

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

NATÁLIA SUFIATTI DE HOLANDA CAVALCANTI

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL DE LEITE
FERMENTADO ASININO**

JOÃO PESSOA

2019

NATÁLIA SUFIATTI DE HOLANDA CAVALCANTI

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL DE LEITE
FERMENTADO ASININO**

JOÃO PESSOA

2019

NATÁLIA SUFIATTI DE HOLANDA CAVALCANTI

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL DE LEITE
FERMENTADO ASININO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Amanda Marília da Silva Sant'Ana

JOÃO PESSOA

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C376d Cavalcanti, Natália Sufiatti de Holanda.
Desenvolvimento e caracterização nutricional de leite
fermentado asinino / Natália Sufiatti de Holanda
Cavalcanti. - João Pessoa, 2019.
68 f. : il.

Orientação: Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga.
Coorientação: Amanda Marília da Silva Sant'Ana.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Leite asinino. 2. Alimentos - Valor nutricional. 3.
Leite fermentado. 4. Armazenamento refrigerado. 5.
Características físico-químicas. I. Queiroga, Rita de
Cássia Ramos do Egypto. II. Sant'Ana, Amanda Marília da
Silva. III. Título.

UFPB/BC

CDU 613.287.6(043)

NATÁLIA SUFIATTI DE HOLANDA CAVALCANTI

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL DE LEITE
FERMENTADO ASININO**

Dissertação APROVADA em: 28/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga – DN/CCS/UFPB

Coordenadora da Banca Examinadora



Prof^a. Dr^a. Maria Elieidy Gomes de Oliveira – DN/CCS/UFPB

Examinadora Interna



Prof^a. Dr^a. Ingrid Conceição Dantas Guerra – DG/CTDR/UFPB

Examinadora Externa

Aos meus filhos: Pierre, Karen e Lara
Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal da Paraíba e seus servidores que proporcionaram o desenvolvimento desse trabalho, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição da UFPB, seu corpo docente e servidores.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão das bolsas.

À professora Dr^a. Rita de Cássia, pela sua orientação, confiança e apoio.

À professora Amanda Sant'Ana, por me orientar, auxiliar e apoiar, e seu esposo José Evangelista por me auxiliar nas análises.

À professora Dr^a. Maria Elieidy, por me ajudar tanto durante todos os imprevistos e dúvidas que eu tive, bem como participar como membro da banca. Sou muito grata por nossas vidas terem se cruzado.

À professora Dr^a. Ingrid Dantas, por aceitar participar da banca e auxiliar na melhoria do trabalho.

Aos professores suplentes Evandro Leite e Carlos Eduardo Vasconcelos por aceitarem participar da banca.

Aos docentes e coordenadores dos laboratórios seguintes: Laboratório de Técnica Dietética, Laboratório de Bromatologia e Laboratório de Bioquímica e Microbiologia dos Alimentos (DN/CCS/UFPB); Laboratório de Processamentos de Alimentos (CTDR/UFPB), Centro de Química de Alimentos (CQA/ITAL) e Laboratório de Sistemas de Produção Animal do Departamento de Produção Animal e Segurança Alimentar (DPASA/FMVUL).

Ao professor Dr. Ariosvaldo Medeiros, por sua disponibilidade e auxílio no processo de secagem das amostras.

Às professoras Dr^a. Maria Teresa, do ITAL, e Dr^a. Susana Alves, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, por auxiliarem na realização das análises.

À professora Dr^a. Maria Lúcia que desde a graduação me ensinou tanto, me acolheu no Laboratório de Microbiologia e torce por mim.

À professora Dr^a. Jailane Aquino, por ter me direcionado ao caminho da pesquisa e por se preocupar sempre com meu bem-estar.

À professora Dr^a. Tereza Helena, que desde a graduação esteve comigo e torce tanto por mim. Obrigada pelo seu carinho por mim e meus filhos.

Aos meus familiares, amigos e todos que fizeram parte desse momento da minha vida.

RESUMO

Diversas pesquisas com foco no leite asinino vêm sendo realizadas, visto que ele apresenta composição semelhante ao leite humano e se mostra a melhor alternativa como substituto do leite materno, quando comparado com o leite de ruminantes. Devido ao alto teor de lactose, o leite asinino pode ser empregado na fabricação de leites fermentados, sendo o desenvolvimento de novas tecnologias, com a utilização de leite asinino na fabricação de produtos, uma alternativa de inovação no mercado de derivados lácteos, contribuindo para ampliar o consumo do leite asinino. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo desenvolver um leite fermentado a partir do leite asinino, bem como avaliar o valor nutricional e as características físico-químicas do leite asinino *in natura* e do leite asinino fermentado. Além disso, avaliou-se o impacto do armazenamento refrigerado (4 °C, 21 dias) nas características do leite fermentado. Este foi elaborado através da adição cultura termofílica composta por *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (0,4 g/L), mantido armazenado sob refrigeração (4 ± 1 °C) e avaliado durante 21 dias quanto as características físico-químicas, perfil de açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, minerais e viabilidade das bactérias lácticas. O leite fermentado foi mais ácido (menores valores de pH e maior acidez titulável) e apresentou menores teores de lactose, minerais (cálcio, fósforo, magnésio, sódio e zinco) e aminoácidos (principalmente aminoácidos indispensáveis) do que o leite. Por outro lado, apresentou um melhor perfil de ácidos graxos (menor teor de ácidos graxos saturados e maiores teores de ácidos graxos mono e poliinsaturados). O armazenamento do leite fermentado resultou em diminuição do teor de lactose, melhora do perfil de aminoácidos e manutenção do teor de minerais. No entanto, foram observados impactos negativos no perfil de ácidos graxos. Pode-se concluir que tanto o leite asinino *in natura* quanto o leite asinino fermentado apresentam importante valor nutricional, podendo o leite fermentado ser armazenado refrigerado por 21 dias.

Palavras-chave: Leite asinino; Valor nutricional; Fermentação; Estabilidade de armazenamento.

ABSTRACT

Several researches focusing on donkey milk supplied have been carried out, since it has a similar composition to human milk and it is the best alternative as a substitute for breast milk, when compared to ruminant milk. Due to the high content of lactose, the donkey can be used in the manufacture of fermented milk, and the development of new technologies, with the use of donkey milk in the manufacture of products, an alternative of innovation in the market of dairy products, contributing to expand the consumption of donkey milk. Therefore, the present study aimed to develop a fermented milk from donkey milk, as well as to evaluate the nutritional value and physical and chemical characteristics of fresh donkey milk and fermented donkey milk. In addition, the impact of refrigerated storage (4 ° C, 21 days) on the characteristics of fermented milk was evaluated. This was elaborated through the addition of a thermophilic culture composed of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (0,4 g / L), stored under refrigeration (4 ± 1 °C) and evaluated for 21 days for area characteristics, sugar profile, amino acids, fatty acids, minerals and viability of lactic acid bacteria. The fermented milk was more acid (lower pH values and higher titratable acidity) and presented lower lactose, mineral (calcium, phosphorous, magnesium, sodium, and zinc), and amino acid (mainly indispensable amino acids) contents than milk. Otherwise, it had a better fatty acid profile (lower saturated fatty acid content, and higher monounsaturated and polyunsaturated fatty acid contents). The fermented milk storage resulted in decreases in the lactose content, improvements in the amino acid profile, and maintenance of the mineral content. However, negative impacts were observed on the fatty acid profile. In conclusion, both fresh donkey milk and fermented donkey milk present important nutritional value, and the fermented milk could be refrigerated stored for 21 days.

Keywords: Asinine milk; Nutritional value; Fermentation; Storage Stability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma do delineamento experimental.....	31
Figura 2 – Fluxograma de processamento do leite fermentado asinino.....	33

LISTA DE TABELAS

TABELAS DA DISSERTAÇÃO

Tabela 1 – Características físico-químicas (g/100mL) do leite asinino <i>in natura</i> fermentado.....	48
Tabela 2 – Perfil de ácidos graxos (g/100g de ácidos graxos totais) no leite de asinino <i>in natura</i> e leite asinino fermentado durante armazenamento refrigerado.....	52
Tabela 3 – Índices de avaliação da qualidade nutricional da gordura do leite asinino <i>in natura</i> e fermentado.....	56

TABELAS DO ARTIGO

Tabela 1 – Chemical composition and physicochemical and microbiological characteristics of fresh donkey milk and fermented milk during cold storage for 21 days.....	64
Tabela 2 – Fatty acid profile (g/100 g of total fatty acids) and health indices of fresh donkey milk and fermented milk during refrigerated storage.....	66
Tabela 3 – Mineral content (mg/100 g) of fresh donkey milk and fermented milk during refrigerated storage.....	68
Tabela 4 – Free amino acid (mg/100 g) of fresh donkey milk and fermented milk during refrigerated storage.....	69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Composição físico-química do leite de alguns mamíferos.....	18
Quadro 2 – Estudos realizados com leite asinino fermentado.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa	Atividade de Água
AA	Ácido araquidônico
AG	Ácido Graxo
AGCC	Ácido Graxo de Cadeia Curta
AGCL	Ácido Graxo de Cadeia Longa
AGCM	Ácido Graxo de Cadeia Média
AGD	Ácidos Graxos Desejáveis
AGI	Ácido graxo Insaturado
AGM	Ácido Graxo Monoinsaturado
AGP	Ácido Graxo Poli-insaturado
AGS	Ácido Graxo Saturado
AL	Ácido Linoleico
ALA	Ácido α -linolênico
AO	Ácido Oleico
AOAC	Official Methods of Analysis
BOD	Demanda Química do Oxigênio
Ca	Cálcio
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CLA	Acid Linoleic Conjugated
CQA	Centro de Química de Alimentos
CRA	Capacidade de Retenção de Água
CTDR	Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional
DG	Departamento de Gastronomia
DHA	Ácido Docosa-Hexaenoico
DN	Departamento de Nutrição
DPASA	Departamento de Produção Animal e Segurança Alimentar
EPA	Ácido Eicosapentaenoico
HCl	Ácido Clorídrico
HDL	High Density Lipoprotein
h/H	Hipocolesterolêmico/Hipercolesterolêmico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

IA	Índice Aterotogênico
INOVA	Agência UFPB de Inovação Tecnológica
INPI	Instituto Nacional da propriedade Industrial
IT	Índice Trombogênico
ITAL	Instituto de Tecnologia de Alimentos
LDL	Low Density Lipoprotein
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
Na	Sódio
P	Fósforo
Pa	Pascal
PB	Paraíba
PE	Pernambuco
pH	Potencial Hidrogeniônico
Se	Selênio
STS	Suscetibilidade a Sinérese
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 ESPÉCIE ASININA: EVIDÊNCIAS E IMPORTÂNCIA SOCIOECONÔMICA.....	17
2.2 LEITE ASININO.....	18
2.2.1 Composição nutricional.....	18
2.2.2 Potencial funcional e tecnológico.....	21
2.3 LEITES FERMENTADOS.....	24
3 ABORDAGEM METODOLÓGICA.....	29
3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO.....	29
3.2 AMOSTRAGEM E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	29
3.3 ELABORAÇÃO DO LEITE FERMENTADO.....	30
3.4 PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS.....	31
3.5 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS.....	31
3.6 VIABILIDADE DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS.....	32
3.7 ANÁLISE DE AÇÚCARES	32
3.10 PERFIL DE AMINOÁCIDOS.....	33
3.11 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS.....	33
3.12 PERFIL DE MINERAIS.....	33
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
REFERÊNCIAS.....	35
APÊNDICES.....	43
APÊNDICE A – ARTIGO 1.....	43
ANEXOS.....	69

1 INTRODUÇÃO

O leite asinino apresenta importantes propriedades nutricionais e promotoras de saúde, podendo ser uma alternativa ao leite de alguns ruminantes (BUDAK-OZTURKOGLU; GÜRSEL, 2012; SALIMEI; FANTUZ, 2012; VINCENZETTI et al., 2014; MARTINI et al., 2015), motivo pelo qual recentemente vem sendo estudado nas formas *in natura*, liofilizado e fermentado (ASPRI et al., 2018; BARNI et al., 2018; CHARFI et al., 2018; COSCIA et al., 2018; TURCHI et al., 2017).

Os aspectos sensoriais como cor branca, consistência fina, gosto ligeiramente doce, agradável e aroma leitoso (MALISSIOVA et al., 2016), aliados ao baixo conteúdo de proteínas potencialmente alergênicas (CUNSOLO et al., 2017), quando comparado com o leite de vaca, o qual é amplamente utilizado na produção de fórmulas infantis, tornam o leite asinino uma opção interessante frente às fórmulas hipoalergênicas disponíveis, sendo, portanto, uma alternativa de consumo para crianças e adultos alérgicos à proteína do leite de vaca, como também por pessoas com o sistema imunológico debilitado (BRUMINI et al., 2016; COSCIA et al., 2018; POLIDORI et al., 2013; TIDONA et al., 2011).

O conteúdo de lisozima, lactoferrina, lactoperoxidasas e imunoglobulinas, conferem a este leite atividade antimicrobiana que pode fortalecer a defesa, estimular o sistema imunológico, regular a flora gastrointestinal e prevenir doenças inflamatórias e autoimunes (BRUMINI et al., 2016; TASTEKIN et al., 2018; TIDONA et al., 2011; TRINCHESE et al., 2015; YVON et al., 2016). Além disso, o leite asinino apresenta em sua composição reduzido percentual de gordura em relação ao leite de ruminantes (CLAYES et al., 2014). Contudo, representa uma fonte natural de lipídios com importante similaridade ao leite humano e, portanto, alto valor nutricional e ação na regulação do sistema imune-inflamatório (CHIOFALO et al., 2011), e conteúdo maior de ácidos graxos poli-insaturados e menor quantidade de saturados e monoinsaturados quando comparado com o leite de ruminantes (CLAYES et al., 2014).

Em relação ao conteúdo mineral, as quantidades de cálcio, fósforo, magnésio, sódio e potássio são superiores ao do leite humano e inferiores ao do leite de vaca (MARTINI et al., 2017). Os minerais apresentam funções diversas no metabolismo e homeostase do corpo humano, incluindo a atuação nos sistemas imune e cerebral (GHARIBZAHEDI; JAFARI, 2017) e, devido à sua importância em relação aos aspectos nutricionais e funcionais, muitas pesquisas têm dado enfoque ao estudo dos minerais em leite asinino (FANTUZ et al., 2013;

POTORTÌ et al., 2013; SALIMEI et al., 2004; MALACARNE et al., 2017; MARTINI et al., 2014; MASSOURAS; TRIANTAPHYLLOPOULOS; THEODOSSIOU, 2017).

Uma das características de maior destaque para a sua semelhança com o leite humano, refere-se principalmente ao teor de lactose, que é em torno de 5,4 a 7,4%. O alto teor de lactose é responsável pelo sabor adocicado e boa palatabilidade (CUNSOLO et al., 2017), o que auxilia na sua aceitação, particularmente pelo público infantil (BARNI et al., 2018). Além disso, a lactose também é responsável pela melhor absorção intestinal de cálcio, que é essencial para a mineralização óssea de crianças (MASSOURAS; TRIANTAPHYLLOPOULOS; THEODOSSIOU, 2017). Devido ao alto teor de lactose, o leite asinino pode ser empregado na fabricação de leites fermentados. Isso permite uma combinação efetiva das propriedades tecnológicas do leite asinino com a utilização de bactérias lácticas (COPPOLA et al., 2002), sugerindo que tais produtos poderiam ser introduzidos com sucesso no comércio, além de permitir o desenvolvimento da indústria de alimentos nutracêuticos. Nesse sentido, a possibilidade de utilizar leite asinino para a elaboração de leites fermentados foi demonstrada em alguns estudos (ASPRI et al., 2018; CHARFI et al., 2018; CHIAVARI et al., 2005; COPPOLA et al., 2002; NAZZARO et al., 2010; PERNA et al., 2015; TIDONA et al., 2015; TURCHI et al., 2017).

Apesar de apresentar características nutricionais importantes e aspectos sensoriais agradáveis, a ingestão do leite asinino no Brasil ainda é incomum e restrita. O desenvolvimento de novas tecnologias, com a utilização de leite asinino na fabricação de derivados lácteos, representa uma alternativa de inovação no mercado, contribuindo para ampliar o consumo deste leite. Bem como, estudos que visem investigar as características do leite e derivados lácteos de leite asinino são de fundamental importância para disseminar as vantagens nutricionais, tecnológicas e socioeconômicas deste leite, valorizando assim, a atividade da asinino cultura leiteira e desenvolvimento de novas atribuições aos asnos.

Diante desse panorama, o presente estudo teve por objetivo caracterizar nutricionalmente o leite asinino *in natura*, desenvolver um leite fermentado a partir do leite asinino e avaliar aspectos de qualidade físico-químicos e tecnológicos, nutricionais, bem como a viabilidade microbiológica ao longo do armazenamento refrigerado.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ESPÉCIE ASININA: ORIGEM E IMPORTÂNCIA SOCIOECONÔMICA

O asno (*Equus asinus*), também conhecido popularmente como jumento, jegue e burro (McMANUS et al., 2010), pertence a família Equidae, que também inclui os cavalos e zebras (POLIDORI; VINCENZETTI, 2013). No Brasil, os asnos desempenham um papel fundamental nas atividades rurais, seja por sua força e habilidade para trabalhar, seja por sua facilidade de adaptação e resistência às condições adversas (LARA et al., 2015). Devido a uma maior resistência na execução das tarefas e na habilidade para percorrer terrenos irregulares, o asno foi substituindo os equinos nessas atividades, ocupando um lugar de destaque na Região Nordeste (ALVES et al., 2009). Porém, a partir do avanço da mecanização agrícola, os asnos passaram a ocupar uma posição secundária no campo (IVANKOVIC et al., 2009; LARA et al., 2015).

Sua origem está ligada a Abissínia, onde era conhecido como “*onagro*” ou “burro selvagem” (McMANUS et al., 2010). Contudo, sua importância econômica remota civilizações antigas diversas, sendo estes essenciais para o trabalho rural devido à sua rusticidade e capacidade de carga, além da produção de leite (RANGEL et al., 2015). Desta forma, os asnos estão associados a um vasto patrimônio de importância social, cultural, econômica e ecológica (ALMEIDA, 2009).

O asno chegou ao Brasil com os colonizadores na época da descoberta, porém devido a cruzamentos feitos com raças importadas, o ambiente e o tratamento, as raças começaram a divergir (McMANUS et al., 2010). No Brasil, destacam-se três raças de asnos, originadas das trazidas pelos colonizadores e do processo de seleção natural: Pêga, Brasileiro ou Paulista e Nordestino (MARIANTE; CAVALCANTE, 2006).

A raça Pêga é caracterizada pelo porte elegante, ativo e reconhecido potencial genético para andamento marchado, sendo criada exclusivamente para produção de novos reprodutores e também para produção de muares marchadores (OLIVEIRA, 2004). Eles podem passar esse traço aos descendentes burros e mulas, que, além de força física e resistência, tornam-se bons de sela e puxam carroças com leveza (McMANUS et al., 2010), possuindo reconhecido valor comercial em todo o território nacional (OLIVEIRA, 2004).

Segundo McManus et al. (2010), com pelagem avermelhada, tordilha e baia, o asno Brasileiro ou Paulista é originária do estado de São Paulo, apresentando porte, aptidão e

tração muito semelhante ao Pêga. Contudo, é destinado à produção de muares do tipo comum, para trabalhos agrícolas e para a tração leve.

O asno Nordestino provavelmente foi originado dos asnos africanos e possui a característica de ser adaptado às condições do semiárido brasileiro (ALMEIDA, 2009; OLIVEIRA, 2004). É uma raça rústica, utilizada principalmente em atividades econômicas, sociais e culturais do nordeste brasileiro. No entanto, com a diminuição da utilização desses animais nestas atividades, é comum encontrar nos dias atuais asnos abandonados e com reprodução indiscriminada (ALMEIDA, 2009).

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) (2013), a criação de asnos se encontra em extinção. Em 2012, o Brasil contava com 902.716 cabeças de asininos, e mais de 90% desse quantitativo estava concentrado na região Nordeste (812.655 animais). Contudo, a partir de 2013, os efetivos de asininos e muares deixaram de ser pesquisados devido à ausência de fontes de informações e de registros administrativos para subsidiar estas estimativas, possivelmente como uma consequência da redução de sua importância econômica, que eram utilizados principalmente para o transporte de cargas, pessoas e para a tração de implementos agrícolas (IBGE, 2013).

Em contrapartida, a fim de incentivar a criação e proteção do animal, estão sendo criadas na Europa políticas (RANGEL et al., 2015) que podem preservar a espécie e estimular o desenvolvimento de novas atribuições aos asnos. A valorização não se refere à utilização no transporte e carga, e sim a utilização e investimento em pesquisas com o foco no leite asinino, que são ascendentes devido às suas propriedades nutricionais e bioativas (ASPRI et al., 2017; CLAYES et al., 2014; CUNSOLO et al., 2017; PEREIRA et al., 2014; MARTINI et al., 2018; MASSOURAS; TRIANTAPHYLLOPOULOS; THEODOSSIOU, 2017). No Brasil, o leite asinino ainda é pouco consumido e os animais pouco valorizados, contudo esta prática realizada na Europa pode servir como estímulo e exemplo, incentivando novas condutas diante de tais eventos, expandindo as possibilidades mercadológicas.

2.2 LEITE ASININO

2.2.1 *Composição nutricional*

O leite asinino é um alimento descrito como branco, fino, com um gosto ligeiramente doce, agradável e aroma leitoso (MALISSIOVA et al., 2016). Possui, de modo geral, características organolépticas e composição química similar ao leite humano (GUO et al,

2007; SALIMEI; FANTUZ, 2012; VINCENZETTI et al., 2008), motivo pelo qual vem sido explorado no meio científico, sendo descobertas diversas propriedades nutricionais e bioativas.

Normalmente, o leite de mamíferos apresenta composição química semelhante, mas pode variar no caso de animais ruminantes e não ruminantes (Quadro 1). O asno é um animal não ruminante que possui o sistema digestivo monogástrico, assim como os cavalos, o que torna o leite dessas espécies diferente. Apesar disso, fatores ambientais, genéticos, fisiológicos e nutricionais também podem fazer com que a composição do leite varie dentro de uma mesma espécie (CLAYES et al., 2014).

Quadro 1 - Composição proximal do leite de alguns mamíferos.

Espécie	Matéria Seca (g/100 g)	Proteína (g/100 g)	Gordura (g/100 g)	Lactose (g/100 g)	Cinzas (g/100 g)	Energia (kJ/100 g)
Humana	10,7-12,9	0,9-1,9	2,1-4,0	6,3-7,0	0,2-0,3	284,3
Equina	9,3-11,6	1,4-3,2	0,3-4,2	5,6-7,2	0,3-0,5	163,6-205,0
Asinina	8,8-11,7	1,4-2,0	0,3-1,8	5,8-7,4	0,3-0,5	160,7-180,3
Bovina	11,8-13,0	3,0-3,9	3,3-5,4	4,4-5,6	0,7-0,8	270,9-284,3
Ovina	18,1-20,0	4,5-7,0	5,0-9,0	4,1-5,9	0,8-1,0	403,8-443,9
Caprina	11,9-16,3	3,0-5,2	3,0-7,2	3,2-5,0	0,7-0,9	280,2-289,4
Bubalina	15,7-17,2	2,7-4,7	5,3-9,0	3,2-4,9	0,8-0,9	424,4-477,9
Camelídea	11,9-15,0	2,4-4,2	2,0-6,0	3,5-5,1	0,7-0,9	241,0-328,6

Adaptado de: Clayes et al. (2014).

A fase de lactação afeta a composição bruta do leite asinino, isto é, o teor de gordura e proteína (MASSOURAS; TRIANTAPHYLLOPOULOS; THEODOSSIOU, 2017), minerais (Ca, Mg, K e P) (FANTUZ et al., 2012) e lipídios, havendo uma diminuição de ácidos graxos saturados e aumento de ácidos graxos insaturados com o avanço do tempo de lactação (MARTINI et al., 2015), enquanto o teor de lactose e os sólidos totais permaneceram praticamente inalterados.

O teor de lactose do leite asinino é alto, em torno de 7 %, e lhe confere o sabor adocicado e a boa palatabilidade (CONSULO et al., 2017), auxiliando na sua aceitação, particularmente pelo público infantil (BARNI et al., 2018). Além disso, pode promover a proliferação microbiana benéfica do trato intestinal, servindo como fonte energética para

bactérias probióticas presentes no intestino, participar na composição de tecidos e órgãos, e melhorar a absorção intestinal de cálcio, fósforo e outros elementos minerais (LI; LIU; GUO, 2018) que são essenciais para a mineralização óssea de crianças (MASSOURAS; TRIANTAPHYLLOPOULOS; THEODOSSIOU, 2017). A lactose quando ingerida pode ser convertida em glicose, a qual é responsável pelo fornecimento de energia para o corpo, mantendo dessa forma, o seu bom funcionamento. A lactose também é fonte de galactose, monossacarídeo importante e crucial para o metabolismo humano, com um papel estabelecido no fornecimento de energia e importante atuação no desenvolvimento inicial de crianças (COELHO; BERRY; RUBIO-GOZALBO, 2015).

O conteúdo de proteína total do leite asinino é baixo, apresentando percentual médio de 1,6% (CUNSOLO et al., 2017). Estudos voltados para a caracterização do perfil proteico do leite asinino têm demonstrado que ele se assemelha ao leite humano, uma vez que na família Equidae, as caseínas representam 35% do teor de proteína total (MALACARNE et al., 2002) enquanto que em humanos é 50% (LÖNNERDAL et al., 2003). Apresenta como fração de caseína predominante a β -caseína, assim como no leite humano, que pode representar até 80% do total de caseínas (CUNSOLO et al., 2017). Uma vez que o conteúdo de proteínas potencialmente alergênicas é baixo, pode ser considerado um leite hipoalergênico e de maior digestibilidade (BARNI et al., 2018; CUNSOLO et al., 2017).

As proteínas do soro do leite representam em torno de 35-50% da fração de nitrogênio, enquanto que no leite de vaca é 20% (HERROUIN et al., 2000). As proteínas do soro do leite mais importantes são a lisozima, β -lactoglobulina e α -lactalbumina. Apesar da β -lactoglobulina ter sido descrita por Carroccio et al. (1999) como o principal alérgeno para crianças e lactentes, enquanto, a caseína como o alérgeno predominante no adulto, os baixos teores de caseínas (PEREIRA, 2014) e relação caseína/proteína do soro do leite baixa (CUNSOLO et al., 2017) estão associadas ao potencial hipoalérgico do leite asinino. Devido à essas características, este leite vem demonstrando ser uma alternativa para substituir o leite materno, em comparação ao leite proveniente de ruminantes, nos casos de alergia do lactente (BUDAK-OZTURKOGLU; GÜRSEL, 2012; POLIDORI ; VINCENZETTI, 2013; SALIMEI; FANTUZ, 2012; VINCENZETTI et al., 2014). Estudos foram realizados acerca da tolerância ao leite asinino por crianças afetadas pela alergia ao leite de vaca (APLV), havendo comprovação da possibilidade do uso desse leite para essas crianças que são afetadas pela APLV (POLIDORI; VINCENZETTI, 2013).

As semelhanças com o leite humano acerca do conteúdo de lactose e proteínas são expressivas, contudo, o teor de lipídeos se encontra em concentração significativamente inferior ao leite humano (CLAYES et al., 2014; TIDONA et al., 2015). Isso implica no valor energético do leite asinino, motivo pelo qual alguns pediatras sugerem a adição de óleos no leite (SWAR et al., 2011), como forma de compensar o baixo percentual lipídico. Apesar disso, representa uma fonte natural de lipídeos com alta similaridade ao leite humano e, portanto, alto valor nutricional e ação na regulação do sistema imune-inflamatório (CHIOFALO et al., 2011). A qualidade dos lipídeos presentes no leite asinino se destaca pelo conteúdo maior de ácidos graxos poli-insaturados e menor de saturados e monoinsaturados quando comparado com o leite de ruminantes (CLAYES et al., 2014). Logo, a proporção de ácidos graxos insaturados / saturados, com alto teor de ácidos graxos poli-insaturados (MARTEMUCCI; D’ALESSANDRO, 2012) sugerem que o leite asinino é mais semelhante ao leite humano do que ao leite de ruminantes (CHIOFALO et al., 2011).

Quanto ao conteúdo mineral, diversos estudos vêm sendo realizados com o leite asinino (FANTUZ et al., 2013; POTORTÌ et al., 2013; SALIMEI et al., 2004; MALACARNE et al., 2017; MARTINI et al., 2014; MASSOURAS; TRIANTAPHYLLOPOULOS; THEODOSSIOU, 2017). O teor de minerais deste leite é menor que o de ruminantes e, ainda assim, é semelhante ao teor de minerais do leite humano, estando o cálcio, fósforo, magnésio, sódio e potássio intermediário entre o leite humano e o de vaca (MARTINI et al., 2017), sendo a proporção de cálcio e fósforo do leite asinino adequada (LI; LIU; GUO, 2018). Estudo realizado por Potortì et al. (2013) obteve resultado expressivo quanto a concentração de selênio, assim como demonstrou que o leite asinino analisado era fonte de zinco, cobre e ferro. Estudos que tragam tais informações são essenciais, uma vez que os minerais apresentam funções diversas no metabolismo e homeostase do corpo humano, incluindo a atuação nos sistemas imune e cerebral (GHRIBZAHEDI; JAFARI, 2017).

2.2.2 Potencial funcional e tecnológico

Os benefícios do leite asinino são diversos, principalmente em relação às questões inflamatórias e restauração da microbiota. Estudo realizado por Yvon et al. (2016) demonstrou que o consumo de leite asinino exerce propriedades anti-inflamatórias em camundongos com ileíte, restaurando os níveis endógenos de peptídeos antimicrobianos que contribuem, por sua vez, na redução do desequilíbrio da microbiota. Da mesma forma, Trinchese et al. (2015) demonstraram um efeito hipolipêmico deste leite, capaz de influenciar

a homeostase metabólica e o estado inflamatório, modulando a função mitocondrial e a composição microbiana intestinal. Tastekin et al. (2018) observaram que a mucosa gástrica de ratos com dano e inflamação induzidos por indometacina foi protegida devido às funções anti-inflamatórias e antioxidantes do leite asinino.

No estudo de Orlandi et al. (2016), realizado em leite asinino da raça “Amiata”, foi encontrado uma concentração significativa de ácido siálico. Este é um importante carboidrato para ser consumido nos primeiros anos de vida devido às suas propriedades bioativas, podendo promover o desenvolvimento do cérebro infantil, atuar na regulação do sistema imunológico e na função intestinal, agindo contra enterotoxinas e infecções nos recém-nascidos, entre outros efeitos fisiológicos importantes (HERNANDEZ-LEDESMA et al., 2011). Além disso, devido ao baixo teor de gorduras e ácidos graxos saturados, o leite asinino pode ser associado a mais um importante benefício, que é a prevenção da obesidade e doenças crônicas não-transmissíveis (MARTINI et al., 2015).

O consumo do leite asinino não está vinculado apenas a pessoas alérgicas, mas também a idosos e pessoas com o sistema imune deprimido, visto que ele apresenta alta concentração de lisozima, enzima que atua como agente antimicrobiano natural, estimulando o sistema imunológico, regulando a biota gastrointestinal e prevenindo doenças inflamatórias e autoimunes (BRUMINI et al., 2016).

A lisozima do leite asinino é fortemente resistente a ácidos e proteases, podendo exercer papel importante na resposta imunológica intestinal (TIDONA et al., 2011) e atuar na redução da incidência de infecções gastrointestinais no trato digestivo de bebês (COSENTINO et al., 2015). A lactoferrina apresenta ação antimicrobiana, antiviral, propriedades antifúngicas, anti-inflamatórias e antitumoral (FARNAUD; EVANS, 2003). Nesse sentido, estudos sugerem que pode haver um sinergismo entre a lisozima, lactoferrina e peptídeos gerados pela digestão, exercendo, dessa forma, um impacto positivo na saúde, principalmente para crianças e idosos com o sistema imune deprimido (TIDONA et al., 2011).

Além de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos, a lactoferrina auxilia na multiplicação de algumas bactérias lácticas, como as do gênero *Lactobacillus* (INAY et al., 2012), motivo pelo qual alguns derivados lácteos adicionados de lactoferrina vem sendo desenvolvidos (D’ALMEIDA, 2010; RAHMAN et al., 2010). Contudo, a estabilidade dessas proteínas pode variar de acordo com o tratamento utilizado. Devido ao fato de que estas proteínas são lábeis ao calor, as altas temperaturas de pasteurização ou esterilização não são adequadas para manter as propriedades funcionais do leite relacionadas a elas (ADDO;

FERRAGUT, 2015). Budak-Ozturkoglu et al. (2018) verificaram que, apesar da lisozima ter mantido sua atividade com tratamentos inferiores a 85 °C, esta foi a temperatura que sua desnaturação teve início, diferindo da lactoferrina, que começou a perder estabilidade a 65 °C, processo que se tornou mais intenso com o aumento da temperatura. Como a lisozima e lactoferrina desempenham papel importante na preservação do leite devido suas funções antimicrobianas, é essencial que tais proteínas sejam mantidas após o processamento do leite (BUDAK-OZTURKOGLU et al., 2018), inclusive nos leites fermentados, uma vez que a lactoferrina estimula a multiplicação de bactérias lácticas probióticas (INAY et al., 2012).

O leite asinino vem sendo fonte de lisozima em queijos duros e semiduros; Galassi, Salimei e Zanazzi (2012) verificaram que com a utilização da lisozima proveniente do leite asinino, ocorreu a prevenção da liberação precoce de gases em queijos duros, processo indesejável no processamento desse tipo de queijo. Assim como Cosentino et al. (2013) observaram a diminuição do número de coliformes em queijos semiduros e Niro et al. (2017) avaliaram o efeito da enzima na proteólise e lipólise, além do efeito na composição química, microbiológica e sensorial de queijo duro. Ambos os estudos obtiveram resultados satisfatórios quanto à utilização da lisozima advinda do leite asinino.

Pesquisas acerca do perfil de compostos voláteis do leite asinino são escassas, mas Conte et al. (2010) observaram que este apresenta um perfil aromático pouco complexo, sendo identificados poucos compostos, principalmente pertencentes às classes químicas de acetoína enxofre (CONTE et al., 2010), cetonas, aldeídos e ácidos graxos (TIDONA et al., 2015). O perfil de compostos voláteis do leite pode ser modificado devido a tratamentos térmicos, secagem, fermentação e oxidação dos ácidos graxos e aminoácidos presentes em sua composição (TIDONA et al., 2015; VINCENZETTI et al., 2018). Além disso, de acordo com Vincenzetti et al. (2018), o aparecimento de determinados compostos voláteis no leite asinino (2-nonanona, 2-undecanona, octanoato de etila e dodecanoato de etila) pode ser utilizado como potencial marcador de vida de prateleira.

A vida de prateleira de um produto está intimamente ligada a carga microbiana ali existente e a processos e reações químicas que ocorrem no alimento. Logo, se um alimento apresenta uma carga microbiana baixa, sua vida de prateleira é estendida. Fato que ocorre com o leite asinino, pois ele apresenta naturalmente contagens microbianas extremamente baixas e características sensoriais agradáveis (MALISSIOVA et al., 2016). Apesar disso, deve-se dar grande atenção às características higiênicas da produção do leite asinino, a fim de considerá-lo um substituto válido das proteínas hidrolisadas ou fórmulas derivadas do grão de

soja no tratamento de lactentes com alergia à proteína do leite de vaca (POLIDORI; VINCENZETTI, 2013).

Nesse sentido, como uma forma de diversificar o mercado de laticínios, aproveitando o leite para outras finalidades, aumentando a sua vida de prateleira e contribuindo com a indústria de alimentos, o leite asinino vem sendo estudado quanto à sua viabilidade para produção tecnológica de derivados lácteos. Faccia et al. (2018) demonstraram que é possível produzir um queijo fresco de qualidade sensorial aceitável a partir de leite asinino, utilizando o coalho de vitelo, ajustando os parâmetros de coagulação, além de ser possível a elaboração de um produto misto, utilizando leite asinino e leite caprino em conjunto, resultando em um queijo semiduro. Além dos queijos, diversos leites fermentados vêm sendo desenvolvidos a partir do leite asinino com adição de cepas probióticas, cepas produtoras de ácido fólico, entre outras (COPPOLA et al., 2002; PERNA et al., 2015; TIDONA et al., 2015; TURCHI et al., 2017; ASPRI et al., 2018; CHARFI et al., 2018).

2.3 LEITES FERMENTADOS

A demanda por produtos lácteos fermentados vem aumentando devido aos potenciais fatores promotores de saúde que estes podem proporcionar, e sua produção ocorre tradicionalmente em todo o mundo (YILMAZ et al., 2015). Os leites fermentados estão entre os alimentos mais populares do mundo (VITAL, 2015) e diversos estudos vêm demonstrando sua aceitabilidade devido ao valor agregado, palatabilidade, suculência, vida de prateleira e valor nutricional (MACHADO et al., 2017; SILVA et al., 2017).

De acordo com a legislação brasileira, os leites fermentados são produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidas por coagulação e diminuição do pH do leite, ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de micro-organismos específicos, os quais devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade (BRASIL, 2007). Diante disso, é importante ressaltar que não existe uma legislação específica que regulamenta a elaboração e comercialização do leite asinino e derivados no Brasil e que este é comercializado sem fiscalização.

Na fermentação do leite ocorre a quebra de substâncias orgânicas em compostos menores, dando origem a produtos mais digeríveis, estáveis e de maior valor nutricional (GAHRUIE et al., 2015). A atividade metabólica dos micro-organismos envolve a utilização de lactose, tendo como composto resultante o ácido láctico (VÉNICA et al., 2014), além do

aumento da glicose, galactose, ácidos orgânicos (COSTA et al., 2013) e aminoácidos livres (LOURENS-HATTING; VILJOEN, 2001). Os ácidos orgânicos no leite fermentado também são originados do metabolismo animal durante a produção de leite e da hidrólise da gordura durante o processamento e armazenamento. Estes compostos são importantes indicadores de atividade bacteriana no produto e contribuem para o desenvolvimento das suas características e do seu sabor (GONZÁLEZ DE LLANO; CUESTA, 1996).

Com a diminuição do pH, devido ao aumento da concentração de ácidos orgânicos, ocorre uma maior biodisponibilidade do cálcio presente no leite, uma vez que o baixo pH ioniza o cálcio, facilitando sua absorção intestinal, além de também reduzir o efeito inibitório do ácido fítico (SINGH; MUTHUKUMARAPPAN, 2008). Os produtos lácteos fermentados têm uma vida de prateleira maior que a matéria-prima não fermentada, pois o baixo pH gerado durante o processo de fermentação inibe o crescimento de bactérias contaminantes e deteriorantes, pois estas são intolerantes à acidez produzida (ROBERT, 2008), evitando, dessa forma, a formação de gás e de reações de proteólise e lipólise que alteram o sabor e o aroma do alimento (GRANATO, 2007). O conteúdo de carboidratos e ácidos orgânicos pode ser usado, assim como pH e acidez, para monitorar o processo de fermentação por culturas *starters* e bactérias probióticas (GONZÁLEZ DE LLANO; CUESTA, 1996).

Se tratando do leite de vaca, um dos fenômenos esperados como consequência da produção de ácido láctico é a formação da matriz de gel através da agregação de micelas de caseína à medida que o pH se aproxima de 4,6 (CUI et al., 2014; MCCANN et al., 2011). Contudo, a composição e características da matéria-prima são de fundamental importância no resultado do produto final, pois a quantidade de sólidos solúveis, proteínas, gordura (VITAL et al., 2015) e até a homogeneização realizada no leite antes do processamento, podem influenciar na reologia do produto (RANADHEERA et al., 2012). As micelas de caseínas equinas são consideravelmente menos suscetíveis à floculação induzida por ácido do que as micelas de caseínas bovinas (EGITO et al., 2002). De acordo com Uniacke et al. (2010), a coagulação das caseínas equinas induzida por ácido se comporta mais como uma floculação micelar, em vez de gelificação, determinando um aumento relativamente pequeno da viscosidade.

O leite asinino se comporta da mesma forma, pois ele apresenta baixo teor de caseína e tendência a sinerese, não formando, numa fermentação ácida, um produto semelhante ao iogurte (TIDONA et al., 2015). Apesar disso, dada a combinação do seu valor nutricional e as propriedades promotoras de saúde proporcionadas por várias espécies de bactérias ácido

láticas, o leite asinino pode ser utilizado na fabricação de uma nova geração de produtos lácteos fermentados (TIDONA et al., 2015). Segundo Coppola et al. (2002), o leite asinino pode ser utilizado na produção de leites fermentados devido seu alto teor de lactose (COPPOLA et al., 2002). Nesse sentido, diversos estudos vêm elaborando produtos derivados do leite asinino (Quadro 2).

Coppola et al. (2002) desenvolveram um leite fermentado asinino utilizando cepa de *Lactobacillus rhamnosus* e o avaliou durante 16 dias, concluindo que o leite asinino é um ótimo meio para crescimento de bactérias ácido lácticas, abrindo assim o caminho para uma infinidade de possibilidades para o seu uso. Perna et al. (2015) elaboraram e avaliaram as características antioxidantes e a diminuição do teor de lactose em iogurtes de asinino contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* e iogurte padrão durante o armazenamento. Tidona et al. (2015) adicionaram óleo de girassol ao leite fermentado de asinino para aumentar a ingestão energética, melhorar a textura e as características nutricionais do produto. Turchi et al. (2017) investigaram a possibilidade de empregar isolados selecionados de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus plantarum* para a produção de um novo leite fermentado probiótico com leite asinino. Aspri et al. (2018) realizaram a fermentação do leite asinino com cepas isoladas do próprio leite asinino, tendo como resultado leites fermentados com potencial bioativo. Charfi et al. (2018) compararam a acidificação do leite asinino com o leite bovino e concluíram que o leite asinino forma pequenos flocos de caseína que não têm firmeza, porém há possibilidade de produzir uma bebida, que pode ser consumida por crianças ou pessoas sensíveis a produtos lácteos bovinos.

A elaboração de leite asinino fermentado permite superar os limites relacionados a leites potencialmente alergênicos citados por ser capaz de utilizar o leite asinino de forma integral na formulação, agregar a funcionalidade das bactérias através da fermentação e geração de compostos bioativos únicos e, dessa forma, ser capaz de melhorar o estado de saúde e qualidade de vida do consumidor, além de agregar sabor característico e qualidades nutricionais ao produto.

Quadro 2 - Estudos realizados com leite asinino fermentado.

Tipo de leite fermentado	Cepas avaliadas	Tratamento térmico	Temperatura e tempo de fermentação	Período avaliado (dias)	Propriedade nutricional ou funcional	Estudo
Leite fermentado adicionado de cepa probiótica	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	90 °C / 1 minuto	37 °C / 48 horas	16	Potencial funcional probiótico	Coppola et al. (2002)
Leite fermentado adicionado de cepa probiótica	<i>L. rhamnosus</i> AT 194 <i>L. rhamnosus</i> CLT 2/2 <i>L. casei</i> LC88	63 °C / 30 minutos	37 °C até atingir pH 4,5-4,6	30	Potencial funcional probiótico	Chiavari et al. (2005)
Leite fermentado adicionado de cepa probiótica	<i>L. acidophilus</i> DSM 20079 <i>L. bulgaricus</i> DSM 20081 <i>L. paraplantarum</i> DSM 10667 <i>L. plantarum</i> DSM 20174 <i>L. pentosus</i> DSM 20314 <i>L. rhamnosus</i> DSM 20711	-	Temperatura recomendada para cada micro-organismo / 48 horas	02	Potencial funcional probiótico	Nazzaro et al. (2010)
Leite fermentado adicionado de cepa probiótica	<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i>	95 °C / 15 minutos	37-42 °C até atingir pH 4,6	30	Potencial funcional probiótico	Perna et al. (2015)

Leite fermentado emulsionado com óleo vegetal	<i>S. thermophilus</i> St 907 <i>S. thermophilus</i> St 563	68 °C / 2,5 minutos	40 °C até atingir pH 5,0	20	Produção de exopolissacarídeos e ácido fólico	Tidona et al. (2015)
Leite fermentado adicionado de cepa probiótica	<i>S. thermophilus</i> <i>L. plantarum</i>	65 °C / 5 minutos	37 °C / 18 horas	35	Potencial funcional probiótico	Turchi et al. (2017)
Leite fermentado adicionado de cepa autóctone probiótica	<i>Enterococcus faecium</i> DM18 <i>E. faecium</i> DM224 <i>E. faecium</i> DM270 <i>E. faecium</i> DM33 <i>E. gallinarum</i> DM150 <i>E. lactis</i> DM237 <i>E. mundii</i> DM246 <i>L. casei</i> DM214 <i>Leuconoctoc mesenteroides</i> DM236 <i>L. helveticus</i> JM1004	Esterilização	37 °C / 48 horas + Pasteurização de 75 °C / 1 minuto para parar a fermentação	01	Atividade anti-hipertensiva, antimicrobiana e antioxidante	Aspri et al. (2018)
Leite fermentado desnatado adicionado de cepa probiótica	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	-	30 °C até atingir pH 4,2	14	Potencial funcional probiótico	Charfi et al. (2018)

3 ABORDAGEM METODOLÓGICA

3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO

O leite asinino fermentado foi elaborado no Laboratório de Técnica Dietética do Departamento de Nutrição (DN), no Centro de Ciências da Saúde (CSS), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). As análises físico-químicas, cor, sinérese e capacidade de retenção de água (CRA) foram realizadas no Laboratório de Bromatologia e as microbiológicas no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia dos Alimentos (DN/CCS/UFPB), Campus I. As análises do perfil de açúcares totais, aminoácidos e minerais foram executadas no Centro de Química de Alimentos (CQA), no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) enquanto que o perfil de ácidos graxos foi obtido no Laboratório de Sistemas de Produção Animal do Departamento de Produção Animal e Segurança Alimentar (DPASA), da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, Portugal.

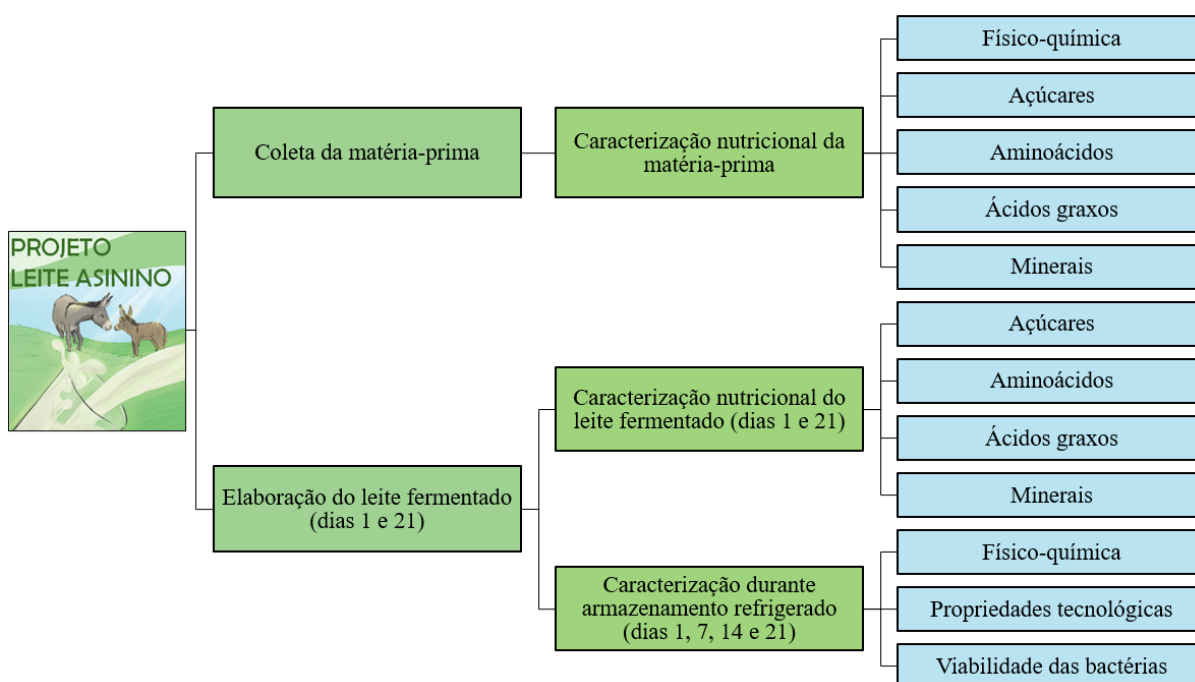
3.2 AMOSTRAGEM E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os leites utilizados no experimento foram obtidos de rebanho criado na Mata Setentrional, na cidade de Carpina – PE, Brasil. A raça asinina utilizada foi a “Nordestina”, com idades variando de 3 a 10 anos, sendo animais primíparas e múltiparas, saudáveis. Os animais foram mantidos em sistema de semiconfinamento, alimentados em comedouros coletivos e soltos diariamente para pastejar à vontade em pasto nativo. A dieta dos animais foi composta por forragem frescas como capim elefante, braquiária, colômbia e maniva, além de silagem de milho. As coletas dos leites foram realizadas por ordenha manual, entre os meses de novembro de 2017 a março de 2018, sendo a amostra composta pelo *pool* de leites de diferentes fases de lactação. Os leites foram acondicionados e transportados em garrafas de polietileno, sob temperatura de refrigeração (4 ± 1 °C) até os laboratórios envolvidos na pesquisa, para a realização das análises correspondentes e elaboração do produto.

O estudo foi dividido em duas sessões: caracterização da matéria-prima (leite asinino) e elaboração e caracterização do produto (leite asinino fermentado). A matéria-prima foi analisada quanto às suas características físico-químicas, perfil de ácidos graxos, açúcares totais, aminoácidos e minerais. Quanto ao produto, foram avaliados no primeiro (1) e último dia de armazenamento (21) o perfil de ácidos graxos, açúcares totais, aminoácidos e minerais;

e durante os dias 1, 7, 14 e 21 as análises físico-químicas, tecnológicas e viabilidade das bactérias ácido láticas. Todas as análises foram realizadas em triplicata. As etapas para execução do estudo estão descritas na Figura 1.

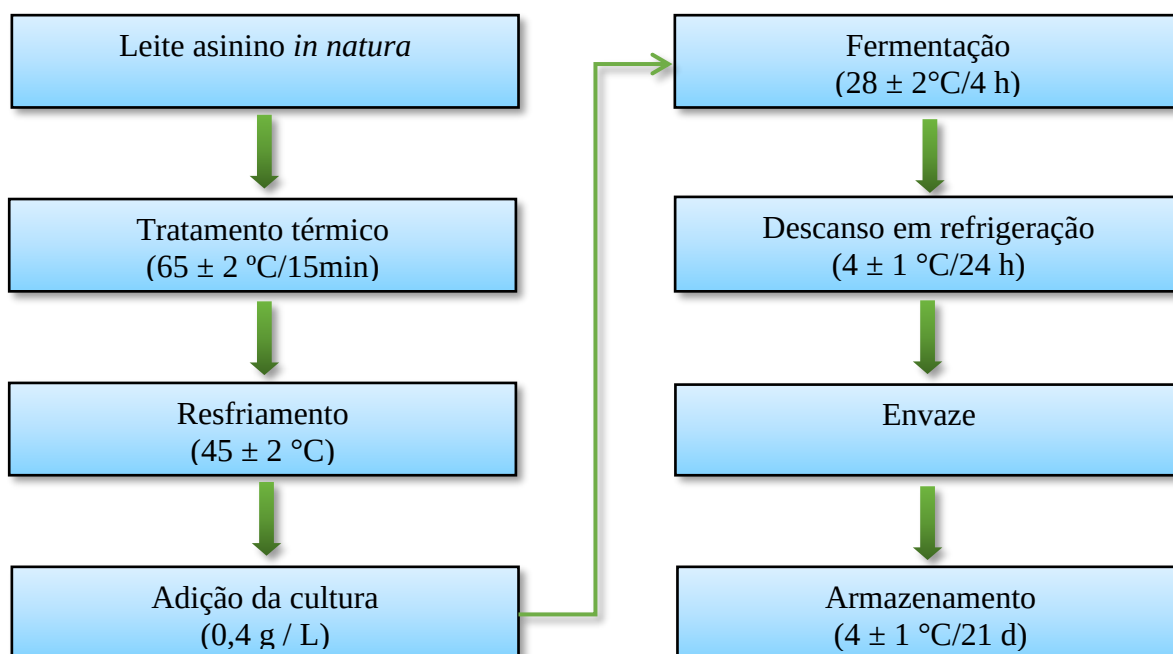
Figura 1 - Fluxograma do delineamento experimental.



3.3 ELABORAÇÃO DO LEITE FERMENTADO

O leite asinino foi previamente submetido a tratamento térmico (65 ± 2 °C/15 min) e posteriormente resfriado até 45 ± 2 °C. A cultura termofílica (YF-L903, Christian Hansen®, Valinhos, Minas Gerais, Brasil), composta por *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (0,4 g/L) foi adicionada em seguida. A fermentação foi realizada em incubadora BOD, sob temperatura de 28 ± 2 °C/4 horas. Após este processo, o leite fermentado foi refrigerado (4 ± 1 °C) durante 24 horas, seguido de homogeneização lenta, por meio de agitação manual com um bastão de vidro. Em seguida, o leite fermentado foi envasado em garrafas de polietileno sob refrigeração (4 ± 1 °C) durante 21 dias. O leite fermentado foi avaliado em dois diferentes experimentos e todas as análises conduzidas em triplicata. O processo de elaboração do leite fermentado asinino está descrito no fluxograma apresentado na Figura 2.

Figura 2 - Fluxograma geral de processamento de leite fermentado asinino.



3.4 PROPRIEDADES FÍSICAS E TECNOLÓGICAS

O pH foi mensurado em potenciômetro digital modelo Q400AS[®] e a acidez foi determinada por titulometria e expressa em g/100g de ácido lático. A atividade de água foi estabelecida a uma temperatura de 25 °C, por meio de aparelho analisador de atividade de água Labswift[®] (Novasina Labmaster Standard, USA). Ambas as análises foram realizadas de acordo com metodologia proposta pela *Association of Official Analytical Chemist Methods* (AOAC, 2016).

O colorímetro CR-400 colorimeter (Minolta Co., Osaka, Japan) foi empregado para avaliação da cor instrumental das amostras. A escala de cores CIE Lab (L^* , a^* b^*), onde L^* = Luminosidade (0 – 100); a^* = coordenada vermelho/verde (+ vermelho/– verde) e b^* = coordenada amarelo/azul (+ amarelo/– azul) foi usada com uma luz D65 (luz diurna padrão) em um ângulo de 10°. Os parâmetros L^* , a^* e b^* foram determinados de acordo com a International Commission on Illumination (CIE, 1996).

3.5 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

As análises do leite *in natura* e leite fermentado foram realizadas segundo a metodologia recomendada pela *Association of Official Analytical Chemist Methods* (AOAC,

2016). As proteínas (nitrogênio total) foram quantificadas pelo método Micro-Kjedahl, os lipídeos utilizando o lacto-butirômetro de Gerber, açúcares redutores pelo método de Fehling, sólidos totais por secagem em estufa a 105 °C e cinzas por carbonização seguida de incineração em forno mufla estabilizado a temperatura de 550 °C.

3.6 VIABILIDADE DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS NOS LEITES FERMENTADOS

A contagem das bactérias ácido lácticas *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* durante a vida de prateleira foi realizada nos tempos 1, 7, 14 e 21 dias. Uma amostra de 100 µL do leite fermentado foi homogeneizada em 900 µL de água peptonada e as amostras homogeneizadas foram diluídas seriadamente (10^{-2} a 10^{-7}), utilizando o mesmo diluente. Em seguida, uma alíquota de 10 µL de cada diluição foi inoculada em ágar MRS para a contagem total das bactérias ácido lácticas, utilizando o método da microgota. As placas foram incubadas por 48 horas a 37 °C em condições aeróbias (IDF, 1988). As contagens foram expressas como log de unidades formadoras de colônia por mL do leite fermentado (Log UFC/mL).

3.7 ANÁLISE DE AÇÚCARES

O perfil de açúcares foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Zeppa, Conterno e Gerbi (2001). Foram pesadas 2 g de amostra liofilizada, seguidas de diluição em 10 mL de água ultrapura, centrifugação por 10 minutos e filtração em filtro de celulose 0,45 µm.

Os açúcares foram quantificados utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência (VARIAN, Waters 2690, Califórnia, USA), com detector de índice de refração, acoplado com uma coluna Hi-Plex Ca, a uma temperatura de 85 °C, utilizando como fase móvel água ultra pura, a um fluxo de 0,6 mL/min. O tempo de duração da corrida foi de 30 minutos, a identificação dos picos correspondentes foi feita por meio de análise comparativa aos padrões e a quantificação foi feita por padronização externa (área dos picos) usando os mesmos padrões como referência.

3.9 PERFIL DE AMINOÁCIDOS

A determinação da composição dos aminoácidos totais foi realizada por meio da derivatização pré-coluna dos aminoácidos liberados após a hidrólise ácida das proteínas, mediante a diluição da amostra em 9 ml de HCl a 6 mol/L sob aquecimento (110-149 °C/20 h), de acordo com o método descrito por White, Hart e Fry (1986). A análise de aminoácidos foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), utilizando-se coluna de fase reversa C18 LUNA 100 Å (4,6 mm x 250 mm; partícula de 5 µm) (Phenomenex, Torrance, CA, EUA). Os aminoácidos serão quantificados por comparação com padrão de aminoácidos Thermo Scientific (Rockford, EUA). Será utilizado ácido DL-2 aminobutírico (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), como padrão interno.

3.10 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

O perfil de ácidos graxos foi obtido utilizando o método descrito em Molkentin e Precht (2000), com modificações. Inicialmente, realizou-se a extração e transesterificação das amostras, seguido da análise dos ácidos graxos sob a forma de ésteres metílicos, utilizando um cromatógrafo gasoso equipado com detector de ionização em chama (Trace™ 1310, Thermo Fisher Scientific, USA), coluna capilar SPTM-2380 (60 m×0.25 mm DI e 0.25 µm de espessura do filme). Os diferentes picos foram identificados por meio de comparação com as respostas de um padrão conhecido (Supelco® 37 Component FAME Mix, USA) e a quantificação foi baseada nas áreas dos respectivos picos.

A partir do perfil dos ácidos graxos identificados foi calculado os índices de aterogenicidade, trombogenicidade, os índices desejáveis de ácidos graxos e hipercolesterolêmicos (Sperry et al., 2018). Esses parâmetros foram utilizados para a determinação da qualidade nutricional do leite asinino *in natura* e fermentado.

3.11 PERFIL DE MINERAIS

Para a análise dos minerais (Cálcio, Fósforo, Magnésio, Manganês, Potássio, Sódio e Zinco) foi utilizado um método de ensaio baseado em AOAC (2016). A amostra foi carbonizada e incinerada em mufla, tratada com ácido clorídrico, filtrada e seguiu para o espectrômetro de emissão com fonte de plasma com acoplamento indutivo (ICP OES 5100

VDV, Agilent Technologies®, Tóquio, Japão). As condições de análise foram: potência de radiofrequência (1,2 kW); vazão do plasma (12 L min⁻¹); vazão de fluxo auxiliar (1,0 L min⁻¹); vazão de nebulização (0,7 L min⁻¹); visão do plasma (axial para Mn e Zn; radial para Ca, Mg, P, Na); e comprimentos de onda: Ca (317,933 nm), Mg (279,553 nm), Mn (257,610 nm), P (213,618 nm), Na (589,592 nm), Zn (206,200 nm).

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As amostras de leite asinino foram avaliadas no primeiro dia de armazenamento e as análises foram realizadas em triplicatas. O leite fermentado foi avaliado em três experimentos independentes e as análises foram realizadas em triplicatas. O perfil de ácidos graxos foi avaliado no primeiro (1) e último dia de armazenamento (21), e as análises físico-químicas e a viabilidade do LAB foram realizadas nos dias 1, 7, 14 e 21 de armazenamento. Os resultados foram analisados por meio do Programa Sigma Stat 3.5, sendo submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação de médias, considerando $p < 0,05$.

REFERÊNCIAS

- ADDO, C. N. A.; FERRAGUT, V. Evaluating the ultra-high pressure homogenization (UHPH) and pasteurization effects on the quality and shelf life of donkey milk. **International Journal of Food Studies**, v. 4, p. 104–115, 2015.
- ALMEIDA, L. D. **Diversidade genética de raças asininas criadas no Brasil, baseada na análise de locos microssatélites e DNA mitocondrial** [dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2009.
- ALVES, F.R. et al. Angiographic aspect of the distal forelimb in donkeys (*Equus asinus*) used for animal traction. **Biotemas**, v.22, n. 4, p.163-167, 2009.
- AOAC (OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC INTERNATIONAL). 20 Edição **2016** / 2 Vols. Dr. George Latimer, Jr. 20^a ed. **2016**. ISBN: 9780935584875.
- ASPRI, M.; ECONOMOU, N.; PAPADEMAS, P. Donkey milk: An overview on functionality, technology and future prospects. **Food Reviews International**, v. 33, p. 316–333, 2017.
- ASPRI, M. et al. Bioactive properties of fermented donkey milk, before and after in vitro simulated gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 268, p. 476-484, 2018.
- BARNI, S. et al. Tolerability and palatability of donkey's milk in children with cow's milk allergy. **Pediatric Allergy & Immunology**, v. 29, p. 329-331, 2018.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Diário Oficial da União, Brasília, 2007.
- BRUMINI, D. et al. Whey proteins and their antimicrobial properties in donkey milk: a brief review. **Dairy Science & Technology**, v. 96, p. 1–14, 2016.
- BUDAK-OZTURKOGLU, S. Effect of different treatments on the stability of lysozyme, lactoferrin and b-lactoglobulin in donkey's milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 71, n. 1, 2018.
- BUDAK-OZTURKOGLU, S.; GÜRSEL, A. An alternative milk: donkey milk. **Journal of Food**, v. 37, n. 4, p. 243-250, 2012.
- CARROCCIO, A.; CAVATAIO, F.; IACONO, G. Cross-reactivity between milk proteins of different animals. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 29, n. 8, p. 1014-1016, 1999.
- CHARFI, I. et al. The behaviour of Arabian donkey milk during acidification compared to bovine milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 71, n. 2, p. 439-445, 2018.
- CHIAVARI, C. et al. Use of donkey's milk for a fermented beverage with lactobacilli. **Le Lait**, INRA Editions, v. 85, n. 6, p. 481-490, 2005.

CHIOFALO, B. et al. Comparison of major lipid components in human and donkey milk: new perspectives for a hypoallergenic diet in humans. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 33, n. 4, p. 633-644, 2011.

CLAYES, W. L. et al. Consumption of raw or heated milk from different species: an evaluation of the nutritional and potential health benefits. **Food Control**, v. 42, p. 188-201, 2014.

COELHO, A. I.; BERRY, G. T.; RUBIO-GOZALBO, M. E. Galactose metabolism and health. Galactose metabolism and health. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 18, n. 4, p. 422-427, 2015.

CONTE, F. et al. Donkey milk shelf life: microbiology and volatile compounds. **Italian Journal of Food Safety**, v.1, n. 7, p. 25-29, 2010.

COPPOLA, R. et al. Behaviour of *Lactobacillus rhamnosus* strains in ass's milk. **Annals of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 5560, 2002.

COSCIA, A. et al. Nutritional adequacy of a novel human milk fortifier from donkey milk in feeding preterm infants: study protocol of a randomized controlled clinical trial. **Nutrition Journal**, v. 17, n. 6, p. 1-7, 2018.

COSENTINO, C. et al. Short communication: Jenny milk as an inhibitor of late blowing in cheese: a preliminary report. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 3547–3550, 2013.

COSENTINO C. et al. Innovative Use of Jenny Milk from Sustainable Rearing. **The Sustainability of Agro-Food and Natural Resource Systems in the Mediterranean Basin**, p.113-32, 2015.

COSTA, M. P. et al. Leite fermentado: potencial alimento funcional. **Enc. Biosfera** 9, p. 1387–1408, 2013.

CUI, B. et al. Effect of cross-linked acetylated starch content on the structure and stability of set yoghurt. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 576–582, 2014.

CUNSOLO, V. et al. Proteins and bioactive peptides from donkey milk: The molecular basis for its reduced allergenic properties. **Food Research International**, v. 99, n. 1, p. 41-57, 2017.

EGITO, S. et al. Action of plasmin on equine β -casein. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 813–820, 2003.

FACCIA, M. et al. Technological attempts at producing cheese from donkey milk. **Journal of dairy Research**, v. 85, p. 327-330, 2018.

FANTUZ, F. et al. Donkey milk concentration of calcium, phosphorus, potassium, sodium and magnesium. **International Dairy Journal**, v. 24, p. 143–145, 2012.

FANTUZ, F. et al. Essential trace elements in milk and blood serum of lactating donkeys as affected by lactation stage and dietary supplementation with trace elements. **Animal**, v. 7, n. 11, p. 1893-1899, 2013.

FARNAUD, S., EVANS, R. W. Lactoferrin: a multifunctional protein with antimicrobial properties. **Molecular Immunology**, v. 40, n. 7, p. 395–405, 2003.

GAHRUIE, H. H. et al. Scientific and technical aspects of yogurt fortification: A review. **Food Science and Human Wellness**, v. 4, n. 1, p. 1–8, 2015.

GALASSI, L.; SALIMEI, E.; ZANAZZI, M. Grana Padano cheese making with lysozyme from ass's milk: first results. **Journal Italian Dairy Science Association**, v. 63, n. 1, p. 73–79, 2012.

GONZÁLEZ DE LLANO, D., RODRIGUEZ, A., CUESTA, P, Effect of lactic starter cultures on the organic acid composition of milk and cheese during ripening - analysis by HPLC. **Journal of Applied Microbiology**, v. 80, p. 570-576, 1996.

GRANATO, D. Leites fermentados: algumas considerações. **Leite & Derivados**, v. 16, n. 100, p. 16-33, 2007.

GHARIBZAHEDI, S. M. T.; JAFARI, S. M. The importance of minerals in human nutrition: bioavailability, food, fortification, processing effects and nanoencapsulation. **Trends in Food Science Technology**, v. 62, p. 119-132, 2017.

GÜNESER, O. Pigment and color stability of beetroot betalains in cow milk during thermal treatment. **Food Chemistry**, v. 196, p. 220-227, 2016.

GUO, H. Y., et al. Composition, Physiochemical Properties, Nitrogen Fraction Distribution, and Amino Acid Profile of Donkey Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 1635-1643, 2007.

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.

HERROUIN, M. et al. New genetic variants identified in donkey's milk whey proteins. **Journal of Protein Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 105–115, 2000.

IDF, International Dairy Federation. Yogurt: enumeration of characteristic microorganisms colony count technique at 37°C. **IDF Standard 117A**. Brussels: IDF, 1988. 4p.

INAY, O. M. et al. Action of lactoferrin on the multiplication of *Lactobacillus casei* in vitro and in Minas fresh cheese. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, suplemento 2, p. 3153-3162, 2012

IVANKOVIC, A. et al. Characteristics of the lactation, chemical composition milk hygiene quality of the Littoral-Dinaric ass. **Mljekarstvo**, v. 59, n. 2, p. 107-113, 2009.

LARA, M. A. C. et al. Genetic diversity of asse's five populations through the use of microsatellites markers. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v. 23, n. 3-4, p. 85-88, 2015.

LI, L.; LIU, X.; GUO, H. The nutritional ingredients and antioxidant activity of donkey milk and donkey milk poder. **Food Science and Biotechnoly**, v. 27, n. 2, p. 393–400, 2018.

LIMA, K. G. C. et al. Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* and *Streptococcus thermophiles*. **Food Science and Technology**, 42, 491–495, 2009.

LÖNNERDAL, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, p. 1537S–1543S, 2003.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 1–2, p. 1–17, 2001.

MACHADO, T. A. D. et al. Impact of honey on quality characteristics of goat yogurt containing probiotic *Lactobacillus acidophilus*. **LWT- Food Science and Technology**, v. 80, p. 221-229, 2017.

MALACARNE, M. et al. Protein and fat composition of mare's milk: Some nutritional remarks with reference to human and cow's milk. *International Dairy Journal*, v. 12, n. 11, p. 869–877, 2002.

MALACARNE, M. et al. Distribution of Ca, P and Mg and casein micelle mineralisation in donkey milk from the second to ninth month of lactation. **Interational Dairy Journal**, v. 66, p. 1-5, 2017.

MALISSIOVA, G. E. et al. Assessment of donkey milk chemical, microbiological and sensory attributes in Greece and Cyprus. **International Journal of Dairy Technoly**, v. 69, n. 1, p. 143-146, 2016.

MARIANTE, A. S.; CAVALCANTE, N. **Animais do Descobrimento: Raças domésticas da história do Brasil**. Distrito Federal: Embrapa; 2006.

MARTEMUCCI, G.; D'ALESSANDRO, A. G. Fat contente, energy value and fatty acid profile of donkey milk during lactation and implications for human nutrition. **Lipids in Health na Disease**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2012.

MARTINI, M et al. Short communication: monitoring nutritional quality of amiata donkey milk: effects of lactation and productive season. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 11, p 6819–6822, 2014.

MARTINI, M.; ALTOMONTE, I; SALARI, F. Amiata donkeys: Fat globule characteristics, milk gross composition and fatty acids. **Italian Journal of Animal Science**, v. 13, p. 123–126, 2014.

MARTINI, M. et al. Changes in donkey milk lipids in relation to season and lactation. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 41, p. 30-34, 2015.

MARTINI, M. et al. Nutritional and nutraceutical quality of donkey milk. **Journal of Equine Veterinary Science**, 2017. <<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2017.10.020>>

MARTINI, M. et al. Nutritional and nutraceutical quality of donkey milk. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 65, p. 33-37, 2018.

MASSOURAS, T.; TRIANTAPHYLLOPOULOS, K. A.; THEODOSSIOU, I. Chemical composition, protein fraction and fatty acid profile of donkey milk during lactation. **International Dairy Journal**, v. 75, p. 83-90, 2017.

MCCANN, T. H. et al. Microstructure, rheology and storage stability of low-fat yoghurt structured by carrot cell wall particles. **Food Research. International**, v. 44, p. 884-892, 2011.

MCMANUS, C. et al. **Jumentos no Brasil**. Série técnica CNPq/INCT/UFGM/UnB. 2010.

MOLKENTIN, J.; PRECHT, D. Recent trends in the fatty acid composition of German sunflower margarines, shortenings and cooking fats with emphasis on individual C16:1, C18:1, C18:2, C18:3 and C20:1trans isomers. **Food, Nahrung**, v. 44, n. 4, p. 222-228, 2000.

NAZZARO, F. et al. The use of probiotic strains in the production of a donkey milk-based functional beverage. *International Journal of Probiotics and Prebiotics* v. 5, n. 2, p. 91-96, 2010.

NIRO, S. et al. Technological use of donkey milk in cheesemaking. **Dairy Technology**, v. 70, n. 3, p. 439-442, 2017.

OLIVEIRA, V. B. **Uma visão técnica e pedagógica sobre os muare**s. 2004. 146f. Dissertação (Mestrado em ciências) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2004.

ORLANDI, M. et al. Sialylated oligosaccharides in mare and ass milk: preliminary results. **Progress in Nutrition**, v. 18, n. 3, p. 283-287, 2016.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA (FAO). Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/QA/E>>. Acesso em: 24 de agosto de 2014.

ORLANDI, M. et al. Sialylated oligosaccharides in mare and ass milk: preliminary results. **Progress in Nutrition**, v. 18, n. 3, p. 283-287, 2016.

PEREIRA, S. L.; LEONARD, A. E.; MUKERJI, P. Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukaryotes. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 68, n. 2, p. 97-106, 2003.

PEREIRA, D. D. S. A. **Produção e composição do leite de jumenta da raça Nordestina no Estado do Rio Grande do Norte**. 2014. 20f. Monografia (Graduação em Zootecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

PERNA, A. et al. Donkey milk for manufacture of novel functional fermented beverages. **Journal of Food Science**. v. 80, n. 6, p. 1352-1359, 2015.

POLIDORI, P.; VINCENZETTI, S. Use of Donkey Milk in Children with Cow's Milk Protein Allergy. **Foods**, v. 2, p. 151-159, 2013.

POTORTÌ, A. G. et al. Non-toxic and potentially toxic elements in Italian donkey milk by ICP-MS and multivariate analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 31, p. 161-172, 2013.

RAFIQ, S. et al. Chemical composition, nitrogen fractions and amino acids profile of milk from different animal species. **Asian Australas Journal of Animal Science**, v. 29, n. 7, p. 1022-1028, 2016.

RAHMAN, M. M. et al. Screening of *Bifidobacterium* spp. based on in vitro growth responses to bovine lactoferrin. **International Journal of Food Science and Technology**, London, v. 45, n. 3, p. 453-458, 2010.

RANADHEERA, C. S. et al. Probiotic viability and physicochemical and sensory properties of plain and stirred fruit yogurts made from goat's milk. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1411–1418, 2012.

RANGEL A. H. N, et al. Aspectos composicionais e nutricionais do leite de jumenta: Uma revisão. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 3, p. 160-171, 2015.

ROBERT, N. F. **Fabricação de iogurtes**. Dossiê Técnico. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas SBRT. Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro. REDETEC. 2008. Disponível em: <<http://sbrt.ibict.br/dossie-tecnico/downloadsDT/MzIw>> Acesso em: 16 out. 2017.

SALAKIDOU, C. et al. Biochemical Characteristics of Yogurt Beverage From Donkey Milk. Special Issue of the International Dairy Federation 1201, p. 157-160, 2012.

SALIMEI, E. et al. Composition and characteristics of ass's milk. **Animal Research**, v. 53, p. 67-78, 2004.

SALIMEI, E.; FANTUZ, F. Equid milk for human consumption. **International Dairy Journal**, v. 24, p. 130-142, 2012.

SILVA, F. A. et al. Effect of Isabel grape addition on the physicochemical, microbiological and sensory characteristics of probiotic goat milk yogurt. **Food & Function**, v. 8, p. 2121-2132, 2017.

SINGH, G.; MUTHUKUMARAPPAN, K. Influence of Calcium Fortification on Sensory, Physical and Rheological Characteristics of Fruit Yogurt. **Food Science and Technology**, v. 41, p. 1145-1152, 2008.

SWAR, M.O. Donkey milk-based formula: A substitute for patients with cow's milk protein allergy. **Sudanese Journal of Paediatrics**, v. 11, n. 2, p. 21-24, 2011.

TASTEKIN, E. et al. Indomethacin-induced gastric damage in rats and the protective effect of donkey milk. **Archives of Medical Science**, v. 3, p. 671-678, 2018.

TIDONA, F. et al. Antimicrobial effect of donkeys' milk digested in vitro with human gastrointestinal enzymes. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 3, p. 158-165, 2011.

TIDONA, F. et al. Fermented beverage emulsion based on donkey milk with sunflower oil. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50 n. 12, p. 2644–2652, 2015.

TRINCHESE, G. et al. Human, donkey and cow milk differently affects energy efficiency and inflammatory state by modulating mitochondrial function and gut microbiota. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 11, p. 1136-46, 2015.

TURCHI, B. et al. Lactobacillus plantarum and Streptococcus thermophilus as starter cultures for a donkey milk fermented beverage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 256, p. 54-61, 2017.

UNIACKE, T.; HUPPERTZ, T.; FOX, P. F. Equine milk proteins: Chemistry, structure and nutritional significance. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 609–629, 2010.

VÉNICA, C. I. et al. Organic acids profiles in lactose-hydrolyzed yogurt with different matrix composition. **Dairy Science and Technology**, v. 94, n. 6, p. 561–580, 2014.

VINCENZETTI, S. et al. Donkey's milk protein fractions characterization. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 640-649, 2008.

VINCENZETTI, S. et al. Hypoallergenic properties of donkey's milk: a preliminary study. **Veterinaria Italiana**, v. 50, n. 2, p. 99-107, 2014.

VINCENZETTI, S. et al. Effects of freeze-drying and spray-drying on donkey milk volatile compounds and whey proteins stability. **Food Science and Technology**, v. 88, p. 189-195, 2018.

VITAL, A. C. P. et al. Microbiological, functional and rheological properties of low fat yogurt supplemented with *Pleurotus ostreatus* aqueous extract. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1028–1035, 2015.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the Waters PicoTag system for the amino-acid analysis of food materials. **The Journal of Automatic Chemistry**, New York, v. 8, n. 4, p. 170-177, oct./dec. 1986.

YILMAZ, M. T. et al. Effect of in situ exopolysaccharide production on physicochemical, rheological, sensory, and microstructural properties of the yogurt drink ayran: an optimization study based on fermentation kinetics. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 1604-1624, 2015.

YVON, S. et al. Donkey milk consumption exerts anti-inflammatory properties by normalizing antimicrobial peptides levels in Paneth's cells in a model of ileitis in mice. **European Journal of Nutrition**, v. 57, p. 155-166, 2016.

ZEPPA, G.; CONTERNO, L.; GERBI, V. Determination of organic acids, sugars, diacetyl, and acetoin in cheese by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2722, 2001.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Artigo 1

Donkey milk and fermented donkey milk: are there differences in the nutritional value and physicochemical characteristics?

Abstract

This study aimed to evaluate the nutritional value and physicochemical characteristics of fresh donkey milk and fermented donkey milk. Furthermore, the impact of the refrigerated storage (4 °C, 21 days) on the characteristics of the fermented milk was evaluated. The fermented milk was more acid (lower pH values and higher titratable acidity) and presented lower lactose, mineral (calcium, phosphorous, magnesium, sodium, and zinc), and amino acid (mainly indispensable amino acids) contents than milk. Otherwise, it had a better fatty acid profile (lower saturated fatty acid content, and higher monounsaturated and polyunsaturated fatty acid contents). The fermented milk storage resulted in decreases in the lactose content, improvements in the amino acid profile, and maintenance of the mineral content. However, negative impacts were observed on the fatty acid profile. It can be concluded that both donkey milk and fermented milk donkey present important nutritional value, and the fermented milk could be refrigerated stored for 21 days.

Keywords: asinine milk; nutritional value; fermentation; storage stability.

1. Introduction

Donkey milk has a chemical composition similar to that of human milk and, for this reason, it is recommended as a substitute for infant nutrition in case of allergy to cow's milk

protein (Aspri, Leni, Galaverna, & Papademas, 2018). It presents low protein content (1.5-2.2%), being particularly high in whey protein compared to casein. Furthermore, it presents high concentrations of lactose (7%), and the main salts are calcium, potassium, phosphates, magnesium, and sodium (Altomonte, Salari, Licitra, & Martini, 2019; Massouras, Triantaphyllopoulos, & Theodossiou, 2017). The fat content is low (0.1-3.8%), and it has a specific fatty acid profile, with a higher concentration of C18:3n-3 and n-3 fatty acids, and a lower content of saturated fatty acids (SFA) than cow milk, as well as a lower n-6 to n-3 fatty acid ratio (Valle et al., 2018). The presence of substantial amounts of lysozyme, immunoglobulins, ω -3 fatty acids, lactoferrin, and bioactive peptides results in a milk with several functional properties, such as antimicrobial, antioxidant, antiviral, anti-inflammatory, anti-diabetic, and immunomodulatory activities (Aspri, Bozoudi, Tsaltas, Hill, & Papademas, 2017; Li, Liu, & Guo, 2018; Li et al., 2020a; Yvon et al., 2018).

The chemical composition of donkey milk and its functional properties are dependent on a combination of different factors, including animal species, season, diet, physiological status, lactation period, among others (Li et al., 2020b). The functions and nutrition of donkey milk are still not well studied, and there is a need of collecting basic data; thus, the donkey milk industry could develop (Li, Liu, & Guo, 2018). Previous studies carried out the characterization of donkey milk from China (Li, Liu, & Guo, 2018; Li et al., 2020), Greece (Massouras, Triantaphyllopoulos, & Theodossiou, 2017), Turkey (Ozturkoglu-Budak, 2018), and Italy (Martini, Licitra, Altomonte, & Salari, 2020; Valle et al., 2018). However, as far as the authors know, there are no studies that characterized donkey milk produced in the Semiarid region of Brazil.

Fermented milk is the most commercialized dairy product due to its suitable nutritional value; therefore, the dairy industry produces several types of fermented milk with different physicochemical characteristics (Miao et al., 2020). Donkey milk has a white color,

low consistency, a slightly sweet and pleasant taste, and a milky aroma (Malissiova et al., 2016). The fermentative process of donkey milk can improve its sensory and functional properties; therefore, the production of fermented milk from donkey milk could be an interesting approach (Aspri et al., 2018). Studies involving the development and characterization of fermented milk from donkey milk are still scarce (Aspri et al., 2018; Miao et al., 2020; Tidona et al., 2015), and they did not perform a complete characterization of the nutritional value of the products (gross composition, sugars, minerals, amino acid profile, and fatty acid profile). Furthermore, the effect of fermented milk processing (heat treatment and fermentation) and storage on the characteristics of the products has not been reported.

The intake of donkey milk is still uncommon and restricted, despite having important nutritional characteristics and pleasant sensory aspects. The development of new technologies using donkey milk in the manufacture of dairy products represents an innovative alternative in the market, contributing to increasing its consumption. Thus, studies aiming at investigating the characteristics of milk and dairy products from donkey milk are of fundamental importance to disseminate the nutritional, technological, and socioeconomic advantages of this milk, thus valuing the dairy activity and the development of new attributions to donkeys. Therefore, the present study aimed to characterize fresh donkey milk, and evaluate the nutritional value and physicochemical and microbiological characteristics of donkey fermented milk during refrigerated storage.

2. Material and methods

2.1 Donkey milk

The milk samples were obtained from animals of the "Nordestina" donkey breed raised in the Northern Forest in the city of Carpina – Pernambuco, Brazil. The animals were aged between 3 and 10 years old, were healthy primiparous and multiparous, and were kept in

a semi-confinement system, fed in collective feeders, and released daily to graze freely in native pasture. The animals' diet consisted of fresh forage such as elephant grass, brachiaria, maniva, in addition to corn silage. Milk samples were collected by hand milking, packaged in polyethylene bottles, and transported under refrigerated temperature (4 ± 1 °C).

2.2 Fermented milk processing

The donkey milk was subjected to heat treatment (65 ± 2 °C/15 min), cooled to 45 ± 2 °C, added with the thermophilic culture (0.4%, YF-L903, Christian Hansen®, Valinhos, Minas Gerais, Brazil, *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) and fermented at 28 ± 2 °C for 4 h in an incubator. Then, the fermented milk was refrigerated (4 ± 1 °C) for 24 h, and slowly homogenized by hand stirring with a glass stick. Finally, the fermented milk was packed in polyethylene bottles and stored (4 ± 1 °C) for 21 days, which is the shelf life of yogurts and fermented milks obtained from cow milk.

2.3 Chemical composition and physicochemical characteristics

The chemical composition (moisture, protein, lipids, and ash) was determined according to the methodologies recommended by the Association of Official Analytical Chemist Methods (AOAC, 2016). The pH was measured in a digital potentiometer (model Q400AS®) and the titratable acidity (TA) was determined by titration and expressed in % lactic acid (AOAC, 2016).

2.4 Sugar profile

The sugar profile (lactose, glucose, and galactose) was determined according to the methodology described by Zeppa, Conterno & Gerbi (2001). 2 g of lyophilized sample were weighed, followed by dilution in 10 mL of ultrapure water, centrifugation for 10 min, and

filtration in a 0.45 µm cellulose filter. The sugars were quantified using a high-performance liquid chromatograph (HPLC, VARIAN, Waters 2690, California, USA) with a refractive index detector, coupled with a Hi-Plex Ca column, at a temperature of 85 °C, using the ultra-pure water as mobile phase at a flow rate of 0.6 mL/min. The analysis lasted 30 min, and the quantification was performed by the injection of standards.

2.6 Amino acid profile

The amino acid composition was carried out by pré-column derivatization of amino acids released after acid hydrolysis (6 mol/L), under heating (110° 149 C/20 h), according to White, Hart, and Fry (1986). The analysis of derivatized amino acids was carried out in high-efficiency liquid chromatography (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), with C18 column LUNA 100 Å (4.6 mm x 250 mm; particle size 5 µm) (Phenomenex, 152 Torrance, CA, USA). Amino acids were quantified by comparison with amino acids standard Thermo Scientific (Rockford, IL, USA), and DL-2-aminobutyric acid (Sigma154 Aldrich®, St.Louis, MO, USA) was used as an internal standard.

2.6 Fatty acid profile

The fatty acid profile was obtained using the method described by Molkentin & Precht (2000), with modifications. Initially, the samples were extracted and transesterified, followed by fatty acid analysis in the form of methyl esters, using a gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (TraceTM 1310, Thermo Fisher Scientific, USA) and a SPTM capillary column -2380 (60 m × 0.25 mm DI and 0.25 µm film thickness). The different peaks were identified by comparison with the responses of a known standard (Supelco® 37 Component FAME Mix, USA) and the quantification was based on the areas of the respective

peaks. The atherogenic (AI), thrombogenic (TI), desirable fatty acid (DFA), and hypercholesterolemic fatty acid indices were calculated (Sperry et al., 2018).

2.7 Mineral profile

For the analysis of minerals (calcium, phosphorus, magnesium, manganese, potassium, sodium, and zinc) a test method based on AOAC (2016) was used. The sample was carbonized and incinerated in a muffle, treated with hydrochloric acid, filtered, and analyzed by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES 5100 VDV, Agilent Technologies®, Tokyo, Japan). The analysis conditions were: radio frequency power (1.2 kW); plasma flow (12 L/min); auxiliary flow rate (1.0 L/min); nebulization flow (0.7 L/min); plasma view (axial for Mn and Zn; radial for Ca, Mg, P, Na); and wavelengths: Ca (317,933 nm), Mg (279,553 nm), Mn (257,610 nm), P (213,618 nm), Na (589,592 nm), K (766,491 nm), and Zn (206,200 nm).

2.8 Lactic acid bacteria viability

The total counts of lactic acid bacteria (LAB, *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, log cfu/g) were performed on Man, Rogosa and Sharp (MRS) agar and aerobic incubation for 48 h at 37 °C (International Dairy Federation, 1988).

2.9 Statistical analysis

The donkey milk samples were evaluated on the first day of storage and the analyzes were performed in triplicates. The fermented milk was evaluated in three independent experiments and the analyses were carried out in triplicates. The fatty acid profile was evaluated on the first (1) and last day of storage (21), and the physicochemical analyzes and

viability of the LAB were performed on days 1, 7, 14 and 21 of storage. The results were analyzed using the Sigma Stat 3.5 Program, being subjected to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test for comparison of means, considering $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1 Chemical composition and physicochemical characteristics

Table 1 presents the chemical composition and physicochemical characteristics of the donkey milk and fermented donkey milk. The donkey milk presented chemical composition of 91.34 g/100 g moisture, 1.5 g/100 g protein, 0.43 g/100 g fat, 0.67 g/100 g ash, and 7.32 g/100 g lactose. Furthermore, it presented pH of 7.97 and TA of 0.26 % lactic acid. The donkey milk was characterized by a low concentration of protein and fat, and a high concentration of lactose. These results suggest that this type of milk present low allergenic properties and could contribute to the development of the intestinal microbiota, mainly in infants (Martini et al., 2020). The high lactose content may contribute to its good taste and palatability and can be an important energy source. The low acidity is associated with the low content of phosphate and casein (Altomonte et al., 2019) and results in a very perishable product, therefore, the pasteurization process should be carried out fast, and its transformation to derived products, as fermented milk, maybe interesting.

The chemical composition and physicochemical characteristics of donkey milk of the present study are similar to those observed for donkey milks in previous studies in different countries (Li, Liu, & Guo, 2018; Martini et al., 2015; Massouras, Triantaphyllopoulos, & Theodossiou, 2017; Valle et al., 2018). Therefore, although breed, feed, and other environmental factors may alter the chemical composition and physicochemical characteristics of the products, it seems that they fall in the same range. Furthermore, the donkey milk presented a chemical composition more similar to the human milk (87.8 g/100 g

moisture, 1.2 g/100 g protein, 3.5-4.0 g/100 g fat, 0.25 g/100 g ash, and 6.3-7.0 g/100 g lactose) than the cow milk (87-88 g/100 g moisture, 3.0 g/100 g protein, 3.2 g/100 g fat, 0.7 g/100 g ash, and 4.6 g/100 g lactose (Li, Liu, & Guo, 2018). This is important from the nutritional point of view and opens opportunities for using this milk in the preparation of formulas for babies that cannot breastfeed.

The fermented milk presented chemical composition of 92.06 g/100 g moisture, 1.48 g/100 g protein, 0.43 g/100 g fat, 0.61 g/100 g ash, 6.41 g/100 g lactose, and 0.17 g/100 g galactose at day 1. Furthermore, it presented pH 4.67 and TA of 3.41% lactic acid. Therefore, the fermented milk presented higher moisture and galactose contents and TA, and lower lactose content and pH values ($p < 0.05$) than the milk. During fermented milk processing, the LAB use lactose as substrate for their metabolism and produce lactic acid, increasing the acidity of the products (Tidona et al., 2015). At the same time, lactose is hydrolyzed in its moieties (galactose and glucose), and galactose is not completely metabolized by LAB (Ohlsson et al., 2017). This explains the higher concentration of galactose in the fermented milks compared to milk. The higher moisture content in the fermented milk may be associated with the reduction in the sugar content during fermentation, which reduces the dry matter of the product.

During fermented milk storage, there was the maintenance of the chemical composition and physicochemical parameters (pH and TA) ($p > 0.05$), except for sugars. A decrease in the lactose content with a consequent increase in galactose and glucose contents ($p < 0.05$) was observed. The results show that the LAB hydrolyzed lactose during storage, but they had no substantial metabolic activity at refrigerated conditions, resulting in an increase in the concentration of glucose and galactose. This result is interesting from the industry point of view, as the products stored for 21 days would have similar characteristics to the new processed ones.

3.2. Fatty acid profile and health indices

Table 2 presents the fatty acid profile and health indices of the donkey milk and fermented donkey milk. The donkey milk presented high concentration of SFA (48.82 mg/100 g fatty acids (FA)), followed by monounsaturated fatty acid (MUFA, 37.67 mg/100 g FA), and polyunsaturated fatty acid (PUFA, 14.87 mg/100 g FA). Furthermore, it presented significant concentrations of important fatty acids, such as C18:1c9 (29.20 mg/100 g FA), C18:2n-6 (7.80 mg/100 g FA), and C18:3n-3 (6.50 mg/100 g FA). MUFA consumption is associated with the reduction in cardiovascular diseases, mainly oleic acid (C18:1c9). This fatty acid increases the mobility of the fat globule and its metabolic activity. Furthermore, PUFA can reduce the risk of cardiovascular disease and enhance body metabolism. Linolenic acid (C18:3n-3) and linoleic acid (C18:2n-6) are fatty acids needed by the human body and they cannot be synthesized, therefore, they must be obtained by the diet (Li, Liu, & Guo, 2018). Finally, donkey milk was characterized by the low concentration of short-chain fatty acids (SCFA) and high concentration of long-chain fatty acids (LCFA), mainly with 16, 18, and 20 carbons. This behavior has already been reported for human milk (Altomonte et al., 2019). The results show that, although donkey milk presents a low concentration of fat (Table 1), this component was of good quality in the product.

The fermented donkey milk presented high concentrations of SFA (41.28 mg/100 g FA) and MUFA (41.02 mg/100 g FA), followed by PUFA (18.55 mg/100 g FA). Therefore, the fermented milk presented lower SFA and higher MUFA and PUFA levels ($p < 0.05$) than milk, mainly associated to the decrease in C8:0, C10:0, C12:0 and C14:0, and increase in C16:1c7, C17:1c9, C18:2n-6, C18:3n-3, C20:2n-6, among others ($p < 0.05$). Consequently, there was a decrease in AI and an increase in the DFA ($p < 0.05$). The consumption of products with lower AI and higher DFA is advisable, as it is associated with decreases in the total cholesterol and LDL cholesterol (Tidona et al., 2015). In this way, the fermented milk

presented a better lipid profile and health indices than the milk. The changes in the fatty acid profile are mainly associated with the fermentation process, as the pasteurization temperatures (65 °C) were extremely low compared to those needed for non-oxidative decomposition of fatty acids (> 200 °C) (Pestana, Gennari, Monteiro, Lehn, & De Souza, 2015). Stress factors, such as the fermentation process, can induce changes in the fatty acid profile, resulting in alterations in the fatty acid unsaturation, cyclization, and concentrations of LCFA (Vieira et al., 2015). The increase in the unsaturated fatty acids is related to the ability of LAB to increase the unsaturation degree of fatty acid, which is suggested as a universally conserved adaptation response (Do Espírito Santo et al., 2012).

During fermented milk storage, there was an increase in the SFA, and decreases in the MUFA and PUFA levels ($p < 0.05$). Consequently, the health indices were impacted, with increases in the AI, TI, and HSFA, and decreases in the DFA ($p < 0.05$). Therefore, the storage time impacted negatively on the lipid profile and health indices. The stress suffered by the LAB during storage (low pH values and presence of oxygen) can result in alterations in the fatty acid profile, with increases or decreases in the SFA, MUFA and PUFA. This is associated with the ability of LAB to reach suitable proportions of fatty acid unsaturation and fatty acid chain length in the membrane of the cell (Vieira et al., 2015). The LAB enzymes necessary for these changes are, mainly, intracellular enzymes (Ziarno, Bryś, Parzyszek, & Veber, 2020). Therefore, during storage, it can have occurred lysis of cells that allowed the lipolytic activity at a higher rate.

The results of the fatty acid profile and health indices indicate that the processing of milk for the production of fermented donkey milk improves the fatty acid profile of the products, but it is advisable to consume it in the first days of storage for the supply of a better-quality lipid.

3.3. Mineral content

Table 3 presents the mineral content of the donkey milk and fermented donkey milk. The donkey milk presented 846.5 mg/100 g calcium, 580.7 mg/100 g phosphorous, 86.7 mg/100 g magnesium, 0.01 mg/100 g manganese, 880.75 mg/100 g potassium, 902.90 mg/100 g sodium, and 3.11 mg/100 g zinc. Therefore, donkey milk was characterized by the increased contents of sodium, calcium, phosphorous, and magnesium as macro minerals, and zinc as micromineral. For children, it is recommended a product with calcium and phosphorous ratio of 1-2:1 and sodium and potassium ratio ≤ 1 (Altomonte et al., 2019). The donkey milk presented 1.46 for the former, and 1 for the latter, which confirms its importance for young nutrition.

The consumption of 100 g of donkey milk would provide 84.65% of the recommended daily intake of calcium, 82.96% of phosphorous, 60.19% of sodium, and 20-28% of magnesium, potassium, and zinc. Calcium consumption is related to improvements in the teeth and bone structures, and this mineral act in the development and contraction of the muscles, being also important for the regulation of heart beating and blood pressure (Matera et al., 2018). Magnesium has an important role in several enzymatic reactions, helps the nervous system, and also the muscles (Satir & Guzel-Seydim, 2016). Phosphorus is important in the processes of gluconeogenesis, skeletal mineralization, glycolysis, cellular signal transduction, and energy metabolism (Takeda, Yamamoto, Yamanaka-Okumura, & Taketani, 2012). Sodium is important in the regulation of extracellular fluid volume and molecules' active transport through the cell membranes. However, its high consumption may increase the prevalence of hypertension (Doyle & Glass, 2010). Therefore, donkey milk is a product with important mineral content.

The fermented donkey milk presented 666-669 mg/100 g calcium, 528-537 mg/100 g phosphorous, 72-73 mg/100 g magnesium, 0.07 mg/100 g manganese, 845-848 mg/100 g

potassium, 528-540 mg/100 g sodium, and 2.5-2.7 mg/100 g zinc. Furthermore, it presented 1.25 for the calcium and phosphorous ratio, and 0.64 for the sodium and potassium ratio, which confirms its importance for young nutrition. The fermented milk presented higher manganese content, and lower calcium, phosphorous, magnesium, sodium, and zinc contents ($p < 0.05$) than the milk. The lower concentrations of minerals in fermented milk may be associated with the utilization of minerals by LAB for their metabolic and physiological activities during fermentation (Afoakwa, Kongor, Takrama, & Budu, 2013). Furthermore, it can be associated with the reduction of the solubility of the minerals after heating treatment (De La Fuente, Olano, Casal, & Juárez, 1999). Even though the lower mineral content, the consumption of 100 g of fermented donkey milk would provide 66% of the recommended daily intake of calcium, 75-76% of phosphorous, 35-36% of sodium, and 17-24% of magnesium, potassium, and zinc. During fermented milk storage, there was maintenance of the mineral content of the products ($p > 0.05$).

The results of the mineral content suggest that the processing of milk for the production of fermented donkey milk decreases the mineral content of the products, and the storage time had no impact on it.

3.4. Amino acid profile

Table 4 presents the amino acid profile of the donkey milk and fermented donkey milk. The donkey milk presented 8 out of 9 of the indispensable amino acids (histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, threonine, and valine), not presenting only tryptophan. It presented glutamic acid (73.58 mg/100 g), histidine (36.85 mg/100 g), serine (21.68 mg/100 g), lysine (14.38 mg/100 g), and alanine (13.67 mg/100 g) as the main amino acids. The amino acid profile of donkey milk was substantially more similar to that reported for human milk (mg/100g; 18.8; 27 histidine, 48 serine, 7.3 lysine, and 4.2 alanine)

compared to cow milk (Altomonte et al., 2019). The composition of infant feed is usually evaluated by an amino acid score, which is based on the human milk amino acid composition (Altomonte et al., 2019). Therefore, the similarity of donkey milk with human milk is important and suggests that donkey milk can be used in infant formulas.

The fermented donkey milk presented glutamic acid (109 mg/100 g), histidine (48-50 mg/100 g), serine (26 mg/100 g), alanine (20-24 mg/100 g), and lysine (9 mg/100 g) as the main amino acids. The fermented milk processing had an impact on the amino acid profile, promoting increases in aspartic acid, glutamic acid, serine, histidine, arginine, alanine, proline, tyrosine, and phenylalanine, and decreases in the other amino acids (glycine, threonine, valine, methionine, isoleucine, lysine) ($p < 0.05$). Therefore, fermented milk processing increased the concentration of a higher number of amino acids. However, it is important to mention that it decreased the content of 6 amino acids that are considered as indispensable (threonine, valine, methionine, isoleucine, leucine, and lysine). LAB have the capacity of degrading large proteins into peptides, and then, to amino acids (Miao et al., 2020). However, LAB need amino acids to ferment milk (Ma, Cheng, Liu, Gong, & Chen, 2016). Therefore, the differences in the amino acid profile between donkey milk and fermented donkey milk may be associated with proteolysis during fermentation and amino acid utilization by LAB. Furthermore, some amino acids may have been lost during heat treatment (Melini, Melini, Luziatelli, & Ruzzi, 2017).

During fermented milk storage, there was reduction in the proline and tyrosine contents, and increases in the other amino acids (arginine, threonine, alanine, valine, methionine, isoleucine, leucine, lysine) ($p < 0.05$). Therefore, the storage time was important to improve the amino acid profile of the fermented milks. The results suggest that LAB continued the proteolysis process during refrigerated storage, increasing the concentration of some amino acids. Furthermore, storage can promote chemical modification of the amino

acids, being the effect dependent on the conditions (temperature and time), and product characteristics (mainly water activity) (Lieshout, Van, Lambers, Bragt, & Hettinga, 2020).

The results of the amino acid profile suggest that the processing of donkey milk for production of fermented donkey milk decreased the amino acid content of the products, mainly of the indispensable ones. However, fermented milk still provides important amino acid contents, mainly at the end of the storage time.

3.5. LAB viability

Table 1 presents the LAB viability in the fermented donkey milk. The products presented 7.39-8.27 log cfu/g of LAB, and no effect of storage time was observed ($p > 0.05$). Brazilian law establishes some minimum requirements for counts of specific microorganisms in fermented milks, which must be met throughout the shelf life of the products. Therefore, the products must have at least 6 log cfu/g of LAB (Brasil, 2007). The products of the present study complied with the legislation. This maintenance of the LAB viability corroborates the other results of the present study, as maintenance of the physicochemical characteristics, chemical composition (except sugars), and mineral profile was observed.

4. Conclusion

This is the first study to determine the complete nutritional value of donkey milk and fermented donkey milk, and it provides important results to the dairy industry. The fermented milk presented different physicochemical characteristics (moister, more acid) and lower nutritional value (lower lactose, and mineral and amino acid contents) than milk. However, it had a better fatty acid profile. The fermented milks could be refrigerated stored for 21 days without negative impacts on the nutritional value of the products, except for the fatty acid profile. It can be concluded that both donkey milk and fermented milk donkey

present important nutritional value, and the fermented milk could be refrigerated stored for 21 days. Donkey milk is still underutilized and the results of the present study can be used to encourage its consumption or processing into fermented milks.

Acknowledgments

This study was financed, in part, by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. The authors thank the Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition of Federal University of Paraíba for supporting the development of microbial analysis.

References

- Afoakwa, E. O., Kongor, J. E., Takrama, J., & Budu, A. S. (2013). Changes in nib acidification and biochemical composition during fermentation of pulp pre-conditioned cocoa (theobroma cacao) beans. *International Food Research Journal*, 20(4), 1843–1853.
- Altomonte, I., Salari, F., Licitra, R., & Martini, M. (2019). Donkey and human milk: Insights into their compositional similarities. *International Dairy Journal*, 89, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.09.005>
- AOAC. (2016). Official methods of analysis of AOAC International. *Association of Official Analysis Chemists International*, CD-ROM. <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=agrisa.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=002093>
- Aspri, M., Bozoudi, D., Tsaltas, D., Hill, C., & Papademas, P. (2017). Raw donkey milk as a source of Enterococcus diversity: Assessment of their technological properties and safety characteristics. *Food Control*, 73, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.022>

- Aspri, M., Leni, G., Galaverna, G., & Papademas, P. (2018). Bioactive properties of fermented donkey milk, before and after in vitro simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 268(June), 476–484. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.119>
- Brasil. (2007). Instrução Normativa N° 46, DE 23 DE OUTUBRO DE 2007. *DOU de 24/10/2007 (N° 205, Seção 1, Pág. 4)*.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jscs.2011.04.006><http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213453015000178><http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643815000651><http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/instrucao-normativa>
- De La Fuente, M. A., Olano, A., Casal, V., & Juárez, M. (1999). Effects of high pressure and heat treatment on the mineral balance of goats' milk. *Journal of Dairy Research*, 66(1), 65–72. <https://doi.org/10.1017/S0022029998003264>
- Do Espírito Santo, A. P., Cartolano, N. S., Silva, T. F., Soares, F. A. S. M., Gioielli, L. A., Perego, P., Converti, A., & Oliveira, M. N. (2012). Fibers from fruit by-products enhance probiotic viability and fatty acid profile and increase CLA content in yoghurts. *International Journal of Food Microbiology*, 154(3), 135–144.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.025>
- Doyle, M. E., & Glass, K. A. (2010). Sodium Reduction and Its Effect on Food Safety, Food Quality, and Human Health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(1), 44–56. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00096.x>
- International Dairy Federation*. (1988). 227.
- Langille, M. G. I., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A., Clemente, J. C., Burkepile, D. E., Vega Thurber, R. L., Knight, R., Beiko, R. G., & Huttenhower, C. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*, 31(9), 814–821.

<https://doi.org/10.1038/nbt.2676>

- Li, L., Liu, X., & Guo, H. (2018). The nutritional ingredients and antioxidant activity of donkey milk and donkey milk powder. *Food Science and Biotechnology*, 27(2), 393–400. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0264-2>
- Li, M., Kang, S., Zheng, Y., Shao, J., Zhao, H., An, Y., Cao, G., Li, Q., Yue, X., & Yang, M. (2020a). Comparative metabolomics analysis of donkey colostrum and mature milk using ultra-high-performance liquid tandem chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 103(1), 992–1001. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17448>
- Li, Y., Fan, Y., Shaikh, A. S., Wang, Z., Wang, D., & Tan, H. (2020b). Dezhou donkey (*Equus asinus*) milk a potential treatment strategy for type 2 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 246(September 2019), 112221. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112221>
- Lieshout, G. A. A. Van, Lambers, T. T., Bragt, M. C. E., & Hettinga, K. A. (2020). *How processing may affect milk protein digestion and overall physiological outcomes : A systematic review*. 60(14), 2422–2445.
- Ma, C., Cheng, G., Liu, Z., Gong, G., & Chen, Z. (2016). Determination of the essential nutrients required for milk fermentation by *Lactobacillus plantarum*. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 884–889. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.003>
- Malissiova, E., Arsenos, G., Papademas, P., Fletouris, D., Manouras, A., Aspri, M., Nikolopoulou, A., Giannopoulou, A., & Arvanitoyannis, I. S. (2016). Assessment of donkey milk chemical, microbiological and sensory attributes in Greece and Cyprus. *International Journal of Dairy Technology*, 69(1), 143–146. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12245>
- Martini, M., Altomonte, I., Manica, E., & Salari, F. (2015). Changes in donkey milk lipids in

- relation to season and lactation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 41, 30–34.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.12.019>
- Martini, M., Licitra, R., Altomonte, I., & Salari, F. (2020). Quality of donkey mammary secretion during the first ten days of lactation. *International Dairy Journal*, 109, 104781.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104781>
- Massouras, T., Triantaphyllopoulos, K. A., & Theodossiou, I. (2017). Chemical composition, protein fraction and fatty acid profile of donkey milk during lactation. *International Dairy Journal*, 75, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.06.007>
- Matera, J., Luna, A. S., Batista, D. B., Pimentel, T. C., Moraes, J., Kamimura, B. A., Ferreira, M. V. S., Silva, H. L. A., Mathias, S. P., Esmerino, E. A., Freitas, M. Q., Raices, R. S. L., Quitério, S. L., Sant'Ana, A. S., Silva, M. C., & Cruz, A. G. (2018). Brazilian cheeses: A survey covering physicochemical characteristics, mineral content, fatty acid profile and volatile compounds. *Food Research International*, 108.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.014>
- Melini, F., Melini, V., Luziatelli, F., & Ruzzi, M. (2017). Raw and Heat-Treated Milk: From Public Health Risks to Nutritional Quality. *Beverages*, 3(4), 54.
<https://doi.org/10.3390/beverages3040054>
- Miao, W., He, R., Feng, L., Ma, K., Zhang, C., Zhou, J., Chen, X., Rui, X., Zhang, Q., Dong, M., Li, W., & Xu, Q. (2020). Study on processing stability and fermentation characteristics of donkey milk. *Lwt*, 124(January).
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109151>
- Molkentin, J., & Precht, D. (2000). Validation of a gas-chromatographic method for the determination of milk fat contents in mixed fats by butyric acid analysis. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 102(3), 194–201.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1438-9312\(200003\)102:3<194::AID-EJLT194>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1438-9312(200003)102:3<194::AID-EJLT194>3.0.CO;2-3)

- Ohlsson, J. A., Johansson, M., Hansson, H., Abrahamson, A., Byberg, L., Smedman, A., Lindmark-Månsson, H., & Lundh, Å. (2017). Lactose, glucose and galactose content in milk, fermented milk and lactose-free milk products. *International Dairy Journal*, 73, 151–154. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.06.004>
- Ozturkoglu-Budak, S. (2018). Effect of different treatments on the stability of lysozyme, lactoferrin and β -lactoglobulin in donkey's milk. *International Journal of Dairy Technology*, 71(1), 36–45. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12380>
- Pestana, J. M., Gennari, A., Monteiro, B. W., Lehn, D. N., & De Souza, C. F. V. (2015). Effects of pasteurization and ultra-high temperature processes on proximate composition and fatty acid profile in bovine milk. *American Journal of Food Technology*, 10(6), 265–272. <https://doi.org/10.3923/ajft.2015.265.272>
- Satir, G., & Guzel-Seydim, Z. B. (2016). How kefir fermentation can affect product composition? *Small Ruminant Research*, 134, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.10.022>
- Sperry, M. F., Silva, H. L. A., Balthazar, C. F., Esmerino, E. A., Verruck, S., Prudencio, E. S., Neto, R. P. C., Tavares, M. I. B., Peixoto, J. C., Nazzaro, F., Rocha, R. S., Moraes, J., Gomes, A. S. G., Raices, R. S. L., Silva, M. C., Granato, D., Pimentel, T. C., Freitas, M. Q., & Cruz, A. G. (2018). Probiotic Minas Frescal cheese added with L. casei 01: Physicochemical and bioactivity characterization and effects on hematological/biochemical parameters of hypertensive overweighted women – A randomized double-blind pilot trial. *Journal of Functional Foods*, 45. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.04.015>
- Takeda, E., Yamamoto, H., Yamanaka-Okumura, H., & Taketani, Y. (2012). Dietary phosphorus in bone health and quality of life. *Nutrition Reviews*, 70(6), 311–321. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00473.x>

- Tidona, F., Charfi, I., Povolò, M., Pelizzola, V., Carminati, D., Contarini, G., & Giraffa, G. (2015). Fermented beverage emulsion based on donkey milk with sunflower oil. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(12), 2644–2652. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12936>
- Valle, E., Pozzo, L., Giribaldi, M., Bergero, D., Gennero, M. S., Dezzutto, D., McLean, A., Borreani, G., Coppa, M., & Cavallarin, L. (2018). Effect of farming system on donkey milk composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(7), 2801–2808. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8777>
- Vieira, C. P., Álvares, T. S., Gomes, L. S., Torres, A. G., Paschoalin, V. M. F., & Conte, C. A. (2015). Kefir grains change fatty acid profile of milk during fermentation and storage. *PLoS ONE*, 10(10), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139910>
- 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(4), 170–177. <https://doi.org/10.1155/S1463924686000330>
- Yvon, S., Olier, M., Leveque, M., Jard, G., Tormo, H., Haimoud-Lekhal, D. A., Peter, M., & Eutamène, H. (2018). Donkey milk consumption exerts anti-inflammatory properties by normalizing antimicrobial peptides levels in Paneth's cells in a model of ileitis in mice. *European Journal of Nutrition*, 57(1), 155–166. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1304-z>
- Zeppa, G., Conterno, L., & Gerbi, V. (2001). Determination of organic acids, sugars, diacetyl, and acetoin in cheese by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2722–2726. <https://doi.org/10.1021/jf0009403>
- Ziarno, M., Bryś, J., Parzyszek, M., & Veber, A. (2020). Effect of lactic acid bacteria on the lipid profile of bean-based plant substitute of fermented milk. *Microorganisms*, 8(9), 1–15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091348>

Table 1

Chemical composition and physicochemical and microbiological characteristics of fresh donkey milk and fermented milk during cold storage for 21 days.

Variables	Milk	Fermented milk			
		Day 1	Day 7	Day 14	Day 21
Moisture	91.34 ± 0.0 ^b	92.06 ± 0.02 ^a	92.02 ± 0.01 ^a	92.00 ± 0.01 ^a	92.02 ± 0.02 ^a
Protein	1.50 ± 0.07 ^a	1.48 ± 0.01 ^a	1.47 ± 0.01 ^a	1.47 ± 0.01 ^a	1.47 ± 0.01 ^a
Fat	0.43 ± 0.01 ^a	0.43 ± 0.06 ^a	0.45 ± 0.01 ^a	0.46 ± 0.06 ^a	0.46 ± 0.06 ^a
Ash	0.67 ± 0.01 ^a	0.61 ± 0.01 ^a	0.60 ± 0.01 ^a	0.62 ± 0.03 ^a	0.61 ± 0.01 ^a
Lactose	7.32 ± 0.14 ^a	6.41 ± 0.02 ^b	-	-	5.70 ± 0.01 ^c
Galactose	ND	0.17 ± 0.003 ^b	-	-	0.52 ± 0.01 ^a
Glucose	ND	ND	-	-	0.62 ± 0.02
pH	7.97 ± 0.03 ^a	4.67 ± 0.06 ^b	4.63 ± 0.06 ^b	4.60 ± 0.10 ^b	4.53 ± 0.06 ^b
Titrateable acidity	0.26 ± 0.01 ^b	3.41 ± 0.22 ^a	3.26 ± 0.06 ^a	3.21 ± 0.01 ^a	3.34 ± 0.05 ^a
Lactic acid bacteria	-	8.27 ± 0.03 ^a	8.01 ± 0.01 ^a	7.50 ± 0.45 ^a	7.39 ± 0.55 ^a

^{a-b}Mean ± standard deviation with different lowercase letters in the same line differed by Tukey's test (p < 0.05). Moisture, protein, fat, ash, lactose, galactose and glucose in g/100 g. Titrateable acidity in % lactic acid. Lactic acid bacteria in log cfu/g. – not measured. ND not detected.

Table 2

Fatty acid profile (g/100 g of total fatty acids) and health indices of fresh donkey milk and fermented milk during refrigerated storage

Fatty acid	<i>Milk</i>	Fermented milk	
		Day 1	Day 21
C4:0	0.162 ± 0.01^b	0.526± 0.04 ^a	0.500± 0.05 ^a
C6:0	0.214± 0.02 ^c	0.414± 0.04 ^b	0.612± 0.05 ^a
C8:0	4.713± 0.40 ^b	3.088± 0.33 ^c	6.998± 0.40 ^a
C10:0	9.509± 0.95 ^b	4.400± 0.42 ^c	15.541± 0.99 ^a
C10:1+[C11:0]	1.364± 0.10 ^b	0.767± 0.08 ^c	2.845± 0.30 ^a
C12:0	6.574± 0.67 ^b	3.011± 0.33 ^c	15.996± 0.95 ^a
C14:0	4.401± 0.42 ^b	3.110± 0.29 ^c	11.080± 1.08 ^a
C14:1c9	0.233± 0.02 ^b	0.193± 0.02 ^c	0.594± 0.06 ^a
C15:0	0.186± 0.02 ^c	0.340± 0.03 ^a	0.227± 0.04 ^b
i-C16:0	0.072± 0.007 ^b	0.151± 0.01 ^a	0.089± 0.009 ^b
C16:0	19.074± 1.65 ^b	22.148± 2.24 ^a	18.305± 2.28 ^b
i-C17:0	0.623± 0.06 ^a	0.711± 0.08 ^a	0.176± 0.02 ^b
C16:1c7	0.747± 0.08 ^c	2.897± 0.30 ^b	4.144± 0.42 ^a
C16:1c9	4.030± 0.38 ^a	4.997± 0.50 ^a	2.250± 0.30 ^b
a-C17:0	0.067± 0.002 ^b	0.126± 0.002 ^a	0.097± 0.009 ^{ab}
C17:0	0.184± 0.01 ^b	0.292± 0.02 ^a	0.291± 0.03 ^a
C17:1c9	0.325± 0.04 ^b	0.416± 0.04 ^a	0.365± 0.04 ^b
C18:0	1.647± 0.20 ^b	2.117± 0.23 ^a	1.609± 0.16 ^b

C18:1trans	0.176± 0.02 ^a	0.099± 0.01 ^b	0.000± 0.001 ^c
C18:1c9	29.202± 2.23 ^a	29.863± 2.99 ^a	7.564± 1.05 ^b
C18:1c11	1.594± 0.23 ^a	1.790± 0.19 ^a	0.382± 0.05 ^b
C18:2n-6	7.798± 0.86 ^b	10.571± 0.99 ^a	5.715± 0.68 ^c
C20:0	0.034± 0.004 ^b	0.087± 0.009 ^a	0.055± 0.005 ^{ab}
C18:3n-6	0.061± 0.009 ^a	0.070± 0.008 ^a	0.000± 0.002 ^b
C18:3n-3	6.507± 0.70 ^b	7.280± 0.86 ^a	4.279± 0.50 ^c
C20:2n-6	0.138± 0.001 ^b	0.190± 0.002 ^a	0.054± 0.006 ^c
C20:3n-6	0.046± 0.005 ^a	0.015± 0.001 ^b	0.055± 0.004 ^a
C20:3n-3+[C22:1]	0.198± 0.06 ^a	0.172± 0.04 ^a	0.118± 0.06 ^b
C20:4n-6	0.061± 0.007 ^b	0.081± 0.009 ^a	0.058± 0.004 ^b
C20:5n-3	0.012± 0.001 ^b	0.023± 0.002 ^a	0.000± 0.001 ^c
C22:5n-3	0.048± 0.005 ^a	0.057± 0.008 ^a	0.000± 0.001 ^b
SFA	48.82 ± 5.02 ^b	41.28± 5.03 ^c	74.42± 6.63 ^a
MUFA	37.67± 4.05 ^b	41.02± 4.49 ^a	18.14± 2.03 ^c
PUFA	14.87± 1.55 ^b	18.55± 2.03 ^a	10.33± 1.09 ^c
AI	0.85± 0.09 ^b	0.64± 0.07 ^c	3.07± 0.20 ^a
TI	0.59± 0.06 ^b	0.57± 0.06 ^b	1.29± 0.02 ^a
DFA	52.82± 5.33 ^b	60.92± 5.99 ^a	27.24± 3.05 ^c
HSFA	30.05± 3.78 ^b	28.27± 3.50 ^b	45.38± 4.69 ^a

^{a-c}Mean ± standard deviation with different lowercase letters in the same line differed by Tukey's test (p <0.05).

Table 3

Mineral content (mg/100 g) of fresh donkey milk and fermented milk during refrigerated storage

Mineral (mg/100g)	Mineral content			Recommended daily intake (%) (portion – 100 g)			Recommendation (mg)*
	Milk	Fermented milk		Milk	Fermented milk		
		Day 1	Day 21		Day 1	Day 21	
Calcium	846.56 ± 2.53 ^a	669.57 ± 4.91 ^b	666.07 ± 6.31 ^b	84.65	66.96	66.61	1000 ¹
Phosphorous	580.74 ± 3.81 ^a	537.73 ± 3.60 ^b	528.30 ± 5.85 ^b	82.96	76.82	75.47	700 ²
Magnesium	86.72 ± 0.77 ^a	73.34 ± 0.25 ^b	72.97 ± 0.62 ^b	20.65	17.46	17.37	420 ²
Manganese	0.01 ± 0.01 ^b	0.07 ± 0.01 ^a	0.07 ± 0.01 ^a	0.43	3.04	3.04	2.3 ¹
Potassium	880.75 ± 37.46 ^a	845.77 ± 8.08 ^a	848.66 ± 19.20 ^a	25.90	24.88	24.96	3400 ¹
Sodium	902.90 ± 20.81 ^a	540.25 ± 9.17 ^b	528.12 ± 8.38 ^b	60.19	36.01	35.20	1500 ¹
Zinc	3.11 ± 0.12 ^a	2.70 ± 0.11 ^b	2.51 ± 0.02 ^b	28.27	24.54	22.82	11 ²

T1 – day 1, T21 – day 21.

* Based on National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine (2019, adult man aged 31-50 years)

⁽¹⁾Adequate Intake⁽²⁾Recommended Dietary Allowances^{a-b}Mean ± standard deviation with different lowercase letters in the same line differed by Tukey's test (p < 0.05). Number in parenthesis represent the % daily intake (100 g) of the mineral

Table 4

Free amino acid (mg/100 g) of fresh donkey milk and fermented milk during refrigerated storage

Mineral (mg/100g)	Milk	Fermented milk	
		Day 1	Day 21
Aspartic acid	4.67 ± 0.11^b	8.03 ± 0.01^a	7.72 ± 0.54^a
Glutamic Acid	73.58 ± 0.62^b	109.18 ± 0.30^a	109.29 ± 1.68^a
Serine	21.68 ± 0.10^b	26.87 ± 0.08^a	26.58 ± 0.09^a
Glicine	13.49 ± 0.45^a	4.22 ± 0.02^b	5.04 ± 0.01^b
Histidine	36.85 ± 0.69^b	50.07 ± 0.05^a	48.28 ± 0.43^a
Arginine	9.85 ± 0.01^c	15.10 ± 0.01^b	16.05 ± 0.03^a
Threonine	6.45 ± 0.01^a	4.62 ± 0.01^c	4.75 ± 0.01^b
Alanine	13.67 ± 0.03^c	20.75 ± 0.01^b	24.39 ± 0.02^a
Proline	3.36 ± 0.01^c	11.94 ± 0.04^a	10.74 ± 0.13^b
Tyrosine	3.87 ± 0.01^c	5.60 ± 0.01^a	5.20 ± 0.11^b
Valine	5.66 ± 0.04^a	1.45 ± 0.01^c	2.08 ± 0.01^b
Methionine	2.27 ± 0.03^b	1.84 ± 0.01^c	2.62 ± 0.01^a

Cistine	4.99 ± 0.01^a	4.43 ± 0.01^a	5.34 ± 0.50^a
Isoleucine	5.33 ± 0.02^a	1.28 ± 0.01^c	2.23 ± 0.01^b
Leucine	4.46 ± 0.01^b	4.03 ± 0.01^c	4.81 ± 0.04^a
Phenylalanine	4.50 ± 0.04^b	7.28 ± 0.04^a	7.88 ± 0.30^a
Lysine	14.38 ± 0.06^a	9.17 ± 0.12^c	9.52 ± 0.10^b

^{a-c}Mean $\pm$ standard deviation with different lowercase letters in the same line differed by Tukey's test ($p < 0.05$).

ANEXOS

ANEXO 1



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2018 076634 1

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24098477000110

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Cidade Universitária

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58059-900

País: Brasil

Telefone: (83) 32167558

Fax:

Email: inova@reitoria.ufpb.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 20/12/2018 às 09:02, Petição 870180165562