

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

NEUSA LYGIA VILARIM PEREIRA

EFEITO DA QUIMOSINA ASSOCIADA AO *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 NAS
CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS DO SORO DE LEITE CAPRINO

JOÃO PESSOA

2020

NEUSA LYGIA VILARIM PEREIRA

**EFEITO DA QUIMOSINA ASSOCIADA AO *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 NAS
CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS DO SORO DE LEITE CAPRINO**

JOÃO PESSOA

2020

NEUSA LYGIA VILARIM PEREIRA

**EFEITO DA QUIMOSINA ASSOCIADA AO *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 NAS
CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS DO SORO DE LEITE CAPRINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Centro de
Tecnologia, da Universidade Federal da Paraíba, em
cumprimento aos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Elieidy Gomes de Oliveira

Co-orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia R. do Egypto Queiroga

JOÃO PESSOA

2020

Catálogo na publicação
Seção de Catálogo e Classificação

P436e Pereira, Neusa Lygia Vilarim.

EFEITO DA QUIMOSINA ASSOCIADA AO *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 NAS CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS DO SORO DE LEITE CAPRINO / Neusa Lygia Vilarim Pereira. - João Pessoa, 2020.

111 f. : il.

Orientação: Maria Elieidy Gomes de Oliveira.

Coorientação: Rita de Cássia R do Egypto Queiroga.

Tese (Doutorado) - UFPB/PPGCTA/CT.

1. Caprinocultura Leiteira, Fermentação, Lactobacilos.
I. Oliveira, Maria Elieidy Gomes de. II. Queiroga, Rita de Cássia R do Egypto. III. Título.

UFPB/BC

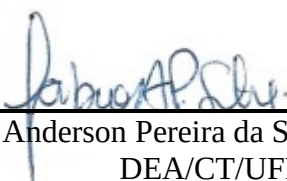
NEUSA LYGIA VILARIM PEREIRA

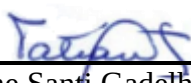
**EFEITO DA QUIMOSINA ASSOCIADA AO *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 NAS
CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS DO SORO DE LEITE CAPRINO**

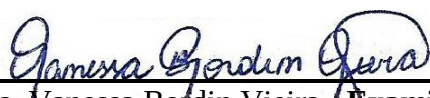
Tese aprovada em 27 de março de 2020

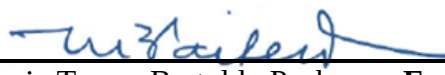
BANCA EXAMINADORA


Profª Dra. Maria Elieidy Gomes de Oliveira - **Presidente da banca examinadora**
DN/CCS/UFPB


Prof. Dr. Fábio Anderson Pereira da Silva - **Examinador interno**
DEA/CT/UFPB


Profª Dra. Tatiane Santi Gadelha - **Examinadora interna**
DBM/CCEN/UFPB


Profª Dra. Vanessa Bordin Vieira - **Examinadora externa**
UAS/CES/UFCG


Profª Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco - **Examinadora externa**
(CCQA/LQ/ITAL)

A minha mãe, Carmen Glória, pelo seu amor incondicional
Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar todos os meus caminhos.

A toda minha família pelo apoio, afago, amor, carinho e compreensão, em especial a minha mãe, Carmen, minha irmã, Nayra, e minha tia, Julieta.

Ao meu amor, Rodrigo, por todos estes anos juntos, compartilhando tantas conquistas. Por todo apoio e carinho que sempre tem comigo para que eu possa ir sempre mais longe.

Aos meus sogros por sempre me incentivarem.

As minhas avós maternas (*in memorian*) que de onde estão velam por mim.

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a. Maria Elieidy Gomes de Oliveira e minha co-orientadora Prof.^a Dr.^a. Rita de Cássia Ramos do Egito Queiroga pelos conhecimentos compartilhados, orientação, apoio e amizade.

A Prof.^a Dr.^a. Tatiane Santi Gadelha por ter aberto as portas do BIOGER e me orientado na escrita do artigo.

Ao Prof. Dr. Marcus Fortes (UNICAMP) por ter me recebido tão bem e pela análise dos GOS.

Ao meu amigo e Prof. Dr Ricardo Moura pelo apoio e por intermediar análise para esta pesquisa.

A todos os professores que passaram pela minha vida, minha eterna gratidão.

Ao ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos – SP) e a Prof. Dra. Maria Teresa Bertoldo pela parceria essencial para a execução deste trabalho, conhecimentos compartilhados e pela acolhida carinhosa. E ainda a equipe de técnicos e pós-graduandos deste Instituto pela importante colaboração em análises laboratoriais.

Aos amigos do Laboratório de Bromatologia, como também do Bioger, pela convivência diária e pelo auxílio nas análises: Fabrícia, Paloma, Fernanda, Tamires, Yasmim, Cecília, Isabel, Joanderson, Júlia.

A Darline, PIBIC desta pesquisa, por todo empenho na execução das análises.

A Joanderson, por ter me guiado no início das minhas análises de proteína.

Ao Prof. Dr. Evandro Leite Sousa e a Prof.^a Dr.^a. Maria Lúcia da Conceição que me deram a primeira oportunidade em realizar uma pesquisa científica.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia e de Bioquímica de Alimentos, onde comecei a dar os primeiros passos na pesquisa: Nereide, Jossana, Rayanne, Helena, Vanessa, Rhayane Edjeyse, Nelson, Camila, Eduardo, Larissa.

Aos meus colegas de curso de graduação, minha eterna gratidão e lembranças os momentos vividos.

Aos meus colegas/amigos da FSM, em especial os professores do Curso de Bacharelado em Nutrição, agradeço o apoio, o carinho, a compreensão e o convívio diário.

Aos meus alunos e ex alunos com quem aprendo a cada dia um pouco mais e a ser um ser humano melhor.

As minhas professoras amigas do 304/112 obrigada por todo carinho e zelo.

As minhas amigas da escola e da vida, em especial, Raquel, Naudiane, Camila, Rayssa, Jordana e Andressa, que me acompanham em todas as fases da minha vida.

A Universidade Federal da Paraíba e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realização deste trabalho.

Aos órgãos de financiamento em pesquisa CAPES e CNPq por todos auxílios recebidos ao longo dos anos.

Ao ex e a ex presidente da República, Lula e Dilma, pelo esmero investimento na educação do ensino superior deste país, em que me permitiu, através de órgãos de financiamento públicos, ter bolsa e auxílios por quase dez anos de dedicação aos estudos.

A todas as mulheres que lutaram, incansavelmente, para que tivéssemos todos os direitos que hoje temos, inclusive este: o de finalizar o doutorado.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente com a realização deste trabalho.

“Mas é preciso ter manha
É preciso ter graça
É preciso ter sonho sempre
Quem traz na pele essa marca
Possui a estranha mania
De ter fé na vida...”

Milton Nascimento

RESUMO

O soro de leite caprino é um bioproduto da fração solúvel do leite, rico em proteínas, peptídeos, lactose, vitaminas e minerais solúveis em água, obtido a partir do processamento de queijos, através da coagulação da caseína, podendo ser: enzimática, ácida e mista. Na obtenção do gel lácteo e do soro, o tipo de processamento e o tipo de leite utilizado influenciam nas características físico-químicas, nutricionais e aspectos sensoriais desses produtos. Apesar destas características, ainda é rejeitado pelos produtores, o que o torna um resíduo de elevado impacto ambiental. Neste estudo, avaliou-se o efeito da quimosina associada ao *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 na composição nutricional, no perfil de carboidratos, ácidos orgânicos, minerais, proteico e aminoacídico de soro de leite caprino. O leite pasteurizado foi submetido a dois tratamentos diferentes do qual originaram 2 tipos de soro de leite caprino: Tratamento 1 obteve-se o S1 (soro de leite caprino obtido na coagulação da caseína pela ação da enzima animal – quimosina) e Tratamento 2 obteve-se o S2 (soro de leite caprino obtido na coagulação da caseína pela ação da quimosina e do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* EM1107). Os soros foram armazenados sob temperatura de refrigeração (4 ± 1 °C), nos tempos 1, 15 e 30 dias, sendo em cada tempo submetidos a liofilização e as análises. O tratamento S2 foi avaliado quanto à viabilidade do micro-organismo probiótico e ambos os tratamentos foram avaliados quanto a composição físico-química, perfil de carboidratos, de ácidos orgânicos, de minerais, de proteína e de aminoácidos. Foi observado a multiplicação do *L. rhamnosus* no soro S2 ao longo do armazenamento, com contagens que variaram de 8,23 a 8,82 log UFC mL⁻¹. Esta multiplicação microbiana resultou na redução dos teores de lactose, com maior produção de ácido láctico, principalmente a partir do 15º dia de armazenamento no S2 ($p \leq 0,05$). Esses dados foram confirmados a partir das análises de perfil de açúcares e de ácidos orgânicos, em que se observaram menores valores do dissacarídeo lactose e de glicose, o que pode comprovar o maior consumo destes açúcares como fonte de energia para o processo fermentativo do *L. rhamnosus* EM1107. Concomitantemente, constatou-se maiores teores de ácido láctico, acético e succínico no S2, detectando o aumento do teor de acidez ao longo do armazenamento. Ambos os soros não apresentaram diferença estatística para os GOS ($p > 0,05$). Ca, seguido de Mg, foram os minerais em maior concentração, com destaque para o S2. O aumento da contagem microbiana ($p \leq 0,05$) também provocou redução dos teores de proteínas, aumento do grau de hidrólise, consumo e hidrólise de proteínas, aumento de aminoácidos livres e formação de peptídeos com maior caráter hidrofílico. Ambos os tratamentos apresentaram conteúdo de aminoácidos que atenderam aos padrões da FAO/OMS, com destaque para o S2. α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina permaneceram em todas os tratamentos e em todos os tempos. Ambas as matrizes apresentam peculiaridades em sua composição que podem ser preponderantes na determinação de sua aplicação, podendo ser utilizadas como um ingrediente bioativo para a formulação de diversos produtos alimentícios funcionais, além de atuarem como uma matriz alimentar de entrega, visto que mantém em contagens viáveis o micro-organismo *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 ao longo do armazenamento.

Palavras-chave: Caprinocultura Leiteira, Alimentos Funcionais, Ação Enzimática, Fermentação, Composição Nutricional, Lactobacilos

ABSTRACT

Goat whey is a bioproduct of the soluble fraction of milk, rich in proteins, peptides, lactose, water-soluble vitamins and minerals, obtained from the processing of cheeses, through the coagulation of casein, which can be: enzymatic, acidic and mixed. In obtaining the milk gel and whey, the kind of processing and the kind of milk used influence the physical-chemical, nutritional and sensory aspects of these products. Despite these characteristics, it is still rejected by producers, which makes it a waste with a high environmental impact. In this study, the effect of chymosin associated with *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 on nutritional composition, on the profile of carbohydrates, organic acids, minerals, protein and amino acid of goat whey was evaluated. Pasteurized milk was subjected to two different treatments from which two kinds of goat whey originated: Treatment 1 obtained W1 (goat whey obtained from the coagulation of casein by the action of the animal enzyme - chymosin) and Treatment 2 obtained if W2 (goat whey obtained from the coagulation of casein by the action of chymosin and the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* EM1107). Whey were stored under refrigeration temperature (4 ± 1 ° C), at times 1, 15 and 30 days, each time being subjected to lyophilization and analysis. Treatment W2 was evaluated for the viability of the probiotic microorganism and both treatments were evaluated for physical-chemical composition, carbohydrate profile, organic acids, minerals, protein and amino acids. The multiplication of *L. rhamnosus* in W2 was observed during storage, with counts ranging from 8.23 to 8.82 log UFC mL⁻¹. This microbial multiplication resulted in a reduction in lactose levels, with a higher production of lactic acid, mainly after the 15th day of storage in W2 ($p \leq 0.05$). These data were confirmed from the analysis of the profile of sugars and organic acids, in which lower values of the disaccharide lactose and glucose were observed, which may prove the greater consumption of these sugars as an energy source for the fermentation process of *L. rhamnosus* EM1107. Concomitantly, higher levels of lactic, acetic and succinic acid were found in W2, detecting the increase in acidity content during storage. Both wheys didn't show statistical difference for GOS ($p > 0.05$). Ca, followed by Mg, were the minerals in greatest concentration, with emphasis on W2. The increase in microbial count ($p \leq 0.05$) also caused a reduction in protein levels, an increase in the degree of hydrolysis, protein consumption and hydrolysis, an increase in free amino acids and the formation of peptides with a greater hydrophilic character. Both treatments had amino acid content that met FAO/WHO standards, with emphasis on W2. α -Lactoalbumin and β -Lactoglobulin remained in all treatments and at all times. Both matrices have peculiarities in their composition that can be preponderant in determining their application, and can be used as a bioactive ingredient for the formulation of several functional food products, in addition to acting as a delivery food matrix, since it keeps in viable counts the *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 microorganism during storage.

Keywords: Dairy goats, Functional foods, Enzyme action, Fermentation, Nutritional composition, *Lactobacillus*

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1. Composição físico-química de soros de leite caprino resultantes do processo de coagulação láctea por ação da quimosina isolada ou associada ao <i>Lactobacillus rhamnosus</i> EM1107.....	71
Tabela 2. Perfil de carboidratos de soros de leite caprino resultantes do processo de coagulação láctea por ação da quimosina isolada ou associada ao <i>Lactobacillus rhamnosus</i> EM1107.....	73
Tabela 3. Perfil de ácidos orgânicos de soros de leite caprino resultantes do processo de coagulação láctea por ação da quimosina isolada ou associada ao <i>Lactobacillus rhamnosus</i> EM1107.....	75
Tabela 4. Perfil de minerais de soros de leite caprino resultantes do processo de coagulação láctea por ação da quimosina isolada ou quando associada ao <i>Lactobacillus rhamnosus</i> EM1107.....	77

Artigo 2

Tabela 1. Essential and non-essential amino acids from goat whey resulting from the milk coagulation process by isolated chymosin action or associated with <i>Lactobacillus rhamnosus</i> EM1107.....	97
---	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Apresentação dos dois estágios envolvidos na coagulação leite pelo coalho.....	25
Figura 2 – Desenho esquemático dos vários processos que ocorrem durante a coagulação do leite pelo coalho.....	25
Figura 3 – Delineamento experimental.....	38
Figura 4 - Fluxograma do preparo do soro de leite tradicional e probiótico.....	40

Artigo 1

Figura 1 – Viabilidade do <i>L. rhamnosus</i> EM1107 no soro de leite caprino S2 durante armazenamento refrigerado.....	69
--	----

Artigo 2

Figura 1. Soluble protein (—) and degree of hydrolysis (····) of goat whey resulting from the milk coagulation process by the action of isolated rennin (■) or associated with <i>Lactobacillus rhamnosus</i> EM1107 (●).....	92
Figura 2. SDS-PAGE of the W1 and W2 goat whey proteins.....	94
Figura 3. Free amino acid profile (mg/g protein) in whey samples obtained from milk coagulation by the isolated rennin enzyme action (W1, ■) and whey obtained from milk coagulation by the associated action of rennin and <i>Lactobacillus rhamnosus</i> EM1107 (W2, ■).....	100
Figura 4. Hydrophilicity profile of goat whey obtained from milk coagulation by the isolated rennin enzyme action (W1) and whey obtained from milk coagulation by the associated action of rennin and <i>Lactobacillus rhamnosus</i> EM1107 (W2).....	102

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AACR - Aminoácidos de Cadeira Ramificada

ANOVA - Análise de variância

AOAC - Association of Official Analytical Chemists

FAO – Food and Agriculture Organizations

ITAL- Instituto de Tecnologia de Alimentos

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

β -Lg - β -Lactoglobulina

α -Lg - α -Lactoalbumina

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

TCA - Ácido tricloroacético

TEMED - N - N' - N'' - N''' - tetrametiletilnodiamina

TRIS - Tris (hidroximetil)-aminometano

UFC - Unidade formadora de colônia

UNICAMP - Universidade de Campinas-SP

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 LEITE CAPRINO.....	20
2.2 TIPOS DE COAGULAÇÃO DO LEITE PARA A PRODUÇÃO DE QUEIJOS.....	23
2.2.1 Tipos de micro-organismos utilizados em queijos obtidos por coagulação mista.....	26
2.3 SORO DE LEITE CAPRINO.....	29
2.4 PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS BIOATIVOS DO SORO DE LEITE DE CABRA.....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 MATÉRIA-PRIMA E LOCAL DE EXECUÇÃO.....	37
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	37
3.3 PREPARO DO INÓCULO E OBTENÇÃO DOS SOROS DE LEITE CAPRINOS.....	39
3.4 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA DOS SOROS DE LEITE E VIABILIDADE DO <i>Lactobacillus rhamnosus</i> EM1107 AO LONGO DO ARMAZENAMENTO.....	41
3.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E QUÍMICAS DOS SOROS DE LEITES.....	41
3.5.1. Análises físico-químicas.....	41
3.5.2 Análises químicas.....	41
3.5.2.1 Perfil de carboidratos.....	41
3.5.2.2 Perfil de ácidos orgânicos.....	42
3.5.2.3 Perfil de minerais.....	43
3.5.2.4. Perfil proteico.....	43
3.5.2.4.1 Preparo das amostras de soros de leites.....	43
3.5.2.4.2 Determinação de proteína solúvel.....	43
3.5.2.4.3 Grau de hidrólise.....	44
3.5.2.4.4 Análise do perfil eletroforético.....	45
3.5.2.4.5 Análise de Aminoácidos Totais e Livres.....	45

3.5.2.4.6 <i>Análise de Triptofano</i>	46
3.5.2.4.7 <i>Perfil de Hidrofilicidade</i>	46
3.5.2.4.8 <i>Espectrometria de Massas dos soros de leite caprino</i>	47
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	47
REFERÊNCIAS	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1 ARTIGO 1.....	62
4.2 ARTIGO 2.....	86
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	110

1 INTRODUÇÃO

O leite de cabra é um alimento completo e de alto valor nutricional que confere benefícios à saúde humana em virtude, principalmente, da sua atividade de modulação das funções fisiológicas e suas propriedades redutoras de risco de doenças crônicas, quando comparado ao leite bovino, caracterizando-o como produto funcional (OLIVEIRA et al., 2011; GARCIA et al., 2014). O crescente interesse do consumidor pelo leite de cabra e seus derivados está relacionado aos benefícios nutricionais oferecidos por esses produtos, visto que apesar da composição semelhante ao leite de vaca em relação ao conteúdo de proteínas, gorduras e lactose, existem diferenças que afetam a digestibilidade e valor nutricional do leite caprino (CLARK; GARCÍA, 2017).

O leite de cabra possui compostos promotores de saúde, como peptídeos bioativos, ácidos linoleicos conjugados e oligossacarídeos (ABEIJÓN MUKDSI et al., 2013; ASSIS et al., 2016; KULLISAAR et al., 2003; SALVA et al., 2011; SONGISEPP et al., 2005; VERRUCK et al., 2019). Esses nutrientes também auxiliam no processamento e comercialização de seus derivados lácteos (PARK et al., 2007), podendo ser empregado na produção de uma ampla variedade de produtos, como bebidas, leite UHT, sorvetes, manteigas, doces e produtos fermentados, como iogurtes e queijos (ARYANA, OLSON, 2017; SILINIKOVE et al., 2010; FAZILAH, et al., 2018; KALYANKAR et al., 2016).

O soro de leite é obtido a partir da coagulação enzimática, ácida ou mista da caseína, resultante do processamento do queijo. Em particular, a coagulação enzimática é a mais utilizada no processo de fabricação de queijos, devido, principalmente, ao maior rendimento obtido em relação a coagulação ácida. A coagulação da caseína ocorre em dois estágios: o de hidrólise enzimática e o de agregação. As enzimas utilizadas na coagulação podem ser oriundas de animais, vegetais e/ou de micro-organismos, que podem ser usadas isoladamente ou misturadas entre si. Na obtenção do gel lácteo e do soro, o tipo de processamento e o tipo de leite utilizado influenciam nas características físico-químicas, nutricionais e aspectos sensoriais desses produtos (AQUARONE et al., 2001; FREITAS et al., 2016; GREGERSEN, LUCEY, 2016). O uso de culturas probióticas, a exemplo do gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, quando adicionadas em leite caprino para processamento de seus derivados, mostraram melhor eficiência de utilização dos nutrientes presentes, com melhor produção de metabólitos com propriedades bioativas para a saúde humana, quando comparado a adição em leite bovino na elaboração de seus derivados (BALAKRISHNAN; AGRAWAL, 2014; CHAMPAGNE et al., 2018).

O soro de leite caprino é rico em proteínas, peptídeos, lactose, vitaminas e minerais solúveis em água, sendo considerado um produto valioso e importante para a indústria de alimentos, como ingrediente funcional. O soro de leite, obtido da produção de queijos, corresponde de 85 a 95% em volume da quantidade do leite utilizado para a produção e possui cerca de 55% dos nutrientes do leite. Apesar destas características, o soro ainda é rejeitado pelos produtores, o que o torna um resíduo de elevado impacto ambiental, ocasionando uma contaminação hídrica e do solo, como também a redução da demanda bioquímica de oxigênio de afluentes. A sua utilização na composição de diversos produtos alimentícios reduz o seu desperdício e, geralmente, esses produtos possuem valor de mercado mais acessível (SANMARTÍN et al., 2012; SILVEIRA et al., 2015).

A lactose é o principal carboidrato presente no soro de leite caprino, sendo considerada um valioso nutriente, por favorecer a absorção intestinal de cálcio, magnésio, fósforo e da vitamina C. Pesquisas tem demonstrado o potencial da lactose e dos oligossacarídeos do soro de leite caprino como agentes prebióticos, anti-infecciosos, anti-inflamatórios, anti-adesivos e antipatogênicos, que são imprescindíveis para o sistema imunológico (KISKINI; DIFILIPPO, 2013; LARA-VILLOSLADA et al. 2006; MEYRAND et al., 2013), atribuindo a essa matriz alimentar propriedades funcionais.

A lactoglobulina e a lactoalbumina são as principais proteínas contidas no soro de leite caprino. A hidrólise dessas proteínas pode dar origem a peptídeos bioativos, capazes de realizar atividades biológicas específicas, como: anti-hipertensiva, antimicrobiana, antioxidante, anti-hipercolesterolêmica e imunomoduladora (HAENLEIN, 2004; VERRUCK et al 2019; YALÇIN et al., 2006). Além disso, estas proteínas contribuem no controle do peso corporal, fornecendo sinais de saciedade que induzem na ingestão de alimentos a curto ou longo prazo (HERNANDEZ-LEDESMA et al., 2011; MADUREIRA et al., 2010). O uso de soro de leite caprino na alimentação humana pode ser uma alternativa interessante na substituição das proteínas bovinas nos alimentos, uma vez que esta última tem um potencial alergênico superior (SANMARTÍN et al., 2013).

No que se refere aos minerais, o soro de leite caprino se destaca pela presença de sódio, cálcio, fósforo, potássio, magnésio e cloro. O sódio, o potássio e o cloro estão quase totalmente solúveis e disponíveis. O cálcio, o magnésio e o fósforo estão associados em proporções diferentes da suspensão coloidal de micelas de caseína. Desta forma, quando usado como ingrediente, o soro eleva o valor nutricional do produto devido ao seu alto teor de minerais (HERNANDEZ-LEDESMA et al., 2011; MONTORO et al., 2015).

As características nutricionais do soro de leite caprino podem ser alteradas conforme o método de coagulação na produção do queijo. No entanto, ainda não foram propostas pesquisas que evidenciem o perfil químico do soro de leite caprino obtido da coagulação por ação de diferentes tipos de enzimas: animal e/ou, microbiana, por exemplo. A adição do probiótico gera produtos lácteos fermentados que estão associados a benefícios, como: melhora da tolerância à lactose, equilíbrio da microbiota (ASSIS et al., 2016; HODGKINSON et al., 2018), atividade antimicrobiana, estimulação do sistema imune (HAELLEN, 2004), propriedades anticarcinogênicas (RANADHEERA et al., 2018), antiolesterolêmicas e antioxidantes em humanos (ELWOOD et al., 2010; KULLISAAR et al., 2003; ZHANG et al., 2015).

Diante do exposto, esta pesquisa objetivou avaliar o perfil químico do soro de leite de cabra obtido por coagulação da caseína por ação da quimosina isolada ou associada ao *Lactobacillus rhamnosus* EM1107, certificando seu potencial funcional e de utilização pelo consumidor na sua forma *in natura* ou como possível ingrediente na formulação de produtos alimentícios.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEITE CAPRINO

O leite é um alimento essencial na alimentação humana, sendo utilizado como constituinte básico na dieta em todas as faixas etárias. Por possuir alta digestibilidade, ser fonte de cálcio, magnésio e de proteínas de elevado valor biológico, o leite é um dos produtos mais completos do ponto vista nutricional, o que promove o crescimento de sua comercialização, como também dos produtos derivados (HEJTMÁNKOVÁ et al., 2012). Dentre os leites que mais vem se destacando em mercado, está o leite caprino (MEYRAND et al., 2013).

O interesse do consumidor pelo leite de cabra e seus derivados está em ascensão, devido aos benefícios nutricionais. Entre as características químicas que se destacam no leite caprino, tem-se a composição de aminoácidos, a estrutura secundária das proteínas do leite e as propriedades químicas que auxiliam a reduzir o potencial alergênico quando comparado ao leite de vaca, podendo ser uma alternativa de relevância na alimentação infantil (CLARK; GARCÍA, 2017; GARCIA et al., 2014; PARK et al., 2007).

O crescimento da caprinocultura leiteira está associado proporcionalmente aos investimentos financeiros aplicados, pesquisas científicas desenvolvidas, bem como a intensificação dos sistemas de criação dos animais, incluindo aspectos de melhoramento em relação a dietas balanceadas e seleção genética (PARK et al., 2007; PIRISI et al., 2011). Os constituintes químicos do leite de cabra podem ser influenciados por fatores genéticos, fisiológicos, climáticos e pelo manejo (QUEIROGA et al., 2009).

Os maiores produtores de leite de cabra no mundo são a Índia, Bangladesh e Paquistão, na Ásia; Sudão, Sudão do Sul e Somália, na África; a França, seguida da Espanha e da Grécia como os maiores produtores da Europa. Embora a produção de leite de cabra ainda seja pequena nos Estados Unidos, demonstrou um aumento substancial nos últimos anos (FAOSTAT, 2018).

Nas regiões da Europa, Oceania e América do Norte e do Sul, a produção de leite de cabra e de seus derivados tornou-se uma atividade lucrativa e importante para o mercado, visto que os produtos caprinos são vendidos e apreciados pelos consumidores. A indústria da produção de queijo é fundamental em países como a França e a Itália, onde o queijo caprino é considerado como um alimento *gourmet* e recebe os preços mais elevados entre as variedades de queijos. Além disso, a caprinocultura leiteira faz parte de um setor tradicional e

fundamental da economia nacional em muitos países do Mediterrâneo, como Espanha, Grécia, Turquia e Marrocos (PARK et al., 2007; SILANIKOVE et al., 2010).

Os caprinos têm um papel importante na nutrição humana, devido a qualidade nutricional da carne, do leite e dos produtos derivados (SILANIKOVE et al., 2010). Para estimular o desenvolvimento econômico nas áreas rurais do Brasil, o leite de cabra é vendido para o governo e usado em programas sociais (OLIVEIRA et al., 2011). A produção leiteira caprina ou bovina destinada ao consumo *in natura* ou na elaboração de derivados é crescente na região do Nordeste brasileiro, destacando-se os Estados da Paraíba e do Rio Grande do Norte, onde a atividade representa uma alternativa de emprego e renda para a agricultura familiar (SILVA et al., 2011).

No Semiárido paraibano, os produtores iniciaram a atividade da caprinocultura de forma mais organizada e definida com a criação do “Programa do Leite” em 2003, quando receberam incentivos por meio da aquisição de leite pelo governo estadual e das ações desenvolvidas pelo “Pacto Novo Cariri” que, entre outras atividades, promoveu a aquisição, industrialização e distribuição de leite (RIET-CORREA et al., 2013). Até então, foi crescente a demanda pelo leite caprino e, segundo o IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, o rebanho nacional possui cerca de 8.851.879 milhões de caprinos, mais de 90% está concentrado na região Nordeste, sendo o Estado da Paraíba ocupante do 5º lugar no efetivo total, com aproximadamente 510 mil caprinos (IBGE, 2014).

O leite caprino ressalta-se como um alimento funcional, por ser uma fonte natural de oligossacarídeos; elevada qualidade proteica; fração lipídica diferenciada e alto teor de minerais. O nível de ácidos graxos coincide com o do leite materno, sendo encontrados ácidos graxos saturados e insaturados, como: oleico, linoléico, linolênico e araquidônico. O linoléico, linolênico e ácido linoleico conjugado (CLA) tem ação cardioprotetora, atuando como anti-aterogênico vascular, anti-carcinogênico e no melhoramento das funções do sistema imunológico (BUENO, 2005; BAUMAN et al., 2011; ELWOOD et al., 2010; HAENLEIN, 2004; HAENLEIN et al., 2011).

A fração lipídica do leite caprino é composta, principalmente, por triacilgliceróis (~98% da gordura total), com quantidades menores de fosfolípidios, colesterol, ácidos graxos livres e mono- e diacilgliceróis (TAYLOR; MACGIBBON, 2011). A gordura no leite de cabra está presente na forma de glóbulos, que não se agregam naturalmente após o resfriamento, pois não possuem aglutinina, proteína responsável pela agregação de glóbulos de gordura no leite de vaca (AMIGO; FONTECHA, 2011). Além disso, o menor tamanho dos glóbulos de gordura do leite caprino, com diâmetros inferiores a 3 µm, é um dos fatores que

aumenta sua digestibilidade e garante um metabolismo lipídico eficaz, bem como, influencia na textura e maciez dos produtos derivados (RAYANAL-LJUTOVAC et al., 2011). Como dito anteriormente, a melhor digestibilidade do leite de cabra comparado ao leite de vaca também está relacionada às diferenças na composição dos ácidos graxos. Os ácidos cáprico, caprílico e capróico representam em média 15–18% de todos os ácidos graxos presentes no leite de cabra, enquanto os mesmos ácidos graxos representam apenas 5–9% dos ácidos graxos do leite de vaca, sendo responsáveis também pelas características de aroma, o que normalmente contribui para a sua baixa aceitação, que faz com que o leite caprino seja mais utilizado na produção de derivados fermentados (AMIGO; FONTECHA, 2011; CLARK; GARCÍA, 2017).

Em relação ao teor de proteína, como no leite de vaca, as caseínas do leite de cabra são classificadas como κ -, β -, α s1-, α s2- e γ -caseínas e as proteínas do soro como β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, albumina sérica e imunoglobulinas. O teor de caseína no leite de cabra representa 74% do total de proteínas do leite, as proteínas do soro chegam a quase 17% e a proporção de compostos nitrogenados não proteicos é de 9% (AL-SAADI et al., 2014). As diferenças entre as proteínas entre as espécies estão relacionadas a polimorfismos genéticos e suas frequências nas populações de caprinos (RAYANAL-LJUTOVAC et al., 2008), principalmente em relação à α s1-caseína, sendo presente em 3,9% no caprino e 33,7% no bovino (SILVA et al., 2007; TOMATAKE et al., 2006). Portanto, a proporção de micelas de caseína de pequeno tamanho é maior no leite de cabra do que no leite de vaca, o que explica a melhor digestibilidade do leite de cabra e seus derivados (HAELEIN, 2004).

Outro aspecto importante sobre as proteínas do leite de cabra é a hipoalergenicidade. A alergia às proteínas do leite, especialmente ao leite bovino, é uma reação adversa à ingestão, necessariamente imunomodulada e classificada como mediada por IgE (Imunoglobulina E), não mediada por IgE ou misturada (FIOCCHI et al., 2010; KOLETZKO et al., 2012). Elsayed et al. (2004) demonstraram que os peptídeos N e C-terminais da α S1-caseína do leite bovino, 16–35 e 136–155, respectivamente, têm maior afinidade de ligação à IgE, enquanto os epítomos 17–36, 39–48, 69–8, 93–102, 109–120, 123–132, 139–154, 159–174 e 173–194 foram reconhecidos como ligantes de IgE em crianças (VILA et al., 2001). A β -lactoglobulina também é considerada, por muitos pesquisadores, como responsável pela alergia à proteína do leite de vaca, devido à sua alta resistência à hidrólise intestinal e ao fato de não ser encontrado no leite humano (BU et al., 2013; CHATCHATEE et al., 2001; RUITER et al., 2006; VERHOECKX et al., 2015).

Com relação aos carboidratos, a lactose é o constituinte majoritário no leite caprino, sendo o conteúdo em média de 0,2 – 0,5% inferior ao bovino, embora não seja recomendado para os intolerantes (CEBALLOS et al., 2009; SILANIKOVE et al., 2010). Os oligossacarídeos derivados da lactose estão em quantidades maiores neste leite em relação ao bovino e ao ovino, o que confere uma série de benefícios à nutrição humana (KUNZ et al., 2000; MEYRAND et al., 2013).

Park et al. (2007) relatam que os oligossacarídeos do leite de cabra têm propriedades antigênicas consideráveis e são valiosas na promoção do crescimento da flora intestinal em recém-nascidos. A concentração de oligossacarídeos do leite de cabra também é maior do que a do leite de vaca e de ovelha (KISKINI; DIFILIPPO, 2013). Estes são estruturalmente mais semelhantes aos oligossacarídeos do leite materno quando comparados com outras espécies de ruminantes (GIORGIO et al., 2018). As semelhanças encontradas entre os oligossacarídeos do leite de cabra e do leite materno estão relacionadas à presença de estruturas neutras (galactosil-lactose e lacto-N-hexose) e sialiladas (3-6-sialil-lactose e dissialil-lactose) (MARTINEZ-FEREZ et al., 2006). Lara-Villoslada et al. (2006) verificaram que os oligossacarídeos do leite de cabra reduziram a inflamação intestinal em ratos e contribuíram para a recuperação da mucosa do cólon danificada. Estes estudos vêm comprovando e ratificando as propriedades funcionais do leite de cabra, bem como discutindo os efeitos dos compostos bioativos para a saúde humana. Os oligossacarídeos são fundamentais no desenvolvimento infantil, com funções anti-inflamatórias, anti-adesivas, antipatogênicas e no sistema imunológico, sendo também utilizados na suplementação em fórmulas lácteas como fontes alternativas ao leite materno (MARTINEZ-FEREZ et al., 2006; MEYRAND et al., 2013; PARK et al., 2009; RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2008;).

Com relação aos micronutrientes, o leite caprino possui níveis mais elevados de Ca, P, Mg, Fe e Cu quando comparado ao leite de vaca, além de maior conteúdo de vitamina A. Esses componentes possuem maior biodisponibilidade no leite de cabra, o que auxiliaria nos processos digestivos e metabólicos (AMIGO; FONTECHA, 2011; ALFÉREZ et al., 2006; CEBALLOS et al., 2009).

Diante do que foi exposto, é notório a relevância do leite caprino na saúde humana pela sua potencialidade nutricional, funcional e tecnológica, sendo, cada vez mais utilizado no desenvolvimento de derivados lácteos, entre eles os queijos, que por sua vez podem ser obtidos a partir de diferentes tipos de coagulações. Os derivados lácteos são objetos de diversos estudos, devido a sua alegação de propriedade funcional.

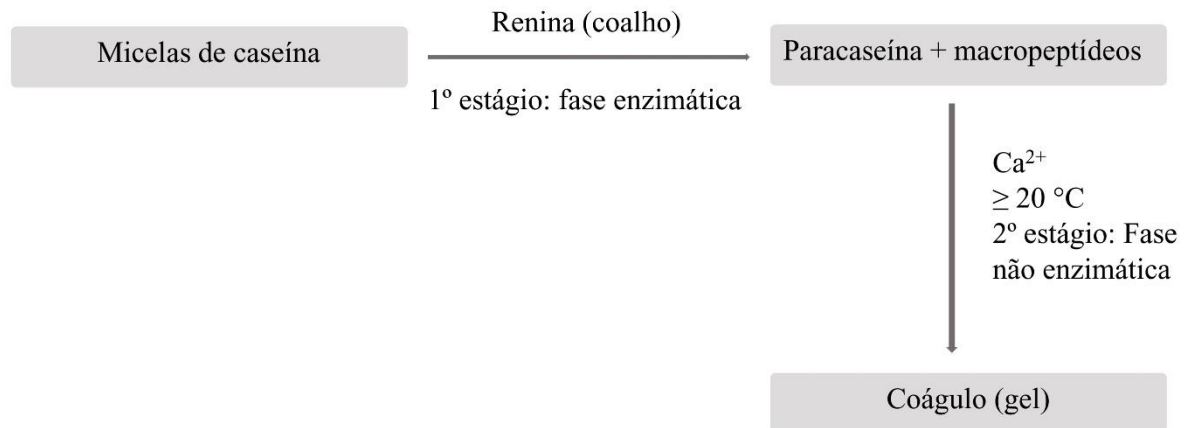
2.2 TIPOS DE COAGULAÇÃO DO LEITE PARA A PRODUÇÃO DE QUEIJOS

A coagulação do leite para produção de queijos pode ser realizada de três formas: enzimática, ácida e mista. Cada uma dessas coagulações leva à formação de gel lácteo com características físico-químicas e nutricionais distintas, além dos aspectos sensoriais. A partir disso, o queijo é produzido, através da precipitação das caseínas e o soro obtido é derivado dessa precipitação. O soro de leite pode ser denominado doce quando a coagulação for enzimática e ácido quando for por coagulação ácida (AQUARONE et al., 2001; FREITAS et al., 2016).

A caseína é a proteína majoritária do leite, sendo classificada como α_1 , α_2 , β - e κ -caseína (DALGLEISH, 2011). Essas proteínas naturalmente se associam umas às outras e com o fosfato de cálcio coloidal, formando estruturas altamente estáveis chamadas micelas de caseína (DE KRUIF et al., 2012; HORNE, 2002). Embora possuam estabilidade, as proteínas do leite podem ser prontamente desestabilizadas pela acidificação ou adição de proteases específicas, promovendo coagulação, o que resulta na formação de uma coalhada, que é base de muitos alimentos, como queijo e iogurte (WALSTRA et al., 2006).

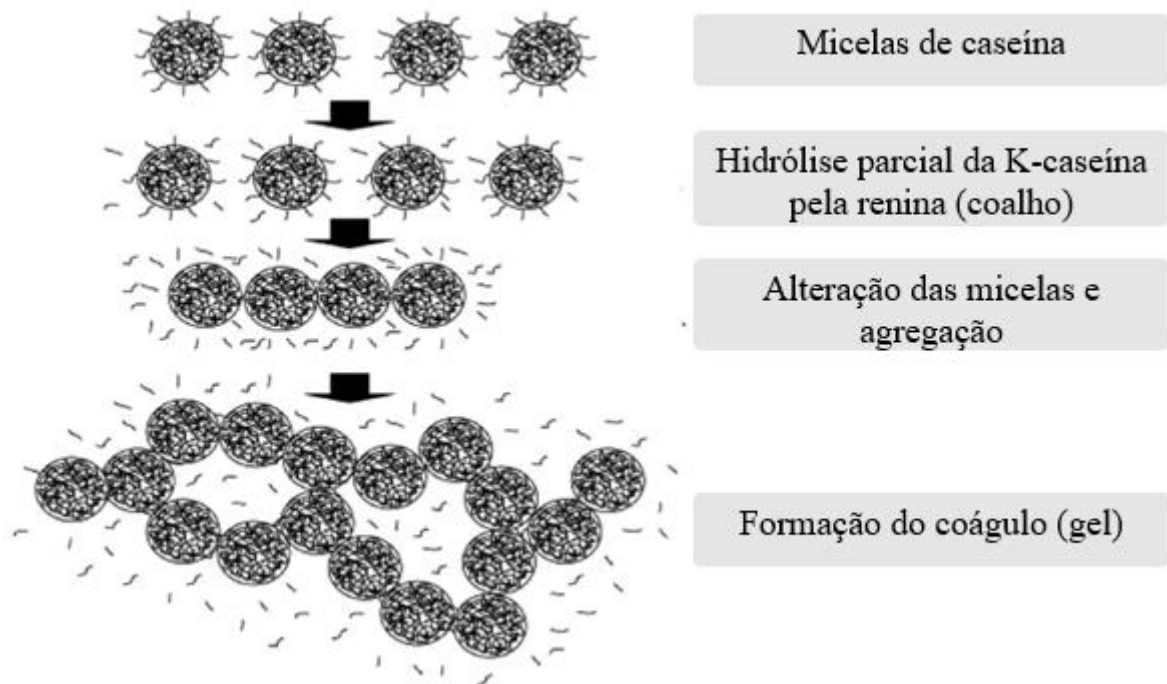
A coagulação enzimática e mista é a mais utilizada no processo de fabricação de queijos, devido, principalmente, ao maior rendimento obtido em relação à coagulação ácida (AQUARONE et al., 2001). Para o êxito da coagulação enzimática, é necessário que após a pasteurização do leite, este seja mantido a uma temperatura entre 32 °C e 36 °C, e receba os ingredientes: cloreto de cálcio (para repor o cálcio perdido na pasteurização, e formar as pontes de ligações peptídicas) e a enzima quimosina (renina), conhecida como coalho, uma fosfoproteína de ação proteolítica presente no estômago de ruminantes jovens. A hidrólise da ação enzimática gera a lise da ligação entre os aminoácidos Phe105 – Met106 com formação da para-k-caseína e do macropeptídeo, o que corresponde ao primeiro estágio de coagulação. Essa alteração resulta em uma redução tanto da carga negativa líquida quanto da repulsão eletrostática, de tal forma que as micelas alteradas pelo coalho se tornam suscetíveis à agregação, o que corresponde ao segundo estágio, e, após uma fase de defasagem, é formada uma rede de gel tridimensional, chamada coágulo (EGITO et al., 2007; GREGERSEN; LUCEY, 2016; LUCEY, 2011), o que pode ser observado nas Figuras 1 e 2. Este processo enzimático é dependente da temperatura, do pH e do teor de cálcio do leite. Por exemplo, a temperatura ótima de ação do coalho é em torno de 40 °C, mas costuma-se utilizar temperaturas ligeiramente mais baixas (aproximadamente 35 °C) para evitar que a coalhada fique muito dura (GREGERSEN, LUCEY, 2016; PERRY, 2004).

Figura 1 – Apresentação dos dois estágios envolvidos na coagulação leite pelo coalho.



Fonte: Adaptado de Gregersen e Lucey (2016).

Figura 2 – Desenho esquemático dos vários processos que ocorrem durante a coagulação do leite pelo coalho.



Fonte: Adaptado de Gregersen e Lucey (2016).

Na coagulação mista, além dos ingredientes usados na coagulação enzimática, é adicionado um ácido e uma cultura bacteriana, que pelo seu processo natural de fermentação também produzirá ácidos modificando o pH. Na coagulação, as enzimas utilizadas podem ser oriundas de animais, vegetais e/ou de micro-organismos, podendo ser adicionadas

isoladamente ou em conjunto. A junção de enzimas pode proporcionar, entre outros efeitos, um ajuste da taxa de proteólise durante a maturação, a um nível desejado (EGITO et al., 2007). Outro método de coagulação da caseína é o método ácido, em que se adiciona ácido (ácido láctico, cítrico ou acético) ao leite em quantidade suficiente para igualar o pH do meio ao ponto isoeletrico da proteína (pH 4,5). Neste pH, as micelas de caseína agregam-se e precipitam-se, porém, o método fornece queijos de qualidade tecnológica e sensorial inferior aos produzidos pelo método enzimático e misto, não obtendo um bom rendimento na massa e no soro (PERRY, 2004).

A coagulação enzimática com o uso da quimosina (coalho) tem várias vantagens importantes sobre a coagulação ácida mediada, principalmente, por ação microbiana; sendo que a ácida inclui uma coagulação mais rápida (em minutos) em comparação com a microbiana, cuja a coagulação é mais lenta, podendo ser realizada por culturas iniciadoras ou *starters*, as quais requerem a redução do pH para coagular o leite na produção de queijos, tais como *Cottage*. Para acelerar esse processo de coagulação do leite por ação microbiana, recomenda-se a acidificação direta por ação de algum ácido orgânico, como ácido láctico ou ácido acético. Os géis de leite coagulados enzimaticamente também sofrem muito mais sinérese do que géis de leite ácido, o que auxilia na produção de queijos com menores níveis de umidade. Na maioria dos queijos, as culturas iniciadoras são adicionadas para reduzir o pH, que ajuda a melhorar e manter a qualidade, tornando-se menos perecível, além de alterar atributos como textura e sabor durante a maturação (GREGERSEN, LUCEY, 2016).

2.2.1 Tipos de micro-organismos utilizados em queijos obtidos por coagulação mista

A adição da cultura *starter* é fundamental na coagulação mista. Trata-se de uma preparação microbiana com células vivas ou em dormência e recebe esta denominação por iniciar a fermentação. As bactérias ácido lácticas ocupam papel central nesse processo fermentativo e possuem utilização segura durante a produção de alimentos e de bebidas, incluindo diversos tipos de queijos, iogurtes. Na coagulação do leite, para a fabricação do queijo, as mais utilizadas são as culturas mesófilas homofermentativas constituídas principalmente de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Os *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* são levemente proteolíticos, com reduzida produção de gás, produzindo sabor e aroma puro, fresco e ácido ao queijo. O *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* atua como principal acidificante, sendo mais proteolítico, produzindo um sabor mais

ácido e uma textura consistente, atuando principalmente nos estágios iniciais da maturação do queijo (LEROY et al., 2004; MADUREIRA, et al., 2011).

A homofermentação é caracterizada pela conversão de hexoses em ácido láctico. Na heterofermentação, as hexoses são convertidas tanto em ácido láctico, quanto em etanol e/ou ácido acético, gás carbônico e ATP (via 6-fosfogluconato/fosfocetolase). Entretanto, esta fermentação também pode ser realizada de forma facultativa, em que as hexoses podem ser convertidas em ácido láctico, semelhantemente à homofermentação, ou, em alguns casos, serem convertidas em ácido acético e/ou etanol, dependendo da estirpe utilizada (GOMES, MALCATA, 1999; VASILJEVIC, SHAH, 2008). Com relação ao emprego no processamento de alimentos, as bactérias homofermentativas estão em maior destaque.

Na revisão de Gatti et al. (2014) foi observado que lactobacilos heterofermentativos facultativos eram predominantes em queijos e nos derivados lácteos, tanto nos estágios da maturação, como também na vida de prateleira destes produtos. Dentre estes micro-organismos, destacam-se: *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus plantarum*, juntamente com *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus casei*. Provavelmente, a predominância destas espécies é devido à elevada tolerância às condições adversas do ambiente, como temperatura, umidade, circulação de ar, de amadurecimento e do local em que são estocados. Além das bactérias ácido lácticas *starter*, também podem ser utilizados no processamento de fermentados bactérias probiótica, principalmente as do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*.

Os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* estão entre os micro-organismos mais estudados para atuarem como probióticos (ANTUNES et al., 2007; DU TOIT et al., 2011; HILL et al., 2014). *Lactobacillus* são bactérias ácido lácticas em forma de cocos ou bacilus, possuem temperatura ótima de 25 °C a 30 °C, sendo consideradas neutrófilas (pH ótimo de 5,5 a 6,0). Estes micro-organismos apresentam características diferentes dependendo da espécie, podendo tolerar o oxigênio ou serem anaeróbicas, homofermentativas ou heterofermentativas, obrigatórias ou facultativas (DU TIOIT et al., 2011). Os *Bifidobacterium* são anaeróbicos, com crescimento em temperatura de 36 a 43 °C e pH de 6,0 a 7,0, sendo tolerado 4,5 e 8,5. São heterofermentativos, produzem ácido acético, além do ácido láctico, dependendo da espécie essa produção pode ser mais intensa (CRONIN et al., 2011; RODRIGUES et al., 2011).

Para que uma cepa alcance o status de probiótico é necessário realizar a identificação genotípica e fenotípica com determinação de gênero, espécie e subtipo; avaliar a segurança para o consumidor; verificar o depósito em coleção internacional de culturas; realizar a

caracterização funcional *in vitro* e em animais; avaliar sua resistência ao processo de digestão; verificar a validação dos benefícios à saúde em humanos, incluindo determinação da quantidade do microrganismo necessária para proporcionar tais efeitos, informações na rotulagem do produto a respeito da identificação da cepa utilizada (gênero, espécie), número mínimo de células viáveis durante o armazenamento e alegação da eficácia do produto (FAO/WHO, 2002; MORELLI, 2007; RANADHEERA et al., 2010). A viabilidade aos processos de fabricação industrial também é muito importante para a seleção dessas cepas probióticas (VINDEROLA et al., 2017). Assim podem ser empregadas em produtos com uma perspectiva de propriedade funcional.

A contagem mínima de bactérias probióticas para garantir impacto a saúde é de 7,0 log UFC.g⁻¹ (DE VUYST, 2000; TALWALKAR et al., 2004). O conceito da FAO/WHO (2002) é claro quando afirma que os micro-organismos “quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”, porém não estabelece exatamente qual seria essa dose. Alguns pesquisadores afirmam que uma concentração mínima de 5 – 6 log UFC.g⁻¹ ou mL ou ainda 7 log UFC.g⁻¹ ou mL (DING; SHAH, 2008; NUALKAELKUL; CHARALAMPOPOULOS, 2011) seria suficiente para fornecer tais benefícios.

Dentre os efeitos benéficos à saúde do hospedeiro, probióticos podem melhorar a funcionalidade da integridade intestinal e promover homeostase da microbiota intestinal, modular a resposta imunológica através do estímulo na produção de imunoglobulinas, anticarcinogênese, efeito hipocolesterolêmico (OLIVEIRA et al., 2012; RANADHEERA et al., 2012; VILLARREAL et al., 2013). Os probióticos podem atuar no tratamento de distúrbios gastrointestinais, como a síndrome do intestino irritável, doença inflamatória intestinal e redução do risco de diarreia causada por bactérias através de exclusão competitiva, efeito de barreira protetora no lúmen intestinal e produção de antimicrobianos, além de alívio da má absorção de lactose e alergias alimentares. Estes e outros efeitos benéficos à saúde do hospedeiro tornam estas bactérias importantes ferramentas para produção de alimentos funcionais (AMIRI et al., 2019; KAUR et al., 2014; SELLE; KLAENHAMMER; RUSSELL, 2014; SANTIAGO-LÓPEZ et al., 2015; VERRUCK et al., 2019).

Devido a composição físico-química a qual favorece a viabilidade destes micro-organismos, como a acidez e o alto teor de umidade, as matrizes lácteas caprinas apresentam-se como uma alternativa para a veiculação desses probióticos, o que possibilita elevar a qualidade do produto, tornando-o um alimento funcional, além das modificações físico-químicas, químicas e nutricionais exercidas pelo micro-organismo, influenciando

positivamente a aceitabilidade do consumidor (OLIVEIRA et al., 2012; SANTOS et al., 2012; VO; KIM, 2013).

2.3 SORO DE LEITE CAPRINO

O soro de leite é um bioproduto obtido do processo de coagulação da caseína, durante a fabricação de queijo. Trata-se de uma matéria-prima de alto valor nutricional (proteínas, sais minerais e lactose), sendo ainda hoje rejeitado pelos produtores, o que o torna um resíduo de elevado impacto ambiental, principalmente quando eliminado em cursos de água, pois contamina os afluentes. O soro de leite obtido corresponde de 85 a 95% em volume da quantidade do leite utilizado para a produção de queijos. Cerca de 55% dos nutrientes deste bioproduto é derivado do leite. A utilização na composição de diversos produtos alimentícios reduz o desperdício e, geralmente, possuem um valor de mercado mais acessível (SANMARTÍN et al., 2012; SILVA et al., 2011; SILVEIRA et al., 2015).

A produção de queijos e consequente obtenção do soro de leite, em todo o mundo, ocorrem principalmente em fábricas, mas há também pequenas produções em propriedades rurais menores como granjas, fazendas (MORENO ÍNDIAS et al., 2009). Há duas principais formas de processamento do leite caprino que são adotadas: o leite é ordenhado, pasteurizado e logo depois é encaminhado aos laticínios para o processamento; ou o mesmo é transformado em queijo e em outros produtos, diretamente no mesmo local de ordenha (DE LA FUENTE et al., 2002; KAMINARIDES, 2015).

O soro de leite bovino tem sido utilizado na composição de vários produtos alimentícios, incluindo compostos lácteos líquidos ou em pó, que geralmente são mais acessíveis do que o leite integral. O soro de leite de cabra, quando comparado ao bovino, não é efetivamente utilizado no processamento de produtos alimentícios, o que pode ser explicado pelo sabor peculiar do leite de cabra, que é ácido, e, geralmente, não é bem aceito pelo consumidor. Assim, se faz necessário uma maior valorização de seu uso na elaboração de matrizes alimentícias, como ingrediente, o que mascara o sabor ácido e agrega valor a estes produtos (HEJTMÁNKOVÁ et al., 2012). A utilização do soro de leite caprino como componente de derivados lácteos implica um destino mais racional deste bioproduto industrial, com um impacto benéfico sobre o ambiente. Além disso, os produtos lácteos que tenham soro de leite em sua formulação, têm demonstrado ser um substrato interessante para o desenvolvimento de bactérias probióticas (CASTRO et al., 2013; DU TOIT et al., 2011; FIGUEROA-GONZALEZ et al., 2011).

A indústria utiliza dois tipos de soro: o doce (pH = 6-7) e o ácido (pH < 5). O soro de queijo ou soro de leite doce é obtido na fabricação do queijo que se utiliza o coalho como agente coagulante da caseína, enquanto que o soro ácido ou soro de caseína é obtido após a fermentação ou a adição de compostos orgânicos ou ácidos minerais (PERRY, 2004).

O soro ácido tem o conteúdo de cinzas elevado e a quantidade proteica menor em relação ao soro doce. Isso ocorre, principalmente, porque a coagulação ácida acontece perto do ponto isoelétrico da caseína (pH 4,6). Assim, mais proteína do leite precipita. Por ter um sabor ácido e um alto teor de sal, o soro ácido tem uso limitado. Neste tipo de soro, a concentração de cálcio é aproximadamente duas vezes mais elevada do que é observado no soro doce. Na coagulação ácida, o cálcio coloidal contido nas micelas de caseína é solubilizado no soro (CARVALHO et al., 2013; MAWSON, 1994; PANESAR et al., 2007;).

O soro de leite caprino tem uma composição nutricional, principalmente com relação ao teor de proteína, que depende de alguns fatores: o tipo do soro (ácido ou doce), a época do ano, o tipo de alimento, o estágio de lactação e a qualidade do processamento (HERNANDEZ-LEDESMA et al., 2011; PANESAR et al., 2007).

Por ser um substrato rico nutricionalmente, o soro de leite tem um amplo aproveitamento: componente principal ou adicional na elaboração de queijo ricota, formulação de meios de cultura bacterianos e leveduras, produção de biomassa e fornecimento de nutrientes para suplementos animais ou como fonte proteica. As principais proteínas presentes são: lactoglobulina, lactoalbumina. As imunoglobulinas, a albumina e as proteases-peptonas estão presentes em concentrações menores, assim como a lactoferrina, também estando presente o caseino-macropeptídeo (AGUIRRE-EZKAURIATZA et al., 2010; HERNANDEZ-LEDESMA et al., 2011).

No soro caprino, a β -lactoglobulina (β -Lg) e α -lactoalbumina (α -Lg) exercem atividades biológicas diversificadas que influenciam na digestão, nas respostas metabólicas aos nutrientes absorvidos, no crescimento e desenvolvimento de órgãos específicos e na resistência a doenças (YALCIN, 2006). A hidrólise dessas proteínas pode fornecer peptídeos bioativos, capazes de realizar atividades biológicas específicas: anti-hipertensivas, antimicrobiana, anti-oxidante, anti-hipercolesterolêmica, imunomoduladora (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2008; MADUREIRA et al., 2010; RECIO et al., 2000; VARGAS et al., 2014). Podem ser uma alternativa interessante na substituição das proteínas bovinas nos alimentos, uma vez que esta última tem um potencial alergênico superior (SANMARTÍN et al., 2013). Ademais, estas proteínas do soro caprino podem contribuir no controle do peso

corporal, fornecendo sinais de saciedade que induzem na ingestão de alimentos a curto ou longo prazo (LUHOVYY et al., 2007).

As vitaminas são componentes fisiológicos, bioquímicos, metabólicos e bioativos presentes no leite e derivados. A maioria das vitaminas lipossolúveis está incorporada a coalhada e a maioria das vitaminas hidrossolúveis está presente no soro. O soro de leite caprino possui um maior conteúdo de vitamina A em comparação aos de vaca e aos de ovelha. Este nutriente é importante, pois modula genes envolvidos no metabolismo de ferro, assim a anemia e o acúmulo de ferro nos tecidos podem ser evitados. A vitamina B12 e o ácido fólico estão em baixa concentração, sendo necessário o consumo de outras fontes alimentares para a obtenção destes nutrientes (HERNANDEZ-LEDESMA et al., 2011; THEODOSIOU et al., 2010).

No soro caprino, os minerais em destaque são: Na, Ca, P, K, Mg e Cl. O Na, o K, e o Cl são quase totalmente solúveis e disponíveis no soro de queijo. Ca, Mg, e P são associados em proporções diferentes da suspensão coloidal de micelas de caseína, e, portanto, estão parcialmente retidos na coalhada durante a produção de queijo (HERNANDEZ-LEDESMA et al., 2011).

A lactose é o principal carboidrato presente no soro caprino e nos seus produtos lácteos. É considerado um valioso nutriente por favorecer a absorção intestinal de cálcio, magnésio, fósforo e da vitamina C. Dentre os carboidratos, os oligossacarídeos presentes têm propriedades prebióticas e anti-infecciosas, não sendo digeridos no trato gastro-intestinal. A fração ácida desses oligossacarídeos contém ácido siálico que são o ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) e o ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc). Estes são fundamentais no desenvolvimento infantil, com funções anti-inflamatórias, anti-adesivas, antipatogênicas e no sistema imunológico, sendo também utilizados na suplementação em fórmulas lácteas como fontes alternativas ao leite materno (MARTINEZ-FEREZ et al, 2006; MEYRAND et al., 2013; PARK et al., 2009; RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2008).

Considerando os aspectos de composição nutricional e potencialidades funcionais que essa matriz apresenta, destaca-se a importância da utilização do soro de leite na elaboração de produtos lácteos ou em processos biotecnológicos, valorizando esta matriz alimentar, o que contribui de forma parcial ou total para a redução dos custos com sua eliminação, principalmente nos países desenvolvidos, os quais apresentam legislação rigorosa quanto à regulamentação do descarte de efluentes, considerando que as tecnologias de tratamento biológico de águas residuais são bastante dispendiosas (PALATINIK et al., 2015; PANESAR et al., 2007).

O reaproveitamento de subprodutos agroindustriais possui grande destaque e inspiram diversas pesquisas, sendo o soro um subproduto promissor, principalmente pelo elevado valor proteico (PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012). Portanto, a utilização do leite e do soro de leite caprinos como ingredientes funcionais é uma das áreas de pesquisa mais promissoras para a moderna indústria de laticínios caprinos, podendo ser aplicado como ingrediente funcional em bebidas lácteas com baixo teor de gordura, fortificadas, aromatizadas, produtos fermentados, queijos, sorvetes, manteiga, doces e balas, também como base para a formulação de alimentos funcionais e infantis, bem como produtos dietéticos para fins específicos, como a área clínica e esportiva (VERRUCK et al., 2019).

2.4 PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS BIOATIVOS DO SORO DE LEITE DE CABRA

As proteínas do soro também chamadas de soroproteínas apresentam, no geral, importante composição aminoacídica por conter todos os aminoácidos essenciais, possuindo alto valor biológico, apresentando excelente digestibilidade e sendo rapidamente absorvidas pelo organismo (OLIVEIRA et al., 2012; SGARBIERI, 2005). Além disso, as proteínas do soro apresentam inúmeras atividades biológicas que influenciam na digestão, respostas metabólicas na absorção de nutrientes, crescimento e desenvolvimento de órgãos específicos, assim como resistência a doenças (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2011). São proteínas solúveis, apresentando-se com uma estrutura globular, com níveis elevados de estruturas secundárias e terciárias, nas quais aminoácidos ácidos/básicos e hidrofóbicos/hidrofílicos estão distribuídos de forma bastante equilibrada ao longo das cadeias polipeptídicas (RAMOS et al., 2014).

β -Lactoglobulina (β -Lg) e α -Lactoalbumina (α -La) são as proteínas majoritárias nesta matriz. As imunoglobulinas, peptona-protease e albumina são proteínas que ocorrem em menor quantidade, e outras em concentrações ainda menores como a lactoferrina e a lactoperoxidase. Quando as proteínas do soro são obtidas após a produção de queijos, o glicomacropéptido (GMP) também pode estar presente, e corresponde a uma proteína solúvel originada da k-caseína (MADUREIRA et al., 2007; MADUREIRA et al., 2010).

A β -Lactoglobulina é a principal proteína globular do soro lácteo, com 18,3 kDa e compreende cerca de 50% das proteínas (FONG; NORRIS; PALMANO, 2008). Apresenta-se como um dímero não covalentemente ligados, possuindo duas pontes dissulfeto e um grupo tiol livre. A β -Lg se liga ao cálcio e ao zinco e pode se ligar ao retinol transportando-o, apresentando assim numerosos sítios de ligação para minerais, vitaminas lipossolúveis e

lipídios (KUSHIBIKI et al., 2001; YALÇIN et al., 2006). Desta proteína caprina, pode-se derivar peptídeos que podem agir como antibacterianos e imunomoduladores, ativando processos autolíticos sobre a microbiota intestinal (BIZIULEVICIUS et al., 2006; HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2011)

A α -Lactoalbumina é outra importante proteína de soro, com 14 kDa, com cadeia polipeptídica única com oito resíduos de cisteína, correspondendo a, aproximadamente, 25% da proteína total. Desempenha papel crucial na síntese de lactose, podendo ainda se ligar ao cálcio, o que melhora a absorção deste mineral, e ainda é fonte de lisina, leucina, treonina, triptofano e cistina. Ela é produzida durante a lactação e desempenha um papel essencial na síntese do leite, sendo umas das poucas proteínas que permanece intacta após a pasteurização (YALÇIN et al., 2006). Entre as suas atividades biológicas de destaque, está à formação do complexo bem elucidado α -La/ácido oleico (HANLET – *Human Alpha-lactalbumin Made Lethal to Tumor cells*), descrito como um complexo proteína-lípido tumoricida com amplos efeitos contra células cancerosas de diferentes origens (HO; NADEEM; SVANBORG, 2017; MOK et al., 2007; PETTERSSON; MOSSBERG; SVANGORG et al., 2006).

A albumina e as imunoglobulinas séricas são proteínas sanguíneas que se incorporam ao leite e são recuperáveis como proteínas de soro de leite. A albumina sérica possui a capacidade de ligar-se a ácidos graxos, participando da síntese de lipídeos (CHOI et al., 2002). As imunoglobulinas incluem a IgG1, IgG2, IgA e IgM, sendo possíveis meios eficazes para prevenir e combater micro-organismos patogênicos, fornecendo proteção aos ruminantes recém-nascidos até que o seu próprio sistema imunológico esteja desenvolvido (YALÇIN et al., 2006).

O CMP (caseinomacropéptido), composto pelos 64 aminoácidos C-terminais da κ -caseína, é rico nos aminoácidos de cadeia ramificada valina e isoleucina e não contém fenilalanina, possuindo uma composição de aminoácidos que o torna adequado em dietas para indivíduos fenilcetonúricos (BUCHHEIM, 1996; EL-SALAM; EL-SHIBINY; HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2011). Esta proteína apresenta uma fração ligada a carboidratos, isto permite uma ação protetiva contra a acidez e erosão dentária, visto que interage com micro-organismos impedindo a ligação de diferentes patógenos às células e a adesão de bactérias que implicam em processos cariogênicos (SETAREHNEJAD et al., 2010).

A lactoperoxidase é uma enzima também presente no soro de leite, e apesar de estar em pequena quantidade, atua de forma reguladora sobre os genes envolvidos no metabolismo, imunidade, apoptose e ciclo celular de células epiteliais intestinais (WAKABAYASHI et al.,

2007). A peptona-protease é uma glicoproteína fosforilada e é, também, encontrada no leite de cabra, com estrutura primária contendo 136 aminoácidos, a qual demonstrou importante propriedade imunomodulatória, sendo eficaz na produção de IgM e de células de hibridoma (LISTER et al., 1998)

As frações proteicas podem variar em tamanho, peso molecular e função, fornecendo às proteínas do soro características específicas (HARAGUCHI et al., 2006). A sua distribuição no soro também é variável, pois depende da fase de lactação, em que no período entre o desmame e a seguinte gestação dos animais, há um aumento na concentração de albumina, lactoferrina e imunoglobulinas, e menor concentração de caseínas (RAIMONDO et al. 2013). Além disso, estas proteínas podem ser modificadas por processos térmicos, conduzindo a alterações de sua estrutura e, assim, afetar as suas propriedades funcionais, sem que haja, necessariamente, alteração em suas características nutricionais (PINTADO; MALCATA, 2001).

A proteólise constitui-se de um evento bioquímico fundamental que acontece durante a produção (coagulação do leite) e a maturação de queijos, consistindo na degradação das proteínas em peptídeos de médio e baixo peso molecular e aminoácidos livres. Essa degradação envolve enzimas presentes no leite, agentes coagulantes e enzimas microbianas - formadas por bactérias lácticas adicionadas durante o processamento (GARCIA et al., 2012; WOLF et al., 2010).

Este processo ocorre em duas fases: a proteólise primária ou em extensão que acontece no início da maturação de queijos, através da ação das enzimas resultantes do coalho (agente coagulante) ou enzimas endógenas do leite; e a outra iniciada durante a maturação. Esta segunda fase é denominada de proteólise secundária ou de grau de profundidade em que ocorre principalmente pela ação das enzimas formadas por bactérias lácticas que foram adicionadas durante o processamento. A primária resulta na degradação da caseína e na liberação de polipeptídeos e a secundária na degradação dos polipeptídeos de baixo peso molecular, gerando os aminoácidos (BONSTINS et al., 2012). As enzimas que atuam são endoproteínases, que hidrolisam ligações peptídicas no interior da cadeia, e exopeptidases que hidrolisam um aminoácido de cada vez em ambas as extremidades N-terminal (aminopeptidases) e C-terminal (carboxipeptidases) (HAYALOGU et al., 2013; STEELE; BROADBENTE; KOK, 2013). Este processo proteolítico gera peptídeos bioativos com inúmeras atividades biológicas de importância para a saúde humana (BALTHAZAR et al., 2017; CUNSOLO et al., 2015; KORHONEN, 2009).

A obtenção de peptídeos bioativos pode ser estimulada a partir da utilização de bactérias iniciadoras e/ou probióticos, comumente utilizadas no processamento de produtos lácteos, as quais possuem atividade proteolítica por meio das peptidases da ação do coalho e de outros coagulantes; no entanto, nessas condições, a liberação de peptídeos e aminoácidos ocorre em menor extensão e mais lentamente. Também pode ocorrer, a partir da hidrólise no trato gastrointestinal pelas enzimas digestivas extracelulares, em que os peptídeos são ainda hidrolisados em aminoácidos ou peptídeos ainda menores por peptidases intracelulares (MADUREIRA et al., 2010). Assim, estes peptídeos, em particular de leite caprino e de seus derivados, como o do soro de leite, podem desempenhar atividades antioxidantes (AHMED et al., 2015; LI et al., 2013), antibacterianas (ESMAEILPOUR et al., 2016), imuno-moduladoras (ERIKSEN et al., 2008) e ações de inibição da enzima de angiotensina (ESPEJO-CARPIO et al., 2013; QUIRÓS, et al., 2005).

Entre as atividades biológicas mais estudadas nos peptídeos do soro de leite caprino, pode-se citar a capacidade de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), diretamente relacionada com o controle da hipertensão arterial sistêmica (HAS) (RECIO et al., 2000). Didelot et al. (2006) utilizaram a microbiota natural do queijo para a obtenção de hidrolisados de soro caprino com atividade ACE-inibitória (f(104-108)) e relataram que a fermentação também é uma via de obtenção destes peptídeos. Hamme et al. (2009) relataram em seus estudos que micro-organismos isolados, os quais consistiram nas leveduras *Kluyveromyces marxianus* e *Lactobacillus rhamnosus* foram capazes de produzir peptídeos ACE-inibitórios a partir do soro caprino.

O soro de leite caprino também possui peptídeos capazes de eliminar radicais livres e desenvolver atividades inibitórias de peroxidação lipídica, e umas das proteínas envolvidas nesses processos é a β -lactoglobulina (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2011). A subtilisina, por exemplo, libera peptídeos com tirosina C-terminal, uma característica estrutural conhecida por aumentar a atividade antioxidante a partir de proteínas de soro de leite (GÜLÇİN, 2007). A proteína do soro de leite de cabra mostrou-se capaz de exercer atividade antioxidante através do mecanismo dependente de Nrf2 em células endoteliais e independente de Nrf2, umas das principais respostas antioxidantes celulares por promover a indução de enzimas antioxidantes (KERASIOTI et al., 2016).

Estudos que descrevam os progressos tecnológicos e científicos sobre as funcionalidades das proteínas e dos peptídeos bioativos do leite caprino e de seus derivados auxiliam no desenvolvimento deste emergente mercado de produtos lácteos funcionais e no fortalecimento da cadeia produtiva de lácteos a nível nacional e regional, tendo em vista que o

acesso a informações sobre a funcionalidade dos alimentos na saúde humana tem despertado grande interesse da população para uma alimentação mais saudável (VARGAS et al., 2014). Especificamente, quando se fala das proteínas do soro que parecem ter efeito supressor do apetite, promover maior saciedade em relação às caseínas, além de conter uma maior concentração de aminoácidos de cadeia ramificada. Neste sentido, estudos que abordam desde a compreensão da regulamentação da biossíntese e expressão, a origem e a incidência destas proteínas, assim como os fatores que possam impactar em sua composição, como os ambientais, nutricionais e genéticos são, cada vez mais, essenciais (FONG; NORRIS, PALMANO, 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATÉRIA-PRIMA E LOCAL DE EXECUÇÃO

O leite caprino, oriundo de cabras mestiças, foi obtido por ordenha mecânica em uma cooperativa (Capribom[®]) localizada na cidade de Monteiro/PB. Após a obtenção, aproximadamente, 6 litros de leite caprino foram pasteurizados e transportados em caixa isotérmica a 5 ± 1 °C até o Laboratório de Técnica Dietética, do Departamento de Nutrição (CCS/UFPB), onde foi armazenado em sacos plásticos estéreis sob refrigeração (4 ± 1 °C) até o processamento de coagulação láctea para obtenção do soro de leite.

O coalho (fonte da enzima animal - quimosina) foi obtido comercialmente (Naturen[®], CHR Hansen, Valinhos, Minas Gerais, Brasil) e a cultura probiótica liofilizada de *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 foi obtida da "Coleção de Micro-organismos de Interesse para a Agroindústria Tropical" da Embrapa Agroindústria Tropical /Fortaleza, Ceará, Brasil.

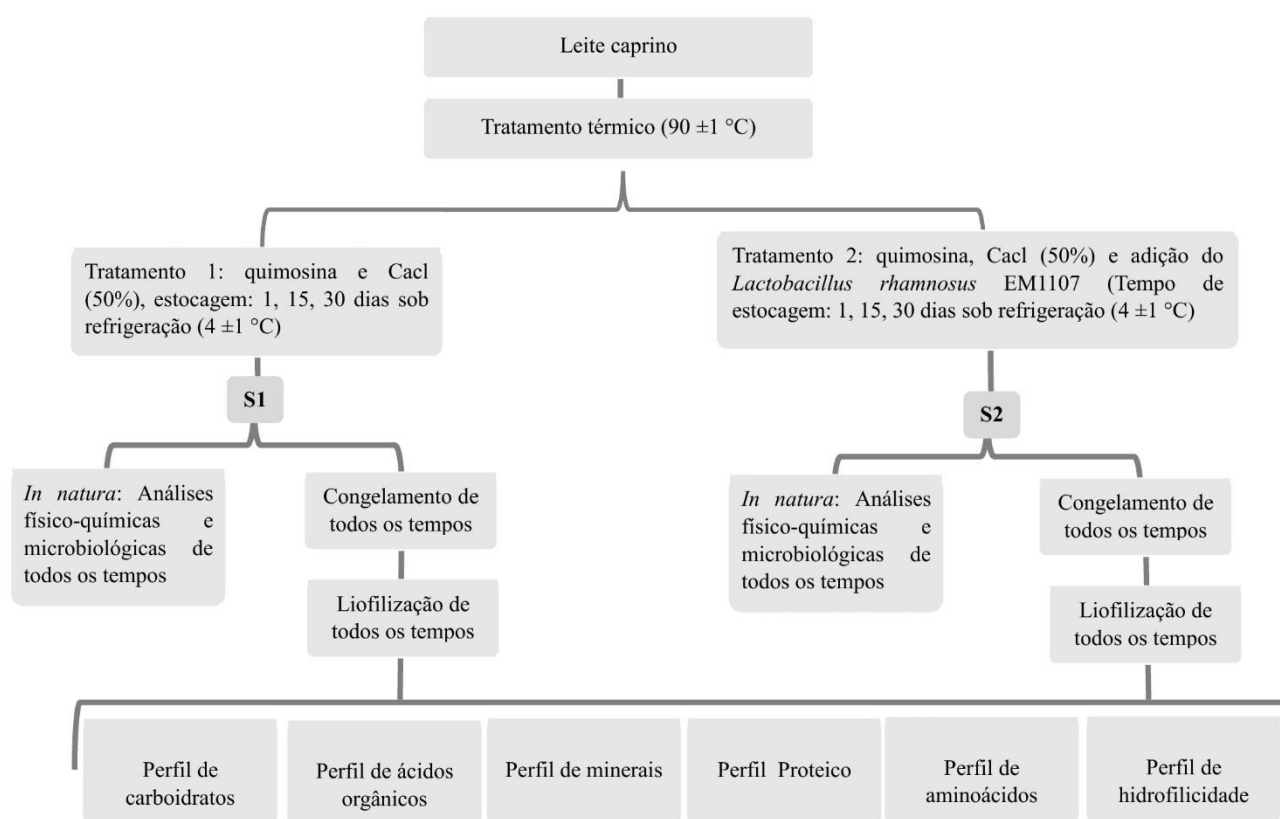
Os soros de leite caprino foram processados no Laboratório de Técnica Dietética pertencente ao Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba. As análises físico-químicas e microbiológicas dos soros foram realizadas, respectivamente, nos Laboratórios de Bromatologia e de Bioquímica e Microbiologia de Alimentos, todos pertencentes ao Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba. O Perfil de Carboidratos foi determinado no Laboratório de Engenharia Metabólica e Bioprocessos, da Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas/SP. O perfil de ácidos orgânicos e de minerais foi avaliado no Centro de Química de Alimentos do Instituto de Tecnologia dos Alimentos (ITAL), Campinas/SP. As análises de perfil proteico e de aminoácidos foram realizadas nos Laboratórios de Genética e Radiobiologia (BioGeR) e Proteômica Estrutural, do Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, e no Centro de Química de Alimentos do Instituto de Tecnologia dos Alimentos (ITAL), Campinas/SP.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após o recebimento, aproximadamente 6 litros de leite caprino foram submetidos a pasteurização através de aquecimento a 90 ± 1 °C/10 min seguido de resfriamento até 36 ± 1 °C. Em seguida, os 6 L de leite foram divididos igualmente em dois lotes com vistas a obtenção dos tratamentos distintos de coagulação láctea para a aquisição dos soros. Dois tipos de soro

de leite caprino foram processados: S1 (soro obtido a partir coagulação da caseína pela ação da enzima animal – quimosina) e S2 (soro obtido a partir da coagulação da caseína pela ação da quimosina e do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* EM1107). Os processamentos foram realizados em triplicata. Os soros obtidos de cada tratamento, aproximadamente 2 L e 700 mL, foram armazenados por 30 dias e retirado para análise nos tempos de 1, 15 e 30 dias. Dado o tempo, parte das análises foram realizadas nas amostras líquidas, e outra parte das amostras foram liofilizadas para análises posteriores. Para liofilização, as condições foram (L-101 model; LIOTOP[®], São Carlos, Brasil) a uma temperatura de -55 ± 2 °C, com pressão de vácuo <138 µHG, (velocidade de liofilização de 1 mm/h), por, aproximadamente, 12 h. Nas amostras liofilizadas foram realizadas as análises de carboidratos, ácidos orgânicos, minerais, proteínas e aminoácidos, conforme demonstrado na Figura 3. Os parâmetros físico-químicos e microbiológicos foram realizados com a amostra *in natura* nos respectivos tempos de armazenamento citados.

Figura 3 - Delineamento experimental.

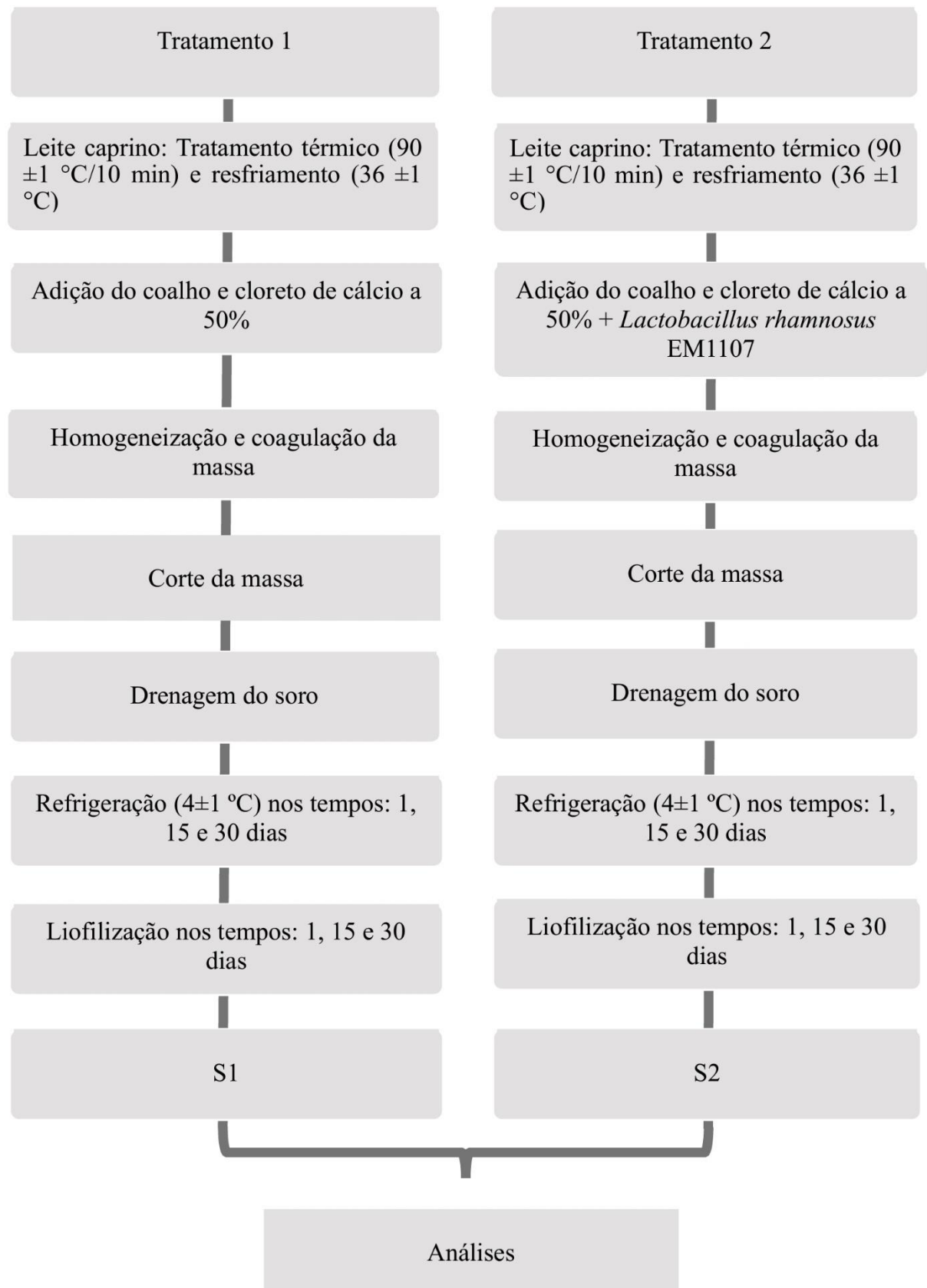


3.3 PREPARO DO INÓCULO E OBTENÇÃO DOS SOROS DE LEITE CAPRINO

A preparação do inóculo foi realizada segundo a metodologia descrita por Rolim et al. (2015). A cultura probiótica do *L. rhamnosus* EM1107 foi semeada em ágar MRS suplementada com cisteína HCl (0,05 g/100 mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), sendo incubada por 48 horas a 37 °C, em condições anaeróbicas (BD GasPak™ EZ Anaerobe container system, Becton, Dickinson and Company, USA). Em seguida, a cepa probiótica foi inoculada em caldo MRS (Sigma-Aldrich) para crescer por 18 horas a 37 °C. Após este período de crescimento, a cepa foi centrifugada (4500 *g* x 15 min, 4 °C), submetida a duas lavagens com água estéril e o *pellet* ressuspensão em leite. Foi realizada a contagem do inóculo final, através de diluições seriadas e contagem em placa, atingindo contagens finais de 9 log UFC mL⁻¹.

Os soros de leite caprino foram produzidos de acordo com a metodologia proposta por Oliveira et al. (2012) e Garcia et al. (2012), com adaptações. Inicialmente, o leite caprino foi submetido a tratamento térmico a 90 ± 1 °C por 10 minutos e resfriado a 37 ± 1 °C adicionado de cloreto de cálcio a 50% (0,5 mL/L) e da quimosina (0,9 mL/L) que foi diluída na mesma quantidade de água mineral, para ambos os tratamentos. Posteriormente, o inóculo do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* EM1107, em contagens mínimas de 9 log UFC/mL foi adicionado ao tratamento S2. Após isso, os soros obtidos, S1 e S2, foram armazenados sob refrigeração (4 ± 1 °C) durante a vida de prateleira, nos tempos: 1, 15, 30 dias. Em cada tempo, os soros foram congelados e liofilizados, sendo submetidos a posteriores análises durante a vida de prateleira (Figura 4).

Figura 4 - Fluxograma do preparo dos dois tratamentos para a obtenção do soro de leite (S1 e S2).



3.4 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA DOS SOROS DE LEITES E VIABILIDADE DO *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 AO LONGO DO ARMAZENAMENTO

Para o controle de qualidade dos soros de leite liofilizados foram realizados os seguintes ensaios: contagem de coliformes totais e termotolerantes, bolores e leveduras e *Staphylococcus* coagulase positiva, presença de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes*, seguindo a recomendação da Resolução RDC n°. 12/2001. A metodologia foi realizada de acordo com os métodos da APHA (2001). No que se refere à avaliação da viabilidade de *L. rhamnosus* EM1107 nos soros de leite caprino, durante o armazenamento refrigerado, seguiu-se a metodologia descrita por Santos et al. (2015).

3.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E QUÍMICAS DOS SOROS DE LEITE

3.5.1 Análises físico-químicas

Após a obtenção dos soros, estes foram submetidos às análises físico-químicas, de acordo com as metodologias descritas pela *Association of Official Analytical Chemist Methods* (AOAC, 2016). Para tanto, foram realizadas as seguintes análises: o pH foi mensurado em potenciômetro digital Quimis[®] (modelo Q400, Diadema, São Paulo, Brasil); a acidez em ácido láctico por titulação; umidade e extrato seco total (EST) por secagem em estufa estabilizada a 105 °C, até obtenção de massa constante; determinação de resíduo mineral fixo (RMF), por carbonização seguida de incineração em forno mufla a 550 °C; determinação do teor de proteínas pelo método de Micro-Kjedahl, com o fator 6,38 multiplicado pela porcentagem de nitrogênio; determinação de gordura pela utilização do lacto-butirômetro de Gerber; açúcares totais pela redução de Fehling e calorias a partir dos teores da fração proteica, lipídica e de carboidratos, utilizando-se os coeficientes específicos que levam em consideração o calor de combustão 4,0; 9,0 e 4,0 kcal, respectivamente, conforme Dutra de Oliveira e Marchini (1998).

3.5.2 Análises químicas

3.5.2.1 Perfil de carboidratos

As amostras (S1 e S2) liofilizadas foram diluídas em água MilliQ, numa proporção de 1:2, e filtradas (0,22 µm). Posteriormente analisadas por cromatografia de íons (HPLC-PAD). A quantificação da glicose, galactose e lactose foi feita por cromatografia de troca iônica com detecção amperométrica pulsada (HPLC-PAD), utilizando o cromatógrafo Dionex® (Sunnyvale, CA, Estados Unidos) equipado com a coluna Carbopac PA-1 (4 x 250 mm) e uma coluna de proteção Carbopac PA-1 (4 x 50 mm), bomba GP50, e um detector eletroquímico ED40, onde foram eluídas com A (NaOH 50 mM), B (NaOAc 500 mM, NaOH 50 mM), C (NaOH 150 mM) e D (água ultrafiltrada) a uma vazão de 1 mL/min. A quantificação foi realizada utilizando-se curva de calibração com os padrões lactose, glicose e galactose na faixa de 1 a 100 mg/L. Os galactooligossacarídeos - GOS foram quantificados considerando-se a área relativa dos picos. Para tal, foi utilizado o software de aquisição de dados Peak Net 5.1.

3.5.2.2 Perfil de ácidos orgânicos

As amostras (S1 e S2) liofilizadas foram diluídas em água MilliQ, numa proporção de 1:2, e filtradas (0,22 µm). Os ácidos orgânicos (acético, succínico, láctico e málico) foram quantificados simultaneamente por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) usando um cromatógrafo Agilent (modelo 1260 Infinity LC, Agilent Technologies, EUA), uma bomba de solvente quaternário (modelo G1311C), desgaseificador, compartimento da coluna termostática (modelo G1316A) e amostrador automático (modelo G1329B), acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) (modelo G1315D) e Detector de Índice de Refração (RID) (modelo G1362A). As demais condições analíticas foram as seguintes: uma coluna Agilent Hi-Plex H (7,7 x 300 mm, 8 µm); fase móvel H₂SO₄ 4 mM/L em água ultrapura; e taxa de fluxo 0,7 mL/min. Os dados foram processados utilizando o software OpenLAB CDS ChemStation Edition™ (Agilent Technologies). Os picos cromatográficos de cada amostra foram identificados comparando os seus tempos de retenção com os dos padrões de ácidos orgânicos. As amostras foram filtradas em membranas de 0,45 micras e injetadas duplicadamente, e as áreas médias dos picos foram usadas para quantificação (BALL et al., 2011). Os padrões dos ácidos acético, succínico, láctico e málico foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha), todos com pureza ≥ 99%. A água ultrapura foi obtida a partir de um sistema MilliQ® (EMD Millipore, EUA) e o ácido sulfúrico foi obtido da Vetec Química Fina® (Rio de Janeiro, Brasil).

3.5.2.3 Perfil de minerais

As amostras de soro foram preparadas por digestão ácida assistida por micro-ondas, com a pesagem de 0,5 g de amostra em tubos de teflon para digestão, adicionados 7 mL de ácido nítrico purificado por destilação sub-boiling (Distillacid, Berghof, Eningen, Alemanha) e 1 mL de peróxido de hidrogênio 30% (Merck, Darmstadt, Alemanha). O programa de digestão utilizou temperatura máxima de 170 °C por 37 minutos, e o conteúdo dos tubos foi transferido com água purificada por osmose reversa (Gehaka, São Paulo, Brasil) para balão de 25 mL.

A quantificação dos minerais foi feita por Espectrometria de Emissão Ótica por Plasma Acoplado Indutivamente, que foi realizada usando um espectrômetro de emissão com fonte de plasma com acoplamento indutivo (ICP/OES), da marca Agilent, modelo 5100 VDV ICP OES (Agilent Technologies, Tóquio, Japão), usando as visões axial e radial, equipado com uma fonte de rádio-frequência (RF) de estado sólido de 27 MHz, utilizando um detector óptico sequencial, uma bomba peristáltica, uma câmara de nebulização ciclônica de duplo passo e um nebulizador seaspray. O sistema utilizou como gás de plasma o argônio líquido, com pureza mínima de 99,996% (Air Liquide, Brasil) (HORWITZ, 2010). Foram determinados os elementos minerais: cálcio, cobre, magnésio e zinco. As curvas analíticas foram preparadas em solução de HCl 5% (v/v) a partir de soluções-padrão na concentração de 10 g/L para Ca, Cu, Mg e de 1 g/L para Zn (Merck, Darmstadt, Alemanha).

3.5.2.4 Perfil proteico

3.5.2.4.1 *Preparo das amostras de soro de leite*

Os soros de leite (S1 e S2), após cada intervalo de tempo de armazenamento refrigerado (1, 15 e 30 dias), foram dialisados, utilizando membranas de diálise (14 kDa cut-off), em uma proveta de 500 mL contendo água ultrapura, com troca de água a cada uma hora, totalizando dez trocas. Em seguida, os soros foram congelados a -18 °C e liofilizados (L-101 model; LIOTOP®, São Carlos, Brasil) a -55 ±2 °C, com pressão de vácuo <138 µHG, (velocidade de liofilização de 1 mm/h), por, aproximadamente, 12 h.

3.5.2.4.2 *Determinação do conteúdo de proteínas solúveis*

O teor de proteínas totais presentes nas amostras de soro foi determinado segundo o método descrito por Bradford (1976), no qual as amostras foram diluídas em diferentes

concentrações de NaCl 0,15 mol/L (1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:360). De cada diluição foi retirada uma alíquota de 100 µL, em duplicata, onde foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford. Após homogeneização e repouso por 10 min, foi feita a leitura das amostras a 595 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 1100 pro Amersham Biosciences, Reino Unido). Como padrão, utilizou-se uma curva de BSA – Albumina do soro bovino, com solução de partida de 1mg/mL.

3.5.2.4.3 Grau de hidrólise

O grau de hidrólise das amostras foi determinado pelo método do *o-phthaldialdehyde* (OPA) segundo Church et al. (1983). No teste, alíquotas de 100 µL (1 mg/mL em água destilada) foram misturadas com 750 µL do reagente OPA (25 mL de tetraborato dissódico decahidratado 100 mmol/L; 2,5 mL de SDS 20 %; 40 mg de OPA dissolvido em 1 mL metanol, e 100 mL de β-mercaptoetanol, ajustado ao volume final de 50 mL com água destilada), preparado no momento de uso.

As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 2 min a temperatura ambiente (25±2 °C) e a absorbância foi lida a 340 nm em espectrofotômetro Ultrospec 1100 pro (Biosciences, Amersham, Reino Unido). Como padrão foi usado o aminoácido serina (50 mg em 500 mL de água destilada – 0,1 mg/mL ou 0,9516 meqv/L).

Todas as leituras foram realizadas em triplicata, e o cálculo do grau de hidrólise foi realizado conforme a equação 1 (NIELSEN; PETERSON; DAMBMANN, 2001):

$$DH = h / h_{\text{hot}} \times 100\% \quad (1)$$

O valor de h foi calculado por meio da equação 2:

$$h = \frac{(\text{serina-NH}_2 - \beta)}{\alpha} \quad (2)$$

Os valores de α e β , obtidos experimentalmente por Adler-Nissen (1979), são os coeficientes angular e linear, respectivamente, da correlação entre serina NH₂ e h para caseína; e o valor de serina-NH₂ foi calculado com a equação 3:

$$\text{Serina-NH}_2 = \frac{DO_a - DO_{ba}}{DO_p - DO_{bp}} \times 0,9516 \times \frac{0,1 \times 100}{m \times P} \text{ L/g proteína} \quad (3)$$

Onde:

- DOa – Densidade óptica da amostra;
- DOba – Densidade óptica do branco da amostra;
- DOp – Densidade óptica do padrão;
- DObp – Densidade óptica do branco padrão.
- m = massa da amostra
- P = Proteína bruta (Kdjehal)

3.5.2.4.4 *Análise do perfil eletroforético*

Neste experimento, o gel de aplicação (stacking gel) foi preparado na concentração de 3,5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl (Tris (hidroximetil) -aminometano) (Sigma-Aldrich) 0,5 M, pH 6,8 e SDS (Dodecil sulfato de sódio) a 1% (Sigma-Aldrich), enquanto que o gel de separação foi montado formando um gradiente de 7,5 a 17,5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,8 e SDS a 1%. Em cada tempo de armazenamento, as amostras foram submetidas a extração proteica seguindo a metodologia descrita por Egito et al. (2002). A corrida foi realizada sob amperagem constante (25 mA), e ao final da corrida o gel foi retirado da placa e fixado em TCA (ácido tricloacético, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) 12,5% por uma hora, sendo então corado com Coomassie brilliant blue R-250 a 0,005%. A remoção do excesso de corante foi realizada com o auxílio de uma solução descorante de metanol, ácido acético e água (1:3,5:8 v/v/v). Os pesos moleculares das frações proteicas dos soros foram comparados mediante a utilização de marcador de peso molecular de 12 a 225 kDa (Amersham Rainbow Marker - Full range GE Healthcare®).

3.5.2.4.5 *Análise de Aminoácidos Totais e Aminoácidos Livres*

A determinação de aminoácidos totais dos dois tratamentos (S1 e S2) foi realizada por cromatografia em coluna de fase reversa em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, marca SHIMADZU), de acordo com o método descrito por Hagen, Frost e Augustin (1989) e White, Hart e Fry (1986). Para liberação dos aminoácidos individuais, aproximadamente 0,15 g da amostra liofilizada foi resuspensa em 9 mL de ácido clorídrico 6 M e fenol. Após a hidrólise (110 °C/22h), foi adicionado o ácido α -aminobutírico (AAAB) como padrão interno. O ácido foi eliminado por evaporação a vácuo, e a seguir foi realizada a derivatização do hidrolisado com solução de metanol, água ultrapura, trietilamina e fenilisotiocianato (PITC). Os aminoácidos foram filtrados (0,22 μ m) e assim introduzidos na coluna. A fase móvel utilizada consistiu numa mistura dos eluentes A (acetato de sódio – pH 6,4) e B (acetonitrila 50%, água ultrapura, EDTA dissódico).

A separação dos aminoácidos individuais ocorreu de acordo com as seguintes condições cromatográficas: coluna analítica: LUNA C18 100 A 5 μ M 250 X 4,6 mm 00G-4252-EQ, fluxo dos eluentes (fase móvel): 1 mL/minuto a 50 °C, detector DAD (arranjo de diodo), com detecção em 254 nm. Nessas condições, a ordem de eluição dos aminoácidos foi a seguinte: Ácido Aspártico, Ácido Glutâmico, Serina, Glicina, Histidina, Arginina, Treonina, Alanina, Prolina, Padrão Interno (AAAB), Tirosina, Valina, Metionina, Cistina (3 picos),

Isoleucina, Leucina, Fenilalanina e Lisina. A identificação dos picos dos compostos foi realizada através de comparação com os tempos de retenção obtidos nos padrões injetados. A identificação dos aminoácidos foi realizada por comparação com padrão externo (Pierce, PN 20088), e para a quantificação foi utilizado o padrão interno ácido α -aminobutírico (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), de acordo com Hagen, Frost e Augustin (1989) e White, Hart e Fry (1986).

Na determinação dos aminoácidos livres, as amostras foram misturadas com solução ácida (HCl 0,1M) sendo a mistura submetida a agitação orbital por 30 minutos. Uma alíquota do filtrado (50 μ L) foi derivatizada seguindo o mesmo método dos aminoácidos totais (exceto a hidrólise ácida com temperatura).

3.5.2.4.6 *Análise de Triptofano*

A determinação de triptofano é realizada separadamente, pois se degrada na hidrólise ácida. Esta determinação foi realizada por espectrofotometria, após hidrólise enzimática com pronase (40 °C/22-24 h), seguido de reação colorimétrica com 4-dimetilaminobenzaldeído (DAB) em 10,55 mol/L de ácido sulfúrico (H₂SO₄) e leitura a 590 nm. O teor de triptofano foi calculado a partir de uma curva padrão de L-triptofano (SPIES, 1967).

3.5.2.4.7 *Perfil de Hidrofilicidade*

As amostras foram diluídas em água ultrapura e homogeneizadas em Ultra-Turrax tube disperser (Ika, Staufen, Germany) durante 10 minutos a 4856 g, a 4 °C (NT 815 Novatecnica). Em seguida, a solução foi colocada em banho ultrassônico por 10 minutos (Unique, 1400, São Paulo, Brasil) e centrifugada a 2060 g x 10 minutos (NT 815 Novatecnica). Os sobrenadantes das amostras foram filtrados em papel de filtro e transferidos para seringa contendo filtro com poros de 0,45 μ m de diâmetro e posteriormente em um segundo filtro com poros de 0,20 μ m de diâmetro. O perfil de hidrofilicidade foi determinado utilizando um sistema de CLAE (Varian, Waters 2690, Califórnia, EUA) acoplado a uma coluna Nova - Pak C18 (4,6 m x 250 mm, 4 μ m de tamanho de partícula, cartridge, Waters, Irlanda). O volume de injeção do extrato solúvel foi 20 μ L e a fase móvel foi constituída em: Eluente A (Ácido trifluoroacético a 1% em água ultrapura) e Eluente B (Ácido trifluoroacético a 1% em acetonitrila). Um gradiente linear do eluente (A) e eluente (B) foi

aplicado durante 60 minutos em fluxo de 1 mL/minuto e a detecção foi realizada a 218 nm (Hexis Científica, DR3900, São Paulo).

3.5.2.4.8 *Determinação dos Espectros de Massas dos soros de leite caprino*

O equipamento Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) foi utilizado operando no modo positivo linear usando um espectrômetro de massa Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). As amostras foram dissolvidas em água ultrapura (2 mg/mL) e solubilizadas em uma matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico e acetonitrila (10 mg/mL), sendo aplicado 1 mL na sonda e seco rapidamente no vácuo. A leitura foi realizada pelo software FlexAnalysis 3.4 (Bremen, Alemanha).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) para verificar o efeito do processo de coagulação e as diferenças entre os grupos estudados foram analisados utilizando o teste de média Tukey para comparação de médias ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$), ao longo do armazenamento. O teste t-Student, ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$), foi utilizado entre os tratamentos de soros de leite. O programa utilizada foio pacote Sigma Stat 3.5 (Jandel Scientific Software, San Jose, Califórnia) (SIGMASTAT, 2006). Os gráficos foram montados utilizando o programa *OriginPro* 8 SR0 (Northampton, USA).

REFERÊNCIAS

- ABEIJÓN MUKDSI, M. C.; HARO, C.; GONZÁLEZ, S. N.; MEDINA, R. B. Functional goat milk cheese with feruloyl esterase activity. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 2, p. 801–809, 2013.
- AGUIRRE-EZKAURIATZA, E.J.; AGUILAR-YÑÉZ, J.M.; RAMÍREZ-MEDRANO, A.; ALVAREZ, M.M. Production of probiotic biomass (*Lactobacillus casei*) in goat milk whey: Comparison of batch, continuous and fed-batch cultures. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 8, p. 2837–2844, 2010.
- AHMED, S. A.; EL-BASSIONY, T.; ELMALT, L. M.; IBRAHIM, H. R. Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. **Food Research International**, v. 44, p. 80–88, 2015.
- ALFÉREZ, M. J. M.; LÓPEZ-ALIAGA, I.; NESTARES, T.; DÍAZ-CASTRO, J.; BARRIONUEVO, M.; ROS, P. B.; CAMPOS, M. S. Dietary goat milk improves iron bioavailability in rats with induced ferropenic anaemia in comparison with cow milk. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 7, p. 813–821, 2006.
- AL-SAADI, J. S.; SHAKER, K.A.; USTUNOL, Z. Effect of heat and transglutaminase on solubility of goat milk protein-based films. **International Journal of Dairy Technology**, v. 67, n. 3, p. 420–426, 2014.
- AMIGO, L.; FONTECHA, J. Goat milk. In J. W. Fuquay, P. F. Fox, & P. L. H. Mcsweeney (Eds.). **Encyclopedia of dairy sciences** - 2nd ed. London, UK: Elsevier Ltd v. 3, p. 484–493, 2011.
- AMIRI, S.; MOKARRAM, R. R.; KHIABANI, M. S.; BARI, M. R.; KHALEDABAD, M. A. Exopolysaccharides production by *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis BB12: Optimization of fermentation variables and characterization of structure and bioactivities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 752–765, 2019.
- ANTUNES, A. E. C.; SILVA, E. R. A.; MARASCA, E. T. G.; MORENO, I.; LERAYER, A. L. S. Probióticos: Agentes promotores de saúde. **Nutrire**, v. 32, p. 113–132, 2007.
- AOAC-Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists **International**. 20th ed. Gaithersburg: AOAC International, 2016.
- APHA - American Public Health Association. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed., cap. 7, p. 63 – 67, 2001.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia Industrial**: biotecnologia na produção de alimentos. São Paulo: Edgard Bllucger, v. 4, p. 523, 2001.
- ARYANA, K. J.; OLSON, D. W. A 100-Year Review: Yogurt and other cultured dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 9987–10013, 2017.

- ASSIS, P. O. A.; GUERRA, G. C. B.; ARAÚJO, D. F. S.; ARAÚJO JÚNIOR, R. F.; MACHADO, T. A. D. G.; ARAÚJO, A. A.; QUEIROGA, R. C. R. E. Intestinal antiinflammatory activity of goat milk and goat yoghurt in the acetic acid model of rat colitis. **International Dairy Journal**, v. 56, p. 45–54, 2016.
- BALAKRISHNAN, G.; AGRAWAL, R. Antioxidant activity and fatty acid profile of fermented milk prepared by *Pediococcus pentosaceus*. **Journal of Food Science and Technology-Mysore**, v. 51, n. 12, p. 4138–4142, 2014.
- BALL, S. et al. Analysis of carbohydrates, alcohols, and organic acids by ion-exchange chromatography. In *Agilent Hi-Plex Columns Applications Compendium*, **Agilent Technologies Inc.**, 2011.
- BALTHAZAR, C. F.; PIMENTEL, T. C.; FERRAO, L. L.; ALMADA, C. N.; SANTILLO, A.; ALBENZIO, M.; CRUZ, A. G. Sheep milk: Physicochemical characteristics and relevance for functional food development. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 2, p. 247–262, 2017.
- BAUMAN, D. E.; TYBURCZY, C.; O'DONNELL, A. M.; LOCK, A. L. Milk lipids: Conjugated linoleic acid. In J. W. Fuquay, P. F. Fox, & P. L. H. Mcsweeney (Eds.). **Encyclopedia of dairy sciences**, 2nd ed, p. 3:660–3:664, London, UK: Elsevier Ltd., 2011.
- BIZIULEVICIUS, G. A.; KISLUKHINA, O. V.; KAZLAUSKAITE, J.; ZUKAITE, V. Food-protein enzymatic hydrolysates possess both antimicrobial and immunostimulatory activities: a “cause and effect” theory of bifunctionality. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 46, p. 131-138, 2006.
- BONSTINIS, T. G.; MALLATOU, H.; PAPPA, E. C.; MASSOURAS, T. H.; ALICHANIDIS, E. Study of proteolysis, lipolysis na volatile profile of a traditional Greak goat cheese (Xinityri) during ripening. **Small Ruminant Research**, v. 105, n. 1-3, p. 193-201, 2012.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. Resolução RDC nº. 12, de 02 de janeiro de 2001. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova Regulamento Técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos, **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília-DF, 02 jan. 2001. Alterada pela Resolução RDC nº 171, de 04 de setembro de 2006.
- BUENO, L. M. C. Leite de cabra: excelente alimento funcional. **Revista Leite e Derivados**, v. 83, p. 52-60, 2005.
- BU, G.; LUO, Y.; CHEN, F.; LIU, K.; ZHU, T. Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: A mini-review. **Dairy Science and Technology**, v. 93, n. 3, p. 211–223, 2013.
- CASTRO, W. F.; CRUZ, A. G.; RODRIGUES, D.; GHISELLI, G.; OLIVEIRA, C. A. F.; FARIA, J. A. F.; GODOY, H. T. Effects of different whey concentrations on physicochemical

characteristics and viable counts of starter bacteria in dairy beverage supplemented with probiotics. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 1, p. 96–100, 2013.

CARVALHO, F.; PRAZERES, A.R.; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Science of the Total Environment**, v. 445–446, p. 385–396, 2013.
 CEBALLOS, L. S.; MORALES, E. R.; ADARVE, G. T.; CASTRO, J. D.; MARTÍNEZ, L.; SAMPELAYO, M.R. S. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 322–329, 2009.

CLARK, S.; GARCÍA, M. B. A 100-year review: Advances in goat milk research. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n.12, p. 10026–10044, 2017.

CHAMPAGNE, C. P.; GOMES DA CRUZ, A.; DAGA, M. Strategies to improve the functionality of probiotics in supplements and foods. **Current Opinion in Food Science**, v. 22, p. 160–166, 2018.

CHATCHATEE, P.; JÄRVINEN, K. M.; BARDINA, L.; VILA, L.; BEYER, K.; SAMPSON, H. A. Identification of IgE and IgG binding epitopes on β - and κ -casein in cow's milk allergic patients. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 31, n. 8, p.1256–1262, 2001.

CHOI, J.; HO, J.; CURRY, S.; QIN, D.; BITTMAN, R.; HAMILTON, J. A. Interactions of very long-chain saturated fatty acids with serum albumin. **Journal of Lipid Research**, v. 43, 2002.

CHURCH, F.C.; HAROLD, E.; SWAISGOOD, H. E.; PORTER, D.H.; CATIGNANI, G.L. Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis In Milk and Isolated Milk Proteins. **Journal Dairy Science**, v. 66, p. 1219–1227, 1983.

CRONIM, M.; VENTURA, M.; FITZGERALD, G.F.; SINDEREN, D.V. Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifibacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, n. 1, p. 4-18, 2011.

CUNSOLO, V.; FASOLI, E.; SALETTI, R.; MUCCILLI, V.; GALLINA, S.; RIGHETTI, P.; G. FOTI, S. Zeus, Aesculapius, Amalthea and the proteome of goat milk. **Journal of Proteomics**, v. 128, p. 69–82, 2015.

DALGLEISH, D. G. On the structural models of bovine casein micelles - review and possible improvements. **Soft Matter**, v.7, p. 2265–2272, 2011.

DE LA FUENTE, M. A.; HEMAR, Y.; TAMEHANA, M.; MUNRO, P. A.; SINGH, H. Process-induced changes in whey proteins during the manufacture of whey protein concentrates. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 361-369, 2002.

DE KRUIF, C. G.; HUPPERTZ, T.; URBAN, V. S.; PETUKHOV, A. V. (2012). Casein micelles and their internal structure. **Advances in Colloid and Interface Science**, n. 171–172, p. 36–52, 2012.

DE VUYST, L. Technology aspects related to the application of functionalstarter cultures. **Food Technology and Biotechnology**, v. 38, p. 105–112, 2000.

DIDELOT, S.; BORDENAVE-JUCHEREAU, S. ROSENFELD, E.; FRUITIER-ARNAUDIN, I.; PIOT, J.; SANNIER, F. Preparation of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory hydrolysates from unsupplemented caprine whey fermentation by various cheese microflora. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 976-983, 2006.

DING, W.K.; SHAH, N.P. Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. **International Food Research Journal**, Malaysia, v. 15, p. 219–232, 2008.

DU TOIT, M.; ENGELBRECHT, L.; LERM, E.; KRIEGER-WEBER, S. Lactobacillus: The next generation of Malolactic Fermentation Starter Cultures – an Overview. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 6, p. 876-906, 2011.

DUTRA DE OLIVEIRA, J. E.; MARCHINI, J. S. **Ciências nutricionais**. São Paulo: Sarvier, p. 403, 1998.

EGITO, A. S., GIRARDET, J. M., LAGUNA, L. E., POIRSON, C., MOLLE, D., MICLO, L., et al. Milk clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine κ -casein. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 816–825, 2007.

EL-SALAM, A. M. H.; EL-SHIBINY, S.; BUCHHEIMH, W. Characteristics and Potential Uses of the Casein Macropeptide. **International Dairy Journal**, v. 6, p. 327–341, 1996.

ELSAYED, S.; HILL, D. J.; DO, T. V. Evaluation of the allergenicity and antigenicity of bovine-milk α s1-casein using extensively purified synthetic peptides. **Journal of Immunology**, v. 60, n. 5, p. 486–493, 2004.

ELWOOD, P. C.; PICKERING, J. E.; GIVENS, D.; GALLACHER, J. E. The consumption of milk and dairy foods and the incidence of vascular disease and diabetes: An overview of the evidence. **Lipids**, v. 45, n. 10, p. 925–939, 2010.

ERIKSEN, E. K.; VEGARUD, G. E.; LANGSRUD, T.; ALMAAS, H.; LEA, T. Effect of milk proteins and their hydrolysates on *in vitro* immune responses. **Small Ruminant Research**, v. 79, n. 1, p. 29-37, 2008.

ESMAEILPOUR, M.; REZA EHSANI, M.; AMINLARI, M.; SHEKARFOROUSH, S.; HOSEINI, E. Antimicrobial activity of peptides derived from enzymatic hydrolysis of goat milk caseins. **Comparative Clinical Pathology**, v. 25, p. 599-615, 2016.

ESPEJO-CARPIO, F. J.; PÉREZ-GALVEZ, R.; GUADIX, E. M.; GUADIX, A. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of goat milk protein fractions. **International Dairy Journal**, v. 32, p. 175-783, 2013.

FAOstat. Food and Agriculture Organization of the United Nations database. From <<http://faostat3.fao.org/home/E>> Retrieved October 10, 2018.

FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report, 2002.

FAZILAH, N. F.; ARIFF, A. B.; KHAYAT, M. E.; RIOS-SOLIS, L.; HALIM, M. Influence of probiotics, prebiotics, synbiotics and bioactive phytochemicals on the formulation of functional yogurt. **Journal of Functional Foods**, v. 48, p. 387–399, 2018.

FIGUEROA-GONZALEZ, I.; QUIJANO, G.; RAMÍREZ, G.; CRUZ-GUERRERO, A. Probiotics and prebiotics- perspectives and challenges. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 8, p. 1341-1348, 2011.

FIOCCHI, A.; BROZEK, J.; SCHÜNEMANN, H.; BAHNA, S. L.; BERG, A. V.; BEYER, K.; VIETHS, S. World allergy organization (WAO) diagnosis and rationale for action against cow's milk allergy (DRACMA) guidelines. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 21, p.1–125, 2010.

FONG, B. I.; NORRIS, C. S.; PALMANO, K. P. Fractionation of bovine whey proteins and characterisation by proteomic techniques. **International Dairy Journal**, v. 18, 23-46, 2008.

FREITAS, C. D. T.; LEITE, H. B.; OLIVEIRA, J. P. B.; AMARAL, J. L.; EGITO, A. S.; VAIRO-CAVALLI, S.; et al. Insights into milk-clotting activity of latex proteases from *Calotropis procera* and *Cryptostegia grandiflora*. **Food Research International**, v. 87, p. 50–59, 2016.

GARCÍA-RUIZ, A.; LLANO, D.G.; ESTEBAN-FERNÁNDEZ, A.; REQUENA, T.; BARTOLME, B.; MORENO-ARRIBAS, V. Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. **Food Microbiology**, v. 44, p. 220-225, 2014.

GARCIA, E. F.; OLIVEIRA, M. E. G.; QUEIROGA, R. C. R. E.; MACHADO, T. A. D.; SOUZA, E. L. Development and quality of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 63, p. 947-956, 2012.

GARCIA, V.; ROVIRA, S.; BOUTOIAL, K.; LOPEZ, M.B. Improvements in goat milk quality: a review. **Small Ruminant Research**, v. 121, n. 1, p. 51-57, 2014.

GATTI, M.; BOTTARI, B.; LAZZI, C.; NEVIANI, E.; MUCCHETTI, G. Invited review: microbial evolution in raw-milk, long-ripened cheeses produced using undefined natural whey starters. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 573-591, 2014.

GIORGIO, D.; DI TRANA, A.; CLAPS, S. Oligosaccharides, polyamines and sphingolipids in ruminant milk. **Small Ruminant Research**, v. 160, p. 23–30, 2018.

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

GREGERSEN, V.R.; LUCEY, J.A. Cheese: Rennet-Induced Coagulation of Milk. **Reference Module in Food Sciences**, Elsevier, 2016.

GÜLCIN, I. Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa. **Amino Acids**, v. 32, p. 431-438, 2007.

HAENLEIN, G. F. W. Goat milk in human nutrition. **Small Ruminant Research**, v. 51, n. 2, p. 155–163, 2004.

HAENLEIN, G. F. W.; ANKE, M. Mineral and trace element research in goats: a review. **Small Ruminant Research**, v. 95, n. 1, p. 2-19, 2011.

HAGEN, S. R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Pre column phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in food. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n. 6, p. 912-916, 1989.

HARAGUCHI F.K.; ABREU W.C.; PAULA H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista Brasileira de Nutrição**, v. 19, n.4, p. 479-488, 2006

HAYALOGLU, A.A.; TOLU, C.; YASAR, K. Characterizing volatile compounds and proteolysis in Gokceada artisanal goat cheese. **Small Ruminant Research**, v. 113, n. 1, p. 187-194, 2013.

HEJTMÁNKOVÁ, A.; PIVEC, V.; TRNKOVA, E.; DRAGOUNOVÁ, H. Differences in the composition of total and whey proteins in goat and ewe milk and their changes throughout the lactation period. **Journal Animal Science**, v. 57, 2012.

HERNANDEZ-LEDESMA, B.; RAMOS, M.; GOMEZ-RUIZ, J.A. Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. **Small Ruminant Research**, v. 101, n. 1-3, p. 196– 204, 2011.

HERNANDEZ-LEDESMA, B.; RECIO, I.; AMIGO, L. Lactoglobulin as source of bioactive peptides. **Amino Acids**, v. 35, n. 2, p. 257–265, 2008.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014.

HODGKINSON, A. J.; WALLACE, O. A. M.; BOGGS, I.; BROADHURST, M.; PROSSER, C. G. Gastric digestion of cow and goat milk: Impact of infant and young child in vitro digestion conditions. **Food Chemistry**, v. 245, p. 275–281, 2018.

HO, J. C.S.; NADEEM, A.; SVANBORG, C.; HAMLET, E. A protein-lipid complex with broad tumoricidal activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, p. 454-458, 2017.

HORWITZ, W. (Ed) **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 18th ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2005. Current Through Revision 3, cap. 50, met. 985.35 e 984.27, p.15-18, 2010.

HORNE, D. S. Casein micelles structure: Models and muddles. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 11, p. 148–153, 2002.

IBGE, **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Produção Pecuária Municipal – 2016. Disponível em: <<http://concla.ibge.gov.br/estrutura/produtos-estrutura/prodlist-industria.html>>. Acesso em: 03 fevereiro 2019.

KALYANKAR, S. D.; KHEDKAR, C. D.; PATIL, A. M. Goat milk. in b. caballero, p. m. fínglas, & f. toldrá (eds.). **Encyclopedia of food and health**, Elsevier, p. 256–260, 2016.

KAMINARIDES, S. A modified form of Myzithra cheese produced by substituting the fresh cheese whey by dried whey protein concentrate and ovine milk and cream. **Small Ruminant Research**, v. 131, p. 118-122, 2015.

KAUR, A. et al. Probiotics and its health benefits. **Journal of Global Biosciences**, v. 3, n. 3, p. 686-693, 2014.

KERASIOTI, E.; STAGOS, D.; TZIMI, A.; KOURETAS, D. Increase in antioxidant activity by sheep/goat whey protein through nuclear factor-like 2 (Nrf2) is cell type dependent. **Food and Chemical Toxicology**, v. 97, p. 47-56, 2016.

KISKINI, A.; DIFILIPPO, E. Oligosaccharides in goat milk: Structure, health effects and isolation. **Cellular and Molecular Biology**, v. 59, n. 1, p. 25–30, 2013.

KOLETZKO, S.; NIGGEMANN, B.; ARATO, A.; DIAS, J. A.; HEUSCHKEL, R.; HUSBY, S.; VANDENPLAS, Y. Diagnostic approach and management of cow's-milk protein allergy in infants and children. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 55, n. 2, p. 221–229, 2012.

KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 2, p. 177–187, 2009.

KULLISAAR, T.; SONGISEPP, E.; MIKELSAAR, M.; ZILMER, K.; VIHALEMM, T.; ZILMER, M. Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects. Retrieved from **The British Journal of Nutrition**, v. 90, n.2, p. 449–456, 2003.

KUNZ, C.; RUDLOFF, S.; BAIER, W.; KLEIN, N.; STROBEL, S. Oligosaccharides in human milk: Structural, functional and metabolic aspects. **Annual Review in Nutrition**, v. 20, p. 699-722, 2000.

KUSHIBIKI, S.; HODATE, k.; KURISAKI, J.; SHINGU, H.; UEDA, Y.; WATANABE, A.; SHINODA, M. Effect of *b*-lactoglobulin on plasma retinol and triglyceride concentrations, and fatty acid composition in calves. **Journal of Dairy Research**, v. 68, p. 579-586, 2001.

LARA-VILLOSLADA, F.; DEBRAS, E.; NIETO, A.; CONCHA, A.; GALVEZ, J.; LÓPEZ-HUERTAS, E.; BOZA, J.; OBLED, C.; XAUS, J. Oligosaccharides isolated from goat milk reduce intestinal inflammation in a rat model of dextran sodium sulfate-induced colitis. **Clinical Nutrition**, v. 25, n. 3 p. 477–488, 2006.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 2, p. 67–78, 2004.

LISTER, I. M. B.; RASMUSSEN, L. K.; JOHNSEN, L. B.; MOLLER, L.; PETERSEN, T. E.; SORESENSEN, E. S. The Primary Structure of Caprine PP3: Amino Acid Sequence, Phosphorylation, and Glycosylation of Component PP3 from the Proteose-Peptide Fraction of Caprine Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2111-2115, 1998.

LI, Z.; JIANG, A.; YUE, T.; WANG, J.; WANG, Y.; SU, J. Purification and identification of five novel antioxidant peptides from goat milk casein hydrolysates. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 6, p. 4242-4251, 2013.

LUCEY, J.A. Cheese: Rennet-Induced Coagulation of Milk. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, 2nd Edition, p. 579–584, 2011.

LUHOVYY, B.L.; AKHAVAN, T.; ANDERSON, G.H. Whey proteins in the regulation of food intake and satiety. **Journal of the American College of Nutrition**, v.26, n. 6 p. 704S–712S, 2007.

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

MADUREIRA, A. R.; PEREIRA, C. I.; GOMES, A. M. P.; PINTADO, M. E.; MALCATA E. F. Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. **Food Research International**, n. 40, p.1197-1211, 2007.

MADUREIRA, A.R.; TAVARES, T.; GOMES, A.M.P.; PINTADO, M.E.; MALCATA, F.X. Invited review: physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. **Journal Dairy Science**, v.93, n. 2, p. 437–455, 2010.

MARTINEZ-FEREZ, A; RODLOFF, S.; GUADIX, A.; HENKEL, C.A.; POHLENTZ, G.; BOZA, J.J.; GUADIX, E.M.; KUNZ, C. et al. Goats' milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: Isolation by membrane technology. **International Dairy Journal**, v.16, n. 2, p. 173–181, 2006.

MAWSON, A.J. Bioconversions for whey utilization and waste abatement. **Bioresource Technology**, v. 47, n. 3, p. 195–203, 1994.

MEDICI, M.; VINDEROLA, C. G.; PERDIGÓN, G. Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresh cheese. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 7, p. 611–618, 2004.

MEYRAND, M.; DALLAS, D. C.; CAILLAT, H.; BOUVIER, F.; MARTIN, P.; BARILE, B. Comparison of milk oligosaccharides between goats with and without the genetic ability to synthesize α s1-casein. **Small Ruminant Research**, v. 113, n. 2-3 p. 411-420, 2013.

MOK, K. H.; PETTERSSON, J.; ORRENIUS, S.; SVANBORG, C. Hamlet, protein folding, and tumor cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 354, p.1-7, 2007.

MONTORO, M.M.; OLALLA, M.; MARTÍNEZ, R.G.; MECA, T.B.; LÓPEZ, M.D.R.; VIQUE, C.C.; ARTACHO, R.; ALÁRCÓN, M.N. Ultrafiltration of skimmed goat milk

increases its nutritional value by concentrating nonfat solids such as proteins, Ca, P, Mg, and Zn. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 11, p. 7628-7634, 2015.

MORELLI, L. In vitro assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1278–1283, 2007.

MORENO-INDIAS, I.; CASTRO, N.; MORALES-DELANUEZ, A.; SÁNCHEZ MACÍAS, D.; ASSUNÇÃO, P.; CAPOTE, J.; ARGÜELLO, A. Farm and factory production of goatvcheese whey results in distinct chemical composition. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.92, n. 10, p. 4792-4796, 2009.

MOUSAVI, M.; HESHMATIA, A.; GARMAKHANY, A. D.; VAHIDINIA, A.; TAHERI, M. Optimization of the viability of *Lactobacillus acidophilus* and physico-chemical, textural and sensorial characteristics of flaxseed-enriched stirred probiotic yogurt by using response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 102, n. 2019, p. 80–88, 2018.

NUALKAEKUL, S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. **International Journal of Food Microbiology**, Netherlands, v. 146, p. 111-117, 2011.

NIELSEN, P.M.; PETERSON, D.; DAMBMANN, C. Improve method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. **Journal of Food Science**, 2001.

OLIVEIRA, C. J. B.; HISRIC, E. R.; MOURA, J. F. P.; GIVISIEZ, P. E. N.; COSTA, R. G.; GEBREYES, W. A. On farm risk factors associated with goat milk quality in Northeast Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 98, n. 1-3, p. 64-69, 2011.

OLIVEIRA D. F.; BRAVO C.E.C.; TONIAL I.B. Soro de leite: Um subproduto valioso. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.67, n.385, p. 64-71, 2012.

OLIVEIRA, E.M.G.; GARCIA, E.F.; QUEIROGA, R.C.R.E.; SOUZA, E.L. Technological, physicochemical, and sensory characteristics of Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bactéria. **Scientia Agricola**, v. 69, n. 6, p. 370-379, 2012.

PALATNIK, D. R.; PORCEL, M.V.O.; GONZALEZ, U.; ZARITZKY, N.; MERCEDES, E.; CAMPDERROS. Recovery of caprine whey protein and its application in a food protein Formulation. **LWT - Food Science Technology**, v.63, p.331-338. 2015.

PANESAR, P. S.; KENNEDY, J. F.; GANDHI, D. N.; BUNKO, K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1-14, 2007.

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

PARK, Y.W. Bioactive components in goat milk. In: Park, Y.W. (Ed.), Bioactive Components in Milk and Dairy Products. Wiley- Blackwell/John Wiley & Sons, **Ltd. Publication**, p. 43–81, 2009.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO F.; RIVAS J. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 110, p. 48-68, 2012.

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

PETTERSSON, J.; MOSSBERG, A; SVANBORG, C. α -Lactalbumin species variation, HAMLET formation, and tumor cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, p.260-270, 2006.

PINTADO, M.E.; MACEDO, A.C.; MALCATA, F.X. Review: Technology, Chemistry and Microbiology of Whey Cheeses. **Food Science Technology International**, v.7, n.2, p.105-116, 2001.

PIRISI, A.; COMUNIAN, R.; URGEGHE, P. P.; SCINTU, M. F. Sheep's and goat's dairy products in Italy: Technological, chemical, microbiological, and sensory aspects. **Small Ruminant Research**, v. 101, p. 102-112, 2011.

QUEIROGA, R.C.R.E.; FERNANDES, M.F.; MEDEIROS, A.N.; COSTA, R.G., OLIVEIRA, C.J.B.; BOMFIM, M.A.D.; GUERRA, I.C.D. Physicochemical and sensory effects of cotton seed and sunflower oil supplementation on Moxotó goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 82, p. 58-61, 2009.

QUIRÓS, A.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; RAMOS, M.; AMIGO, L.; RECIO, I. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 10, p. 3480-3487, 2005.

RAIMONDO, R.F.S., BRANDESPIM, F.B. PRINA, A.P.M., MIYASHIRO, S.I.; SAUT, J.P.E.; MORI C.S.; POGLIANI, F. C.; BIRGEL JUNIOR, E. H. Dynamic in the concentration of whey proteins in themammary secretion of goats during the dry period. **Small Ruminant Research**, v. 113, p. 239-246, 2013.

RAMOS, O. L.; PEREIRA, R. N.; RODRIGUES, R.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A.; MALCATA, F. X. Physical effects upon whey protein aggregation for nano-coating production. **Food Research International**, v. 66, p. 344-355, 2014.

RANADHEERA, C. S.; EVANS, C. A.; ADAMS, M. C.; BAINES, S. K. In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. **Food Research International**, v. 49, p. 619-625, 2012.

RANADHEERA, C. S.; NAUMOVSKI, N.; AJLOUNI, S. Non-bovine milk products as emerging probiotic carriers: Recent developments and innovations. **Current Opinion in Food Science**, v. 22, p. 109–114, 2018.

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

RAYNAL-LJUTOVAC, K.; LAGRIFFOUL, G.; PACCARD, P.; GUILLET, I.; CHILLIARD, Y. Composition of goat and sheep milk products: An update. **Small Ruminant Research**, v. 79, n. 1, p. 57–72, 2008.

RAYANAL-LJUTOVAC, K.; LE PAPE, M.; GABORIT, P.; BARRUCAND, P. French goat milk cheeses: an overview on their nutritional and sensorial characteristics and their impacts on consumers' acceptance. **Small Ruminant Research**, v. 101, n. 1-3, p. 64-72, 2011.

RECIO, I.; VISSER, S. Antibacterial and binding characteristics of bovine, ovine and caprine lactoferrins: a comparative study. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 597-605, 2000.
RIET-CORREA, B.; SIMÕES, S. V.; PEREIRA FILHO, J. M.; AZEVEDO, S. S.; MEDO, D. B.; BATISTA, J. A.; MIRANDA NETO, E. G.; RIET-CORREA, F. Sistemas produtivos de caprinocultura leiteira no Semiárido paraibano: caracterização, principais limitantes e avaliação de estratégias de intervenção. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 345-352, 2013.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**. v. 34, n. 2, p. 105-10, 2002.

RODRIGUES, D.; ROCHA-SANTOS, T.A.P.; PEREIRA, C.I.; GOMES, A.M.; MALCATA, X.; FREITAS, A.C. The potential effects of FOS and inulin upon probiotics bacterium performance in curdledmilk matrices. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, n. 1, p. 100-108, 2011.

ROLIM, F. R. L.; SANTOS, K. M. O.; BARCELOS, S. C.; EGITO, A. S.; RIBEIRO, T. S.; CONCEIÇÃO, M. L.; MAGNANI, M.; OLIVEIRA, M. E. G.; QUEIROGA, R. C. R. E. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 in simulated gastrointestinal conditions and its inhibitory effect against pathogenic bacteria in semi-hard goat cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 807-813, 2015.

RUITER, B.; TRÉGOAT, V.; M'RABET, L.; GARSSSEN, J.; BRUIJNZEEL-KOOMEN, C. A.; KNOL, E. F.; VAN HOFFEN, E. Characterization of T cell epitopes in α s1-casein in cow's milk allergic, atopic and non-atopic children. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 36, n. 3, p. 303–310, 2006.

SALVA, S.; NUNEZ, M.; VILLENA, J.; RAMON, A.; FONT, G.; ALVAREZ, S. Development of a fermented goats' milk containing *Lactobacillus rhamnosus*: In vivo study of health benefits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 13, p. 2355–2362, 2011.

SANMARTÍN, B.; DÍAZ, O.; RODRÍGUEZ-TURIENZO, L.; COBOS, A. Composition of caprine whey protein concentrates produced by membrane technology after clarification of cheese whey. **Small Ruminant Research**, v. 105, n. 1-3, p. 186– 192, 2012.

SANMARTÍN, B.; DÍAZ, O.; RODRÍGUEZ-TURIENZO, L.; COBOS, A. Functional properties of caprine whey protein concentrates obtained from clarified cheese whey. **Small Ruminant Research**, v. 110, n. 1, p. 52– 56, 2013.

SANTIAGO- LÓPEZ, L.; HERNÁNDEZ- MENDOZA, A.; GARCIA, H. S.; MATAHARO, V.; VALLEJO- CORDOBA, B.; GONZÁLEZ- CÓRDOVA, A.F. The effects of consuming probiotic-fermented milk on the immune system: A review of scientific evidence. **International Journal of Dairy Technology**, v. 68, n. 2, p. 153-165, 2015.

DOS SANTOS, K. M. O.; VIEIRA, A. D. S.; BURITI, F. C. A.; DO NASCIMENTO, J. C. F.; DE MELO, M. E. S.; BRUNO, L. M.; DE FÁTIMA BORGES, M.; ROCHA, C. R. C.; DE SOUZA LOPES, A. C.; DE MELO FRANCO, B. D. G.; TODOROV, S. D. Artisanal Coalho cheeses as source of beneficial *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Dairy Science & Technology**, v. 95, n. 2, p. 209-230, 2015.

SELLE, K. M.; KLAENHAMMER, T. R.; RUSSELL, W. M. **Lactobacillus: Lactobacillus acidophilus**. Second Edi : Elsevier, v. 2, 2014..

SETAREHNEJAD, A; KANEKANIAN, A.; TATHAM, A.; ABEDI, A. The protective effect of caseinomacropeptid against dental erosion using hydroxyapatite as a model system. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 652-656, 2010.

SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 43-56, 2005.

SIGMASTAT (programa de computador). Versão 3.5. Point Richmond (Califórnia): Comercial; 2006.

SILANIKOVE, N.; LEITNER, G.; MERIN, U.; PROSSER, C. G. Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. **Small Ruminant Research**, v. 89, n. 2-3, p. 110-124, 2010.

SILVA, P. D. L. et al. Leite de cabra: aspectos produtivos e nutricionais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 62, p. 32-35, 2007.

SILVA, M.S.S.; FIGUEIRÊDO, R.M.F.; QUEIROZ, A.J.M.; SANTIAGO, V.M.S. Avaliação físico-química e sensorial de doces cremosos produzidos com soro de leite de cabra, leite de vaca e polpa de umbu. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 13, n. especial, p. 397-410, 2011.

SILVEIRA, E.O.; LOPES NETO, J.H.; SILVA, L.A.; RAPOSO, A.E.S.; MAGNANI, M.; CARDARELLI, H.R. The effects of inulin combined with oligofructose and goat cheese whey on the physicochemical properties and sensory acceptance of probiotic chocolate goat dairy beverage. **LWT- Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 445-451, 2015.

SONGISEPP, E.; KALS, J.; KULLISAAR, T.; MÄNDAR, R.; HÜTT, P.; ZILMER, M.; MIKELSAAR, M. Evaluation of the functional efficacy of an antioxidative probiotic in healthy volunteers. **Nutrition Journal**, v. 4, n. 1, p. 22, 2005.

SPIES, J. R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry**, v. 39, v. 12, p. 1412-1416, 1967.

STEELE, J.; BROADBENTE, J.; KOK, J. Perspectives on the contribution of lactic acid bacteria to cheese flavor development. **Current opinion in biotechnology**, v. 24, n.2, p. 135-141, 2013.

TALWALKAR, A.; MILLER, C. W.; KAILASAPATHY, K.; NGUYEN, M. H. Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 39, p. 605–611, 2004.

TAYLOR, M. W.; MACGIBBON, A. K. H. (2011). Milk lipids: General characteristics. In J. W. Fuquay, P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.). **Encyclopedia of dairy sciences** 2nd ed. London, UK: Elsevier Ltd, v. 3, p. 649–654, 2011.

THEODOSIOU M, LAUDET V, SCHUBERT M. From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 9, p. 1423–45, 2010.

TOMOTAKE, H.; OKUYAMA, R.; KATAGIRI, M.; FUZITA, M.; YAMATO, M.; OTA, F.; Comparison between Holstein cow's milk and Japanese-Saanen goat's milk in fatty acid composition, lipid digestibility and protein profile. **Bioscience Biotechnology Biochemistry** v.70, n. 11, p.2771-2774, 2006.

VARGAS, D. P.; NÖRNBERG, J. L.; RITT, L. A.; SHEIBLER, R. B.; RIZZO, F. A. MILAN, M. P. Potencialidades funcionais e nutracêuticas das Proteínas do leite bovino. **Revista Eletronica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, p. 25-35, 2014.

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

VERHOECKX, K. C. M.; VISSERS, Y. M.; BAUMERT, J. L.; FALUDI, R.; FEYS, M.; FLANAGAN, S.; KIMBER, I. Food processing and allergenicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 80, p. 223–240, 2015.

VERRUCK, S; DANTAS, D.; PRUDENCIO, E.S. Functionality of the components from goat's milk, recent advances for functional dairy products development and its implications on human health. **Journal of Functional Foods**, v. 52, p. 243–257, 2019.

VILA, L.; BEYER, K.; JÄRVINEN, K. M.; CHATCHATEE, P.; BARDINA, L.; SAMPSON, H. A. Role of conformational and linear epitopes in the achievement of tolerance in cow's milk allergy. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 31, n.10, p. 1599–1606, 2001.

VILLARREAL, M. L. M.; PADILHA, M.; VIEIRA, A. D. S.; FRANCO, B. D. G. M.; MARTINEZ, R. C. R.; SAAD S. M. I. Advantageous direct quantification of viable closely related probiotics in petit-suisse cheeses under in vitro gastrointestinal conditions by propidium monoazide - QPCR. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–11, 2013.

VINDEROLA, G.; GUEIMONDE, M.; GOMEZ-GALLEGO, C.; DELFEDERICO, L.; SALMINEN, S. Correlation between in vitro and in vivo assays in selection of probiotics from traditional species of bacteria. **Trends in Food Science & Technology**, v. 68, p. 83–90, 2017.

WAKABAYASHI H.; MIYAUCHI, H.; SHIN, K.; YAMAUCHI, K.; MATSUMOTO, I.; ABE, K.; TAKASE, M. Orally Administered Lactoperoxidase Increases Expression of the FK506 Binding protein 5 Gene I Epithelial Cells of the Small Intestine of Mice: A DNA Microarray Study. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 71, p. 2274-2282, 2007.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy science and technology**, 2^o Edition). New York, USA: Taylor & Francis, p. 782, 2006.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, v. 8, p. 170-177, 1986.

WOLF, I.V.; PEROTTI, M.C.; BERNAL, S.M.; ZALAZAR, C.A. Study of the chemical composition, proteolysis, lipolysis and volatile compounds profile of comercial Reggianito Argentino cheese: Characterizations of Reggianito Argentino cheese. **Food Research International**, v. 43, n.4, p. 1204-1211, 2010.

YALÇIN, A. S. Emerging Therapeutic Potential of Whey Proteins and Peptides. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, p. 1637-1643, 2006.

ZHANG, W. Q.; GE, W. P.; YANG, J.; XUE, X. C.; WU, S. Z.; CHEN, Y.; QIN, L. H. Comparative of in vitro antioxidant and cholesterol-lowering activities of fermented goat & cow milk. **Resources Environment and Engineering**, p. 417–424, 2015.

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

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 ARTIGO 1

ACÇÃO DA QUIMOSINA ASSOCIADA AO *Lactobacillus Rhamnosus* EM 1107 NAS CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS DE SORO DE LEITE CAPRINO

Resumo

Neste estudo, avaliou-se o efeito da coagulação do leite caprino pela ação da quimosina isolada e associada ao *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 na composição físico-química, perfil de açúcares, ácidos orgânicos e minerais de soro de leite caprino. Para tanto, foram processados dois tratamentos, sendo o tratamento 1 denominado de S1 (soro de leite caprino obtido da coagulação do leite pela ação de enzima animal – quimosina) e o tratamento 2, denominado de S2 (soro de leite caprino obtido da coagulação do leite pela ação conjunta da quimosina e do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* EM 1107). Após obtenção, os soros foram armazenados sob temperatura de refrigeração (4 ± 1 °C) e analisados nos tempos 1, 15 e 30 dias. O tratamento S2 foi avaliado quanto à viabilidade do micro-organismo probiótico e ambos os tratamentos foram avaliados quanto a composição físico-química, perfil de carboidratos, de ácidos orgânicos e de minerais. Foi detectado o aumento ($p \leq 0,05$) das contagens de *L. rhamnosus* no soro S2 ao longo do armazenamento (8,23 a 8,82 log UFC mL⁻¹). A multiplicação microbiana resultou na redução dos teores de lactose, com maior produção de ácido láctico, principalmente a partir do 15º dia de armazenamento no soro S2 ($p \leq 0,05$). Constatou-se maiores teores de ácido láctico, acético e succínico no S2, detectando o aumento do teor de acidez ao longo do armazenamento. Ambos os soros não apresentaram diferença estatística para os GOS ($p > 0,05$). Ca, seguido de Mg, foram os minerais em maior concentração em ambos os tratamentos, com destaque para o S2 que apresentou maiores concentrações destes minerais no último tempo de armazenamento. Ambas as matrizes apresentaram peculiaridades em sua composição que podem ser preponderantes na determinação de sua aplicação. Assim, poderão ser utilizadas como um ingrediente bioativo para a formulação de diversos produtos alimentícios funcionais

Palavras-chave: Soro de leite caprino, probióticos, fermentação láctea, composição nutricional.

1 INTRODUÇÃO

O soro de leite contém propriedades funcionais e tecnológicas que possibilitam ampla aplicação como ingrediente, seja na formulação de suplementos proteicos ou para produção de diversos produtos alimentícios (WEN-QIONG et al., 2017; GAJO et al., 2017; WAGONER; FOEGEDING, 2017). O soro de leite caprino tem sido associado com a presença de oligossacarídeos, proteínas e peptídeos com propriedade funcional, além de sua importante

ação na prevenção da inflamação intestinal e ação na memória, devido aos seus constituintes (ARAÚJO et al., 2016; MEDEIROS et al., 2016; VERRUCK et al., 2019).

A lactose é o principal carboidrato presente no soro de leite caprino e em seus derivados. É considerado um valioso nutriente por favorecer a absorção intestinal de cálcio, magnésio, fósforo e da vitamina C. Outra fração de carboidrato importante presente no soro de leite são os oligossacarídeos, em especial o galacto-oligossacarídeos (GOS), que têm propriedades prebióticas e anti-infeciosas, não sendo digeridos no trato gastrointestinal. (MARTINEZ-FEREZ et al, 2006; MEYRAND et al., 2013; PARK et al., 2009; RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2008; SOUSA, et al., 2015).O soro de leite caprino também é fonte de minerais, com destaque para Na, Ca, P, K, Mg e Cl. Estes micronutrientes atuam de diferentes formas no metabolismo, participando de sinapses nervosas, metabolismo de vitaminas, respiração celular, função hormonal, cofatores enzimáticos, regulação da pressão arterial, resposta imune, sinalizadores celulares, neurotransmissores, secreção de insulina. (COSTA-PINTO; GANTNER, 2019; EREM et al., 2019; HERNANDEZ-LEDESMA et al., 2011; KHANANSHVILI, 2013; THEODOSIOU et al., 2010).

A composição do soro de leite caprino depende, principalmente, das técnicas de processamento utilizadas na remoção da caseína durante a fabricação do queijo (YADAV et al., 2015). A presença dos principais constituintes depende do tipo de queijo e da origem do leite utilizado, e ainda, pode sofrer a influência da raça do animal, do estágio de lactação, da localização geográfica, da estação do ano e do sistema de produção, mais precisamente da alimentação animal (PINTADO; MACEDO; MALCATA, 2001; PARK, 2007).

Os componentes nutricionais desta matriz são gerados e/ou modificados por processos metabólicos, a exemplo da fermentação por ação de bactérias lácticas naturalmente presentes e também as adicionadas ao processamento, como as probióticas; e por ação do processo tecnológico, através de agentes coagulantes de leites, possibilitando a formação de diversos compostos com propriedades funcionais. Os principais metabólitos gerados através da via glicolítica anaeróbica, em que há degradação da molécula de lactose em ácido láctico, podem resultar no aumento da biodisponibilidade de componentes nutricionais e bioativos de grande importância para a saúde do consumidor, tais como peptídeos, oligossacarídeos e ácidos orgânicos. Além disso, estes metabólitos podem ser utilizados como substrato para o desenvolvimento microbiano (GARCIA et al., 2012; WOLF et al., 2010). A fermentação acarreta a redução do pH do produto, influenciando na solubilidade e no *flavour*, contribuindo para o aumento da sua aceitabilidade e conservação. Assim, este processo tecnológico gera produtos com um diferencial no mercado consumidor, devido ao seu apelo nutricional,

funcional, tecnológico e inovador (DU TOIT et al., 2011; ONG; SHAH, 2009; VASILJEVIC, SHAH, 2008; VOIGT et al., 2010).

O reaproveitamento de subprodutos agroindustriais, como o soro de leite, possui grande destaque e inspira diversas pesquisas, pois utiliza processos diferentes de obtenção e suas influências na composição, podendo ser um promissor ingrediente para a indústria de alimentos funcionais. Assim, objetivou-se caracterizar e avaliar o potencial nutricional de soros de leite caprinos obtidos pela ação da quimosina associada ao *Lactobacillus rhamnosus* EM1107.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria prima e preparo do inóculo do *L. rhamnosus* EM1107

O leite pasteurizado (72 °C/15 seg) de cabras da raça mestiça, foi obtido por ordenha mecânica e disponibilizado por uma cooperativa (Capribom[®]), localizada na cidade de Monteiro, Paraíba, Brasil. Foi transportado refrigerado até a unidade laboratorial, onde foi armazenado sob refrigeração (4 ±1 °C) até o momento do processamento de coagulação láctea para obtenção do soro de leite.

O coalho, fonte da enzima animal – quimosina, Naturen[®] (CHR Hansen, Valinhos, Minas Gerais, Brasil), foi obtido comercialmente e a cultura probiótica liofilizada de *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 foi obtida da "Coleção de Micro-organismos de Interesse da Indústria de Alimentos e Agroenergia" da Embrapa Agroindústria Tropical/Fortaleza, Ceará, Brasil.

O inóculo foi preparado segundo Rolim et al. (2015), e para tanto, o *L. rhamnosus* EM1107 foi semeado em ágar MRS suplementado com cisteína HCl (0,05 g/100 mL) (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, EUA) e incubados por 48 horas a 37 °C, em condições anaeróbicas (BD GasPakTM EZ Anaerobe container system, Becton, Dickinson and Company, USA). Em seguida, a cepa probiótica foi inoculada em caldo MRS (Sigma-Aldrich) para crescer por 18 horas a 37 °C, em anaerobiose. Após este período de crescimento, a cepa foi centrifugada (4500 g x 15 min, 4 °C), submetida a duas lavagens com água estéril e o *pellet* ressuspenso em leite, com contagens de 9 log UFC/mL, obtendo-se o inóculo final.

2.2 Processamento dos soros de leite caprino

Os soros de leite caprinos foram produzidos de acordo com a metodologia proposta por Oliveira et al. (2012) e Garcia et al. (2012), com adaptações. Inicialmente, o leite caprino

foi submetido a tratamento térmico a 90 ± 1 °C por 10 minutos e resfriado a 37 ± 1 °C adicionado de cloreto de cálcio a 50% (0,5 mL/L) e da quimosina (0,9 mL/L) que foi diluída na mesma quantidade de água mineral, para ambos os tratamentos. Posteriormente, o inóculo do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* EM1107, em contagens mínimas de 9 log UFC/mL foi adicionado ao tratamento S2. Após isso, os soros obtidos, S1 e S2, foram armazenados sob refrigeração (4 ± 1 °C) durante a vida de prateleira, nos tempos: 1, 15, 30 dias. Em cada tempo, para a realização das análises do perfil de carboidratos, ácidos orgânicos e minerais, as amostras foram congeladas a uma temperatura de -18 °C e liofilizadas (LIOTOP®, L-101 model São Carlos, Brasil) a uma temperatura de -55 ± 2 °C, com pressão de vácuo <138 µHG, (velocidade de liofilização de 1 mm/h), por, aproximadamente, 12 h, e submetidas às análises, em triplicata. Para as demais análises físico-químicas e microbiológicas, trabalhou-se com as amostras de soro líquidas.

2.3 Avaliação da qualidade higiênico-sanitária dos soros de leites e a viabilidade do *L. rhamnosus* EM1107

Para o controle de qualidade foram realizados os seguintes ensaios: contagem de coliformes totais e termotolerantes, bolores e leveduras e *Staphylococcus* coagulase positiva, presença de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes*, de acordo com os métodos da APHA, (2001). Os soros foram submetidos à análise de viabilidade do probiótico *L. rhamnosus* EM1107 ao longo do armazenamento refrigerado (4 ± 1 °C), seguindo-se a metodologia descrita por Santos et al. (2015).

2.4 Análises Físico-químicas e Químicas

2.4.1 Físico-químicas

Após a obtenção dos soros, estes foram submetidos às análises de composição físico-química, de acordo com as metodologias descritas pela *Association of Official Analytical Chemist Methods* (AOAC, 2016). Para tanto, foram realizadas as seguintes análises: o pH foi mensurado em potenciômetro digital Quimis® (modelo Q400, Diadema, São Paulo, Brasil); a acidez em ácido láctico por titulação; umidade e extrato seco total (EST) por secagem em estufa estabilizada a 105 °C, até obtenção de massa constante; determinação de resíduo mineral fixo (RMF), por carbonização seguida de incineração em forno mufla a 550 °C; determinação do teor de proteínas pelo método de Micro-Kjedahl, com o fator 6,38 multiplicado pela porcentagem de nitrogênio; determinação de gordura pela utilização do

lactobutirômetro de Gerber; açúcares totais pela redução de Fehling e calorías a partir dos teores da fração proteica, lipídica e de carboidratos, utilizando-se os coeficientes específicos que levam em consideração o calor de combustão 4,0; 9,0 e 4,0 kcal, respectivamente, conforme Dutra de Oliveira e Marchini (1998).

2.4.2 Perfil de carboidratos

As amostras (S1 e S2) liofilizadas foram diluídas em água MilliQ, numa proporção de 1:2, e filtradas (0,22 µm). Posteriormente analisadas por cromatografia de íons (HPLC-PAD). A quantificação da glicose, galactose e lactose foi feita por cromatografia de troca iônica com detecção amperométrica pulsada (HPLC-PAD), utilizando o cromatógrafo Dionex® (Sunnyvale, CA, Estados Unidos) equipado com a coluna Carbopac PA-1 (4 x 250 mm) e uma coluna de proteção Carbopac PA-1 (4 x 50 mm), bomba GP50, e um detector eletroquímico ED40, onde foram eluídas com A (NaOH 50 mM), B (NaOAc 500 mM, NaOH 50 mM), C (NaOH 150 mM) e D (água ultrafiltrada) a uma vazão de 1 mL/min. A quantificação foi realizada utilizando-se curva de calibração com os padrões lactose, glicose e galactose na faixa de 1 a 100 mg/L. Os galactooligossacarídeos - GOS foram quantificados considerando-se a área relativa dos picos. Para tal, foi utilizado o software de aquisição de dados Peak Net 5.1.

2.4.3 Perfil de ácidos orgânicos

As amostras (S1 e S2) liofilizadas foram diluídas em água MilliQ, numa proporção de 1:2, e filtradas (0,22 µm). Os ácidos orgânicos (acético, succínico, láctico e málico) foram quantificados simultaneamente por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) usando um cromatógrafo Agilent (modelo 1260 Infinity LC, Agilent Technologies, EUA), uma bomba de solvente quaternário (modelo G1311C), desgaseificador, compartimento da coluna termostática (modelo G1316A) e amostrador automático (modelo G1329B), acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) (modelo G1315D) e Detector de Índice de Refração (RID) (modelo G1362A). As demais condições analíticas foram as seguintes: uma coluna Agilent Hi-Plex H (7,7 x 300 mm, 8 µm); fase móvel H₂SO₄ 4 mM/L em água ultrapura; e taxa de fluxo 0,7 mL/min. Os dados foram processados utilizando o software OpenLAB CDS ChemStation Edition™ (Agilent Technologies). Os picos cromatográficos de cada amostra foram identificados comparando os seus tempos de retenção com os dos padrões de ácidos orgânicos. As amostras foram filtradas em membranas de 0,45 micras e injetadas duplicadamente, e as áreas médias dos picos foram usadas para quantificação (BALL et al.,

2011). Os padrões dos ácidos acético, succínico, láctico e málico foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha), todos com pureza $\geq 99\%$. A água ultrapura foi obtida a partir de um sistema MilliQ[®] (EMD Millipore, EUA) e o ácido sulfúrico foi obtido da Vetec Química Fina[®] (Rio de Janeiro, Brasil).

2.4.4 Perfil de minerais

As amostras de soro foram preparadas por digestão ácida assistida por micro-ondas, com a pesagem de 0,5 g de amostra em tubos de teflon para digestão, adicionados 7 mL de ácido nítrico purificado por destilação sub-boiling (Distillacid, Berghof, Eningen, Alemanha) e 1 mL de peróxido de hidrogênio 30% (Merck, Darmstadt, Alemanha). O programa de digestão utilizou temperatura máxima de 170 °C por 37 minutos, e o conteúdo dos tubos foi transferido com água purificada por osmose reversa (Gehaka, São Paulo, Brasil) para balão de 25 mL.

A quantificação dos minerais foi feita por Espectrometria de Emissão Ótica por Plasma Acoplado Indutivamente, que foi realizada usando um espectrômetro de emissão com fonte de plasma com acoplamento indutivo (ICP/OES), da marca Agilent, modelo 5100 VDV ICP OES (Agilent Technologies, Tóquio, Japão), usando as visões axial e radial, equipado com uma fonte de rádio-frequência (RF) de estado sólido de 27 MHz, utilizando um detector óptico sequencial, uma bomba peristáltica, uma câmera de nebulização ciclônica de duplo passo e um nebulizador seaspray. O sistema utilizou como gás de plasma o argônio líquido, com pureza mínima de 99,996% (Air Liquide, Brasil) (HORWITZ, 2010). Foram determinados os elementos minerais: cálcio, cobre, magnésio e zinco. As curvas analíticas foram preparadas em solução de HCl 5% (v/v) a partir de soluções-padrão na concentração de 10 g/L para Ca, Cu, Mg e de 1 g/L para Zn (Merck, Darmstadt, Alemanha).

2.5 Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre os grupos estudados foram analisados utilizando o teste de média Tukey, com nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$), ao longo do armazenamento e teste t-Student ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$), entre os tratamentos de soros de leite, utilizando-se o pacote Sigma Stat 3.5 (Jandel Scientific Software, San Jose, Califórnia) (SIGMASTAT, 2006). Os gráficos foram montados utilizando o programa *OriginPro* 8 SR0 (Northampton, USA).

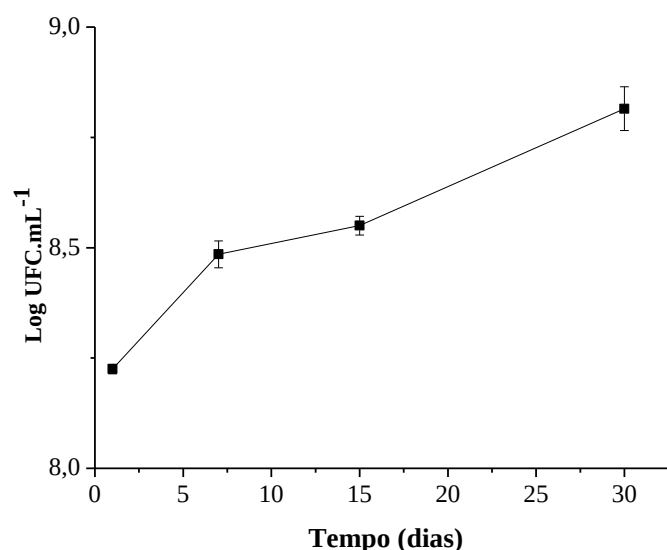
3 RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Características higiênico-sanitárias do soro de leite caprino e viabilidade do *L. rhamnosus* EM1107 ao longo do armazenamento refrigerado

Os resultados das análises microbiológicas de controle higiênico-sanitário mostraram que todos os tratamentos de soros de leite caprino estavam adequados para o consumo humano durante o período de armazenamento refrigerado, visto que foi identificada a ausência de *Salmonella* spp., o não crescimento de *Staphylococcus* coagulase positiva e valores menores que 3 NMP/mL na determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes fecais, indicando boas práticas de fabricação (BPF) do produto recomendadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 1997; BRASIL 2002).

Na Figura 1 é apresentada a viabilidade do *L. rhamnosus* EM1107 durante armazenamento refrigerado. Houve multiplicação do *L. rhamnosus* no soro S2 ao longo do armazenamento, com contagens que variaram de 8,23 a 8,82 log UFC.mL⁻¹. O aumento das contagens ($p \leq 0,05$) foi acompanhado de mudanças nas características nutricionais, conforme apresentado mais à frente, indicando a ação deste micro-organismo durante a fermentação desta matriz.

Figura 1 - Viabilidade do *L. rhamnosus* EM1107 no soro de leite caprino S2 durante armazenamento refrigerado.



Diversos fatores podem afetar a viabilidade dos micro-organismos probióticos em produtos lácteos, dentre eles temos: a cepa utilizada, a pós-acidificação, a composição da possível co-cultura, assim como a presença de fatores intrínsecos de crescimento nas matrizes (CUFFIA et al., 2017; GILLILIAND; SPECK, 1977; ONG; HENRIKSSON; SHAH, 2006; VILLAREAL et al., 2013). O conceito de que probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro, tem sido aceito e utilizado mundialmente por pesquisadores, entidades governamentais e de segurança de alimentos (EFSA, 2012; FAO/WHO, 2002; FOOD SAFETY AUTHORITY OF IRELAND, 2013; HEALTH CANADA, 2009; HILL et al., 2014). Portanto, a manutenção da viabilidade da cultura láctea ao longo do período de armazenamento é fundamental para garantir a qualidade funcional e nutricional do produto e, desta forma, manter os efeitos benéficos esperados do produto para a saúde.

A FAO/WHO (2002) afirma que os micro-organismos “quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”, porém não estabelece exatamente qual seria essa dose. Alguns pesquisadores afirmam que uma concentração mínima de 5 – 6 log UFC.g⁻¹ ou mL ou ainda 7 log UFC.g⁻¹ ou mL (DING; SHAH, 2008; NUALKAELKUL; CHARALAMPOPOULOS, 2011) seria suficiente para proporcionar efeitos positivos no organismo humano.

As matrizes lácteas são tradicionalmente usadas como veículos para a administração de probióticos, apresentando uma série de vantagens sobre outros produtos, pois geralmente

possuem pH próximo da neutralidade e capacidade de tamponamento, além de disponibilidade de nutrientes e menores níveis de oxigênio. Em conjunto, estas condições podem conferir proteção aos micro-organismos durante o armazenamento e durante a exposição às condições adversas encontradas no TGI (CUFFIA et al., 2017; ONG; HENRIKSSON; SHAH, 2006; SANDERS, 2008; VILLAREAL et al., 2013). No presente estudo, o *L. rhamnosus* EM1107 adicionado ao soro S2 apresentou ao longo do armazenamento contagens que condizem com os estudos supracitados, indicando essa matriz com grande potencialidade para ser utilizada como veículo de entrega da cepa estudada para o organismo.

3.2 Caracterização físico-química e química dos soros de leite caprino

3.2.1 Caracterização físico-química

Os resultados obtidos na caracterização físico-química de soros de leite de cabra resultantes do processo de coagulação láctea por ação da renina e da quimosina estão expostos na Tabela 1.

Tabela 1. Composição físico-química de soros de leite caprino resultantes do processo de coagulação láctea por ação da quimosina isolada ou associada ao *Lactobacillus rhamnosus*.

Variáveis	Dias	Soro de leite caprino	
		S1	S2
pH	1	7,03 ±(0,00) ^{A*}	6,54 ±(0,01) ^A
	15	7,04 ±(0,02) ^{A*}	4,88 ±(0,01) ^B
	30	6,91 ±(0,00) ^{B*}	4,14 ±(0,06) ^C
Acidez em ácido láctico (g/100 g)	1	0,12 ±(0,00) ^{B*}	0,10 ±(0,01) ^C
	15	0,17 ±(0,00) ^A	0,30 ±(0,01) ^{B*}
	30	0,19 ±(0,01) ^A	0,68 ±(0,02) ^{A*}
Umidade (g/100 g)	1	92,75 ±(0,01)	92,87 ±(0,08)
	15	92,16 ±(0,18)	93,06 ±(0,00) [*]
	30	92,04 ±(0,01)	93,04 ±(0,24) [*]
EST** (g/100 g)	1	7,25 ±(0,01)	7,13 ±(0,08)
	15	7,84 ±(0,18) [*]	6,95 ±(0,00)
	30	7,96 ±(0,01) [*]	6,96 ±(0,24)
Cinzas (g/100 g)	1	0,32 ±(0,07)	0,29 ±(0,01)
	15	0,35 ±(0,01)	0,34 ±(0,01)
	30	0,29 ±(0,16)	0,22 ±(0,02)
Proteínas (g/100 g)	1	1,19 ±(0,01) [*]	0,82 ±(0,00) ^A
	15	1,28 ±(0,06) [*]	0,83 ±(0,01) ^A
	30	2,05 ±(0,00) [*]	0,66 ±(0,00) ^B
Lipídios (g/100 g)	1	0,40 ±(0,14)	1,00 ±(0,00) [*]
	15	0,50 ±(0,00)	1,10 ±(0,00) [*]
	30	0,40 ±(0,14)	1,00 ±(0,00) [*]
Açúcares (g/100 g)	1	5,99 ±(0,07) ^{A*}	4,10 ±(0,11) ^A
	15	5,36 ±(0,06) ^{B*}	4,19 ±(0,05) ^A
	30	5,49 ±(0,19) ^{AB*}	3,34 ±(0,18) ^B
Calorias (Kcal/100 g)	1	32,31 ±(0,93) [*]	21,93 ±(0,21) ^C
	15	32,21 ±(0,54) [*]	29,96 ±(0,14) ^A
	30	33,76 ±(0,52) [*]	25,03 ±(0,72) ^B

*Médias ±desvio-padrão na mesma linha diferiram entre si pelo teste de t-Student ($p \leq 0,05$), entre os tratamentos.

Médias ±desvio-padrão com letras maiúscula na mesma coluna diferiram entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), ao longo do tempo.

**Extrato Seco Total

S1 – Soro de leite caprino obtido pela ação de enzima animal - Renina; S2 – Soro de leite caprino obtido pela ação de renina e do *L. rhamnosus* EM1107.

Houve influência tanto do tempo de armazenamento como do tipo de coagulação láctea utilizada na obtenção dos soros de leite para a maioria das variáveis avaliadas ($p \leq 0,05$).

Os valores médios dos parâmetros físico-químicos do tratamento S1, no primeiro dia de armazenamento, foram próximos aos detectados em estudos que utilizaram soros de leite caprino em bebidas lácteas mistas, concentrado proteico e bebidas fermentadas com potencial probiótico (GOMES et al., 2013; PALATNIK et al., 2015; SILVEIRA et al., 2015).

Observou-se aumento da acidez, com concomitante redução do pH até o 30º dia de vida de prateleira, principalmente entre o 1º e 30º dia ($p \leq 0,05$), tanto para o soro obtido

através do processo de coagulação por enzima animal (S1) como microbiana (S2). Verificou-se que quando comparado ao tratamento S2, S1 apresentou maiores valores para pH, EST, proteínas, lactose e calorias ($p \leq 0,05$).

De um modo geral, ao longo do armazenamento, houve influência do *L. rhamnosus* EM1107 sob os parâmetros físico-químicos, provavelmente pelo processo fermentativo deste micro-organismo probiótico, que contribuiu para um maior consumo de proteínas, açúcares e, conseqüentemente, aumento do teor de acidez em ácido láctico, principalmente nos últimos dias de armazenamento ($p \leq 0,05$). Esse comportamento foi condizente com o aumento da contagem deste micro-organismo ao longo dos 30 dias, conforme apresentado na Figura 1. Os valores de acidez e pH estão diretamente relacionados com a contagem bacteriana total, uma vez que as bactérias presentes são capazes de fermentar a lactose contida no leite, produzindo ácido láctico (PFEILER; KLAENHAMMER, 2007; TODOROV; FRANCO, 2010), o que aumenta a acidez e, conseqüentemente, diminui o pH, corroborando com os valores apresentados na Tabela 1.

A proteína bruta em S1 não sofreu influência do tempo de armazenamento ($p > 0,05$), mas foi superior ($p \leq 0,05$) a detectada no S2, variando entre 1,19 g/100 g a 2,05 g/100 g. Em contrapartida, em S2 houve uma redução desse macronutriente após 30 dias de armazenamento ($p \leq 0,05$), iniciando com um teor de 0,82 g/100 g e chegando ao final do armazenamento com 0,66 g/100 g, indicando um possível consumo de proteínas pelo *L. rhamnosus* EM1107. Quanto ao conteúdo lipídico das amostras, verificou-se diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre S1 e S2, em que os valores quantificados em S2 mantiveram-se maiores durante toda a vida de prateleira, o que pode ser justificado pelo processo de crescimento da estirpe.

Gomes et al. (2013) analisaram soro de leite caprino e bovino que seriam utilizados como ingredientes em bebidas lácteas e obtiveram valores médios de gordura superiores aos determinados em S1, porém menores que os detectados em S2, sendo 0,48 g/100 g para o soro de leite caprino e 0,62 g/100 g para o soro de leite bovino. Com relação aos resultados determinados para [açúcares](#), S1 apresentou teores superiores aos detectados por estes autores, sendo 5,06 g/100 g para o soro de leite caprino e 4,98 g/100 g para o soro de leite bovino. Todavia, S2 apresentou valores menores, muito provavelmente em decorrência ao processo fermentativo pelo *L. rhamnosus* EM1107. Reforça-se que os teores deste macronutriente encontrados permitem que o soro seja utilizado como ingrediente funcional em bebidas lácteas com baixo teor de gordura, fortificadas, aromatizadas, produtos fermentados, sorvetes, doces e balas, também como base para a formulação de alimentos funcionais e infantis, bem

como produtos dietéticos para fins específicos, como a área clínica e esportiva (VERRUCK et al., 2019).

É importante enfatizar que as variações de composição do soro de leite podem ocorrer dependendo da espécie de animal do qual o leite foi coletado e pela técnica de processamento (soro doce e soro ácido) Alia-se a este fato o tempo e a condição de preservação do soro desde a geração até o momento das análises, o que pode também justificar a variação nos resultados encontrados quando comparados com a literatura (HERNANDEZ-LEDESMA et al., 2011; PANESAR et al., 2007).

3.2.2 Perfil de Carboidratos

Na Tabela 2 são apresentados os resultados do perfil de carboidratos dos soros de leite caprino. Foi observado que a amostra S2 apresentou menor teor de lactose e glicose em todos os tempos avaliados ($p \leq 0,05$), ratificando o processo fermentativo do *L. rhamnosus* EM1107, que possivelmente utilizou estes carboidratos como fonte de energia em sua via metabólica, contribuindo para a multiplicação deste micro-organismo ao longo do armazenamento (Figura 1).

Tabela 2. Perfil de carboidratos de soros de leite caprino resultantes do processo de coagulação láctea por ação da quimosina isolada ou associada ao *Lactobacillus rhamnosus*.

Variáveis (g/100 mL)	Dias	Soro de leite caprino	
		S1	S2
Lactose	1	5,04 $\pm$ (0,13) ^{A*}	3,40 $\pm$ (0,11)
	15	4,33 $\pm$ (0,15) ^{B*}	3,68 $\pm$ (0,15)
	30	4,44 $\pm$ (0,09) ^{B*}	3,36 $\pm$ (0,20)
Galactose	1	0,07 $\pm$ (0,01)	0,07 $\pm$ (0,00) ^A
	15	0,07 $\pm$ (0,01) [*]	0,05 $\pm$ (0,00) ^B
	30	0,05 $\pm$ (0,01)	0,05 $\pm$ (0,00) ^B
Glicose	1	0,08 $\pm$ (0,00) ^{A*}	0,01 $\pm$ (0,00) ^C
	15	0,04 $\pm$ (0,01) ^{C*}	0,02 $\pm$ (0,00) ^B
	30	0,06 $\pm$ (0,00) ^{B*}	0,03 $\pm$ (0,00) ^A
GOS	1	0,20 $\pm$ (0,02)	0,16 $\pm$ (0,07)
	15	0,17 $\pm$ (0,04)	0,12 $\pm$ (0,08)
	30	0,18 $\pm$ (0,08)	0,11 $\pm$ (0,07)

*Médias $\pm$ desvio-padrão na mesma linha diferiram entre si pelo teste de t-Student ($p \leq 0,05$), entre os tratamentos.

Médias $\pm$ desvio-padrão com letras maiúscula na mesma coluna diferiram entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), ao longo do tempo.

GOS - galactooligossacarídeos

S1 – Soro de leite caprino obtido pela ação de enzima animal - Renina; S2 – Soro de leite caprino obtido pela ação de renina e do *L. rhamnosus* EM1107.

No estudo realizado por Thum et al. (2015), soros obtidos de leite de cabras alimentadas no pasto apresentaram teores de lactose (3,6 g/100 mL) e galactose (0,02 g/100 mL) semelhantes ao encontrado no tratamento S2, e inferiores ao S1, com exceção do teor de glicose (0,2 g/100 mL) que apresentou maior concentração quando comparado aos dois tratamentos.

Os resultados encontrados neste estudo apresentaram teores de lactose e glicose superiores aos encontrados por Andrés et al. (2015) em bebidas lácteas comerciais produzidas à base de leite bovino e de extrato de soja. Assim, o soro de leite caprino apresenta um valor nutricional superior ao encontrado em bebidas já comumente encontradas no mercado consumidor.

Foi observado que não houve influência do tempo de armazenamento nem do tipo de coagulação láctea nos teores de GOS determinados nos diferentes tipos de tratamento de soro. Todavia, reforça-se que as quantidades de GOS detectadas para ambas amostras podem promover efeitos prebióticos e, portanto, podem ser utilizados na elaboração de produtos alimentícios e farmacêuticos com potencial funcional (FISCHER; KLEINSCHMIDT, 2015; SUWAL et al., 2019). A produção de GOS a partir da lactose é de interesse industrial para utilização como compostos prebióticos em fórmulas para lactentes, ingredientes funcionais e aditivos alimentares devido aos seus efeitos benéficos na saúde humana, como estimular o crescimento e a atividade de bactérias intestinais (OTIENO, 2010; TORRES et al., 2010; RODRIGUEZ-COLINAS et al., 2011).

3.2.3 Perfil de ácidos orgânicos

Na Tabela 3 é apresentado o perfil de ácidos orgânicos dos soros de leite caprino resultantes do processo de coagulação láctea por ação da renina isolada ou associada ao *Lactobacillus rhamnosus*. Observou-se que os ácidos orgânicos majoritários em ambos tratamentos foram o ácido tartárico, málico, láctico, acético e cítrico. O ácido succínico foi encontrado apenas no soro S2.

Tabela 3. Perfil de ácidos orgânicos de soros de leite caprino resultantes do processo de coagulação láctea por ação da quimosina isolada ou associada ao *Lactobacillus rhamnosus*.

Variáveis (g/L)	Dias	Soro de leite caprino	
		S1	S2
Ácido Tartárico	1	0,20 ±(0,00) ^C	0,21 ±(0,00)* ^B
	15	0,30 ±(0,00)* ^A	0,24 ±(0,00) ^A
	30	0,28 ±(0,00)* ^B	0,08 ±(0,00) ^C
Ácido málico	1	0,25 ±(0,00) ^B	0,29 ±(0,01)* ^A
	15	0,27 ±(0,00)* ^A	0,14 ±(0,00) ^C
	30	0,25 ±(0,01)* ^B	0,16 ±(0,00) ^B
Ácido Lático	1	0,20 ±(0,00) ^B	0,20 ±(0,00) ^C
	15	0,14 ±(0,00) ^C	0,26 ±(0,00)* ^B
	30	0,23 ±(0,01) ^A	0,33 ±(0,00)* ^A
Ácido acético	1	0,33 ±(0,01) ^A	0,67 ±(0,01)* ^A
	15	0,29 ±(0,00) ^B	0,48 ±(0,00)* ^C
	30	0,21 ±(0,00) ^C	0,63 ±(0,00)* ^B
Ácido cítrico	1	0,04 ±(0,00)* ^C	0,023 ±(0,00) ^A
	15	0,11 ±(0,00)* ^A	0,00 ±(0,00) ^B
	30	0,06 ±(0,00)* ^B	0,00 ±(0,00) ^B
Ácido succínico	1	ND	0,19 ±(0,09) ^A
	15	ND	0,10 ±(0,02) ^B
	30	ND	0,05 ±(0,07) ^C

*Médias ±desvio-padrão na mesma linha diferiram entre si pelo teste de t-Student ($p \leq 0,05$), entre os tratamentos.

Médias ±desvio-padrão com letras maiúscula na mesma coluna diferiram entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), ao longo do tempo.

ND – não detectado

S1 – Soro de leite caprino obtido pela ação de enzima animal - Renina; S2 – Soro de leite caprino obtido pela ação de renina e do *L. rhamnosus* EM1107.

Verificou-se que houve influência do tempo de armazenamento, assim como do tipo de coagulação láctea utilizada para obtenção dos soros nos valores determinados para ácidos orgânicos, com destaque para S2 que apresentou maiores quantidades de ácido acético e succínico em todos os tempos avaliados ($p \leq 0,05$). Destaca-se, ainda, que ao longo do tempo de armazenamento houve um aumento dos teores de ácido lático em ambas as amostras ($p \leq 0,05$); entretanto, em S2 foi detectado maiores teores de ácido lático a partir de 15 dias de armazenamento, quando comparado a S1 ($p \leq 0,05$). Esses dados determinados para ácidos orgânicos corroboram com os valores quantificados para acidez em ácido lático (Tabela 1), em que o maior teor de acidez determinado em S2 pode estar associado não só aos maiores valores detectados para ácido lático, mas também às concentrações de ácido acético e succínico determinadas nesta amostra.

Os ácidos orgânicos detectados em soro de leite podem ser transferidos a partir do leite durante o processamento, ou podem ser oriundos de processos fermentativos, em que ocorre a degradação da lactose, com produção de glicose e galactose pela via glicolítica, as quais são

fermentadas pelos micro-organismos presentes e/ou adicionados ao soro de leite (MADUREIRA et al., 2012; YADAV et al., 2015).

Provavelmente, a maior quantidade de ácido succínico encontrado no soro S2 seja resultante do metabolismo aeróbico da estirpe, como via de produção de ATP para sua multiplicação. Já a maior concentração de ácido acético observada no soro S2 pode ser justificada pelo processo de heterofermentação mediado pelo *L. rhamnosus* EM1107, em que as hexoses são convertidas tanto em ácido láctico, quanto em etanol e/ou ácido acético, gás carbônico e ATP (via 6-fosfogluconato/fosfocetolase) (DU TOIT et al., 2011; VASILJEVIC, SHAH, 2008).

Os ácidos orgânicos são um dos grupos de compostos de maior interesse e valor agregado a partir de diferentes biomassas (DENG; WANG; YAN, 2016), incluindo o soro de leite (PANESAR et al., 2007; ARSLAN; AYDOGAN; TASKIN, 2016). Estes ácidos podem ser utilizados na indústria de alimentos e possuem papel como agentes antimicrobianos em embalagens de alimentos, aumentam a vida de prateleira e a segurança dos alimentos, além de desempenharem papel fundamental nos critérios de avaliação da aceitabilidade comercial de produtos alimentícios (LIU; HEYING; TANUMIHARDJO, 2012; ADELEKE; NWANGBURUKA; OBOIRIEN, 2017).

Embora haja um enfoque para a recuperação destes ácidos em diferentes fontes biológicas de menor custo e elevado volume, com vistas à sustentabilidade e aproveitamento de subprodutos alimentares (BEKATOROU, 2016; SAXENA et al., 2017), o uso do soro de leite caprino ainda não tem sido evidenciado como alternativa de agregação de valor, e conforme os resultados apresentados, observa-se que possui importante potencial.

3.2.4 Perfil de minerais

O resultado do perfil de minerais de soros de leite caprino resultantes do processo de coagulação láctea por ação da quimosina isolada ou associada ao *Lactobacillus rhamnosus* está apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Perfil de minerais de soros de leite caprino resultantes do processo de coagulação láctea por ação da quimosina isolada ou associada ao *Lactobacillus rhamnosus*.

Variáveis (mg/100 mL)	Dias	Soro de leite caprino	
		S1	S2
Cálcio	1	441,27 ±(0,55)* ^A	428,29 ±(0,42) ^B
	15	399,34 ±(4,72) ^B	440,74 ±(1,47)* ^B
	30	426,37 ±(6,52) ^A	521,25 ±(5,10)* ^A
Cobre	1	ND	0,08 ±(0,01)
	15	0,05 ±(0,01)	ND
	30	0,07 ±(0,00)	0,11 ±(0,00)*
Magnésio	1	102,56 ±(1,07) ^A	111,63 ±(0,17)* ^C
	15	100,33 ±(0,66) ^{A,B}	115,51 ±(0,12)* ^B
	30	96,44 ±(1,46) ^B	136,67 ±(0,67)* ^A
Zinco	1	0,30 ±(0,02)* ^B	0,14 ±(0,04) ^B
	15	0,13 ±(0,01) ^C	0,14 ±(0,00) ^B
	30	0,45 ±(0,02) ^A	0,62 ±(0,18) ^A

*Médias ±desvio-padrão na mesma linha diferiram entre si pelo teste de t-Student ($p \leq 0,05$), entre os tratamentos.

Médias ±desvio-padrão com letras maiúscula na mesma coluna diferiram entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), ao longo do tempo.

ND – não detectado

S1 – Soro de leite caprino obtido pela ação de enzima animal - Renina; S2 – Soro de leite caprino obtido pela ação de renina e do *L. rhamnosus* EM1107.

Os minerais Cu e Zn estiveram em menores concentrações em ambos os soros, visto que se encontram mais ligados às caseínas nos leites de ruminantes e, portanto, em menor quantidade neste resíduo em relação ao cálcio e magnésio (RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2008). Apesar disso, e analisando apenas o soro de leite, estas concentrações foram superiores as concentrações determinadas no estudo de Andrés et al. (2015), quando avaliaram bebidas lácteas comerciais produzidas à base de leite bovino e de extrato de soja.

Cálcio e magnésio foram os minerais majoritários encontrados em ambos tratamentos. Após 30 dias de armazenamento, S2 apresentou maiores concentrações de Ca (521,25 mg/100 mL) e de Mg (136,67 mg/100 mL) ($p \leq 0,05$). Destaca-se que esses valores encontrados no último tempo de vida de prateleira contribuem com 52,13% do valor recomendado de Ca para homens e mulheres saudáveis e com 32,54% de Mg para homens e 42,71% de Mg para mulheres saudáveis, de acordo com a recomendação diária permitida (RDA) do Instituto de Medicina (2010). Estas concentrações de ambos os tratamentos foram superiores aos resultados obtidos por Souza et al. (2019), quando avaliaram iogurtes e bebidas fermentadas produzidas com soro de leite, em que encontrou que o Ca correspondia a 13,6% da RDA para ambos os gêneros e o Mg 3,80% e 5% da RDA para homens e mulheres saudáveis, respectivamente. Reforça-se que Ca e Mg são fundamentais no metabolismo da vitamina D,

contribuindo para a saúde óssea, redução de dislipidemias e produção de hormônios (ASBAGHI et al., 2019; EREM et al., 2019), o que demonstra potencialidade funcional do soro de leite obtido a partir de coagulação láctea por ação de renina e do micro-organismo *L. rhamnosus* EM1107.

4 CONCLUSÃO

O *Lactobacillus rhamnosus* EM 1107 no soro S2 sobreviveu ao longo da vida de prateleira, com contagens superiores a $8 \log \text{ UFC mL}^{-1}$, promovendo modificações na composição nutricional do soro, o qual apresentou nutrientes de relevância para a saúde humana e ainda com potencialidade para ser utilizado como veículo de entrega desta cepa para o organismo. Ambos soros estudados podem ser consumidos como matriz alimentar ou utilizados como ingredientes na formulação de diversos outros produtos alimentícios, reduzindo o seu descarte, evitando o desperdício e agregando benefícios à saúde dos consumidores. Este estudo evidencia a importância da utilização de soro de leite caprino em processos biotecnológicos fermentativos por ação de bactérias probióticas com potencial para ser utilizado na indústria de alimentos funcionais. Estudos futuros são necessários para elucidar as principais interações deste probiótico veiculado por soro de leite de cabra na saúde humana, bem como a identificação e a bioatividade de outros metabólitos que podem ser gerados em processos fermentativos.

REFERÊNCIAS

- Adeleke R, Nwangburuka C, Oboiriend. B. Origins, roles and fate of organic acids in soils: A review. South African Journal of Botany 2017;108:393-406.
- APHA - American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4. ed., cap. 7 2001:63 – 67.
- Andrés V, Tenorio MD, Villanueva MJ. Sensory profile, soluble sugars, organic acids, and mineral content in milk- and soy-juice based beverages. Food Chemistry 2015;173:1100–1106.
- AOAC-Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International. 20th ed. Gaithersburg: AOAC International, 2016.
- AsbaghiO, Kashkooli S, Choghakhori R, Hasanvand A, Abbasnezhad, A. Effect of calcium and vitamin D co-supplementation on lipid profile of overweight/obese subjects: A systematic review and meta-analysis of the randomized clinical trials. Obesity Medicine 2019;15:100-124.

Araujo DFS, Guerra GCB, Araujo Junior RF, Araujo AA, De Assis POA, Medeiros NA, Sousa YRF, Pintado MME, Galvez J, Queiroga R CRE. Goat whey ameliorates intestinal inflammation on acetic acid-induced colitis in rats. *Journal of Dairy Science* 2016; 99:9383-9394.

Arslan NP, Aydogan MN, Taskin M. Citric acid production from partly deproteinized whey under non-sterile culture conditions using immobilized cells of lactose-positive and cold-adapted *Yarrowia lipolytica* B9. *Journal of Biotechnology* 2016; 231:32-39.

Ball S. et al. Analysis of carbohydrates, alcohols, and organic acids by ion-exchange chromatography. In *Agilent Hi-Plex Columns Applications Compendium*, Agilent Technologies Inc., 2011.

Bekatorou A, Dima A, Tsafraquidou P, Boura K, Lappa K, Kandylis P, Pissaridi K, Kanellaki M, Koutinas AA. Downstream extraction process development for recovery of organic acids from a fermentation broth. *Bioresource Technology* 2016; 220:34-37.

BRASIL. Portaria nº 368, de 04 de setembro de 1997. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Regulamento Técnico sobre as condições Higiênico-sanitárias e de Boas Práticas de Elaboração para estabelecimentos Elaboradores/Industrializadores de Alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 05 set. 1997, Seção 1, p. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução - Resolução n. 275, de 21 de outubro de 2002. Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 22 out. 2002.

Costa-Pinto R, Gantner D. *Macronutrients, Minerals, Vitamins and Energy. Anaesthesia and intensive care medicine* – Elsevier, 2019.

Cuffia F, George G, Renzulli P, Reinheimer J, Meinard C, Burns P. Technological challenges in the production of a probiotic pasta filata soft cheese. *LWT- Food Science and Technology* 2017;81:111–117.

Deng W, Wang Y, Yan N. Production of organic acids from biomass resources. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 2016; 2:54-58.

Ding WK, Shah NP. Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. *International Food Research Journal* 2008;15:219–232.

Du Toit M, Engelbrecht L, Lerm E, Krieger-Weber S. *Lactobacillus*: The next generation of Malolactic Fermentation Starter Cultures – an Overview. *Food and Bioprocess Technology*; 2011;4 (6):876-906.

Dutra de Oliveira JE, Marchini JS. *Ciências nutricionais*. São Paulo: Sarvier;1998:403.

Erem S, Atfi A, Razzaque MS. Anabolic effects of vitamin D and magnesium in aging bone, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2019;193:105-400.

European Food Safety Authority – EFSA. Scientific Opinion. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. EFSA Journal 2012;10:2740.

FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and agriculture Organization of the United Nations and World Health. Organization Workinggroup report. London Ontario, Canadá, 2002. Disponível: <<ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>>. Acesso em 07 de abr 2018.

Fischer C, Kleinschmidt, T. Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. International Dairy Journal 2015;48:15-22.

FOOD SAFETY AUTHORITY OF IRELAND. Probiotic Health Claims. Food Safety Authority of Ireland. 2013. Disponível em: <http://www.fsai.ie/faqs/probiotic_health_claims.html>. Acesso em: Jul. 2018.

Gajo AA, De Resende JV, Costa FF, Pereira QG, De Lima RR, Antonialli F, De Abreu LR. Effect of hydrocolloids blends on frozen dessert —popsicles made with whey concentrated. LWT - Food Science and Technology 2017;75:473-480.

Garcia EF, Oliveira MEG, Queiroga RCRE, Machado TAD, Souza EL. Development and quality of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. International Journal of Food Science and Nutrition 2012;63:947-956.

Gilliland SE, Speck ML. Instability of *Lactobacillus acidophilus* in yogurt. Journal. Dairy Science 1977;60:1395- 1398.

Gomes JJL, Duarte AM, Batista ASM, Figueiredo RMF, Sousa EP, Souza EL, Queiroga RCRE. Physicochemical and sensory properties of fermented dairy beverages made with goat's milk, cow's milk and a mixture of the two milks. LWT - Food Science and Technology 2013;54:18-24.

HEALTH CANADA. Accepted Claims about the Nature of Probiotic Microorganisms in Food. Health Canada. 2009. Disponível em: <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/label/etiquet/claims-reclam/probiotics_claims-allegations_probiotiques-eng.php%20>. Acesso em: Jul. 2018.

Hernandez-Ledesma B, Ramos M, Gomez-Ruiz JA. Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. Small Ruminant Research 2011;101(1-3):196– 204.

Hill, C. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology 2014;11:506–514.

Horwitz, W. (Ed) Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 18th ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2005. Current Through Revision 3, cap. 50, met. 985.35 e 984.27, 2010:15-18.

Institute of Medicine. Dietary reference intakes for water, potassium, sodium, chloride, and sulfate. Washington: National Academy Press, Versão Digital 2010:114.

Khananashvili D. The SLC8 gene family of sodium–calcium exchangers (NCX) –Structure, function, and regulation in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine* 2013;34:220–235.

Liu Y, Heying E, Tanumihardjo SA. History, Global Distribution, and Nutritional Importance of Citrus Fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2012;11:530-545.

Madureira AR, Soares JC, Amorim M, Tavares T, Gomes AM, Pintado MM, Malcata FX. Bioactivity of probiotic whey cheese: characterization of the content of peptides and organic acids. *Journal Science Food Agriculture* 2012.

Martinez-Ferez A, Rodloff S, Guadix A, Henkel CA, Pohlentz G, Boza JJ, Guadix EM, Kunz C. et al. Goats' milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: Isolation by membrane technology. *International Dairy Journal* 2006;16(2):173–181.

Medeiros LB, Lima SMV, Benevides RDL, Queiroga RCRE, Guedes RCA. Neonatal administration of goat whey modulates memory and cortical spreading depression in rats previously suckled under different litter sizes: Possible role of sialic acid. *Nutritional Neuroscience (Online)* 2016.

Meyrand M, Dallas DC, Caillat H, Bouvier F, Martin P, Barile B. Comparison of milk oligosaccharides between goats with and without the genetic ability to synthesize α s1-casein. *Small Ruminant Research* 2013;113(2-3):411-420.

Nualkaekul S, Charalampopoulos D. Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. *International Journal of Food Microbiology* 2011;146:111-117

Oliveira EMG, Garcia EF, Queiroga RCRE, Souza EL. Technological, physicochemical, and sensory characteristics of Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. *Scientia Agricola* 2012;69(6):370-379.

Ong L, Henriksson A, Shah NP. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. *International Dairy Journal* 2006;16(5):446–456.

Ong L, Shah NP. Probiotic Cheddar cheese: Influence of ripening temperatures on survival of probiotic microorganisms, cheese composition and organic acid profiles. *LWT – Food Science and Technology* 2009;42(7):1260-1268.

Otieno DO. Synthesis of β -galactooligosaccharides from lactose using microbial β -galactosidases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2010;9:471-482.

Palatnik DR, Porcel MVO, Gonzalez U, Zaritzky N, Mercedes E, Campderros. Recovery of caprine whey protein and its application in a food protein Formulation. *LWT - Food Science Technology* 2015;63:331-338.

Panesar PS, Kennedy JF, Gandhi DN, Bunko K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry* 2007;105:1-14.

Park YW, Juárez M, Ramos M, Haenlein GFW. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* 2007;68(1-2):88-113.

Park YW. Bioactive components in goat milk. In: Park, Y.W. (Ed.), *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*. Wiley- Blackwell/John Wiley & Sons, Ltd. Publication 2009;43–81.

Pfeiler EA, Klaenhammer TR. The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology* 2007;15(12):546-553.

Pintado ME, Macedo AC, Malcata FX. Review: Technology, Chemistry and Microbiology of Whey Cheeses. *Food Science Technology International* 2001;7(2):105-116.

Raynal-Ljutovac K, Lagriffoul G, Paccard P, Guillet I, Chilliard Y. Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research* 2008;79(1):57–72.

Rodriguez-Colinas B, De Abreu MA, Fernandez-Arrojo L, De Beer R, Poveda A, Jimenez-Barbero J, Haltrich D, Ballesteros Olmo AO, Fernandez-Lobato M, Plou FJ. Production of galacto-oligosaccharides by the β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: comparative analysis of permeabilized cells versus soluble enzyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2011;59:10477-10484.

Rolim FRL, Santos KMO, Barcelos SC, Egito AS, Ribeiro TS, Conceição ML, Magnani M, Oliveira MEG, Queiroga RCRE. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 in simulated gastrointestinal conditions and its inhibitory effect against pathogenic bacteria in semi-hard goat cheese. *LWT - Food Science and Technology* 2015;63(2):807-813.

Sanders ME. Probiotics: Definition, Sources, Selection, and Uses. *Clinical Infectious Diseases*, United States 2008;46:58–61.

Santos KMO, Vieira ADS, Buriti FCA, Do Nascimento JCF, De Melo MES, Bruno LM, De Fátima Borges M, Rocha CRC, De Souza Lopes AC, De Melo Franco BDG, Todorov SD. Artisanal Coalho cheeses as source of beneficial *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Dairy Science & Technology* 2015;95(2):209-230.

Saxena RK, Saran S, Isar J, Kaushik R. Production and Applications of Succinic Acid. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*; 2017;27:601-630.

SIGMASTAT (programa de computador). Versão 3.5. Point Richmond (Califórnia): Comercial; 2006.

Silveira EO, Lopes Neto JH, Silva LA, Raposo AES, Magnani M, Cardarelli HR. The effects of inulin combined with oligofructose and goat cheese whey on the physicochemical properties and sensory acceptance of a probiotic chocolate goat dairy beverage. *LWT - Food Science and Technology* 2015;62(1):445–451.

Sousa YRF, Vasconcelos MAS, Costa RG, Azevedo filho CA, Paiva EP, Queiroga RCRE. Sialic acid content of goat milk during lactation. *Livestock Science* 2015;117:175-180.

Souza TSP, Luna AS, Barros DB, Pimentel TC, Pereira EPR, Guimarães JT, Esmerino EA, Freitas MQ, Costa RGB, Silva MC, Quitério SL, Raices RSL, Cruz AG. Yogurt and whey beverages available in Brazilian market: Mineral and trace contents, daily intake and statistical differentiation. *Food Research International* 2019;119:709–714.

Suwal S, Bentahar J, Marciniak A, Beaulieu L, Deschênes JS, Doyen A. Evidence of the production of galactooligosaccharide from whey permeate by the microalgae *Tetrademus obliquus*. *Algal Research* 2019;39:101470.

Theodosiou M, Laudet V, Schubert M. From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2010;67(9):1423-45.

Thum C, Cookson A, McNabb WC, Roy NC. Composition and enrichment of caprine milk oligosaccharides from New Zealand Saanen goat cheese whey. *Journal of Food Composition and Analysis* 2015;42:30-37.

Todorov SD, Franco BGM. *Lactobacillus plantarum*: Characterization of species and application in food production. *Food Reviews International* 2010;26(3):205-229.

Torres DPM, Gonçalves MDPF, Teixeira JA, Rodrigues LR. Galacto-oligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2010;9:438-454.

Vasiljevic T, Shah NP. Probiotics-From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal* 2008;18(7):714-728.

Verruck S, Dantas D, Prudencio ES. Functionality of the components from goat's milk, recent advances for functional dairy products development and its implications on human health. *Journal of Functional Foods* 2019;52:243–257.

Villarreal MLM, Padilha M, Vieira ADS, Franco BDGM, Martinez RCR, Saad SMI. Advantageous direct quantification of viable closely related probiotics in petit-suisse cheeses under in vitro gastrointestinal conditions by propidium monoazide - QPCR. *PLoS ONE* 2013; 8(12):1–11.

Voigt DD, Chevalier F, Qian MC, Kelly AL. Effect of high-pressure treatment on microbiology, proteolysis, lipolysis and levels of flavour compounds in mature blue-veined cheese. *Innovative Food Science e Emerging Technologies* 2010;11(1):68-77.

Wagoner TB, Foegeding EA. Whey protein–pectin soluble complexes for beverage applications. *Food hydrocolloids* 2017;63:130-138.

Wen-Qiong W, Lan-Wei Z, Xue H, Yi LU. Cheese whey protein recovery by ultrafiltration through transglutaminase (TG) catalysis whey protein cross-linking. *Food Chemistry* 2017;215:31-40.

Wolf IV, Perotti MC, Bernal SM, Zalazar CA. Study of the chemical composition, proteolysis, lipolysis and volatile compounds profile of commercial Reggianito Argentino cheese: Characterizations of Reggianito Argentino cheese. *Food Research International* 2010;43(4):1204-1211.

Yadav JSS, Yana S, Pillia S, Kumara L, Tyagia RD, Surampallib RY. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances* 2015;33(6):756-774.

4.2 ARTIGO 2

**THE EFFECT OF CHYMOSIN ENZYME ACTION ASSOCIATED WITH
Lactobacillus rhamnosus EM1107 ON THE PROTEIN AND AMINO ACID PROFILE
OF GOAT WHEY**

Abstract

The effect of goat milk coagulation by isolated rennin action or when associated with *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 on the protein and amino acid profile of goat whey was evaluated. Goat whey was obtained by coagulating milk and divided into two treatments: W1 (goat whey obtained from milk coagulation by chymosin enzyme action); and W2 (goat whey obtained from milk coagulation by the joint action of chymosin and *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 probiotic). The 2 different wheys (W1 and W2) were stored under refrigeration temperature (4 ± 1 °C) and subsequently were frozen to be subjected to lyophilization at times of 1 (T1), 15 (T15) and 30 (T30) days in order to be analyzed later. The W2 treatment was evaluated for microorganism viability, and the protein and amino acid profile were evaluated in both treatments. *L. rhamnosus* EM1107 multiplication in the W2 whey was observed during storage with counts ranging from 8.23 to 8.82 log CFU mL⁻¹. This increase ($p \leq 0.05$) was accompanied by a reduction in the soluble protein levels, an increase in the degree of hydrolysis, consumption of proteins (seen in the electrophoretic profile), an increase in the free amino acid content and the formation possible of peptides with greater hydrophilic character, possibly due to the use of proteins by the probiotic bacteria as a viable source of energy in metabolism. The majority of smaller-sized proteins such as α -Lactoalbumin and β -Lactoglobulin remained in all treatments and at all times, as demonstrated by mass spectrometry. The chymosin action together with the *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 strain positively influenced the protein profile, highlighting the possible formation of bioactive peptides; however, the identifications and functions of these peptides in the human organism can be tested and evaluated in later studies. This study highlights the importance of using goat whey in biotechnological fermentative processes by probiotic bacteria with the potential to be applied by the functional food industry.

Keywords: Dairy goats, Functional foods, Probiotics, Fermentation processes.

1. Introduction

Whey contains functional and technological properties which enable its wide application as an ingredient, whether in the formulation of protein supplements or in the production of various food products, including those which give health benefits (GAJO et al., 2017; WAGONER; FOEGEDING, 2017; WEN-QIONG et al., 2017). In particular, goat whey is rich in proteins, peptides, lactose, water-soluble vitamins and minerals, being considered a valuable and important product for the food industry (SANMARTÍN et al., 2012; SILVEIRA et al., 2015).

Whey is obtained by virtue of the casein coagulation process during cheese making, which can be enzymatic, acidic and mixed, with enzymatic and mixed being the most used in the cheesemaking process, mainly due to the greater yield obtained in relation to acid coagulation (AQUARONE et al., 2001). Enzymes can come from animals, vegetables and/or microorganisms, and can be used alone or in combination. The type of processing in obtaining milk gel and whey influences the nutritional characteristics, protein profile and sensory aspects of these products (GREGERSEN; LUCEY, 2016). It has already been demonstrated that probiotic cultures, such as the *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* genera, showed better efficiency when added to goat milk for processing their derivatives in the use of the present nutrients, with better production of metabolites with bioactive properties for human health (for example bioactive peptides) when compared to the use of cow's milk in elaborating its derivatives (BALAKRISHNAN; AGRAWAL, 2014; CHAMPAGNE et al., 2018)

β -Lactoglobulin (β -Lg) and α -Lactoalbumin (α -La) are the major proteins found in whey (ARAÚJO et al., 2016; HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2011; SOUSA et al., 2015; VERRUCK et al., 2019). Immunoglobulins, peptone-protease and albumin are proteins which occur in lesser amounts, and others in even lower concentrations such as lactoferrin and lactoperoxidase. Moreover, glycomacropeptide (GMP) can also be present when whey proteins are obtained after cheese production, and corresponds to a soluble protein originating from k-casein (MADUREIRA et al., 2007; MADUREIRA et al., 2010).

Whey proteins, also called seroproteins, generally have an important amino acid composition because they contain all essential amino acids, possess high biological value, present excellent digestibility and are quickly absorbed by the body (OLIVEIRA et al., 2012; SGARBIERI, 2005).

The action of coagulating agents and microbial enzymes produced by lactic acid bacteria during cheese processing can modify these proteins through proteolysis, which consists of a fundamental biochemical event which occurs during production (milk

coagulation) and cheese maturation, culminating in protein degradation into medium and low molecular weight peptides, as well as free amino acids (GARCIA et al., 2012; WOLF et al., 2010).

Considering the aforementioned aspects, it is believed that the whey obtained from mixed coagulation may present advantages which surpass the nutritional value of this matrix. Thus, the objective of this study was to analyze the effect of goat's milk coagulation by isolated chymosin action and when associated with *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 on the protein and amino acid profile of the obtained goat's whey.

2. Material and Methods

2.1 Raw material and preparation of *L. rhamnosus* EM1107 inoculum

Pasteurized milk (72 °C/15 sec) was obtained from crossbred goats by mechanical milking and made available by a cooperative (Capribom[®]), located in the city of Monteiro, Paraíba, Brazil, and transported chilled to the laboratory unit, where it was stored under refrigeration for a maximum of 24 h until the moment of milk coagulation processing to obtain whey.

The animal enzyme source (chymosin), Naturen[®] (CHR Hansen, Valinhos, Minas Gerais, Brazil) was commercially obtained from Christian Hansen[®] (Valinhos, Minas Gerais, Brazil) and the lyophilized probiotic culture of *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 was obtained from the “Collection of Microorganisms of Interest to the Food and Agroenergy Industry” by Embrapa Agroindustry Tropical/Fortaleza, Ceará, Brazil.

The inoculum was prepared according to Rolim et al. (2015). To do so, *L. rhamnosus* EM1107 was seeded on MRS agar supplemented with cysteine HCl (0.05 g/100 mL) (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA) and incubated for 48 hours at 37 °C under anaerobic conditions (BD GasPak[™] EZ Anaerobe container system, Becton, Dickinson and Company, USA). Next, the probiotic strain was inoculated in MRS broth (Sigma-Aldrich) to grow for 18 hours at 37 °C in anaerobiosis. After this growth period, the strain was centrifuged (4500 g x 15 min, 4 °C), subjected to two washes with sterile water and the pellet resuspended in milk, with final counts of 9 log CFU mL⁻¹.

2.2 Goat whey processing

The wheys were produced according to the cheese curd processing methodology proposed by Oliveira et al. (2012), with adaptations. Two different goat whey treatments were processed, namely: W1 (whey obtained from casein coagulation by the animal enzyme action

- chymosin); and W2 (whey obtained from casein coagulation by the joint action of chymosin and the *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 probiotic).

The two whey treatments (W1 and W2) were dialyzed after each cold storage time interval (1, 15 and 30 days) using dialysis membranes (14 kDa cut-off) in a 500 mL becker containing ultrapure water with water changes every hour, totaling ten changes. Next, they were frozen at a temperature of -18 °C and lyophilized (LIOTOP[®], L-101 model São Carlos, Brazil) at a temperature of -55 ± 2 °C with vacuum pressure < 138 µHG, (freeze-drying speed of 1 mm/h) for approximately 12 h. They were subsequently submitted to the analyses (described below) in triplicate at times of 1, 15 and 30 days of cold storage (4 ± 1 °C). This procedure was performed on the whey samples for protein and amino acid characterization analyses.

2.3 *L. rhamnosus* EM1107 viability analyses

The wheys were subjected to a viability analysis of the *L. rhamnosus* EM1107 probiotic in refrigerated storage (4 ± 1 °C) by following the methodology described by Santos et al. (2015).

2.4 Protein characterization of the wheys

2.4.1. Soluble protein determination

The soluble protein content present in the whey samples was determined according to the method described by Bradford (1976), in which the samples were diluted in different concentrations of 0.15 mol/L NaCl (1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:360).

An aliquot of 100 µL was removed from each dilution in duplicate, and 2.5 mL of Bradford's reagent was added. The samples were read at 595 nm in a spectrophotometer (Ultrospec 1100 pro Amersham Biosciences, United Kingdom) after homogenization and rest for 10 min. A bovine serum albumin (BSA) curve was used as a standard.

2.4.2 Degree of hydrolysis

The degree of hydrolysis of the samples was determined using the o-phthaldialdehyde (OPA) method according to Church et al. (1983). In the test, 100 µL aliquots of the resuspended sample (1 mg/mL in distilled water) were added to 750 µL of the OPA reagent (25 mL of disodium tetraborate decahydrate 100 mmol/L; 2.5 mL of 20% SDS; 40 mg of OPA dissolved in 1 mL of methanol, and 100 mL of β-mercaptoethanol, adjusted to the final volume of 50 mL with distilled water), being prepared at the time of use.

The samples were homogenized and incubated for 2 min at room temperature (25 ± 2 °C) and the absorbance read at 340 nm in an Ultrospec 1100 pro spectrophotometer (Biosciences, Amersham, United Kingdom). L-Serine amino acid (50 mg in 500 mL of distilled water - 0.1 mg/mL or 0.9516 meqv/L) was used as a standard. All readings were performed in triplicate and the degree of hydrolysis was calculated according to Nielsen, Peterson and Dambmann (2001).

2.4.3 Analysis of the electrophoretic profile

In this experiment, the application gel (stacking gel) was prepared at a concentration of 3.5% polyacrylamide in 0.5 M Tris-HCl (Tris(hydroxymethyl)-aminomethane) buffer (Sigma-Aldrich), pH 6.8 and 1% SDS (sodium dodecyl sulfate) (Sigma-Aldrich), while the separation gel was mounted forming a 7.5 to 17.5% polyacrylamide gradient in 3 M Tris-HCl buffer, pH 8.8 and 1% SDS. The samples were subjected to protein extraction at each storage time, following the methodology described by Egito et al. (2002). The run was carried out under constant amperage (25 mA), the gel was removed from the plate at the end of the run, fixed in 12.5% TCA (trichloroacetic acid, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) for one hour and then stained with Coomassie brilliant blue R-250 at 0.005%. Excess dye removal was performed with a bleach solution of methanol, acetic acid and water (1:3.5:8 v/v/v). The molecular weights of the whey protein fractions were compared using a molecular weight marker from 12 to 225 kDa (Amersham Rainbow Marker - Full range GE Healthcare®).

2.4.4 Goat whey mass spectrometry

The Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) equipment was used operating in positive linear mode using an Autoflex III mass spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). The samples were dissolved in water (2 mg/mL) and solubilized in an alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid and acetonitrile matrix (10 mg/mL), with 1 mL being applied in the probe and dried quickly in a vacuum. The mass/charge ratio (m/z) of the samples was evaluated. The reading was performed using FlexAnalysis 3.4 software (Bremen, Germany).

2.4.5 Analysis of total and free amino acids

The total amino acids of the two treatments (W1 and W2) was determined by reverse phase column chromatography in a high performance liquid chromatograph (HPLC, SHIMADZU, Kyoto, Japan), according to the method described by Hagen, Frost and

Augustin (1989) and White, Hart and Fry (1986). First, 0.15 g of the lyophilized sample in 9 mL of 6 M hydrochloric acid and phenol p.a. were used to release the individual amino acids. Next, α -aminobutyric acid was added after hydrolysis (110 °C/22 h) as an internal standard. The acid was eliminated by vacuum evaporation, and then the amino acids were derivatized with a methanol, ultrapure water, triethylamine and phenylisothiocyanate (PITC) solution. The amino acids were solubilized, filtered and then introduced into the column. The mobile phase was formed by the eluents A (sodium acetate) and B (acetonitrile, ultrapure water, disodium EDTA).

The individual amino acids were separated according to the following chromatographic conditions: analytical column: LUNA C18 100 A 5 μ M 250 x 4.6 mm 00G-4252-EQ, flow of the eluents (mobile phase): 1 mL/minute at 50 °C, DAD detector (diode array) with detection at 254 nm. The amino acids were identified by comparison with an external standard (Pierce, PN 20088), while α -aminobutyric acid (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA) was used as the internal standard for quantification, according to Hagen, Frost and Augustin (1989) and White, Hart and Fry (1986). The elution order of the amino acids under these conditions was as follows: Aspartic Acid, Glutamic Acid, Serine, Glycine, Histidine, Arginine, Threonine, Alanine, Proline, Internal Standard (AAAB), Tyrosine, Valine, Methionine, Cystine (3 peaks), Isoleucine, Leucine, Phenylalanine and Lysine.

For determining the free amino acids, the amino acids were extracted in acidic solution (0.1M HCl) left in orbital agitation for 30 minutes. An aliquot of the filtrate was derivatized following the same method as for the total amino acids (except acid hydrolysis with temperature) (HANGEN et al., 1993).

Tryptophan was determined separately, as it degrades in acid hydrolysis. Therefore, tryptophan was determined by spectrophotometry after enzymatic hydrolysis with pronase (40 °C/22-24 h), followed by colorimetric reaction with 4-dimethylaminobenzaldehyde (DAB) in 10.55 mol/L of sulfuric acid (H₂SO₄) and reading at 590 nm. The tryptophan content was calculated from a standard L-tryptophan curve (SPIES, 1967).

2.4.6 Hydrophilicity profile

The samples were diluted in ultrapure water and homogenized in an Ultra-Turrax tube disperser (Ika, Staufen, Germany) for 10 minutes at 4856 g and 4 °C (NT 815 Novatecnica). Next, the solution was placed in an ultrasonic bath for 10 minutes (Unique, 1400, São Paulo, Brazil) and centrifuged at 2060 g x 10 minutes (NT 815 Novatecnica). The supernatants of the samples were filtered on filter paper and transferred to a syringe containing a filter with a pore

diameter of 0.45 μm and subsequently a second filter with a pore diameter of 0.20 μm . The hydrophilicity profile was determined using a Nova-Pak C18 column (4.6 mx 250 mm, 4 μm particle size, cartridge, Waters, Ireland) connected to a High Efficiency Liquid Chromatograph (HPLC, SHIMADZU, Kyoto, Japan). The injection volume of the soluble extract was 20 μL and the mobile phase consisted of: Eluent A (1% trifluoroacetic acid in ultra pure water) and Eluent B (1% trifluoroacetic acid in acetonitrile). A linear gradient of the eluent (A) and eluent (B) was applied over 60 minutes at a flow of 1 mL/minute and the detection was performed at 218 nm (Hexis Científica, DR3900, São Paulo).

2.5 Statistical analyses

The data were statistically analyzed by analysis of variance (ANOVA), the differences between the studied groups were analyzed by the Tukey test to compare means at a significance level of 5% ($p \leq 0.05$) during storage, and the Student's t-test between the whey treatments at a significance level of 5% ($p < 0.05$) using the Sigma Stat 3.5 software program (Jandel Scientific Software, San Jose, California) (SIGMASTAT, 2006). The graphics were assembled using the *OriginPro* 8 SR0 program (Northampton, USA).

3 Results and Discussion

3.1 Viability of *L. rhamnosus* EM1107

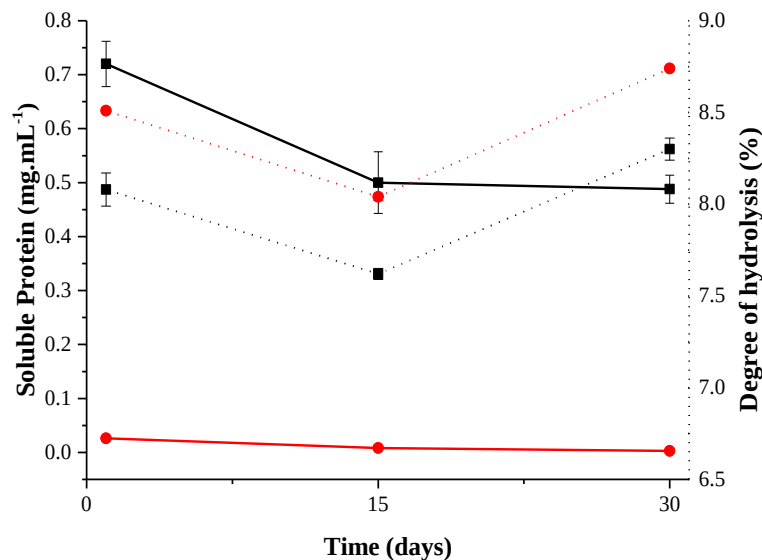
The *L. rhamnosus* EM1107 counts in the W2 treatment ranged from 8.23 to 8.82 log cfu mL^{-1} during storage. This increase in counts ($p \leq 0.05$) was accompanied by changes in the characteristics of the protein and amino acid profile (as will be seen later), indicating the action of this microorganism from the synthesis of its microbial enzymes in the fermentation process of this matrix. The minimum probiotic bacteria count to guarantee health impact is 7.0 log cfu g^{-1} or mL^{-1} (DE VUYST, 2000; TALWALKAR et al., 2004). The concept by the FAO/WHO (2002) is clear when it states that “when microorganisms are administered in adequate quantities, they confer benefits to the health of the host”, but it does not establish exactly what that dose would be. Some researchers claim that a minimum concentration of 5-6 log cfu g^{-1} or mL^{-1} , or even 7 log cfu g^{-1} or mL^{-1} (DING; SHAH, 2008; NUALKAELKUL; CHARALAMPOPOULOS, 2011) would be enough to provide such benefits. Thus, the W2 treatment meets these reference values.

3.2 Protein characterization of the goat whey

3.2.1 Soluble protein and degree of hydrolysis

Figure 1 shows the protein content of the two goat whey treatments (W1 and W2) together with the degree of hydrolysis. *L. rhamnosus* EM1107 influenced these parameters, since W2 had lower protein levels ($p \leq 0.05$) when compared to S1. This fact is probably explained by the higher protein consumption in the natural fermentative process of this strain.

Figure 1. Soluble protein (—) and degree of hydrolysis (····) of goat whey resulting from the milk coagulation process by the action of isolated chymosin (■) or associated with *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 (●).



The enzymatic action on the W1 and W2 whey proteins promoted an increase in hydrolysis during storage, in which the W2 whey showed a greater degree of hydrolysis after 30 days ($p \leq 0.05$), thus demonstrating the microorganism's proteolytic action effect on this matrix, corroborating the protein electrophoretic profile (Figure 2).

The samples obtained by fermentation with lactic acid bacteria take place in three stages: first, casein hydrolysis occurs by a protease anchored to the cell envelope; followed by the transport of peptides by bacteria; and finally, the intracellular hydrolysis of peptides to free amino acids by a set of peptidases (JUILLARD; LOPEZ-KLEINE; MONNET, 2016), which could justify the reduced soluble protein with a concomitant increase in the degree of hydrolysis observed in the goat whey obtained by the joint action of rennin with the probiotic microorganism.

3.2.2 Electrophoresis and mass spectrum of the goat wheys

The protein profile of goat whey showed protein fractions ranging from 225 kDa to 12 kDa, which were identified as immunoglobulin heavy chains, lactoferrins, albumin, immunoglobulin light chains, α -caseins, β -lactoglobulins, α -lactalbumins (Figure 2). Similar characteristics were also reported by Uniacke-Lowe et al. (2010) in working with mare whey, which presented a similar profile to bovine; and by Medeiros et al. (2018) in studying goat whey. It is noteworthy that all proteins detected in the studied whey samples also appear in breast milk, with the exception of β -Lactoglobulin.

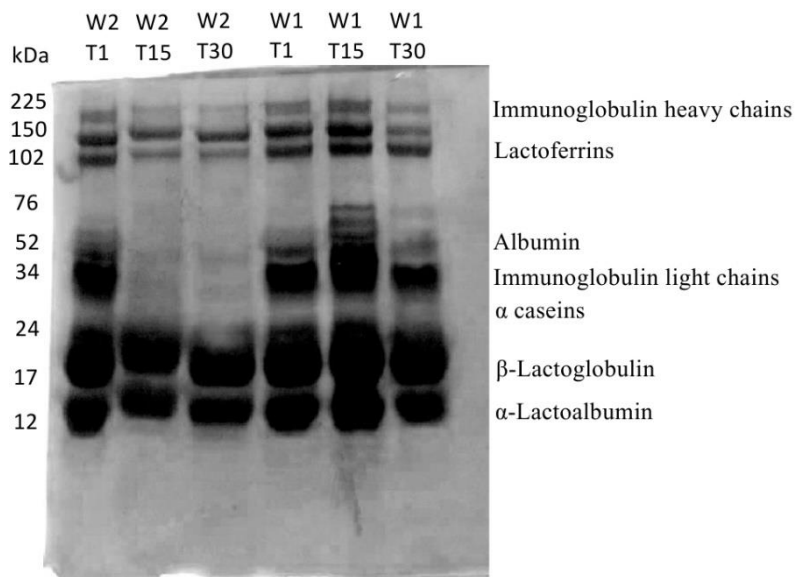


Figure 2. SDS-PAGE of the W1 and W2 goat whey proteins.

W1 – Whey obtained from milk coagulation by isolated chymosin action; W2 - Whey obtained from milk coagulation by the associated action of chymosin and *Lactobacillus rhamnosus* EM1107. T1 - 1 day of cold storage; T15 - 15 days of cold storage; T30 - 30 days of cold storage

Electrophoresis in the probiotic whey (W2) treatment shows that there was hydrolysis and protein consumption, mainly albumin and immunoglobulin light chains resulting from the fermentation process. Such activity reinforces the results observed in the quantification analysis of soluble proteins and the degree of hydrolysis, proving that there was a reduction in the amount of whey protein after the addition and multiplication of the probiotic microorganism. It was also found that the longer the storage time, the greater the proteolysis activity of the natural whey proteins. In spite of this, the majority of smaller-sized goat whey proteins, such as α -Lactoalbumin and β -Lactoglobulin, remained intact in the treatments (W1

and W2) in all storage times (Figure 2). This result was confirmed with mass spectrometry data, in which the presence of α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin was detected in the evaluated range from 2000 to 18000 m/z for both whey types until the last day of storage (data not shown).

β -Lactoglobulin is the main globular protein in whey. It binds to calcium and zinc and can also bind to retinol by transporting it, thus having an important function in carrying minerals, fat-soluble vitamins and lipids due to the numerous binding sites for these nutrients (YALÇIN et al., 2006). Peptides which can act as antibacterials and immunomodulators are derived from β -Lactoglobulin, activating autolytic processes in intestinal microbiota (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2011). Moreover, α -Lactalbumin plays a crucial role in synthesizing lactose and can also bind calcium, which improves its absorption, and is also a source of lysine, leucine, threonine, tryptophan and cysteine. In addition, it forms the α -La/oleic acid complex (HAMLET - Human Alpha-lactalbumin Made Lethal to Tumor cells) among its biological activities, described as a tumoricidal protein-lipid complex with broad effects against cancer cells of different origins (HO; NADEEM; SVANBORG, 2017; MOK et al., 2007; PETTERSSON; MOSSBERG; SVANGORG et al., 2006).

A protein profile in goat whey with lower molecular weights was reported in the study by Anagnostopoulos et al. (2016), as also observed in the study herein. According to these authors, these proteins are subject to variations according to race, geographic location, genetic factors, animal nutrition, as well as the implemented coagulation methods (GREGERSEN; LUCEY, 2016).

In electrophoresis assays (Figure 2), especially after 15 days of storage, it was also observed that there was degradation and consumption of immunoglobulin light chains and albumin in the whey obtained from coagulation by the rennin and *L. rhamnosus* EM1107 action, probably by the higher fermentative metabolism induced by the presence of this microorganism in the sample. It is reinforced that the proteolysis of these proteins can lead to a release of peptides with bioactive properties. Bioactive peptide obtention can be stimulated by the use of initiator bacteria and/or probiotics, commonly used in processing dairy products, which have proteolytic activity through the rennin action peptidases and other coagulants (MADUREIRA et al., 2010). Thus, these peptides, in particular goat's milk and its derivatives such as whey, can perform antioxidant (AHMED et al., 2015; LI et al., 2013), antibacterial (ESMAEILPOUR et al., 2016), and immunomodulating activities (ERIKSEN et al., 2008), as well as angiotensin enzyme-inhibiting actions (ESPEJO-CARPIO et al., 2013; QUIRÓS, et al., 2005).

Based on the obtained electrophoretic profile, it is found that both wheys can be consumed as a food matrix or used as ingredients in formulating several other food products due to their protein quality, thus reducing their disposal and adding nutritional value to products. The use of probiotic bacteria, such as *Lactobacillus rhamnosus* EM1107, in mixed milk coagulation processes to obtain whey, in addition to showing this matrix as a good carrier and protective vehicle for this strain during storage, also confirms that biotechnological fermentative whey processes can contribute to producing a whey with interesting protein quality, and can be considered a product with functional potential, resulting from both the presence of the probiotic microorganism in viable counts until the end of the shelf life, as well as a source of possible bioactive peptides with great potential to perform therapeutic functions in the human body.

3.2.3 Analysis of the total and free amino acid profile and the hydrophilicity profile of peptides from goat whey

The total amino acid profile of the goat whey (Table 1) showed a relevant amount of essential amino acids, with an emphasis on threonine, isoleucine, lysine, histidine, phenylalanine + tyrosine and tryptophan for both wheys, which were above minimum daily recommendations proposed by FAO/WHO (2007). Moreover, there was only a difference between treatments for the amino acid valine in the profile of essential amino acids, which was detected in greater concentration in the W1 treatment, as well as for the amino acid threonine, which had higher levels in W2 ($p \leq 0.05$).

Values higher than 1.0 were adopted as a reference for the chemical score of whey, and only sulfur (methionine + cysteine) and leucine did not present a score which exceeded the recommendations, despite corresponding to 86.32% and 91.15%, respectively, of what FAO/WHO (2007) recommends daily. Both whey treatments met the recommendations, which demonstrates that the studied samples can be considered as a product with an excellent amino acid profile, especially the W2 whey because it has a higher amino acid content (essential + non-essential) than the W1 whey (Table 1). Thus, the importance of the fermentation carried out by the microorganism in obtaining whey rich in amino acids and possible peptides is highlighted, thereby generating a product with better nutritional and functional quality.

Table 1. Essential and non-essential amino acids from goat whey resulting from the milk coagulation process by isolated chymosin action or associated with *Lactobacillus rhamnosus* EM1107.

Total amino acids mg/g of protein	Goat whey		P-value	FAO ¹ standard (mg/g of protein)	AA ² Score
	W1	W2			
Essential amino acids					
Threonine	51.14 ±0.28	56.26 ±1.10*	P = 0.024	23	2.22 - 2.45
Valine	41.21 ±0.09*	30.09 ±0.04	P = <0.001	39	0.77 - 1.06
Isoleucine	48.07 ±0.75	42.46 ±1.71	P = 0.051	30	1.42 - 1.60
Leucine	53.52 ±0.75	54.59 ±0.26	P = 0.202	59	0.90 - 0.93
Lysine	61.62 ±0.07	61.88 ±0.09	P = 0.084	45	1.37 - 1.38
Histidine	17.69 ±0.05	17.55 ±0.05	P = 0.113	15	1.18 - 1.17
Methionine + Cysteine	19.65 ±0.10	18.65 ±3.29	P = 0.486	22	0.85 - 0.89
Phenylalanine + Tyrosine	43.70 ±0.06	40.37 ±1.16	P = 0.486	38	1.06 - 1.15
Tryptophan	12.20 ±0.00	14.00 ±0.00*	P = <0.001	6	2.03 - 2.34
Total	348.81±0.00*	335.84±0.00	P = <0.001	277	1.21-1.26
Non-essential amino acids					
Aspartic acid	128.17 ±0.06	132.19 ±0.95*	P = 0.002	NA	NA
Glutamic acid	89.72±0.13*	71.36±0.24	P = 0.001	NA	NA
Serine	40.36 ±0.11	48.34 ±0.23*	P = <0.001	NA	NA
Glycine	17.90 ±0.05	23.61 ±0.07*	P = <0.001	NA	NA
Arginine	33.40 ±0.10	34.62 ±1.34	P = 0.328	NA	NA
Alanine	34.62 ±0.011	36.41 ±0.12*	P = 0.002	NA	NA
Proline	55.44 ±0.58	94.44 ±1.31*	P = <0.001	NA	NA
Total	399.11 ±0.71	440.46 ±0.71*	P = <0.001	NA	NA

*Means ± standard deviation on the same line differed by the Student's t-test ($p \leq 0.05$) between treatments. W1 - Whey obtained from milk coagulation by isolated chymosin action; W2 - Whey obtained from milk coagulation by the associated action of chymosin and *Lactobacillus rhamnosus* EM1107. ¹Standard protein reference FAO/WHO/UN (2007) - estimated requirement of amino acids (Adults); ²Score of amino acids (mg/g of proteins in the sample) / (mg/g of standard proteins FAO/WHO); NA - Not applicable.

In the study by Rafiq et al. (2016), a high concentration of the amino acid lysine was found in camel milk casein (67.00 ± 2.39 mg/g) and in whey proteins (96.00 ± 2.20 mg/g), as well as a substantial amount of valine, isoleucine, threonine and phenylalanine. Similarly, Stancheva et al. (2011) also reported higher levels of leucine in studying sheep milk, followed by lysine and valine among the essential amino acids.

Lysine, threonine and tryptophan are limiting amino acids in various foods, including rice and wheat. These amino acids are strictly essential, sensitive to catabolism and essential for protein synthesis. Whey is an important dietary source of lysine, a growth hormone-stimulating amino acid (TUNICK et al., 2016), as seen in this study, considering that lysine was the essential amino acid which stood out in quantity for both studied wheys (Table 1).

Tryptophan ingestion in the diet results in a reduction of depressive symptoms in healthy individuals (LINDSETH et al., 2015); in addition, tryptophan consumption is not only important for protein synthesis, but also for forming neuroactive compounds (TAŞ et al., 2019). In this study, it was seen that goat whey fermented with *L. rhamnosus* EM1107 can be a considerable source of this amino acid, and that together with lysine (also detected in an appreciable amount in this type of whey) makes it an excellent source of these limiting amino acids in the diet.

It is noteworthy that whey proteins are rapidly metabolized and absorbed (JAKUBOWICZ; FROY, 2013). Its superiority in relation to eggs, red meat, soy, caseins and fish refers to the amino acid and peptide content, which are presented as bioactive compounds capable of bringing benefits to human health, since it is a source of essential amino acids (SMITHERS, 2008), as verified in this research in determining the total amino acid profile.

Regarding the amount of Branched-Chain Amino Acids (BCAA) - valine, isoleucine and leucine, the W1 treatment presented approximately 11.81%, 13.78% and 15.34%, respectively, of the total essential amino acids in this whey; while in the W2 treatment these amino acids corresponded to approximately 8.96%, 12.64% and 16.25%, respectively, also of the total essential amino acids of this whey. Thus, the W1 whey has 40.94% and W2 whey has 37.86% of BCAA, demonstrating that both treatments can be used in producing food supplements and as ingredients for producing products which aim to increase protein intake.

When compared to soy protein, the BCAAs present in whey are in greater concentration and are more efficient for the metabolism of peripheral tissues (BOS et al., 2000; FOUILLET et al., 2002). These amino acids have a relevant action in protein synthesis, promoting muscle anabolism by stimulating anabolic hormones and mTor protein (Mammalian Target of Rapamycin), in signaling molecules, or as a substrate for initiating this

process (HÁ; ZEMEL, 2003; JENSEN et al., 2016). In addition, BCAAs are important in weight control via glucose homeostasis and lipid metabolism, which reinforces the functional potential of the studied goat whey matrices.

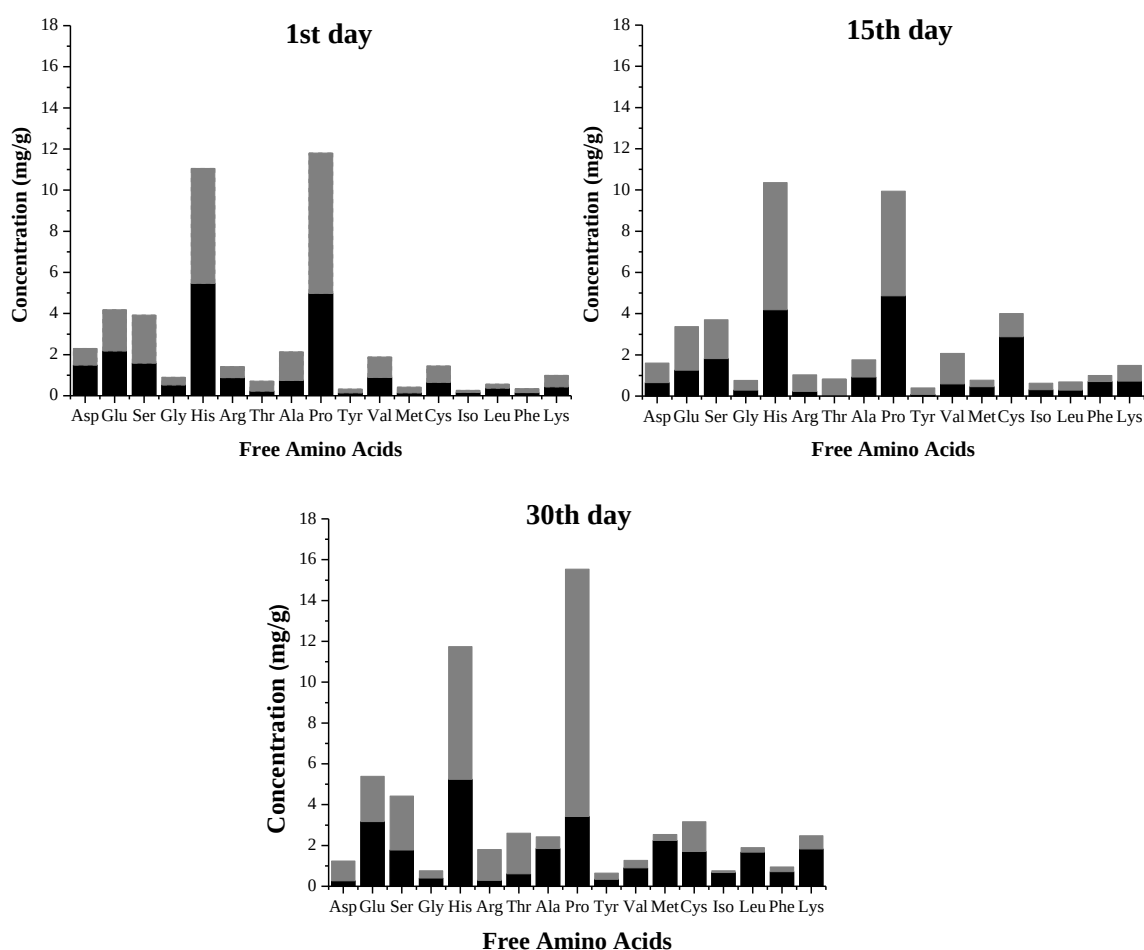
Aspartic and glutamic acids were the amino acids which stood out in the profile of non-essential amino acids in terms of quantities, which had already been reported in the literature by Kareb et al. (2017) and Sinha et al. (2007) in studies with bovine whey. There was a statistical difference regarding non-essential amino acids, in which the W2 treatment showed higher levels for most of these amino acids ($p \leq 0.05$), with the exception of aspartic acid, which can be explained by the proteolytic action of *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 present in this type of whey, thus contributing to the increase in the amount of these amino acids.

It was also found that leucine and glutamic acid were the main amino acids present in the studies by Salem et al. (2009) and Rafiq et al. (2016) with goat milk, and Shamsia (2009) with camel milk, while methionine and glycine were present in trace amounts. Likewise, Stancheva et al. (2011) reported higher levels of glutamic acid, followed by proline and aspartic acid when they studied sheep milk.

The data presented herein demonstrate that the enzymatic hydrolysis of goat whey by the *L. rhamnosus* EM1107 microorganism when associated with the rennin enzyme leads to an interesting amino acid profile, with numerous possibilities for research and applications by the food industry, especially given the biological activities already evidenced for these amino acids and possible peptides generated. In addition, another important factor is that it can reduce protein allergenicity from protein hydrolysis (common in fermentation), which enables its use as an ingredient in food for special purposes (GOULART et al., 2014; AMBROSI et al., 2016), which again reinforces the potential of mixed fermentation biotechnological processes for obtaining whey and its use by the food industry and functional products.

The addition of probiotic lactic acid bacteria and the storage time influenced the release of amino acids in the evaluated whey (Figure 3).

Figure 3. Free amino acid profile (mg/g protein) in whey samples obtained from milk coagulation by the isolated chymosin enzyme action (W1, ■) and whey obtained from milk coagulation by the associated action of chymosin and *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 (W2, ■)



It is observed that there was an increase in the free amino acid concentration during the shelf life, mainly in the W2 whey, due to the proteolytic action of the probiotic micro-organism used, corroborating with the previously mentioned results. Michaelidou et al. (2003) found that bacteria of this genus cause high proteolytic activity due to the performance of their peptidases.

Furthermore, four of the 18 quantified amino acids had their amounts approximately doubled in the last shelf life when compared to the first day of storage, as in the case of arginine (from 0.53 ± 0.00 to 1.50 ± 0.11 mg/g), threonine (from 0.47 ± 0.66 to 2.00 ± 1.37 mg/g), proline (from 6.82 ± 0.09 to 12.11 ± 0.00 mg/g), and cysteine (from 0.79 ± 0.03 to

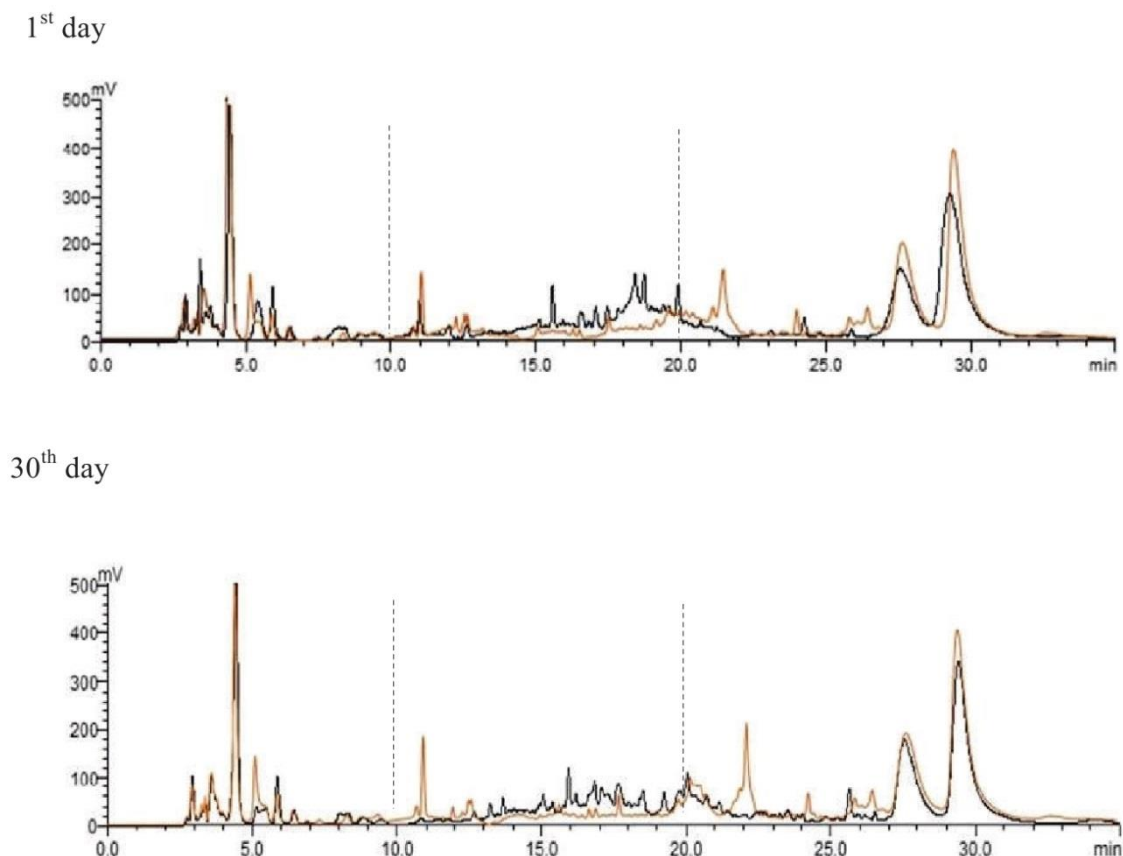
1.47 ± 0.05 mg/g). This increase in free amino acids was also verified in the study by Bezerra et al. (2016) on cheeses with added probiotic bacteria due to proteolysis caused by the added *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. It is noteworthy that the production of free amino acids contributes to the characteristic flavor of fermented dairy derivatives, in addition to contributing as precursors to other catabolic reactions which originate keto acids, ammonia, amines, aldehydes, acids, and alcohols which contribute to the flavor of these products (ALBENZIO et al., 2011; ALBENZIO et al., 2013; ILICIC et al., 2012).

It is important to emphasize that the amino acids released by proteolytic enzymes during fermentation can undergo a conversion process (deamination, decarboxylation and dehydrogenation) and then be metabolized by bacterial cultures (SINZ; SCHWAB, 2012), which can also lead to obtaining peptides.

The hydrophilicity behavior of peptides extracted from the W1 and W2 wheys after 1 and 30 days of storage is shown in Figure 4. The high hydrophilicity zones correspond to up to 10 min, medium hydrophilicity from 10 to 20 min and low hydrophilicity from 20 to 30 min. It was observed that both wheys (W1 and W2) presented peptides with hydrophilic characteristics, which was also found in the proteolysis of cheeses with added *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, and *Bifidobacterium lactis* species in the study by Bezerra et al. (2016).

The enzymes which act on this proteolysis are endoproteinases, which hydrolyze peptide bonds within the chain, and exopeptidases that hydrolyze one amino acid at a time at both the N-terminal (aminopeptidases) and C-terminal (carboxypeptidases) extremities (HAYALOGLU et al., 2013; STEELE; BROADBENTE; KOK, 2013). This proteolytic process generates bioactive peptides with numerous important biological activities for human health (BALTHAZAR et al., 2017; CUNSOLO et al., 2015; KORHONEN, 2009), once again reinforcing the functional potential of the studied wheys, with an emphasis on the W2 treatment.

Figure 4. Hydrophilicity profile of goat whey obtained from milk coagulation by the isolated chymosin enzyme action (W1-) and whey obtained from milk coagulation by the associated action of chymosin and *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 (W2-).



High hydrophilicity (up to 10 min), medium hydrophilicity (10-20 min) and low hydrophilicity zones (20-30 min).

4. Conclusion

Lactobacillus rhamnosus EM1107 survived throughout the shelf life with counts greater than 8 log CFU mL⁻¹. In addition, it promoted a reduction in protein content, with an increase in protein hydrolysis and amino acid content due to proteolysis, thus possibly generating new peptides, although it maintained the major α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin whey proteins. W2 whey can be consumed as a food matrix or as an ingredient in the formulation of various food products with functional potential as a source of several relevant nutrients to human health, which would reduce its disposal, avoiding waste and adding health benefits to consumers. This study highlights the magnitude of using goat whey in fermentative biotechnological processes by probiotic bacteria with the potential to be applied by the food industry. Future studies are necessary to evaluate the protection of whey on the survival of *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 in simulation models of in vitro digestion, as

well as the performance of identification and evaluation tests on the functionality of peptides which are generated by the metabolic fermentative process of this milk matrix. In addition, elucidating the main therapeutic properties of this probiotic when conveyed by the goat whey obtained by mixed coagulation and the peptides generated by fermentation in animal models may clarify mechanisms of action to improve the health of those who will consume this type of food matrix product with bioactive potential.

REFERENCES

- Anagnostopoulos, A.K., Katsafadou, A.I., Pierros, V., Kontopodis, E., Fthenakis, G.C., Arsenos, G., Karkabounas, S.C.H., Tzora, A., Skoufos, I., Tsangaris, G.T.H. (2016). Milk of Greek sheep and goat breeds; characterization by means of proteomics. *Journal of Proteomics*, 147, 76-84.
- Albenzio, M., Santillo, A. (2011). Biochemical characteristics of ewe and goat milk: effect on the quality of dairy products. *Small Ruminant Research*, 101, 33-40.
- Albenzio, M., Santillo, A., Caroprese, M., Ruggieri, D., Napolitano, F., Sevi, A. (2013). Physicochemical properties of Scamorza ewe milk cheese manufactured with different probiotic cultures. *Journal Dairy of Science*, 96, 5, 2781-2791.
- Ambrosi, V., Polenta, G., Gonzalez, C., Ferrari, G., Maresca, P. (2016). High hydrostatic pressure assisted enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 38, 294-301.
- Aquarone, E., Borzani, W., Schmidell, W., Lima, U.A. (2001). *Biotechnologia Industrial: biotecnologia na produção de alimentos*. São Paulo: Edgard Bllucger, 4,523.
- Araujo, D.F.S., Guerra, G.C.B., Araujo Junior, R.F., Araujo, A.A., De Assis, P.O.A., Medeiros, N.A., Sousa, Y.R.F., Pintado, M.M.E., Galvez, J., Queiroga, R.C.R.E. (2016). Goat whey ameliorates intestinal inflammation on acetic acid-induced colitis in rats. *Journal of Dairy Science*, 99, 9383-9394.
- Balakrishnan, G., Agrawal, R. (2014). Antioxidant activity and fatty acid profile of fermented milk prepared by *Pediococcus pentosaceus*. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 51,12, 4138–4142.
- Balthazar, C.F., Pimentel, T.C., Ferrao, L.L., Almada, C.N., Santillo, A., Albenzio, M., Cruz, A.G. (2017). Sheep milk: Physicochemical characteristics and relevance for functional food development. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16, 2, 247–262.
- Bezerra, T.K.A., Araujo, A.R.R., Nascimento, E.S., Paz, J.E.M., Gadelha, C.A., Gadelha, T.S., Pacheco, M.T.B., Egypto Queiroga, R.C.R.E., Oliveira, M.E.G., Madruga, M.S. (2016). Proteolysis in goat “coalho” cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. *Food Chemistry*, 196, 359–366.

- Bos, C., Gaudichon, C., Tome, D. (2000). Nutritional and physiological criteria in the assessment of milk protein quality for humans. *Journal American College Nutrition*, 19, 191-205.
- Castro, W.F., Cruz, A.G., Rodrigues, D., Ghiselli, G., Oliveira, C.A., Faria, J.A., Godoy, H.T. (2013). Effects of different whey concentrations on physicochemical characteristics and viable counts of starter bacteria in dairy beverage supplemented with probiotics. *Journal of Dairy Science*, 96, 1, 96–100.
- Champagne, C.P., Gomes da Cruz, A., Daga, M. (2018). Strategies to improve the functionality of probiotics in supplements and foods. *Current Opinion in Food Science*, 22, 160–166.
- Church, F.C., Harold, E., Swaisgood, H.E., Porter, D.H., Catignani, G.L. (1983) Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis In Milk and Isolated Milk Proteins. *Journal Dairy Science*, 66, 1219–1227.
- Cunsolo, V., Fasoli, E., Saletti, R., Muccilli, V., Gallina, S., Righetti, P.G., Foti, S. (2015) Zeus, Aesculapius, Amalthea and the proteome of goat milk. *Journal of Proteomics*, 128, 69–82. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.07.009>
- De Vuyst, L. (2000). Technology aspects related to the application of functional starter cultures. *Food Technology and Biotechnology*, 38, 105–112.
- Ding, W.K., Shah, N.P. (2008). Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. *International Food Research Journal*, 15, 219–232.
- Du Toit, M., Engelbrecht, L., Lerm, E., Krieger-Weber, S. (2011). Lactobacillus: The next generation of Malolactic Fermentation Starter Cultures – an Overview. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 6, 876-906.
- Egito, A.S., Miclo, L., López, C., Adam, A., Girardet, J.M., Gaillard, J.L. (2002). Separation and characterization of mares' milk alpha (s1)-, beta-, kappa-caseins, gamma-casein-like, and proteose peptone component 5-like peptides. *Journal of dairy science*, 85, 4, 697-706.
- Eriksen, E.K., Vegarud, G.E., Langsrud, T., Almaas, H., Lea, T. (2008). Effect of milk proteins and their hydrolysates on *in vitro* immune responses. *Small Ruminant Research*, 79, 1, 29-37.
- Esmaeilpour, M., Reza Ehsani, M., Aminlari, M., Shekarforoush, S., Hoseini, E. (2016). Antimicrobial activity of peptides derived from enzymatic hydrolysis of goat milk caseins. *Comparative Clinical Pathology*, 25, 599-615.
- Espejo-Carpio, F.J., Pérez-Gálvez, R., Guadix, E.M., Guadix, A. (2013). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of goat milk protein fractions. *International Dairy Journal*, 32, 175-783.
- FAO/WHO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report.

- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2007). Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition. In Report of a Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation; WHO Press: Geneva, Switzerland.
- Figuerola-Gonzalez, I., Quijano, G., Ramírez, G., Cruz-Guerrero, A. (2011). Probiotics and prebiotics- perspectives and challenges. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 8, 1341-1348.
- Fouillet, H., Mariotti, F., Gaudichon, C., Bos, C., Tome, D. (2002). Peripheral and splanchnic metabolism of dietary nitrogen are differently affected by the protein source in humans as assessed by compartmental modeling. *Journal Nutrition*, 132, 125-133.
- Gajo, A.A., De Resende, J.V., Costa, F.F., Pereira, Q.G., De Lima, R.R., Antonialli, F., De Abreu, L.R. (2017). Effect of hydrocolloids blends on frozen dessert —popsicles made with whey concentrated. *LWT - Food Science and Technology*, 75, 473-480.
- Garcia, E.F., Oliveira, M.E.G., Queiroga, R.C.R.E., Machado, T.A.D., Souza, E.L. (2012). Development and quality of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 63, 947-956.
- Goulart, A.J., Bassan, J.C., Barbosa, O.A., Marques, D.P., Silveira, C.B., Santos, A.F., Garrido, S.S., Resende, F.A., Contiero, F. (2014). Transport of amino acids from milk whey by Caco-2 cell monolayer after hydrolytic action of gastrointestinal enzymes. *Food Research International*, 63, 62-70.
- Gregersen, V.R., Lucey, J.A. (2016). Cheese: Rennet-Induced Coagulation of Milk. Reference Module in Food Sciences, Elsevier.
- Ha, E., Zemel, M.B. (2003). Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, 14, 251-58.
- Hagen, S.R., Frost, B., Augustin, J. (1989). Pre column phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in food. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 72, 6, 912-916.
- Hagen, S.R., Augustin, J., Grings, E. Tassinari, P. (1993). Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of free amino acids in biological samples. *Food Chemistry*, 46, 3, 319-323.
- Hayaloglu, A.A., Tolu, C., Yasar, K. (2013). Characterizing volatile compounds and proteolysis in Gokceada artisanal goat cheese. *Small Ruminant Research*, 113, 1, 187-194.
- Hernandez-Ledesma, B., Ramos, M., Gomez-Ruiz, J.A. (2011). Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. *Small Ruminant Research*, 101, 196– 204.
- Ho, J.C.S., Nadeem, A., Svanborg, C. (2017). Hamlet - A protein-lipid complex with broad tumoricidal activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482, 3, 454-458.

Ilić, M.D., Milanovic, S.D., Caric, M.D., Kanuric, K.G., Vukic, V.R., Hrnjez, D.V., Ranogajec, M.I. (2012). Volatile compounds of functional dairy products. *Acta Periodica Technologica*, 43, 11–19.

Jakubowicz D., Froy, O. (2013). Biochemical and metabolic mechanisms by which dietary whey protein may combat obesity and Type 2 diabetes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24, 1-5.

Jensen, K.H., Brandt, S.S., Shigematsu, H., Sigworth, F.J. (2016). Statistical modeling and removal of lipid membrane projections for cryo-EM structure determination of reconstituted membrane proteins. *Journal Structural Biology*, 194, 49-60.

Juillard, V., Lopez-Kleine, L., Monnet, V. (2016). Proteolytic Systems of Lactic Acid Bacteria (LAB). In *The Reference Module in Food Sciences*, Elsevier Ed.

Kareb, O., Gomaa, A., Champagne, C.P., Jean, J., Aïder, M. (2017). Electro-activation of sweet defatted whey: Impact on the induced Maillard reaction products and bioactive peptides. *Food Chemistry*, 221, 590-598.

Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods*, 1, 2, 177–187.

Lindseth, G., Helland, B., Caspers, J. (2015). The effects of dietary tryptophan on affective disorders. *Archives of Psychiatric Nursing*, 29, 102–107.

Li, Z., Jiang, A., Yue, T., Wang, J., Wang, Y., Su, J. (2013). Purification and identification of five novel antioxidant peptides from goat milk casein hydrolysates. *Journal of Dairy Science*, 96, 6, 4242-4251.

Madureira, A.R., Pereira, C.I., Gomes, A.M.P., Pintado, M.E., Malcata, E.F. (2007). Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Research International*, 40, 1197-1211.

Madureira, A.R., Tavares, T., Gomes, A.M.P., Pintado, M.E., Malcata, F.X. (2010). Invited review: physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *Journal Dairy Science*, 93, 2, 437–455.

Medeiros, G.K.V.V., Queiroga, R.C.R.E., Costa, W.K.A., Gadelha, C.A.A., Lacerda, R.R., Lacerda, J.T.J.G., Pinto, L.S., Braganhol, E., Teixeira, F.C., Barbosa, P.P.S., Campos, M.I.F., Gonçalves, G.F., Pessoa, H.L.F., Gadelha, T.S. (2018). Proteomic of goat milk whey and its bacteriostatic and antitumour potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 116–123.

Michaelidou, A., Katsiari, M.C., Voutsinas, L.P., Kondyli, E., Alichanidis, E. (2003). Effect of commercial adjunct cultures on proteolysis in low-fat Kefalogravieratye cheese. *International Dairy Journal*, 13, 743–753.

Mok, K.H., Pettersson, J., Orrenius, S., Svanborg, K. (2007). Hamlet protein folding, and tumor cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354, 1-7.

- Nielsen, P.M., Peterson, D., Dambmann, C. (2001). Improve method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Journal of Food Science*.
- Nualkaekul, S., Charalampopoulos, D. (2011). Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. *International Journal of Food Microbiology*, 146, 111-117.
- Oliveira, E.M.G., Garcia, E.F., Queiroga, R.C.R.E., Souza, E.L. (2012). Technological, physicochemical, and sensory characteristics of Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. *Scientia Agricola*, 69, 6, 370-379.
- Oliveira, D.F., Bravo, C.E.C., Tonial, I.B. (2012). Soro de leite: Um subproduto valioso. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 67, 385, 64-71.
- Pettersson, J., Mossberg, A., Svanborg, C. (2006). α -Lactalbumin species variation, HAMLET formation, and tumor cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345, 260-270.
- Quirós, A., Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Amigo, L., Recio, I. (2005). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. *Journal of Dairy Science*, 88, 10, 3480-3487.
- Rafiq, S., Huma, N., Pasha, I., Sameen, A., Mukhtar, O., Khan, M.I. (2016). Chemical Composition, Nitrogen Fractions and Amino Acids Profile of Milk from Different Animal Species Asian Australas. *Journal Animal Science*, 29, 7, 1022-1028.
- Rolim, F.R.L., Santos, K.M.O., Barcelos, S.C., Egito, A.S., Ribeiro, T.S., Conceição, M.L., Magnani, M., Oliveira, M.E.G., Queiroga, R.C.R.E. (2015). Survival of *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 in simulated gastrointestinal conditions and its inhibitory effect against pathogenic bacteria in semi-hard goat cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 63, 2, 807-813.
- Salem, S.A., El-Agamy, E.I., Salama, F.A., Abu-Soliman, N.H. (2009). Isolation, molecular and biochemical characterization of goat milk casein and its fractions. *Tropical Subtropical Agroecosystems*, 11, 29-35.
- Sanmartín, B., Díaz, O., Rodríguez-Turienzo, L., Cobos, A. (2012). Composition of caprine whey protein concentrates produced by membrane technology after clarification of cheese whey. *Small Ruminant Research*, 105, 186– 192.
- Santos, K.M.O., Buriti, F.C.A., Vieira, A.D.S., Nascimento, J. (2015). Artisanal Coalho cheeses as source of beneficial *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Dairy Science & Technology*, 95, 2, 209-230.
- Sgarbieri, V.C. (2005). Review: Structural and Physical-Chemical Properties of Milk Proteins. *Brazilian Journal of Food Technology*, 8, 1, 43-56.
- Shamsia, S.M. (2009). Nutritional and therapeutic properties of camel and human milks. *International Journal Genetics and Molecular Biology*, 1, 52-58.

SIGMASTAT (programa de computador). (206). Versão 3.5. Point Richmond (Califórnia): Comercial.

Sinha, C.R., Prakash, J., Kaul, P. (2007). Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation Rhicha. *Food Chemistry*, 101, 1484-1491.

Silveira, E.O., Lopes Neto, J.H., Silva, L.A., Raposo, A.E.S., Magnani, M., Cardarelli, H.R. (2015). The effects of inulin combined with oligofructose and goat cheese whey on the physicochemical properties and sensory acceptance of probiotic chocolate goat dairy beverage. *LWT- Food Science and Tecnology*, 62, 1, 445-451.

Sinz, Q., Schwab, W. (2012). Metabolismo of amino acids, dipeptides and tetrapeptides by *Lactobacillus sakei*. *Food Microbiology*, 29, 2, 215-223.

Spies, J.R. (1967). Determination of tryptophan in proteins. *Analytical Chemistry*, 39, 12, 1412-1416.

Smithers, G.W. (2008). Whey and whey proteins - From gutter-to-gold. *International Dairy Journal*, 18, 695-704.

Sousa, Y.R.F., Vasconcelos, M.A.S., Costa, R.G., Azevedo filho, C.A., Paiva, E.P., Queiroga, R.C.R.E. (2015). Sialic acid content of goat milk during lactation. *Livestock Science*, 117, 175-180.

Stancheva, N., Naydenova, N., Staikova, G. (2011). Physicochemical composition, properties, and technological characteristics of sheep milk from the Bulgarian dairy synthetic population. *Macedonian. Journal Animal Science*, 1, 73-76.

Steele, J., Broadbente, J., Kok, J. (2013). Perspectives on the contribution of lactic acid bacteria to cheese flavor development. *Current opinion in biotechnology*, 24, 2, 135-141.

Talwalkar, A., Miller, C.W., Kailasapathy, K. (2004). Nguyen MH. Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. *International Journal of Food Science & Technology*, 39, 605-611.

Taş, N.G., Yilmaz, C., Gökmen, V. (2019); Investigation of serotonin, free and protein-bound tryptophan in Turkish hazelnut varieties and effect of roasting on serotonin content. *Food Research International*, 120, 865-871.

Tunick, M.H., Thomas-Gahring, A., Van Hekken, D.L., Iandola, U.K., Singh, M., Qi, P.X., Ukuku, D.O., Mukhopadhyay, S., Onwulata, C.I., Tomasula, P.M. (2016). Physical and chemical changes in whey protein concentrate stored at elevated temperature and humidity. *Journal of Dairy Science*, 99, 2372-2383.

Uniacke-Lowe, T., Huppertz, T., Fox, P.F. (2010). Equine milk proteins: Chemistry, structure and nutritional significance. *International Dairy Journal*, 20, 9, 609-629.

- Verruck, S., Dantas, D., Prudencio, E.S. (2019). Functionality of the components from goat's milk, recent advances for functional dairy products development and its implications on human health. *Journal of Functional Foods*, 52, 243–257.
- Wagoner, T.B., Foegeding, E.A. (2017). Whey protein–pectin soluble complexes for beverage applications. *Food hydrocolloids*, 63, 130-138.
- Wen-Qiong, W., Lan-Wei, Z., Xue, H., Yi, LU. (2017). Cheese whey protein recovery by ultrafiltration through transglutaminase (TG) catalysis whey protein cross-linking. *Food Chemistry*, 215, 31-40.
- White, J.A., Hart, R.J., Fry, J.C. (1986). An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. *Journal of Automatic Chemistry*, 8, 170-177.
- Wolf, I.V., Perotti, M.C., Bernal, S.M., Zalazar, C.A. (2010); Study of the chemical composition, proteolysis, lipolysis and volatile compounds profile of commercial Reggianito Argentino cheese: Characterizations of Reggianito Argentino cheese. *Food Research International*, 43, 4, 1204-1211.
- Yalçın, A.S. (2006). Emerging Therapeutic Potential of Whey Proteins and Peptides. *Current Pharmaceutical Design*, 12, 1637-1643.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os soros de leite caprino de ambos os tratamentos possuem qualidade nutricional para serem empregados como ingrediente funcional na indústria alimentícia. O soro S2 destacou-se em relação ao S1 devido a presença do *Lactobacillus rhamnosus* EM 1107, sobrevivendo ao longo da vida de prateleira, com contagens superiores a 8 log UFC mL⁻¹. Este probiótico promoveu modificações na composição nutricional do soro, devido ao seu metabolismo fermentativo, reduzindo o conteúdo de lactose e glicose, aumentando os teores de ácido láctico, acético e succínico, e ainda promovendo o aumento do teor de acidez ao longo do armazenamento.

Também se destacou, no S2, o maior conteúdo de Ca e Mg, minerais importantes no metabolismo da vitamina D, contribuindo para a saúde óssea, redução de dislipidemias e produção de hormônios. Ambos os tratamentos foram considerados boas matrizes para a obtenção dos GOS, composto bioativo com função prebiótica. A atividade metabólica proteolítica do micro-organismo promoveu o consumo e a hidrólise de proteínas culminando no aumento de aminoácidos livres e formação de peptídeos com maior caráter hidrofílico, o que podem desempenhar atividades antioxidantes, antibacterianas, imuno-moduladoras no organismo. Ambos os tratamentos apresentaram conteúdo de aminoácidos que atendem aos padrões da FAO/OMS, sendo o S2 com maior conteúdo de aminoácidos totais e livres devido ao metabolismo do micro-organismo, apresentando um melhor perfil aminoacídico. As proteínas majoritárias, de menores tamanhos, como a α -Lactoalbumina e a β -Lactoglobulina, permaneceram nos dois tratamentos e em todos os tempos de armazenamento.

Os soros S1 e S2 apresentaram peculiaridades em sua composição que podem ser preponderantes na determinação de sua aplicação. Podem ser consumidos por sua qualidade nutricional, além de atuarem como uma matriz alimentar de entrega, visto que S2 manteve em contagens viáveis o micro-organismo *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 ao longo do armazenamento. Ainda podem ser indicados como um ingrediente bioativo para a formulação de diversos produtos alimentícios funcionais, reduzindo o seu descarte, evitando o desperdício e agregando benefícios à saúde dos consumidores.

Desta forma, o desenvolvimento destes tipos de soros de leite caprino configura uma inovação e relevante iniciativa de elaboração de um ingrediente, ou mesmo produto, com conteúdo proteico de alto valor biológico, muito requisitado para fins alimentícios e de suplementação na atualidade, além da funcionalidade associada aos peptídeos e aminoácidos que o compõe. Ainda, o aproveitamento do soro constitui-se uma alternativa para o

aproveitamento do grande volume de soro de leite caprino gerado em queijarias, que é, muitas vezes, descartado de forma indevida, tornando-se um poluente para o meio ambiente. Para tanto, sugere-se pesquisas futuras a partir do isolamento de peptídeos, visando à identificação das unidades específicas responsáveis por atividades biológicas, objetivando gerar outros dados inéditos que contribuam para o aprofundamento do conhecimento sobre a biofuncionalidade deste bioproduto. Estes resultados auxiliam ainda na valorização da criação de caprinos nos sistemas de produção comumente adotados e na abordagem atual e promissora das possibilidades de utilização de resíduos ou subprodutos da agroindústria leiteira, uma demanda fundamental e atual.