoção de crescimento. Atua, também, sobre os efeitos secundários da obesidade e da diabetes (ELIAS et al., 2004; JIANG et al., 1999; OSMARI et al., 2011; WILLIAMS, 2000). Logo, a importância do leite de cabra na alimentação se deve ao seu alto valor nutritivo, maior digestibilidade e as características terapêuticas e dietéticas (HAENLEIN, 2004; MCCULLOUGH, 2004; MONERET-VAUTRIN, 2004).

As principais diferenças na composição química entre o leite de vaca e de cabra diz respeito aos teores de proteínas, extrato seco total e cinzas. Alguns trabalhos são controversos, concluindo que, em relação aos aspectos físico-químicos, os leites citados são similares e as variações ocorrem devido às espécies dos animais. O leite de cabra apresenta densidade mais elevada do que o leite de vaca, que situa em torno de 1.032 g/l, enquanto que o leite de cabra pode atingir 1.034 g/l. Quanto ao teor de acidez, o leite caprino apresenta-se ligeiramente inferior, devido às diferenças entre os grupos carboxílicos das duas espécies, podendo este índice ser utilizado como indicador do seu estado de conservação, variando entre 11 e 18 °D (HAENLEIN, 2004; MCCULLOUGH, 2004). Para a quantidade de gordura entre o leite de cabra e vaca, tanto do ponto de vista quantitativo quanto do ponto de vista físico, observam-se diferenças devido a diversos fatores, entre eles os genéticos, sendo relatados valores entre 2,0% a 8,0% de gordura para o leite de cabra (HAENLEIN, 2004).

As proteínas do leite de cabra são formadas principalmente pela α -lactoalbumina; β -lactoalbumina; β -caseína; κ -caseína; α -S1 caseína e α -S2 caseína, as quais se assemelham aos homólogos do leite de vaca. Entretanto, no leite de cabra, a β -caseína representa 55% da composição destas proteínas, enquanto a α -S1 caseína apresenta-se com maior percentual no leite bovino (MONERET-VAUTRIN, 2004; MORGAN et al., 2003). Presume-se que as proteínas do soro (α -lactoalbumina; β -lactoalbumina) do leite de cabra e de vaca apresentam-se estruturalmente diferenciadas, e, além disso, variam percentualmente, o que explicaria a melhor tolerância do leite de cabra por crianças portadoras de quadros alérgicos ao leite de vaca.

De acordo com Haenlein (2004), no leite de cabra encontram-se, também, níveis maiores de 6 dos 10 aminoácidos essenciais (treonina, isoleucina, lisina, cistina, tirosina e valina) que o leite de vaca (Quadro 2). Este fato poderia auxiliar na interpretação de alguns efeitos benéficos atribuídos ao leite de cabra na nutrição humana. Estudo experimental comprovou que o leite de cabra melhorou a absorção intestinal de cobre, fato atribuído às concentrações mais elevadas de alguns desses aminoácidos no leite de cabra quando comparado ao leite de vaca (BARRIONUEVO et al., 2002).

Os teores de vitaminas no leite de cabra, comparado ao leite bovino, são próximos, exceto as vitaminas B6, B12 e ácido fólico que são reduzidos. Fisiologicamente as cabras convertem todo caroteno em vitamina A, portanto o leite apresenta maior teor dessa vitamina. Ainda, apresenta maior quantidade de cálcio, potássio, magnésio, fósforo, cloro e manganês e menor teor de sódio, ferro, zinco, enxofre, molibdênio e cobalto, estando esse último relacionado com a taxa reduzida de vitamina B12 (FISBERG, 1999, apud CARVALHO, 2008).

Quadro 2 – Aminoácidos essenciais (g/100g) existentes no leite de cabra e no leite de vaca.

Aminoácidos Essenciais (g/100g)	FONTE	
	Leite de Cabra	Leite de Vaca
Treonina	0,163	0,149
Metionina	0,080	0,083
Cistina	0,046	0,030
Valina	0,240	0,220
Leucina	0,314	0,332
Isoleucina	0,207	0,199
Fenilalanina	0,155	0,159
Tirosina	0,179	0,159
Lisina	0,290	0,261
Triptofano	0,044	0,049

Fonte: Adaptado de Haenlein (2004)

Enquanto o leite bovino possui uma cor característica amarelada, pela presença do pigmento β -caroteno, no leite caprino a cor é branca, sendo atribuída à ausência deste pigmento, que é totalmente convertido em vitamina A (SILVA, 2001).

O leite caprino apresenta características sensoriais peculiares, com odor e sabor acentuados, que muitas vezes são considerados agradáveis ou não, tornando-se fatores de recusa e implicação direta na sua aceitabilidade. As causas destas características ainda não estão bem esclarecidas, reportando-se, possivelmente, a fatores genéticos, ambientais e de manejo dos animais. Nos sistemas de criação, usualmente utilizados na região Nordeste, a partir do conhecimento empírico, o animal macho (reprodutor) é retirado de junto das fêmeas, por acreditar-se na impregnação do odor hircino, próprio do macho, no leite obtido. As

práticas higiênicas da ordenha também representam papel importante, visto que processos envolvendo lipólise por micro-organismos podem provocar alterações no perfil sensorial deste leite (BERNARD et al., 2009; MORAND-FERH et al., 2007; QUEIROGA, 2004).

Além disso, as características do sabor do leite de cabra podem ser atribuídas à presença de lipídios, particularmente sob a forma de ácidos graxos de cadeia curta, principalmente caprílico, capróico e cáprico, presentes em conteúdo aproximadamente três vezes superiores que no leite de vaca, tornando-os química e fisiologicamente distintos. Alguns autores observaram que o leite de cabra apresenta uma maior concentração de glóbulos de gordura de menor tamanho ($1,5 \mu$), enquanto glóbulos maiores que $3,0 \mu$ são encontrados no leite de vaca em maior concentração, podendo isto explicar uma das causas de sua maior digestibilidade, supondo-se que as lipases atuam nas gorduras do leite de cabra com maior rapidez, devido a uma maior área de exposição e fragilidade de membrana, associando-se ao desenvolvimento de ácidos graxos voláteis (CHILLIARD et al., 2003; VARGAS et al., 2008).

4.2 QUEIJOS: ASPECTOS GERAIS E TECNOLÓGICOS

O queijo é um concentrado lácteo constituído de proteínas, lipídios, carboidratos, sais minerais, cálcio, fósforo e vitaminas A e B. É um dos alimentos mais nutritivos que se conhece, dado que um queijo com 48% de gordura contém cerca de 23-25% de proteína o que significa que, em termos de valor proteico, 210 g desse produto equivalem a 300 g de carne. Os minerais participam do processo de coagulação do leite, influenciando a textura do queijo. O líquido residual, cujo teor varia com o tipo de queijo, é chamado lacto soro. Considerável parte do lacto soro é eliminada durante o processo de fabricação e aproveitada como matéria prima na produção de bebidas lácteas, ricota e outros produtos (PERRY, 2004).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 1996), queijo é “o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado) ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, enzimas de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes”. A legislação complementa essa definição, reservando o nome queijo exclusivamente para produtos cuja base láctea não

contenha gordura e/ou proteínas de outra origem. Segundo a mesma legislação, os queijos podem ser classificados de acordo com o conteúdo de matéria gorda no extrato seco e teor de umidade. Para tanto, estabelece-se o seguinte:

✓ De acordo com o conteúdo de matéria gorda no extrato seco, em percentagem, os queijos classificam-se em: extra gordo ou duplo creme, quando contenham o mínimo de 60% de gordura; gordos, quando contenham entre 45,0 e 59,9%; semigordo, quando contenham entre 25,0 e 44,9%; magros, quando contenham entre 10,0 e 24,9% e desnatados, quando contenham menos de 10,0%.

✓ De acordo com o conteúdo de umidade, em percentagem, os queijos classificam-se em: queijo de baixa umidade (geralmente conhecidos como queijo de massa dura), com umidade de até 35,9%; queijos de média umidade (geralmente conhecidos como queijo de massa semidura), com umidade entre 36,0 e 45,9%; queijos de alta umidade (geralmente conhecido como de massa branda ou "macios"), cuja umidade pode variar entre 46,0 e 54,9% e queijos de muita alta umidade (geralmente conhecidos como de massa branda ou "mole"), cuja umidade não seja inferior a 55,0%.

Dentre as variedades de queijos, o queijo tipo coalho se destaca na alimentação do brasileiro, principalmente na população da região Nordeste. Segundo a legislação vigente (BRASIL, 1997), entende-se por queijo de coalho, “o queijo que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas e comercializado normalmente com até 10 (dez) dias de fabricação”. Constitui-se em um queijo de média a alta umidade, de massa semicozida ou cozida, apresentando um teor de gordura nos sólidos totais variável entre 35,0% e 60,0% (BRASIL, 1996). Seu nome deve-se ao fato de ter sido tradicionalmente elaborado com leite coagulado pela ação do coalho animal: pedaços do estômago de pequenos animais, que devidamente preparados são conhecidos por abomaso ou coagulador (AQUINO, 1983).

A Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) do Ministério da Agricultura, através do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho, Instrução Normativa nº 30 de 26/06/2001, define este produto como um queijo de consistência semidura e elástica, com textura compacta e macia, podendo apresentar algumas olhaduras. Apresenta cor branca amarelada uniforme, sabor brando, ligeiramente ácido, podendo ser salgado, com aroma, também ligeiramente ácido, que lembra massa de queijo coagulada. Este produto possui

forma cilíndrica ou retangular, com peso entre 0,5 a 1,5 kg, sendo consumido fresco ou curado (BRASIL, 2001).

Tradicionalmente, a origem do queijo de coalho está ligada à fabricação artesanal, fato que ainda persiste em numerosas unidades de produção caseira e de fazendas produtoras, as quais não contam com tecnologia apropriada de manufatura, sendo utilizado o leite cru para a elaboração do produto (NASSU et al., 2001).

A produção de produtos lácteos como queijo de manteiga, manteiga da terra e, em especial, o queijo de coalho, na região Nordeste, representa uma atividade relevante para a economia regional, por ser considerada fonte de renda e de trabalho para parcela considerável de pequenos e médios produtores rurais. Além disso, desempenha importante papel no desenvolvimento da agricultura familiar, em pequenos municípios localizados nas bacias leiteiras. Esses produtos são fabricados em todos estados do Nordeste, mas a maior produção concentra-se nos estados do Pernambuco, Ceará, Rio Grande do Norte e Paraíba (ESCOBAR et al., 2001; CAVALCANTE; ANDRADE; SILVA, 2004). Este tipo de queijo, devido a suas características de consumo e sabor peculiar, tem ganhado novos consumidores em outras regiões do país, principalmente da região Sudeste (CAVALCANTE, 2009).

A legislação para este queijo é muito abrangente e pouco definida, contemplando as variações percebidas na composição físico-química do produto e refletindo na falta de identidade do queijo de coalho. As diferenças na sua composição físico-química podem ser verificadas em vários estados do Nordeste, como no Ceará, onde o queijo é classificado em extra gordo ou duplo creme, gordo e de média umidade com teor médio de proteína em 25,02%, acidez 0,26% e pH 5,2 (NASSU et al., 2001). No Recife, o queijo foi classificado em semigordo e de alta umidade (SENA et al., 2000), em Sergipe, como de alta umidade a muita alta umidade, com índice de acidez variando de 0,3% a 1,71% (SENA et al., 2000) e no estado da Paraíba, como gordo, de média a alta umidade, com teor de proteína variável de 21,78% a 23,47% (AQUINO, 1983). Também foram encontrados teores variáveis de sal de 1,5% a 3,0%, valores médios de cloretos 1,91%, acidez 0,44%, proteína 24,26%, cinzas 4,41% e pH na faixa de 4,9 a 6,37 para as diversas regiões do Ceará (BRANCO et al., 2003; NASSU et al., 2001; SEBRAE, 1998).

Nas últimas décadas houve uma popularização do consumo de leite de cabra e seus produtos, especialmente queijos, são produzidos em todo o mundo, em função da diversidade de localização, composição do leite e técnicas de fabricação utilizadas. Diferenças entre os queijos de leite de cabra são atribuídos principalmente à natureza das mudanças físicas e químicas durante a maturação, que também são influenciados por substâncias químicas, as

culturas ou ingredientes adicionados durante o processamento, processos de moldagem e prensagem, métodos de incorporação de sal, condições e tempo de cura (SORYAL et al., 2004).

Os queijos produzidos com leite de cabra na região Nordeste do Brasil são, em sua maioria, queijos tipo coalho ou frescal. De modo geral, o uso do leite pasteurizado juntamente com o emprego de fermento láctico, no Brasil, tem contribuído de forma significativa para a melhoria da qualidade dos queijos. Entretanto, tal fato não ocorre de forma uniforme em todo o Nordeste brasileiro, em relação aos produtores de queijo de coalho, observando-se, desta forma, diferenças na qualidade do desenvolvimento do sabor e nas características microbiológicas dos produtos, o que indica uma não padronização das características dos queijos elaborados nesta região (OLIVEIRA, 2005).

A fabricação de queijos envolve procedimentos gerais e alguns específicos do tipo de produto. Entre as etapas, ou mesmo durante elas, pode haver variações relativas no tempo de descanso da massa, tempo de mexeduras, diferenças de temperaturas, tempo de dessoragem e, também, diferenças na condição de maturação. Esses fatores determinam a textura, aroma e sabor de cada queijo, influenciando as suas diferenças e características particulares (CURI; BONASSI, 2007).

O leite utilizado na produção de queijos frescos deve, obrigatoriamente, ser pasteurizado. Para aqueles queijos que são submetidos a um período de maturação antes do consumo, o leite utilizado como matéria prima pode ou não ser cru, dependendo do tipo de queijo. A legislação brasileira, porém, exige que produtos derivados de leite cru sejam comercializados somente após quarenta dias de maturação. A tecnologia de fabricação de queijos compreende as seguintes etapas básicas (PERRY, 2004):

1. Coagulação do leite: pode ser feita diretamente pela flora microbiana do leite, ou pela adição de cultivo bacteriano apropriado (coalho ou fermento). Após um período de tempo, o leite fermentado transforma-se na coalhada; 2. Corte da coalhada, para liberação do lacto soro; 3. A massa obtida é colocada em formas e prensada, ou não, dependendo do queijo; 4. O queijo é salgado e, em seguida, embalado.

A função do coalho, utilizado em todos os tipos de queijo, exceto nos frescos, tipo “cottage”, é coagular a caseína presente no leite. A principal enzima responsável por essa ação é a renina, uma fosfoproteína de ação proteolítica presente no estômago de ruminantes jovens, a qual atua hidrolisando ligações peptídicas da caseína, transformando-a em *para*-caseína que precipita em presença de íons Ca^{2+} formando, então, a coalhada. Este processo é dependente da temperatura, do pH e do teor de cálcio do leite. A temperatura ótima de ação

do coalho é em torno de 40 °C, mas costuma-se utilizar temperaturas ligeiramente mais baixas (em torno de 35 °C) para evitar que a coalhada se torne muito rígida. Outro método de coagulação da caseína consiste na adição de ácido ao leite em quantidade suficiente para igualar o pH do meio ao ponto isoelétrico da proteína (pH 4,5). Neste pH, as micelas de caseína agregam-se e precipitam, porém esse método fornece queijos de qualidade inferior aos produzidos pelo método enzimático (PEREDA et al., 2005; PERRY, 2004).

Durante a formação da coalhada podem ser adicionados, conforme a necessidade e o interesse do produtor, aditivos como cloreto de cálcio (CaCl_2), nitratos, corantes, etc. O CaCl_2 aumenta o teor de íons Ca^{2+} no leite, acelerando a coagulação da caseína e auxiliando na formação do coágulo. O CaCl_2 é utilizado, principalmente, quando o teor de proteína no leite não é o ideal (PEREDA et al., 2005; PERRY, 2004).

Com poucas exceções, os queijos contêm entre 0,5-2,0% de cloreto de sódio (NaCl). Durante a salga do queijo, a diferença na pressão osmótica entre a salmoura e a massa faz com que parte da umidade seja liberada, arrastando consigo soro proteínas, ácido láctico e minerais dissolvidos, ao mesmo tempo em que o NaCl é absorvido. Para que este equilíbrio funcione de forma satisfatória torna-se importante que a concentração da salmoura e seu pH sejam apropriados. Além disso, o teor de cálcio do meio deve ser da ordem de 0,1-0,2%, podendo ser ajustado por adição de CaCl_2 , se necessário (PEREDA et al., 2005; PERRY, 2004).

O pH ideal da salmoura utilizada na produção de queijos situa-se entre 5,2 e 5,3. Durante o processo de salga ocorre troca de íons Ca^{2+} por Na^+ nas moléculas de *para*-caseína, o que torna a massa mais macia. Se o pH estiver abaixo de 5,0 haverá mais íons H^+ do que Ca^{2+} ligados às moléculas de *para*-caseína. Em consequência, ocorrerá incorporação insuficiente de íons Na^+ , tornando o queijo mais rígido e quebradiço. Ao contrário, em pH acima de 5,8 haverá excesso de íons Ca^{2+} em relação aos íons H^+ , causando a ocorrência de um excesso de íons Na^+ na molécula após a troca, tornando o queijo demasiado macio. A concentração de NaCl na salmoura deve permanecer entre 18-23% , para temperaturas entre 10-14 °C, de modo a facilitar a absorção do sal, manter um grau ótimo de dissolução da *para*-caseína e eliminar bactérias patogênicas porventura presentes (PEREDA et al., 2005; PERRY, 2004).

A boa qualidade microbiológica do leite, seja ele pasteurizado ou cru, é fundamental para a preparação de queijos de qualidade satisfatória. A utilização de leite de qualidade confiável pressupõe a sua obtenção de animal saudável, adoção de boas práticas de higiene na ordenha e no manuseio do leite, higienização eficiente dos equipamentos e utensílios

utilizados e, finalmente, o resfriamento do leite a temperaturas entre 0-4 °C, no máximo 2 h após a ordenha. Essas práticas permitem que o leite mantenha a qualidade microbiológica por até 72 h, porém não significam ausência de bactérias, visto que o leite é um ótimo meio para crescimento destes micro-organismos (PERRY, 2004).

O leite com níveis de contaminação microbiológica elevados consiste em um problema para a indústria laticinista, uma vez que se torna mais ácido, resultando em produtos de má qualidade e mais perecíveis. O nível de bactérias presentes no leite de boa qualidade deve ser menor que 10^6 bactérias/mL, de acordo com o preconizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2002a). Outro agravante consiste na contaminação do leite por agentes químicos como antibióticos, herbicidas e pesticidas. No caso dos antibióticos, se estes forem administrados ao animal, passarão ao leite e poderão inibir a sua coagulação ou alterar o tempo de maturação dos queijos devido a alterações na microbiota láctica (PERRY, 2004).

Durante a transformação do leite em queijo ocorre, paralelamente, a oxidação da lactose e a redução do oxigênio dissolvido. Em consequência, o interior dos queijos torna-se um ambiente essencialmente anaeróbico onde, portanto, só se multiplicam micro-organismos anaeróbicos. Isso significa que micro-organismos exclusivamente aeróbicos, tais como *Pseudomonas*, *Brevibacterium*, *Bacillus* e *Micrococcus* podem desenvolver-se na superfície dos queijos, mas não em seu interior (BERESFORD; WILLIAMS, 2004).

Do ponto de vista bioquímico, a microbiota dos queijos pode ser dividida em dois grupos: bactérias lácticas iniciadoras (BLI) e micro-organismos secundários. As BLI são responsáveis pela transformação de lactose em ácido láctico durante a preparação do queijo. Suas enzimas também contribuem na maturação, estando envolvidas na proteólise e na conversão de aminoácidos em substâncias voláteis responsáveis pelas propriedades organolépticas do produto (BERESFORD; WILLIAMS, 2004).

Por serem de crescimento rápido, as BLI podem alterar o leite por acidificação em excesso se a sua ação não for controlada; porém, por outro lado, são indispensáveis para a fabricação dos queijos. As BLI podem ser adicionadas no início da produção, ou podem ser utilizadas somente aquelas que já ocorrem naturalmente no leite. Este último caso é normalmente utilizado na fabricação de queijos artesanais a partir de leite não pasteurizado (PERRY, 2004).

Para fabricação de queijos podem-se utilizar culturas definidas - um número conhecido de cepas conhecidas - ou culturas mistas nas quais se tem um número desconhecido de cepas. As culturas mesofílicas utilizadas, definidas ou mistas, são

constituídas principalmente, de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *L. lactis* subsp. *lactis*; por sua vez, as culturas termofílicas mais comuns são compostas de *Streptococcus thermophilus* e bacilos lácticos como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* ou *Lb. helveticus* (PEREDA et al., 2005; PERRY, 2004).

Os micro-organismos secundários compreendem as bactérias lácticas não iniciadoras (BLNI), que se multiplicam no interior da maioria das variedades de queijos, e outras bactérias, leveduras e/ou fungos que crescem, tanto no interior, quanto na parte externa dos queijos. Entre estes micro-organismos estão os proteolíticos, lipolíticos e ou produtores de gás (PERRY, 2004; BERESFORD; WILLIAMS, 2004).

Os micro-organismos proteolíticos provocam alterações no aroma, sabor e características físico-químicas do leite e derivados. Embora sejam indesejáveis, certas bactérias lácticas possuem alguma atividade proteolítica, a qual é importante na maturação dos queijos. Fazem parte deste grupo as espécies de *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium* e *Bacillus*. Associados aos micro-organismos proteolíticos ocorrem os micro-organismos lipolíticos, que podem acarretar problema na rancidez do produto. A maioria dos micro-organismos lipolíticos tem características psicotróficas, e destacam-se os gêneros bacterianos *Pseudomonas* e *Alcaligenes* e alguns fungos, a citar *Candida* e *Geotrichum* (PERRY, 2004).

Os micro-organismos produtores de gás podem produzir efeitos indesejáveis, ou ser fundamentais para que o queijo desenvolva sua textura característica. Algumas vezes, a quantidade destes micro-organismos presentes determina se a ação desempenhada será ou não indesejável para a qualidade final do produto. Alguns dos micro-organismos produtores de gás mais comuns pertencem ao gênero *Clostridium*, *Candida*, *Saccharomyces*, além do grupo dos coliformes, sendo que a presença destes últimos indica falta de higiene adequada no manuseio e processamento dos produtos (PEREDA et al., 2005; PERRY, 2004).

Outro aspecto importante a ser enfatizado consiste na maturação dos queijos, uma série de processos físicos, bioquímicos e microbiológicos, que alteram a composição química dos queijos, principalmente no que concerne ao seu conteúdo de açúcares, proteínas e lipídeos. O tempo de maturação varia para cada tipo de queijo, de modo que é neste processo que se desenvolvem as características organolépticas e de textura peculiares de cada variedade. A maturação de queijos é realizada, na maioria dos casos, em câmaras com controle de temperatura e umidade. O tempo varia de acordo com o tipo, podendo durar de poucas semanas a vários meses. Os principais contribuintes da maturação são o coalho,

proteases e peptidases do fermento láctico e/ou microbiota secundária e enzimas naturais do leite (PEREDA et al., 2005; PERRY, 2004).

Tradicionalmente, o índice de maturação é medido pela degradação de caseína, através da avaliação da proporção entre nitrogênio total e nitrogênio solúvel, assim denominado o nitrogênio oriundo de matéria orgânica. A proteólise é efetuada pelos sistemas enzimáticos do coalho e é fator preponderante para a qualidade do queijo, sobretudo nos aspectos de sabor e consistência. A hidrólise da proteína retida no coágulo (basicamente caseínas) resulta inicialmente em grandes peptídeos, posteriormente em pequenos peptídeos e, finalmente, em aminoácidos livres (McSWEENEY, 2004), sendo que os grandes peptídeos formados são normalmente insípidos ou amargos e não contribuem diretamente para o sabor típico do queijo. No entanto, a mistura de pequenos peptídeos e aminoácidos influencia diretamente o desenvolvimento de sabor (FARKYE, 2004). Indiretamente também contribuem porque atuam como precursores de reações catabólicas (via desaminação ou descarboxilação, ou pela ação de aminotransferase ou liase) que resultam na formação de compostos de sabor como aminas, ácidos, tióis e tioésteres, que são únicos para cada variedade de queijo e dependentes do tipo de enzimas e micro-organismos presentes (PRIETO et al., 2004).

Os principais agentes proteolíticos envolvidos no processo de proteólise são o coagulante residual; as proteinases naturais do leite; as proteinases e peptidases liberadas a partir da lise das células das bactérias ácido lácticas, provenientes da cultura láctica; as proteinases e peptidases liberadas pelas bactérias ácido lácticas não provenientes da cultura láctica (contaminantes ou sobreviventes ao tratamento térmico aplicado); e as enzimas das bactérias provenientes do fermento secundário (FOX, 1989).

As alterações de textura durante a maturação estão relacionadas com a hidrólise da matriz de caseína, aumento de pH (devido à formação de NH_3) e decréscimo da atividade de água causada pelo aumento da retenção de água pelos novos grupos aminos e carboxílicos formados durante a degradação da proteína (McSWEENEY, 2004).

Logo, a concentração dos diferentes aminoácidos contidos no queijo está relacionada com a tecnologia de manufatura (tipo de cultura láctica, de coagulante, teores de umidade e sal), tempo e temperatura de maturação, tipo e extensão da proteólise utilizada como índice de maturidade do queijo e envolve a separação, quantificação e caracterização dos compostos nitrogenados (N) formados durante a maturação (POVEDA; CABEZAS; McSWEENEY, 2004).

A extensão da proteólise deve-se, principalmente, à ação proteolítica do coalho sobre as caseínas do queijo produzindo peptídeos de alto peso molecular, constituindo a fração

solúvel em pH 4,6; enquanto a profundidade da proteólise se refere principalmente à ação de proteinases e peptidases providas de bactérias ácido lácticas, produzindo peptídeos de baixo peso molecular e que constituem a fração solúvel em ácido tricloroacético a 12% (FOX, 1989).

Não existe uma correlação direta entre o aroma dos queijos e a concentração de aminoácidos livres. Sabe-se, no entanto, que estes compostos podem ser metabolizados por enzimas bacterianas produzindo produtos menores, entre os quais flavorizantes. Perry (2004), por exemplo, relata que *Brevibacterium linens* produz amônia, aminas, álcoois, aldeídos e os ácidos capróico e 3-metilbutírico a partir de aminoácidos. Todos esses produtos influenciam, em maior ou menor grau, o sabor e o aroma dos queijos. Produtos da degradação de aminoácidos contendo enxofre desempenham papel particularmente importante. L-metionina, por exemplo, pode ser degradada a S-metiltioésteres e metanotiol ao qual se atribui o odor característico de queijos como Gruyère e Comté. Já o sabor amargo que, às vezes, se observa em alguns queijos é atribuído à liberação excessiva de peptídeos de baixo peso molecular.

O principal açúcar dos queijos é a lactose e sua degradação, conhecida como fermentação láctica, ocorre também na maturação, tendo como produto final o ácido láctico. Tal degradação é efetuada por bactérias naturalmente presentes no leite e deve ser controlada tanto em extensão, quanto em velocidade. A produção de ácido continua após estágios primários da maturação, para a maioria das variedades, causando um decréscimo no pH que pode chegar a 5,0 em um intervalo de 12 a 24 horas, a partir do início da fabricação (FOX; LAW, 1991). A diminuição do pH é importante na qualidade final do queijo, visto que evita o desenvolvimento da microflora secundária indesejável (McSWEENEY, 2004). A concentração de lactose residual da massa depende das condições de manufatura, do tipo e atividade do fermento e, especialmente, da relação entre sal e umidade (FARKYE; FOX, 1990). Em geral, aproximadamente 98% da lactose do leite são perdidos no soro, permanecendo na massa somente 0,5% a 1,8%, que é rapidamente metabolizado em L-lactato pelas bactérias ácido lácticas providas da cultura iniciadora (FOX; LAW, 1991).

Durante o processo de maturação ocorre ainda a lipólise das gorduras com formação de ácidos graxos de baixo peso molecular. Tais reações ocorrem por ação dos micro-organismos presentes e/ou através de enzimas adicionadas especificamente para esse fim. Os principais ácidos formados são butírico, capróico, caprílico, cáprico e láurico, de modo que a sua proporção relativa varia de acordo com o agente lipolítico utilizado, o qual, por sua vez, é escolhido de acordo com o tipo de queijo a ser produzido. Desta forma, a gordura tem importante papel na obtenção da textura e sabor dos queijos, pela presença destes compostos

ou até mesmo pelas transformações bioquímicas que resultam na formação de outros compostos flavorizantes, como cetonas, metil-cetonas e lactonas (SABIONI, 2000).

4.3 ALIMENTOS FUNCIONAIS: PROBIÓTICOS

O efeito benéfico de determinados tipos de alimentos sobre a saúde do hospedeiro é conhecido há muito tempo. O estudo desses alimentos, denominados funcionais, e dos componentes responsáveis por esse efeito, tornou-se intenso com o surgimento das novas tecnologias, como a biotecnologia, engenharia genética, processamento de alimentos, inovações de produtos e produção em massa, o que habilitaram os cientistas de alimentos a planejar novos produtos (OLIVEIRA et al., 2002). Há em todo o mundo um crescente interesse pelo conhecimento do papel desempenhado por alimentos que contêm componentes que influenciam em atividades fisiológicas ou metabólicas, ou que sejam enriquecidos com substâncias isoladas de alimentos que possuam uma destas propriedades, os quais estão sendo chamados "alimentos funcionais".

São vários os fatores que vêm estimulando o desenvolvimento de alimentos funcionais, dentre eles, destacam-se, principalmente, o aumento da expectativa de vida em países desenvolvidos (cujas populações necessitarão de cuidados hospitalares por maior período de tempo), o elevado custo dos serviços de saúde, os avanços na tecnologia de alimentos e ingredientes, a necessidade que as instituições públicas de pesquisa têm em divulgarem os resultados de suas investigações e a maior cobertura dos diferentes tipos de mídia dada a essas descobertas e às questões de saúde (ARVANITOYANNIS; HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLU, 2005).

Naturalmente, todos os alimentos são funcionais, uma vez que nos proporcionam sabor, aroma e valor nutritivo. Entretanto, nas últimas décadas, o termo funcional está sendo aplicado a alimentos com características diferenciadas, as quais proporcionam um benefício fisiológico adicional, além das qualidades nutricionais básicas encontradas. Tais alimentos também são vistos como promotores de saúde e podem estar associados à redução do risco a certas doenças (VO; KIM, 2013). Entretanto, alguns estudos esclarecem que estes produtos isoladamente não podem garantir uma boa saúde, mas apenas melhorar a saúde quando fazem parte de uma dieta contendo uma variedade de alimentos, incluindo frutas, vegetais, grãos e legumes (VIEIRA; CORNÉLIO; SALGADO, 2007).

Alimento funcional é definido pela Secretaria de Vigilância Sanitária, do Ministério da Saúde, como sendo "aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutritivas básicas,

quando consumido como parte da dieta usual, produza efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica" (RDC nº 18/99) (BRASIL, 1999b).

O termo “alimentos funcionais” foi inicialmente definido no Japão, em meados da década de 80, como alimentos similares em aparência aos alimentos convencionais, usados como parte de uma dieta normal, e que demonstram benefícios fisiológicos e/ou reduzem o risco de doenças crônicas, além de suas funções básicas nutricionais. O consumo regular de alimentos funcionais pode, potencialmente, reduzir as chances de ocorrência de certos cânceres, doenças do coração, osteoporose, problemas intestinais e muitos outros problemas de saúde (BRANDÃO, 2002; SAAD et al., 2013).

O caráter funcional pode ser atribuído a uma qualidade inerente à matéria prima ou uma característica implementada através de tecnologias de processamento inovadoras ou a adição de ingredientes promotores da saúde, como os probióticos, à matriz alimentar, sendo que as indústrias sempre buscaram ofertar novos produtos com foco neste nicho emergente de mercado (BISTROM; NORDSTROM, 2002).

Uma definição bastante abrangente é proposta por Sgarbieri e Pacheco (1999): "qualquer alimento, natural ou preparado, que contenha uma ou mais substâncias, classificadas como nutrientes ou não nutrientes, capazes de atuar no metabolismo e na fisiologia humana, promovendo efeitos benéficos, para a saúde, podendo retardar o estabelecimento de doenças crônico-degenerativas e melhorar a saúde e a expectativa de vida das pessoas". Como os benefícios saudáveis oferecidos por esses produtos são determinados pelos ingredientes utilizados nas formulações, destacam-se algumas classes reconhecidas como favorecedoras da saúde: fibras alimentares, oligossacarídeos, proteínas e peptídeos, vitaminas, antioxidantes, minerais, ácidos graxos polinsaturados (PUFAs), isoflavonas e outros flavonoides, e bactérias ácido lácticas (VIEIRA; CORNÉLIO; SALGADO, 2007).

No Quadro 3 são enumerados os aditivos alimentares considerados potencialmente funcionais, bem como os efeitos funcionais atribuído.

Quadro 3 - Principais aditivos alimentares com potencial funcional.

Aditivos alimentares com potencial funcional	Efeito atribuído
fibra de soja, bactérias probióticas, pectina	Redução do colesterol
β -caroteno, extratos de alho, esteroides, compostos fenólicos, “psyllium”	Combate a problemas cardíacos

alho, chá verde, bactérias probióticas, “psyllium”	Anti-carcinógenos
ácido g-aminobutírico, pectina	Anti-hipertensivo
cálcio, boro, fosfopeptídios de caseína	Prevenção da osteoporose
ácidos graxos ω -3, extratos de gengibre, colágeno	Prevenção da artrite
licopeno, frutas e verduras contendo anti-oxidantes	Alteração do dano oxidativo
bactérias probióticas, zinco ionizado, extrato de “elderberry”	Agentes anti-infecciosos

Fonte: Adaptado de Sanders, 1998.

A suplementação de componentes com atividade reconhecidamente benéfica à saúde, como cálcio e vitaminas, constituíam os alimentos funcionais de primeira geração. Por outro lado, esse conceito voltou-se principalmente para aditivos alimentares, que podem exercer efeito benéfico sobre a composição da microbiota intestinal. Os prebióticos e os probióticos são os aditivos alimentares que compõem esses alimentos funcionais (SAAD, 2006).

As culturas probióticas têm sido utilizadas no desenvolvimento de produtos funcionais, nos quais os micro-organismos probióticos atuam como agentes tecnológicos, melhorando as características do produto tradicional, tal como a redução da pós-acidificação, e como agentes terapêuticos, promovendo efeitos benéficos nos indivíduos que os ingerem. Para isso, o micro-organismo utilizado deve apresentar comprovação dos efeitos benéficos e se apresentar em concentração suficiente para sua atuação durante toda a vida de prateleira do produto (MORETTI, 2009).

Os probióticos são definidos como micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2002b). Considerando, como é admitido comumente, que a fermentação pode melhorar a digestibilidade de alimentos e produzir vitaminas e co-fatores nos produtos alimentícios, as bactérias probióticas têm um efeito benéfico na saúde humana (GILLILAND, 1989).

Holzapfel et al. (1998) optam pela definição de probióticos proposta por Havenaar et al. (1992), a qual define probióticos como culturas puras ou mistas de micro-organismos vivos (bactérias lácticas e outras bactérias ou leveduras aplicadas como células secas ou em um produto fermentado) que quando aplicadas aos animais ou ao homem, tem efeitos benéficos ao hospedeiro promovendo o balanço de sua microbiota intestinal. Os autores discutem que esta definição é mais ampla e vantajosa, pois não restringe os efeitos probióticos à microbiota intestinal, mas também às comunidades microbianas de outras partes do corpo.

Segundo Leroy, Verluyten e Vuyst (2006) e Ammor e Mayo (2007), os probióticos necessitam ser ingeridos em quantidades suficientes para exercerem efeito benéfico sobre a

fisiologia e saúde do hospedeiro. Vários efeitos benéficos à saúde estão associados com o consumo de probióticos, como melhoria do trânsito intestinal, facilitando a digestão; alívio dos sintomas de intolerância à lactose; melhoria da absorção de determinados nutrientes; aumento da resposta imune, pelo estímulo da produção de anticorpos e da atividade fagocítica contra patógenos no intestino e em outros tecidos do hospedeiro; redução dos episódios de diarreia; controle das infecções intestinais; prevenção ou supressão de câncer de cólon; redução do colesterol sanguíneo; além da exclusão competitiva e da produção de compostos antimicrobianos (SANDINE et al., 1972; GILLILAND, SPECK, 1977; KIM, GILLILAND, 1983; FULLER, 1989; GILLILAND, 1989; TEJADA-SIMON et al., 1999; LEE et al., 1999; GOMES, MALCATA, 1999; SHORTT, 1999; SREEKUMAR, HOSONO, 2000; NAIDU, CLEMENS, 2000; HEENAN; ADAMS; HOSKEN, 2002; NOMOTO, 2005; SINGH et al., 2011).

Para ser considerado como probiótico o micro-organismo deve necessariamente sobreviver às condições adversas do estômago e colonizar o intestino, mesmo que temporariamente, por meio da adesão ao epitélio intestinal (HUANG; ADAMS, 2004; KAILASAPATHY; CHIN, 2000).

Em condições normais, inúmeras espécies de bactérias estão presentes no intestino, as quais em sua maioria são anaeróbias estritas (LEE et al., 1999). A microbiota intestinal exerce influência considerável sobre uma série de reações bioquímicas do hospedeiro. Paralelamente, quando em equilíbrio, impede que micro-organismos potencialmente patogênicos presentes exerçam seus efeitos patogênicos. Por outro lado, o desequilíbrio dessa microbiota pode resultar na proliferação de patógenos, com consequente infecção bacteriana (ZIEMER; GIBSON, 1998).

A microbiota saudável é definida como a microbiota normal que conserva e promove o bem estar e a ausência de doenças, especialmente do trato gastrointestinal. A correção das propriedades da microbiota autóctone desequilibrada constitui a racionalidade da terapia por probióticos (ISOLAURI; SALMINEN; OUWEHAND, 2004). A influência benéfica dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana inclui fatores como os efeitos antagônicos e a competição contra micro-organismos indesejáveis e os efeitos imunológicos (PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002). Dados experimentais indicam que diversos probióticos são capazes de modular algumas características da fisiologia digestiva, como a imunidade da mucosa e a permeabilidade intestinal (FIORAMONTI; THEODOROU; BUENO, 2003). A ligação de bactérias probióticas aos receptores da superfície celular dos enterócitos também

dá início às reações em cascata que resultam na síntese de citocinas (KAUR; CHOPRA; SAINI, 2002).

Os micro-organismos benéficos podem ser aplicados principalmente em bebidas lácteas, mas também em produtos à base de cereais, fórmulas para alimentação infantil, sucos de frutas, sorvetes e produtos cárneos (COSTA et al., 2013; ERKKILÄ et al., 2001; LEANDRO et al., 2013; MAKINEN et al., 2012; PAPAMANOLI et al., 2003; RANADHEERA et al., 2013; RUIZ-MOYANO et al., 2008; YING et al., 2013). Dentre os probióticos, as culturas mais comumente utilizadas são constituídas por micro-organismos produtores de ácido láctico, em particular lactobacilos e bifidobactérias, que são adicionados a produtos lácteos fermentados ou comercializados na forma liofilizada (ANAL; SINGH, 2007).

Os lactobacilos constituem um importante grupo de bactérias ácido lácticas, estando amplamente difundidos na natureza. Muitas espécies têm aplicações na indústria de alimentos, sendo utilizadas como culturas iniciadoras em leites fermentados, queijos e soro de leite (PRASAD; GHODEKER, 1991). O gênero *Lactobacillus* é, certamente, o mais amplo dos gêneros incluídos dentro deste grupo, sendo que diversas espécies já foram relatadas por vários autores como produtoras de substâncias antimicrobianas (RACCACH; McGRATH; DAFTARIAN, 1989; EL-ZINEY et al., 1999; ZAMFIR et al., 2000; AHMADOVA et al., 2013). Tais substâncias ajudam na manutenção da qualidade do produto lácteo processado, suprimindo o crescimento tanto de micro-organismos deteriorantes, quanto de bactérias potencialmente patogênicas (GILLILAND; SPECK, 1977; PRASAD; GHODEKER, 1991; SAMESHIMA et al., 1998; PAN et al., 2009). Sobre este aspecto, alguns ácidos, principalmente ácido láctico e acético, são utilizados como conservantes de alimentos, inibindo o crescimento de micro-organismos contaminantes e patogênicos (VAN NETTEN; MOSSEL; HUIS IN'T VELD, 1997; SILVA, 1999; CASTILLO et al., 2001).

Fuller (1989) enumerou três possíveis mecanismos de atuação dos probióticos, sendo o primeiro deles a supressão do número de células viáveis mediante produção de compostos com atividade antimicrobiana, a competição por nutrientes e a competição por sítios de adesão. O segundo desses mecanismos seria a alteração do metabolismo microbiano, pelo aumento ou diminuição da atividade enzimática. O terceiro seria o estímulo da imunidade do hospedeiro, por meio do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos. Segundo Naidu e Clemens (2000), o espectro de atividade dos probióticos pode ser dividido em efeitos nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos.

De uma maneira geral, os papéis das bactérias probióticas em fermentações lácticas são auxiliar na (i) conservação do leite através da produção de ácido lático e, possivelmente, compostos antimicrobianos; (ii) na produção de compostos de sabor e aroma (como por exemplo o acetaldeído em iogurtes e queijos) e outros metabólitos (tal como polissacarídeos extracelulares) que fornecerão um produto com propriedades sensoriais desejáveis pelo consumidor; (iii) na melhora do valor nutricional do alimento, como, por exemplo, através da liberação de aminoácidos livres ou da síntese de vitaminas; e (iv) na provisão de propriedades terapêuticas e profiláticas especiais para prevenção de câncer e controle dos níveis de colesterol sérico (PARVEZ et al., 2006).

Para que os benefícios à saúde produzidos por bactérias probióticas sejam obtidos, é necessária a ingestão de uma dose diária de 10^8 a 10^{10} UFC/g ou mL de alimento (REID et al., 2003). Assim, considerando um consumo de produtos lácteos de 100 g, estes devem conter pelo menos 10^6 a 10^7 UFC/g de bactérias probióticas viáveis no momento da compra do produto e dentro do seu prazo de validade (ANVISA, 2001; ANVISA, 2007; MARUYAMA et al., 2006; RYBKA; FLEET, 1997; VINDEROLA; RENHEIMER, 2000). Logo após a ingestão de alimentos probióticos, as bactérias são encontradas distribuídas em regiões específicas do trato intestinal, de acordo com as condições de cada região, como disponibilidade de nutrientes, pH, potencial redox, fatores químicos e físicos. Em função disso, os lactobacilos colonizam o intestino delgado, enquanto as bifidobactérias colonizam o intestino grosso (HOLZAPFEL et al., 1998).

A seleção de bactérias probióticas tem como base os seguintes critérios preferenciais: o gênero ao qual pertence, visto que a bactéria deve ser de origem humana; a estabilidade frente ao ácido e à bile; a capacidade de aderir à mucosa intestinal; a capacidade de colonizar, ao menos temporariamente, o trato gastrointestinal humano; a capacidade de produzir compostos antimicrobianos; e ser metabolicamente ativo no nível do intestino. Ainda, deve ser considerada a segurança para uso humano, o histórico de não patogenicidade e não devem estar associadas a outras doenças, tais como endocardite, além da ausência de genes determinantes da resistência aos antibióticos (COLLINS; THORNTON; SULLIVAN, 1998; LEE et al., 1999; SAARELA et al., 2000). Adicionalmente, as espécies devem ter capacidade de fermentar e acidificar o leite até um valor de pH entre 4,4 e 4,6 em um tempo de no máximo 14 a 16 horas e apresentar atuação benéfica nas características sensoriais dos produtos (KAPITULA; KLEBUKOWSKA; KORNACKI, 2008).

A viabilidade e a atividade das bactérias probióticas são considerações importantes visto que devem sobreviver no alimento durante sua vida de prateleira e durante o trânsito sob

condições ácidas no estômago e resistir à degradação pelas enzimas hidrolíticas e sais biliares (VASILJEVIC; SHAH, 2008). Segundo Gueimond et al. (2004) e Kapitula, Klebukowska e Kornacki (2008), a viabilidade e a atividade das culturas probióticas podem ser afetadas pelos seguintes fatores:

- ✓ *Durante a produção de preparações probióticas:* presença de ácidos orgânicos durante o cultivo, concentração (alta pressão osmótica, baixa atividade de água, alta concentração de alguns íons), temperatura (congelamento, vácuo e secagem atomizada), estocagem prolongada (exposição ao oxigênio e oscilação de temperatura);
- ✓ *Durante a produção de um produto contendo probióticos:* escassez de nutrientes, antagonismo por alguma espécie, aumento na acidez, potencial redox positivo (presença de oxigênio), presença de compostos antimicrobianos (por exemplo, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas) e temperatura de estocagem;
- ✓ *Durante o trânsito gastrointestinal:* ácidos e sucos gástricos, sais biliares e antagonismo microbiano.

Segundo o *Food and Drug Administration* (FDA), algumas bactérias são permitidas para o emprego em alimentos e entre elas estão as probióticas. Entre os micro-organismos empregados como probióticos, destacam-se as bactérias pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* e, em menor escala, as bactérias *Enterococcus faecium* e *Streptococcus thermophilus*. Dentre as bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*, destacam-se *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum* e *B. thermophilum* (SAAD, 2006; SANDERS, KLAENHAMMER, 2001).

Dentre as bactérias lácticas pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, destacam-se *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. casei* - subsp. *Paracasei* e subsp. *tolerans*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius* (COLLINS; THORNTON; SULLIVAN, 1998; LEE et al., 1999; SAAD, 2006; SANDERS, KLAENHAMMER, 2001).

Apesar das culturas probióticas de *Lactobacillus* sp. e de *Bifidobacterium* sp. serem consideradas GRAS (GENERALLY RECOGNIZED AS SAFE), é necessária a determinação da segurança na utilização da cepa antes do lançamento e da divulgação de um novo produto (SALMINEN et al., 1998; O'BRIEN et al., 1999).

4.4 QUEIJOS COMO VEÍCULO DE MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS

Em tecnologia alimentar, procura-se desenvolver novos produtos com elevada qualidade, sendo possuidor de grande valor acrescentado, como os alimentos funcionais (ou nutracêuticos). Neste âmbito, segundo Gomes e Malcata (1999), o aumento do valor nutritivo e terapêutico trazido pelas bifidobactérias tornou-as alvo preferencial de uma série de programas de investigação aplicada; gerou-se, então, um interesse considerável no sentido da incorporação das bifidobactérias em determinados alimentos, tendo sido muitos os produtos introduzidos no mercado como veículos para tais agentes probióticos, entre eles alimentos infantis, leites fermentados, queijos e outros produtos lácteos.

As espécies mais utilizadas para a obtenção destes produtos são de origem humana, como, por exemplo, *Bifidobacterium adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum* (a mais comum e com maior êxito), *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* subsp. *rhamnosus* e *Enterococcus faecium* (GOMES; MALCATA, 1999; SAAD, 2006); considera-se que tais espécies reúnem as condições mais adequadas para fazer face às necessidades fisiológicas do hospedeiro, podendo mais facilmente colonizar o intestino. Outros estudos apontam para o uso de estirpes de origem animal, considerando que estas estirpes são de mais fácil cultivo e mais resistentes às condições adversas prevalentes nos processos industriais, como baixos valores de pH e presença de oxigênio. A estirpe *B. lactis* demonstra um satisfatório potencial como aditivo alimentar, além de efeito benéfico desencadeado após a sua ingestão (KLAVER; KINGMA; WEERKAMP, 1993) e boa tolerância a ácidos e ao oxigênio molecular (GOMES; MALCATA et al., 1998a, b).

As estirpes probióticas podem ser adicionadas como cultura única, ou em conjunto com outras bactérias lácticas, durante a fermentação, ao produto final já fermentado ou ainda ao produto fresco antes da respectiva distribuição. Os queijos são produtos com características peculiares que conferem proteção às bactérias probióticas contra a ação do oxigênio, baixo pH e sais biliares, durante a sua passagem pelo trato gastrointestinal. Esse conjunto de características, o qual inclui, entre outros, pH próximo ao neutro, atividade de água normalmente elevada (dependendo, obviamente, da quantidade de sal do queijo e das condições de maturação, no caso de ser um produto maturado), matriz sólida (que facilita a “inserção da bactéria”) e concentração relativamente elevada de gordura, leva a proposição que esses produtos sejam mais adequados como veículos para os probióticos quando comparado aos leites fermentados e iogurtes. Por outro lado, alguns queijos apresentam um período de maturação muito longo, o que dificulta a sobrevivência de micro-organismos

probióticos (GARDINER et al., 1998; STANTON et al., 1998; DAIGLE et al., 1999; CORBO et al., 2001; HELLER et al., 2003; BOYLSTON et al., 2004; BERGAMINI et al., 2005).

Assim como ocorre com praticamente todos os outros produtos alimentícios, os principais pontos relacionados a modificações nos processos de elaboração de queijos podem sucumbir quanto à sua eficiência, qualidade, sabor, segurança, saúde e nutrição. No caso específico dos queijos elaborados com a adição de culturas probióticas, o produto deve garantir uma concentração razoável de probióticos no momento do consumo para que, ao final do trato gastrointestinal, se apresente em doses benéficas à saúde. Estudos com diferentes tipos de queijos mostraram variações em seu período máximo de armazenamento, quando considerada a viabilidade das bactérias probióticas (ROSS et al., 2000).

Diversos tipos de queijo foram testados como veículos para cepas probióticas de *Lactobacillus* e de *Bifidobacterium*, revelando-se apropriados. Dentre os queijos testados para esse fim, destacam-se os queijos Cheddar (DINAKAR, MISTRY, 1994; GARDINER et al., 1998), Gouda (GOMES; VIEIRA; MALCATA, 1998), Cottage (BLANCHETTE et al., 1996), Crescenza (GOBBETTI et al., 1997) e queijo fresco (ROY; MAINVILLE; MONDOU, 1997; VINDEROLA; REINHEIMER, 2000), incluindo o Minas frescal (BURITI et al., 2005; BURITI, ROCHA, SAAD, 2005; SOUZA et al., 2008).

Em estudo com queijo tipo Cheddar, utilizando a cepa probiótica *Enterococcus faecium*, Gardiner et al. (1999) relataram que esse queijo demonstrou melhor capacidade tamponante, oferecendo melhor proteção à cultura probiótica no que diz respeito à exposição ao suco gástrico, quando comparado ao iogurte. Os autores concluíram que o queijo Cheddar é tão ou mais eficiente que o iogurte como veículo de micro-organismos probióticos viáveis no trato gastrointestinal de suínos, mesmo após 15 meses de fabricação. Por outro lado, as cepas de *L. salivarius* testadas não sobreviveram ao processo de maturação do queijo (GARDINER et al., 1998). Essas constatações reforçam a necessidade de se estudar cada cepa, em particular, em produtos alimentícios específicos candidatos a serem usados como veículos de micro-organismos probióticos.

Daigle et al. (1999) relataram um estudo com queijo semelhante ao Cheddar produzido com leite micro filtrado, o qual foi padronizado por meio da adição de creme, enriquecido com retentato de fosfocaseinato e fermentado com *Bifidobacterium infantis* (concentração inicial de 10^7 e 10^8 UFC/g de creme). Os autores obtiveram contagens de bifidobactéria em níveis acima de 10^6 UFC/g durante, pelo menos, 12 semanas. Paralelamente, não foram observados efeitos da cultura sobre as características organolépticas dos queijos. A adição de

Lactobacillus helveticus WSU19 ao mesmo tipo de queijo contribuiu para uma melhoria do sabor do produto após 6 meses de armazenamento (DRAKE et al., 1996).

Gardiner et al. (2002) estudaram a utilização de uma cultura submetida à secagem em *spray-dryer* na produção de queijo Cheddar probiótico. Os autores relataram que a população inicial (dia 0) de *L. paracasei* NFBC 338 passou de 2×10^7 UFC/g para $7,7 \times 10^7$ UFC/g após 3 meses de maturação do queijo. Resultados de Ong, Henriksson e Shah (2006) também mostraram que o queijo cheddar é um veículo efetivo de micro-organismos probióticos. Por outro lado, em queijo Cottage, *B. infantis* sobreviveu de forma satisfatória nos 10 primeiros dias de armazenamento, não sendo, entretanto, detectado aos 28 dias (BLANCHETTE et al., 1996).

A incorporação de três cepas probióticas - *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum* - ao queijo Crescenza foi testada, sendo observado que a adição de *Bifidobacterium* sp. afetou as características de textura do queijo. O queijo adicionado de *B. bifidum* diferiu significativamente do queijo controle (padrão) em relação ao sabor. A intensidade do sabor dos queijos com *B. bifidum* e *B. longum* adicionados individualmente foram ligeiramente maiores, em comparação ao controle (GOBBETTI et al., 1997).

O tempo de armazenamento de diferentes queijos contendo probióticos estudados varia, principalmente, em função do tipo de queijo produzido (maturado ou fresco, período e temperatura de maturação), da cultura adicionada e do seu inóculo. Assim, a sobrevivência de *B. lactis* e de *L. acidophilus* em queijo Gouda foi de 9 semanas (GOMES; VIEIRA; MALCATA, 1998); de *B. bifidum* Bb02 e de *B. longum* Bb46 em queijo Canestrato-Pugliese foi de 56 dias (CORBO et al., 2001); de *L. acidophilus* e de *Bifidobacterium* sp. em queijo maturado *Festivo* com teor reduzido de gordura foi de 16 semanas (RYHÄNEN; PIHLANTO-LEPPÄLÄ; PAHKALA, 2001); de *B. breve* e de *B. longum* em queijo fresco foi de 15 dias (ROY; MAINVILLE; MONDOU, 1997); de uma combinação de cepas de *B. bifidum* e *L. acidophilus* em queijo fresco argentino foi de 60 dias (VINDEROLA et al., 2000) e de *L. acidophilus* e de *L. paracasei* em queijo fresco minas frescal foi de 21 dias (JURKIEWICZ, 1999; BURITI et al., 2005; BURITI; ROCHA; SAAD, 2005; SOUZA et al., 2008).

No Brasil, estudos realizados com queijo minas frescal revelaram populações de probióticos superiores a 10^6 UFC/g durante o armazenamento refrigerado do produto por até 21 dias. O queijo mostrou-se veículo apropriado para *L. paracasei* LBC-82 (BURITI et al., 2005), *L. acidophilus* La-5 (BURITI; ROCHA; SAAD, 2005), cultura ABT – *L. acidophilus*

La-5 + *B. animalis* Bb-12 + *Streptococcus thermophilus* (BURITI et al., 2007b) e *L. acidophilus* La-5 + *S. thermophilus* (SOUZA et al., 2008).

A viabilidade de *L. acidophilus*, assim como de *L. paracasei* em queijo minas frescal foi ligeiramente favorecida em queijos adicionados da cultura *starter* tipo O, composta por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, comparada à viabilidade em queijos acidificados diretamente com ácido láctico. Entretanto, os queijos com a cultura O apresentaram características sensoriais e de textura instrumental mais desfavoráveis, em virtude da diminuição excessiva de pH ao final do período de armazenamento (BURITI et al., 2005; BURITI; ROCHA; SAAD, 2005).

Estudos com queijos *petit-suisse*, produzidos com massa-base de queijo quark contendo a cultura *starter* de *S. thermophilus* e os probióticos *L. acidophilus* e *B. lactis*, também foram realizados neste tipo de queijo. Maruyama et al. (2006) verificaram que as populações de probióticos mantiveram-se acima de 6,4 log UFC/g para *L. acidophilus* Lac4 e de 7,3 log UFC/g para *B. animalis* subsp. *lactis* BL04 (anteriormente classificada como *B. longum*), em diferentes formulações de queijo *petit-suisse* contendo combinações das gomas xantana, guar, carragena e pectina. Trabalhando com as mesmas cepas, Cardarelli et al. (2008) observaram, em queijos *petit-suisse* simbióticos contendo os prebióticos inulina, oligofrutose e/ou mel, que *L. acidophilus* e *B. lactis* estiveram sempre superiores a 6 log UFC/g e a 7 UFC/g, respectivamente, com o melhor desempenho apresentado por *B. lactis* durante todo o armazenamento (28 dias).

O emprego de *L. paracasei* em co-cultura com *S. thermophilus* em queijo fresco cremoso simbiótico foi estudado por Buriti, Cardarelli e Saad (2007) e Buriti et al. (2007a). Buriti, Cardarelli e Saad (2007) verificaram populações acima de 7 log UFC/g de *L. paracasei* durante 21 dias de armazenamento dos queijos simbióticos e probióticos, produzidos, respectivamente, com e sem a adição da fibra prebiótica inulina. No mesmo estudo, os micro-organismos *L. paracasei* e *S. thermophilus* em co-cultura contribuíram para a bioconservação dos queijos probióticos e simbióticos, tendo sido efetivos na inibição de contaminantes, incluindo coliformes totais, *Staphylococcus* sp. e *Staphylococcus* DNase positivos (BURITI; CARDARELLI; SAAD, 2007). Adicionalmente, a fibra inulina melhorou as características sensoriais dos queijos simbióticos (BURITI; CARDARELLI; SAAD, 2008), não tendo sido degradada pelas culturas presentes durante o armazenamento do produto (BURITI et al., 2007a).

Em estudos realizados com queijo Minas frescal fabricado com 1% de cultura probiótica composta por *S. thermophilus*, *B. lactis* e *L. acidophilus* e mantido armazenado

durante 21 dias a 8,5 °C, a viabilidade de *L. acidophilus* permaneceu estável nos 14 primeiros dias, aumentando ligeiramente após 21 dias. A contagem de probióticos foi de $1,3 \times 10^6$ a $3,4 \times 10^7$ UFC/g, enquanto a de *S. thermophilus* variou de $3,8 \times 10^8$ a $8,0 \times 10^8$ UFC/g (OLIVEIRA et al., 1996; OKAZAKI et al., 2001).

Cichoski et al. (2008) em estudo com adição de probióticos ao queijo prato obtiveram melhor desenvolvimento das bactérias ácido lácticas, maiores valores de pH e lactose, e baixa acidez, quando comparado ao queijo produzido com as culturas lácteas tradicionais.

Gomes e Malcata (1999) relataram que o processamento de queijo de leite de cabra com adição das culturas probióticas *Bifidobacterium lactis* e *L. acidophilus* pode ser empregado para a obtenção de um queijo com boas características de sabor e textura. Os autores observaram que a sobrevivência das cepas probióticas mostrou-se dependente das características físico-químicas do queijo, mas que as contagens finais desses micro-organismos revelaram-se acima do limiar aceitável para o efeito probiótico (10^6 UFC/g).

Outras pesquisas evidenciam o efeito protetor de alguns alimentos, incluindo diferentes tipos de queijos, no que diz respeito à sobrevivência de várias cepas probióticas frente às condições gastrintestinais simuladas. Dentre os alimentos testados para esse fim, destacam-se suco de frutas (CHAMPAGNE; GARDNER, 2008); extrato de semente de uva (LAURENT; BESANCON; CAPORICCIO, 2007); matrizes de soro de queijo (MADUREIRA et al., 2005; MADUREIRA et al., 2011a) e salame ibérico (RUIZ-MOYANO et al., 2008).

Além disso, evidenciando o potencial probiótico de algumas estirpes bacterianas, alguns estudos *in vitro* ainda mostram o potencial destas bactérias no que diz respeito à atividade antimicrobiana, estabelecidas pela ação de diferentes compostos sintetizados quando estas culturas são adicionadas a uma matriz alimentar, inibindo o crescimento de micro-organismos deteriorantes e patogênicos (AHMADOVA et al., 2013; BRUNO; LANKAPUTHRA; SHAH, 2002; MADUREIRA et al., 2011b; ONG; HENRIKSSON; SHAH, 2007; PAN et al., 2009; SAMESHIMA et al., 1998; THARMARAJ; SHAH, 2009; TALWALKAR et al., 2004; TODOROV; DICKS, 2006).

Apesar de se encontrar na literatura vários trabalhos que envolvem a utilização de queijo como veículos de probióticos, o Mercado Brasileiro de produtos fermentados ainda carece de disponibilidade maior destes tipos de queijos. Os produtos mais encontrados, dentro deste nicho de mercado, são principalmente os leites fermentados. Além disto, as pesquisas referentes à adição de culturas probióticas em queijos estão voltadas para queijos finos, a exemplo de Cheddar, Cottage, Crescenza e cremoso, havendo poucos relatos relacionados a

queijos mais populares, como o tipo coalho adicionado destas bactérias. Há, portanto, uma carência de pesquisas que abordem a tecnologia de fabricação desta variedade de queijo, destacando-se os obtidos a partir de leite caprino, bem como os efeitos das culturas lácticas probióticas nas suas características tecnológicas, físicas, físico-químicas, microbiológicas e sensoriais.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Setor de Caprinocultura do Centro de Formação de Tecnólogos/Campus III/ da Universidade Federal da Paraíba; Laboratório de Bromatologia, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba; Laboratório de Técnica Dietética, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba e Universidade Federal de Pernambuco; e Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba.

5.1 COLETA DOS MATERIAIS

O leite de cabra pasteurizado (65 °C/30 min.) foi obtido de raças nativas, pertencentes à Estação Experimental do Centro de Formação de Tecnólogos/Campus III/UFPB (Laboratório de Caprinocultura), sendo transportado em recipiente isotérmico contendo gelo até o Laboratório de Técnica Dietética (CCS/UFPB), onde foi armazenado sob refrigeração por no máximo 1 dia até o momento do processamento em pequena escala dos queijos. As culturas lácticas, o ácido láctico e o coalho que foram utilizados na produção dos queijos coalhos foram disponibilizados pela Christian Hansen[®] (Valinhos, Minas Gerais, Brasil).

5.2 ELABORAÇÃO DOS QUEIJOS CAPRINOS

Foram processados cinco diferentes tipos de queijos tipo coalho caprinos em 3 experimentos, a citar: T1 (controle), contendo a cultura mesófila convencional starter composta por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (R704, lote 2937721); T2, contendo *Lactobacillus acidophilus* (LA-5, lote 2914230); T3, com *Lactobacillus paracasei* (*L. casei*-01, lote 2910976); T4 contendo *Bifidobacterium lactis* (BB

12, lote 2280202) e T5 com a co-cultura contendo todos os micro-organismos probióticos em uso associado (proporção 1:1:1 p/p).

Os queijos foram elaborados da forma a ser descrita a seguir, conforme metodologia descrita por Laguna e Landim (2003). O leite foi submetido a um tratamento térmico (90 °C/10 min.) (Fig. 1C) e em seguida resfriado a 37 °C. Posteriormente, foi adicionado ácido láctico (85%) na proporção de 0,25 mL/L (diluído previamente na proporção de 1:10 v/v). Em seguida, as culturas lácticas liofilizadas foram adicionadas isoladamente conforme os tratamentos relatados e na forma combinada (co-cultura), na concentração de 10 mg/L de leite utilizado. Também foram adicionados solução de cloreto de cálcio a 50% (0,5 mL/L), com a finalidade de repor o cálcio perdido durante o processo de pasteurização, e coalho líquido (0,9 mL/L) diluído na mesma quantidade de água mineral. O leite foi homogeneizado e mantido a uma temperatura de 37 °C até a completa coagulação da massa (aproximadamente, 40 min.). Após verificação do ponto de corte (Fig. 2E), o coágulo formado foi cortado no sentido vertical e horizontal, com auxílio de uma lira (Fig. 3A), e em seguida foi homogeneizado por cerca de 20 a 40 min. Metade do soro foi drenado e aquecido a 55 °C, sendo colocado novamente sobre a massa, que foi homogeneizada por 5 a 10 min. Em seguida, a massa foi dessorada e parte do soro foi utilizada para elaboração da salmoura. A massa foi misturada com a salmoura sendo novamente drenada e, então, acondicionada em fôrmas perfuradas (Fig. 3D), de modo que se obtivessem queijos com, aproximadamente, 250 g ao final da prensagem. Em seguida, foram submetidos a prensas consecutivas durante 4 h (Fig. 4A), de modo que após 1 h de prensagem, a massa foi virada no interior das formas (Fig. 4B) e a posição destas alternada no interior da prensa, até que todo o resíduo de soro fosse completamente drenado. Os queijos obtidos foram embalados a vácuo (Fig. 4C) e acondicionados sob temperatura de refrigeração (10 ± 1 °C) até o momento das análises (Fig. 4D).



Figura 1 – Coleta e pasteurização do leite: (A) Parte do rebanho de cabras leiteiras da UFPB – Campus III; (B) Leite caprino embalado; (C) Pasteurização.
Fonte: Própria.



Figura 2 – Materiais para fabricação do queijo e teste do coágulo: (A) Ácido láctico; (B) Cultura liofilizada; (C) Cloreto de cálcio; (D) Coalho; (E) Teste de corte da coalhada.
Fonte: Própria.

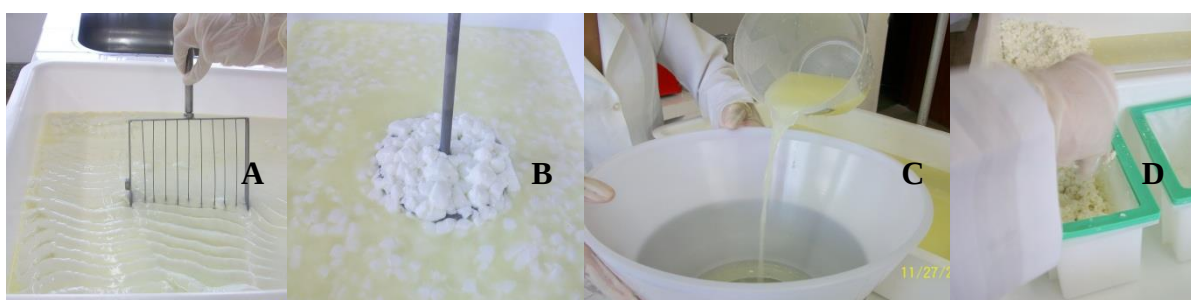


Figura 3 – Processamento dos queijos: (A) Corte da massa com lira; (B) Homogeneização da massa; (C) Retirada de soro; (D) Acondicionamento da massa em fôrmas perfuradas.
Fonte: Própria.

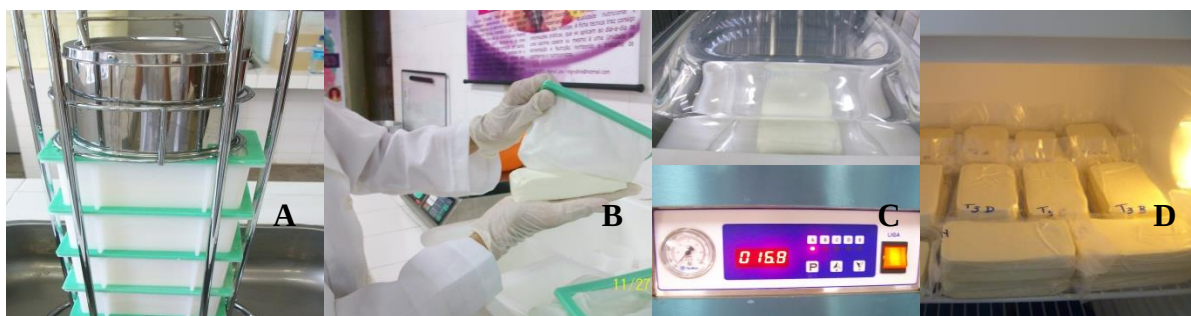


Figura 4 – Processamento, embalagem e armazenamento: (A) Prensagem; (B) Viragem; (C) Selamento a vácuo; (D) Armazenamento dos queijos sob temperatura de refrigeração (10 °C).
Fonte: Própria.

5.3 AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO E SINERESE DOS QUEIJOS

Após o processamento, o rendimento de cada lote de queijo tipo coalho foi expresso (em g de queijo/10 L de leite) como peso de queijo fresco em gramas obtido a partir de 10 L de leite utilizado. A sinerese (em g/100 g) foi calculada como o peso de soro de leite liberado por cada grama de queijo em sua própria embalagem após o armazenamento em diferentes tempos de armazenamento refrigerado (1, 7, 14 e 21 dias) dividido pelo peso do queijo em

gramas da mesma embalagem e multiplicado por 100 (BURITI et al., 2005). O cálculo destes parâmetros foi feito com base nas fórmulas descritas abaixo:

$$✓ \text{ **Rendimento** } = \frac{\text{Peso em gramas de queijo produzido;}}{10 \text{ L de leite utilizado}}$$

$$✓ \text{ **Sinerese** } = \frac{\text{Peso em gramas de soro}}{\text{Peso em gramas do queijo}} \times 100$$

5.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Após elaboração dos diferentes tipos de queijo, estes foram submetidos a análises de determinação de pH, acidez titulável em ácido láctico, umidade, extrato seco total (EST), cinzas, lipídios por Gerber, lactose, proteína bruta e índice proteolítico, de acordo com a AOAC (2000); atividade de água de acordo com Manual Aqualab (AQUALAB, 2001) e cloreto de sódio de acordo com Lanara (1981). Estas análises foram realizadas em triplicata nos tempos 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento refrigerado (10 ± 1 °C).

5.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As análises microbiológicas das amostras de queijo dos diferentes tratamentos foram realizadas após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento refrigerado (10 ± 1 °C), segundo metodologia preconizada por Vanderzant e Splittstoesser (1992). Para tal, inicialmente, em cada intervalo, as amostras de queijo foram diluídas (1:9 p/v) em água peptonada 0,1% estéril (diluição 10^{-1}), seguindo-se o processo de diluição seriada até a obtenção da diluição 10^{-12} .

5.5.1 Viabilidade das Bactérias Lácticas

A viabilidade das bactérias lácticas consistiu no monitoramento das contagens de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (T1 – cultura mesófila convencional), *Lactobacillus acidophilus* (T2), *Lactobacillus paracasei* (T3), *Bifidobacterium lactis* (T4), e co-cultura (T5) nos queijos caprinos tipo coalho adicionados destas culturas. Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas contendo ágar DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS) e incubadas a 37 °C por 48 horas, sob anaerobiose (BD GasPak™ EZ Anaerobe container system, Becton, Dickinson and Company, USA) - com

exceção do T1 que foi incubado em microaerofilia. Após o término do período de incubação, foi realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC), sendo os resultados expressos em log de UFC/g.

5.5.2 Avaliação da Qualidade Sanitária

✓ *Contagem de coliformes totais e fecais:* foi realizada através da técnica de tubos múltiplos, onde 1 mL de cada diluição seriada foi inoculada em Caldo Lactosado com Bile e Verde Brilhante (CLBVB) e caldo EC incubados a 37 °C/48 horas e 44,5 °C/24 horas, respectivamente. Os resultados foram expressos em Número Mais Provável de coliformes fecais ou totais por grama da amostra (NMP/g).

✓ *Contagem de Staphylococcus coagulase positiva:* foi realizada através da técnica de plaqueamento em superfície, utilizando-se como inóculo 0,1 mL das diluições decimais e como meio de contagem o Ágar Baird-Parker adicionado de telurito de potássio a 1% e emulsão de gema de ovo e incubado a 37 °C por um período de 48 horas. Após o período de incubação, foi realizada a contagem do número de colônias típicas. Foram consideradas como colônias típicas àquelas que apresentaram as seguintes características: circulares, pretas, pequenas, lisas, convexas, com bordas perfeitas, rodeadas por uma zona opaca e/ou halo transparente. Tais colônias foram isoladas em Ágar Nutriente inclinado (37 °C por 24 horas), sendo em seguida submetidas ao teste de coagulase.

✓ *Deteção de Salmonella sp.:* A análise foi realizada através de uma etapa de pré-enriquecimento da amostra utilizando-se Caldo Lactosado, seguido por uma etapa de enriquecimento seletivo utilizando-se Caldo Tetracionato e Caldo Selenito Cistina. Em seguida, fez-se plaqueamento de alíquotas dos caldos de enriquecimento seletivo em Ágar Bismuto Sulfito e Ágar Entérico de Hektoen. As colônias com característica típicas (colônias presuntivas) de *Salmonella* foram isoladas em Ágar Nutriente, sendo finalmente realizados os testes bioquímicos confirmatórios.

✓ *Deteção de Listeria monocytogenes:* A detecção de presença ou ausência de *Listeria* foi realizada, inicialmente, por uma etapa de enriquecimento seletivo utilizando-se o Caldo de Enriquecimento para *Listeria*. Após essa etapa foi realizado plaqueamento seletivo

em Ágar Oxford (AO), Ágar Palcam (AP) e Ágar Triptose com Ácido Nalidíxico (ATN). A confirmação bioquímica de *Listeria* sp. foi realizada por meio da verificação da produção de catalase, observação das características morfológicas e tintoriais, verificação do crescimento típico em meio semissólido e, adicionalmente, por meio da verificação da incapacidade de redução de nitrato e verificação da positividade nas reações de Vermelho de Metila e Voges Proskauer (VM-VP). A diferenciação das espécies de *Listeria* sp. realizou-se por meio da verificação da produção de α -hemólise em Ágar Sangue de Cobaia ou Ágar Sangue de Carneiro, verificação da capacidade de produzir reação de CAMP positiva com *S. aureus* (e opcionalmente também com *Rodococcus equi*), e verificação da capacidade de fermentação dos carboidratos ramnose, xilose e manitol.

5.6 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS

A avaliação das propriedades tecnológicas dos queijos produzidos foi feita baseada nos testes de textura instrumental, capacidade de derretimento e cor instrumental, realizados nos tempos 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento refrigerado (10 ± 1 °C), conforme Buriti, Rocha; Saad (2005); Kosikowski e Mistry (1997) e CIE (1996), respectivamente. A realização destas análises seguiu as metodologias a seguir.

5.6.1 Avaliação da Textura Instrumental

A textura instrumental dos queijos foi determinada, em triplicata, através de teste de dupla compressão, em texturômetro TA-XT2 (Stable Micro Systems, Haslemere, Reino Unido), utilizando dispositivo cilíndrico de alumínio com 25 mm de diâmetro e realizando compressão de 1 cm. A velocidade empregada foi de 1 mm/s. As amostras cilíndricas foram retiradas do refrigerador momentos antes do teste. Os dados foram coletados através do programa *Texture Expert for Windows* – versão 1.20 (Stable Micro Systems). Foram analisados os atributos primários dureza, coesividade, adesividade e elasticidade e o atributo secundário gomosidade. Empregaram-se os seguintes parâmetros: amostras de queijo coalho caprino em seus diferentes tratamentos com altura e diâmetro de 2 cm e 5 cm, respectivamente, temperatura de 10 ± 1 °C, distância e velocidade de compressão de 10 mm e 1 mm/s, respectivamente.

5.6.2 Capacidade de Derretimento

A capacidade de derretimento do queijo foi determinada em triplicata, pelo método de Schreiber's modificado, descrito por Kosikowski e Mistry (1997) e adaptado ao tamanho do queijo de coalho. No método de Schreiber's modificado, as dimensões do queijo utilizadas foram 7 mm de altura e 36 mm de diâmetro. Utilizou-se o maior diâmetro possível para não haver interferência na avaliação do buraco central deixado pelo palito ao longo do queijo. A temperatura utilizada foi a mesma do método tradicional 100 °C/7 min.

Cada um dos cilindros foi colocado em placa de Petri e deixado em temperatura ambiente por 1 h. Após esse período as placas foram levadas a uma estufa com circulação de ar forçada à 100 °C/7 min. Em seguida foram retiradas, deixadas à temperatura ambiente por 30 min. e determinado o diâmetro do queijo derretido em quatro direções diferentes separadas por um ângulo de 45° (Figura 5). Esse diâmetro foi medido com régua, calculada a média e a partir desta foi calculada a porcentagem de derretimento das amostras de queijo, segundo a seguinte equação.

$$\text{C.D. (\%)} = \frac{Df^2 - Di^1}{Di^2} \times 100$$

Em que:

Di = Diâmetro médio inicial da amostra (pré-derretimento)

Df = Diâmetro médio final da amostra (pós-derretimento)

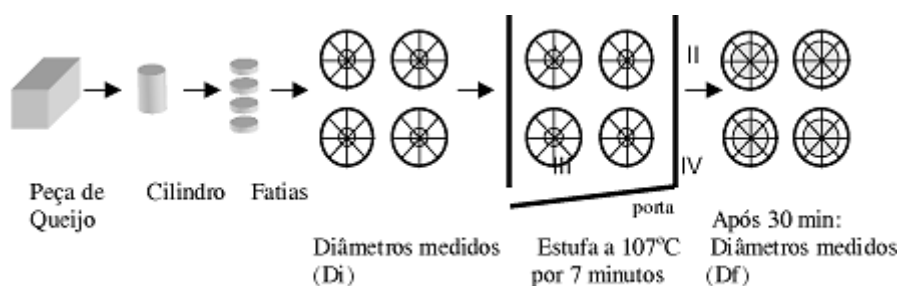


Figura 5 - Esquema da análise de capacidade de derretimento.

Fonte: Narimatsu et al. (2003).

5.6.3 Cor Instrumental

A determinação da cor instrumental foi realizada em colorímetro Minolta, modelo CR-300, utilizando o sistema CIELAB (CIE, 1996). No espaço colorimétrico CIELAB, definido por L*, a*, b*, a coordenada L* corresponde à luminosidade, a* e b* referem-se às

coordenadas de cromaticidade verde(-)/vermelho(+) e azul(-)/amarelo(+), respectivamente. As medições foram realizadas em triplicata com o aparelho previamente calibrado, usando a parte externa e interna da peça de queijo, imediatamente após a retirada da embalagem.

5.7 ANÁLISE SENSORIAL

Após submissão do projeto ao Comitê de Ética em Pesquisa do CCS/UFPB e após obtenção da sua aprovação (protocolo nº 155/2009 - Anexo A), a avaliação sensorial dos queijos foi realizada nos tempos 1, 7, 14 e 21 dias após a sua fabricação. Antes das análises sensoriais os queijos foram submetidos às análises microbiológicas para garantir a qualidade higiênico-sanitária, verificando se os queijos apresentavam-se dentro dos padrões recomendados pela legislação vigente (BRASIL, 1996).

Foram realizados testes de aceitabilidade e preferência relativa entre as amostras, segundo Faria e Yotsuyanagi (2002). No teste de aceitabilidade foram empregados os critérios estabelecidos por Amerine, Pangborn e Roessler (1967). Para tanto, um painel não treinado constituído por 50 provadores (alunos, professores e funcionários da UFPB e UFPE, selecionados com base nos hábitos e interesse em consumir queijo tipo coalho, constituídos tanto pelo gênero feminino como masculino, cuja faixa etária poderia variar de 18 a 45 anos de idade, não apresentando nenhum problema de saúde ou deficiência física que viesse comprometer a avaliação sensorial dos produtos, especificamente relacionado a três dos sentidos humano: olfato, paladar e visão), assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice C) e analisaram as amostras de queijos tipo coalho convencional (T1) e adicionados de culturas lácticas probióticas (T2, T3, T4 e T5) de acordo com o *Institut of Food Technologist* (IFT, 1981). Foram avaliados a aparência, aroma, sabor, textura e aceitação global. Os provadores atribuíram valores aos queijos, numa escala hedonística estruturada com nove pontos (1 = desgostei muitíssimo; 5 = nem gostei/nem desgostei; 9 = gostei muitíssimo). Os formulários destinados a este teste continham campos que possibilitavam aos provadores anotar descrições que julgassem importantes (APÊNDICE A). Os queijos foram considerados aceitos quando obtinham média $\geq 5,0$ (equivalente ao termo hedônico “gostei moderadamente”).

A preferência relativa entre as amostras de queijos foi conduzida segundo delineamento de ordenação em blocos casualizados com os 50 provadores não treinados, empregando-se teste de preferência, com notas que variaram de 1 (“amostra mais preferida”) a 5 (“amostra menos preferida”) (APÊNDICE B). Com a finalidade de se obter maiores

informações sobre as características sensoriais de cada queijo, os provadores foram instruídos a relatar os atributos sensoriais que contribuíram para a escolha das amostras “mais preferidas” e “menos preferidas”.

Paralelamente também foi avaliada a intenção de compra. Para tanto, foi empregado uma escala hedônica estruturada com cinco pontos (1 = jamais compraria; 3 = talvez comprasse/talvez não comprasse; 5 = compraria), conforme formulário em Apêndice A.

Em ambos os testes, as amostras foram padronizadas em forma de cubos de aproximadamente 2 cm³ e servidas, simultaneamente e de forma aleatória, a aproximadamente 10 °C, em copos de plásticos de cor branca codificados com números aleatórios de 3 dígitos. Juntamente com as amostras foram oferecidos aos provadores bolacha, água e palito e estes foram orientados a entre uma amostra e outra fazer o uso da bolacha e da água, para remoção do sabor residual e a provarem estas da esquerda para direita.

Os testes foram realizados no Laboratório de Técnica Dietética da UFPB e UFPE, em cabines individuais utilizando-se luz branca, longe de ruídos e odores, em horários que não compreendessem uma hora antes e duas horas após o almoço.

5.8 TESTES *IN VITRO* DA VIABILIDADE PROBIÓTICA DOS QUEIJOS TIPO COALHO CAPRINOS

Esses testes consistiram na avaliação do efeito protetor do queijo tipo coalho caprino sobre a sobrevivência das bactérias lácticas probióticas adicionadas aos mesmos, quando expostas às condições simuladas do trato gastrointestinal e avaliação do efeito inibitório destas culturas adicionadas ao queijo contra as bactérias patogênicas contaminantes *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*.

5.8.1 Avaliação da sobrevivência das bactérias em condições gastrointestinais simuladas

Após processamento dos queijos conforme metodologia descrita em 5.2, os quais foram inoculados com as culturas ácido lácticas probióticas isoladas: *L. acidophilus* (LA-5), *L. paracasei* (*L. casei*-01) e *B. lactis* (BB 12) e armazenados por 7 dias sob temperatura de refrigeração (10 ± 1 °C), procedeu-se da seguinte forma:

5.8.1.1 Inoculação das matrizes de queijos

Cada bactéria ácido láctica probiótica foi estudada separadamente. Para cada cepa, um conjunto de cinco amostras rotuladas como C1, C2, C3, S1 e S2 foram produzidas. C1 e C2

foram os queijos controles duplicados, que foram inoculados com cada cepa testada, mas não foram expostos às condições simuladas gastrointestinais, C3 foi um queijo controle que não foi inoculado com as bactérias, mas foi exposto às condições simuladas gastrointestinais (usado para realizar assepticamente os ajustamentos de pH na etapas sequenciais da digestão simulada). S1 e S2 foram os queijos inoculados e expostos às condições simuladas gastrointestinais. Todas as amostras acima mencionadas foram preparadas em frascos estéreis de 50 mL. Nestes recipientes, os queijos com as bactérias testadas foram distribuídos em quantidades de 25 g cada.

5.8.1.2 Simulação das condições gastrointestinais

A via gastrointestinal que foi utilizada é descrita no Quadro 4, incluindo os compostos e concentrações utilizadas, o tempo de exposição e as intensidades de agitação em todas as etapas. As agitações foram utilizadas para simular os movimentos peristálticos.

Quadro 4 - Condições de processamento utilizadas em cada etapa de digestão simulada.

Compartimento	Condição	Agitação (rpm)	pH final	Tempo (min)
Boca	Saliva	200	6,9	2
Esôfago-estômago	Pepsina	130	5,5	10
			4,6	10
			3,8	10
			2,8	20
			2,3	20
			2,0	20
Duodeno	Pancreatina + Sais biliares	45	5,0	30
Íleo	-----	45	6,5	60

A mastigação foi simulada de acordo com Hold et al. (1995) e Choi et al. (2007), utilizando uma solução de saliva preparada com 100 U/mL de 1- α -amilase diluída em solução de CaCl₂ a 1 mM, onde o pH foi ajustado para 6,9 utilizando solução de NaHCO₃ a 1 mM. Esta solução foi adicionada em 25 g das amostras a uma taxa de 0,6 mL/min, durante 2 minutos. Na etapa que simulou as condições do esôfago-estômago adicionou-se solução de

pepsina a uma taxa de 0,05 mL/mL durante 90 minutos. A solução de pepsina foi preparada em HCl a 0,1 N numa proporção de 25 mg/mL. Nesta etapa, o pH foi reduzido para 2, utilizando solução de HCl a 1 M (Mainville et al., 2005). As condições do duodeno foram simuladas utilizando 2 g/L de pancreatina e 12 g/L de sais biliares, diluídos em solução de NaHCO_3 a 0,1 M. Esta solução foi adicionada no início da etapa a uma taxa de 0,25 mL/mL (LAURENT; BESANÇON; CAPORICCIO, 2007). Finalmente, a etapa do íleo foi provocada por um aumento do pH para 6,5 utilizando solução de NaHCO_3 a 0,1 M. A simulação foi contínua, de modo que o volume de trabalho total aumentou (como acontece durante uma digestão real).

Todas as soluções das enzimas foram preparadas em frascos e esterilizadas por filtração, usando membrana filtrante de 0,22 μm (Milipore, Billerica MA, USA) antes de serem utilizadas. Após esterilização, todas as soluções foram mantidas em banho de gelo durante todo o período de simulação. Uma câmara de incubação a 37 °C e agitação mecânica foi usada para simular a temperatura do corpo humano os movimentos peristálticos, com intensidades semelhantes às atingidas em cada compartimento digestivo.

5.8.1.3 Análises microbiológicas

As contagens das células viáveis de bactérias lácticas adicionadas aos queijos expostos a cada condição gastrointestinal simulada foram determinadas através da preparação de diluições seriadas decimais com água peptonada esterilizada [0,1 g/100 mL (Sigma, St. Louis MO, EUA)]. Estas diluições foram semeadas, posteriormente, conforme método proposto por Miles, Misra e Irwin (1938). *L. paracasei* foi plaqueado em ágar MRS (Sigma-Aldrich) e incubado a 37 °C/48 h, enquanto que *B. lactis* e *L. acidophilus* foram semeados em placas com ágar MRS (Sigma-Aldrich) suplementado com cisteína-HCl (0,05 g/100 mL) e incubados sob condições anaeróbicas (BD GasPak™ EZ Anaerobe container system, Becton, Dickinson and Company, USA), a 37 °C/48 h. Os resultados foram expressos como o log das unidades formadoras de colônias por cada grama de queijo (log de UFC/g). O pH de cada amostra foi medido em cada etapa de simulação das condições gastrintestinais com um medidor de pH (Modelo 021/15; Quimis, São Paulo, Brasil), que foi periodicamente esterilizado com etanol (90 mL/100 mL).

5.8.2 Avaliação do efeito inibitório das bactérias ácido lácticas no crescimento de *S. aureus* e *L. monocytogenes*

5.8.2.1 Micro-organismos

As culturas ácido lácticas, *L. acidophilus* (LA-5), *L. paracasei* (*L. casei*-01) e *B. lactis* (BB 12), foram obtidas da Chr. Hansen Brasil® (Valinhos, Minas Gerais, Brasil). As cepas de bactérias patogênicas, *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *S. aureus* ATCC 6538, foram adquiridas da Coleção de Micro-organismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil).

5.8.2.2 Preparação dos inóculos

Para preparar os inóculos que foram adicionados aos queijos, as cepas bacterianas ácido lácticas foram primeiramente cultivadas em caldo MRS (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EUA), e incubadas a 37 °C durante 48 h. Todos os meios preparados para *B. lactis* e *L. acidophilus* foram suplementados com 0,05% (w/v) HCl-cisteína (Sigma-Aldrich). *S. aureus* e *Listeria monocytogenes* foram cultivadas em caldo BHI (Sigma-Aldrich) para obtenção de pré-inóculo e novamente cultivadas em caldo BHI (1:9 v/v) e incubadas a 37 °C durante 24 h. Para verificar os níveis desejados de inóculo contendo as bactérias ácido lácticas probióticas (8 a 10 log UFC/mL) e bactérias patogênicas (6 a 7 log UFC/mL), diluições em série foram preparadas com água peptonada esterilizada [0,1 g/100 mL (Sigma-Aldrich)]. Para as contagens de células viáveis das bactérias probióticas, estas diluições foram subsequentemente plaqueadas, utilizando-se o método de Miles, Misra e Irwin método (1938), em ágar MRS (Sigma-Aldrich) e incubadas sob condições anaeróbicas (BD GasPak™ EZ Anaerobe container system, Becton, Dickinson and Company, USA), a 37 °C/48 h. Os resultados foram expressos como log de UFC/g. Para as contagens de células viáveis das bactérias patogênicas estas diluições foram subsequentemente semeadas em placas com ágar BHI (Sigma-Aldrich) e incubadas sob condições aeróbicas, a 37 °C/24 h. Os resultados foram expressos como o log de UFC/g.

5.8.2.3 Processamento dos queijos tipo coalho caprinos

Seguiu-se a metodologia mencionada em 5.2, com excessão da adição das culturas ácido lácticas probióticas.

5.8.2.4 Adição dos inóculos de bactérias ácido lácticas e patogênicas nos queijos

Para cada bactéria probiótica testada, um nível de inóculo de bactérias contaminantes foi testado. Foi elaborado um queijo controle positivo, adicionado apenas do inóculo contendo as bactérias patogênicas isoladas, assim como um queijo controle negativo, contendo apenas as bactéria ácido lácticas isoladas, totalizando 5 amostras controles. As bactérias probióticas foram inoculadas numa proporção de 1 mL de inóculo (contendo 8 a 10 log UFC/mL) para cada 25 g de queijo. Já as bactérias contaminantes foram inoculadas numa proporção de 1 mL de inóculo (contendo 6 a 7 log UFC/mL) para cada 25 g de queijo. As amostras de queijos experimental consistiram nos queijos adicionados das culturas mistas, contendo 1 mL de inóculo de bactérias probióticas isoladas e 1 ml do inóculo de bactérias contaminantes isoladas, com os mesmos níveis de inóculos mencionados acima, resultando em 6 amostras (3 cepas probióticas x 2 cepas patogênicas).

Todas as amostras de queijo inoculadas foram agitadas com um misturador elétrico (Kenwood, UK) durante 5 min e igualmente distribuídas assepticamente em frascos estéreis de 50 mL e armazenadas a 7 °C durante 21 dias, correspondendo a um total de 44 amostras (11 amostras x 4 tempos de armazenamento). Cada amostra foi submetida a contagem de células viáveis de bactérias probióticas e contaminantes no 1º, 7º, 14º e 21º dia de armazenamento refrigerado.

5.8.2.5 Análises microbiológicas

As contagens de células viáveis das bactérias ácido lácticas probióticas e bactérias patogênicas nas matrizes de queijos foram determinadas através da preparação de diluições seriadas decimais com água peptonada esterilizada [0,1 g/100 mL (Sigma, St. Louis MO, EUA)]. Estas diluições foram plaqueadas em seguida, usando o método de Miles, Misra e Irwin (1938), para a determinação das bactérias ácido lácticas probióticas. *L. paracasei* foi plaqueado em ágar MRS (Sigma-Aldrich) e incubado a 37 °C/48 h, enquanto que *B. lactis* e *L. acidophilus* foram semeados em placas com ágar MRS (Sigma-Aldrich) e suplementado com cisteína-HCl (0,05 g/100 mL) e incubados em condições anaeróbias (BD GasPak™ EZ Anaerobe container system, Becton, Dickinson and Company, USA), a 37 °C/48 h.

Para a contagem de células viáveis de *S. aureus* utilizou-se ágar Vogel-Johnson (Sigma-Aldrich), suplementado com uma solução de telurito de potássio (1 g/100 mL) (Sigma-Aldrich) e incubou-se durante 24 horas a 37 °C. Para contagens de células viáveis de *L. monocytogenes*, foram utilizados Ágar Base Seletivo Listeria suplementado com Suplemento Seletivo Listeria (HIMEDIA Laboratories, Índia) e incubou-se durante 24 horas a

37 °C. Todas as análises foram realizadas em duplicata e os resultados foram expressos em log de UFC/g.

5.8.2.6 Cálculo da taxa de inibição

Para cada tempo de armazenamento, o grau de inibição foi calculado como:

$$\text{Taxa de inibição} = [(N_{\text{control}} - N_{\text{patogen}}) / N_{\text{control}}] * 100,$$

onde N_{control} foi o log de UFC/g da bactéria patogênica adicionada isoladamente, e N_{patogen} foi o log de UFC/g da bactéria patogênica na presença de uma bactéria ácido láctica específica (MADUREIRA et al., 2011b).

5.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados das análises tecnológicas, físico-químicas, microbiológicas, aceitação sensorial e testes *in vitro* da avaliação do potencial probiótico dos queijos tipo coalho elaborados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), realizando-se teste de média de Tukey ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Para o cálculo dos dados, utilizou-se o programa - Statistics Analys Systems, versão 8.12 (SAS Institute, Inc., Cary, NC.) (SAS, 1999).

Os resultados dos testes sensoriais de ordenação preferência foram analisados de acordo com o teste de Friedman, utilizando-se a tabela de Newell Mac Farlane, para determinar se as amostras diferiram significamente entre si (FARIA; YOTSUYANAGI, 2002).

6 RESULTADOS – ARTIGOS ORIGINAIS

A partir do presente estudo, dois artigos originais foram elaborados, os quais foram submetidos a revistas descritas abaixo, e serão apresentados em ordem cronológica de elaboração.

O artigo intitulado **“Technological, physicochemical and sensory characteristics of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria”** foi publicado na Revista *Scientia Agricola*, no volume 69, número 6 de 2012. Esta Revista apresenta fator de impacto de 0.864, sendo classificada como Qualis B2 na área de Nutrição, pela CAPES 2012.

O artigo intitulado **“Addition of probiotic bacteria in a semi-hard goat cheese (coalho): survival to simulated gastrointestinal conditions and inhibitory effect against pathogenic bacteria”** foi enviado para a Revista *Food Research International*, que apresenta fator de impacto de 3.150, sendo classificada como Qualis A2 na área de Nutrição, pela CAPES 2012.

Technological, physicochemical and sensory characteristics of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria

Running title: Goat cheese with added probiotic bacteria

Maria Elieidy Gomes de Oliveira¹, Estefânia Fernandes Garcia², Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga¹, Evandro Leite de Souza^{2*}

¹ Laboratory of Food Quality, Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

² Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

* Author for correspondence: Evandro Leite de Souza

Universidade Federal da Paraíba

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Nutrição

Campus I, 58051-900, Cidade Universitária, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

E-mail: evandroleitesouza@ccs.ufpb.br

Telephone number: + 55 83 3216 7807

Fax number: + 55 83 3216 7094

ABSTRACT: Over the past few years, the use of probiotics, which are capable of exerting beneficial effects on the composition of intestinal microbiota, has increased. Cheeses have been suggested as a better carrier of probiotic bacteria than other fermented milk products. The effect of added cultures of probiotic lactic acid bacteria on the quality of a Brazilian goat semi-hard cheese (coalho) was assessed during 21 days of storage at 10 °C as follows: C1, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *Cremoris* (standard cheese); C2, *Lactobacillus acidophilus* (LA-5); C3, *Lactobacillus paracasei* (*Lactobacillus casei*-01); C4, *BBifidobacterium lactis* (BB-12); and C5, *L. acidophilus*, *L. paracasei* and *B. lactis*. Differences in some physico-chemical, experimental texture and proteolysis parameters were found among the assessed cheeses. All of them presented high luminosity (L*) with predominance of the yellow component (b*). Numbers of lactic acid bacteria in the cheeses were greater than 10⁷ cfu g⁻¹ during storage. Cheeses with the added probiotic strains alone and in co-culture were better accepted than cheeses without the probiotic strains. It is suggested that goat “coalho” cheese could be a potential carrier of probiotic lactic acid bacteria.

Keywords: dairy product, probiotic microorganisms, quality evaluation

Introduction

In recent years, consumers have become more interested in the general quality of foods. Most consumers are concerned not only about safety and nutritional value but also about health benefits (Saarela et al., 2002). The Food and Agriculture Organization defines food-related probiotics as living organisms that, upon ingestion in certain numbers, exert health benefits to the consumer's health beyond inherent basic nutrition (FAO, 2001).

Probiotics are efficacious in treatment of gastrointestinal disorders, respiratory infections and allergic symptoms (Wohlgemuth et al., 2010) and also reduce blood cholesterol

and improve immunity (Shah, 2007). The minimal population of the probiotic bacteria to ensure a favorable impact on health is 10^7 cfu g⁻¹ or mL⁻¹ of food at the time of consumption (De Vuyst, 2000). Furthermore, a probiotic strain must be amenable to food-grade production on an industrial scale, remain under good viability and functionality during storage and food consumption (Mätö et al., 2006), resist the bile salts and acidic conditions of the upper gastrointestinal tract (Cruz et al., 2009), adhere to the intestinal epithelium of hosts and possess antagonistic activity against bacterial pathogens (Lin et al., 2006).

Strains belonging to the genera *Lactobacillus* [*L. acidophilus* (LA-5), *L. paracasei* (*L. casei*-01)] and *Bifidobacterium* [*B. lactis* (BB 12), *B. longum* (1941)] have been evaluated for probiotic properties with satisfactory results (Buriti et al., 2005a; Buriti et al., 2005b; Buriti et al., 2007b; Ong and Shah, 2009; Phillips et al., 2006; Souza and Saad, 2009). These bacterial strains are normal constituents of the intestinal flora and present a long history of safe application in foods.

Considering the survival and viability of probiotic cultures, fermented dairy products, such as cheeses, yogurts and fermented milks, are promising food delivery systems for these cultures. Cheese has been suggested as a better carrier of probiotic bacteria than other fermented milk products due to its pH, higher content of fat and solid consistency, which offer greater protection to these microorganisms in the gastrointestinal tract (Ong et al., 2006).

“Coalho” cheese is a Brazilian product that has been produced for over 150 years in various states of the northeast region of Brazil. Coalho cheese is a semi-hard cheese with medium-to-high moisture produced from raw or pasteurized cow or goat milk. It is obtained after milk coagulation using rennet or proper coagulating enzymes, which are sometimes complemented with selected lactic acid bacteria. Coalho cheese is commonly marketed after seven days of storage at 10 °C (Brasil, 1997). This product has a high commercial value because its production technology is simple, the yield is high and consumers readily purchase it.

Probiotic bacteria, such as lactobacilli, bifidobacteria and enterococci, have been successfully incorporated into different cheese varieties, such as cheddar (McBrearty et al., 2001), Gouda (Gomes et al., 1998), Crescenza (Gobbetti et al., 1998), cream cheese (Buriti et al., 2007a) and Minas fresh cheese (Buriti et al., 2005b; Vinderola et al., 2000). The addition of selected lactic acid bacteria in simple and mixed cultures in cheeses can improve bacterial viability and increase the acidification, flavor development and sensory characteristics of the cheese during storage (Buriti et al., 2005a; Buriti et al., 2005b; Buriti et al., 2007c).

Currently, there is a lack of studies emphasizing the incorporation of probiotic cultures into coalho goat cheese and the influence of probiotics on the quality parameters of the cheese during storage. Regarding these aspects, this study was performed with the main purpose of assessing the technological, physicochemical and sensory characteristics of coalho goat cheese supplemented with *Lactobacillus acidophilus* (LA-5), *Lactobacillus paracasei* (*L. casei*-01) and *Bifidobacterium lactis* (BB 12) in single and mixed culture during cold storage. A secondary aim was to assess the viability of the added probiotic strains in the cheeses during the evaluated storage periods.

Materials and Methods

Cultures – The following freeze-dried commercial cultures used in the production of the cheeses were obtained in Valinhos, state of São Paulo, Brazil (22°58'14" S; 46°59'45" W): *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (R704, batch 2937721) (non-probiotic cultures used as starter cultures in the standard method for the manufacture of coalho cheese); *Lactobacillus acidophilus* (LA-5, batch 2914230); *Lactobacillus paracasei* (*L. casei*-01, batch 2910976); and *Bifidobacterium lactis* (BB 12, batch 2280202). Five bacterial cultures (10 mg L⁻¹ of milk) were added during the production of the cheeses as follows: C1, *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris*; C2, *L.*

acidophilus; C3, *L. paracasei*; C4, *B. lactis*; and C5, *L. acidophilus*, *L. paracasei* and *B. lactis* (1:1:1 ratio).

Manufacturing process of coalho goat cheeses – Coalho cheeses were manufactured in 10-L vats from commercially pasteurized (65 °C per 30 min) goat milk heated to 45 ± 1 °C and followed by direct acidification with lactic acid (0.85 mL 100 mL⁻¹) in an amount of 0.25 mL L⁻¹. The cultures of lactic acid bacteria were added at a concentration of 10 mg L⁻¹ for direct vat inoculation. Calcium chloride (0.5 mL L⁻¹) and a commercial coagulating agent (0.9 mL L⁻¹) were also added to the vats. The vats were incubated at 36 °C until a firm curd was formed (approximately 40 min). The obtained gel was gently cut into cubes (1.5 to 2.0 cm), allowed to drain, placed in perforated rectangular containers (approximate capacity of 250 g), salted in brine (12 g L⁻¹ NaCl), maintained at 36 °C under pressure for 4 h and vacuum packaged. The cheese obtained after storage at 10 °C for 24 h was regarded as the final product. Each cheese was manufactured three times (replicates), and all analyses were performed in triplicate. The results of the analysis are presented as averages of the data collected for each replicate. For each replication, the cheeses were manufactured from the same milk batch.

Analysis – Cheeses from each treatment were used for physicochemical and technological analyses. The cheeses were analyzed both immediately (day 1) and after 7, 14 and 21 days of storage at 10 °C. Each day, three cheeses from the same batch and trial were unpacked. The samples (25 g) were collected aseptically from parts of the cheeses for microbiological analysis. For the instrumental texture profile analysis, at least 0.5 cm of the rind of the cheeses was discarded, and the cheese samples were collected from the center to the outer part. The

rest of the cheese was grated and immediately used for physicochemical, microbiological and sensory analyses.

Yield and syneresis – The yield of each batch is expressed as the fresh weight of the cheese obtained from each liter of milk used for its production (g of cheese L⁻¹ of milk). The syneresis (expulsion of whey from coagulum) was calculated as the weight of whey in grams released from each kilogram of cheese in the package after the various storage times, divided by the weight of cheese of the same package in grams and multiplied by 100 (Buriti et al., 2005b).

Gross composition and physicochemical analysis – Titratable acidity was determined according to the appropriate standard method (AOAC, 2005) and expressed in terms of acidity in lactic acid (g 100 g⁻¹). Water activity (A_w) was determined at 25 °C. Moisture and dry matter contents were determined by drying 5 g of the samples at 105 °C until constant weight. The ash content was determined gravimetrically by heating the samples (3 g) at 550 °C until complete combustion. The protein content was estimated by measuring the N content by the Kjeldahl method and multiplying the value by a conversion factor (6.38) after drying the cheese samples (1 g). The fat content was determined by Gerber's method, and sodium chloride (NaCl) content was analyzed using the Mohr method. The analysis of lactose was performed by the Fehling reducing method. All analyses were performed in triplicate according to the standard methods suggested by AOAC (2005).

Analysis of proteolysis and meltability – The soluble nitrogen (SN) content in 1.2 g L⁻¹ of trichloroacetic acid (TCA) and the SN content at pH 4.6 in the cheese samples were determined using a micro-Kjeldahl method (AOAC, 2005). Proteolysis was evaluated with

the proteolysis index (EPI) and depth of proteolysis index (DPI) using the following equations: $EPI = (SN \text{ at pH } 4.6) / TN \text{ (total nitrogen)} \times 100$; and $DPI = (SN \text{ in TCA}) / TN \times 100$ (Andreatta et al., 2007). Meltability of the cheese samples was determined by the Schreiber test, as previously described by Koca and Metin (2004). The cheese samples (4-6 °C) were prepared using a glass borer and a sharp knife. The samples (36 mm × 7 mm) were placed on a Petri dish, which was then placed into an electrical oven preheated to 107 ± 1 °C for 5 min. The samples were removed from the oven and cooled for 30 min at room temperature. Sample expansion was measured using a scale with six lines (A - E) marked on a concentric set of circles. Schreiber meltability was expressed as the mean of six readings using an arbitrary scale (0-10 units) (Park et al., 1984).

Analysis of instrumental texture profile – The textural properties of the cheeses were evaluated using a two-bite compression of cylindrical samples (diameter of 5.0 cm and height of 2.0 cm) with a probe of 25.4 mm. The employed compression ratio was 50 % deformation from the initial height of the sample at a rate of 1 mm s⁻¹. The compression distance was 10 mm, the contact force was 5.0 g, and the time between cycles was 5 s. After being cut, the cheese samples were stored in boxes containing ice prior to testing. The measured parameters consisted of hardness, springiness, adhesiveness, cohesiveness, chewiness and gumminess, which were obtained with the Texture Expert for Windows software version 1.20 (Stable Micro Systems).

Color evaluation – A CR-300 colorimeter was used for the instrumental color evaluation. The CIELab color scale (L*a*b*) was used with a D65 illuminant (standard daylight) at a 10° angle. The L*, a* and b* parameters were determined according to the standards set by the International Commission on Illumination (CIE, 1986). Using reference plates, the apparatus

was calibrated in the reflectance mode with specular reflection excluded. A 10-mm quartz cuvette was used for the readings. Measurements were performed in triplicate using the inner section of the cheeses immediately after unpacking.

Counts of lactic acid bacteria – Initially, a sample (25 g) of each cheese was blended with 225 mL of peptone water (1 g per L) in a Bag Mixer and submitted to serial dilutions (10^1 – 10^{-5}) with the same diluent. A sample (1 mL) of each dilution was plated onto DeMan-Rogosa-Sharpe ágar using the pour plate method and incubated for three days at 37 °C in an anaerobic atmosphere (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid). The counts were expressed in colony forming units per gram of cheese ($\log \text{cfu g}^{-1}$) (FDA, 1992).

Sensory evaluation – Sensory evaluation was performed by three methods: the acceptance test, purchase intention and preference ranking test. These tests were performed using 50 non-trained panelists pre-selected according to interest with a habit of consuming coalho cheese. All sensory evaluation assays were performed with the same panelists who worked in individual booths with controlled temperature and lighting conditions. Each panelist was served 20 g of each cheese on a small white plate coded with a random three-digit number, and the samples of the five types of cheese were served simultaneously using a blind method in a randomized sequence (assuring that each panelist was served with a specific order of samples) immediately after being taken out of the refrigerated storage. The panelists were asked to use low-salt crackers and water to cleanse their palates between the samples. The acceptability of appearance, color, flavor, taste, texture and general perception were evaluated on a 9-point unstructured hedonic scale ranging from 1 (dislike very much) to 9 (like very much). Purchase intention was evaluated using a 5-point unstructured hedonic scale ranging from 1 (certainly would not purchase) to 5 (certainly would purchase). For the preference

ranking test, the panelists were asked to choose the most and least preferred sample based on their overall impressions.

Statistical analysis – The means of the results were evaluated using analysis of variance (ANOVA), and the Tukey test was used to compare differences ($p < 0.05$) among the technological, physicochemical, microbiological and sensory evaluations. Statistical Analysis System (SAS, 1999) was used for the statistical analyses.

Results and Discussion

The yields and synereses for the coalho goat cheeses with added probiotic lactic acid bacteria during storage at 10 °C (Table 1) ranged from 130.90 to 142.83 g L⁻¹. Higher yields ($p < 0.05$) were found for cheese C3 (*L. paracasei*) compared with cheeses C1 and C2.

The higher yield of C3 could be related to its lower acidity after one day of storage (Table 2). A similar result was observed with fresh white cheese supplemented with *L. paracasei* (Buriti et al., 2005b). Generally, cheeses produced through the direct addition of lactic acid to the milk (as in our study) resulted in higher yields and improved textures, and the products are more durable due to the delayed acidification (Ong et al., 2006). However, the use of this procedure could result in cheeses with high pH and moisture levels, which are more susceptible to spoilage by contaminating microorganisms (Cunha et al., 2006).

All the cheeses presented increased ($p < 0.05$) syneresis after 21 days of storage (Table 1). The increased expulsion of the whey in cheeses C1, C3 and C4 during storage could be the cause of the decreased moisture of these cheeses after 21 days of storage ($p < 0.05$) (Table 2). Buriti et al. (2005b) and Souza and Saad, (2009) also found increased syneresis in bovine fresh white cheese supplemented with *L. paracasei* and *L. acidophilus*. The syneresis rate is directly related to the acidity and, therefore, inversely related to pH

(Souza and Saad, 2009). As a consequence of the progressive increase in the hydrogen ion concentration during acidification, the repulsive forces decrease and casein micelles begin to aggregate, followed by whey expulsion and establishment of the increased syneresis. However, in our study, this relation was found only for cheeses C3 and C5. Cheese C3 presented the highest acidity in lactic acid ($1.24 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) after 21 days of storage (Table 2), explaining the loss of whey (103.08 g kg^{-1}) during the same storage period.

Differences in gross composition and physicochemical characteristics of coalho goat cheese supplemented with lactic acid bacteria during 21 days of cold storage were observed among the types of bacteria and throughout the time of storage ($p < 0.05$) (Table 2). The moisture content of cheeses C1, C3 and C4 decreased during storage time, concomitant with an increase in dry matter, both of which could be related to an increase in the percentage of protein.

Lower values for lactose were observed in cheeses C1 (1.55 and $1.09 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ at 1 and 21 days, respectively), C3 (2.08 and $1.16 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$, respectively) and C5 (2.09 and $1.65 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$, respectively), suggesting a higher consumption of lactose by the starter culture and probiotic strains during storage, which may have been accompanied by greater lactic acid production (Table 2).

Proteolysis is one of the major biochemical events for the development of proper flavor in cheeses during storage, mainly due to the production of peptides and free amino acids (Sousa et al., 2001). The mean values for the proteolysis parameters of coalho goat cheeses supplemented with different lactic acid bacteria during 21 days of cold storage are listed in Table 3. Storage time exhibited no influence ($p > 0.05$) on the extent of the proteolysis index - EPI (primary proteolysis), with the exception of cheese C5, in which EPI decreased ($p < 0.05$) after seven days of storage. This finding could be related to the processing of the cheeses, where the type and the amount of commercial coagulating agent

was the same for all the produced cheeses, and therefore, different proteolytic enzymes did not act on the casein in the cheeses, producing different high-molecular-weight peptides.

Our findings are consistent with Gardiner et al. (1998) who did not observe differences in the proteolysis parameters between cheddar cheeses with and without *L. paracasei* during refrigerated storage. Similar results were also noted in semi-hard cheeses supplemented with *L. acidophilus* and *L. paracasei* (Bergamini et al., 2006). This same feature for primary proteolysis was also found in previous studies of cheddar cheese supplemented with *Bifidobacterium bifidum* and *L. paracasei* (Dinakar and Mistry, 1994; Gardiner et al., 1998), Gouda cheeses with *Bifidobacterium* sp. and *L. acidophilus* (Gomes et al., 1995) and goat cheeses with *B. lactis* and *L. acidophilus* (Gomes and Malcata, 1998).

Higher average values for the depth of the proteolysis index - DPI (secondary proteolysis) were found in cheese C5 (*L. acidophilus*, *L. paracasei* and *B. lactis*) at all storage times, suggesting that the combined use of the assayed bacteria could enhance the proteolysis of cheeses and provide an increased release of peptides (medium and small) and free amino acids. Only in the C1, C2 and C4 cheeses did increased secondary proteolysis occur over the assessed storage periods. The increased levels of secondary proteolysis in cheeses with *L. acidophilus* (LA-5) and *B. lactis* (BB-12) suggest that these strains present a more active peptidolytic system than the assayed strain of *L. paracasei* (*L. casei*-05). Similar results were also observed by Bergamini et al. (2009) who reported that *L. paracasei* exerted no influence on secondary proteolysis in semi-hard cheese after 60 days of storage. Enzymes are more likely to influence proteolysis in cheeses than the type of lactic acid bacteria used during processing (Buriti et al., 2005a; Gomes and Malcata, 1998). In fact, changes in proteolysis are mainly catalyzed by residual chymosin and, to a lesser extent, by other proteases present in the curd, such as plasmin, or proteases from the cell envelopes of the starter culture (Sousa et al., 2001); this was not observed in the present study.

All the evaluated cheeses, when submitted to proper temperatures, did not melt but reduced in diameter. Cheeses tend to melt and deform when exposed to heat at pH values below 5.7 (Sousa et al., 2001). The pH values (ranging from 6.22 to 7.26) measured in the cheeses may justify the decreased diameter observed in all the tested samples (Table 2). The mean values for the textural parameters of the coalho goat cheeses supplemented with different lactic acid bacteria during 21 days of storage at 10 °C are shown in Table 4. After 21 days of storage, an increase ($p < 0.05$) in hardness was observed for cheeses C1, C3 and C5. Cheese C1 presented the lowest values ($p < 0.05$) for springiness and cohesiveness at 1, 7 and 21 days of storage. The gumminess increased in cheeses C3 and C5 during storage, while chewiness increased during storage only in cheese C5.

The increase in syneresis and decrease in moisture content during storage may have been related to the increase in the hardness of the cheeses (Bhaskaracharya and Shah, 2001). Buriti et al. (2005a) and Souza and Saad (2009) reported that Minas frescal cheese with *L. acidophilus* became harder during storage. The rate and level of acidification have a major impact on cheese texture due to demineralization of the casein micelles (Buriti et al., 2005a). In the present study, cheeses C1, C3 and C5 presented greater acidification during storage, which could have contributed to the increased hardness. Among the texture parameters analyzed in the present study, hardness was the most important, as cheeses with brittle texture are normally rejected by consumers (Souza and Saad, 2009).

The L^* value decreased ($p < 0.05$) in the all assessed cheeses during storage (Table 5). Cheeses C2, C3 and C4 showed an increase in the a^* value during storage, and most of the cheeses also presented an increase in the b^* value during storage. The L^* parameter indicates lightness and the capacity of the object to reflect or transmit light based on a scale ranging from 0 to 100. Therefore, higher lightness values result in clearer objects. The assessed samples had high luminosity (L^*) with a predominance of the yellow component (b^*) rather

than the green component (a^*), suggesting that the white yellowness contributed the most to the color characteristics of the cheeses. Rohm and Jaros (1996) evaluated changes in the color of Emmental cheese during storage and noted a decrease in L^* and increases in a^* and b^* .

No differences ($p > 0.05$) were found for the bacterial counts between the types of cheese over the period of storage (Figure 1). The lactic acid bacteria counts in cheeses C2, C3, C4 and C5 were always higher than $6.5 \log \text{ cfu g}^{-1}$ after 1 day of storage, while after 21 days, these values were higher than $7 \log \text{ cfu g}^{-1}$ of cheese. Buriti et al. (2007c) noted decreases in the counts of lactic acid bacteria in Minas frescal cheese with a mixed culture of *L. lactis* subsp. *Lactis* and *L. lactis* subsp. *Cremoris* after 21 days of refrigerated storage. However, other authors have reported increases in the populations of lactic acid bacteria (e.g., *L. paracasei* and *L. acidophilus*) in Minas frescal cheese during storage (Buriti et al., 2005b; Souza and Saad 2009). Similarly, Ryhänen et al. (2001) found counts of *L. acidophilus* over $6.0 \log \text{ cfu g}^{-1}$ in Festivo cheese during 16 weeks of storage. Yilmaztekin et al. (2004) reported counts of *L. acidophilus* La-5 in white-brined cheese approximately $6.0 \log \text{ cfu g}^{-1}$ after 90 days of storage. Vinderola et al. (2000) tested the addition of *L. acidophilus* in mixed culture with different bifidobacteria (*Bifidobacterium* sp., *B. bifidum*, and *B. longum*) to Argentinian fresco cheese and observed counts of *L. acidophilus* above $6.0 \log \text{ cfu g}^{-1}$ after 60 days of storage.

In this study, all cheeses presented counts of lactic acid bacteria higher than 10^7 cfu g^{-1} ($7.0 \log \text{ cfu g}^{-1}$) after seven days of cold storage, which is considered the minimum count of probiotic bacteria required at the moment of intake to assure a favorable impact on consumer health (De Vuyst, 2000; Talwalkar et al., 2004). Some characteristics of low-ripened white cheeses, such as the coalho cheese, suggest that these matrices are suitable carriers of probiotic lactic acid bacteria: i) temperatures exceeding 45°C applied in the processing inhibit the survival of contaminating bacteria, and the matrices provide an

appropriate physical structure for the protection of the probiotic cultures during the storage; ii) they contain high amounts of the proteins, lipids, vitamins and minerals needed for the survival and multiplication of probiotic cultures; and iii) they are slightly acidic, which enables the growth of lactic acid bacteria and inhibits microorganisms that commonly cause spoilage and food-borne diseases (Buriti et al., 2005a; Buriti et al., 2005b).

The lowest ($p < 0.05$) values for appearance, flavor, taste, texture and general perception were found for cheese C1 (standard) at all evaluated storage periods (Table 6). No differences ($p > 0.05$) in appearance, color or flavor were found between cheeses C2, C3, C4 and C5 in the evaluated storage period. Cheese C5 had higher values ($p < 0.05$) than C3 for general perception after 21 days of storage. A decrease ($p < 0.05$) in the scores for general perception for C3 was observed over the storage time.

When asked to report about the intent to purchase, the panelists reported differences between cheese C1 and the other cheeses at all storage periods. The responses fell between “possibly would not purchase” and “maybe would purchase/maybe would not purchase”. The intent to purchase was similar for cheeses C3 and C5 during the evaluated storage periods, where the hedonic term was between “maybe would purchase/maybe would not purchase” and “purchase”. There was an increase in purchase intention for cheeses C2 and C4 during the assessed storage period, where the hedonic term was “possibly purchase”.

In the preference ranking test, cheese C5 was the most preferred, and cheese C1 was the least preferred ($p < 0.05$) after 21 days of storage. Cheeses C2, C3 and C4 were similarly ($p > 0.05$) classified as being moderately desirable. Under certain conditions, *L. lactis* (which was present in the starter culture added to cheese C1) rapidly ferments available carbon sources into lactic acid and converts sugars into other organic compounds, such as formate, acetate and ethanol, negatively influencing the sensory properties of unripened cheeses, such as the coalho cheese (Even et al., 1999). Moreover, the different profile of secondary

proteolysis (depth of proteolysis index) found in cheeses manufactured with some strains of probiotic lactic acid bacteria could cause a satisfactory impact on the sensory characteristics of these cheeses, particularly in their flavor, when compared with cheeses manufactured without the addition of these strains. Although cheese C1 had also presented increased secondary proteolysis, the higher acidity developed in this cheese over the storage period could have overcome the possible positive effects of secondary proteolysis on its sensory characteristics, resulting in a decrease in the sensory acceptance of the product.

Conclusions

The addition of a standard starter culture of *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris* in coalho goat cheese resulted in a more acidic product. The addition of the assayed strains of probiotic lactic acid bacteria in co-culture resulted in higher proteolysis rates and depths. Coalho goat cheese may be a good carrier for the delivery of probiotic lactic acid bacteria because the cheeses presented viable counts of the added bacteria during 21 days of cold storage at levels higher than those recommended for health benefits. Coalho goat cheeses with the added probiotic lactic acid strains alone and in co-culture were better accepted in the sensory evaluation than cheeses without the probiotic strains.

Acknowledgements

To the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Brazil) and the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brazil) for financial support.

References

- Andreatta, E.; Fernandes, A.M.; Santos, M.V.; Lima, C.G.; Mussarelli, C.; Marquesi, M.C.; Oliveira, C.A.F. 2007. Effects of milk somatic cell count on physical and chemical characteristics of mozzarella cheese. *Australian Journal of Dairy Technology* 62: 166–170.
- Association of Official Analytical Chemists - International [AOAC]. 2005. *Official Methods of Analysis*. 18ed. AOAC, Gaithersburg, MD, USA.
- Bergamini, C.V.; Hynes, E.R.; Zalazar, C.A. 2006. Influence of probiotic bacteria on the proteolysis profile of a semi-hard cheese. *International Dairy Journal* 16: 856–866.
- Bergamini, C.V.; Hynes, E.R.; Palma, S.B.; Sabbag, N.G.; Zalazar, C.A. 2009. Proteolytic activity of three probiotic strains in semi-hard cheese as single and mixed cultures: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*. *International Dairy Journal* 19: 467–475.
- Bhaskaracharya, R.K.; Shah, N.P. 2001. Texture and microstructure of skim milk Mozzarella cheeses made using fat replacers. *Australian Journal of Dairy Technology* 56: 9–14.
- Brasil. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Ordinance No. 352 of 1997: approves technical regulation for the identity and quality of “coalho” cheese. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, Brazil (in Portuguese).
- Buriti, F.C.A.; Rocha, J.S.; Saad, S.M.I. 2005a. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. *International Dairy Journal* 15: 1279–1288.
- Buriti, F.C.A.; Rocha, J.S.; Assis, E.G.; Saad, S.M.I. 2005b. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. *LWT. Food Science and Technology* 38: 173–180.

- Buriti, F.C.A.; Cardarelli, H.R.; Saad, S.M.I. 2007a. Biopreservation by *Lactobacillus paracasei* in co-culture with *Streptococcus thermophilus* in potentially probiotic and synbiotic fresh cream-cheeses. *Journal of Food Protection* 70: 228–235.
- Buriti, F.C.A.; Cardarelli, H.R.; Filisetti, T.M.C.C.; Saad, S.M.I. 2007b. Symbiotic potential of fresh cream cheese supplemented with inulin and *Lactobacillus paracasei* in co-culture with *Streptococcus thermophiles*. *Food Chemistry* 104: 1605–1610.
- Buriti, F.C.A.; Okazaki, T.Y.; Alegro, J.H.A.; Saad, S.M.I. 2007c. Effect of a probiotic mixed culture on texture profile and sensory performance of Minas fresh cheese in comparison with the traditional products. *Archivos Latinoamericano de Nutrición* 57: 179–185.
- Commission Internationale de l'Éclairage [CIE]. 1986. Colourimetry. 2ed. CIE Publication, Vienna, Austria.
- Cruz, A.G.; Buriti, F.C.A.; Souza, C.H.B.; Faria, J.A.F.; Saad, S.M.I. 2009. Probiotic cheese: Health benefits, technological and stability aspects. *Trends in Food Science and Technology* 20: 344–354.
- Cunha, C.R.; Viotto, W.H.; Viotto, L.A. 2006. Use of low concentration factor ultrafiltration retentates in reduced fat “Minas Frescal” cheese manufacture: effect on composition, proteolysis, viscoelastic properties and sensory acceptance. *International Dairy Journal* 16: 215–224.
- De Vuyst, L. 2000. Technology aspects related to the application of functional starter cultures. *Food Technology and Biotechnology* 38: 105–112.
- Dinakar, P.; Mistry, V.V. 1994. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* 77: 2854–2864.
- Even, S.; Garrigues, C.; Loubiere, P.; Lindley, N.D.; Coccagn-Bousquet, M. 1999. Pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis* is dependent upon glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase activity. *Metabolism and Engineering* 1: 198–205.

- Food and Agriculture Organization. [FAO]. 2001. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. FAO/WHO, Roma, Italy.
- Food and Drug Administration [FDA]. 1992. Bacteriological Analytical Manual. 7ed. AOAC International, Arlington, VA, USA.
- Gardiner, G.; Ross, R.P.; Collins, J.K.; Fitzgerald, G.; Stanton, C. 1998. Development of a probiotic Cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2192–2199.
- Gobbetti, M.; Corsetti, A.; Smacchi, E.; Zocchetti, A.; De Angelis, M. 1998. Production of Crescenza cheese by incorporation of bifidobacteria. *Journal of Dairy Science* 81: 37–47.
- Gomes, A.M.P.; Malcata, F.X.; Klaver, F.A.M.; Grande, H.J. 1995. Incorporation and survival of *Bifidobacterium sp.* Strain Bo and *Lactobacillus acidophilus* strain Ki in a cheese product. *Netherland Milk and Dairy Journal* 49: 71–95.
- Gomes, A.M.P.; Vieira, M.M.; Malcata, F.X. 1998. Survival of probiotic microbial strains in a cheese matrix during ripening: simulation of rates of salt diffusion and microorganism survival. *Journal of Food Engineering* 36: 281–301.
- Gomes, A.M.P.; Malcata, F.X. 1998. Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. *Journal of Dairy Science* 81: 1492–1507.
- Koca, N.; Metin, M.N. 2004. Textural, melting and sensory properties of low-fat fresh kashar cheeses produced by using fat replacers. *International Dairy Journal* 14: 365–373.
- Laguna, L.E.; Landim, F.G.S. 2003. Starting a small big agro-industrial business with goat milk and derivatives. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF, Brazil (in Portuguese).
- Lin, W.H.; Hwang, C.F.; Chen, L.W.; Tsen, H.Y. 2006. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. *Food Microbiology* 23: 74–81.

- Mätö, J.; Alakomi, H.; Vaari, A.; Virjajärvi, I.; Saarela, M. 2006. Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* with a special focus on acid tolerance and factors affecting its products. *International Dairy Journal* 16: 1029–1037.
- McBrearty, S.; Ross, R.P.; Fitzgerald, G.F.; Collins, J.K.; Wallace, J.M.; Stanton, C. 2001. Influence of two commercially available bifidobacteria cultures on cheddar cheese quality. *International Dairy Journal* 11: 599–610.
- Ong, L.; Henriksson, A.; Shah, N.P. 2006. Development of probiotic cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium spp.* and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. *International Dairy Journal* 16: 446–456.
- Ong, L.; Shah, N.P. 2009. Probiotic cheddar cheese: influence of ripening temperatures on survival of probiotic microorganisms, cheese composition and organic acid profiles. *LWT – Food Science and Technology* 42: 1260–1268.
- Park, J.; Rosenau, R.; Peleg, M. 1984. Comparison of four procedures of cheese melt ability evaluation. *Journal of Food Science* 49: 1158–1162.
- Phillips, M.; Kailasapathy, K.; Tran, L. 2006. Viability of commercial probiotic cultures (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium sp.*, *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus*) in cheddar cheese. *International Journal of Food Microbiology* 108: 276–280.
- Rohm, H.; Jaros, D. 1996. Colour of hard cheese. 1. Description of colour properties and effects of maturation. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung Forschung* 203: 241–244.
- Ryhänen, E.L.; Pihlanto-Leppälä, A.; Pahkala, E. 2001. A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. *International Dairy Journal* 11: 441–447.
- Saarela, M.; Lähdenmäki, L.; Crittenden, R.; Salminen, S.; Mattila-Sandholm, T. 2002. Gut bacteria and health food: the European perspective. *International Journal of Food Microbiology* 78: 99–117.

- SAS Institute. 1999. SAS User's Guide: Statistics; Version 8.0. SAS Institute, Cary, NC, USA.
- Shah, N.P. 2007. Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal* 17: 1262–1277.
- Sousa, M.J.; Ardo, Y.; McSweeney, P.L.H. 2001. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal* 11: 327–345.
- Souza, C.H.B.; Saad, S.M.I. 2009. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 added solely or in co-culture with a yoghurt starter culture and implications on physico-chemical and related properties of Minas fresh cheese during storage. *LWT - Food Science and Technology* 42: 633–640.
- Talwalkar, A.; Miller, C.W.; Kailasapathy, K.; Nguyen, M.H. 2004. Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. *International Journal of Food Science and Technology* 39: 605–611.
- Vinderola, C.G.; Prosello, W.; Ghiberto, D.; Reinheimer, J.A. 2000. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian fresco cheese. *Journal of Dairy Science* 83: 1905–1911.
- Wohlgemuth, S.; Loh, G.; Blaut, M. 2010. Recent developments and perspectives in the investigation of probiotic effects. *International Journal of Medical Microbiology* 300: 3–10.
- Yilmaztekin, M.; Özer, B.H.; Atasoy, F. 2004. Survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-02 in white-brined cheese. *International Journal of Food Science and Nutrition* 55: 53–60.

Table 1 - Mean values (standard deviation) for yields of the final product and syneresis of coalho goat cheese with different lactic acid bacteria during 21 days of storage at 10 °C.

Variables	Days of storage	Cheeses				
		C1	C2	C3	C4	C5
Yield ¹	1	133.60 (± 10.80) ^{BC}	130.90 (± 72.50) ^C	142.83 (± 33.80) ^A	136.27 (± 40.80) ^{AC}	139.84 (± 28.70) ^{AB}
	1	8.29 (± 0.47) ^{BCc}	18.50 (± 5.79) ^{Ab}	10.01 (± 0.21) ^{Bb}	2.45 (± 0.26) ^{Cc}	2.27 (± 2.48) ^{Cb}
Syneresis ²	7	27.62 (± 1.89) ^{Abc}	42.87 (± 0.11) ^{Aab}	43.24 (± 25.85) ^{Ab}	40.57 (± 6.56) ^{Ab}	51.08 (± 6.43) ^{Aa}
	14	49.25 (± 1.26) ^{Aa}	69.80 (± 30.31) ^{Aa}	68.91 (± 15.36) ^{Aab}	41.27 (± 12.58) ^{Aab}	60.47 (± 21,30) ^{Aa}
	21	34.78 (± 1.61) ^{Bab}	64.36 (± 10.17) ^{ABa}	103.08 (± 51.47) ^{Aa}	55.70 (± 15.47) ^{Ba}	77.19 (± 12.73) ^{ABa}

Results are averages of three replicates of cheeses manufactured at different times.

The following abbreviations are used: C1, cheese treated with *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*; C2, cheese treated with *Lactobacillus acidophilus*; C3, cheese treated with *Lactobacillus paracasei*; C4, cheese treated with *Bifidobacterium lactis*; and C5, cheese treated with *L. acidophilus*, *L. paracasei* and *B. lactis*.

¹ g of cheese L of milk⁻¹.

² g of whey kg of cheese⁻¹.

^{a-c} For each trial, different superscript lowercase letters within a column denote differences ($p < 0.05$) between values obtained for different days of storage according Tukey's test.

^{A-C} Different superscript capital letters within a row denote differences ($p < 0.05$) between the values obtained for the different trials according to Tukey's test.

Table 2 - Mean values (standard deviation) for the gross composition and physicochemical characteristics of coalho goat cheese with probiotic lactic acid bacteria during 21 days of storage at 10 °C.

Variables	Days of storage	Cheeses				
		C1	C2	C3	C4	C5
Moisture (g 100g ⁻¹)	1	57.57 (± 0.41) ^{Ca}	56.62 (± 0.51) ^{Ca}	57.64 (± 1.10) ^{BCa}	59.18 (± 0.73) ^{ABa}	60.27 (± 0.31) ^{Aa}
	7	57.09 (± 0.15) ^{Ca}	57.48 (± 0.52) ^{Ca}	58.15 (± 0.88) ^{BCa}	58.83 (± 0.73) ^{Ba}	60.41 (± 0.05) ^{Aa}
	14	54.97 (± 0.12) ^{Cb}	56.72 (± 1.09) ^{Ba}	54.39 (± 0.99) ^{Cb}	59.46 (± 0.32) ^{Aa}	59.29 (± 0.30) ^{Ab}
	21	54.20 (± 0.11) ^{Cb}	56.06 (± 0.89) ^{Ba}	55.23 (± 0.09) ^{Cb}	56.76 (± 0.82) ^{Bb}	59.97 (± 0.14) ^{Aa}
Dry matter (g 100g ⁻¹)	1	42.85 (± 0.17) ^{Ac}	43.47 (± 0.37) ^{Aa}	41.29 (± 0.36) ^{Bb}	40.39 (± 0.19) ^{Bb}	40.25 (± 0.94) ^{Bb}
	7	42.91 (± 0.15) ^{Ac}	42.52 (± 0.52) ^{Aa}	41.85 (± 0.88) ^{ABb}	41.18 (± 0.73) ^{Bb}	39.56 (± 0.08) ^{Cb}
	14	45.50 (± 0.12) ^{Ab}	43.28 (± 1.09) ^{Ba}	45.61 (± 0.99) ^{Aa}	43.23 (± 0.11) ^{Ba}	40.71 (± 0.30) ^{Cb}
	21	45.80 (± 0.11) ^{ABa}	43.94 (± 0.89) ^{CDa}	44.78 (± 0.09) ^{BCa}	43.24 (± 0.82) ^{Da}	46.86 (± 0.31) ^{Aa}
Ashes (g 100g ⁻¹)	1	4.03 (± 0.04) ^{Ba}	4.25 (± 0.07) ^{Aa}	4.02 (± 0.11) ^{Ba}	4.37 (± 0.14) ^{Abc}	4.24 (± 0.05) ^{Aa}
	7	4.13 (± 0.15) ^{Aa}	4.25 (± 0.04) ^{Aa}	4.16 (± 0.19) ^{Aa}	4.32 (± 0.03) ^{Ac}	4.23 (± 0.06) ^{Aa}
	14	4.13 (± 0.09) ^{Ba}	4.25 (± 0.04) ^{Ba}	4.20 (± 0.06) ^{Ba}	4.56 (± 0.09) ^{Aab}	4.25 (± 0.06) ^{Ba}
	21	4.22 (± 0.20) ^{Ba}	4.10 (± 0.10) ^{Bb}	4.09 (± 0.11) ^{Ba}	4.70 (± 0.11) ^{Aa}	4.20 (± 0.02) ^{Ba}
Total protein (g 100g ⁻¹)	1	21.82 (± 0.10) ^{Ac}	20.01 (± 0.16) ^{Bc}	20.32 (± 0.14) ^{Bb}	19.27 (± 0.32) ^{Cb}	18.42 (± 0.03) ^{Db}
	7	22.73 (± 0.16) ^{Ab}	21.66 (± 0.12) ^{ABa}	19.98 (± 0.96) ^{CDb}	21.12 (± 0.43) ^{Ba}	19.44 (± 0.26) ^{Da}
	14	23.32 (± 0.37) ^{Aa}	20.69 (± 0.19) ^{Cb}	21.86 (± 0.60) ^{Ba}	20.96 (± 0.54) ^{BCa}	19.37 (± 0.64) ^{Da}
	21	21.59 (± 0.24) ^{Ac}	21.27 (± 0.33) ^{Aa}	20.87 (± 0.47) ^{Aab}	21.70 (± 0.74) ^{Aa}	19.10 (± 0.16) ^{Bab}
Fat matter (g 100g ⁻¹)	1	17.00 (± 0.00) ^{Ab}	16.50 (± 0.00) ^{Bab}	17.25 (± 0.29) ^{Ab}	15.13 (± 0.25) ^{Cc}	16.13 (± 0.25) ^{Ba}
	7	18.63 (± 0.48) ^{Aa}	16.00 (± 0.58) ^{Bb}	18.63 (± 1.03) ^{Aa}	17.50 (± 0.00) ^{Aa}	16.13 (± 0.48) ^{Ba}
	14	18.83 (± 0.41) ^{Aa}	17.50 (± 0.41) ^{Ba}	19.13 (± 0.25) ^{Aa}	15.75 (± 0.29) ^{Cbc}	16.17 (± 0.26) ^{Ca}
	21	19.00 (± 0.45) ^{Aa}	16.75 (± 0.61) ^{Bab}	19.25 (± 0.65) ^{Aa}	16.63 (± 0.75) ^{Bab}	16.38 (± 0.25) ^{Ba}
Lactose (g/100 g)	1	1.54 (± 0.04) ^{Ca}	1.90 (± 0.02) ^{Ba}	2.08 (± 0.02) ^{Aa}	1.54 (± 0.04) ^{Cc}	2.09 (± 0.07) ^{Aa}
	7	1.07 (± 0.00) ^{Db}	1.93 (± 0.02) ^{Bb}	1.56 (± 0.05) ^{Cab}	2.04 (± 0.07) ^{Aa}	1.85 (± 0.02) ^{Bb}
	14	0.99 (± 0.02) ^{Dc}	1.68 (± 0.02) ^{BCc}	1.32 (± 0.34) ^{CDb}	2.12 (± 0.02) ^{Aa}	1.76 (± 0.10) ^{ABbc}

NaCl (g 100g ⁻¹)	21	0.97 (± 0.02) ^{Cc}	2.03 (± 0.04) ^{Aa}	1.16 (± 0.37) ^{BCb}	1.94 (± 0.01) ^{Ab}	1.65 (± 0.02) ^{Ac}
	1	0.61 (± 0.04) ^{Bb}	0.62 (± 0.06) ^{Ba}	0.58 (± 0.04) ^{Bb}	0.77 (± 0.05) ^{Aa}	0.55 (± 0.00) ^{Bb}
	7	0.67 (± 0.05) ^{Aab}	0.59 (± 0.04) ^{Ba}	0.70 (± 0.03) ^{Aa}	0.65 (± 0.02) ^{ABb}	0.63 (± 0.03) ^{ABa}
	14	0.66 (± 0.02) ^{ABab}	0.61 (± 0.03) ^{BCa}	0.59 (± 0.05) ^{Cb}	0.69 (± 0.01) ^{Ab}	0.60 (± 0.02) ^{Ca}
	21	0.69 (± 0.01) ^{Aa}	0.53 (± 0.04) ^{Ba}	0.56 (± 0.01) ^{Bb}	0.65 (± 0.05) ^{Ab}	0.64 (± 0.03) ^{Aa}
pH	1	6.52 (± 0.16) ^{Da}	7.03 (± 0.02) ^{BCab}	7.16 (± 0.00) ^{ABa}	7.26 (± 0.01) ^{Aab}	6.93 (± 0.06) ^{Ca}
	7	6.31 (± 0.30) ^{Ba}	7.12 (± 0.09) ^{Aab}	7.06 (± 0.02) ^{Aab}	7.16 (± 0.08) ^{Ab}	6.98 (± 0.01) ^{Aa}
	14	6.01 (± 0.09) ^{Da}	7.25 (± 0.02) ^{Aa}	6.79 (± 0.05) ^{Cb}	7.16 (± 0.04) ^{Ab}	6.91 (± 0.05) ^{Ba}
	21	6.22 (± 0.41) ^{Ca}	6.88 (± 0.25) ^{ABb}	6.35 (± 0.25) ^{Cc}	7.38 (± 0.11) ^{Aa}	6.53 (± 0.16) ^{BCb}
	21	6.22 (± 0.41) ^{Ca}	6.88 (± 0.25) ^{ABb}	6.35 (± 0.25) ^{Cc}	7.38 (± 0.11) ^{Aa}	6.53 (± 0.16) ^{BCb}
Titratable acidity (g/100 g)	1	0.53 (± 0.00) ^{Bc}	0.71 (± 0.00) ^{Aa}	0.18 (± 0.00) ^{Dd}	0.53 (± 0.00) ^{Ba}	0.36 (± 0.00) ^{Cb}
	7	1.06 (± 0.00) ^{Ab}	0.53 (± 0.00) ^{Cb}	0.71 (± 0.00) ^{Bc}	0.44 (± 0.10) ^{CDa}	0.36 (± 0.00) ^{Db}
	14	1.06 (± 0.00) ^{Ab}	0.53 (± 0.00) ^{Bb}	1.06 (± 0.00) ^{Ab}	0.35 (± 0.00) ^{Ca}	0.53 (± 0.00) ^{Ba}
	21	1.23 (± 0.00) ^{Ba}	0.35 (± 0.00) ^{Dc}	1.24 (± 0.00) ^{Aa}	0.35 (± 0.00) ^{Da}	0.53 (± 0.00) ^{Ca}
	21	1.23 (± 0.00) ^{Ba}	0.35 (± 0.00) ^{Dc}	1.24 (± 0.00) ^{Aa}	0.35 (± 0.00) ^{Da}	0.53 (± 0.00) ^{Ca}
Aw	1	0.971 (± 0.00) ^{Aa}	0.967 (± 0.00) ^{Bab}	0.970 (± 0.00) ^{Ab}	0.966 (± 0.00) ^{Bb}	0.962 (± 0.00) ^{Cc}
	7	0.966 (± 0.00) ^{Cb}	0.969 (± 0.00) ^{Ba}	0.972 (± 0.00) ^{Aab}	0.963 (± 0.00) ^{Db}	0.971 (± 0.00) ^{ABb}
	14	0.967 (± 0.00) ^{Cb}	0.966 (± 0.00) ^{CDb}	0.963 (± 0.00) ^{Dc}	0.973 (± 0.00) ^{Ba}	0.978 (± 0.00) ^{Aa}
	21	0.966 (± 0.00) ^{Bb}	0.962 (± 0.00) ^{Bc}	0.978 (± 0.01) ^{Aa}	0.975 (± 0.01) ^{Aa}	0.976 (± 0.00) ^{Aa}
	21	0.966 (± 0.00) ^{Bb}	0.962 (± 0.00) ^{Bc}	0.978 (± 0.01) ^{Aa}	0.975 (± 0.01) ^{Aa}	0.976 (± 0.00) ^{Aa}

Results are averages of three replicates of cheeses manufactured at different times.

The following abbreviations are used: C1, cheese treated with *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*; C2, cheese treated with *Lactobacillus acidophilus*; C3, cheese treated with *Lactobacillus paracasei*; C4, cheese treated with *Bifidobacterium lactis*; and C5, cheese treated with *L. acidophilus*, *L. paracasei* and *B. lactis*.

^{a-c} For each trial, different superscript lowercase letters within a column denote differences ($p < 0.05$) between values obtained for different days of storage according to Tukey's test.

^{A-C} Different superscript capital letters within a row denote differences ($p < 0.05$) between the values obtained for the different trials according to Tukey's test.

Table 3 - Mean values (standard deviation) for proteolysis parameters of coalho goat cheese with probiotic lactic acid bacteria during 21 days of storage at 10 °C.

Variables	Days of storage	Cheeses				
		C1	C2	C3	C4	C5
EPI	1	10.54 (± 2.04) ^{Aa}	14.50 (± 3.65) ^{Aa}	11.44 (± 4.75) ^{Aa}	12.72 (± 3.44) ^{Aa}	12.32 (± 3.05) ^{Aab}
	7	13.28 (± 3.82) ^{Aa}	12.39 (± 2.54) ^{Aa}	11.83 (± 3.12) ^{Aa}	12.97 (± 1.85) ^{Aa}	10.16 (± 1.14) ^{Ab}
	14	13.27 (± 0.38) ^{ABa}	11.81 (± 2.03) ^{Ba}	12.44 (± 1.82) ^{ABa}	11.65 (± 2.64) ^{Ba}	15.37 (± 1.65) ^{Aa}
	21	14.41 (± 0.54) ^{Aa}	12.56 (± 2.40) ^{Aa}	13.66 (± 3.20) ^{Aa}	11.59 (± 2.77) ^{Aa}	14.12 (± 3.89) ^{Aab}
DPI	1	9.34 (± 0.38) ^{Dc}	9.64 (± 0.39) ^{CDb}	10.29 (± 0.55) ^{BCa}	10.52 (± 0.39) ^{Bb}	16.25 (± 0.03) ^{Aa}
	7	8.87 (± 0.04) ^{Dbc}	8.89 (± 0.49) ^{CDb}	9.83 (± 0.71) ^{BDa}	10.07 (± 0.50) ^{ABb}	16.89 (± 0.14) ^{Aa}
	14	8.70 (± 0.04) ^{Cb}	15.16 (± 0.79) ^{Ba}	9.73 (± 0.48) ^{Ca}	9.66 (± 0.43) ^{Cb}	16.38 (± 0.54) ^{Aa}
	21	14.60 (± 0.44) ^{Ca}	14.42 (± 0.15) ^{Ca}	9.82 (± 0.22) ^{Da}	15.42 (± 0.48) ^{Ba}	16.59 (± 0.11) ^{Aa}

Results are averages of three replicates of cheeses manufactured at different times.

The following abbreviations are used: EPI, extent proteolysis index; DPI, depth of proteolysis index; C1, cheese treated with *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*; C2, cheese treated with *Lactobacillus acidophilus*; C3, cheese treated with *Lactobacillus paracasei*; C4, cheese treated with *Bifidobacterium lactis*; and C5, cheese treated with *L. acidophilus*, *L. paracasei* and *B. lactis*.

^{a-c} For each trial, different superscript lowercase letters within a column denote differences ($p < 0.05$) between values obtained for different days of storage according to Tukey's test.

^{A-C} Different superscript capital letters within a row denote differences ($p < 0.05$) between the values obtained for the different trials according to Tukey's test.

Table 4 - Mean values (standard deviation) for textural parameters of coalho goat cheese with different probiotic lactic acid bacteria during 21 days of storage at 10 °C.

Variables	Days of storage	Cheeses				
		C1	C2	C3	C4	C5
Hardness	1	1254.42 ($\pm$ 182.45) ^{Ab}	1240.48 ($\pm$ 334.07) ^{Aa}	1293.77 ($\pm$ 470.90) ^{Ab}	1163.23 ($\pm$ 430.98) ^{Aa}	1012.84 ($\pm$ 213.49) ^{Ab}
	7	2042.54 ($\pm$ 508.49) ^{Aab}	1891.10 ($\pm$ 820.35) ^{Aa}	1795.68 ($\pm$ 282.18) ^{Ab}	1762.84 ($\pm$ 911.12) ^{Aa}	1349.64 ($\pm$ 357.70) ^{Ab}
	14	2027.19 ($\pm$ 574.70) ^{Aab}	1424.30 ($\pm$ 232.26) ^{Aa}	1911.82 ($\pm$ 324.65) ^{Aab}	1709.28 ($\pm$ 127.61) ^{Aa}	1654.55 ($\pm$ 339.96) ^{Aab}
	21	2490.71 ($\pm$ 566.32) ^{Aa}	1814.84 ($\pm$ 745.69) ^{Aa}	2582.29 ($\pm$ 598.43) ^{Aa}	1880.77 ($\pm$ 691.88) ^{Aa}	2011.70 ($\pm$ 435.50) ^{Aa}
Adhesiveness	1	-0.60 ($\pm$ 0.45) ^{Aa}	-0.84 ($\pm$ 0.37) ^{Aa}	-1.05 ($\pm$ 0.93) ^{Aa}	-0.70 ($\pm$ 0.53) ^{Aa}	-1.11 ($\pm$ 0.41) ^{Aa}
	7	-3.26 ($\pm$ 3.03) ^{Aa}	-1.66 ($\pm$ 1.32) ^{Aa}	-1.40 ($\pm$ 0.50) ^{Aa}	-0.98 ($\pm$ 0.35) ^{Aa}	-0.59 ($\pm$ 0.44) ^{Aa}
	14	-1.40 ($\pm$ 0.55) ^{Aa}	-0.745 ($\pm$ 0.68) ^{Aa}	-1.36 ($\pm$ 0.71) ^{Aa}	-0.66 ($\pm$ 0.18) ^{Aa}	-0.99 ($\pm$ 0.65) ^{Aa}
	21	-5.90 ($\pm$ 5.02) ^{Aa}	-1.16 ($\pm$ 0.21) ^{Aa}	-6.57 ($\pm$ 8.33) ^{Aa}	-1.14 ($\pm$ 0.84) ^{Aa}	-1.57 ($\pm$ 1.20) ^{Aa}
Springiness	1	0.89 ($\pm$ 0.02) ^{Ba}	0.93 ($\pm$ 0.00) ^{Aa}	0.93 ($\pm$ 0.01) ^{Aa}	0.93 ($\pm$ 0.01) ^{Aa}	0.93 ($\pm$ 0.01) ^{Aa}
	7	0.78 ($\pm$ 0.13) ^{Ba}	0.92 ($\pm$ 0.02) ^{Aa}	0.91 ($\pm$ 0.03) ^{Aa}	0.92 ($\pm$ 0.01) ^{Aa}	0.91 ($\pm$ 0.03) ^{Aa}
	14	0.85 ($\pm$ 0.11) ^{Aa}	0.91 ($\pm$ 0.01) ^{Aa}	0.90 ($\pm$ 0.03) ^{Aa}	0.91 ($\pm$ 0.02) ^{Aa}	0.88 ($\pm$ 0.05) ^{Aa}
	21	0.73 ($\pm$ 0.14) ^{Ba}	0.92 ($\pm$ 0.02) ^{Aa}	0.83 ($\pm$ 0.10) ^{ABa}	0.92 ($\pm$ 0.01) ^{Aa}	0.88 ($\pm$ 0.05) ^{Aa}
Cohesiveness	1	0.75 ($\pm$ 0.04) ^{Ba}	0.82 ($\pm$ 0.01) ^{Aa}	0.81 ($\pm$ 0.00) ^{Aa}	0.81 ($\pm$ 0.01) ^{Aa}	0.81 ($\pm$ 0.01) ^{Aa}
	7	0.55 ($\pm$ 0.22) ^{Ba}	0.81 ($\pm$ 0.02) ^{Aa}	0.79 ($\pm$ 0.03) ^{Aab}	0.81 ($\pm$ 0.02) ^{Aa}	0.79 ($\pm$ 0.07) ^{Aa}
	14	0.65 ($\pm$ 0.26) ^{Aa}	0.80 ($\pm$ 0.03) ^{Aa}	0.76 ($\pm$ 0.07) ^{Aab}	0.77 ($\pm$ 0.03) ^{Aa}	0.76 ($\pm$ 0.08) ^{Aa}
	21	0.44 ($\pm$ 0.26) ^{Ba}	0.80 ($\pm$ 0.04) ^{Aa}	0.65 ($\pm$ 0.15) ^{ABb}	0.80 ($\pm$ 0.02) ^{Aa}	0.72 ($\pm$ 0.11) ^{Aa}
Gumminess	1	720.83 ($\pm$ 506.26) ^{Aa}	1018.20 ($\pm$ 261.32) ^{Aa}	1051.94 ($\pm$ 378.80) ^{Ab}	942.27 ($\pm$ 343.82) ^{Aa}	819.26 ($\pm$ 165.18) ^{Ab}
	7	1253.44 ($\pm$ 676.67) ^{Aa}	1548.93 ($\pm$ 712.23) ^{Aa}	1428.75 ($\pm$ 260.27) ^{Aab}	1429.05 ($\pm$ 764.93) ^{Aa}	1063.61 ($\pm$ 268.72) ^{Ab}
	14	1100.12 ($\pm$ 288.14) ^{Aa}	1241.69 ($\pm$ 306.54) ^{Aa}	1311.86 ($\pm$ 98.61) ^{Aab}	1329.53 ($\pm$ 128.81) ^{Aa}	1223.35 ($\pm$ 202.96) ^{Aab}
	21	1163.32 ($\pm$ 816.79) ^{Aa}	1477.72 ($\pm$ 664.08) ^{Aa}	1621.85 ($\pm$ 275.55) ^{Aa}	1504.69 ($\pm$ 577.28) ^{Aa}	1425.34 ($\pm$ 166.06) ^{Aa}
Chewiness	1	861.38 ($\pm$ 195.70) ^{Aa}	948.90 ($\pm$ 243.74) ^{Aa}	980.02 ($\pm$ 358.79) ^{Aa}	873.20 ($\pm$ 309.91) ^{Aa}	759.76 ($\pm$ 162.12) ^{Ab}
	7	1043.67 ($\pm$ 692.88) ^{Aa}	1428.00 ($\pm$ 673.82) ^{Aa}	1307.96 ($\pm$ 262.91) ^{Aa}	1321.47 ($\pm$ 716.90) ^{Aa}	972.687 ($\pm$ 248.37) ^{Aab}

14	962.87 ($\pm$ 344.72) ^{Aa}	1131.96 ($\pm$ 272.07) ^{Aa}	1176.82 ($\pm$ 51.10) ^{Aa}	1216.86 ($\pm$ 136.59) ^{Aa}	1072.38 ($\pm$ 128.77) ^{Aab}
21	943.70 ($\pm$ 798.04) ^{Aa}	1362.80 ($\pm$ 628.28) ^{Aa}	1357.18 ($\pm$ 340.23) ^{Aa}	1388.27 ($\pm$ 538.22) ^{Aa}	1258.26 ($\pm$ 147.22) ^{Aa}

Results are averages of three replicates of cheeses manufactured at different times; The following abbreviations are used: C1, cheese treated with *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*; C2, cheese treated with *Lactobacillus acidophilus*; C3, cheese treated with *Lactobacillus paracasei*; C4, cheese treated with *Bifidobacterium lactis*; and C5, cheese treated with *L. acidophilus*, *L. paracasei* and *B. lactis*. ^{a-b} For each trial, different superscript lowercase letters within a column denote differences ($p < 0.05$) between values obtained for different days of storage according to Tukey's test. ^{A-B} Different superscript capital letters within a row denote differences ($p < 0.05$) between the values obtained for the different trials according to Tukey's test.

Table 5 - Mean values (standard deviation) for the color evaluation parameters for coalho goat cheese with probiotic lactic acid bacteria during 21 days of storage at 10 °C.

Color	Days of storage	Cheeses				
		C1	C2	C3	C4	C5
L	1	93.50 ($\pm$ 0.30) ^{Aa}	92.63 ($\pm$ 0.30) ^{Ba}	93.38 ($\pm$ 0.16) ^{Aa}	92.67 ($\pm$ 0.15) ^{Ba}	92.50 ($\pm$ 0.25) ^{Ba}
	7	92.81 ($\pm$ 0.13) ^{ABb}	92.23 ($\pm$ 0.15) ^{Ca}	93.30 ($\pm$ 0.33) ^{Aab}	92.70 ($\pm$ 0.30) ^{BCa}	92.51 ($\pm$ 0.21) ^{BCa}
	14	92.51 ($\pm$ 0.27) ^{ABb}	92.52 ($\pm$ 0.19) ^{ABa}	92.84 ($\pm$ 0.21) ^{Abc}	92.60 ($\pm$ 0.18) ^{ABa}	92.42 ($\pm$ 0.33) ^{Ba}
	21	91.36 ($\pm$ 0.23) ^{Bc}	91.48 ($\pm$ 0.21) ^{Bb}	92.73 ($\pm$ 0.35) ^{Ac}	91.71 ($\pm$ 0.80) ^{Bb}	91.69 ($\pm$ 0.20) ^{Bb}
a	1	-3.18 ($\pm$ 0.08) ^{Ba}	-3.09 ($\pm$ 0.00) ^{ABb}	-3.04 ($\pm$ 0.05) ^{Abc}	-3.14 ($\pm$ 0.04) ^{ABc}	-3.08 ($\pm$ 0.02) ^{ABa}
	7	-3.12 ($\pm$ 0.17) ^{ABa}	-3.17 ($\pm$ 0.28) ^{Bb}	-3.09 ($\pm$ 0.21) ^{ABc}	-2.78 ($\pm$ 0.04) ^{Ab}	-3.09 ($\pm$ 0.12) ^{ABa}
	14	-2.88 ($\pm$ 0.21) ^{Ba}	-2.86 ($\pm$ 0.08) ^{ABab}	-2.81 ($\pm$ 0.06) ^{ABb}	-2.65 ($\pm$ 0.03) ^{Aa}	-3.04 ($\pm$ 0.02) ^{Ba}
	21	-2.88 ($\pm$ 0.23) ^{Ba}	-2.68 ($\pm$ 0.14) ^{Ba}	-2.34 ($\pm$ 0.17) ^{Aa}	-2.74 ($\pm$ 0.06) ^{Bb}	-3.18 ($\pm$ 0.14) ^{Ba}
b	1	9.17 ($\pm$ 0.82) ^{Ac}	8.87 ($\pm$ 0.02) ^{Ac}	9.37 ($\pm$ 0.05) ^{Aa}	9.03 ($\pm$ 0.04) ^{Ac}	9.49 ($\pm$ 0.16) ^{Ac}
	7	9.46 ($\pm$ 0.37) ^{Ac}	9.60 ($\pm$ 0.11) ^{Abc}	9.61 ($\pm$ 0.50) ^{Aa}	9.20 ($\pm$ 0.05) ^{Abc}	9.70 ($\pm$ 0.40) ^{Abc}
	14	10.31 ($\pm$ 0.24) ^{Ab}	10.32 ($\pm$ 0.71) ^{Aab}	9.70 ($\pm$ 0.33) ^{ABa}	9.58 ($\pm$ 0.20) ^{Bb}	10.33 ($\pm$ 0.07) ^{Ab}
	21	11.16 ($\pm$ 0.32) ^{Aa}	10.70 ($\pm$ 0.47) ^{ABa}	9.76 ($\pm$ 0.14) ^{Ca}	10.48 ($\pm$ 0.24) ^{Ba}	11.09 ($\pm$ 0.33) ^{Aa}

Results are averages of three replicates of cheeses manufactured at different times.

The following abbreviations are used: C1, cheese treated with *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*; C2, cheese treated with *Lactobacillus acidophilus*; C3, cheese treated with *Lactobacillus paracasei*; C4, cheese treated with *Bifidobacterium lactis*; and C5, cheese treated with *L. acidophilus*, *L. paracasei* and *B. lactis*.

^{a-c} For each trial, different superscript lowercase letters within in column denote differences ($p < 0.05$) between values obtained for different days of storage according to Tukey's test.

^{A-C} Different superscript capital letters within a row denote differences ($p < 0.05$) between the values obtained for the different trials according to Tukey's test.

Table 6 - Mean (standard deviation) sensory scores¹ for coalho goat cheese with different probiotic lactic acid bacteria treatments after storage at 10 °C.

Variables	Days of storage	Cheeses				
		C1	C2	C3	C4	C5
Appearance	1	6.66 (± 2.12) ^{Ba}	7.83 (± 1.28) ^{Aa}	7.71 (± 1.40) ^{Aa}	7.65 (± 1.43) ^{Aa}	7.86 (± 1.60) ^{Aa}
	7	6.18(± 1.98) ^{Ba}	7.27 (± 1.56) ^{Ab}	7.42 (± 1.56) ^{Aa}	7.62 (± 1.27) ^{Aa}	7.72 (± 1.15) ^{Aa}
	14	5.93 (± 2.12) ^{Ba}	7.58 (± 1.27) ^{Aab}	7.56 (± 1.36) ^{Aa}	7.71 (± 1.25) ^{Aa}	7.77 (± 1.08) ^{Aa}
	21	5.93 (± 2.07) ^{Ba}	7.75 (± 1.30) ^{Aab}	7.32 (± 1.41) ^{Aa}	7.47 (± 1.47) ^{Aa}	7.84 (± 1.22) ^{Aa}
Color	1	7.54 (± 1.61) ^{Aa}	7.80 (± 1.34) ^{Aa}	7.91 (± 1.18) ^{Aa}	7.84(± 1.21) ^{Aa}	8.06 (± 0.87) ^{Aa}
	7	7.27 (± 1.50) ^{Ba}	7.61 (± 1.17) ^{ABa}	7.70 (± 1.23) ^{ABa}	7.79 (± 1.15) ^{Aa}	7.79 (± 1.08) ^{Aa}
	14	7.24 (± 1.59) ^{Ba}	7.80 (± 1.20) ^{Aa}	7.75 (± 1.28) ^{Aa}	7.91 (± 1.10) ^{Aa}	7.84 (± 1.14) ^{Aa}
	21	7.11 (± 1.53) ^{Ba}	7.85 (± 1.27) ^{Aa}	7.61 (± 1.32) ^{ABa}	7.68 (± 1.36) ^{Aa}	7.75 (± 1.34) ^{Aa}
Flavor	1	5.88 (± 2.23) ^{Ba}	6.72 (± 1.77) ^{Aa}	6.77 (± 1.69) ^{Aa}	6.84 (± 1.63) ^{Aa}	7.22 (± 1.64) ^{Aa}
	7	5.69 (± 2.32) ^{Ba}	6.51 (± 1.77) ^{Aa}	6.49 (± 1.84) ^{Aa}	6.50 (± 1.67) ^{Aa}	6.86 (± 1.61) ^{Aa}
	14	5.96 (± 2.08) ^{Ba}	6.61 (± 1.54) ^{ABa}	6.62 (± 1.69) ^{ABa}	6.93 (± 1.58) ^{Aa}	6.93 (± 1.64) ^{Aa}
	21	6.18 (± 1.94) ^{Ba}	6.89 (± 1.69) ^{Aa}	6.49 (± 1.53) ^{ABa}	6.63 (± 1.66) ^{ABa}	6.93 (± 1.65) ^{Aa}
Taste	1	5.26 (± 2.49) ^{Ba}	7.05 (± 1.85) ^{Aa}	6.84 (± 1.93) ^{Aa}	7.01 (± 1.68) ^{Aa}	7.28 (± 1.75) ^{Aa}
	7	4.93 (± 2.56) ^{Ba}	6.54 (± 1.93) ^{Aa}	6.48 (± 1.89) ^{Aab}	6.42 (± 1.92) ^{Aa}	7.10 (± 1.61) ^{Aa}
	14	4.74 (± 2.39) ^{Ba}	6.79 (± 1.75) ^{Aa}	6.55 (± 1.93) ^{Aab}	7.02 (± 1.69) ^{Aa}	6.92 (± 1.63) ^{Aa}
	21	5.27 (± 2.57) ^{Ca}	7.06 (± 1.87) ^{Aa}	5.96 (± 2.15) ^{BCb}	6.73 (± 2.04) ^{ABa}	6.95 (± 1.84) ^{Aa}
Texture	1	5.81 (± 2.31) ^{Ba}	7.36 (± 1.64) ^{Aa}	6.66 (± 2.07) ^{Aa}	7.07 (± 1.79) ^{Aa}	7.36 (± 1.65) ^{Aa}
	7	5.35 (± 2.32) ^{Ca}	6.59 (± 2.01) ^{Bb}	6.80 (± 1.82) ^{ABa}	6.99 (± 1.76) ^{ABa}	7.38 (± 1.30) ^{Aa}
	14	5.15 (± 2.09) ^{Ba}	7.03 (± 1.54) ^{Aab}	6.87 (± 1.73) ^{Aa}	7.48 (± 1.48) ^{Aa}	7.28 (± 1.39) ^{Aa}
	21	5.38 (± 2.53) ^{Ca}	7.51 (± 1.50) ^{Aa}	6.60 (± 1.93) ^{Ba}	7.02 (± 1.93) ^{ABa}	7.44 (± 1.55) ^{Aa}
General perception	1	5.50 (± 2.30) ^{Ba}	7.23 (± 1.59) ^{Aa}	6.97 (± 1.55) ^{Aa}	7.06 (± 1.43) ^{Aa}	7.55 (± 1.29) ^{Aa}
	7	5.32 (± 2.22) ^{Ca}	6.76 (± 1.64) ^{ABa}	6.66 (± 1.71) ^{Bab}	6.74 (± 1.78) ^{ABa}	7.41 (± 1.31) ^{Aa}
	14	5.06 (± 2.16) ^{Ba}	7.06 (± 1.32) ^{Aa}	6.78 (± 1.74) ^{Aab}	7.27 (± 1.45) ^{Aa}	7.17 (± 1.39) ^{Aa}

21	5.43 ($\pm$ 2.31) ^{Ca}	7.22 ($\pm$ 1.47) ^{Aa}	6.25 ($\pm$ 1.86) ^{Bb}	6.79 ($\pm$ 1.78) ^{ABa}	7.22 ($\pm$ 1.54) ^{Aa}
----	----------------------------------	----------------------------------	----------------------------------	-----------------------------------	----------------------------------

¹Scored according to a hedonic scale ranging from 1 (dislike very much) to 9 (like very much).

Results are averages of three replicates of cheeses manufactured at different times.

The following abbreviations are used: C1, cheese treated with *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*; C2, cheese treated with *Lactobacillus acidophilus*; C3, cheese treated with *Lactobacillus paracasei*; C4, cheese treated with *Bifidobacterium lactis*; and C5, cheese treated with *L. acidophilus*, *L. paracasei* and *B. lactis*.

^{a-b} For each trial, different superscript lowercase letters within in column denote differences ($p < 0.05$) between values obtained for different days of storage according to Tukey's test.

^{A-C} Different superscript capital letters within a row denote differences ($p < 0.05$) between the values obtained for the different trials according to Tukey's test.

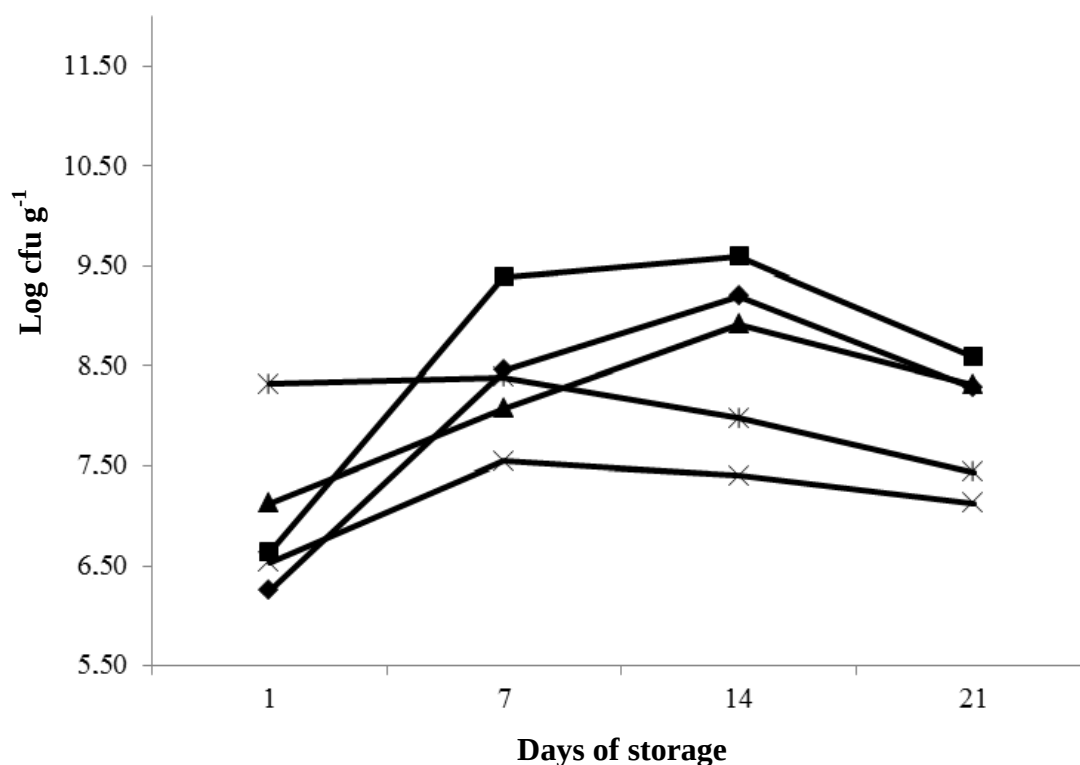


Figure 1 - Counts of lactic acid bacteria in coalho goat cheese with probiotic lactic acid bacteria during 21 days of storage at 10 °C. C1 (◆): control cheese. C2 (■): cheese with *L. acidophilus*. C3 (▲): cheese with *L. paracasei*. C4 (×): cheese with *B. lactis*. C5 (✱): cheese with *L. acidophilus*, *L. paracasei* and *B. lactis*. Results are average of three replicates of cheeses manufactured at different times.

ARTIGO 2

Addition of probiotic bacteria in a semi-hard goat cheese (coalho): survival to simulated gastrointestinal conditions and inhibitory effect against pathogenic bacteria

Running title: Probiotics in goat cheese

Maria Elieidy Gomes de Oliveira¹, Estefânia Fernandes Garcia¹, Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga¹, Carlos Eduardo Vasconcelos de Oliveira¹, Ana Maria Pereira Gomes ², Maria Manuela Esteves Pintado², Ana Raquel Mendes Ferreira Madureira², Maria Lúcia da Conceição³, Evandro Leite de Souza^{3*}

¹ Laboratory of Food Quality, Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

² College of Biotechnology, Catholic University of Porto, Porto, Portugal

³ Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

* Corresponding author: Evandro Leite de Souza

Universidade Federal da Paraíba

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Nutrição

Campus I, 58051-900, Cidade Universitária, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

E-mail: evandroleitesouza@ccs.ufpb.br

Telephone number: + 55 83 3216 7807

Fax number: + 55 83 3216 7094

Abstract

In this study, the survival of the probiotics *Lactobacillus acidophilus* (LA-5), *Lactobacillus paracasei* (*L. casei* 01) and *Bifidobacterium lactis* (BB12) incorporated in a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) when exposed to *in vitro* simulated conditions of digestion was assessed. It was also evaluated the inhibitory effects of these probiotic bacteria against *L. monocytogenes* and *S. aureus* in the coalho goat cheese during refrigerated storage for 21 days. There was a significant difference ($p < 0.05$) for the counts obtained for the tested strains when exposed and not exposed to the simulated gastrointestinal conditions. At the end of the experimental digestion, all of the tested strains presented decreased ($p < 0.05$) viable counts (5.5 – 6.0 log cfu/g) with respect to those determined before exposure to the mouth conditions (time 0.7 – 8 log cfu/g). *L. paracasei* presented inhibition rate of 7.87% and 23.63% against *S. aureus* on the 14th and 21th day of storage, respectively; against *L. monocytogenes* these values were of 12.96 and 32.99%. Positive inhibition rates of *B. lactis* toward *S. aureus* was found on the 1st, 14th and 21th day of storage (16.32%, 10.12% and 3.67%, respectively); and against *L. monocytogenes* only on the 1st day of storage (3.28%). From these results, coalho goat cheese could be an interesting carrier of those probiotic strains; and the probiotic bacteria tested, particularly *L. paracasei* and *B. lactis*, could be used as protective cultures for delay the growth of *S. aureus* and *L. monocytogenes* in goat coalho cheese, increasing the safety and shelf-life of this product.

Keywords: probiotics, gastrointestinal conditions, survival, inhibitory effects, cheese

1. Introduction

In recent years, the growing public awareness of diet-related health issues has fueled the demand for foods with distinct health-promoting effects (Phillips, Kailasapathy, & Tran, 2006; Saarela, Lähteenmäki, Crittenden, Salminen, & Mattila-Sandholm, 2002). The Food and Agriculture Organization defines food-related probiotics as living organisms that, upon ingestion in certain numbers, exert benefits to the consumer's health beyond the inherent basic nutrition (FAO/WHO, 2001). The bacterial strains that are claimed to be probiotics typically belong to the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* and are commonly associated with the gastrointestinal tract (Anal & Singh, 2007).

To provide beneficial health effects to the host, probiotic bacteria must survive through the gastrointestinal tract, tolerating acid, bile and gastric enzymes, and then adhere to and colonize the intestinal epithelium (Huang & Adams, 2004; Kailasapathy & Chin, 2000). Food formulations with an appropriate pH (>5) and high buffering capacity would increase the pH of the gastric tract and thereby enhance the stability of the probiotics. In cheeses, the conditions (i.e., pH and oxygen levels) are suitable for the long-term survival of probiotic bacteria (Boylston, Vinderola, Ghoddusi, & Reinheimer, 2004; Phillips, Kailasapathy, & Tran, 2006), and during gastric passage, the high buffering capacity and lipid content of the matrix may also provide protection to probiotics (Kailasapathy & Chin, 2000; Phillips, Kailasapathy, & Tran, 2006). Therefore, it has been suggested that cheese could be an alternative vehicle for delivering viable probiotics in sufficient numbers to provide therapeutic effects through its entire shelf life (Burns et al., 2008; Vinderola, Prosello, Ghiberto, & Reinheimer, 2000).

Antimicrobial activity is one of the most outstanding features of probiotic bacteria, so the incorporation of probiotic strains in cheeses could prevent (or, at least, delay) the growth or survival of pathogenic and spoiling bacteria in these foods, acting as protector

cultures extending their shelf-life and safety. The antimicrobial activity of probiotic lactic acid bacteria is mainly attributable to the production of organic acids, bacteriocins, hydrogen peroxide, fat and amino acid metabolites (Todorov & Dicks, 2006).

“Coalho” cheese is a product that has been produced for over 150 years in various states of the northeast region of Brazil. Coalho cheese is a semi-hard cheese with medium-to-high moisture produced from raw or pasteurized cow or goat milk. It is obtained after milk coagulation using rennet or proper coagulating enzymes, which are sometimes complemented with selected lactic acid bacteria (starter culture). This cheese is commonly marketed after seven days of storage at 10 °C; and possesses high commercial value because the simplicity of the technology used in this production, the high yield and good acceptance among consumers (Queiroga et al., 2013). In previous studies (Garcia, Oliveira, Queiroga, Machado, & Souza, 2012; Oliveira, Garcia, Queiroga, & Souza, 2012), we demonstrated that *Lactobacillus acidophilus* (LA-5), *Lactobacillus paracasei* (*L. casei*-01) and *Bifidobacterium lactis* (BB-12) remained viable in coalho goat cheese during 21 days of cold storage, and the viable counts were always higher than the those recommended (6 – 7 log cfu/g) for a probiotic food. Moreover, the incorporation of the tested probiotic bacteria in the production of coalho cheese was shown to be feasible because the probiotic bacteria did not cause changes in the quality characteristics of the product except for improving its sensory attributes.

In this manuscript, we analyze the survival of the probiotic bacteria *L. acidophilus* (LA-5), *L. paracasei* (*L. casei*-01) and *B. lactis* (BB 12) when added to coalho goat cheese and exposed to experimental conditions that are typically encountered throughout the gastrointestinal tract; and the inhibitory effect of these probiotic strains against the pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in coalho goat cheese throughout the storage.

2. Material and methods

2.1 Microorganisms

Freeze-dried commercial probiotic cultures of *L. acidophilus* (LA-5, batch 2914230), *L. paracasei* (*L. casei*-01, batch 2910976) and *B. lactis* (BB 12, batch 2280202) were obtained from Chr. Hansen Brazil® (Valinhos, Minas Gerais, Brazil). *L. monocytogenes* ATCC 7644 and *S. aureus* ATCC 6538 were obtained from the Collection of Reference Microorganisms, National Institute of Quality Control in Health (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil).

2.2 Manufacture process of coalho goat cheeses

Coalho cheeses were manufactured in 10-L vats from commercially pasteurized (65 °C per 15 min) goat milk (Caprilácti, Alagoinha, Brazil) heated to 45 ± 1 °C and followed by direct acidification with 0.25 mL/L of lactic acid (stock solution of 0.85 mL/100 mL). The cultures of each of the probiotic bacteria tested were added at a concentration of 10 mg/L for direct vat inoculation. Calcium chloride (0.5 mL/L) and a commercial coagulating agent (0.9 mL/L) were also added to the vats. The vats were incubated at 36 °C until a firm curd was formed (approximately 40 min). The obtained gel was gently cut into cubes (1.5 to 2.0 cm), allowed to drain, placed in perforated rectangular containers (approximate capacity of 250 g), salted in brine (12 g/L NaCl), maintained at 36 °C under pressure for 4 h and vacuum packaged. The cheese obtained after storage at 10 °C for 24 h was regarded as the final product. Each cheese was manufactured three times (replicates), and all analyses were performed in duplicate. For each replication, the cheeses were manufactured from the same milk batch. Control without addition of the probiotic bacteria tested were manufactured similarly and used in assays as control.

2.3 Assays of effects of simulated gastrointestinal conditions on the viability of probiotic bacteria

Each probiotic bacterial strain was studied separately; for each strain, a set of 5 cheese samples labeled as C1, C2, C3, S1 and S2 was produced. C1 and C2 were duplicate controls that were inoculated with the tested probiotic strain but were not exposed to the simulated gastrointestinal conditions; C3 was a control that was not inoculated with the tested probiotic strains but was exposed to the simulated gastrointestinal conditions (and used to aseptically follow the pH adjustments in the sequential stages of the simulated digestion); and S1 and S2 were inoculated with the tested probiotic strains and exposed to the simulated gastrointestinal conditions. All of the aforementioned samples were prepared in sterile flasks (50 mL). In these containers, the cheeses with each of the probiotic strains tested were distributed in amounts of 25 g each.

The simulated gastrointestinal pathway used in this study is described in Table 1, including the compounds, their concentrations, the time interval and the intensities of stirring in all steps (stirring was used to somewhat simulate peristaltic movements). Mastication was simulated according to Hold, Boer, Zuidema, & Maes (1995) and Choi, Chung, Lee, Shin, & Sung (2007) using a saliva solution prepared with 100 U/mL α -amylase (Sigma, St. Louis MO, USA) and diluted in 1 mM CaCl_2 , and 1 M NaHCO_3 was used to adjust the pH to 6.9; the simulated saliva was added to the 25 g-cheese samples at a rate of 0.6 mL/min for 2 min. To simulate the esophagus–stomach, 25 mg/mL pepsin (Sigma) was prepared in 0.1 N HCl; this solution was added in equal-sized aliquots at each step throughout this gastric phase at a rate of 0.05 mL/mL for a total of 90 min while the pH was decreased to 2 using 1 M HCl (Aura, 2005). The duodenum was simulated using 2 g/L pancreatin (Sigma) and 12 g/L bovine bile salts (Sigma, St. Louis MO, USA) diluted in 0.1 M NaHCO_3 ; this solution was added at the beginning of this step at a rate of 0.25 mL/mL (Laurent, Besancon, & Caporiccio,

2007). Finally, the ileum was simulated by increasing the pH to 6.5 using filter-sterilized 0.1 M NaHCO₃. The simulation was continuous, so the overall working volume increased (as happens during actual digestion) from that of the initial 25 g-sample of cheese. The viable numbers referred to the current volume, so they should be compared with the C1 and C2 counterparts to compensate for the effect of dilution.

All of the enzyme solutions were freshly prepared and filter-sterilized using a 0.22 µm-membrane filter (Millipore, Billerica, MA, USA) prior to use; after sterilization, all of the solutions were maintained in an ice bath during the entire period of simulation prior to their gradual addition (when appropriate). An incubation chamber (at 37 °C) was used to simulate the temperature of the human body, and mechanical agitation (60 rpm) was used to parallel peristaltic movements, with intensities resembling those attained in each digestive compartment.

The viable cell counts of the probiotic bacteria in the cheeses matrices submitted for each simulated gastrointestinal condition were determined by preparing serial decimal dilutions with sterile peptone water [0.1 g/100 mL (Sigma, St. Louis MO, USA)]. These dilutions were subsequently plated, using the Miles, Misra, & Irwin method (1938). *L. paracasei* was plated on MRS agar (Sigma-Aldrich) and incubated at 37 °C/48 h, whereas *B. lactis* and *L. acidophilus* were plated on MRS agar (Sigma-Aldrich) supplemented with cysteine–HCl (0.05 g/100 mL) and incubated under anaerobic conditions (BD GasPak™ EZ anaerobe container system, Becton, Dickinson and Company, USA) at 37 °C/48 h. The results were expressed as the log of count forming units per g (log cfu/g). The pH of each sample was measured at all times with a pH meter (Model 021/15; Quimis, São Paulo, Brazil) that was periodically sterilized with ethanol (90 mL/100 mL).

2.4 Assays of inhibitory effects of probiotic bacteria against pathogenic bacteria

For these assays the coalho goat cheese samples were manufactured as described above, excepting for no addition of the bacterial probiotic cultures tested. To prepare suitable inoculum for cheeses, the probiotic bacterial strains were first grown in MRS broth (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA), and incubated at 37 °C for 48 h. All media prepared for *B. lactis* and *L. acidophilus* were supplemented with 0.05 % (w/v) cystein-HCl (Sigma-Aldrich). The aforementioned pathogenic bacteria were first grown in BHI Broth (Sigma-Aldrich), and thereafter cultured twice again in BHI broth – incubated at 37 °C for 24 h. To verify the desired levels of probiotic inoculum (viz. 8 to 10 log cfu/mL) and pathogenic bacteria inoculum (viz. 6 to 7 log cfu/mL), serial dilutions were prepared with sterile peptone water [0.1 g/100 mL (Sigma-Aldrich)]. For the viable cell counts of the probiotic lactic acid bacteria, these dilutions were subsequently plated, using the Miles, Misra, & Irwin (1938), on MRS agar (Sigma-Aldrich) and incubated under anaerobic conditions (BD GasPak™ EZ Anaerobe container system, Becton, Dickinson and Company, USA) at 37 °C/48 h. For the viable cell counts of the pathogenic bacteria these dilutions were subsequently plated on BHI agar (Sigma-Aldrich) and incubated under aerobic conditions at 37 °C/24 h.

For each probiotic bacterium, one inoculum level of contaminant bacteria was tested. In cheese, a (positive) control containing only each pathogenic bacterium was provided, as well as a (negative) one containing only each probiotic bacterium; this led to 5 control samples. The probiotic bacteria were inoculated at a proportion of 1 mL inoculum (containing 8 to 10 log cfu/mL) for each 25 g of cheese. The contaminant bacteria were inoculated at a proportion of 1 mL inoculum (containing 6 to 7 log cfu/mL) for each 25 g of cheese. All inoculated cheese samples were stirred with an electric mixer (Kenwood, UK) for 5 min, equally distributed by sterile 50 mL-sterile flasks and stored at 7 °C during 21 days, corresponding to a total of 44 samples (11 samples x 4 storage periods). Each sample was

subjected to viable counts of probiotic and pathogenic bacteria on the 1st, 7st, 14th and 21th day of storage.

The viable cell counts of the probiotic bacteria were performed as described above. For viable counts of *S. aureus*, was used Vogel-Johnson agar (Sigma-Aldrich), supplemented with potassium tellurite solution (1 g/100 mL) (Sigma-Aldrich), incubated for 24 h at 37 °C. For viable counts of *L. monocytogenes*, was used Listeria Selective Agar Base supplemented with Listeria Selective Supplement (HiMedia Laboratories, India), incubated for 24 h at 37 °C. All analyzes were performed in duplicate and the results were expressed as the log cfu/g.

For each storage time, the extent of inhibition (inhibition rate) was calculated as:

$$\text{Inhibition rate} = [(N_{\text{control}} - N_{\text{pathogen}}) / N_{\text{control}}] * 100,$$

where N_{control} is log (cfu/g) of the potential pathogen alone, and N_{pathogen} is log (cfu/g) of the potential pathogen in the presence of a specific lactic acid bacterium.

2.5 Statistical analysis

The means of the results were evaluated using an analysis of variance (ANOVA), and the Tukey test was used to compare differences ($p < 0.05$). Statistical Analysis System (SAS, 1999) software was used for the statistical analyses.

3. Results

3.1 Survival to simulated gastrointestinal conditions

The viable cells counts of *L. acidophilus* (LA-5), *L. paracasei* (*L. casei*-01) and *B. lactis* (BB 12) in coalho goat cheese when exposed to the simulated gastrointestinal model are presented in Fig. 1. There was a significant difference ($p < 0.05$) for the counts obtained for the tested bacterial strains when exposed and not exposed (control) to the simulated gastrointestinal conditions (Fig. 1 A – C). The tested bacterial strains maintained higher cell

viabilities in the cheeses not exposed to the gastrointestinal conditions for each of the different gastrointestinal conditions. At the beginning of the simulated digestion, all of the assayed probiotic strains presented viable counts between 7 – 8 log cfu/g (10^7 – 10^8 cfu/g); however, the samples obtained at the end of the experimental digestion revealed viable counts of 6.0 log cfu/g for *L. acidophilus* (Fig. 1A), 5.7 log cfu/g for *L. paracasei* (Fig. 1B) and 5.5 log cfu/g for *B. lactis* (Fig. 1C), which corresponded, respectively, to reductions of 18.92%, 29.63% and 8.33% in the viable counts with respect to those found at the beginning studied time interval (time 0, when exposed to the mouth conditions). This reduction in the viable counts was significant ($p < 0.05$) for all of the tested bacterial strains.

When added to the goat coalho cheese, *L. acidophilus* showed an increase in the viable cell number of approximately 0.5 log cycles when exposed to the mouth conditions. When exposed to the simulated esophagus-stomach conditions, this bacterium maintained its viable cell number until 52 min, and then the viable cell number decreased by approximately 1.5 log cycles upon exposure to pH 2.3 in the presence of pepsin. During the passage throughout the simulated duodenum, the viable cell number decreased slightly. After 92 min of digestion, in the simulated ileum, *L. acidophilus* presented viable cell numbers of approximately 1.5 log cycles lower than those found at the beginning of the simulated digestion (Fig. 1A).

When inoculated in cheese and exposed to the simulated mouth conditions, *L. paracasei* revealed an increase in its viable cell numbers of approximately 0.5 log cycles (Fig. 1B). During exposure to the esophagus-stomach conditions, the viable cell count was maintained until the pH reached a value of 3.8 in the presence of pepsin. However, the viable cell counts decreased by more than 3.5 log cycles in comparison to the initial count when a pH of 2.0 was reached. In the simulated duodenum conditions, the viable numbers of *L. paracasei* decreased by approximately 0.5 log cycles. Finally, after 92 min of digestion, the viable numbers of *L. paracasei* increased by approximately 0.5 log cycles.

B. lactis showed the most variability in the viable cell number throughout the exposure to the simulated digestion (Fig. 1C). When exposed to the mouth conditions, an unexpected decrease in the viable cell numbers occurred; however, the exposure to the esophagus–stomach conditions revealed a slight increase in the viable count (ca. 0.5 log cycles). After 32 min of digestion, when the pH reached 2.8, there was a decrease in the number of viable cells. Then, the decrease in pH to 2.3 appears to have stimulated the growth of *B. lactis*, resulting in an increase of 2.5 log cycles. Under the simulated duodenum conditions, the viable number of *B. lactis* increased; however, when exposed to the ileum conditions, a significant reduction occurred (approximately 2.5 log cycles).

3.2 Inhibitory effects on pathogenic bacteria in cheese

The viable cell numbers of the probiotic and pathogenic bacteria when inoculated separately in coalho goat cheese during 21 days of cold storage are shown in Fig. 2. The viable cell counts of the probiotic bacteria tested were in a range of 8.1 to 9.8 log cfu/g during all assessed storage interval times (Fig. 2A); while the viable counts of the pathogenic bacteria were in a range of 5.7 to 8.3 log cfu/g (Fig. 2B).

With respect to the counts of probiotic bacteria when inoculated associated with *S. aureus* in coalho cheese, it was observed an initial increase in viable counts up to the 14th day of storage for both *L. acidophilus* and *L. paracasei* (Fig. 3A and 3B). Different behavior was noted for *B. lactis* inoculated in cheese associated with *S. aureus*, when an initial decrease in viable counts occurred up to the 7th day of storage, followed by an increase in counts in the remaining storage intervals evaluated. *S. aureus* when inoculated associated with *L. acidophilus* in coalho cheese revealed a linear increase in viable counts over time, reaching approximately 9.1 log cfu/g on the 21th day of storage (Fig. 3A). *S. aureus* when inoculated associated with *B. lactis* exhibited a progressive increase in viable counts up to the 7th day of storage (7.6 log

cfu/g), followed by a small increase in viable counts only on the 21th day of storage (7.9 log cfu/g) (Fig. 3C). Otherwise, the inoculation of *S. aureus* associated with *L. paracasei* in coalho cheese revealed similar progressive increase in viable counts of *S. aureus* up to the 7th day of storage (7.8 log cfu/g), but it was followed by a decrease in viable counts mainly after the 14th day of storage (ca. 6.3 log cfu/g) (Fig. 3B).

The inoculation of *L. monocytogenes* with *L. acidophilus* or *B. lactis* in cheese matrices showed similar behavior up to the 7th day of storage, when was noted a sharp increase in viable counts of *L. monocytogenes* (8.7 and 8.1 log cfu/g, respectively), followed for a slight increase in viable counts only on the 21th day of storage (8.4 log cfu/g and 8.5 log cfu/g, respectively) (Fig. 4A and 4C). Likewise to the results found for the inhibition of *S. aureus*, *L. monocytogenes* when inoculated associated with *L. paracasei* revealed an progressive increase in viable counts up to the 7th day of storage (7.5 log cfu/g), followed for a sharp decrease in the later assessed storage intervals (viable count of 5.3 log cfu/g on the 21th day of storage) (Fig. 4B).

The time course of inhibition (inhibition rate) brought about by *L. acidophilus*, *L. paracasei* and *B. lactis* against *L. monocytogenes* and *S. aureus* is plotted in Fig. 5. *L. acidophilus* exhibited an inhibition rate toward *S. aureus* of 13.1% on the 1st day of storage, and on the 14th day of storage the inhibition rate was of 0.66% (Fig. 5A). No positive inhibition rate provided by *L. acidophilus* against *L. monocytogenes* was detected during the storage periods assessed (Fig. 5D). *L. paracasei* presented the highest inhibition rates against the both pathogenic bacteria tested, which were of 7.87% and 23.63% toward *S. aureus* on the 14th and 21th day of storage, respectively (Fig. 5B); toward *L. monocytogenes* these values were of 12.96 and 32.99%, respectively (Fig. 5E). Positive inhibition rates of *B. lactis* toward *S. aureus* was found on the 1st (16.32%), 14th (10.12%) and 21th (3.67%) day of storage (Fig. 5C). *B.*

lactis exhibited a positive inhibition rate (3.28%) toward *L. monocytogenes* only on the 1st day of storage (Fig. 5F).

4. Discussion

The ability to tolerate digestive stresses is one of the important properties for the successful incorporation of probiotics into foods (Ross, Desmond, Fitzgerald, & Stanton, 2005). The experiment carried out in this study was based on the gastrointestinal model used to test the *in vitro* survival of bacteria under different environments mimicking the digestion of semi-solid foods (Madureira, Amorim, Gomes, Pintado, & Malcata, 2011), including the passage of the food through all of the gastrointestinal tract compartments (from mouth to ileum), mechanical simulation (i.e., peristaltic movements via actual stirring) and exposure to a pH gradient (as normally occurs during digestion).

At the beginning of digestion (mouth conditions), all of the tested probiotic strains incorporated in coalho goat cheese were at levels of 7 – 8 log cfu/g (10^7 – 10^8 cfu/g), which is higher than the minimum count of probiotic bacteria in foods required at the moment of intake to assure a favorable impact on consumer health (Talwalkar, Miller, Kailasapathy, & Nguyen, 2004). At the end of the simulated digestion, the cheeses with added *L. acidophilus* presented a count of 6 log cfu/g, whereas the cheeses with added *L. paracasei* and *B. lactis* showed counts of 5.5 log cfu/g and 5.7 log cfu/g, respectively.

The experimental digestion model applied in this study started with the simulation of the mouth conditions. For this portion of the model, an artificial saliva solution was prepared with α -amylase because this enzyme is the dominant active compound of natural saliva, which gradually starts the digestion process (Humphrey & Williamson, 2001). Furthermore, bicarbonate was used to simulate the buffering capacity of saliva. Only *B. lactis* was slightly affected when subjected to this condition. A similar behavior was observed by Madureira,

Amorim, Gomes, Pintado, & Malcata (2011), who evaluated the survival of *B. animalis* BO in whey cheese matrix exposed to simulated gastrointestinal conditions. According to Douglas (1990), salivary α -amylase may inhibit some oral bacterial strains (e.g., of the *Streptococcus* spp.) by binding to their surface. As both *B. lactis* and *Streptococcus* spp. are gram-positive bacteria, these findings may also be applicable to our situation.

Before reaching the intestinal tract, probiotic bacteria must first survive the deleterious action of the gastric juices during the passage through the stomach. A gradual decrease of pH and exposure to pepsin was thus included in the digestion model to mimic as far as possible what happens in the human body during the digestion of foods. During the exposure to the simulated esophagus–stomach conditions, *L. acidophilus* and especially *L. paracasei* decreased their viable cell numbers within 72 min of contact with the gastric juices, which corresponded to a pH of 2.3. In the case of *L. paracasei*, this decrease was first observed when the pH of the medium reached 2.8. A similar behavior was already reported for *L. paracasei* incorporated into a bovine Portuguese cheese when submitted to a similar digestion model (Madureira et al., 2005). Hood & Zotolla (1988) found that *L. acidophilus* could survive at pH values as low as 4.0 and that such pH values did not affect the ability of the tested bacterium to attach to human intestinal cells. Furthermore, *L. acidophilus* strains plated on MRS agar at pH 2.5 containing pepsin (1000 units/mL) and incubated for 180 min showed a decline of approximately 1 log cycle within 120 min (Oh, Kim, & Worobo, 2000). In the same study, *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* was the only strain that showed a significant decrease in the viable cell numbers (approximately 2 log cycles relative to the initial concentration) during exposure to artificial gastric juice.

As for *B. lactis*, the esophagus–stomach simulated conditions had no effect on the viable cell numbers; although there was initially a slight drop, the original viable numbers were recovered by the end of this digestion step, and the initial counts were surpassed until

after 72 min of total digestion time. It has been hypothesized that when these strains are exposed to artificial gastric juice, which is characterized by both low pH and the presence of pepsin, their survival is higher than when they are only exposed to low pH because the pepsin somehow protects the bacterial cells (Matsumoto, Ohishi, & Benno, 2004; Matto, Alakomi, Vaari, Virkajarvi, & Saarela, 2006).

Upon exposure to the duodenum conditions (i.e., bile salts and pancreatin), *L. acidophilus* and *L. paracasei* showed a slight decrease in the viable numbers when inoculated, and the viable numbers of *B. lactis* increased. The pH increase appeared to be favorable for the survival of these strains. Such a fast increase in cell counts is certainly not an outcome of cell division, but may be a recovery of sublethally injured cells, because previous steps had led to reductions in the viable numbers. In the case of *L. acidophilus* and *L. paracasei*, it appears that cells were in a fragile state when they reached this stage, with injuries caused by the previous exposure to bile acid salts, so an eventual recovery was not possible.

This phenomenon may be related to the fact that bile salts had a particularly negative effect, so the recovery of probiotic bacterial cells was not possible. Recalling that bile salts are natural detergents that facilitate the digestion and absorption of hydrophobic components of the diet, the antimicrobial nature of bile arises chiefly from its detergent property, which dissolves bacterial membranes. The amphiphilic nature of bile salts makes these compounds strongly inhibitory to bacteria, constraining the survival of bacteria throughout the gastrointestinal tract (Madureira, Amorim, Gomes, Pintado, & Malcata, 2011). Many authors have reported a negligible effect of pancreatic enzymes (in simulated small intestinal conditions without bile salts) on the viability of lactic acid bacteria *in vitro* (Champagne & Gardner, 2008; Maragkoudakis et al., 2006; Ruiz-Moyano, Martín, Benito, Nevado, & de Guía Córdoba, 2008). These findings would suggest that, in comparison with the effect of bile salts, the impact of pancreatin on the survival of probiotics is relatively low.

In the ileum, different behaviors with respect to the survival in coalho cheese were observed according to the type of probiotic bacteria assayed. There was a low reduction in the count of *L. acidophilus*, a considerable increase in the count of *L. paracasei* and a sharp reduction in the numbers of viable cells of *B. lactis*. Despite the low counts for *L. paracasei* and *B. lactis* at the end of digestion, if the cells reached this point *in vivo* via their inoculation in cheese, they would likely adhere to the intestinal wall and start performing their (desired) biological activities. Only strains that are extremely sensitive to acid *in vitro* will be unable to survive the gastric transit, and at least a moderate resistance to low pH appears to be necessary for an eventual probiotic role. However, it remains to be proven whether the high resistance assessed in this digestion model correlates with the ability to effectively colonize the intestine.

Probiotic bacteria may contribute to the preservation of foods due to their potential antimicrobial property, established by the action of different compounds synthesized by these bacteria and delivered in the food matrix (de Vuyst et al., 2004); hence, this property was also investigated in this study in an attempt to control the growth of pathogenic bacteria in goat coalho cheese, thus extending its safety and shelf-life.

The viable cells number of the assayed probiotics in coalho cheese (6 to 9.5 log cfu/g), when inoculated alone or associated with the pathogenic bacteria *S. aureus* and *L. monocytogenes* at the end of the refrigerated storage (21 days) was always higher than the minimum count of probiotic bacteria (7 log cfu/g). *B. lactis* showed reasonable antagonistic activity, chiefly against *S. aureus*. *Bifidobacterium* genus is known to behave heterofermentative (Bruno, Lankaputhra, & Shah, 2002), and has been shown to synthesize acetic, lactic and formic acids to significant levels in several matrices (Ong, Henriksson, & Shah, 2007; Tharmaraj & Shah, 2009), which may have contributed to the inhibition of *S. aureus* observed in this study. *L. acidophilus* exhibited low inhibitory activities, inhibiting only

S. aureus in coalho cheese on the 1st day of refrigerated storage. It is known that *L. acidophilus* is homofermentative, thus is able to produce mainly lactic acid (with no significant acetic acid production), as previously shown in the ripening of Cheddar and Gouda (Gomes & Malcata, 1999; Ong, Henriksson, & Shah, 2007) and whey cheeses (Madureira et al., 2012), which may be related to the reduced antimicrobial activity caused by this bacterium.

In general, the highest inhibition rates were found in cheeses inoculated with *L. paracasei*, for both assayed pathogenic bacteria. *L. paracasei* is known to be a facultative heterofermentative, which converts lactose to lactic acid, acetic acid and carbon dioxide (Bruno, Lankaputhra, & Shah, 2002; Tharmaraj & Shah, 2009), and this may contribute to a higher pH decrease resulting in strong inhibition of some pathogenic bacteria. In fact, in a previous study with coalho goat cheese added of the same probiotic cultures assayed in this study, Oliveira, Garcia, Queiroga, & Souza (2012) found the highest increase in acidity (0.18 to 1.24 g/100 g) in cheeses added of *L. paracasei* relative to cheeses added of *L. acidophilus* (0.35 to 0.71 g/100 g) or *B. lactis* (0.53 to 0.35 g/100 g), which possibly could be attributable to the higher inhibitory effect caused by *L. paracasei* in the same cheese as reported here. Strains of *L. paracasei* had previously been shown to possess an inhibitory effect against *S. aureus* in dairy products (Sameshima et al., 1998), as well as in *in vivo* assays – as a strain of *L. paracasei* from vaginal origin was able to produce hydrogen peroxide and to inhibit uropathogenic bacteria (Ocaña et al., 2006).

An early study found that probiotic bacteria (*L. acidophilus*, *B. animalis*, *L. casei*) inhibited *S. aureus* and *L. monocytogenes* in whey cheese inoculated with 3 – 4 log cfu/g and 4 – 6 log cfu/g of each bacterium, respectively, (Madureira, Pintado, Gomes, & Malcata, 2011) to a greater extent than the inhibition we reported here. In this study, we used a bacterial inoculum containing higher amounts (6 - 7 log cfu/mL) of cells of the pathogenic bacteria tested than

those used by these researchers, which could influence the levels of inhibition caused by the probiotic bacteria and explain the lower inhibitory effect found in our assays.

4. Conclusions

Our results revealed that *L. acidophilus* (LA-5), *L. paracasei* (*L. casei* 01) and *B. lactis* (BB 12), added in a goat coalho cheese, survived (counts higher than 5.5 log cfu/g) the simulated gastrointestinal digestion in the upper gastrointestinal tract model, suggesting that these probiotic strains are able to pass through the gastrointestinal tract when delivered in the assayed cheese matrix. Among the three probiotic strains studied, *L. acidophilus* appears to be the most resilient during transit throughout the gastrointestinal tract when compared to other bacteria because this bacterium presented higher viable counts at the end of the experimental digestion. In this study it was also found that *L. paracasei* and *B. lactis* stood out in inhibiting the growth of *S. aureus* and or *L. monocytogenes* in coalho goat cheese over refrigerated storage relative to the inhibitory effects caused by *L. acidophilus*. Regarding these findings, it could be inferred that coalho goat cheese could be an interesting carrier of those probiotic strains; and the probiotic bacteria tested, particularly *L. paracasei* and *B. lactis*, could be used as protective cultures for delay the growth of *S. aureus* and *L. monocytogenes* in goat coalho cheese, increasing the safety and shelf-life of this product.

References

- Anal, A. K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 240–251.
- Aura, A. -M. (2005). *In vitro digestion models for dietary phenolic compounds*. PhD Thesis, Department of Chemical Technology, Helsinki University of Technology, Espoo, Finland.

- Boylston, T., Vinderola, C., Ghoddusi, H., & Reinheimer, J. (2004). Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *International Dairy Journal*, 14, 375–387.
- Bruno, F. A., Lankaputhra, W. E. V., & Shah, N. P. (2002). Growth, viability and activity of *Bifidobacterium* spp. in skim milk containing prebiotics. *Journal of Food Science*, 67, 2740–2744.
- Burns, P., Patrignani, F., Serrazanetti, D., Vinderola, G. C., Reinheimer, J., Lanciotti, R., & Guerzoni, M. E. (2008). Probiotic crescenza cheese containing *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* manufactured with high-pressure homogenized milk. *Journal of Dairy Science*, 91, 500–512.
- Champagne, C. P., & Gardner, N. J. (2008). Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastrointestinal stresses. *Food Research International*, 41, 539–543.
- Choi, S. Y., Chung, M. J., Lee, S. J., Shin, J. H., & Sung, N. J. (2007). N-nitrosamine inhibition by strawberry, garlic, kale, and the effects of nitrite-scavenging and N-nitrosamine formation by functional compounds in strawberry and garlic. *Food Control*, 18, 485–491.
- de Vuyst, L., Makras, L., Avonts, L., Holo, H., Yi, Q., Servin, A., Fayol-Messaoudi, D., Berger, C., Zoumpopoulou, E., Tsakalidou, G., Sgouras, D., Martinez-Gonzalez, B., Panayotopoulou, E., Mentis, A., Smarandache, D., Savu, L., Thonart, P., & Nes, I. (2004). Antimicrobial potential of probiotic or potentially probiotic lactic acid bacteria. The first results of the international European research project PROPATH of the PROEUHEALTH cluster. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 16, 125–130.
- Douglas, C. W. I. (1990). Characterization of the α -amylase receptor of *Streptococcus gordonii* NCTC 7868. *Journal of Dental Research*, 69, 1746–1752.

- FAO/WHO. (2002). *Working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food*. London, ON, Canada: FAO/WHO.
- Garcia, E. F., Oliveira, M. E. G., Queiroga, R. C. R. E., Machado, T. A. D., & Souza, E. L. (2012). Development and quality of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63, 947-956.
- Gomes, A. M. P., & Malcata, F. X. (1999). *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 139-157.
- Hold, K. M., de Boer, D., Zuidema, J., & Maes, R. A. A. (1995). Saliva as an analytical tool in toxicology. *International Journal of Drug Testing*, 1, 1-36.
- Hood, S. K., & Zotolla, E. A. (1988). Effect of low pH on the viability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. *Journal of Food Science*, 53, 1514-1516.
- Huang, Y., & Adams, M. C. (2004). *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 253-260.
- Humphrey, S. P., & Williamson, R. T. (2001). A review of saliva: Normal composition, flow and function. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 85, 162-169.
- Kailasapathy, K., & Chin, J. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology & Cell Biology*, 78, 80-88.
- Laurent, C., Besancon, P., & Caporiccio, B. (2007). Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an *in vitro* digestion/caco-2 cell culture model. *Food Chemistry*, 100, 1704-1712.

- Madureira, A. R., Soares, J. C., Amorim, M., Tavares, T., Gomes, A. M., Pintado, M. M., & Malcata, F. X. (2012). Bioactivity of probiotic whey cheese: characterization of the content of peptides and organic acids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93. doi: 10.1002/jsfa.5915.
- Madureira, A. R., Amorim, M., Gomes, A. M., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2011). Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 44, 465–470.
- Madureira, A. R., Pintado, M. E., Gomes, A. M., & Malcata, F. X. (2011). Incorporation of probiotic bacteria in whey cheese: decreasing the risk of microbial contamination. *Journal of Food Protection*, 74, 1194–1199.
- Madureira, A. R., Pereira, C. I., Truszkowska, K., Gomes, A. M., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2005). Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. *International Dairy Journal*, 15, 921–927.
- Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16, 189–199.
- Matsumoto, M., Ohishi, H., & Benno, Y. (2004). H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *International Journal of Food Microbiology*, 93, 109–113.
- Matto, J., Alakomi, H., Vaari, A., Virkajarvi, I., & Saarela, M. (2006). Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp. *subtilis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. *International Dairy Journal*, 16, 1029–1037.
- Miles, O., Misra, S. S., & Irwin, J. O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Journal of Hygiene*, 45, 41–45.

- Ocaña, V. S., Pesce-de-Ruiz Holgado, A. A., & Nader-Macías, M. E. (2006). Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* isolated from the human vagina. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 23, 87-92.
- Oh, S., Kim, S. H., & Worobo, R. W. (2000). Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. *Journal of Dairy Science*, 83, 2747–2752.
- Oliveira, M. E. G., Garcia, E. F., Queiroga, R. C. R. E., & Souza, E. L. (2012). Technological, physicochemical and sensory characteristics of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. *Scientia Agricola*, 69, 370-379.
- Ong, L., Henriksson, A., & Shah, N. P. (2007). Proteolytic pattern and organic acid profiles of probiotic Cheddar cheese as influenced by probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*, *L. paracasei*, *L. casei* or *Bifidobacterium* sp. *International Dairy Journal*, 17, 67-78.
- Phillips, M., Kailasapathy, K., & Tran, L. (2006). Viability of commercial probiotic cultures (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium* sp., *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus*) in cheddar cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 276–280.
- Queiroga, R. C. R. E., Santos, B. M., Gomes, A. M. P., Monteiro, M. J., Teixeira, S. M., Souza, E. L., Pereira, C. J. D., & Pintado, M. M. E. (2013). Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats' milk and their mixture. *LWT – Food Science and Technology*, 50, 538-544.
- Ross, R. P., Desmond, C., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2005). Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1410–1417.

- Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Benito, M. J., Nevado, F. P., & de Guía Córdoba, M. (2008). Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Science*, 80, 715–721.
- Saarela, M., Lähteenmäki, L., Crittenden, R., Salminen, S., & Mattila-Sandholm, T. (2002). Gut bacteria and health foods — the European perspective. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 99–117.
- Sameshima, T., Magome, C., Takeshita, K., Arihara, K., Itoh, M., & Kondo, Y. (1998). Effect of intestinal *Lactobacillus* starter cultures on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in fermented sausage. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 1-7.
- SAS Institute. (1999). *SAS User's Guide: Statistics*; Version 8.0. SAS Institute, Cary, NC, USA.
- Talwalkar, A., Miller, C. W., Kailasapathy, K., & Nguyen, M. H. (2004). Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 605–611.
- Tharmaraj, N., & Shah, N. P. (2009). Antimicrobial effects of probiotics against selected pathogenic and spoilage bacteria in cheese-based dips. *International Food Research Journal*, 16, 261-76.
- Todorov S., & Dicks L. (2006). Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria: Comparison of the bacteriocins. *Process Biochemistry*, 41, 11-19.
- Vinderola, C. G., Prosello, W., Ghiberto, T. D., & Reinheimer, J. A. (2000). Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian Fresco cheese. *Journal of Dairy Science*, 83, 1905–1911.

Fig. 1. The viable cell numbers (average $\pm$ standard deviation) of (A) *Lactobacillus acidophilus* (LA-5), (B) *Lactobacillus paracasei* (*L. casei* 01) and (C) *Bifidobacterium lactis* (BB 12) when exposed (■) and not exposed (●) to the simulated gastrointestinal conditions over different incubation times. The pH values that the bacteria were exposed to are indicated in the upper left corner.

Fig. 2. The viable cell numbers (average $\pm$ standard deviation) of probiotic bacteria - A [*L. acidophilus* (LA-5), ●; *L. paracasei* (*L. casei* 01, ▲; and *B. lactis* (BB 12), ◇] and pathogenic bacteria - B (*S. aureus* ATCC 6538, □; and *L. monocytogenes* ATCC 7634, ■) when inoculated separately in goat coalho cheese, during 21 days of storage at 7 °C.

Fig. 3. The viable cell numbers (average $\pm$ standard deviation) of *S. aureus* ATCC 6538 (□) inoculated associated to *L. acidophilus* (LA-5, ●) (A), *L. paracasei* (*L. casei* 01, ▲) (B) or *B. lactis* (BB 12, ◇) (C) in goat coalho cheese, during 21 days of storage at 7 °C.

Fig. 4. The viable cell numbers (average $\pm$ standard deviation) of *L. monocytogenes* ATCC 7644 (■) inoculated associated with *L. acidophilus* (LA-5, ●) (A), *L. paracasei* (*L. casei* 01, ▲) (B) or *B. lactis* (BB 12, ◇) (C) in goat coalho cheese, during 21 days of storage at 7 °C.

Fig. 5. Time course of inhibition (inhibition rate expressed as average $\pm$ standard deviation) of *S. aureus* ATCC 6538 (A – C) and *L. monocytogenes* ATCC 7644 (D – F) brought about by *L. acidophilus* (LA-5) – A and D; *L. paracasei* (*L. casei* 01) – B and E; and *B. lactis* (BB 12) – C and F, in goat coalho cheese, during 21 days of storage at 7 °C.

Table 1. The conditions used during each stage of the simulated digestion.

Compartment	Conditions	Stirring (rpm)	Final pH	Time (min)
Mouth	Saliva	200	6.9	2
Oesophagus– stomach	Pepsina	130	5.5	10
			4.6	10
			3.8	10
			2.8	20
			2.3	20
			2.0	20
Duodenum	Pancreatin + bile salts	45	5.0	30
Ileum	-----	45	6.5	60

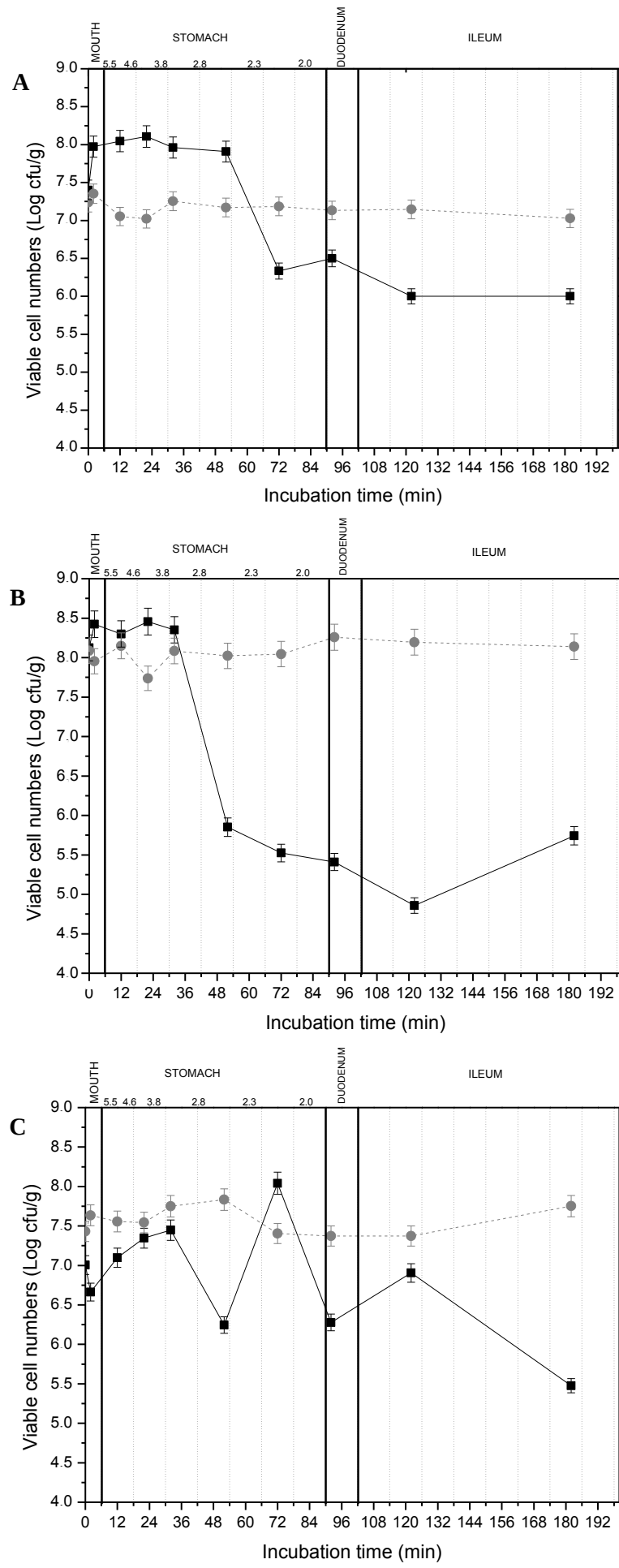


Fig. 1.

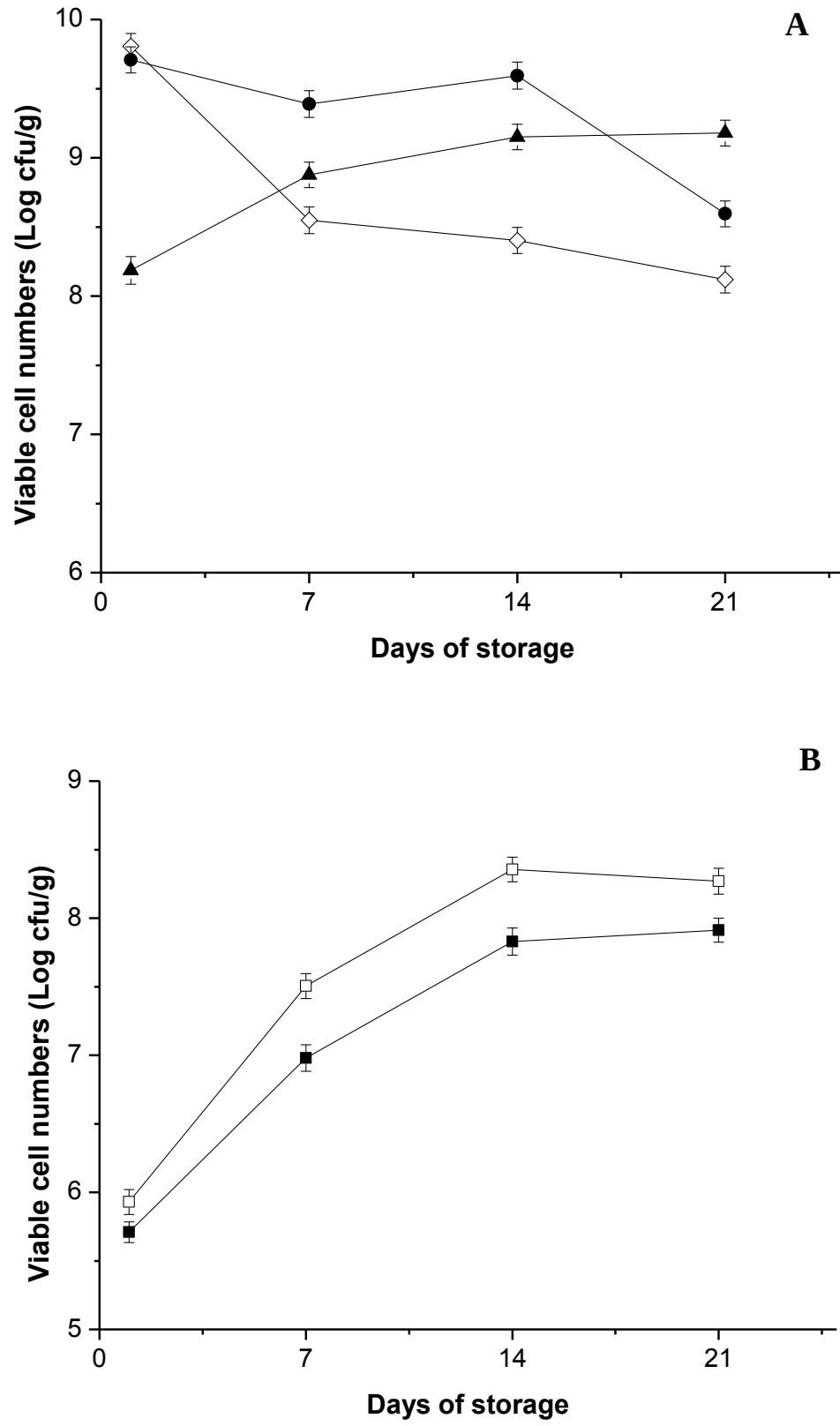


Fig. 2.

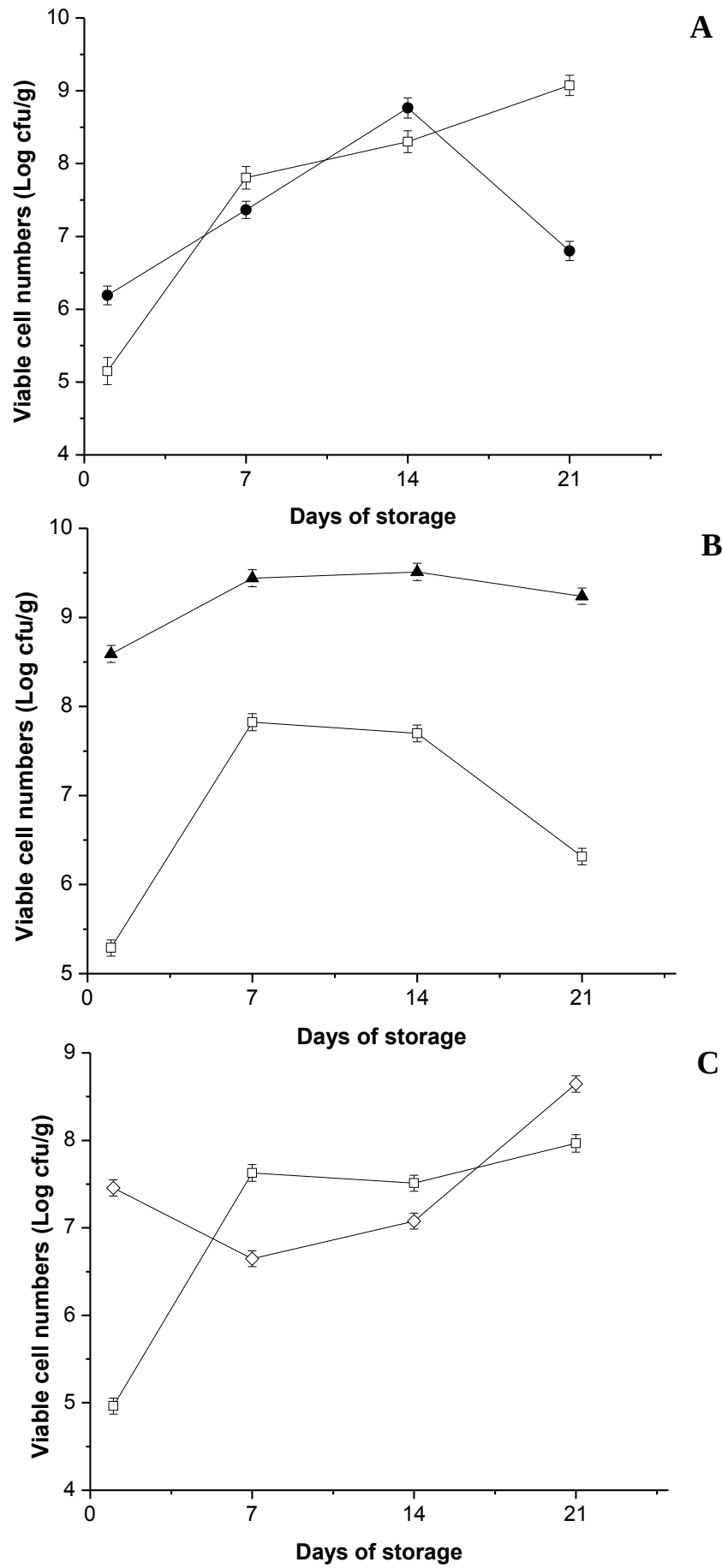


Fig. 3.

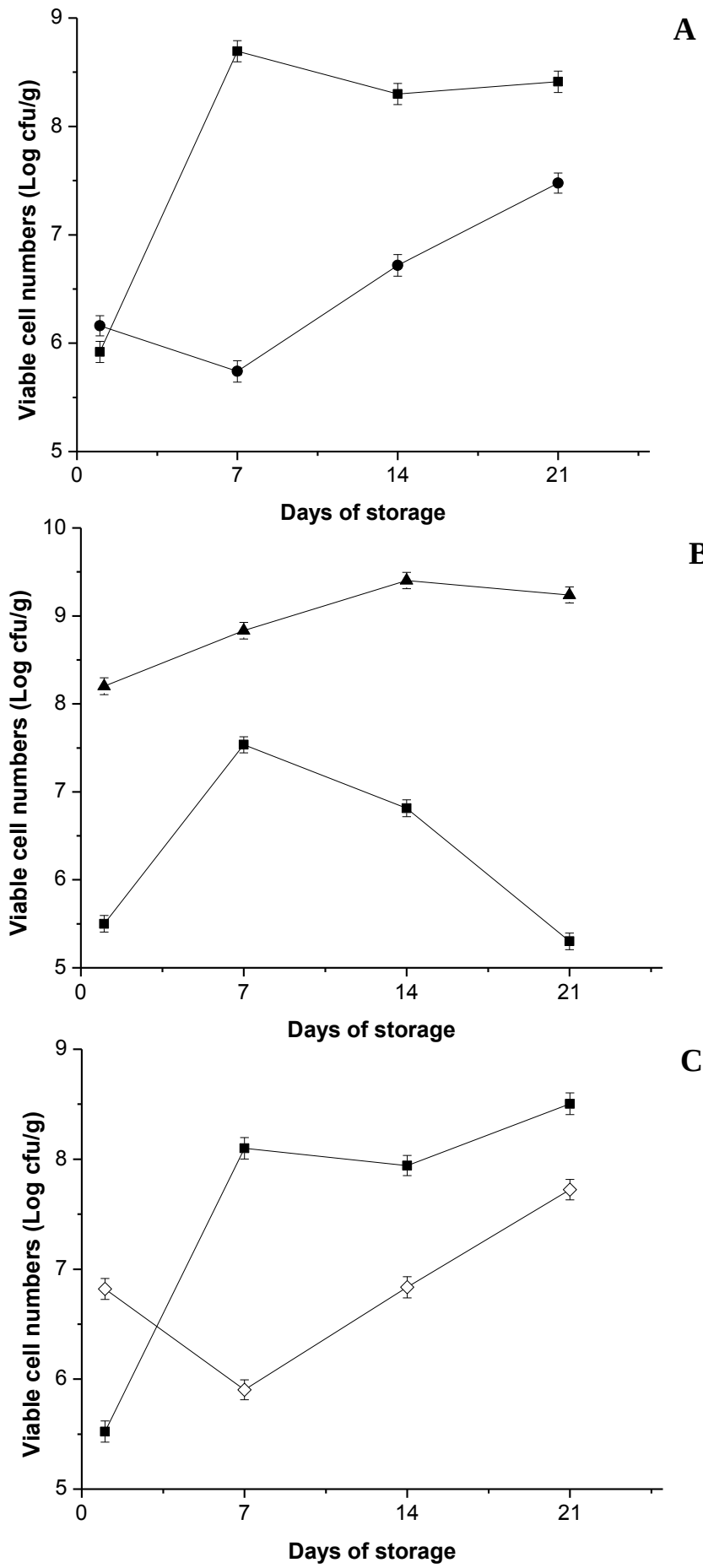


Fig. 4.

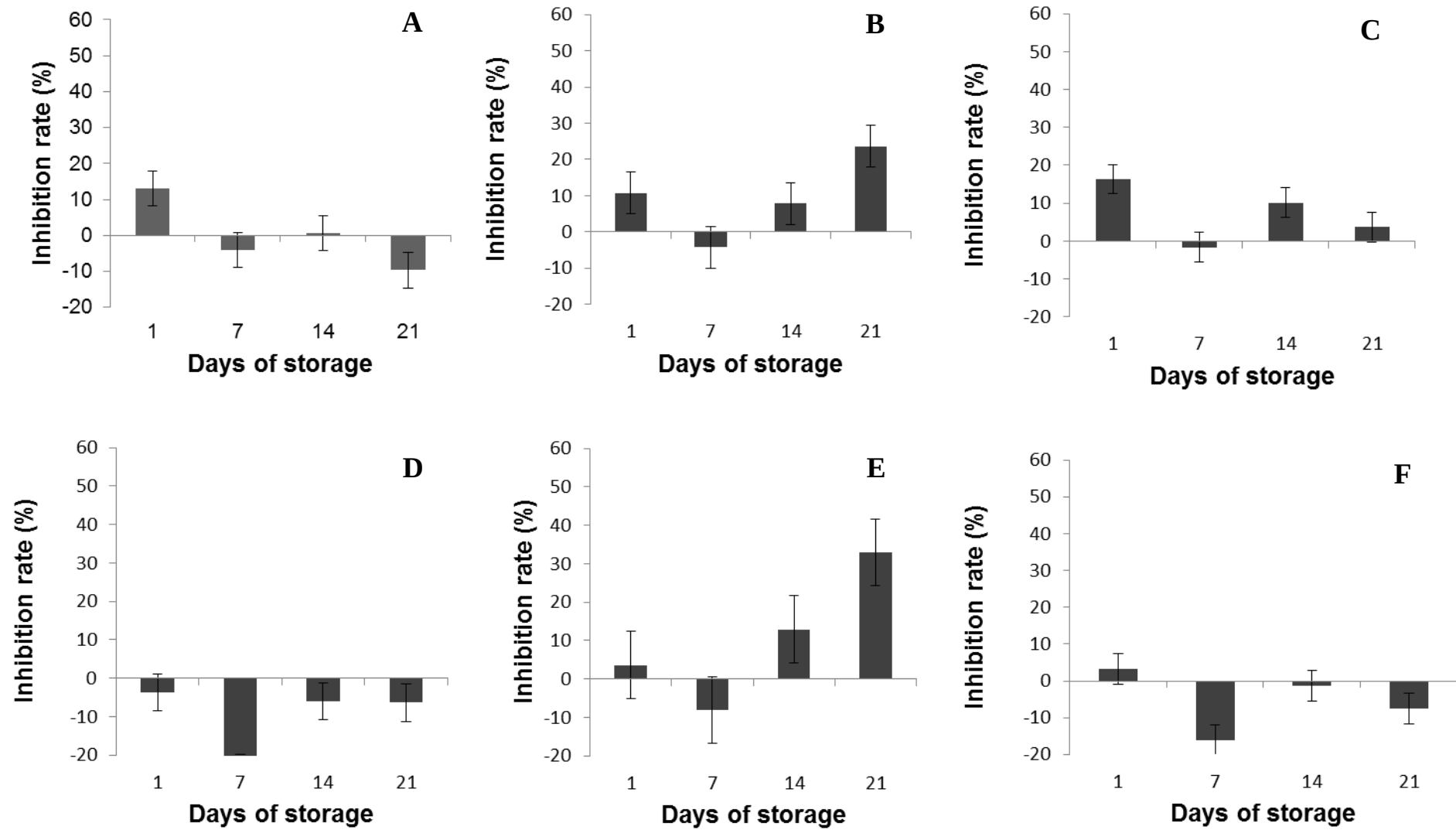


Fig. 5.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento desta pesquisa permitiu as seguintes considerações finais a respeito do tema estudado:

✓ O processo tecnológico aplicado na fabricação do queijo tipo coalho caprino é viável quando se substitui a cultura iniciadora mesofílica comumente utilizada na fabricação de queijos por bactérias ácido lácticas probióticas tanto isoladas como em co-cultura;

✓ O queijo adicionado da bactéria probiótica *L. paracasei* apresentou maior rendimento quando comprado aos demais tratamentos, possivelmente pelo maior teor de acidez verificado neste queijo após um dia de armazenamento;

✓ No que se refere às análises físico-químicas, observou-se uma redução do teor de umidade, acompanhado do aumento da concentração do extrato seco total dos queijos T1 (queijo controle), T3 (queijo adicionado de *L. paracasei*) e T4 (queijo adicionado de *B. Lactis*), ao longo do armazenamento refrigerado. Além disso, houve um maior consumo de lactose, o que possivelmente contribuiu para o aumento do teor de acidez observado nestes queijos durante o armazenamento;

✓ O produto elaborado apresenta potencial probiótico, visto que foram observadas contagens de bactérias lácticas, ao longo do seu armazenamento, acima do que é preconizado pela legislação vigente (7 log de UFC/g) para que um alimento seja considerado probiótico;

✓ Quanto às propriedades tecnológicas, o queijo T5 (acrescentado da co-cultura composta de *L. acidophilus* + *L. paracasei* + *B. lactis*) apresentou maior taxa de proteólise em profundidade, o que sugere que o uso combinado de três diferentes cepas de bactérias apresentou um aumento da liberação de peptídeos e aminoácidos livres;

✓ Após 21 dias de armazenamento houve um aumento da dureza dos queijos T1 (queijo controle), T3 (queijo adicionado de *L. paracasei*) e T5 (acrescentado da co-cultura composta de *L. acidophilus* + *L. paracasei* + *B. lactis*), o que possivelmente esteve relacionado ao aumento da sinerese e consequente redução da umidade destes queijos;

✓ Houve alteração no padrão de cor dos queijos, cujo valor L* (luminosidade) diminuiu ao longo do armazenamento, com a predominância da componente amarela (b*) sobre a componente verde (a*) para maioria dos queijos, sugerindo uma coloração branco amarelada característica desse tipo de produto;

- ✓ Não houve aumento de diâmetro no teste de derretimento, mas sim um encolhimento, o que parece estar associado ao pH mais elevado verificado nos queijos;
- ✓ Sensorialmente os queijos T2, T3, T4 e T5, adicionados das culturas probióticas isoladas e associadas, apresentaram maior aceitação frente ao T1, provavelmente por conta do maior teor de ácido láctico produzido pela cultura starter no queijo controle;
- ✓ Apesar do queijo elaborado com a co-cultura ter sido o preferido no teste de ordenação preferêncial, acredita-se que os tratamentos 2, 3 e 4 também devem ser incluídos em estudos futuros já que também apresentaram bom desempenho sensorial e tecnológico;
- ✓ Quanto à viabilidade das bactérias ácido lácticas probióticas *in vitro*, o queijo tipo coalho caprino mostrou um efeito protetor sobre a sobrevivência de *L. acidophilus*, *L. paracasei* e *B. lactis* frente às condições simuladas do trato gastrointestinal, cujas contagens ao final da digestão foram superiores a 5,5 log UFC/g. Neste estudo, *L. acidophilus* pareceu mais resistente que as demais cepas ácido lácticas utilizadas;
- ✓ No que se refere aos efeitos inibitórios sobre bactérias patogênicas, *L. paracasei* e *B. lactis* foram mais efetivos contra *S. aureus* e *L. monocytogenes*, quando comparados ao *L. acidophilus*, o que pode ter ocorrido em função da diminuição do pH (aumento da acidez) pela produção de ácido orgânicos;
- ✓ A partir deste estudo pode-se concluir que os melhores queijos foram àqueles adicionados das bactérias probióticas *L. paracasei* e *B. lactis* tendo em vista que apresentaram características físico-químicas, microbiológicas, sensoriais e tecnológicas satisfatórias, permitindo que as bactérias probióticas adicionadas conseguissem atravessar as barreiras gastrintestinais simuladas e, assim, alcançar o íleo simulado em contagens viáveis. Ainda, as cepas de *L. paracasei* e *B. lactis* inibiram de forma mais efetivas as bactérias patogênicas *S. aureus* e *L. monocytogenes*;
- ✓ Outros estudos devem ser desenvolvidos para avaliar a viabilidade das bactérias *in vitro* e, posteriormente, *in vivo* com o objetivo de atestar se o queijo tipo coalho caprino adicionado das bactérias probióticas ensaiadas neste estudo pode ser considerado como um alimento funcional.

8 PERSPECTIVAS

A partir da análise dos dados obtidos nesta tese, foram levantadas novas hipóteses e sugeridas algumas perspectivas para estudos posteriores. Essas perspectivas são mencionadas a seguir:

- ✓ Determinar o perfil lipídico (ácidos graxos, com ênfase para o ácido linoléico conjugado), aromático e produção de ácidos orgânicos dos queijos durante a vida de prateleira, tendo como intuito de avaliar a influência das bactérias ácido lácticas sobre esses parâmetros;
- ✓ Realização de testes *in vitro* para verificação da viabilidade das bactérias ácido lácticas probióticas, após sobrevivência às condições simuladas do trato gastrointestinal, em aderir e colonizar as células intestinais simuladas (testes com células caco-2), bem como de competir com as bactérias patogênicas pelos sítios de adesão;
- ✓ Realização de testes *in vitro* para identificação e quantificação de compostos antimicrobianos (bacteriocinas; peróxido de hidrogênio; metabólitos de ácidos graxos de cadeia curta, ácidos orgânicos e aminoácidos; peptídeos bioativos; entre outros) assim como uma elucidação dos mecanismos envolvidos no estabelecimento da atividade inibitória das cepas probióticas ensaiadas frente a bactérias patogênicas;
- ✓ Avaliar a eficácia probiótica dos queijos em modelos animais a partir de testes de resposta imunológica e de identificação e quantificação dos micro-organismos probióticos nas fezes dos animais, bem como dos que possivelmente possam ser translocados para o cólon, ceco, baço, fígado e rins de ratos machos da linhagem Wistar, assim como identificar e quantificar os ácidos orgânicos presentes nas fezes destes animais.

REFERÊNCIAS

AHMADOVA, A.; TODOROV, S. D.; HADJI-SFAXI, I.; CHOISET, Y.; RABESONA, H.; MESSAOUDI, S.; KULIYEV, A.; FRANCO, B. D. G. M.; CHOBERT, J. M.; HAERTLÉ, T. Antimicrobial and antifungal activities of *Lactobacillus curvatus* strain. **Anaerobe**, p. 1-8, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.01.003>.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Comissões tecnocientíficas de assessoramento em alimentos funcionais e novos alimentos**. Recomendações da comissão já aprovadas pela diretoria de alimentos em toxicologia. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/alimentos/comissoes/tecno.htm>>. Acesso em: 20 dez. 2001.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em agosto, 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 19 fev. 2010.

ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. A importância do leite de cabra na nutrição humana. **Revista Agropecuária Catarinense**, v. 16, n. 1, p. 25-31, 2003.

AMMOR, M.; MAYO, B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. **Meat Science**, v. 76, n. 1, p. 138-146, 2007.

ANAL, A. K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 5, p. 240-251. 2007.

AMERINE, A. M.; PANGBORN, R. M.; ROESSLER, E. B. **A Principles of Sensory Evaluation of food**. N. York. Ac. Press. 1967.

AOAC. **Official Methods of Analysis**. 14th ed. Ass. Off. Analytical. Chem., Washington, USA, 2000.

AQUALAB. **Analizador de atividade de água para avaliar biodegradação (alimentos e fármacos)**: Modelo CX-2. Decagon Devices, Inc. 950 NE Nelson Court Pullman, WA 99163 USA, 2001.

AQUINO, F. T. M. **Produção de queijo de coalho no Estado da Paraíba**: acompanhamento das características físico-químicas do processamento, 1983. 81 f. Dissertação (Mestrado). Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1983.

ARVANITOYANNIS, I. S.; HOUWELINGENKOUKALIAROGLOU, M. V. Functional foods: a survey of health, claims, pros and cons, and current legislation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 5, p. 385-404, 2005.

ANNUNZIATA, A.; VECCHIO, R. Consumer perception of functional foods: A conjoint analysis with probiotics. **Food Quality and Preference**, v. 28, n. 1, p. 348-355, 2013.

BARRIONUEVO, M.; ALFEREZ, M. J. M.; LOPEZ, A. I.; SANZ, S. M. R.; CAMPOS, M. S. Beneficial effect of goat milk on the partially baked: low temperatures and HPMC addition. **Journal Dairy Science**, v. 20, n. 145, p. 25-28, 2002.

BEDANI, R.; ROSSI, E. A.; SAAD, S. M. I. Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, p. 1-8, 2013. (In press). <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.01.012> .

BELTRÃO FILHO, E. M. **Estudo da vida útil do leite de cabra pasteurizado e acondicionado em três tipos de embalagens**. 1999. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

BERESFORD, T.; WILLIAMS, A. **The microbiology of cheese ripening**. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUEENE, T. P. (Ed.). Cheese chemistry, physics and microbiology, 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 2004, v. 1, p. 287-317.

BERGAMINI, C. V.; HYNES, E. R.; QUIBERONI, A.; SUÁREZ, V. B.; ZALAZAR, C. A. Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese. **Food Research International**, v. 38, n. 5, p. 597-604, 2005.

BERNARD, L.; SHINGFIELD, K. J.; ROUEL, J.; FERLAY, A.; CHILLIARD, Y. Effect of plant oils in the diet on performance and milk fatty acid composition in goats fed diets based on grass hay or maize silage. **British Journal of Nutrition**, v. 101, n. 2, p. 213-224. 2009.

BISTROM, M.; NORDSTROM, K. Identification of key success factors of functional dairy foods product development. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, n. 11, p. 372-379, 2002.

BLANCHETTE, L.; ROY, D.; BELANGER, G.; GAUTHIER, S. F. Production of cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria. **Journal Dairy Science**, v. 79, n. 1, p. 8-15, 1996.

BOYLSTON, T. D.; VINDEROLA, C. G.; GHODDUSI, H. B.; REINHEIMER, J. A. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 5, p. 375-387, 2004.

BRANCO, M. A. A. C. FIGUEIREDO, E. A. T.; BORGES, M. F.; SILVA, M. C. D.; DESTRO, M. T. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 393-408, 2003.

BRANDÃO, S. C. C. Novas gerações de produtos lácteos funcionais. **Indústria de Laticínios**, p. 64-66, jan./fev. 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Portaria nº 146, de 07/03/1996. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 11/03/1996. p. 3977-3978.

BRASIL. Portaria nº 352 de 1997 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de Queijo de Coalho. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 1997. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2194>>. Acesso em 21 jun. 2008.

BRASIL. Secretaria de Agricultura. Portaria nº. 56 de 17 de dezembro de 1999. Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura e Abastecimento. **Diário Oficial da república Federativa do Brasil**. 1999a.

BRASIL. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. 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 mai. 1999. Seção 1, p.11. 1999b.

BRASIL. Instrução Normativa nº 30 de 26 de junho de 2001. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de manteiga da terra, queijo de coalho e queijo de manteiga. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 jul. 2001.

BRASIL. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos

técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo... **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 13, 20 set. Seção 1. 2002a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, 09 jan. 2002b.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Agropecuária e Abastecimento. In: Embrapa Gado de Leite. **Estatísticas do Leite**. Disponível em: <<http://www.cnp.gl.embrapa.br/producao/dados2002/producao/tabela0210.php>>. Acesso em: dezembro de 2007.

BRUNO, F. A.; LANKAPUTHRA, W. E. V.; SHAH, N. P. Growth, viability and activity of *Bifidobacterium* spp. in skim milk containing prebiotics. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 7, p. 2740-2744. 2002.

BUENO, L. M. C. Leite de cabra – excelente alimento funcional. **Revista Leite e Derivados**, n. 83, p. 52-60, 2005.

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

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*. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 38, n. 2, p. 173-180, 2005.

BURITI, F. C. A.; CARDARELLI, H. R.; SAAD, S. M. I. Biopreservation by *Lactobacillus paracasei* in coculture with *Streptococcus thermophilus* in potentially probiotic and synbiotic fresh cream cheeses. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 1, p. 228-235, 2007.

BURITI, F. C. A.; CARDARELLI, H. R.; SAAD, S. M. I. Textura instrumental e avaliação sensorial de queijo fresco cremoso simbiótico: implicações da adição de *Lactobacillus paracasei* e inulina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 1, p. 75-84, 2008.

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

BURITI, F. C. A.; OKAZAKI, T. Y.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Effect of a probiotic mixed culture on texture profile and sensory performance of Minas fresh cheese in comparison with the traditional products. **Archivos Latinoamericanos Nutrición**, v. 57, n. 2, p. 179-185, 2007b.

CARDARELLI, H. R.; BURITI, F. C. A.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic *petit-suisse* cheese. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, n. 6, p. 1037-1046, 2008.

CARVALHO, R. B. **Potencialidades dos mercados para os produtos derivados caprinos e ovinos**. Artigo. 2008. Disponível em: < http://www.capritec.com.br/art040521.htm#_ftn1>. Acesso em: 18 de fev. de 2013.

CASTILLO, A.; LUCIA, L. M.; ROBERSON, D. B.; STEVENSON, T. H.; MERCADO, I.; ACUFF, G. R. Lactic acid sprays reduce bacterial pathogens on cold beef carcass surfaces and in subsequently produced ground beef. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 1, p. 58-62, 2001.

CASTRO, W. F.; CRUZ, A. G.; BISINOTTO, M. S.; GUERREIRO, L. M. R.; FARIA, J. A. F.; BOLINI, H. M. A.; CUNHA, R. L.; DELIZAT, R. Development of probiotic dairy beverages: Rheological properties and application of mathematical models in sensory evaluation. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 1, 2013.

CAVALCANTE, J. F. M.; ANDRADE, N. J.; SILVA, R. F. N. Valorização do queijo de artesanal brasileiro: caso do queijo de coalho. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 59, n. 339, p. 215-218, jul./ago., 2004.

CAVALCANTE, J. F. M.; ANDRADE, N. J.; FERREIRA, C. L. C. F.; FURTADO, M. M.; PINTO, C. L. O. Sistema multimídia de apoio à decisão na produção de leite e queijo coalho com segurança alimentar. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 289-304, 2009.

CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N. J. Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastrointestinal stresses. **Food Research International**, v. 41, n. 5, p. 539–543. 2008.

CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; ROUEL, J.; LAMBERET, G. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 5, p. 1751-1770, 2003.

CHOI, S. Y.; CHUNG, M. J.; LEE, S. J.; SHIN, J. H.; SUNG, N. J. N-nitrosamine inhibition by strawberry, garlic, kale, and the effects of nitrite-scavenging and N-nitrosamine formation by functional compounds in strawberry and garlic. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 485–491. 2007.

CIE - Commission Internationale de l'Éclairage. **Colorimetry**. Vienna: CIE publication, 2. ed., 1996.

CICHOSKI, A. J.; CUNICO, C.; LUCCIO, M.; ZITKOSKI, J. L.; CARVALHO, R. T. Efeito da adição de probióticos sobre as características de queijo prato com reduzido teor de gordura fabricado com fibras e lactato de potássio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 214-219, 2008.

COLLINS, J. K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G. O. Selection of probiotic strains for human applications. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 5, p. 487-490, 1998.

CORBO, M. R.; ALBENZIO, M.; DE ANGELIS, M.; SEVI, A.; GOBBETTI, M. Microbiological and biochemical properties of Canestrato Pugliese hard cheese supplemented with Bifidobacteria. **Journal Dairy Science**, v. 84, n. 3, p. 551-561, 2001.

COSTA, M. G. M.; FONTELES, T. V.; JESUS, A. L. T.; RODRIGUES, S. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: Process optimisation and product stability. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1-4, p. 261-266, 2013.

CRUZ, B. C. C.; SANTOS, C. L.; CRUZ, C. A. C. Benefícios do leite de cabra para alimentação humana. 1ª REUNIÃO TÉCNICA CIENTÍFICA EM OVINOCAPRINOCULTURA. **Anais...** Itapetininga – BA, p. 6-9, 2004.

CURI, R. A.; BONASSI, I. A. Elaboração de um queijo análogo ao pecorino romano produzido com leite de cabra e coalhada congelados. **Ciência e agrotecnologia**, v. 31, n. 1, p. 171-176, 2007.

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

DINAKAR, P.; MISTRY, V. V. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in cheddar cheese. **Journal Dairy Science**, v. 77, n. 10, p. 2854-2864, 1994.

DRAKE, M. A.; BOYLSTON, T. D.; SPENCE, K. D.; SWANSON, B. G. Chemical and sensory effects of a *Lactobacillus* adjunct in Cheddar cheese. **Food Research International**, v. 29, n. 3-4, p. 381-387, 1996.

DUBEUF, J. P.; MORAND-FEHR, P.; RUBINO, R. Situation, changes and future of goat industry around the world. **Small Ruminant Research**, v. 51, n. 2, p. 165-173, 2004.

EL-ZINEY, M. G.; VAN DEN TEMPEL, T.; DEBEVERE, J.; JAKOBSEN, M. Application of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* 12002 for meat decontamination and preservation. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 3, p. 257-261, 1999.

ELIAS, A. H. N. et al. Ácido linoléico conjugado (CLA) na mussarela de búfalas. **In:** Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 19. Recife, 2004.

ERKKILÄ, S.; PETÄJÄ, E.; EEROLA, S.; LILEBERG, L.; MATILLA-SANDHOLM, T.; SUIHKO, M. L. Flavour profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter cultures. **Meat Science**, v. 58, n. 2, p. 111-116, 2001.

ESCOBAR, C. A. M.; LEUTHIER, S.; ANTUNES, G.; ALBUQUERQUE, R. C. L. Avaliação dos pontos críticos na produção de queijo de coalho em Pernambuco. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 56, n. 321, p. 248-256, 2001.

FAO/WHO. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/009/y6398e.pdf>>. Acesso em: 6 jun. 2012. [Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation].

FAOSTAT- Disponível em:

<<http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor>>. Acesso em 17 de fev. 2013.

FARIA, E. V.; YOTSUYANAGI, K. **Técnicas de Análise Sensorial**. Campinas: ITAL/LAFISE, 116 p. 2002.

FARKYE, N. Y.; FOX, P. F. Objective indices of cheese ripening. **Trends in Food Science and Technology**, v. 1, n. 2, p. 37-40, 1990.

FARKYE, N. Y. Cheese technology. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 2/3 p. 91-98, 2004.

FIORAMONTI, J.; THEODOROU, V.; BUENO, L. Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology? **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, n. 5, p. 711-724, 2003.

FISBERG, M.; NOGUEIRA, M.; FERREIRA, A. M. A.; FISBERG, R. M. Aceitação e tolerância de leite de cabra em pré-escolares. **Revista de Pediatria Moderna**, v. 35, n. 7, 1999.

FOX, P. F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 6, p. 1379-1400, 1989.

FOX, P. F.; LAW, J. Enzymology of cheese ripening. **Food Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 239-262, 1991.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, n. 5, p. 365-378, 1989.

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, n. 6, p. 2192-2199, 1998.

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

GARDINER, G. E.; BOUCHIER, P.; O'SULLIVAN, E.; KELLY, J.; COLLINS, J. K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R. P.; STANTON, C. A spray-dried culture for probiotic Cheddar cheese manufacture. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 9, p. 749-756, 2002.

GASPAR, P.; ESCRIBANO, A. J.; MESÍAS, F. J.; ESCRIBANO, M.; PULIDO, A. F. Goat systems of Villuercas-Ibores area in SW Spain: Problems and perspectives of traditional farming systems. **Small Ruminant Resear**, v. 97, n. 1-3, p. 1-11, 2011.

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

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

GOBBETTI, M.; CORSETTI, A.; SMACCHI, E.; ZOCCHETTI, A.; De ANGELIS, M. Production of crescenza cheese by incorporation of bifidobacteria. **Journal Dairy Science**, v. 81, n. 1, p. 37-47, 1997.

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

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Use of small ruminants' milks supplemented with available nitrogen as growth media for *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, n. 5, p. 839. 1998b.

GOMES, A. M. P.; VIEIRA, M. M.; MALCATA, F. X. Survival of probiotic microbial strains in a cheese matrix during ripening: simulation of rates of salt diffusion and microorganism survival. **Journal of Food Engineering**, v. 36, n. 3, p. 281-301, 1998.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 4-5, p. 139-157, 1999.

GOMES, A. A.; BRAGA, S. P.; CRUZ, A. G.; CADENA, R. S.; LOLLO, P. C. B.; CARVALHO, C.; AMAYA-FARFÁN, J.; FARIA, J. A. F.; BOLINI, H. M. A. Effect of the inoculation level of *Lactobacillus acidophilus* in probiotic cheese on the physicochemical features and sensory performance compared with commercial cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 10, p. 4777-4786. 2011.

GONZALO. **Leite de cabra**: Município da Paraíba é destaque no Globo Rural. Assista! Disponível em: < <http://www.portalacteo.com.br/noticias/leite-de-cabra-municipio-da-pb-e-destaque-no-globo-rural-assista-5308/>>. Acesso em: 17 de fev. 2013.

GOVERNO DO ESTADO DA PARAÍBA. Disponível em: <http://portal.paraiba.pb.gov.br/index.php?option=com_content&task=view&id=9940&Itemid=2>. Acesso em: 12 de fev. 2009.

GUEIMONDE, M.; DELGADO S.; BALTASAR, M.; MADIEDO-RUAS, P.; MARGOLLES A.; REYES-GAVILÁN, C. G. Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. **Food Research International**, v. 37, n. 9, p. 839-850, 2004.

HAENLEIN, G. F. W. Goat milk in human nutrition. **Small Ruminant Research**, v. 51, n. 1, p. 155-163, 2004.

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

HEENAN, C. N.; ADAMS, M. C.; HOSKEN, R. W. Growth medium for culturing Probiotics bacteria for applications in vegetarian food products. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 35, n. 2, p. 171-176, 2002.

HELLER, K. J.; BOCKELMANN, W.; SCHREZENMEIR, J.; VRESE, M. Cheese and its potential as a probiotic food. In: FARNWORTH, E.R., Ed. **Handbook of fermented functional foods**. Boca Raton: CRC Press, 2003. p. 203-225.

HOLD, K. M.; DE BOER, D.; ZUIDEMA, J.; MAES, R. A. A. Saliva as an analytical tool in toxicology. **International Journal of Drug Testing**, v. 1, n. 1, p. 1-36. 1995.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U.; HUIS IN'T VELDT, J. H. J. Overview of gut flora and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 85-101, 1998.

HUANG, Y.; ADAMS, M. C. *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 253-260. 2004.

IFT – INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS. Sensory evaluation guide for testing food and beverage products. **Food Technology**, v. 35, n. 11, p. 50-59, 1981.

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

JIANG, J.; WOLK, A.; VESSBY, B. Relation between the intake of milk fat and the occurrence of conjugated linoléic acid in human adipose tissue. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 1, p. 21-27, 1999.

JURKIEWICZ, C. H. **Avaliação das características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais de queijo minas frescal elaborado com culturas probióticas de *Lactobacillus acidophilus***. São Paulo, 1999. 134 f. (Tese de Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo.

KAILASAPATHY, K.; CHIN, J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Immunology & Cell Biology**, v. 78, n. 1, p. 80-88. 2000.

KAPITULA, M. M.; KLEBUKOWSKA, L.; KORNACKI, K. Evaluation of the possible use of potentially probiotic *Lactobacillus* strains in dairy products. **International Journal of Dairy Technology**, v. 61, n. 2, p. 165-169, 2008.

KAUR, I. P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2002.

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

KLAVER, F. A.; M., KINGMA, F.; WEERKAMP, A. H. Growth and survival of bifidobacteria in milk. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v. 47, p. 151-164. 1993.

KOSIKOWSKI, F. V.; MISTRY, V. V. **Cheese and fermented milk foods**. 3 ed. Westport: AVI, 728p. 1997.

LAGUNA, L. E.; LANDIM, F. G. S. **Iniciando um Pequeno Grande Negócio Agroindustrial de Leite de Cabra e Derivados**. Embrapa Caprinos, Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. – Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003.

LANARA - Laboratório Nacional de Referência Animal. **Métodos de análises oficiais par controle de produtos de origem animal e seus ingredientes**. Brasília, DF, 1981.

LAURENT, C.; BESANÇON, P.; CAPORICCIO, B. Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an *in vitro* digestion/caco-2 cell culture model. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1704–1712. 2007.

LEANDRO, E. S.; ARAÚJO, E. A.; CONCEIÇÃO, L. L.; MORAES, C. A.; CARVALHO, A. F. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 in ice cream produced with different fat levels and after submission to stress acid and bile salts. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, p. 503-507, 2013.

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

LEROY, F.; VERLUYTEN, J.; VUYST, L. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 3, p. 270-285, 2006.

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, n. 6-9, p. 921–927. 2005.

MADUREIRA, A. R.; AMORIM, M.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 465–470. 2011a.

MADUREIRA, A. R.; PINTADO, M. E.; GOMES, A. M.; MALCATA, F. X. Incorporation of probiotic bacteria in whey cheese: decreasing the risk of microbial contamination. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 7, p. 1194–9. 2011b.

MAINVILLE, I.; ARCAND, Y.; FARNWORTH, E. R. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 287–296. 2005

MAKINEN, K.; BERGER, B.; BEL-RHLID, R.; ANANTA, E. Science and technology for the mastership of probiotic applications in food products. **Journal of Biotechnology**, v. 162, n. 4, p. 356-365, 2012.

MARUYAMA, L. Y; CARDARELLI, H. R; BURITI, F. C. A; SAAD, S. M. I. Textura instrumental de Queijo Petit-Suisse potencialmente probiótico: Influência de diferentes combinações de gomas. **Revista Ciência Tecnologia de Alimentos**. v. 26, n. 2, p. 386 – 388, 2006.

McSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 2/3 p. 127-144, 2004.

MCCULLOUGH, F. S. W. Nutritional interest of goat's milk – Present information and future prospects. **In: International Symposium the future of the sheep and goat dairy sectors**. Zaragoza: CIHEAM-IAMZ, 2004.

MILES, O.; MISRA, S. S.; IRWIN, J. O. The estimation of the bactericidal power of the blood. **Journal of Hygiene**, v. 38, n. 6, p. 732-749. 1938.

MINERVINI, F.; SIRAGUSA, S.; FACCIA, M.; DAL BELLO, F.; GOBBETTI, M.; DE ANGELIS, M. Manufacture of Fior di Latte cheese by incorporation of probiotic lactobacilli. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 2, p. 508-520. 2012.

MONERET-VAUTRIN, A. Allergy to goat milk and sheep milk. **In:** International Symposium the future of the sheep and goat dairy sectors. Zaragoza: CIHEAM-IAMZ, 2004.

MORAND-FEHR, P.; FEDELE, V.; DECANDIA, M.; LE FRILEUX, Y. Influence of farming and feeding systems on composition and quality of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1, p. 20-34, 2007.

MORETTI, B. R. **Efeito da suplementação do leite com proteínas de diferentes fontes (soro de leite, soja e colágeno) e da composição da cultura lática em iogurtes**. 2009. 160 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto.

MORGAN, F.; MASSOURAS, T.; BARBOSA, M.; ROSEIRO, L.; RAVOSCO, F.; KONDARAKIS, I.; BONNIN, V.; FISTAKORIS, M.; ANIFANTAKIS, E.; JAUBERT, G.; RAYNAL-LJUTOVAC, K. Characteristics of goat milk collected from small and medium enterprises in Greece, Portugal and France. **Small Ruminant Research**, v. 47, n. 1, p. 39-49, 2003.

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

NARIMATSU, A.; DORNELLAS, J. R. F.; SPADOTI, L. M.; PIZAIA, P. D.; ROIG, S. M. Avaliação da proteólise e do derretimento do queijo prato obtido por ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 0, 2003 .

NASSU, R. T.; LIMA, J. R.; BASTOS, M. S. R.; MACEDO, B. A.; LIMA, M. H. P. Diagnóstico das condições de processamento de queijo de coalho e manteiga da terra no Estado do Ceará. **Revista Higiene Alimentar**, v. 15, n. 89, p. 28-36, jul., 2001.

NOMOTO, K. Prevention of Infections by Probiotics. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 100, n. 6, p. 583–592. 2005

O'BRIEN, J.; CRITTENDEN, R.; OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. Safety evaluation of probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 12, p. 418-424, 1999.

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

OLIVEIRA, M. N.; LACERRA, A. A.; GIOIELLI, L. A.; BARUFFALDI, R. Effetto della temperatura e del tempo di coagulazione del latte sulla consistenza del formaggio “Minas Frescal”. In: PORRETA, S. **Ricerche e innovazioni nell'industria alimentari**. Pinerolo: Chiriotti Editore, 1996. v. 2, p. 575-584.

OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p. 1-21, 2002.

OLIVEIRA, J. S. **Como fazer queijos**: fundamentos tecnológicos. Rio de Janeiro: Tecnoprint, 1987. Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas de Instituto Adolfo Lutz. 5 ed. São Paulo, 2005. p. 1018.

ONG, L.; HENRIKSSON, A.; SHAH, N. P. Development of probiotic cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb casei*, *Lb paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 5, p. 446-456, 2006.

ONG, L.; HENRIKSSON, A.; SHAH, N. P. Proteolytic pattern and organic acid profiles of probiotic Cheddar cheese as influenced by probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*, *L. paracasei*, *L. casei* or *Bifidobacterium* sp. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 1, p. 67-78. 2007.

OSMARI, E. K.; CECATO, U.; MACEDO, F. A. F.; SOUZA, N. E. Nutritional quality indices of milk fat from goats on diets supplemented with different roughages. **Small Ruminant Research**, v. 98, n. 1-3, p. 128-132, 2011.

OUWEHAND, A. C.; TUOMOLA, E. M.; TOLKKO, S.; SALMINEN, S. Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, n. 1-2, p. 119-126. 2001.

PAN, X.; CHEN, F.; WUA, T.; TANG, H.; ZHAO, Z. The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. **Food Control**, v. 20, n. 6, p. 598-602, 2009.

PARVEZ, S.; MALIK, K. A.; AH KANG, S.; KIM, H. Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 6, p. 1171-1185, 2006.

PAPAMANOLI, E.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; KOTZEKIDOU, P. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in

respect of their technological and probiotic properties. **Meat Science**, v. 65, n. 2, p. 859-867, 2003.

PARK, Y. W.; JUAREZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN, G. F. W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1-2, p. 88-113. 2007.

PEREDA, J. A. O.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. **Queijos**. In: Tecnologia de Alimentos. Alimentos de origem animal. v. 2. Porto alegre: Artmed, 2005. p. 85-103.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

POVEDA; J. M.; CABEZAS, L.; MCSWEENEY, P. L. H. Free amino acid content of Manchego cheese manufactured with different starter cultures and changes throughout ripening. **Food Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 213-218, 2004.

PRASAD, M. M.; GHODEKER, D. R. Antimicrobial activity of lactobacilli isolated from fermented milk products. **Cultured Dairy Products Journal**, v. 26, n. 2, p. 22-28, 1991.

PRIETO, B.; FRANCO, I.; FRESNO, J. M.; PRIETO, J. G.; BERNARDO, A.; CARBALLO, J. Effect of ripening time and type of rennet (farmhouse rennet from ki dor commercial calf) on proteolysis during the ripening of León cow milk cheese. **Food Chemistry**, v. 85, n. 3, p. 389-398, 2004.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A. M.; OKSMANCALEDENTY, K. M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, n. 1, p. 3-11, 2002.

QUEIROGA, R. C. R. E. **Caracterização nutricional, microbiológica, sensorial e aromática do leite de cabra Saanen, em função do manejo do rebanho, higiene da ordenha e fase de lactação**. 2004. 136 f. Tese (Doutorado em Nutrição) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

QUEIROGA, R. C. R. E.; COSTA, R. G.; BISCONTINI, T. M. B. **A Caprinocultura Leiteira no Contexto da Segurança Alimentar e Nutricional**. Artigo. 2006. Disponível em: < <http://www.capritec.com.br/art37.htm> >. Acesso em: 18 de mar. De 2013.

QUEIROGA, R. C. R. E., SANTOS, B. M., GOMES, A. M. P., MONTEIRO, M. J., TEIXEIRA, S. M., SOUZA, E. L., PEREIRA, C. J. D., & PINTADO, M. M. E. Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats' milk and their mixture. **LWT – Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 538-544, 2013.

RACCACH, M.; McGRATH, R.; DAFTARIAN, H. Antibiosis of some lactic acid bacteria including *Lactobacillus acidophilus* toward *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 25-32, 1989.

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

RANADHEERA, C. S.; EVANS, C. A.; ADAMS, M. C.; BAINES, S. K. Production of probiotic ice cream from goat's milk and effect of packaging materials on product quality. **Small Ruminant Research**, 2013. (*In press*). <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.12.020>.

REID, G.; SANDERS, M. E.; GASKINS, H. R.; GIBSON, G. R.; MERCENIER, A.; RASTALL, R.; ROBERFROID, M.; ROWLAND, I.; CHERBUT, C.; KLAENHAMMER, T. R. New Scientific paradigms for probiotics and prebiotics. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 37, n. 2, p. 105-118, 2003.

RODRIGUES, A.; QUINTANS, L. J. Produção e beneficiamento do leite de cabra na Paraíba. In: Simpósio Internacional de Caprinos de Corte, 2, Simpósio Internacional sobre o Agronegócio da Caprinocultura Leiteira, 1, João Pessoa/PB, **Anais...João Pessoa/PB**, p. 291-311, 2003.

ROSS, R. P.; STANTON, C.; HILL, C.; FITZGERALD, G. F.; COFFEY, A. Novel cultures for cheese improvement. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 3, p. 96-104, 2000.

ROY, D.; MAINVILLE, I.; MONDOU, F. Selective enumeration and survival of bifidobacteria in fresh cheese. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 12, p. 785-793, 1997.

RUIZ-MOYANO, S.; MARTÍN, A.; BENITO, M. J.; NEVADO, F. P.; DE GUÍA CÓRDOBA, M. Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. **Meat Science**, v. 80, n. 3, p. 715–721. 2008.

RYBKA, S.; FLEET, G. H. Populations of *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* species in Australian yoghurts. **Food Australia**, v. 49, n. 10, p. 471-475, 1997.

RYHÄNEN, E. L.; PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A.; PAHKALA, E. A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4-7, p. 441-447, 2001.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006 .

SAAD, N.; DELATTRE, C.; URDACI, M.; SCHMITTER, J. M.; BRESSOLIER, P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 1-16, 2013.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, n. 3, p. 197-215, 2000.

SABIONI, J. G. Contribuição da atividade lipolítica e proteolítica na formação de flavor em queijos e no desenvolvimento de produtos aromáticos de origem láctea. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 54, n. 312, p. 30-9. 2000.

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; MORELLI, L.; MARTEAU, P.; BRASSART, D.; VOS, W. M.; FONDÉN, R.; SAXELIN, M.; COLLINS, K.; MOGENSEN, G.; BIRKELAND, S. E.; MATTILASANDHOLM, T. Demonstration of safety of probiotics: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, n. 1-2, p.9 3-106, 1998.

SAMESHIMA, T.; MAGOME, C.; TAKESHITA, K.; ARIHARA, K.; ITOH, M.; KONDO, Y. Effect of intestinal *Lactobacillus* starter cultures on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in fermented sausage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 1-7. 1998.

SANDERS, M. E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 5, p. 341-347, 1998.

SANDERS, M. E.; KLAENHAMMER, T. R. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 2, p. 319-331, 2001.

SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Reviews**, v. 61, n. 3, p. 91-99, 2003.

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

coli as well as certain enteric diseases and their treatment with antibiotics and lactobacilli. **Journal of Milk Food Technology**, v. 35, n. 12, p. 691-702, 1972.

SANTOS, B. M.; OLIVEIRA, M. E. G.; SOUSA, Y. R. F.; MADUREIRA, A. R. M. F. M.; PINTADO, M. M. E.; GOMES, A. M. P.; SOUZA, E. L.; QUEIROGA, R. C. R. E. Caracterização físico-química e sensorial de queijo de coalho produzido com mistura de leite de cabra e de leite de vaca. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 3, p. 302-310, 2011.

SAS Institute. **SAS User's Guide: Statistics**; Version 8.0. SAS Institute, Cary, NC, USA. 1999.

SEBRAE. **Projeto melhoria da qualidade do queijo de coalho produzido no Ceará**. Fortaleza: SEBRAE/CE, 1998. 208p.

SENA, M. J.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; MORAIS, C. F. A.; CORREA, E. S.; SOUZA, M. R. Características físico-químicas de queijo de coalho comercializado em recife, PE. **Higiene alimentar**, v. 14, n. 74, p. 41-44, jul. 2000.

SGARBIERI, V. C.; PACHECO, M. T. B. Revisão: alimentos funcionais fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 2, n. 1-2, p. 7-19, 1999.

SHORTT, C. The probiotic century: historical and current perspectives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 12, p. 411-417, 1999.

SILVA, J. A. Sanitização da carne bovina com ácidos orgânicos – Parte I. **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 60, p. 55-62, 1999.

SILVA, A. M. C. **Efeitos de processos de pasteurização aplicados em leite de cabra no estado de Pernambuco**. Recife - PE, 2001. 117 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SIMPLÍCIO, A. A.; WANDER, A. Organização e Gestão da Unidade Produtiva na Caprinocultura. Congresso Pernambucano de Medida Veterinária. In: SEMINÁRIO NORDESTINO DE CAPRI-OVINOCULTURA, 5, 2003, Recife/Brasil. **Anais...** Recife/Brasil, p. 177-187, 2003.

SINGH, K.; KALLALI, B.; KUMAR, A.; THAKER, V. Probiotics: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 2, p. S287-S290, 2011.

SORYAL, K. A.; ZENG, S. S.; MIN, B. R.; HART, S. P. Effect of feeding treatments and lactation stages on composition and organoleptic quality of goat milk Domiati cheese. **Small Ruminant Research**, v. 52, n. 1, p. 109–116, 2004.

SOUZA, C. H. B.; BURITI, F. C. A.; BEHRENS, J. H.; SAAD, S. M. I. Sensory evaluation of probiotic Minas fresh cheese with *Lactobacillus acidophilus* added solely or in coculture with a thermophilic starter culture. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 43, n. 5, p. 871–877, 2008.

SREEKUMAR, O.; HOSONO, A. Immediate effect of *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal flora and fecal enzymes of rats and the *in vitro* inhibition of *Escherichia coli* in coculture. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 5, p. 931–939, 2000.

STANTON, C.; GARDINER, G.; LYNCH, P. B.; COLLINS, J. K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R. P. Probiotic cheese. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 5, p. 491–496, 1998.

TALWALKAR, A.; MILLER, C. W.; KAILASAPATHY, K.; NGUYEN, M. H. Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 39, n. 6, p. 605–11, 2004.

TEJADA-SIMON, M. V.; LEE, J. H.; USTUNOL, Z.; PESTKA, J. J. Ingestion of yogurt containing *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* to potentiate immunoglobulin A responses to cholera toxin in mice. **Journal Dairy Science**, v. 82, n. 4, p. 649–680, 1999.

THARMARAJ, N.; SHAH, N. P. Antimicrobial effects of probiotics against selected pathogenic and spoilage bacteria in cheese-based dips. **International Food Research Journal**, v. 16, p. 261–76, 2009.

TODOROV, S.; DICKS, L. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria: Comparison of the bacteriocins. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 11–19, 2006.

VANDERZANT, C.; SPILTTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3 ed. Washington: APHA, p. 1219, 1992.

VAN NETTEN, P.; MOSSEL, D. A. A.; HUIS IN'T VELD, J. H. J. Microbial changes on freshly slaughtered pork carcasses due to “hot” lactic acid decontamination. **Journal of Food Safety**, v. 17, n. 2, p. 89–111, 1997.

VARGAS, M.; CHÁFER, M.; ALBORS, A.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Physicochemical and sensory characteristics of yoghurt produced from mixtures of cows' and goats' milk. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 12, p. 1146-1152, 2008.

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

VIEIRA, M. I. **Criação de cabras: técnicas práticas lucrativas**. ed. 4. São Paulo: Nobel, 1995. p. 23-25.

VIEIRA, A. C. P.; CORNÉLIO, A. R.; SALGADO, J. M. **Alimentos Funcionais**: aspectos relevantes para o consumidor. Disponível em: <www.jus2.uol.com.br>. Acesso em: 15 set. 2007.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Enumeration of *L. casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 4, p. 271-275, 2000.

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

VO, T. -S.; KIM, S. -K. Fucoidans as a natural bioactive ingredient for functional foods. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, p. 16-17, 2013.

WANG, Y. C.; YU, R. C.; CHOU, C. C. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 93, n. 2, p. 209-217, 2004.

WILLIAMS, C. Dietary fatty acids and human health. **INRA Animale Zootechnia**, n. 49, p. 165-180, 2000.

YING, D. Y.; SCHWANDER, S.; WEERAKKODY, R.; SANGUANSRI, L.; DEMARCHI, C. G.; AUGUSTIN, M. A. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein and resistant starch matrices: Probiotic survival in fruit juice. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, p. 98-105, 2013.

ZAMFIR, M.; CALLEWAERT, R.; CORNEA, P. C.; De VUYST, L. Production kinetics of acidophilin 801, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. **FEMS: Microbiology Letters**, v. 190, n. 2, p. 305-308, sep. 2000.

ZIEMER, C. J.; GIBSON, G. R. An Overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **International Dairy Journal**, Barking, v. 8, n. 5-6, p. 473-479, may/jun. 1998.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Formulário do teste aceitação sensorial e intenção de compra de queijo tipo coalho caprino adicionado de bactérias lácticas.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO**

Teste de Aceitação e Intenção de compra

Nome: _____ **Idade:** _____ **e-mail:** _____

Fone: _____ **Escolaridade:** _____ **Data:** _____

Você está recebendo 05 amostras codificadas de queijo tipo coalho caprino com potencial probiótico. Prove-as da esquerda para direita, avalie sensorialmente as amostras de acordo com cada atributo nos quadros e escreva o valor da escala que você considera correspondente à amostra (código) no que diz respeito aos atributos avaliados. Antes de cada avaliação, você deverá fazer uso da água e da bolacha.

9 – gostei muitíssimo
8 – gostei muito
7 – gostei moderadamente
6 – gostei ligeiramente
5 – nem gostei/nem desgostei
4 – desgostei ligeiramente
3 – desgostei moderadamente
2 – desgostei muito
1 – desgostei muitíssimo

ATRIBUTOS	AMOSTRAS (Código)				
Aparência					
Cor					
Aroma					
Sabor					
Consistência					
Avaliação Global					

Agora indique sua atitude ao encontrar estes queijos no mercado.

5 – compraria
4 – possivelmente compraria
3 – talvez comprasse/ talvez não comprasse
2 – possivelmente não compraria
1 – jamais compraria

ATRIBUTOS	AMOSTRAS (Código)				
Intenção de Compra					

Comentários: _____

OBRIGADA!

APÊNDICE B - Formulário do teste de ordenação preferência de queijo tipo coalho caprino adicionado de bactérias láticas.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

Teste de Ordenação-Preferência

Nome: _____ Data: _____

Você está recebendo 5 amostras de queijo tipo coalho caprino com potencial probiótico. Por favor, prove as amostras, da esquerda para direita, e ordene-as em ordem decrescente de **preferência geral**. Espere 30 segundos antes de consumir a próxima amostra e utilize bolacha e água entre cada avaliação.

	Mais preferida	—————→			Menos preferida
Posto	1º Lugar	2º Lugar	3º Lugar	4º Lugar	5º Lugar
Código					

Comentários: _____

Agora, por favor, responda as seguintes questões:

Qual característica sensorial você mais apreciou na amostra mais preferida?

Qual característica sensorial você não apreciou na amostra menos preferida?

Comentários: _____

Obrigada!

APÊNDICE C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) utilizado na análise sensorial de queijo tipo coalho caprino adicionado de bactérias láticas.

Termo do Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Prezado (a) Senhor (a)

Esta pesquisa é sobre elaboração e caracterização de queijo tipo coalho caprino adicionado de culturas láticas e está sendo desenvolvida por Maria Elieidy Gomes de Oliveira, aluna da Pós-graduação em Nutrição (Doutorado) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob a orientação do Professor Dr^o. Evandro Leite de Souza e Co-orientação da Professora Dr^a. Rita de Cássia Ramos do E. Queiroga.

Objetivos do estudo:

Elaborar e caracterizar os aspectos tecnológicos e de qualidade, bem como o potencial funcional de queijos caprinos tipo coalho adicionados de bactérias probióticas.

Solicitamos a sua colaboração na avaliação sensorial, como também sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo. Só deve participar desta pesquisa quem for consumidor de queijo.

Esclarecemos que sua participação no estudo é voluntária e, portanto, o(a) senhor(a) não é obrigado(a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador(a). Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que vem recebendo na Instituição.

Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.

Diante do exposto, declaro que fui devidamente esclarecido(a) e dou o meu consentimento para participar da pesquisa e para publicação dos resultados.

Assinatura do Participante da Pesquisa
ou Responsável Legal

Assinatura da Testemunha

Contato com o Pesquisador (a) Responsável:

Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor ligar para o(a) Pesquisador (a) Maria Elieidy Gomes de Oliveira; Telefone: (83) 8830-4927
Email: elieidynutri@yahoo.com.br

Atenciosamente,

Assinatura do Pesquisador Responsável

Assinatura do Pesquisador Participante

ANEXOS

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – UFPB

15/02/13

Andamento do Projeto

Andamento do projeto - CAAE - 0141.0.126.000-09				
Título do Projeto de Pesquisa				
QUALIDADE DE QUEIJO COALHO CAPRINO ADICIONADO DE CULTURAS LÁTICAS				
Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP
Aprovado no CEP	20/08/2009 08:26:09	26/08/2009 10:54:13		
Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	Origem
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	19/08/2009 09:53:05	Folha de Rosto	FR284781	Pesquisador
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	20/08/2009 08:26:09	Folha de Rosto	0141.0.126.000-09	CEP
3 - Protocolo Aprovado no CEP	26/08/2009 10:54:12	Folha de Rosto	155/2009	CEP

ANEXO B – Documentação comprobatória da publicação do Artigo 1 no periódico Scientia Agricola.

370

Scientia Agricola

Technological, physicochemical and sensory characteristics of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria

Maria Elieidy Gomes de Oliveira¹, Estefânia Fernandes Garcia², Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga¹, Evandro Leite de Souza^{2*}

¹Universidade Federal da Paraíba/Centro de Ciências da Saúde – Depto. de Nutrição – Lab. de Bromatologia.

²Universidade Federal da Paraíba/Centro de Ciências da Saúde – Depto. de Nutrição – Lab. de Microbiologia de Alimentos, Campus I, Cidade Universitária – 58051-900 – João Pessoa, PB – Brasil.

*Corresponding author <evandroleitesouza@ccs.ufpb.br>

Edited by: Daniel Scherer de Moura

Received November 01, 2011

Accepted March 08, 2012

ABSTRACT: Over the past few years, the use of probiotics, which are capable of exerting beneficial effects on the composition of intestinal microbiota, has increased. Cheeses have been suggested as a better carrier of probiotic bacteria than other fermented milk products. The effect of added cultures of probiotic lactic acid bacteria on the quality of a Brazilian goat semi-hard cheese (coalho) was assessed during 21 days of storage at 10 °C as follows: C1, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris* (standard cheese); C2, *Lactobacillus acidophilus* (LA-5); C3, *Lactobacillus paracasei* (*Lactobacillus casei*-01); C4, *Bifidobacterium lactis* (BB-12); and C5, *L. acidophilus*, *L. paracasei* and *B. lactis*. Differences in some physico-chemical, experimental texture and proteolysis parameters were found among the assessed cheeses. All of them presented high luminosity (L*) with predominance of the yellow component (b*). Numbers of lactic acid bacteria in the cheeses were greater than 10⁷ cfu g⁻¹ during storage. Cheeses with the added probiotic strains alone and in co-culture were better accepted than cheeses without the probiotic strains. It is suggested that goat "coalho" cheese could be a potential carrier of probiotic lactic acid bacteria.

Keywords: dairy product, probiotic microorganisms, quality evaluation

Introduction

In recent years, consumers have become more interested in the general quality of foods. Most consumers are concerned not only about safety and nutritional value but also about health benefits (Saarela et al., 2002). The Food and Agriculture Organization defines food-related probiotics as living organisms that, upon ingestion in certain numbers, exert health benefits to the consumer's health beyond inherent basic nutrition (FAO, 2001).

Probiotics are efficacious in treatment of gastrointestinal disorders, respiratory infections and allergic symptoms (Wohlgemuth et al., 2010) and also reduce blood cholesterol and improve immunity (Shah, 2007). The minimal population of the probiotic bacteria to ensure a favorable impact on health is 10⁷ cfu g⁻¹ or mL⁻¹ of food at the time of consumption (De Vuyst, 2000). Furthermore, a probiotic strain must be amenable to food-grade production on an industrial scale, remain under good viability and functionality during storage and food consumption (Mätö et al., 2006), resist the bile salts and acidic conditions of the upper gastrointestinal tract (Cruz et al., 2009), adhere to the intestinal epithelium of hosts and possess antagonistic activity against bacterial pathogens (Lin et al., 2006).

Strains belonging to the genera *Lactobacillus* [*L. acidophilus* (LA-5), *L. paracasei* (*L. casei*-01)] and *Bifidobacterium* [*B. lactis* (BB 12), *B. longum* (1941)] have been evaluated for probiotic properties with satisfactory results (Buriti et al., 2005a; Buriti et al., 2005b; Buriti et al., 2007b; Ong and Shah, 2009; Phillips et al., 2006; Souza and Saad, 2009). These bacterial strains are normal constituents of the intestinal flora and present a long history of safe application in foods.

Considering the survival and viability of probiotic cultures, fermented dairy products, such as cheeses, yogurts and fermented milks, are promising food delivery systems for these cultures. Cheese has been suggested as a better carrier of probiotic bacteria than other fermented milk products due to its pH, higher content of fat and solid consistency, which offer greater protection to these microorganisms in the gastrointestinal tract (Ong et al., 2006).

"Coalho" cheese is a Brazilian product that has been produced for over 150 years in various states of the northeast region of Brazil. Coalho cheese is a semi-hard cheese with medium-to-high moisture produced from raw or pasteurized cow or goat milk. It is obtained after milk coagulation using rennet or proper coagulating enzymes, which are sometimes complemented with selected lactic acid bacteria. Coalho cheese is commonly marketed after seven days of storage at 10 °C (Brasil, 1997). This product has a high commercial value because its production technology is simple, the yield is high and consumers readily purchase it.

Probiotic bacteria, such as lactobacilli, bifidobacteria and enterococci, have been successfully incorporated into different cheese varieties, such as cheddar (McBrearty et al., 2001), Gouda (Gomes et al., 1998), Crescenza (Gobbetti et al., 1998), cream cheese (Buriti et al., 2007a) and Minas fresh cheese (Buriti et al., 2005b; Vinderola et al., 2000). The addition of selected lactic acid bacteria in simple and mixed cultures in cheeses can improve bacterial viability and increase the acidification, flavor development and sensory characteristics of the cheese during storage (Buriti et al., 2005a; Buriti et al., 2005b; Buriti et al., 2007c).

Currently, there is a lack of studies emphasizing the incorporation of probiotic cultures into coalho

ANEXO C – Documentação comprobatória de encaminhamento do Artigo 2 ao periódico Food Research International

17/03/13

elieidynutri - Yahoo! Mail

17/03/13

elieidynutri - Yahoo! Mail

Buscar no Yahoo! Mail Buscar na Web  Oi, Maria Elieidy

ENTRADA CONTATOS AGENDA Re: artigo_FW: Subm...

Escrever Enviar Salvar rascunho Cancelar

Entrada Para: Evandro Leite de Souza Cc

Conversas CCO Ocultar Cco

Rascunhos (1)

Enviadas Assunto: Re: artigo_FW: Submission Confirmation

Spam

Lixeira (5)

PASTAS

Doutorado

sem título

APLICATIVOS

> From: fr@uoguelph.ca
> To: evandroleitesouza@hotmail.com
> Date: Sun, 17 Mar 2013 18:22:47 +0000
> Subject: Submission Confirmation
>
> Dear Dr. Evandro de Souza,
>
> Your submission entitled "Addition of probiotic bacteria in a semi-hard goat cheese (coalho): survival to simulated gastrointestinal conditions and inhibitory effect against pathogenic bacteria" has been received by Food Research International
>
> You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/foodres/>.
>
> Your username is: evandroleitesouza@hotmail.com
> If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/foodres/automail_query.asp
>
> Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.
>
> Thank you for submitting your work to this journal.
>
> Kind regards,
>
> Elsevier Editorial System
> Food Research International
>
>
> Important information to authors concerning the manuscript processing at Food Research International and correspondence with the Editorial Office
>
> Kind regards,
>
> Elsevier Editorial System
> Food Research International
>
>
> Important information to authors concerning the manuscript processing at Food Research International and correspondence with the Editorial Office
>
> All papers submitted to FRI undergo a process of pre-review evaluation which will determine whether they are sent for external review (see Guide for Authors).
>
> FRI submissions have increased by over 40% over the past three years, and while editors try to process them rapidly as possible, the pre-review evaluation of many papers cannot be completed in a short time. When a paper is marked "With Editor" in EES, the pre-evaluation review is being completed.
>
> Papers that are accepted for external review are sent to peer reviewers. Finding reviewers who are both specialized in the same field as the manuscript topic and who are available to review can be a long and time-consuming process. Papers marked "Under Review" have not been forgotten, but frequently it takes multiple attempts to find two peer reviewers who will actually review the submission.
>
> Authors should only send correspondence to the journal about technical issues - e.g. password difficulties, missing data, adding another author, or some other item that was forgotten or overlooked when the paper was uploaded into EES. Enquiries concerning the status of papers, given the very small staff at the FRI Editorial Office, and its part-time operation, will delay the processing of manuscripts; there is no guarantee that such enquiries will be answered.
>
> For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.