

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM HIGIENE
VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE
PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

EDUARDO BRUNO NOGUEIRA

ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS, BACTERIOLÓGICAS, REOLÓGICAS
E SENSORIAIS DO QUEIJO MARMOREADO DOCE COM
PROBIÓTICO

UNIVERSIDADE
FEDERAL
FLUMINENSE

NITERÓI
2013

EDUARDO BRUNO NOGUEIRA

ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS, BACTERIOLÓGICAS, REOLÓGICAS E
SENSORIAIS DO QUEIJO MARMOREADO DOCE COM PROBIÓTICO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre. Área de concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Orientador: Marco Antonio Sloboda Cortez

Co-orientador: Robson Maia Franco

Co-orientador: Adriano Gomes da Cruz

Niterói
2013

EDUARDO BRUNO NOGUEIRA

ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS, BACTERIOLÓGICAS, REOLÓGICA E
SENSORIAIS DO QUEIJO MARMOREADO DOCE COM PROBIÓTICO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre. Área de concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovado em 18/02/2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco Antônio Sloboda Cortez
UFF

Prof. Dr. Robson Maia Franco
UFF

Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz
IFRJ

Dr. Anderson de Souza Sant'Ana
USP

Niterói
2013

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha família e amigos

À minha mãe, Lia Márcia de Paula Bruno, minha melhor amiga, maior exemplo de Médica Veterinária e mãe, me proporcionando conselhos fundamentais, educação e um amor incondicional, superando obstáculos para fazer de mim uma pessoa e um profissional melhor. Amo você.

Ao meu irmão, Carlos Bruno Nogueira, meu melhor amigo, que esteve ao meu lado nos momentos felizes e tristes, me dando conselhos e força para que meus objetivos se realizassem. Sempre que precisei de uma mão você imediatamente me deu as duas, muito obrigado, meu amigo, meu irmão do coração.

Ao meu pai, Sávio Soares Nogueira, figura do “Super Homem”, com um coração fantástico, fundamental na minha educação e formação.

Aos meus queridos tios, primos e padrasto, José Luiz, Rachel, Luiz Gustavo, Mariana, Vânia, Thales, Guilherme, Antônio Márcio, Maurício, Carlos Heitor, Dani e Pedro Paulo, pela motivação, apoio e inspiração.

Aos meus amigos de raiz e aos que conquistei após deixar minha cidade natal, pelos conselhos, pela reciprocidade de sentimentos, pelos abraços apertados, pelos momentos de felicidades e tristezas que passamos juntos, sempre nos unindo para seguir uma “Vida Boa”. Meu maior medo é de que meus filhos não tenham as amizades que tive.

À minha namorada, Paula Strunck da Silva Pinto, pelo companheirismo, amor, ajuda técnica e por estar constantemente me motivando a me tornar um profissional mais competente e melhor. Minha namorada, minha Paixão, minha alavanca.

Ao Prof. Dr. Robson Maia Franco, meu co-orientador e eterno orientador, pela competência, pelo caráter, pelos ensinamentos e principalmente pela amizade, fundamentais na realização desse trabalho e na minha formação, Médico Veterinário ético e de caráter!

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Sloboda Cortez, meu orientador, pela amizade, pelos ensinamentos, pelo caráter e pela confiança depositada em mim desde a graduação.

Ao Prof. Dr^o Adriano Gomes da Cruz, meu co-orientador, pela dedicação, ensinamentos e motivação em me tornar um profissional melhor e mais competente.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, da Universidade Federal Fluminense que contribuíram para o meu crescimento

profissional e pessoal, em especial à Prof.Drª Mônica Queiroz de Freitas, por me estender a mão e acreditar em mim desde o início.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS, f. 6

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS, f. 7

RESUMO E PALAVRAS-CHAVE, f. 8

ABSTRACT AND KEYWORDS, f. 9

1 INTRODUÇÃO, f. 10

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, f. 12

2.1 ASPECTO TECNOLÓGICO BACTERIANO, FÍSICO-QUÍMICO E REOLÓGICO NA PRODUÇÃO DE QUEIJOS MATURADOS, f. 12

2.2 ASPECTOS SENSORIAS APLICADOS NA INOVAÇÃO TECNOLÓGICA DE QUEIJOS, f. 15

2.3 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO QUEIJO, f. 17

2.4 QUEIJO COMO ALIMENTO PROBIÓTICO, f. 20

3 DESENVOLVIMENTO, f. 24

3.1 MARBLED CHEESE SUPPLEMENTED WITH PROBIOTIC BACTERIA: VIABILITY, ACTIVITY AND SENSORY ACCEPTANCE (TRABALHO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA JOURNAL OF DAIRY SCIENCE), f. 24

3.2 PROBIOTIC MARBLED CHEESE: RHEOLOGICAL CHARACTERISTICS AND SENSORY OPTIMIZATION (TRABALHO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA LEBENSMITTEL-WISSENSCHAFT + TECHNOLOGIE / FOOD SCIENCE + TECHNOLOGY), f. 47

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS, f. 75

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, f. 76

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

1º ARTIGO

Figure 1- Marbled cheese processing

Table 1- Probiotic and conventional marbled: features and codes

Table 2- Physicochemical parameters of probiotic and conventional Marbled cheese

Table 3- Microbiological viable count of probiotic and starter bacteria of probiotic and conventional Marbled cheese

Table 4- Sensory acceptance of probiotic marbled cheese

2ºARTIGO

Figure 1- The Marbled Cheese

Figure 2- Consumer assessment about the appropriateness of acid taste (a) and texture (b) using 9- point just about right scale (1= extremely less, 5=just about right, 9= extremely more). See table 1 for coding samples

Figure 3- Relation between overall acceptability data and JAR deviation For Acid taste (a) and texture (b). See table 1 for coding samples

Table 1- Probiotic and conventional marbled: characteristics and codes

Table 2- Gross composition of probiotic and conventional marbled cheese

Table 3- Rheological parameters of Marmoreado cheese at different treatments estimated from uniaxial compression test.

Table 4- Sensory acceptance and purchase intent of probiotic and conventional marbled cheese

Table 5- Consumer penalty analysis of Just about Right (JAR) diagnostic attributes: percentages of consumers and mean drop for liking score of each JAR category

Table 6- Estimates, probability, and odds ratio estimates for predicting purchase intent of probiotic and conventional marbled cheese

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CLA- Ácido Linoleico Conjugado, do inglês “Conjugated Linoleic Acid”

DASH- Dietary Approaches to Stop Hypertension

FDA- Órgão Federal dos Estados Unidos que supervisiona Alimentos, Medicamentos e Cosméticos, do inglês “Food and Drug Administration”

JAR- Just About Right

LDL- Low-Density Lipoprotein

LR- Logistic Regression

NSLAB- Non-Starter Acid Lactic Bacteria

PA- Penalty Analysis

SLAB- Starter Acid Lactic Bacteria

RESUMO

Objetivou-se neste trabalho realizar a contagem, a viabilidade e a caracterização da cultura láctica (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris*) e da cultura probiótica (*Lactobacillus acidophilus*) usadas para o processamento do Queijo Marmoreado Doce, além de avaliar a aceitação sensorial e as características reológicas do queijo adicionado de culturas probióticas, bem como usando a metodologia da “penalty analysis”, com função de identificar direções para a melhoria de atributos sensoriais do produto perante aos consumidores. Os queijos foram elaborados a partir de quatro formulações: 1) Sem a adição de cultura láctica e probiótica; 2) Com a adição de cultura láctica; 3) com a adição de cultura probiótica; 4) Com a adição de cultura láctica e probiótica. As análises foram realizadas em duplicata, nos dias 0, 7, 15, 22 e 29. Foram realizadas determinações de acidez, pH, lactose, proteólise, ácidos graxos, composição centesimal, reologia; contagem e teste de viabilidade das culturas “starter” e probiótica. Observaram-se alterações em todos os parâmetros estudados no que diz respeito ao tempo de armazenagem e ao tipo de microrganismo utilizado ($p < 0,05$). Níveis baixos de lactose (0,86-0,98 g/100g) foram detectados nos queijos suplementados com culturas lácticas ou probióticos, depois de 29 dias de armazenamento, o que acrescenta valor ao produto uma vez que possibilita o consumo por indivíduos com intolerância à lactose. As contagens de *L. acidophilus* variaram de 7,59 a 12,66 log/g, mantendo-se estável ao longo de todo o armazenamento. Não foram encontradas alterações significativas ($p < 0,05$) dos atributos sensoriais analisados (aparência, aroma, sabor e textura). A adição das bactérias probióticas não influenciou as características físico-químicas, reológicas e a aceitação do produto. Contudo, o uso da escala do ideal (“Just About Right”) e análise de penalidades (“Penalty Analysis”) sugeriram que é possível aumentar a aceitação do produto pelos consumidores através da otimização do atributo gosto ácido, o que foi confirmado pela regressão logística (Logistic Regression”) que indicou o atributo gosto ácido da escala do ideal (JAR) em menor extensão à textura, como atributos que apresenta maior influência na intenção de compra do produto.

Palavras-chave: Probiótico, queijo e alimento funcional.

ABSTRACT

The objective of this work was to count, to test the viability and to characterize of lactic (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris*) and probiotic cultures (*Lactobacillus acidophilus*) used to process the Sweet Marbled Cheese, in addition to evaluate sensory acceptance and rheological characteristics of cheese supplemented with probiotic cultures as well as using the methodology of the "penalty analysis", which function to identify directions for improving the sensory attributes of the product before consumers. Cheese were elaborated using four formulations: 1) Without lactic and probiotic cultures; 2) With lactic culture; 3) With probiotic culture; 4) With lactic culture probiotic. Analysis were performed in duplicate, at 0, 7, 15, 22 and 29 days. It were tested acidity, pH, lactose, proteolysis, fatty acid composition, rheology, counting and viability test of probiotic and starter culture. Changes were observed in all studied parameters with respect to storage time and type of microbial strain ($p < 0.05$). low levels of lactose (0.86 – 0.98 g/100g) were detected in the cheeses supplemented with lactic or probiotics cultures after 29 days of storage, that adds value to the product and allows consumption by intolerant individuals. *L. acidophilus* counts ranged from 7.59 to 12.66 log/g, remaining stable for all storage period. No significant changes ($p < 0.05$) to any sensory attribute evaluated (appearance, aroma, taste, and texture) were noted by addition of probiotic culture. The addition of probiotic bacteria did not influence the physico-chemical, rheological and acceptance of the product. However, the use of just about right (JAR) scale and Penalty Analysis (PA) suggested that is possible to increase consumers product acceptance by reducing acidic taste attribute, which was confirmed by Logistic Regression (LR) indicated that the attribute JAR acid taste and texture to a lesser extent, as attributes that presents greater influence on the purchase intention of the product.

Keywords: Probiotic, cheese and functional food.

1 INTRODUÇÃO

A produção de leite fresco total mundial é de 702.137.249 toneladas, incluindo leite de vaca, búfala, cabra, ovelha e camelo, com destaque para a primeira espécie, com 583.401.740 litros. No ano de 2010, o Brasil se fixou como o quinto maior produtor de leite fluido do mundo, com 32.091.010 toneladas (EMBRAPA, 2012). Dessa totalidade de produção de leite de vaca, 36% são destinados à produção de queijos, sendo o Brasil o sexto maior produtor de queijos do mundo (CHALITA, 2010; EMBRAPA, 2012).

O mercado de queijos vem crescendo expressivamente a partir de 1994, ano do Plano Real, que gerou aumento do poder de compra do consumidor das classes mais baixas. Em 1994, o mercado cresceu 20,3% em relação ao ano anterior, passando de 206,6 mil toneladas em 1993 para 248,6 mil em 1994. Nos anos subsequentes (95 a 97), o mercado de queijos continuou apresentando índices de crescimento elevados, no entanto, a partir de 2000, com a queda no ritmo de crescimento da economia brasileira, as taxas de crescimento do mercado de queijos se mantiveram praticamente estáveis, num patamar em torno de 6% ao ano. Entre 2002 e 2006, esse mercado aumentou cerca de 20%, passando de 477.300 tons para 572.000 toneladas (SEBRAE, 2008).

O interesse por alimentos saudáveis, nutritivos e de grande aproveitamento tem crescido mundialmente, o que resulta em diversos estudos também na área de produtos lácteos. Nesse sentido, o uso dos alimentos como veículos de promoção do bem-estar e da saúde e, ao mesmo tempo, como redutor dos riscos de algumas doenças, tem incentivado as pesquisas de novos componentes naturais e o desenvolvimento de novos ingredientes, possibilitando a inovação em produtos alimentícios e a criação de novos nichos de mercado. A indústria de laticínios está reagindo para aumentar a competitividade no segmento de produtos funcionais, adaptando-se à tendência de transformações em um mercado consumidor exigente, que se modifica rapidamente, além de ter que manter a liderança tecnológica na indústria de alimentos.

Com base no incentivo de pesquisas relacionadas aos alimentos promotores de saúde, a utilização de bactérias probióticas na formulação de alimentos, tais como queijos e derivados lácteos, é uma inovação tecnológica de grande

importância para a saúde humana, pois possui inúmeros benefícios, embora seus efeitos para promoção da saúde dependam do número de células de microrganismos viáveis no alimento.

Considerando-se o exposto, objetivou-se nesta pesquisa realizar a contagem, a viabilidade e a caracterização da cultura láctica (“starter”) e da cultura probiótica usadas para o processamento do Queijo Marmoreado, além de avaliar a aceitação sensorial e as características reológicas do Queijo Marmoreado Doce adicionado de culturas probióticas. Por fim, objetivou-se ainda, valendo-se da metodologia da análise de penalidades, identificar direções para a melhoria de atributos sensoriais do produto perante aos consumidores.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTO TECNOLÓGICO BACTERIANO, FÍSICO-QUÍMICO E REOLÓGICO NA PRODUÇÃO DE QUEIJOS MATURADOS

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade de Queijos, Portaria nº. 146/1986 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, “entende - se por queijo, 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, de enzimas específicas, 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” (BRASIL, 2002).

A maturação dos queijos corresponde às fases de transformações físicas, químicas, microbiológicas e sensoriais, que se processam tanto na superfície quanto no interior do queijo, sob ação de enzimas lipolíticas e proteolíticas, grande parte de origem microbiana, sendo um fenômeno bastante complexo, pois varia de queijo para queijo (PERRY, 2004).

Na fabricação do queijo maturado, no que diz respeito ao aspecto tecnológico bacteriano, diversos microrganismos são empregados, divididos em bactérias lácticas adicionadas “Starter Acid Lactic Bacteria” (SLAB), constituídas por misturas indefinidas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris*, envolvidas principalmente na produção de ácido láctico da fermentação de lactose, além de contribuírem para a maturação do queijo, por meio do fornecimento de enzimas envolvidas na proteólise, bem como na conversão de aminoácidos em compostos de aroma (BERESFORD; WILLIAMS, 2004).

Diferente das “SLAB”, que são especialmente selecionadas e comercializadas por empresas internacionais, as bactérias lácticas não adicionadas, “Non-Starter Acid Lactic Bacteria” (NSLAB) são provenientes dos ambientes, da sobrevivência após a pasteurização e equipamentos dos laticínios, e podem desempenhar um papel importante na maturação dos queijos. Diversos trabalhos foram realizados com o intuito de isolar “NSLAB” de diferentes tipos de queijos e avaliar o seu

potencial de utilização como culturas adjuntas. Os seguintes resultados foram destacados: aceleração da proteólise, intensificação do aroma e/ou redução do aroma amargo dos queijos maturados (AWAD, AHMED, SODA, 2010; CAGNO, et al., 2011; HASHEMI, MAIN, MAZLUMI, 2009; PRATIBHA, 2010; SHEEHAN, WILKINSON, MCSWEENEY, 2008; SUDHIR, J. H. A.;). Settanni e Moschetti, 2010; Tellez, et al., 2010 também demonstram o potencial de determinadas “NSLAB” de fornecer benefícios à saúde.

Diversos mecanismos são utilizados para o monitoramento e viabilidade dessas bactérias lácticas no alimento. Em relação à metodologia tradicional, contagem de microrganismos em placas, existem diversas vantagens, como o baixo custo, alta disponibilidade de meio e praticidade, por ser uma análise de rotina. No entanto, essa metodologia possui uma desvantagem em relação à baixa capacidade de contagem discriminatória em relação a um alimento com mais de uma cultura simultânea, manifestando resultados de subestimação ou superestimação e a possibilidade de surgimento de colônias atípicas em placas (MORTAZAVIAN et al., 2007;. MORTAZAVIAN, SOHRABVAND, 2006; MCCARTNEY, 2005). Vários tipos de meios de cultura têm sido propostos para diferenciar e realizar contagem seletiva de bactérias probióticas, isoladamente ou em presença de outras culturas, tais como: MRS-maltose agar (TALWALKAR, KAILASAPATHY, 2004; LIM et al., 1995), MRS-salicina.agar agar e MRS-sorbitol (MORTAZAVIAN et al, 2007.;DAVE, SHAH, 1996; LANKAPUHRA, SHAH, 1996), MRS-LP agar (VINDEROLA; REINHEIMER, 1999), MRS-bile (KARIMI et al., 2012) e M17 (GOMES et al., 2011).

Em relação ao aspecto tecnológico físico-químico, a maturação influenciará, principalmente, a acidez e o pH, além da bioquímica relacionada aos compostos orgânicos, como a glicólise, a proteólise e a lipólise. Em geral, a acidez e o pH diminuem durante o processo de maturação, devido à metabolização da lactose em ácido láctico. As proteases microbianas, por exemplo, exibem atividade máxima em uma faixa de pH de 5,5-6,5, atuando diretamente na qualidade sensorial do produto (PERRY, 2004).

O processo de maturação atua diretamente nos componentes do queijo, e por reflexo, a textura, que é afetada por mudanças na microestrutura, estado físico-químico e força das interações entre esses componentes, influenciando a macroestrutura do queijo. Santos 2001 e Perry, 2004 relataram principalmente

modificações nas frações proteicas como fator primordial que se relaciona ao desenvolvimento da textura do queijo durante período de maturação. A textura é um fator importante na qualidade de muitos produtos lácteos, sendo atribuída aos alimentos como resultado da combinação das propriedades físicas e químicas, e percebida pelo sentido do tato, visão e audição. A textura pode ser avaliada por métodos sensoriais usando provadores treinados ou métodos instrumentais. A medida precisa, consistente e objetiva da textura tem valor inestimável no campo em que as técnicas de análise são empregadas tanto na monitoração do desenvolvimento do produto, quanto na identificação de problemas de processamento, tais como na falta de uniformidade da textura (SANTOS, 2001).

A reologia, ciência que estuda a deformação dos corpos, define a relação que existe entre um estresse que age sobre um determinado material e a deformação resultante como consequência. As propriedades reológicas são determinadas através de medição da força e deformação em função do tempo (TABILO-MUNIZAGA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005), examinadas como métodos de controle de qualidade em plantas processadoras de produtos lácteos e como técnica científica para cientistas de alimentos e reologistas em pesquisas relacionadas à estrutura ou textura dos alimentos (PARK, 2007). O conhecimento do comportamento reológico de um alimento é importante, pois está relacionado com várias etapas de industrialização, como engenharia de processos e controle de qualidade, além de estar diretamente associado com a estrutura e percepção sensorial do produto (RAMOS, 1997).

Na reologia existem alguns testes básicos para medir a deformação da massa dos alimentos, o teste de relaxação, de “creep” e compressão uniaxial. O teste de relaxação baseia-se na aplicação de uma deformação instantânea a um corpo e na manutenção dessa durante todo o período do teste. A forma como o corpo reage à tensão imposta é então monitorada em função do tempo. No caso de alimentos, é importante que a deformação aplicada seja suficientemente pequena para minimizar a ocorrência de alterações estruturais no material. Em contrapartida, no teste de “creep” a amostra é submetida a uma tensão deformante momentânea e a deformação resultante é monitorada em função do tempo. Ao contrário do teste de relaxação que a deformação relativa varia com o tempo, enquanto a tensão aplicada não sofre alteração. Em relação à compressão uniaxial, o teste tem o objetivo de

calcular a resistência da amostra baseado na tensão de ruptura da amostra em relação à deformação recebida (TRUONG, 2002).

2.2 ASPECTOS SENSORIAS APLICADOS NA INOVAÇÃO TECNOLÓGICA DE QUEIJOS

As indústrias de alimentos têm buscado identificar e atender aos anseios dos consumidores em relação aos produtos, pois só assim terão sucesso em um mercado cada vez mais competitivo. A análise sensorial é uma importante ferramenta nesse processo, envolvendo um conjunto de técnicas elaboradas com o intuito de avaliar um produto quanto à sua qualidade sensorial, em várias etapas do seu processo de fabricação (DELA LUCIA. 2008).

O desenvolvimento de novos produtos possui estreita relação com as tendências ou modas de consumo da massa consumidora, o que traz como consequência a necessidade de respostas rápidas das indústrias de alimentos às mudanças do mercado consumidor. A indústria de alimentos no Brasil nunca lançou no mercado tantos produtos novos como vem ocorrendo nos últimos anos. Em virtude de fatores como o desenvolvimento tecnológico, o crescimento da concorrência externa, o licenciamento de marcas importadas, competitividade do setor e da exigência do consumidor que incorporou novos valores às suas preferências por novos produtos (CERVANTES, 2010; MIGUEL, 2011).

A implantação de novos produtos requer que as análises dos alimentos intervenham nas diferentes etapas do ciclo de desenvolvimento dos mesmos, como na seleção e caracterização de matérias primas, na seleção do processo de elaboração, no estabelecimento das especificações das variáveis das diferentes etapas do processo, na otimização da formulação, na seleção dos sistemas de embalagem, nas condições de armazenamento e no estudo de validade comercial do produto final (ALBUQUERQUE et al., 2009; MIGUEL, 2011).

Um alimento, além de seu valor nutritivo e funcional, deve produzir satisfação e ser agradável ao consumidor, o que resulta do equilíbrio de diferentes parâmetros de qualidade sensorial. No desenvolvimento de um novo produto, é imprescindível aperfeiçoar parâmetros, como forma, cor, aparência, odor, sabor, textura, consistência e a interação dos diferentes componentes, com a finalidade de alcançar

um equilíbrio integral que se traduza em uma qualidade excelente e que seja de boa aceitabilidade (BARBOZA et al., 2003; CUNHA et al., 2009).

Os métodos sensoriais podem ser classificados em analíticos, que necessitam de equipe treinada para realizar a avaliação objetiva; e afetivos, no qual os avaliadores não precisam de treinamento e podem expressar suas opiniões pessoais ou preferências. Os testes analíticos são classificados em: a) teste de diferença: comparação pareada, triangular, duo-trio, ordenação e comparação múltipla e b) testes descritivos: perfil de sabor, perfil de textura e análise descritiva quantitativa. Os testes afetivos de preferência ou aceitação são classificados em: comparação pareada, ordenação, escala hedônica, escala do ideal e escala de atitude (CARVALHO et al., 2005; MARONÊZ, OLIVEIRA, 2011).

Os testes afetivos são usados para avaliar a preferência e/ou aceitação de produtos. Geralmente um grande número de julgadores, não treinados, selecionados para representar uma população alvo, é requerido para essas avaliações. Esses testes são uma importante ferramenta, por permitirem acessar diretamente a opinião do consumidor já estabelecido ou potencial de um produto, sobre características específicas do produto ou sugestões, por isso são também chamados de testes de consumidor. As principais funções dos testes afetivos são a manutenção da qualidade do produto, a otimização e/ou processos e desenvolvimento de novos alimentos. (CERVANTES, 2010).

Portanto, tornam-se necessários diversos métodos de análise sensorial para se introduzir um alimento novo, com sucesso, no mercado consumidor. Dentre os métodos importantes vale ressaltar a escala hedônica, escala do ideal e os testes de penalidades (“penalty analysis”) (ALBUQUERQUE et al., 2009; BARBOZA et al., 2003; CERVANTES, 2010).

A escala hedônica é um teste usado onde são relatados os estados agradáveis e desagradáveis no organismo. A avaliação da análise sensorial é convertida em escores numéricos, geralmente em escalas de sete a nove pontos, que possuem em seus extremos características muito favoráveis e extremamente desfavoráveis. Os dados coletados são analisados estatisticamente para determinar a diferença no grau de preferência entre amostras (BARBOZA et al., 2003).

A escala relativa do ideal (“just about right”), por sua vez, é utilizada para avaliar o nível de adequação de atributos como textura e sabor . Esse procedimento

permite determinar o quanto a amostra varia ou se aproxima da intensidade ideal do atributo (VILLEGAS et al., 2009). A escala possui pontos com termos opostos como, por exemplo, “muito fraco” e “muito forte” e, no centro da escala, o termo “ideal”, de tal forma que tenham números iguais de categoria de ambos os lados. A escala do ideal permite, dessa forma, avaliar a intensidade de um atributo em relação a um critério mental dos julgadores, não podendo ser analisada resposta média, já que as escalas podem ser desbalanceadas, conforme com as intensidades relativas e adequacidade de cada atributo na mente do consumidor. Após, recomenda-se calcular a porcentagem de respostas de cada categoria do atributo (IAL, 2004).

No teste de atitude e de consumo, o indivíduo expressa sua vontade em consumir, adquirir ou comprar, um produto que lhe é oferecido. A escala possui pontos com termos opostos como, por exemplo, “compraria sempre” e “nunca compraria” e deve possuir número balanceado de categorias entre o ponto intermediário e os extremos. Os dados são avaliados pela frequência através dos gráficos de histogramas (MORAIS, 2009).

Assim, o sucesso de um alimento no mercado comercial implica necessariamente na aceitação pelo mercado consumidor de suas características sensoriais e de segurança e de suas qualidades nutricionais. A fim de se obter um controle de qualidade do produto final, é essencial a realização do controle microbiológico, físico-químico e sensorial, com intuito de oferecer um alimento inovador, com características funcionais e sensoriais aceitas pelos consumidores (CRUZ et al., 2010; MORAIS, 2009).

2.3 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO QUEIJO

Alimentos funcionais são todos os alimentos ou bebidas que, consumidos na alimentação cotidiana, podem trazer benefícios fisiológicos específicos, graças à presença de ingredientes fisiologicamente saudáveis (CÂNDIDO; CAMPOS, 2005).

A concepção de alimentos funcionais foi lançada, no Japão na década de 80, por um programa de governo que tinha como objetivo desenvolver alimentos saudáveis para uma população que envelhecia e apresentava uma grande expectativa de vida (ANJO, 2004). Esse tipo de alimento deve apresentar propriedades benéficas, além das nutricionais básicas, presentes nos alimentos

comuns. Os alimentos funcionais são consumidos em dietas convencionais, mas devem possuir a capacidade de regular funções corporais de forma a auxiliar na proteção contra doenças como hipertensão, diabetes, câncer, osteoporose e coronariopatias (SOUZA, 2003).

Existem várias definições para alimentos funcionais, entretanto, segundo a “Food and Drug Administration” (FDA), os alimentos funcionais são regulamentados com base no uso que se pretende dar ao produto, na descrição presente nos rótulos ou nos ingredientes do produto. A partir desses critérios, na FDA, os alimentos funcionais foram classificados em cinco categorias: alimento, suplementos alimentares, alimento para usos dietéticos especiais, alimento-medicamento ou fármaco (NOONAN; NOONAN, 2004).

No Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, os alimentos funcionais foram definidos como aqueles relativos ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano (BRASIL, 2002).

Em relação ao produto lácteo estudado, o queijo é um produto concentrado feito a partir da coagulação do leite e consumido como parte da dieta humana, fundamental para fornecer uma nutrição adequada, rica em proteína de alta biodisponibilidade, cálcio, ácidos graxos insaturados e vitaminas (PINHO, FERREIRA, 2006). Além das funções nutricionais básicas, o queijo é um dos melhores alimentos para prevenir a hipertensão e osteoporose, alcançar e manter um peso saudável, no tratamento de doenças cardiovasculares como diabetes tipo 2 e síndrome metabólica (NATIONAL DAIRY COUNCIL, 2007) e anti-cariogênicos (LINKE, RIBA, 2001; MOYNIHAN, 1999).

Em relação à prevenção da hipertensão arterial, verifica-se que o cálcio juntamente com os outros nutrientes do queijo como o potássio, magnésio, vitamina D e proteínas tem um importante papel no controle da pressão arterial. Conforme Appel, 1997, em relação a dieta “Dietary Approaches to Stop Hypertension” (DASH), realizada pelo governo americano, foi mostrado que uma dieta pobre em gordura associada a um consumo de alimentos lácteos com teor de gordura reduzido (3 porções diárias) e ao consumo de frutas e vegetais (8 a 10 porções diárias) tem como resultado uma maior redução da pressão arterial do que uma dieta rica em frutas e vegetais somente.

Além dos benefícios descritos, os queijos auxiliam, ainda, na perda e controle do peso, o que se deve ao papel realizado pelo cálcio nesse processo. Segundo Cummings et al., 2006; Teegarden, 2005, demonstraram que o cálcio atua gerando um maior gasto energético através de um controle hormonal e aumento da oxidação de lipídios. O cálcio também atua diminuindo a absorção dos ácidos graxos no intestino através da formação de sais de cálcio e aumento da saciedade.

Outra virtude do queijo está no importante conteúdo de “Conjugated Linoleic Acid” (CLA), ácido linoleico conjugado, presente na gordura dos queijos produzidos a partir do leite de vaca. Conforme resultados obtidos por Junior et al., 2011, foram verificados que o CLA auxiliou na prevenção da aterosclerose com a diminuição do colesterol total e do LDL; teve ação contra certos tipos de câncer como de mama, próstata e estômago, inibindo o crescimento das células cancerígenas e tumores malignos; diminuiu a resistência à insulina, auxiliando no tratamento do Diabetes tipo 2, e também auxiliou no fortalecimento do sistema imunológico.

O consumo de três porções diárias de queijos, leite e derivados lácteos, juntamente com uma alimentação equilibrada é importante não somente para fornecer os nutrientes de que o corpo precisa, mas também gerar diversos benefícios para a saúde. Além disso, deve-se, dar preferência também para os produtos lácteos com baixo teor de gordura ou desnatados (NATIONAL DAIRY COUNCIL, 2007).

A nutrição otimizada, regida no sentido de maximizar as funções fisiológicas de cada indivíduo, de maneira a assegurar tanto o bem-estar quanto a saúde, como também o risco mínimo de desenvolvimento de doenças ao longo da vida, é considerada como alimentação funcional. Devido ao fato de que os consumidores estão cada vez mais preocupados com a saúde, os alimentos funcionais constituem-se hoje, como prioridade de pesquisa em todo o mundo, com a finalidade de elucidar as propriedades e os efeitos benéficos que esses produtos podem proporcionar à saúde e ao bem-estar (BELCHIOR, 2004).

2.4 QUEIJO COMO ALIMENTO PROBIÓTICO

Diversas tecnologias são aplicadas para a promoção da saúde, como a adição de microrganismos probióticos na ingestão diária. A importância da microbiota intestinal para a saúde é cada vez mais reconhecida e as bactérias probióticas, quando fazem parte dessa microbiota em proporção adequada, participam ativamente do ambiente do intestino, realizando atividades benéficas importantes. São geralmente lactobacilos e bifidobactérias que combatem as bactérias patogênicas que atingem o trato intestinal, prevenindo ou reduzindo a ocorrência de patologias gastrointestinais, modulam a imunidade no intestino, além de auxiliar na digestão da lactose (SANTOS, 2010).

Os probióticos são microrganismos vivos, que, se administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (SANDERS, 2003; WHO, 2001). A influência benéfica dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana inclui fatores como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, resultando em um aumento da resistência contra patógenos, além de serem eficazes no tratamento de infecções respiratórias, sintomas alérgicos (WOHLGEMUTH et al., 2010) e auxiliarem a reduzir o colesterol no sangue (SHAH, 2007). Assim, a utilização de culturas bacterianas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002).

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 desbalanceada constitui a racionalidade da terapia por probióticos (ISOLAURI et al., 2004). A influência benéfica dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana inclui fatores como os efeitos antagônicos e a competição contra microrganismos 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 et al., 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 et al., 2002).

Os benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos à ingestão de culturas probióticas que mais se destacam são: controle da microbiota intestinal; estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; promoção da resistência gastrintestinal à colonização por patógenos; diminuição da população de patógenos através da produção de ácidos acético e láctico, de bacteriocinas e de outros compostos antimicrobianos; promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose; estimulação do sistema imune; alívio da constipação; aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas. Embora ainda não comprovados, outros efeitos atribuídos a essas culturas são a diminuição do risco de câncer de cólon e de doença cardiovascular. São sugeridos, também, os efeitos de diminuição das concentrações plasmáticas de colesterol, efeitos anti-hipertensivos, redução da atividade ulcerativa de *Helicobacter pylori*, controle da colite induzida por rotavírus e por *Clostridium difficile*, prevenção de infecções urogenitais, além de efeitos inibitórios sobre a mutagenicidade (CHARTERIS et al., 1998; JELEN, LUTZ, 1998; KAUR et al., 2002; KLAENHAMMER, 2001; SHAH, 2007; TUOHY et al., 2003).

Conforme resultados obtidos por Lollo et al., 2012, realizados com ratos de laboratório, relataram que a ingestão de queijos com probióticos podem ser uma alternativa viável para aumentar o sistema imune e prevenir infecções após esforços físicos exagerados. O objetivo dos estudos foi avaliar o efeito no sistema imune de ratos, alimentados com queijo adicionado de probiótico, após exercícios físicos intensos e agudos. Os exercícios reduziram as contagens dos linfócitos, mas, em ratos alimentados com queijos probióticos, a redução foi de 22% comparada com a redução em ratos alimentados com queijo comum, que foi de 48%.

Os queijos são particularmente interessantes como alimentos carreadores de bactérias probióticas para o organismo humano, por serem produtos sólidos, de baixa acidez e alto teor de proteínas e gordura, que favorecem a sobrevivência dessas bactérias no período de estocagem, e as protegem durante a passagem pelo trato gastrintestinal, contribuindo para que cheguem viáveis no intestino. Uma fatia

de queijo, com cerca de 30g, é suficiente para fornecer a quantidade diária de probióticos necessária (CRUZ et al., 2009; SANTOS, 2010).

Além das características intrínsecas do produto lácteo, as culturas probióticas com adequada propriedade tecnológica possuem grande impacto da qualidade final do queijo, pois devem apresentar boa multiplicação no leite, promover propriedades sensoriais adequadas no produto e serem estáveis e viáveis durante o armazenamento. Dessa forma, podem ser manipuladas e incorporadas no produto alimentício sem perder a viabilidade e a funcionalidade, resultando em produtos com textura e aroma adequados (BURITI; SAAD, 2007).

Os probióticos utilizados em alimentos devem crescer e sobreviver aos processos de elaboração, maturação e estocagem do produto, bem como não afetar negativamente a qualidade do queijo e ser seguro à saúde do consumidor (ZALAZAR, 2004). A viabilidade das bactérias probióticas, ou seja, o número de bactérias vivas e ativas por porção de alimentos, no momento do consumo, é um dos grandes pontos críticos para esses alimentos funcionais, determinante para a sua eficácia (SOHRABVANDI; MORTAZAVIAN, 2012).

Diversos tipos de queijo foram testados como veículos para cepas probióticas de *Lactobacillus* spp e de *Bifidobacterium* spp, foram considerados apropriados, entre os quais, o queijo Minas-Frescal (BURITI et al., 2005a; BURITI et al. 2005b; SOUZA, SAAD, 2009; FRITZEN-FREIRE et al., 2010; GOMES et al., 2011), Fresco Argentino (VINDEROLA et al., 2000), Pategrás (PEROTTI et al., 2009), soro de queijo (MADUREIRA et al., 2011), queijo Cheddar (ONG, SHAH, 2009; WANG et al., 2010; SCHELLER et al., 2011), Ras (ABD EL-SALAM et al., 2011), queijo Turco de ovelha (ALBENZIO et al., 2010), massa filada (MINERVINI et al., 2012), Feta ultrafiltrado (KARIMI et al., 2012), Akami (AYYASH et al., 2012) queijo branco Iraniano (ZOMORODI et al., 2011; MIRZAEI et al., 2012) e Panela (ESCOBAR et al., 2012). Todos com resultados satisfatórios em relação à viabilidade probiótica ao longo da validade comercial do produto.

Na Agência Nacional de Vigilância Sanitária foram regulamentados os produtos com característica probiótica, os quais devam conter no mínimo, cem milhões de microrganismos probióticos vivos por porção do alimento em um consumo diário. Essa concentração deve ser mantida até o final da validade comercial do alimento. Assim, se esses produtos forem consumidos regularmente e

em quantidades adequadas, as bactérias probióticas passam a fazer parte da microbiota intestinal e os benefícios à saúde podem ser sentidos pelo consumidor (BRASIL, 2002).

O derivado lácteo estudado, o queijo Marmoreado, é um produto lácteo de massa semicozida, obtido por coagulação enzimática do leite pasteurizado integral, semi-desnatado ou desnatado, adicionado de probiótico e de doce de leite, prensado e maturado por, pelo menos, 15 dias, a uma temperatura de 10 a 12°C e umidade relativa do ar de 88%, além de possuir teor final de lactose de, aproximadamente, 0%. Sensorialmente, o referido queijo possui textura macia, superfície externa com coloração caramelizada e parte interna com cor levemente caramelizada, ambas com característica marmoreada. Possui aroma agradável, remetendo ao doce de leite, sendo, ainda, levemente ácido e adocicado.

3 DESENVOLVIMENTO

Os trabalhos a seguir estão formatados conforme as normas das revistas às quais foram submetidos.

3.1 MARBLED CHEESE SUPPLEMENTED WITH PROBIOTIC BACTERIA: VIABILITY, ACTIVITY AND SENSORY ACCEPTANCE (TRABALHO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA JOURNAL OF DAIRY SCIENCE)

Marbled cheese supplemented with
probiotic bacteria: viability, activity and sensory acceptance

E.B. Nogueira¹, A.G. Cruz^{1,2}, R.M. Franco¹, M.A. S. Cortez⁴

¹ Universidade Federal Fluminense (UFF), Faculdade de Medicina Veterinária, 24230-340, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PGCTA), 20270-021, Rio de Janeiro, Brazil.

.

* Tel: 55-21-26299517 - Email: macortez@vm.uff.br

ABSTRACT

The viability, activity of probiotic bacteria at the Marbled cheese as well as the sensory acceptance was investigated. Marbled cheeses were produced with/without starter culture and probiotic bacteria (*Lactobacillus acidophilus* LC-05). The cheese samples were submitted to physic-chemical analysis (pH, proteolysis), microbiological analysis (probiotic and lactic bacteria count) as well as the activity culture (lactic acid, acetic and lactose counts) at days 1, 7, 15, 22 and 29 storage days. Changes were observed in all studied parameters with respect to storage time ($p < 0.05$), and a clear trend was observed with regard to the microbial strain used to manufacture the cheese. In particular, low lactose levels (0.86 – 0.98 g/100g) were detected in the cheeses supplemented with lactic cultures or probiotics after 29 days of storage, and this may add value to the product once lactose-intolerant people may consume the product. *L. acidophilus* counts ranged from 7.59 to 12.662 log/g, remaining stable along the storage all. Absence of significant changes ($p < 0.05$) in any sensory attribute evaluated (appearance, aroma, taste, and texture) was noted by addition of probiotic culture. Marbled cheese seemed to be one possible option for the addition of probiotic bacteria, representing a new option at the option at the probiotic cheese market with advantage to be consumed by special group, as lactose intolerant people.

Key-word: Marbled cheese, probiotic bacteria.

INTRODUCTION

Probiotics are viable microorganisms, which when administered in adequate amounts confer a health benefit to the host (FAO/WHO, 2002). The industry is interested in probiotic strains from the *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genus (Botina, 2010). Complex food matrices such as cheeses are suitable and well established in scientific audience and present a high acceptance by consumers (Karimi et al., 2011).

The Marbled cheese can represent a new option in the cheese market. It is a semi-hard cheese, ripened, and slightly acidic. It is added with *dulce de leche* (milk-based sweet paste), pressed and cured for at least 15 days at a temperature from 10 to 12° C and relative humidity of 88%. This cheese has a firm texture, with an overall marbled characteristic due to *dulce de leche* and an internal and external caramelized aspect, presenting a pleasant and soft flavor.

To achieve success in launching new food products in the marketplace, it is essential to deploy continuous renewals and test new ingredients, optimize the physicochemical and nutritional aspects as well as to improve the product's acceptance (Granato et al., 2010a). Herein, the development of alternative products, such as the Marbled cheese, may be an option for cheese consumers. Furthermore, the addition of probiotic microorganisms in Marbled cheese can add value to the product and increase the availability of functional sweet cheeses, such as "Petit Suisse" (Cardarelli et. al. 2,008; Pereira et. al. 2,010; Santos et al, 2012).

However, the addition of probiotic bacteria into food products such as cheeses should be performed considering the following: the strains should survive and be stable through the cheese processing, maturation and storage, as well as not

negatively affect the sensory quality of the product, and finally, to be safe to consumer health (Zalazar, 2004). Therefore, this research was aimed to evaluate the viability and the activity of probiotic bacteria added to Marbled cheese along the processing and cold storage. In addition, a sensory acceptance test was also carried out.

MATERIAL AND METHODS

Marbled Cheese Processing

Whole pasteurized milk (3.0 % fat, Vitallete, Valença, Rio de Janeiro, Brazil) was used to manufacture the cheese samples. The milk was heated up to 35 °C and then the following ingredients were added: calcium chloride (CaCl₂, CAP-LAB, São Paulo, São Paulo, Brazil) at 40% in the proportion of 300 ml per 1,000 liters of fluid milk, aromatic lactic culture (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, R704, CHR HANSEN, Valinhos, São Paulo, Brazil), at a concentration of 25 g/500 L of fluid milk (6 log CFU/g), Probiotic culture (*Lactobacillus acidophilus* LC-05, CHR HANSEN, Valinhos, São Paulo, Brazil) at a concentration of 25 g/250 L of fluid milk (7 log CFU/g) and Coagulant enzyme (HALA®, CHR HANSEN, Valinhos, São Paulo, Brazil) at a concentration of 10 ml/10 L of fluid milk. The milk was left to rest for 40 minutes and the resulted curd was cut with a cheese wire knife to cubes shaped grains of 0.7 cm³. After 2 minutes of resting, the curd was softly stirred for 20 min at 32°C to increase the hardness of the grain. Thereafter, there was a second stirring (40 min at 40 °C), in order to reduce the grain moisture. Approximately 30% of cheese whey was drained and the same volume of pre-heated water (40 °C) was added to the product to reduce the lactose content. After a partial removal of whey, the salting process was performed using sodium

chloride (NaCl, Cisne, São Paulo, Brazil) at a ratio of 0.7% w/w of curd. To obtain the marbled characteristic, a 10% w/w of *dulce de leche* was added to the curd and gently manipulated to keep the grain structure. Also, a caramel essence (0.06% w/w relative to curd, Toffel, Arcor, São Paulo) was added to the product in order to intensify the flavor. The curd was placed into plastic former and pressed during 3 hours, being turned in hourly intervals. Finally, the cheese was ripened for 29 days at 10-12 °C and humidity of 88%.

Storage and sampling days

The cheese samples were submitted to physico-chemical analysis (pH, proteolysis), microbiological analysis (probiotic and lactic bacteria count) as well as the activity culture (lactic acid, acetic and lactose counts). The analysis were performed in duplicated at days 1, 7, 15, 22 and 29 storage days. Four treatments were conducted: (I) Marbled Cheese without added starter culture and probiotic culture, (II) Marbled Cheese added with starter culture; (III) Marbled Cheese added with probiotic culture and (IV) Marbled Cheese added with starter culture and probiotic culture. The table 1 reports the characteristics and code of probiotic and conventional cheeses.

Physico-chemical analysis

The pH values were determined using a digital pH meter (Micronal, B-375) by direct insertion of the electrode into the sample (Marshall, 1993). The proteolysis extent was quantified by measuring the amino acids and peptides produced by the lactic and probiotic cultures, using a reactive solution (OPA). The proteolytic extent was expressed as the absorbance of the OPA derivatives at 340 nm (Massuda et al., 2005). The organic acids and the sugar content (lactic, acetic acids and lactose) and

were determined using high performance liquid chromatography (HPLC) using an Aminex X-87H column (300 mm x 7.8 mm, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) (Ong et al., 2006).

Lactic and Probiotic bacteria count

For the microbiological analyses, a total of 25 g of cheese was transferred into a stomacher containing 225 mL of sterile 0.1% w/v peptone water (Oxoid, São Paulo, Brazil). The subsequent dilutions up to 10^{-12} were obtained adding 100 microliters of this freshly prepared dilution to 900 microliters of SSP 0.1%, according to the miniaturization technique (Martinez et al., 2011).

The starter lactococci were enumerated on M17 agar (Oxoid, São Paulo, Brazil) and incubated under aerobic conditions at 30°C for 72 hours (Gomes et al., 2011), whereas the *Lactobacillus acidophilus* LA-5 count was enumerated using 0.15% w/v bile salts MRS agar (Oxoid, São Paulo, Brazil), at 37°C for 72 h under aerobic conditions (Karimi et al., 2012a).

Consumer test

Fifty cheese consumers were recruited at random from the Fluminense Federal University (Niteroi, Rio de Janeiro, Brasil) to take part in the study. The criterion for selection was the absence of allergic reactions to milk. For sensory evaluation, all the 4 four marbled cheeses were evaluated. The cheese samples were removed from the refrigerator, cut into pieces (about 1.5 × 1.5 × 1.5 cm), and placed on white plates coded with random 3-digit numbers 1 h before evaluation at room temperature (25°C). The consumers were instructed to evaluate the cheese with respect to the degree of liking of the appearance, aroma, flavor, texture, and overall impression using a 9-point hybrid hedonic scale (1 = disliked immensely, 9 = liked

immensely; Cruz et al., 2012). The first-order and carry-over effects were balanced using a specific design, and the samples were presented monadically (MacFie et al., 1989)

Statistical analysis

Analysis of variance for repeated measures was used for physico-chemical and microbiological treatment data using the XLSTAT for Windows 2012 (Adinsoft, Paris, France). Probiotic cheese was the treatment between subjects and repeated measure was carried out at 5 different day points. Analysis of variance for repeated measures was performed. The effect of replication was blocked to avoid the variations for each replicate. The Turkey test was used to determine the significance differences considering $p < 0.05$ over all comparisons (Shrestha et al., 2011). Towards the consumer test a 2-way ANOVA (consumers \times samples) followed by Tukey's test was carried out.

RESULTS AND DISCUSSION

Physicochemical analysis

Table 2 shows the evolution of the physicochemical characteristics of the probiotic and conventional Marbled cheeses along storage. Changes were observed in all studied parameters with respect to storage time ($p < 0.05$), and a clear trend was observed with regard to the microbial strain used to manufacture the cheese. The pH values decreased and this may have been due to the cheese type and storage time, and a slower decrease rate was observed in cheese I (5.36) as

compared to the other samples (pH 5.12, 5.08 and 5.14, respectively, $p < 0.05$) after 29 days of storage. It is noteworthy that the cheese I, which had no probiotic strain, also presented a lower pH value, which may be related to the existence and growth of non-pathogenic adventitious bacteria (NSLAB). This group of bacteria is usually composed by homofermentative lactobacilli and pediococci, and comes from the production environment, and may have a direct influence on the formation of aroma compounds present in cheeses (Settanni, Moschetti, 2010) and poses challenges to the counting of probiotics (Oberg et al., 2011).

A similar trend was observed for proteolysis, sugar consumption and lactic acid production, suggesting that the microorganism used to manufacture the Mabled cheese did not have a significant effect on those quality parameters. Generally, a higher proteolysis and lactose consumption as well as higher lactic acid production was observed in cheese IV (added with probiotics and lactic culture), cheese II (added with starter culture added), and cheese III (added with *L. acidophilus*), where cheese I presented the lowest mean values for all these parameters. This suggests that there is a synergy between the starter lactic culture and the probiotic strain combined with a higher availability of lactose used in the manufacture of Marbled cheese (Gomes and Malcata, 1999), which justifies the increasingly high levels of lactic acid in cheese IV in comparison to the other cheeses (2.01 versus 1.41, 1.82, 1.85 g/100 respectively). In fact, although probiotic bacteria have limited proteolytic capacity (Shah, 2000), this behavior depends on the strain, and *L. acidophilus* has shown good performance against this parameter in comparison to the strains of bifidobacteria (Shiata and Shah, 2000), which may also help to understand the results.

Low lactose levels (0.86 – 0.98 g/100g) were detected in the cheeses supplemented with lactic cultures or probiotics after 29 days of storage, and this may add value to the product once lactose-intolerant people may consume the product. In Brazil, for example, around 70% of Brazilian adults present any degree of lactose-intolerance, and the product may be a suitable option for those people (Granato et al., 2010b)

Acetic acid was not detected in the samples throughout storage, which is consistent with the metabolism of homofermentative *L. acidophilus* (Gomes and Malcata, 1998). However, we emphasize that these results are closely related to the strain used in this study and some other researchers have already observed the production of acetic acid in Minas fresh cheese supplemented with increasing levels of *L. acidophilus* (Gomes et al., 2011). The strain used by these authors was not the same we used in this work.

Overall, the results in this study indicate a considerable variation of physicochemical parameters of Marbled cheese along ripening process: the synergy between the lactic and the probiotic strains resulted in an increase of all parameters evaluated, and when the probiotic strain was the only culture used to manufacture the cheese, the metabolic activity of the probiotic strain was similar to that of the starter culture. Research regarding bioactive peptides (Madureira et al., 2011) and aroma compounds should be the focus of future studies to better understand this issue (Milesi et al., 2010), and also to determine more precisely the effect of NSLAB on physicochemical and aromatic composition of marbled cheese as compared to other cheeses.

Lactic and Probiotic bacteria count

Table 3 shows microbiological counts of probiotic and conventional marbled cheeses during the ripening process. Although cheese type and storage period influenced the growing of *L. acidophilus*, high counts were observed in all samples, regardless of the strain. Throughout experimental period, *L. acidophilus* counts were significantly higher at treatments with addition of these microorganisms (III and IV). Also, *L. acidophilus* counts were gradually increasing over time, indicating that the cheese was an excellent environment to the development and proliferation of the microorganism. The counts of *L. lactis* remained stable (approximately 12 log CFU / g) for all cheeses during 29 days of ripening, whereas *L. acidophilus* counts ranged from 2.40 (day1, cheese I) to 4.79 log CFU / g; 2.60 (day 1, cheese II) to 3.77 log CFU / g; 7.59 (day 1, cheese III) to 11.00 log CFU / g and 8.30 (day 1, cheese IV) to 12.23 log CFU / g, showing statistically significant differences ($P > 0.05$) between the days of analysis. An increase of three logarithmic cycles in *L. acidophilus* counts was observed to all analyzed cheeses, mainly among first and 7th days, which may be related to consumption of residual lactose present in cheeses or a synergy behavior between a lactic culture and probiotic strain. Similar results were observed for *S.thermophilus* and *L. acidophilus* in Minas Frescal cheese (Buriti et al., 2007). The bacteria count in cheeses I and II is related to the non-starter lactic acid bacteria (NSLAB). The "NSLAB" might be originate from the environment or industry equipment, being able to survive pasteurization and then presenting effects on the cheese during the ripening period. Regards to high count *L. lactis*, it has being proved a low selectivity of M17 medium, permitting the development of a high percentage of non-lactic bacteria (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Weissela*) (Pots, 2007) and other lactic acid bacteria

(Beresford, 2001; Borelli, 2006; Nobrega, 2007). Several studies were performed in order to isolate "NSLABs" from different types of cheese and to evaluate its potential for use as adjunct cultures. Among results, it were highlighted: acceleration of proteolysis, intensifying the flavor and reducing bitter aroma of ripening cheeses (Cagno, et. al., 2011; Awad; Ahmed; Soda, 2010; Sudhir, JHA; Pratibha, 2010; Hashemi , Main, Mazlumi, 2009; Sheehan, Wilkinson, McSweeney, 2008). Evidences also suggest a potential of certain "NSLAB" to provide health benefits (Settanni, Moschetti, 2010; Tellez, et al., 2010)

The results suggest that Marbled cheese is an excellent carrier of probiotic bacteria, even though it goes through a short period of maturation, which is considered an additional problem for the stability of the probiotic culture due to biochemical changes that occur inside the cheese environment: decrease in water activity and pH, thus creating a hostile and stressful environment for the adjunct cultures (Cruz et al., 2009). Additionally, the Marbled cheese presented a higher s viability and maintenance of probiotic cultures when compared to other typical Brazilian cheeses such as Minas fresh cheese (Buriti et al., 2005) and Prato cheese (Cichoski et. al. 2008), and other types of cheeses consumed worldwide, such as Fior di Latte cheese (Minervini et al., 2012), Iranian ultrafiltered Feta cheese (Karimi et al., 2012b), Panella cheese (Escobar et al., 2012), Akawi cheese (Ayyash et al., 2012), Caciotta" cheese, "Pecorino" cheese, "Büscion" Swiss cheese (Coman et al., 2012) and cream cheese (Alves et al., 2013). Therefore, our findings are comparable with those of commercial yogurts and fermented milks available in the market, that is, the cheeses present a total of 11 billion viable cells. Considering a daily intake of a portion (30g) of Marbled cheese, which is set for labeling purposes in Brazilian law, there is a total of 10^{14} CFU/g, which is above the value set to add value

to the beneficial consumer health - 6 log CFU / g, offsetting losses along the gastrointestinal tract (Granato et al., 2010c).

Further studies should test the functionality of the probiotic cultures added to Marble cheese (Ortakci et al. 2012) and *in vivo* studies using animal models (Lollo et al., 2012) and humans (Songisepp et al. 2012) should be performed to assess the health benefits and safety issues.

Consumer test

Table 3 shows the mean scores obtained in the sensory acceptance test of the Marbled cheese samples. The addition of probiotic microorganisms in Marbled cheese did not cause significant changes ($p < 0.05$) in any sensory attribute evaluated (appearance, aroma, taste, and texture) and the scores ranged from 5.00 (neither liked, neither disliked) and 6 (I liked slightly) when the 9-point hedonic scale was used. A similar behavior was observed for overall acceptance, which ranged from 6.52 (IV) to 5.96 (II).

The success of a probiotic product is linked to consumer perceptions and the product's sensory properties throughout its commercial shelf life (Drake and Drake, 2011). Indeed, besides the viability of probiotics in cheese, the incorporation of probiotic bacteria should not affect the expected sensory characteristics (flavor, texture, and appearance) of conventional (non-probiotic) cheeses (Cruz et al., 2010). Cheese added with probiotic bacteria should at least maintain and display similar flavor attributes as compared to the traditional cheese. It is known that the impact of probiotic bacteria on flavor characteristics of cheese is mainly dependent on the species and strains added and also on the metabolic activity of the strains during cheese production and storage. The metabolites produced by probiotic strains may

enhance the bitter taste, affect the cheese texture as well as produce substances that can depreciate the product's taste (Karimi et al., 2012c).

In this sense, our results are broadly favorable to the production of Marbled cheese added with probiotic bacteria without prejudice its commercial quality. Reinforcing the idea of previous work with fresh cheese (Fritzen-Freire et al., 2010), the addition of probiotics in Marbled cheese does not result in modification of the product's sensory attributes, although all treatments showed an increased production of lactic acid; however, this was not detected by consumers. Similar results were observed in the processing of cheese whey using *L. casei* and *B. animalis* (Madureira et al., 2011).

Future studies should assess the use of descriptive sensory tests (Santillo et al., 2012; Wadhvani and McMahon, 2012) in order to establish the sensory profile of Marbled cheese and then optimize the formulation. It is important to note that marketing campaigns are needed to disclosure cheese as a carrier of probiotic bacteria, once it is much easier to consume a piece (30 g) of cheese as compared to the consumption of fermented milks (100-200 ml).

CONCLUSION

The development of cheeses supplemented with probiotic bacteria may be a suitable option for dairy industries that wish to diversify their products in an increasingly competitive consumer market. In this sense, Marbled cheese seemed to be one possible option for the addition of probiotic bacteria, regardless of the addition of the starter culture in co-culture with the probiotic or solely the addition of probiotic culture. In fact, a constant and adequate viability of *L. acidophilus* was observed throughout 29 days of storage, which led to the production of organic metabolites

and proteolysis, in addition to providing a low level of lactose that can be considered another advantage of consuming this cheese. In view of economic considerations for manufacturers, the latter option seems more advantageous once no decrease of sensory quality was observed.

Future studies should evaluate the metabolism of other probiotic cultures added to Marbled cheese as well as to use and assess the effects of direct acidification on the product's quality parameters. Additionally, the establishment of the sensory profile of the product, functionality as well as identification of bioactive peptides and aroma compounds must also be evaluated for better optimization of its formulation.

Table 1. Probiotic and conventional marbled: features and codes

Cheeses	Features*	Code
Standard cheese	Without lactic and probiotic bacteria	I
Conventional cheese	<i>L. lactis</i> (6 log CFU/g), without probiotic bacteria	II
Probiotic cheese 1	<i>L. acidophilus</i> (6 log CFU/g), without lactic bacteria	III
Probiotic cheese 2	<i>L. acidophilus</i> and <i>L. lactis</i> (each 6 log CFU/g)	IV

Table 2. Physicochemical parameters of probiotic and conventional Marbled cheese

Days	Cheese	pH	Proteolysis	Lactose (g/100g)	Lactic acid (g/100g)	Acetic acid (g/100g)
1	I	6.71 ^{aA}	-----	2.51 ^{aA}	-----	-----
1	II	5.84 ^{dC}	0.489 ^{bB}	2.45 ^{aA}	1.35 ^{bB}	-----
1	III	6.61 ^{bA}	0.324 ^{cC}	2.55 ^{aA}	1.56 ^{aA}	-----
1	IV	5.93 ^{cB}	0.512 ^{AA}	2.38 ^{aA}	1.24 ^{cC}	-----
7	I	5.73 ^{aA}	0.103 ^{dD}	2.54 ^{aA}	1.12 ^{cC}	-----
7	II	5.19 ^{cC}	0.525 ^{bB}	1.66 ^{cC}	1.46 ^{aA}	-----
7	III	5.23 ^{bB}	0.378 ^{cC}	1.93 ^{bB}	1.13 ^{bB}	-----
7	IV	5.22 ^{bB}	0.628 ^{aA}	1.33 ^{dD}	1.58 ^{aA}	-----
14	I	5.44 ^{aA}	0.129 ^{dD}	2.49 ^{aA}	1.13 ^{dD}	-----
14	II	5.14 ^{bA}	0.599 ^{bB}	1.32 ^{cC}	1.46 ^{bB}	-----
14	III	5.13 ^{bA}	0.469 ^{cC}	1.54 ^{bB}	1.13 ^{cC}	-----
14	IV	5.14 ^{bA}	0.693 ^{aA}	1.16 ^{dD}	1.46 ^{aA}	-----
22	I	5.41 ^{aA}	0.188 ^{dD}	2.38 ^{aA}	1.23 ^{dD}	-----
22	II	5.14 ^{bC}	0.625 ^{bB}	1.12 ^{cC}	1.62 ^{cC}	-----
22	III	5.12 ^{bB}	0.499 ^{cC}	1.17 ^{bB}	1.75 ^{bB}	-----
22	IV	5.15 ^{bB}	0.726 ^{aA}	0.99 ^{dD}	1.87 ^{eA}	-----
29	I	5.36 ^{aA}	0.240 ^{dD}	2.29 ^{aA}	1.41 ^{cC}	-----
29	II	5.12 ^{bB}	0.697 ^{bB}	0.98 ^{cC}	1.82 ^{bB}	-----
29	III	5.08 ^{bB}	0.563 ^{cC}	1.07 ^{bB}	1.85 ^{bB}	-----
29	IV	5.14 ^{bB}	0.764 ^{aA}	0.86 ^{dD}	2.01 ^{aA}	-----

* Analysis performed in duplicate. Different lowercase in the same column indicate presence of statistical difference ($p < 0.05$) among treatments (cheeses). Different capital letters in the same column indicate presence of statistical difference ($p < 0.05$) along the storage days. Proteolysis is expressed in absorbance₃₄₀. ----: not detected. I,II,III,IV= see text.

Table 3. Microbiological viable count of probiotic and starter bacteria of probiotic and conventional Marbled cheese

Days	Cheese	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
1	I	12.38 ^{aA}	2.30 ^{cC}
1	II	12.62 ^{aA}	2.60 ^{cC}
1	III	11.90 ^{aA}	7.59 ^{bB}
1	IV	12.66 ^{aA}	8.30 ^{aA}
7	I	12.47 ^{aA}	4.79 ^{cC}
7	II	12.96 ^{aA}	3.77 ^{dD}
7	III	12.46 ^{aA}	11.00 ^{bB}
7	IV	12.77 ^{aA}	12.39 ^{aA}
15	I	11.71 ^{aA}	4.57 ^{cC}
15	II	12.71 ^{aA}	4.77 ^{dD}
15	III	11.85 ^{aA}	11.86 ^{bB}
15	IV	12.93 ^{aA}	12.62 ^{aA}
22	I	12.47 ^{aA}	5.00 ^{cC}
22	II	12.76 ^{aA}	4.65 ^{dD}
22	III	12.47 ^{aA}	11.00 ^{bB}
22	IV	12.96 ^{aA}	12.59 ^{aA}
29	I	12.00 ^{aA}	4.79 ^{cC}
29	II	12.21 ^{aA}	3.77 ^{dD}
29	III	12.30 ^{aA}	11.00 ^{bB}
29	IV	12.48 ^{aA}	12.23 ^{aA}

* Microbiological analysis is expressed in log CFU/g of cheese. Analysis performed in duplicate. Different lowercase in the same column indicate presence of statistical difference ($p < 0.05$) among treatments (cheeses). *Lc. Lactis* and *Lb. acidophilus* are expressed in log CFU/g. Different capital letters in the same column indicate presence of statistical difference ($p < 0.05$) along the storage days. I,II,III,IV= see text.

Table 4. Sensory acceptance of probiotic marbled cheese*

Cheese	Appearance	Aroma	Taste	Texture	Overall Acceptance
I	6.61 ^a	6.90 ^a	6.42 ^a	6.72 ^a	6.38 ^a
II	6.41 ^a	6.41 ^a	5.88 ^a	6.20 ^a	5.96 ^a
III	6.00 ^a	6.20 ^a	5.86 ^a	6.04 ^a	6.14 ^a
IV	6.34 ^a	6.30 ^a	5.88 ^a	6.40 ^a	6.52 ^a

* Mean data from 50 consumers and based on a 9-point hedonic scale (1 = dislike extremely; 5 = neither like nor dislike; 9 = like extremely). Mean values in the same column not followed by the same letter are significantly different ($p < 0.05$).

Figure 1. Marbled cheese processing

REFERENCE

Alves, L.L., N.S.P.S. Richards, P. Mattana, D.F. Andrade, A.P.S. Rezer, Milani L.I.G., A.G. Cruz, and J.A.F. Faria. 2013. Cream cheese as a symbiotic food carrier using *Bifidobacterium animalis* Bb-12 and *Lactobacillus acidophilus* La-5 and inulin. Int. J. Dairy Technol. 66:63-69.

Ayyash, M.M., F. Sherkat, N.P. Shah. 2012. The effect of NaCl substitution with KCl on Akawi cheese: Chemical composition, proteolysis, angiotensin-converting enzyme-inhibitory activity, probiotic survival, texture profile, and sensory properties. J. Dairy Sci. 95: 4747-4759.

Bem estar. 2012. Intolerância à lactose atinge até 70% dos adultos brasileiros. Available in: <http://g1.globo.com/bemestar/noticia/2012/02/intolerancia-lactose-atinge-ate-70-dos-adultos-brasileiros.html>. Accessed in 13/ 01/2013.

Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L. 2001. Recent advances in cheese microbiology. Int. Dairy J. 11, n. 4-7 : 259-274.

Borelli, B.M. 2006. Caracterização das bactérias lácticas, leveduras e das populações de *Staphylococcus enterotoxigênicos* durante a fabricação do queijo Minas curado produzido na Serra da Canastra, MG. 120f. Tese (Doutorado em Microbiologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Buriti, F. C. A., J. S. Rocha, and S. M. I. Saad. 2005. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. Int. Dairy J. 15:1279–1288

Buriti, F.C.A., T.Y. Okazaki, J.H.A. Alegro and S.M.I. Saad. 2007. Effect of a probiotic mixed culture on texture profile and sensory performance of Minas fresh-cheeses in comparison with the traditional products. *Arch. Latinoam. Nut.* 57:179-185.

Cardarelli H.R, F.C.A Buriti, I.A Castro and S.M.I. Saad. 2008. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic petit-suisse cheese. *LWT-Food Sci Technol* 41:1037–46.

Coman, M.M, C. Cecchini, M.C. Verdenelli, S. Silvi, C. Orpianesi and A. Crespi. 2012. Functional foods as carriers for SYN BIO®, a probiotic bacteria combination. *Int. J. Food Microbiol.* 157: 346–352.

Cruz, A. G., R. S. Cadena, J. A. F. Faria, H. M. A. Bolini, C. Dantas, M. M. C. Ferreira, and R. Deliza. 2012. PARAFAC: Adjustment for modeling consumer study covering probiotic and conventional yogurt. *Food Res. Int.* 45:211–215.

Cruz, A. G., R. S. Cadena, E. H. M. Walter, A. Mortazavian, D. Granato, J. A. F. Faria, and H. M. A. Bolini. 2010a. Sensory analysis: Relevance for prebiotic, probiotic, and synbiotic product development. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9:358–373.

Cruz, A. G., F. C. A. Buriti, C. B. H. Souza, J. A. F. Faria, and S. M. I. Saad. 2009. Probiotic cheese: Health benefits, technological and stability aspects. *Trends Food Sci. Technol.* 20:344–354.

Drake, S. and M. Drake. 2011. Application of sensory methods to development of probiotic and prebiotic foods. Pages 113–130 in *Probiotic and Prebiotic Foods: Technology, Stability and Benefits to Human Health*. N. P. Shah, A. G. Cruz, and J. A. F. Faria, ed. Nova Publisher, New York, NY.

Escobar, M.C., M.L. Van Tassell, F. Martínez-Bustos, M. Singh, E. Castaño-Tostado, S.L. Amaya-Llano, M.J. Miller. 2012. Characterization of a Panela cheese with added probiotics and fava bean starch. *J. Dairy Sci.* 95: 2779-2787.

Food and Agriculture Organization of United Nations; World Health Organization. FAO/WHO. 2002. Available from. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a joint FAO/ WHO expert consultation, Córdoba, Argentina. ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf

Fritzen-Freire, C. B., C. M. O. Muller, J. B. Laurindo, R. M. C. Amboni, and E. S. Prudencio. 2010. The effect of direct acidification on the microbiological physicochemical and sensory properties of probiotic Minas Frescal cheese. *Int. J. Dairy Technol.* 63:561–568.

Granato, D., I.A. Castro, L.S.N. Ellendersen and M.L. Masson. 2010a. Physical stability assessment and sensory optimization of a dairy-free emulsion using response surface methodology. *J. Food Sci.* 75: S149-S155.

Granato, D., G. F. Branco, F. Nazarro, A. G. Cruz and J. A. F. Faria.. 2010b. Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9:292-302.

Granato, D., G. F. Branco, A. G. Cruz, J. A. F. Faria, and N. P. Shah. 2010c. Probiotic dairy products as functional foods. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9:455–470.

Gomes, A. M. P. and F. X. Malcata. 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: Biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* 10:139–157.

Gomes, A.A., S.P. Braga, A.G. Cruz, R.S. Cadena, P.C.B. Lollo, C. Carvalho, J. Amaya-Farfán, J.A.F. Faria and H.M.A. Bolini. 2011. Effect of the inoculation level of *Lactobacillus acidophilus* in probiotic cheese on the physicochemical features and sensory performance compared with commercial cheeses. J. Dairy Sci. 94: 4777-4786

Karimi, R., A.M. Mortazavian and A.G. Cruz. 2011. Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. Dairy Sci. Technol. 91: 283-308

Karimi, R., A. M. Mortazavian and A. Amiri-Rigi. 2012a. Selective enumeration of probiotic microorganisms in cheese. Food Microbiol. 29:1-9.

Karimi, R., A.M. Mortazavian and M. Karami. 2012b. Incorporation of *Lactobacillus casei* in Iranian ultrafiltered Feta cheese made by partial replacement of NaCl with KCl. J. Dairy Sci., 95, 4209-4222.

Karimi, K., S. Sohrabvandi and A. M. Mortazavian. 2012c. Sensory Characteristics of Probiotic Cheese. Comp. Rev. Food Sci. Saf. 11: 437-452.

Lollo, P.C.L., A.G. Cruz, P.N. Morato, C.S. Moura, L.B. Carvalho-Silva, C.A.F. Oliveira, J.A.F. Faria and J. Amaya-Farfán. 2012. Probiotic cheese attenuates exercise-induced immune suppression in Wistar rats. J. Dairy Sci. 95: 3549-3558.

MacFie, H. J., N. Bratchell, K. Greenhoff, and L. V. Vallis. 1989. Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effects in hall tests. J. Sens. Stud. 4:129–148.

Madureira, A.R., J.C. Soares, M. Amorim, T. Tavares, A.M. Gomes, M.X. Pintado and F.X. Malcata. Bioactivity of probiotic whey cheese: characterization of the content of peptides and organic acids. J. Food Sci. Agric., in press.

Madureira, A. R., A. I. Pintado, A. M. Gomes, M. E. Pintado and F. X. Malcata. 2011a. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Lebenson. Wiss. Technol.* 44:75–81.

Minervini, F., S. Siragusa, M. Faccia, F. Dal Bello, M. Gobbetti and M. De Angelis. 2012. Manufacture of Fior di Latte cheese by incorporation of probiotic lactobacilli. *J. Dairy Sci.* 94: 4777-4786.

Marshall, R. T. 1993. *Standard Methods for Examination of Dairy Products*. American Public Health Association, Washington, DC

Martinez, R. C. R., A.-E. Aynaou, S. Albrecht, H.A. Schols, E. C.P De Martinis, E. G. Zoetendal, K. Venema, S.M.I. Saad and H. Smidt. 2011. In vitro evaluation of gastrointestinal survival of *Lactobacillus amylovorus* DSM 16698 alone and combined with galactooligosaccharides, milk and/or *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12. *Int. J. Food Microbiol.* 149:152-158.

Masuda, T., R. Yamanari, and T. Itoh. 2005. The trial for production of fresh cheese incorporated probiotic *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft* 60:167–171.

Milesi, M.M., I.V. Wolf, C.V. Bergamini and E.R. Hynes. (2010). Two strains of nonstarter lactobacilli increased the production of flavor compounds in soft cheeses. *J. Dairy Sci.* 93: 5020-5031.

Nóbrega, J.E. 2007. Caracterização do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Canastra no município de Medeiros, Minas Gerais, com ênfase em leveduras. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Oberg, C.V., L.V. Moyes, M.J. Domek, C. Brothersen and D.J. McMahon. 2011. Survival of probiotic adjunct cultures in cheese and challenges in their enumeration using selective media. *J. Dairy Sci.* 94: 2220-2230

Ong, L., A. Henriksson and N. P. Shah. 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. *Int. Dairy J.* 16:446–456.

Ortakci, F., J.R. Broadbent, W.R. McManus and D.J. McMahon. 2012. Survival of microencapsulated probiotic *Lactobacillus paracasei* LBC-1e during manufacture of Mozzarella cheese and simulated gastric digestion. *J. Dairy Sci.* 95: 6274-6281.

Pereira, L. C., C. H. B. Souza, J. H. Behrens, and S. M. I. Saad. 2010. *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in co-culture improve sensory acceptance of potentially probiotic petit Suisse cheese. *Acta Aliment.* 39:265–276.

Potes, M.E., Marinho, A.A. 2007. Utilização de diferentes meios de cultura na identificação e recuperação de bactérias lácticas. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias.* 102, n. 561-562: 145-151.

Santillo, A., M. Caroprese, D. Ruggieri, R. Marino, A. Sevi and M. Albenzio. 2012. Consumer acceptance and sensory evaluation of Monti Dauni Meridionali *Caciocavallo* cheese. *J. Dairy Sci.* 95: 4203-4208.

Settanni, L. and Moschetti, G. 2010. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiol.* 21: 691-697.

Shah, N.P. 2000. Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. *J. Dairy Sci.* 83:894-907.

Shihata, A. and N.P. Shah. 2000. Proteolytic profile of yogurt and probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* 10: 401-408.

Shrestha, S., J.A. Grieder, D.J. McMahon and B.A. Nummer. 2011. Survival of *Listeria monocytogenes* introduced as a post-aging contaminant during storage of low-salt Cheddar cheese at 4, 10, and 21°C. J. Dairy Sci. 94: 4329-4335

Songisepp, E., P. Hütt, M. Rätsep, E. Shkut, S. Kõljalg, K. Truusalu, J. Stsepetova, I. Smidt, H. Kolk, M. Zagura and M. Mikelsaar. 2012. Safety of a probiotic cheese containing *Lactobacillus plantarum* Tensia according to a variety of health indices in different age groups. J. Dairy Sci. 95:5495-5509.

Wadhvani, R. and D.J. McMahon.2012. Color of low-fat cheese influences flavor perception and consumer liking. J. Dairy Sci. 95: 2336-2346.

3.2 PROBIOTIC MARBLED CHEESE: RHEOLOGICAL CHARACTERISTICS AND
SENSORY OPTIMIZATION (TRABALHO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA
REVISTA LEBENSMITTEL-WISSENSCHAFT + TECHNOLOGIE / FOOD SCIENCE
+ TECHNOLOGY)

Probiotic Marbled Cheese: rheological characteristics and sensory optimization
using Just about right (JAR) scale and Penalty analysis

E.B. Nogueira¹, A.G. Cruz ^{1,2}, R.M. Franco¹, M.A. S. Cortez¹

¹ Universidade Federal Fluminense (UFF), Faculdade de Medicina Veterinária, 24230-340, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PGCTA), 20270-021, Rio de Janeiro, Brazil.

.

Abstract

The physicochemical and rheological properties as well as the sensory optimization of Marbled cheese added with probiotic bacteria was investigated using the Just About right scale (JAR scale), penalty analysis (PA) and the logistic regression (LR). The addition of probiotic bacteria did not influence the gross composition and the acceptance of the final product; however the cheese with probiotic bacteria presented an decrease at the rheological parameters. JAR scale and PA suggested it is possible to increase the product acceptance by optimizing the acidic taste, which was further confirmed by LR. By using LR, it was possible to observe that the acid taste and texture are drivers of liking of Marbled cheese. The results call attention to the importance of previous sensory studies before marketing of probiotic cheeses.

Key words: Just about right scale, penalty analysis, probiotic cheese.

Introduction

Functional foods are those in which are added or naturally contain nutrients or substances in their formulation that provide health benefits beyond traditional nutritional benefit (Williasom, 2009). Dairy products added with probiotic bacteria are recognized as a broad category of functional foods, with a positive reputation among consumers (Granato et al., 2010). Among dairy products, cheese can be an adequate matrix for supplementation with probiotic bacteria because it presents intrinsic advantages, such as high water activity and buffering capacity, leading to better protection of these bacteria during the passage through the gastrointestinal tract (Cruz et al., 2009; Karimi et al., 2011).

The development of functional foods, such as such as probiotic cheeses, must focus on the behavior and the actual needs of the consumer, enabling him/her to continuously buy the product (Bleiel, 2010). In this context, the impact of adding the probiotic culture on the sensory attributes of the product should be assessed during the initial stages of product development, once previous studies have shown the negative influence of the addition of these cultures on the sensory properties of cheeses (Gomes et al., 2011). However, it is necessary to investigate the influence of probiotics on certain sensory attributes that drive their acceptance, leading for the optimization of the product's formulation prior to its marketing.

The Marbled Cheese representa uma nova opção de ripined semi hard cheese, being obtained by enzymatic coagulation of pasteurized milk, added with "Dulce de leche", pressed and cured for at least 15 days before the consumption. It presents a firm texture, with a overall marbled characteristic due to "Dulce de leche" and a internal and external caramelized aspect (Cortez, Franco, Nogueira, 2012), being an adequate food carrier for probiotic bacteria (Nogueira et al., submitted).

Herein, the objectives of this study are to evaluate the rheological features of Marbled probiotic cheese as well as to identify the factors that lead for the improvement of the product's formulation using the Just about right scale (JAR scale) and the penalty analysis methodology. In addition, the physicochemical characteristics of the final product were also evaluated

Material and Methods

Marbled Cheese Processing

Whole pasteurized milk (3.0 % fat, Vitallete, Valença, Rio de Janeiro, Brazil) was used to manufacture the cheese samples. The milk was heated up to 35 °C and then the following ingredients were added: calcium chloride (CaCl₂, CAP-LAB, São Paulo, São Paulo, Brazil) at 40% in the proportion of 300 ml per 1,000 liters of fluid milk, aromatic lactic culture (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, R704, CHR HANSEN, Valinhos, São Paulo, Brazil), at a concentration of 25 g/500 L of fluid milk (6 log CFU/g), Probiotic culture (*Lactobacillus acidophilus* LC-05, CHR HANSEN, Valinhos, São Paulo, Brazil) at a concentration of 25 g/250 L of fluid milk (7 log CFU/g) and Coagulant enzyme (HALA®, CHR HANSEN, Valinhos, São Paulo, Brazil) at a concentration of 10 ml/10 L of fluid milk. The milk was left to rest for 40 minutes and the resulted curd was cut with a cheese wire knife to cubes shaped grains of 0.7 cm³. After 2 minutes of resting, the curd was softly stirred for 20 min at 32°C to increase the hardness of the grain. Thereafter, there was a second stirring (40 min at 40 °C), in order to reduce the grain moisture. Approximately 30% of cheese whey was drained and the same volume of pre-heated water (40 °C) was added to the product to reduce the lactose

content. After a partial removal of whey, the salting process was performed using sodium chloride (NaCl, Cisne, São Paulo, Brazil) at a ratio of 0.7% w/w of curd. To obtain the marbled characteristic, a 10% w/w of *dulce de leche* was added to the curd and gently manipulated to keep the grain structure. Also, a caramel essence (0.06% w/w relative to curd, Toffel, Arcor, São Paulo) was added to the product in order to intensify the flavor. The curd was placed into plastic former and pressed during 3 hours, being turned in hourly intervals. Finally, the cheese was ripened for 29 days at 10-12 °C and humidity of 88%. The Marble cheese is showed in the Figure 1. Four treatments were conducted: (I) Marbled Cheese without added starter culture and probiotic culture, (II) Marbled Cheese added with starter culture; (III) Marbled Cheese added with probiotic culture and (IV) Marbled Cheese added with starter culture and probiotic culture. The table 1 reports the characteristics and code of probiotic and conventional cheeses.

Storage and sampling days

The gross composition and rheological analysis as well as the consumer test were performed at 15 ripening day. This period was chosen due the marbled cheese technology, which suggests a minimum period of 15 ripening days before the commercialization.

Gross Composition

The gross composition was using standard analytical methodologies (Brasil, 2006). Moisture and ash levels were determined by gravimetric analysis. Total nitrogen was determined by MicroKjeldahl, after multiplication by 6.35 . Percentage

of fat was determined by Gerber method. All the analysis were performed in triplicate.

Rheological analysis

The rheological behavior of four different formulations of “Marmoreado” cheeses (I,II, III AND IV) was evaluated using uniaxial compression test. The rheological analysis were carried out using the TA-XT21 texture analyzer (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, UK), fitted with a 50 kg load cell. The texture analyzer was equipped with a fixed platform and an aluminum plate 35 mm in diameter. The plate and the platform were not lubricated since it was considered that the whey exuded during the test was sufficient to reduce the friction between the cheese surface and the plate/platform to insignificant levels. The samples were prepared removing cylindrical samples (20 mm diameter, 20 mm height) of the cheese. These samples were wrapped individually in PVC film and then in waterproof plastic bags and maintained in a refrigerated bath at 10 °C for at least 90 min before testing. The rheological analysis was performed at least three times.

The uniaxial compression was carried out according to Karlsson, Ipsen & Ardo (2007) methodology. The cheese samples were compressed to 80% of their height at a cross-head speed of 1 mm.s⁻¹. From the force and displacement data, with the assumption that the sample maintained its volume and cylindrical shape during the compression, the true stress (σ_t) and the Hencky strain (ϵ_H) were calculated and plotted for each measurement. Force-displacement data were converted to true stress (σ_t) (Eq. 6) and Hencky strain (ϵ_H) (Eq. 7) as described by Fox et al. (2000).

$$\sigma_t = \frac{F(t)}{A(t)} = \frac{F(t)L(t)}{A_0L_0} \quad (6)$$

Where $F(t)$ is the applied force at any time, $A(t)$ is the cross-sectional area at any time, A_0 is the initial cross-sectional area, and L_0 is the initial length.

$$\varepsilon_H = \left| \ln \left(\frac{L(t)}{L_0} \right) \right| = \left| \ln \left(\frac{L_0 - \Delta L}{L_0} \right) \right| \quad (7)$$

Where L is the current sample height, L_0 is the initial sample height, ΔL is deformation. The following parameters were calculated from the true stress-Hencky strain curve (σ_t - ε_H): modulus of elasticity (E), fracture stress (σ_f); fracture strain (ε_{Hf}) and fracture work (W_f) (Fox et al., 2000).

Consumer test

Fifty cheese consumers (28 female and 22 male, aged 20-60 years) were recruited at random from the Fluminense Federal University (Niteroi, Rio de Janeiro, Brasil) to take part in the study. The criterion for selection was the absence of allergic reactions to milk. For sensory evaluation, all the 4 four marbled cheeses were evaluated. The cheese samples were removed from the refrigerator, cut into pieces (about $1.5 \times 1.5 \times 1.5$ cm), and placed on white plates coded with random 3-digit numbers 1 h before evaluation at room temperature (25°C). The consumers were instructed to evaluate the cheese with respect to the overall impression using a 9-point hybrid hedonic scale (1 = disliked immensely, 9 = liked immensely; Cruz et al., 2012). Subsequently, each participant used to Just about right scale (JAR scale, 9 = extremely more than the ideal e 1 = extremely less than the ideal, (Wadhvani & McMahon, 2012) to evaluate acid flavor and texture of the all cheeses. The first-order and carry-over effects were balanced using a specific design, and the samples were presented monadically (MacFie et al., 1989).

Statistical Analysis

The physico-chemical and rheological data were submitted to one way analysis of variance, considering the sample as fixed effect. The consumer test data was evaluated through 2-way ANOVA (consumers \times samples) with interaction (Cruz et al., 2011). When it was necessary, the Turkey test was used to determine the significance differences, considering 5 % of significance.

The JAR data for analyzed in a similar way in accordance with previous study reporting the acceptability of new prebiotic low-fat milk beverages (Villegas, Tárrega, Carbonell, & Costell, 2010). Firstly, the percentage of consumers who perceive the cheese attributes (acid flavor and texture in a certain way was calculated, using the relative frequency of answers in each category; in addition, descriptive measures (mean and standard deviation) were calculated for each attribute. Individual JAR scale scores (1, 2, 3, 4,5, 6,7,8,9) were transformed into (-4,-3,-2, -1,0,1,2,3,4 respectively). Two groups of data emerge from this calculation, one for those consumers who feel that the sample has too little of the attribute (below the JAR) and another for those consumers who feel that the product has too much of the attribute (above the JAR). The average of the values below the JAR point 5 corresponded to the negative deviation value (too little of the attribute) and the average of the values above the JAR point correspond to the positive deviation value (too much of the attribute). Plots of acceptability versus JAR deviation values were used to study the relationship between acceptability and the intensity of each attribute.

Finally, penalty analysis (Drake et al., 2011) was performed to reach conclusions related to the effects of a JAR variable on overall liking, identifying

decreases in acceptability associated with sensory attributes not at optimal levels in a product.

Results and Discussion

Gross composition

Table 2 shows the chemical composition of probiotic Marbled cheese. Overall, no differences were found between the different treatments with respect to moisture, protein, total lipids and lipids in the dry matter ($p > 0.05$). These data suggest that the addition of probiotic bacteria has no effect on the product composition. Similar results were obtained for frescal cheese (Fritzen-Freite et al., 2010a).

From a regulatory standpoint, the Marbled cheese can be considered a light cheese and presents an intermediate moisture content (also known as semi-hard cheese), once its lipid content was comprehended between 10 and 24.9% and its moisture content was in the range of 36.0 and 45.9% (Brazil, 1996). Once there is a worldwide increasing consumption trend of products with reduced fat content, the development of marbled cheese can be considered an interesting technological alternative.

Rheological Characteristics

In Table 3 are presented the estimated rheological parameters calculated from the true stress-Hencky strain curves of all samples of Marmoreado cheese. The modulus of elasticity (E) indicates the material's resistance to axial deformation which can be expressed as the rigidity of the material to an applied load (Fox et al., 2000). All formulations have demonstrated high E values indicating higher rigidity when

compared to probiotic Minas Frescal cheeses (Fritzen-Freire et al., 2010). The treatment II (with *L. lactis*) sample have shown the higher E value indicating that was the most rigid sample followed by marbled cheeses I, IV and III, respectively

The fracture stress is related to cheese toughness, whereas the fracture work is directly related to cheese hardness (Fox et al., 2000). Regarding the fracture stress, the descending sequence of toughness of these samples can be described with cheese I presenting the higher σ_f value followed by cheese IV, II and III where the last two did not show a significant difference ($p < 0.05$). The σ_f values achieved in this study were higher than the results obtained by Fritzen-Freire et al (2010) that studied the influence of Bifidobacterium Bb-12 and lactic acid in the rheological properties of Minas Frescal cheese. These finding is in accordance with Marbled cheese technology, which it is a ripened cheese.

The fracture strain (ε_{HF}) denotes the strain need to cause a rupture point in the sample and may be associated to the crumbliness of the cheese samples (Fox et al., 2000). The cheese IV showed the higher value of fracture strain. The cheese II and III did not show significant difference ($p < 0.05$). These results are lower than those obtained by Fritzen-Freire et al (2010b). All cheese samples have shown a significant difference ($p < 0.05$) with respect to fracture work (W_f). The cheese II has demonstrated the higher W_f being followed by cheese IV, I and III.

Overall, marbled cheese added with lactic culture (cheese II) as well as the cheese IV (added simultaneity with lactic and probiotic culture) demonstrated an increase in rheological parameters. On the other hand, the cheese III, added only with *L. acidophilus* presented the lowest values of rheological parameters which indicate a decrease in rigidity of Marmoreado cheeses. Further studies should be

conducted to a better understand of the impact of others variables such as storage time on the rheological properties of marbled cheese.

Consumer test

Table 4 shows the mean scores obtained in the sensory acceptance test and the positive purchase intent of the probiotic and conventional marbled Marbled samples. The addition of probiotic microorganisms in Marbled cheese did not cause significant changes ($F=1.851$, $p= 0.141$) in overall acceptance, which ranged from 6.52 (IV) to 5.96 (II). This is an interesting datum that suggests the absence of the any negative sensory drawback due the addition of probiotic bacteria in cheese matrix. Similar results were obtained in other cheeses, such as *Flor di latte* chese (Minervini et al., 2012) and Panela cheese (Escobar et al., 2012). Additionally, the positive purchase intent ranged from 72% (IV) from 58% (II and III), which also indicates that the addition of probiotic bacteria in the Marbled cheese was beneficial to increase the purchase intent. However, it is noteworthy evaluate if there is an effect among some sensory attributes, such as the influence of acidic taste and texture on the overall acceptance, and if this score can be increased due to a improvement of these attributes. The JAR scale can provide this information and an sensory optimization of the product can be performed.

Figures 1 and 2 show the percentage of consumer response in the JAR scale with respect to acidic taste and texture. Not even one sample was considered "excellent" from the sensory standpoint, once the acceptance did not reach 70% of the responses, which corresponds to the range of 5 and 9 points from the JAR scale (Meullenet et al., 2007). Values between 30 (I) 50 and (II) have been reported with respect to acid taste, meanwhile scored between 38 (III) 50% (I) were obtained for

texture, respectively. Overall, the results suggest that these attributes can be improved, and studies should aim at improving the sensory acceptance of probiotic cheeses.

These results can be seen in Figures 3 and 4, which show that the acceptance of samples and the deviation of each score obtained in the JAR scale relative to category 5 (JAR). These figures indicate the existence of two groups of consumers: a consumer group that perceives the product with low intensity of a certain attribute and the other group of consumers that feels the product presents a high intensity such a sensory attribute (Gagula et al. 2007). Overall, no consistent relationship between the acidic taste, texture and acceptance of probiotic cheeses was observed, and even cheese IV, which was added with *L. lactis* and *L. acidophilus*, has been noticed as being more acidic over the other cheeses and presented a similar overall acceptance. Choosing a probiotic culture with moderate metabolic activity might be of industrial interest to improve the sensory acceptance of marbled cheese. Indeed, cheese added with probiotic bacteria should, at least, maintain and the display the flavor attributes of traditional cheeses, once the impact of the addition of probiotic bacteria on flavor characteristics is dependent on the metabolic activity of strains added to the cheese (Karimi et al. 2012).

Table 5 shows the mean drop value, the penalty analysis, as well as the percentage of consumers that considered the acidic taste and texture perception to be "not enough or non-JAR". The penalty analyses values ranged from 0.94 (cheese IV) to 1.38 (cheese II) towards the acid taste, while similar values were reported for the texture (0.89 - cheese III- to 0.96 -cheese I and II). The high penalty value observed for acidic taste indicates a large change in the overall linking scores and

demonstrates that the sensory improvement of probiotic marbled cheese implies in minimize the sensory perception of this attribute by the consumer, which is ultimately controlling the metabolic of the probiotic strain. This observation was also confirmed by the mean drop values and non-JAR responses, where it is noted that cheese IV also presented high values, with a mean drop of 1.64 (on a 9-point hedonic scale) and 60% of non-jar responses for acidic taste. Indeed, a mean drop higher than 2.0 on a 9-point hedonic scale is considered "very concerning" with respect to overall liking (ASTM, 2009) and in this sense, any calculated mean drop value for acidic taste of marbled cheese and texture fitted in this range.

Table 6 shows the results of the logistic regression, where the sensory attributes that influenced the purchase intent of the probiotic and conventional marbled cheese were identified. JAR acidic taste (odds-ratio = 1.967, $p = 0.007$) and texture (odds-ratio = 1.555, $p = 0.011$) were the attributes that most influenced the purchase intent of the cheese samples. This means that the likelihood of the product being purchased would be 1.967 times higher as compared to the probability of the product not being purchased, with a one unit increase in the JAR acidic taste scale (based on a 9-point hedonic scale), and with respect to texture, the likelihood of the product being purchased would be 1.555 times higher as compared to the probability of the product not being purchased. The results of the logistic regression confirm the data obtained by penalty analysis and call attention to the need to optimize the acidic taste and, to a lesser extent, the cheese texture in order to increase the purchase intent of probiotic Marbled cheese.

Conclusion

The addition of probiotic bacteria in Marbled cheese did not influence its physicochemical and the sensory acceptance, suggesting the adequacy of this technological alternative to increase the product's functional potential without being rejected by consumers. However, it was observed an increase of the rheological parameters

The use of JAR scale and penalty analysis methodology suggested that it is still possible to optimize the sensory acceptance of Marbled by improving the acidic taste, which impacts on which probiotic strain will be used to produce the cheese. These results were confirmed by logistic regression analysis, which indicated that the acidic taste and texture (to a lesser extent) are attributes that should be taken into account to increase the purchase intent of Marbled cheese.

Future studies involving probiotic Marbled cheese should include the quantitative descriptive analysis and the use of dynamic perception methodologies to assess the product's sensory properties.

Figure 1. The Marbled Cheese



Table 1. Probiotic and conventional marbled: characteristics and codes

Cheeses	Features*	Code
Standard cheese	Without lactic and probiotic bacteria	I
Conventional cheese	<i>L. lactis</i> (6 log CFU/g), without probiotic bacteria	II
Probiotic cheese 1	<i>L. acidophilus</i> (6 log CFU/g), without lactic bacteria	III
Probiotic cheese 2	<i>L. acidophilus</i> and <i>L. lactis</i> (each 6 log CFU/g)	IV

Table 2. Gross composition of probiotic and conventional marbled cheese*

	I	II	III	IV
Moisture	41.3 ^a	41.4 ^a	41.7 ^a	41.9 ^a
Protein	25.5 ^a	26.5 ^a	26.4 ^a	26.5 ^a
Fat	22.0 ^a	22.7 ^a	21.6 ^a	21.6 ^a
F/DE	12.9 ^a	13.2 ^a	12.6 ^a	12.6 ^a

*Units are expressed in g/100 cheese. Same lowercase letter in the same line indicates absence of difference. See table I for codes. Analysis performed at 15 days of ripening. F/DE=fat/dry extract.

Table 3. Rheological parameters of Marmoreado cheese at different treatments estimated from uniaxial compression test.

Rheological Parameters	I	II	III	IV
E (kPa)	8108.89 ^b	11474.43 ^a	4019.45 ^d	7998.43 ^c
f_f (kPa)	2290.064 ^b	3838.531 ^a	1316.01	2751.34 ^b
H_f (-)	0.333 ^c	0.384 ^b	0.387 ^b	0.435 ^a
W_f (kJ.m ⁻³)	421.18 ^c	811.73 ^a	279.89 ^d	717.89 ^b

*Within a row, different superscript lowercase letters denote significant differences ($p < 0.05$) among the different studied cheeses for the same rheological parameter. The E denotes Young's modulus. The f_f represents the fracture stress. The H_f represents the fracture Hencky strain. W_f denotes the fracture work.

Table 4. Sensory acceptance and purchase intent of probiotic and conventional marbled cheese*

Cheese	Overall Acceptance	Positive Purchase Intent** (%)
I	6.38 ^a	64
II	5.96 ^a	58
III	6.14 ^a	58
IV	6.52 ^a	72

* Mean data from 50 consumers and based on a 9-point hedonic scale (1 = dislike extremely; 5 = neither like nor dislike; 9 = like extremely). Mean values in the same column not followed by the same letter are significantly different ($p < 0.05$). ** Based on the binomial scale (yes/no) scale and on 50 responses.

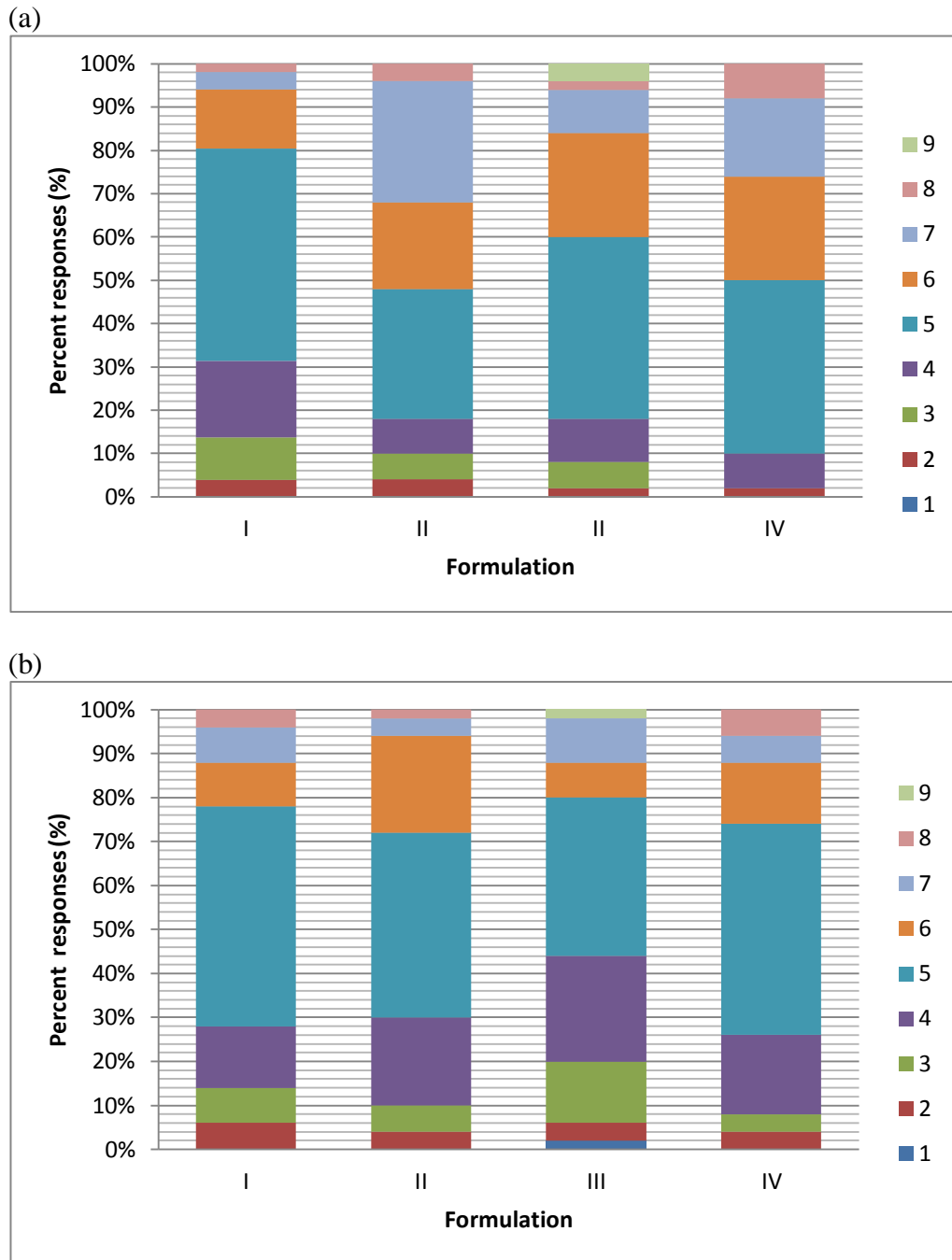


Figure 2. Consumer assessment about the appropriateness of acid taste (a) and texture (b) using 9-point just about right scale (1= extremely less, 5=just about right, 9= extremely more). See table 1 for coding samples.

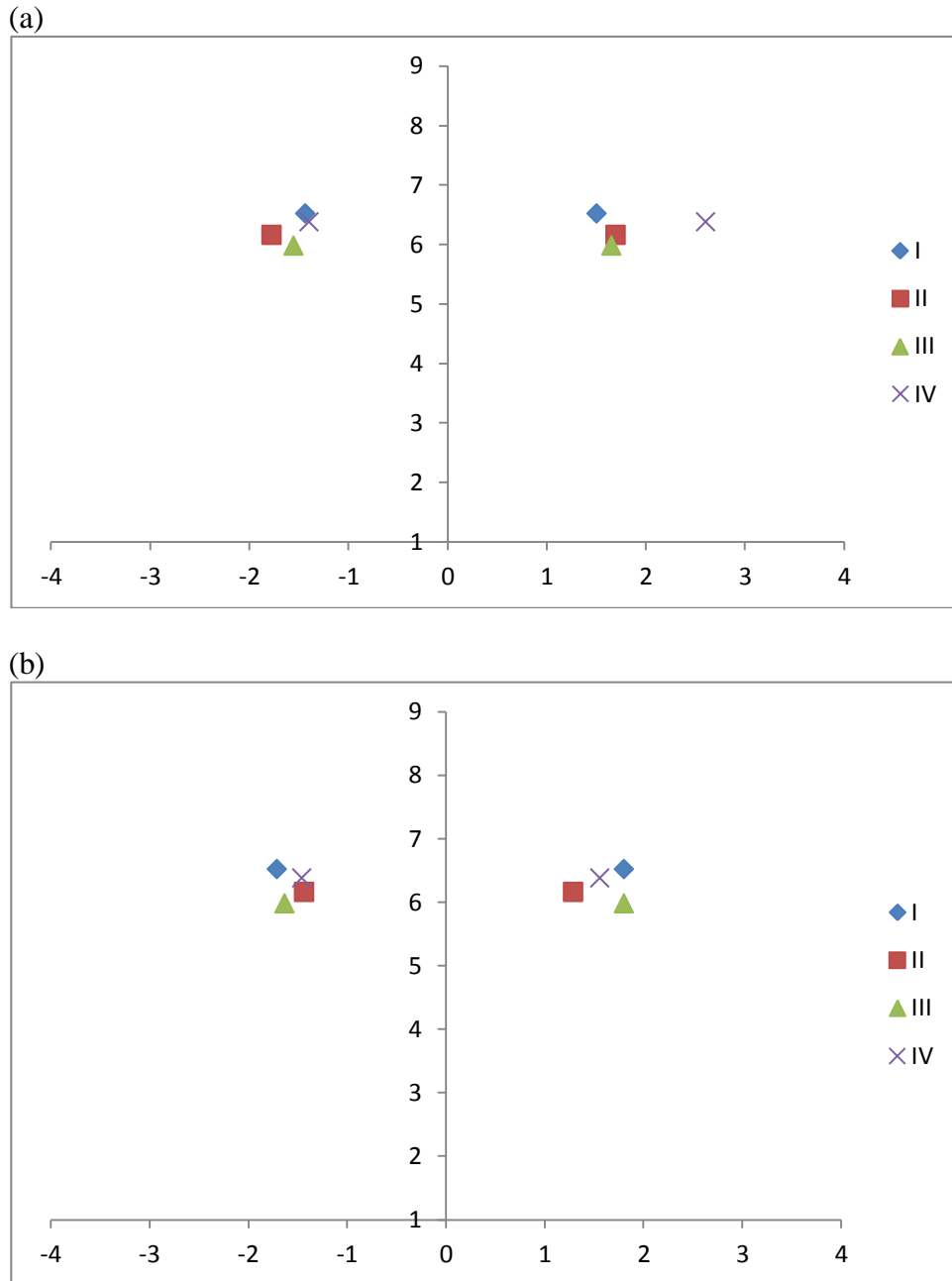


Figure 3. Relation between overall acceptability data and JAR deviation For Acid taste (a) and texture (b). See table 1 for coding samples.

Table 5. Consumer penalty analysis of Just about Right (JAR) diagnostic attributes: percentages of consumers and mean drop for liking score of each JAR category [&]

Cheeses	Acid taste JAR		Texture JAR		Total penalty***	
	Not enough	Too much	Not enough	Too much	Acid Taste JAR	Texture JAR
I	20*(1.52)**	30(0.99)	28(1.07)	22(0.82)	1.2	0.96
II	52(0.68)	---	28(0.24)	30(0.52)	1.38	0.96
III	40(1.42)	---	44(1.43)	20(2.51)	0.94	0.89
IV	60(1.64)	---	26(1.18)	26(0.72)	1.70	0.952

[&] See table for coding samples. * Percentage of consumers who found each product to be "Not enough" and "Too much" for acid taste and texture JAR. ** Mean drop, calculated as the difference between mean liking for the JAR response and mean liking score for the non-JAR response. *** Calculated as the product between the mean drop and percentage of non-JAR consumer responses. -- - Indicated less than 20% consumers selected corresponding JAR category.

Table 6. Parameter estimates, probability, and odds ratio estimates for predicting purchase intent of probiotic and conventional marbled cheese

* Based on logistic regression analysis, using a full model of 7 sensory acceptability and 2 JAR attributes. Analysis of maximum likelihood estimates was used to obtain parameter estimates.

Variables	Coefficient	Pr > χ^2	Odds ratio	Significance of parameter estimates
Appearance	-5.655	0.001	-----	
Aroma	-0.144	0.335	0.866	
Flavour	0.029	0.847	1.029	
Texture	0.441	0.011	1.555	
Overall Acceptance	0.080	0.611	1.084	
JAR acid taste	0.677	0.007	1.967	
JAR texture	-0.194	0.204	0.824	

was based on the Wald χ^2 value at $P < 0.05$.

Reference

ASTM. American Society of Testing and Materials. (2009). Just-About-Right (JAR) scales: Design, usage, benefits and risks. In: Rothman L, Parker MJ, editors. ASTM International Manual Series. MNL 63. West Conshohocken, Pa.: ASTM.

Bleiel, J. (2010). Functional foods from the perspective of the consumer: How to make it a success? *International Dairy Journal*, 20, 303-306.

Brasil. (2006). Instrução Normativa nº68 de 12 de novembro de 2006. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Available in: <http://www.agricultura.gov.br>. Accessed in 25/11/2012.

Brasil. (1996). Regulamento Técnico Mercosul nº 145. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. . Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Available in: <http://www.agricultura.gov.br>. Accessed in 25/11/2012.

Cruz, A.G., Cadena, R.S., Faria, J.A.F., Bolini, H.M.A., Dantas, C., Ferreira, M.M.C., & Deliza, R. (2011). _PARAFAC: Adjustment for modeling consumer study covering probiotic and conventional yogurt. *Food Research International*, 41, 211-215.

Cruz, A.G., Cadena, R.S., Faria, J.A.F., Oliveira, C.A.F., Cavalcanti, R.N., Bona, E., Bolini, H.M.A., da Silva, M.A.A.P. (2011). Consumer acceptability and purchase intent of probiotic yoghurt with added glucose oxidase using sensometrics, artificial neural networks and logistic regression. *International Journal of Dairy Technology*, 64, 549-556.

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.

Drake, S.L., Lopetcharat, K., & Drake, M.A. (2011). Salty taste in dairy foods: Can we reduce the salt? *Journal of Dairy Science*, 94, 636-645.

Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M. & McSweeney, P. L. H. (2000). Cheese rheology and texture. In P. F. Fox, T. P. Guinee, T. M. Cogan, & P. L. H.

Fritzen-Freire, C. B, Muler, C. M. O., Laurindo. J.B., & Amboni, R.D.M.C. (2010a). The effect of direct acidification on the microbiological, physicochemical and sensory properties of probiotic Minas Frescal cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 63, 1-8.

Fritzen-Freire, C. B., Müller, C. M. O., Laurindo, J. B., Prudêncio, E. S. (2010b). The influence of *Bifidobacterium* Bb-12 and lactic acid incorporation on the properties of Minas Frescal Cheese. *Journal of Food Engineering*, 96, 621-627.

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. (2011). 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*, 94, 4777-4786.

Granato D., Branco, G.F., Cruz, A.G., Faria, J.A.F., & Shah, N.P. (2010). Probiotic dairy products as functional foods. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*, 9, 455-470.

Karimi, R., Sohrabvandi, S., & Mortazavian, A.M. (2012). Sensory Characteristics of Probiotic Cheese. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*, 11, 437-452.

Karimi, R., Mortazavian, A.M., & Cruz, A.G. (2011). Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: A review. *Dairy Science and Technology*, 91, 283-308.

Karlsson, A.O., Ipsen, R., & Ardo, Y. (2007). Influence of pH and NaCl on rheological properties of rennet-induced casein gels made from UF concentrated skim milk. *International Dairy Journal*, 17, 1053–1062.

MacFie, H.J., Bratchell, N., Greenhoff., K., & Vallis, L. V. (1989). Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effects in hall tests. *Journal of Sensory Studies*, 4, 129-148.

McSweeney (Eds.), *Fundamentals of cheese science* (pp. 305-340). Gaithersburg: Aspen.

Meullenet, J-F., Xiong, R., & Findlay, C. (2007). *Multivariate and Probabilistic Analyses of Sensory Science Problems*. New York: IFT Press.

Minervini, F., Siragusa, S., Faccia, Dal Bello, M.F., Gobbetti, M., & De Angeli, M. (2012). Manufacture of Fior di Latte cheese by incorporation of probiotic lactobacilli. *Journal of Dairy Science*, 95, 508-520.

Escobar, M.C., Van Tassell, M.L., Martínez-Bustos, Singh, F.M., Castaño-Tostado, E., Amaya-Llano, S.L., & Miller, M.J. (2012). Characterization of a Panela cheese with added probiotics and fava bean starch. *Journal of Dairy Science*, 95, 2779-2787.

Villegas, B., Tárrega, A., Carbonell, I., & Costell, E. (2010). Optimising acceptability of new prebiotic low-fat milk beverages. *Food Quality and Preference*, 21, 234-242.

Wadhvani, R. & McMahon, D.J. (2012). Color of low-fat cheese influences flavor perception and consumer liking. *Journal of Dairy Science*, 95, 2336-2346.

Williamson, C. (2009). Functional Foods: what are the benefits? *British Journal of Community Nursing*, 14, 230 -236.

4 CONCLUSÕES FINAIS

O desenvolvimento de queijos com bactérias probióticas pode ser uma opção adequada para indústrias de laticínios que desejam diversificar os produtos em um mercado consumidor cada vez mais competitivo. Nesse sentido, o queijo marmoreado doce é uma opção inovadora de alimento com adição de bactérias probióticas, independentemente da adição da cultura iniciadora em co-cultura com o probiótico ou unicamente a adição de cultura probiótica. De fato, a viabilidade constante e adequada de *L. acidophilus* foi observada durante 29 dias de armazenamento, o que levou à produção de metabolitos orgânicos e proteólise, além de proporcionar um baixo nível de lactose, considerada vantagem do produto por consumidores intolerantes à lactose. Tendo em vista as considerações econômicas para os fabricantes, parece vantajoso a comercialização do derivado lácteo, uma vez que além de oferecer um alimento funcional, o processo da elaboração do produto não manifestou redução da qualidade sensorial observada.

Estudos futuros deverão avaliar o metabolismo de outras culturas probióticas adicionadas ao queijo marmoreado, bem como de utilizar e avaliar os efeitos da acidificação direta sobre os parâmetros de qualidade do produto. Além disso, o estabelecimento do perfil sensorial do produto funcional, assim como a identificação de peptídeos bioativos e de compostos aromáticos também devem ser avaliadas para uma melhor otimização da formulação do Queijo Marmoreado doce adicionado de probiótico..

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-SALAM, M. H.; HIPPEN, A. R.; ASSEM, F. M.; EL-SHAFEI, K.; TAWFIK, N. F.; EL-AASSAR, M. Preparation and properties of probiotic cheese high in conjugated linoleic acid content. *International Journal of Dairy Technology*, 64, 64–74. 2011.

ALBENZIO, M.; SANTILLO, A.; CAROPRESE, M.; MARINO, R.; TRAN, A.; FACCIA, M. Biochemical patterns in ovine cheese: influence of probiotic strains. *Journal of Dairy Science*, 93, 3487–3496. 2010.

ALBUQUERQUE, T. L. D.; LIMA, M. D. A.; OLIVEIRA, V.S.; COELHO, R.M.D.A.; RODRIGUES, M.D.C.P. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, Curitiba, v. 27, n. 2, p. 191-198, jul./dez. 2009

ANJO, D. L. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. *Jornal Vascular Brasileiro*, v. 3, n. 2, p. 145-154. 2004.

APPEL, L. J. A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group. *The New England Journal of Medicine*, v.336, n.16, p.1117-1124, april. 1997.

AWAD; S.; AHMED, N.; SODA, M.E. Influence of microfiltration and adjunct culture on quality Domiati cheese. *Journal of Dairy Science*. v. 93, p. 1807-1814, 2010

AYYASH, M. M.; SHERKAT, F.; SHAH, N. P. The effect of NaCl substitution with KCl on Akawi cheese: chemical composition, proteolysis, angiotensin-converting enzyme-inhibitory activity, probiotic survival, texture profile, and sensory properties. *Journal of Dairy Science*, 95, 4747–4759. 2012.

BARBOZA, L. M. V.; FREITAS, R. J. S. D.; WASZCZYNSKYJ. *Brasil Alimentos*, nº 18 – Janeiro/Feveireiro de 2003, disponível em:
<http://www.signuseditora.com.br/ba/pdf/18/18%20-%20Desenvolvimento.pdf>,
acessado em: 09/10/2012

BELCHIOR, F. O ingrediente do lácteo saudável. *Leite e Derivados*, São Paulo, v. 13, n. 76, p. 54-64. 2004

BERESFORD, T.; WILLIAMS, A. *The microbiology of cheese ripening*. In: *Cheese: Chemistry, Phisics and Microbiology*. Third Edition. V.1. General Aspects. (Eds) FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H.; COGAN, T.M., GUINEE, P. Amsterdan: Elsevier 2004. p. 298-30.

BRASIL. *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Requeijão ou Requesõn. Portaria nº 359, de 04 de setembro de 1997

BRASIL. *Ministério da Saúde*. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 2, de 7 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. Brasília. 2002.

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*, Amsterdam, v.38, n.2, p.173-180. 2005a.

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*, Amsterdam, v.15, n. 12, p. 1279-1288. 2005b.

BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, V. 57, n. 4, p. 373-380, 2007.

DI CAGNO, R.; DE PASQUALE, I. ; DE ANGELIS, M.; BUCHIN, S.; CALASSO, M.; FOX, P.F.; GOBBETTI, M. Manufacture of Italian Caciotta-type cheeses with adjuncts and attenuated adjuncts of selected non-starter lactobacilli. *International Dairy Journal*, v. 21, p. 254-260, 2011.

CANDIDO, L.M.B.; CAMPOS, A. M. Alimentos funcionais. Uma revisão. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 29, n. 2, p. 193-203. 2005.

CARVALHO, A. M.; JUNQUEIRA, A. M. R.; VIEIRA, J. V.; BOTELHOS, R. *Análise sensorial de genótipos de cenoura cultivados em sistema orgânico e convencional*. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.23, n.3, p.805-809, jul-set 2005.

CERVANTES B.G.; AOKI N.A.; ALMEIDA C.P.M.; *Brazilian Journal of Food Technology*, 6º SENSIBER, 19-21 de agosto de 2010, p. 3-10.

CHALITA, M. A. N.; SILVA R. O. P.; PETTI R. H. V.; SILVA C. R. L. Algumas considerações sobre a fragilidade das concepções de qualidade no mercado de queijos no Brasil. *Informações Econômicas*, São Paulo, v.39, n.6, jun. 2010.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. *International Journal Dairy Technology*, Long Hanborough, v.51, n.4, p.123-136, 1998.

CUMMINGS, N.K.; JAMES, A. P.; SOARES, M. J. The acute effects of different sources of dietary calcium on postprandial energy metabolism. *British Journal of Nutrition*, v.96, n.1, p.138, jul. 2006.

CUNHA, C. S.; CASTRO, C. F.; PIRES, C. V.; PIRES, I. S. C.; HALBOTH, N. V.; MIRAND, L. S.; Influence of the texture on the acceptance of oat creams by people from different ages. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, Vol. 20, Nº4, 2009.

CRUZ, A. G.; BURITI, C.; SOUZA, C. B. H.; FARIA, J. A. F.; SAAD, S. M. I. Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. *Trends Food Science and Technology*, 20 344–354. 2009.

CRUZ, A. G.; CADENA, R. S.; WALTER, E. H. M.; MORTAZAVIAN, A.; GRANATO, D.; FARIA, J. A. F.; BOLINI, H. M. A. Sensory analysis: Relevance for prebiotic, probiotic, and synbiotic product development. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9:358–373. 2010.

DELLA LUCIA, S. M. *Métodos Estatísticos para Avaliação da Influência de Características Não Sensoriais na Aceitação, Intenção de Compra e Escolha do Consumidor*. 2008. 116 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008. Disponível em: <http://www.tede.ufv.br/tedesimplificado/tde_arquivos/38/TDE-2008-05-14T133623Z_1158/Publico/texto%20completo.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2011.

EMBRAPA GADO DE LEITE. *Produção mundial de leite de diferentes espécies de animais – 2009*, Junho, 2012. Disponível em: <http://www.cnpgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0210.php>, acessado em: 16/09/2011.

ESCOBAR, M. C.; VAN TASSEL, M. L.; MARTÍNEZ-BUSTOS, F.; MARTÍNEZ-BUSTOS, E.; AMAYA-LLANO, S. L.; MILLER, M. J. Characterization of a Panela cheese with added probiotics and fava bean starch. *Journal of Dairy Science*, 95. 2779–2787. 2012.

FRITZEN-FREIRE, C. B.; MÜLLER, C. M. O.; LAURINDO, J. B.; PRUDÊNCIO, E. S. The influence of Bifidobacterium Bb-12 and lactic acid incorporation on the properties of Minas Frescal cheese. *Journal of Food Engineering*, 96 621–627. 2010.

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

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

HASHEMI, M.; MAIN, A.; MAZLUMI, M.T. Effect of commercial adjunct lactobacilli on biochemical and sensory characteristics of Iranian White-brined cheese. *International Journal of Dairy Technology*. V. 62, p. 48-55, 2009

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. 4ª ed. São Paulo. 2004. 1032p.

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

JELEN, P.; LUTZ, S. Functional milk and dairy products. In: MAZZA, G., ed. *Functional foods: biochemical and processing aspects*. Lancaster: Technomic Publishing, 1998. p.357-381.

JUNIOR, D. M. D. L.; MONTEIRO, P. D. B. S.; RANGEL, A. H. D. N.; URBANO, S. A.; MACIEL, M. D. V. Alimentos Funcionais de Origem Animal: revisão bibliográfica. *Revista Verde*, v.6, n.2, p. 30 – 40 abril/junho de 2011.

KARIMI, R.; MORTAZAVIAN, A. M.; KARAMI, M. Incorporation of *Lactobacillus casei* in Iranian ultrafiltered Feta cheese made by partial replacement of NaCl with KCl. *Journal of Dairy Science*, 95, 4209–4222. 2012.

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

KLAENHAMMER, T. R. Probiotics and prebiotics. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. 2.ed. Washington: ASM, 2001. p.797-811.

LINKE, H. A.; RIBA H.K. Oral Clearance and acid production of dairy products during interaction with sweet foods. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 45; 202-8, 2001.

LOLLO, P.C.L., A.G. CRUZ, P.N. MORATO, C.S. MOURA, L.B. CARVALHO-SILVA, C.A.F. OLIVEIRA, J.A.F. FARIA AND J. AMAYA-FARFAN. Probiotic cheese attenuates exercise-induced immune suppression in Wistar rats. *Journal of Dairy Science*, 95: 3549-3558. 2012.

MADUREIRA, A. R.; PINTADO, A. I.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Rheological, textural and microstructural features of probiotic whey cheeses. *LWT-Food Science and Technology*, 44 75–81. 2011.

MARONÊZ, E. M.; OLIVEIRA, J. D. M. D.; *Pesquisa de mercado, análise sensorial e avaliação da embalagem e rotulagem de bebidas à base de soja*. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, curso de tecnologia em alimentos. trabalho de conclusão de curso. medianeira 2011. Disponível em:
http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/346/1/MD_COALM_2011_2_06.df

MIGUEL, D. P. Importância da análise sensorial no desenvolvimento de novos produtos. Núcleo de Excelência em Engenharia de Alimentos. 2011. Disponível em:
[http://neeafazu.wordpress.com/2011/06/24/importancia-da-anlise-sensorial-no-desenvolvimento-de-novos-produtos/](http://neeafazu.wordpress.com/2011/06/24/importancia-da-analise-sensorial-no-desenvolvimento-de-novos-produtos/). Acessado em: 23/12/2012.

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*, 95 508–520. 2012.

MIRZAEI, H.; POURJAFAR, H.; HOMAYOUNI, A. Effect of calcium alginate and resistant starch microencapsulation on the survival *Lactobacillus acidophilus* La-5 and sensory properties in white brined cheese. *Food Chemistry*, 132 1966–1970. 2012.

MORAIS, A.C.D.S.; *Desenvolvimento, otimização e Aceitabilidade de extrato hidrossolúvel da amêndoa da castanha de caju (Anacardium occidentale L.)*. Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, dissertação, 2009, Fortaleza-CE.

MOYNIHAN, P. J. The cariostatic potential of cheese: cooked cheese-containing meals increase plaque calcium concentration. *British Dental Journal*, 1999, 187: 664-7.

NATIONAL DAIRY COUNCIL. Health benefits of dairy foods: an update. *Dairy Council Digest*, v.78, n.6, p.33– 8, nov-dec. 2007.

NOONAN, W. P.; NOONAN, C. *Legal requeriments for “functional foods” claims*. *Toxicology Letters*. v. 150, p. 19-24. 2004.

ONG, L.; SHAH, N. P. Probiotic Cheddar cheese: influence of ripening temperatures on survival of probiotics microorganisms, cheese composition and organic acid profiles. *Journal of Food Science* 42 1260–1268. 2009.

PARK, Y. W. Rheological characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, V.68, p.73-87, 2007.

PEROTTI, M. G.; MERCANTI, D. J.; BERNAL, S. M.; ZALAZAR, C. A. Characterization of the free fatty acids profile of Pategrás cheese during ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 62 331– 338. 2009.

PERRY, K. S. P.; Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Revista Química Nova*, V. 27, nº 2, 293 – 300. 2004.

PINHO, O.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Queijo, um alimento para todas as idades. Entre o queijo tradicional e os novos alimentos funcionais. *Leite I + D + T*, nº 1. 10 – 11. 2006

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

RAMOS, A. M. *Caracterización reológica y transmisión de calor en derivados de frutas en el interior de tanques agitados*. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universitat de Lleida. 304f. 1997.

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

SANTOS, J.A.F. Análise da textura garante consistência uniforme. *Food Ingredients, South America*, v.11, p.28-29, mar./abr. 2001.

SANTOS, K.M.O.; *Queijos probióticos: alimentos lácteos nutritivos e funcionais*, 2010, Disponível em:

http://www.caprilvirtual.com.br/Artigos/queijos_probioticos_EMBRAPA.pdf, acessado em: 24/04/2012.

SHELLER, M.; O'SULLIVAN, D. J. Comparative analysis of an intestinal strain of *Bifidobacterium longum* and a strain of *Bifidobacterium animalis* subspecies *lactis* in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 94 1122–1131. 2011.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. *Estudos de mercado Sebrae / ESPM: Queijos Nacionais*. 2008. Disponível em: [http://201.2.114.147/bds/BDS.nsf/4416AA3881FA433B832574DC00471EF1/\\$File/NT0003909A.pdf](http://201.2.114.147/bds/BDS.nsf/4416AA3881FA433B832574DC00471EF1/$File/NT0003909A.pdf), acessado em: 12/08/2011.

SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*. V. 27, p. 691-697, 2010.

SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, v.17, p.1262-1267, 2007.

SHEEHAN, J.J.; WILKINSON, M.G.; McSWEENEY, P.L.H. Influence of processing and ripening parameters on starter, no-starter and propionic acid bacteria and on the ripening characteristics of semi-hard cheeses. *International Dairy Journal*, v 18, p. 905-917, 2008.

SOHRABVANDI, S.; MORTAZAVIAN, A.M.; DOLATKHAHNEJAD, M.R.; MONFARED, A.B. Suitability of MRS-bile agar for the selective enumeration of mixed probiotic bacteria in presence of mesophilic lactic acid cultures and yoghurt bacteria. *Iranian journal of biotechnology*, Vol. 10, No. 1. January 2012

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

SOUZA, P. H. M.; SOUZA NETO, M. H.; MAIA, G. A. Componentes funcionais nos alimentos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 37, n. 2, p. 127-135. 2003.

SUDHIR, K.; J.H.A, Y.J.; PRATIBHA, S. Influence of adjuncts as a debittering AIDS in encountering the bitterness developed in cheese slurry during accelerated ripening. *Food Science and Tecchnology*, v. 45, p. 1403-1409, 2010.

TABILO-MUNIZAGA, G.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Rheology for the food industry. *Journal of Food Engineering*, V.67, p.147-156, 2005.

TEEGARDEN, D. The Influence of Dairy Product Consumption on Body Composition. *The Journal of Nutrition*, v.135, n.12, p.2749-52, dec. 2005.

TELLEZ ,A.; CORREDIG, M. BROVKO, Y.; GRIFFITHS, M.W. Characterization of immune-active peptidesmobtained from Milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Dairy Research*, v. 77, p. 129-136, 2010.

TRUONG, V.D.; DAUBERT, C.R.; DRAKE, M.A.; BAXTER, S.R. Vane rheometry for textural characterization of Cheddar cheeses: Correlation with other instrumental and sensory measurements. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 35, pp. 305–314. 2002.

TUOHY, K.M.; PROBERT, H.M.; SMEJKAL, C.W.; GIBSON, G.R. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discovery Today, Haywards Heath*, v.8, n.15, p.692-700, 2003.

WANG, H. K.; DONG, C.; CHEN, Y. F.; CUI, L. M.; ZHANG, H. P. A new probiotics Cheddar cheese with high ACE-inhibitory activity and c-aminobutyric acid content produced with koumiss-derived *Lactobacillus casei*. *Food Technology and Biotechnology*, 48 62–70. 2010.

WOHLGEMUTH, S.; LOH, G.; BLAUT, M. Recent developments and perspectives in the investigation of probiotic effects. *International Journal of Medical Microbiology*, 300:3–10. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*. Córdoba, 2001. 34p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf>. Acesso em: 12/01/2013.

VILLEGAS, B.; TÀRREGA, A.; CARBONELL, I.; COSTELL, E.; Optimising acceptability of new prebiotic low-fat milk beverages. *Food Quality and Preference*, 2009.

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

ZALAZAR, C. A. et al. Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese. *Food Research International*, Ontario, Canada, v. 38, n. 8, p. 597-604. 2004.

ZOMORODI, S.; ASL, A. K.; ROHANI, S. M. R.; MIRAGHAEI, S. Survival of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium bifidum* in free and microencapsulated forms on Iranian white cheese produced by ultrafiltration. *International Journal of Dairy Technology*, 64 84–91. 2011.