



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA

JOYCEANA OLIVEIRA CORREIA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL PROTEICO DE BEBIDA LÁCTEA ISENTA DE
LACTOSE CONTENDO *Lactobacillus mucosae* ATRAVÉS DE ELETROFORESE EM
GEL DE POLIACRILAMIDA-DODECISULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE)**

CAMPINA GRANDE
2018

JOYCEANA OLIVEIRA CORREIA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL PROTEICO DE BEBIDA LÁCTEA ISENTA DE
LACTOSE CONTENDO *Lactobacillus mucosae* ATRAVÉS DE ELETROFORESE EM
GEL DE POLIACRILAMIDA-DODECISULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora:
Prof.^a Dr.^a Flávia Carolina Alonso Buriti.

**CAMPINA GRANDE
2018**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

C824a Correia, Joyceana Oliveira.
Avaliação do perfil proteico de bebida láctea isenta de lactose contendo *Lactobacillus mucosae* através de eletroforese em gel de Poliacrilamida-Dodecissulfato de Sódio (SDS-PAGE) [manuscrito] : / Joyceana Oliveira Correia. - 2018.
46 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2018.

"Orientação : Profa. Dra. Flávia Carolina Alonso Burity, Departamento de Farmácia - CCBS."

1. Probióticos. 2. Alimento funcional. 3. Eletroforese.

21. ed. CDD 615.34

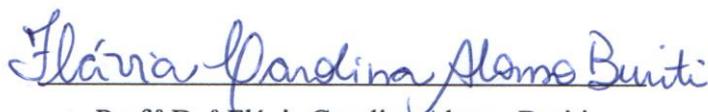
JOYCEANA OLIVEIRA CORREIA

AVALIAÇÃO DO PERFIL PROTEICO DE BEBIDA LÁCTEA ISENTA DE LACTOSE
CONTENDO *Lactobacillus mucosae* ATRAVÉS DE ELETROFORESE EM GEL DE
POLIACRILAMIDA-DODECISULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Departamento de Farmácia da Universidade
Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência
para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

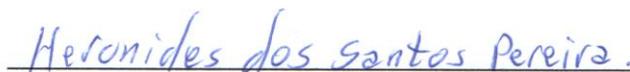
Aprovada em: 28/06/2018.

BANCA EXAMINADORA



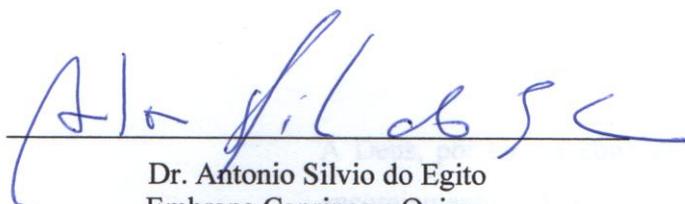
Prof.^a Dr.^a Flávia Carolina Alonso Buriti
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Orientadora



Prof. Dr. Heronides dos Santos Pereira
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Examinador



Dr. Antonio Silvio do Egito
Embrapa Caprinos e Ovinos

Examinador

A Deus, por ter me concedido saúde, força e encorajamento. Aos meus pais, irmãs e sobrinho, por todo amor e apoio, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ser minha fortaleza durante os obstáculos, por ter me guiado durante todo caminho possibilitando viver e aprender coisas maravilhosas.

Aos meus pais Aluiso e Graça, pelos ensinamentos, pelo cuidado e amor, são fontes de inspiração. Que muitas vezes abdicaram de si mesmos, para incentivar os meus estudos. Eu não teria conquistado nada sem vocês, sou grata.

À minha irmã Glauciana por toda paciência para ouvir minhas angústias, pelo apoio e conselhos seja qual for a circunstância. E, ao bebê mais lindo e amado que você trouxe à vida, meu Gabriel.

À Julia Maria, minha irmãzinha que trouxe tanta alegria com sua chegada.

À minha avó Francisca por sua simplicidade, proteção e todo amor dado que foram de fundamental importância para a construção da pessoa que eu sou.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Flávia Carolina pela orientação, dedicação, competência e aos conhecimentos proporcionados ao longo da minha jornada acadêmica.

Ao secretário Ronald, a coordenadora Prof.^a Rosemary e a chefe do Departamento de Farmácia Prof.^a Nícia, esta que foi coordenadora do curso quando ingressei na universidade, pela presteza aos pedidos e dúvidas durante a graduação. E aos demais professores e funcionários do Curso de Farmácia da UEPB que contribuíram para o meu desenvolvimento profissional.

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisa e Extensão em alimentos (NUPEA), particularmente à Adna Bandeira, Adriana Valéria, Isanna Menezes, Elaine Pereira e Thiago José, pela atenção e atendimento quando foi necessário.

Às mestrandas Débora Dantas, pela ajudar na execução das análises, e Sabrina Alves, pelo auxílio, pelo companheirismo na realização do trabalho tornando meus dias no laboratório mais divertido.

Aos colegas de turma Mariana Morais, Geovana Guedes, Daniely Rayane, Blenda Queiroz, Alisson Sousa, Messias Gomes, Angélica Maria, Silmara Vicentini e todos aqueles com quem eu dividi momentos difíceis e de alegrias durante o curso. Minha gratidão pelo apoio, companheirismo e amizade. Sentirei saudades.

Ao Prof. Dr. Heronides dos Santos pelo aceite do meu convite para a banca examinadora do trabalho. Tenho certeza que suas considerações serão de grande contribuição.

Agradeço ao pesquisador Dr. Antonio Egito por seu auxílio e colaboração que foram de fundamental importância para o desenvolvimento das análises. E também por sua presença, como avaliador deste trabalho.

Ao Programa de Incentivo à Pós-Graduação e Pesquisa da UEPB pelo auxílio financeiro ao trabalho. Às empresas Embrapa Caprinos e Ovinos, DuPont-Danisco e Prozyn por ceder parte do material destinado a este estudo.

A todas as pessoas que de alguma forma colaboraram com a realização deste trabalho.

RESUMO

Alimentos funcionais são produtos alimentícios enriquecidos por aditivos nutritivos e bioativos, que conferem ao consumidor benefícios à saúde além da nutrição convencional. Dentre estes, destacam-se os probióticos, os quais possuem microrganismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas, conferem um efeito de saúde ao hospedeiro. Considera-se que produtos probióticos de base láctea são excelentes meios para manter as culturas vivas e ativas, em parte, devido às proteínas que são um dos principais constituintes nutricionais. Este trabalho teve por finalidade avaliar o perfil proteico de bebidas lácteas com potencial funcional contendo a cultura nativa potencialmente probiótica de *Lactobacillus mucosae* CNPC007, em cocultura com o microrganismo iniciador *Streptococcus thermophilus* TA40, e polpa de jabolão (*Syzygium cumini*), adicionadas ou não de β -galactosidase para a eliminação da lactose. Foi utilizado o método eletroforético de gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) para avaliar a degradação e/ou modificação do perfil proteico após a fermentação das bases lácteas utilizadas na fabricação das bebidas, bem como no produto final sob armazenamento refrigerado (4 ± 1 °C) durante 21 dias. A partir dos resultados obtidos foi possível visualizar uma fração proteica não bem definida na região abaixo de 14,0 kDa nas bases lácteas antes da fermentação (T0) e nas bebidas lácteas ao longo do armazenamento, particularmente após 14 e 21 dias (D14 e D21, respectivamente), em ambos os tratamentos controle e isento de lactose. Por outro lado, esta fração esteve ausente nas bases lácteas ao final da fermentação (TF) em ambos os tratamentos. No caso específico da modificação proteica observada ao longo do armazenamento, esta provavelmente ocorreu em função do metabolismo da cocultura utilizada sobre as proteínas lácteas. Também foi verificada uma redução das caseínas entre T0 e TF, com manutenção ao longo do período de armazenamento, mostrando que a atividade das bactérias sobre essas proteínas é praticamente inexistente no produto refrigerado. Este estudo mostrou também que a adição de polpa da fruta de *Syzygium cumini* não interferiu no perfil proteolítico das bebidas assim como não houve diferença evidentes entre os géis dos tratamentos controle e isento de lactose.

Palavras-Chave: SDS-PAGE. Alimento funcional. Cultura nativa probiótica.

ABSTRACT

Functional foods are enriched food products by nutritional and bioactive additives, giving the consumer health benefits beyond the conventional nutrition. Among these food products, the probiotics are in evidence, which contain living microorganisms, when consumed in adequate amounts, confer a health effect to the host. Milk based probiotic products are excellent strategies to maintain the cultures alive and active, in part, due to the proteins that are one their main nutritional constituents. The purpose of this study was to evaluate the protein profile of dairy beverages with functional potential containing the potentially probiotic indigenous culture of *Lactobacillus mucosae* CNPC007, in co-culture with the starter *Streptococcus thermophilus* TA40, and jambolan (*Syzygium cumini*) pulp, added or not of β -galactosidase for removal of lactose. The sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) method was used to evaluate the degradation of and/or changes in the protein profile after the fermentation of the dairy bases used in the manufacture of beverages, as well as the final product stored under cold conditions (4 ± 1 °C) for 21 days. A not well defined protein fraction was observed in the region below 14 kDa in the dairy bases before the fermentation (T0) and in the dairy beverages during the storage, particularly after 14 and 21 days (D14 and D21, respectively) in both control and lactose free trials. On the other hand, this fraction was absent in the both dairy bases trials at the end of fermentation (TF). In the specific case of the changes in the protein profile observed during the storage, this fact probably occurred as a result of the metabolism of the co-culture on the milk proteins. It was also verified a decrease in the proportion of caseins, which were maintained stable during the storage, showing that the activity of the microorganisms on these proteins is almost absent in the refrigerated product. This study also showed that the addition of *Syzygium cumini* fruit pulp did not interfere in the proteolytic profile of the beverages as well as there was no important differences between the gels of lactose free and control trials.

Keywords: SDS-PAGE. Functional food. Indigenous probiotic culture.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	OBJETIVOS.....	11
2.1	Objetivo geral.....	11
2.2	Objetivos específicos.....	11
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
3.1	Alimento funcional.....	12
3.2	Probióticos.....	13
3.3	Microrganismos probióticos e sua aplicação em produtos.....	14
3.4	Bebida láctea.....	15
3.5	Lactose no leite e sua intolerância.....	16
3.6	Soro do leite.....	17
3.7	Proteínas do soro do leite.....	18
3.7.1	<i>β-Lactoglobulina (β-LG) e α-Lactoalbumina (α-LA).....</i>	18
3.7.2	<i>Albumina sérica bovina (BSA).....</i>	19
3.7.3	<i>Imunoglobulinas (Ig's).....</i>	19
3.7.4	<i>Lactoferrina (Lf).....</i>	20
3.8	Produtos lácteos com frutas como veículos de compostos fenólicos.....	20
3.9	Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE).....	21
4	METODOLOGIA.....	23
4.1	Preparo das bebidas lácteas fermentadas.....	23
4.1.1	<i>Obtenção da polpa do fruto do <i>Syzygium cumini</i>.....</i>	23
4.1.2	<i>Obtenção do soro lácteo.....</i>	23
4.1.3	<i>Elaboração das bases lácteas controle e isenta de lactose.....</i>	23
4.1.4	<i>Elaboração das bebidas lácteas fermentadas controle e isenta de lactose.....</i>	24
4.2	Análise do perfil proteico das bebidas lácteas fermentadas pela técnica de eletroforese de poliacrilamida dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE).....	24
4.2.1	<i>Preparo das soluções.....</i>	24
4.2.1.1	<i>Acrilamida/bis-acrilamida.....</i>	24
4.2.1.2	<i>Tampão do gel separador.....</i>	25
4.2.1.3	<i>Tampão do gel concentrador.....</i>	25

4.2.1.4	<i>Tampão do tanque (ou do eletrodo)</i>	25
4.2.1.5	<i>Dodecil sulfato de sódio (SDS) 5%</i>	25
4.2.1.6	<i>Persulfato de amônia a 10%</i>	26
4.2.1.7	<i>Tampão de amostra</i>	26
4.2.1.8	<i>Solução corante</i>	26
4.2.1.9	<i>Solução de álcool etílico a 50%</i>	26
4.2.1.10	<i>Solução de nitrato de prata</i>	26
4.2.1.11	<i>Solução reveladora</i>	26
4.2.2	<i>Preparação das amostras</i>	26
4.2.3	<i>Preparação dos géis</i>	27
4.2.4	<i>Corrida eletroforética</i>	28
4.2.5	<i>Revelação das proteínas</i>	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

Devido à preocupação e discussão dos hábitos alimentares e sua relação com a saúde, o desenvolvimento de estudos sobre nutrição aumentou, principalmente considerando o papel da microbiota intestinal na etiologia de doenças e os efeitos dos alimentos na sua modulação. Assim, foi promovido o conceito de alimentos funcionais, considerando os aditivos benéficos que são adicionados aos mesmos sobre a composição ou atividade da microbiota intestinal, destacando os probióticos e prebióticos (MARTINEZ; BEDANI; SAAD, 2015).

Segundo Hill et al. (2014), é aceita a definição da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), que refere probióticos como “microrganismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas, conferem um efeito de saúde ao hospedeiro”.

O veículo mais comum utilizado para o consumo de culturas probióticas é o iogurte (BEHARE; KUMAR; MANDAL, 2016). Tanto o leite fermentado quanto o iogurte predominam no comércio. No entanto, existem fatores que podem prejudicar a multiplicação das bactérias probióticas nestes produtos, seja durante sua elaboração ou sobre a sobrevivência destes microrganismos durante o período de armazenamento (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008).

Segundo Kandylis et al. (2016), produtos de base láctea são excelentes meios para manter culturas probióticas vivas e ativas. De acordo com os autores, as cepas probióticas mais comuns são *Bifidobacterium* (*adolescentis*, *animalis*, *bifidum*, *breve* e *longum*) e *Lactobacillus* (*acidophilus*, *casei*, *fermentum*, *gasseri*, *johnsonii*, *paracasei*, *plantarum*, *rhamnosus* e *salivarius*). Estas colaboram com a microbiota intestinal benéficamente (HILL et al., 2014).

Frutas são adicionadas aos produtos lácteos para lhes conferir sabor e ampliar suas características nutricionais e funcionais. Sabe-se que o jabolão (*Syzygium cumini*) é um fruto rico em antocianinas (VEIGAS, 2007). Esta característica é capaz de promover uma alta atividade antioxidante, tornando este fruto uma matéria-prima interessante para produtos alimentícios, podendo aumentar o valor nutricional e funcional do novo alimento gerado (BEZERRA, 2015).

Em contrapartida, o teor de lactose é bastante alto no leite bovino e sua hidrólise *in vivo* é realizada através da enzima lactase (β -galactosidase) (DE VRESE et al., 2001; ZHANG; ZHONG, 2018). A presença dessa enzima é essencial para a hidrólise digestiva de lactose e sua ausência ou diminuição resulta na intolerância à lactose nos indivíduos (JÄRVELÄ;

TORNIAINEN; KOLHO, 2009). Dessa maneira, os seres acometidos por esta deficiência necessitam reduzir o consumo de produtos de base láctea (ZHANG; ZHONG, 2018). No entanto, a indústria de laticínios utiliza da incorporação da enzima β -galactosidase em produtos derivados do leite, garantindo a estes alimentos o baixo teor de lactose (ROSSETTO; MORAES; ZANIN, 2012; TOMAL et al., 2010).

As proteínas também estão entre os elementos nutricionais do leite, possuindo diferentes concentrações e características nutricionais que são determinadas pelo seu uso no produto alimentício. Podem variar de estrutura com o pH, temperatura, força iônica, açúcares e com os tratamentos de processamento (SINGH, 2016).

Para isso, a técnica de eletroforese é utilizada como forma eficaz para a caracterização de proteínas (ANEMA, 2009; FOGAÇA, 2017). Boa parte das análises para identificar as frações proteicas são realizadas por meio do sistema de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). Nesta técnica, a proteína é desnaturada por aquecimento na presença de 2-mercaptoetanol, com rompimento das ligações dissulfeto, em que os polipeptídios adquirem a carga negativa do SDS. Dessa forma, ocorre a separação unicamente pela diferença dos pesos moleculares (BRAMMER, 2001). Sendo, assim este estudo tem como finalidade avaliar o perfil proteico de bebidas lácteas com potencial funcional, constituídas de *Syzygium cumini* e β -galactosidase, empregando a metodologia de eletroforese SDS-PAGE.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar as frações proteicas de bebidas lácteas com potencial funcional, adicionadas ou não de β -galactosidase, contendo a cultura nativa *Lactobacillus mucosae* CNPC 007, em cocultura com o microrganismo iniciador *Streptococcus thermophilus* TA40, e polpa de jambolão (*Syzygium cumini*), pelo método de eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE).

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos desta pesquisa são:

- a) caracterizar o perfil proteico durante a fermentação e armazenamento;
- b) verificar a atividade proteolítica das bactérias lácticas sobre as proteínas do leite;
- c) avaliar a influência da hidrólise da lactose sobre o perfil proteico;
- d) avaliar a influência da adição do jambolão sobre o perfil proteico;
- e) comparar os géis revelados pelas técnicas de Coomassie Brilliant Blue e nitrato de prata.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Alimento funcional

Baseado no aumento da preocupação da população na expectativa de vida e diminuição do número de hospitalizações, a nutrição desenvolveu novos conceitos que ampliou as funções fisiológicas dos indivíduos, assegurando o bem-estar e a saúde, simultaneamente o menor risco de doenças ao longo da vida (ROBERFROID, 2002; SAAD, 2006).

Alimentos funcionais são aqueles que trazem benefícios além da nutrição básica, sendo necessário que as suas propriedades à saúde sejam comprovadas cientificamente (ASHWELL, 2004; BOLUDA; CAPILLA, 2017). As classes de alimentos funcionais são categorizadas de acordo com componentes bioativos neles contidos, como os probióticos, as vitaminas, os minerais, as ervas, os ácidos graxos ômega 3, os fitoquímicos, bem como alguns peptídeos e proteínas (BIELECKA; BIEDRZYCKA; MAJKOWSKA, 2002; KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008). Podem ainda ser adicionados de fibras ou conterem menor teor de gorduras e açúcares (ASHWELL, 2004; BOLUDA; CAPILLA, 2017).

Nesse âmbito, dentre os alimentos funcionais, se destacam os probióticos e prebióticos que são aditivos alimentares que tem por intenção efeitos benéficos sobre a composição e a atividade da microbiota intestinal hospedeira (MARTINEZ; BEDANI; SAAD, 2015).

A microbiota intestinal, quando em desequilíbrio, pode implicar no surgimento de doenças. Por outro lado, uma nutrição com componentes que possam modular estes microrganismos está vinculada com a redução do risco de desenvolvimento de doenças (MARTINEZ; BEDANI; SAAD, 2015).

Uma microbiota sadia é caracterizada por possuir equilíbrio sobre suas diversas classes de bactérias, incluindo os simbioses, que promovem a saúde, tais como *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp., as comensais, que supostamente não são benéficas como também não causam danos ao hospedeiro, e os microrganismos potencialmente patogênicos (MARTINEZ; BEDANI; SAAD, 2015; ROUND; MAZMANIAN, 2009).

A relação entre a microbiota e o hospedeiro é importante para a formação da parede intestinal, colonização de resistência contra patógenos, produção de vitaminas, interação com o sistema imunológico e degradação de xenobióticos (HILL, 1997; MARTINEZ; BEDANI; SAAD, 2015; QIN et al., 2010; SAULNIER; KOLIDA; GIBSON, 2009).

3.2 Probióticos

A digestão tem a finalidade de exercer a manutenção ou melhoria do estado de saúde. Considerando que o desconforto gastrointestinal é associado com a função intestinal, a sua reparação está relacionada aos efeitos fisiológicos benéficos (EALES et al., 2017; EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2011). Como indicação de melhorar os sintomas gastrointestinais, a ingestão de probióticos é recomendada, uma vez que eles são capazes de alterar a composição da microbiota intestinal (EALES et al., 2017; SIMRÉN, et al., 2013).

Segundo Hill et al. (2014), é aceita a definição da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), que refere probióticos como “microrganismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas, conferem um efeito de saúde ao hospedeiro”. Os microrganismos probióticos necessariamente devem ser resistentes à passagem no estômago, bem como apresentar sobrevivência e proliferação no intestino (GUIDANCE, 2016; HOLZAPFEL et al., 1998). Os probióticos incorporados aos produtos devem ter a capacidade de resistir à acidez gástrica, aos ácidos biliares e às enzimas digestivas, serem aptos a apresentar atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas, além de possuírem seus benefícios à saúde e segurança comprovados ao consumidor (DIXIT; WAGLE; VAKIL, 2016; VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015).

Muitos trabalhos científicos afirmam as propriedades e finalidade dos microrganismos vivos nos alimentos probióticos, os quais demonstram resultados significativos nas funções imunológicas, digestivas, respiratórias e de doenças infecciosas. Estes efeitos vêm sendo cada vez mais reconhecidos pelos profissionais de saúde e, do mesmo modo, observa-se o aumento do número de alimentos e bebidas probióticos disponíveis ao consumidor (DIXIT; WAGLE; VAKIL, 2016; VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015).

As influências de probióticos sobre bactérias patogênicas são identificadas por impedirem a sua sobrevivência e, desta maneira, estes últimos são inibidos pela produção de ácidos graxos de cadeia curta, como ácido acético, propiônico, butirico e láctico. Os probióticos, portanto, auxiliam a manter o pH do lúmen do cólon, o que afeta a expressão das enzimas bacterianas e também o metabolismo de compostos estranhos e carcinogênicos no intestino (SIMOVA; BESHKOVA; DIMITROV, 2009; TEJERO-SARIÑENA et al., 2013; KERRY et al., 2018). Também são responsáveis pela produção de outros constituintes como, etanol, outros ácidos orgânicos, diacetil, acetaldeídos, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas e

peptídeos. Em especial, bacteriocinas e peptídeos que levam à morte celular de patógenos, estão ligados ao aumento da permeabilidade na membrana da célula alvo e, conseqüentemente, a despolarização da mesma (ISLAM, 2016; KERRY et al., 2018). Os probióticos também competem com patógenos por sítios de adesão e de receptores, assim como por nutrientes (KERRY et al., 2018). Embora se conheçam os efeitos benéficos envolvendo os probióticos, os mecanismos moleculares decorrente desses alimentos ainda merecem estudos. Estes mecanismos, por compreenderem vários eventos, torna o campo de estudo bastante complexo (FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS AND WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001).

3.3 Microrganismos probióticos e sua aplicação em produtos

Probióticos estão disponíveis em uma variedade de formas, como pós, cápsulas, alimentos e fórmulas infantis (EALES, 2017; SANDERS, 2011). A forma como os microrganismos serão viáveis nestes produtos depende das condições de fermentação, temperatura, armazenamento e características de cada espécie. Tais fatores são importantes para que as culturas possam desempenhar suas funções e determinar as propriedades do produto final (MOTTA, 2015; SHAH, 2007).

De acordo com KERRY et al. (2018), algumas pesquisas recentes centraram-se no estudo das condições e viabilidade dos microrganismos probióticos durante o armazenamento e processamento, bem com na sensibilidade destes aos baixos valores de pH, fluido gástrico, muco, bile, fluidos pancreáticos e intestinais, e também na aderência a células isoladas ou cultura de células, além da interação com outros microrganismos (patogênicos). Estes autores descrevem um levantamento de diferentes espécies bacterianas que são usadas ativamente como probióticas com base em outros estudos. São estas: *Lactobacillus* – *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. reuteri*, *L. bulgaricus* (DIXIT; WAGLE; VAKIL, 2016); *Propionibacterium* – *P. jensenii*, *P. freudenreichii*; *Peptostreptococcus* – *P. productus*; *Bacillus* – *B. coagulans*, *B. subtilis*, *B. laterosporus* (NGUYEN et al., 2016); *Lactococcus* – *L. lactis* (DIXIT; WAGLE; VAKIL, 2016); *Enterococcus* – *E. faecium* (ONYENWEAKU et al., 2016); *Pediococcus* – *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* (SORNPLANG; PIYADEATSOONTORN, 2016); *Streptococcus* – *S. sanguis*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. thermophilus*, *S. salivarius* (ARORA; SINGH; SHARMA, 2013); *Bifidobacterium* – *B. longum*, *B. catenulatum*, *B. breve*, *B. animalis*, *B. bifidum* (WESTERMANN et al., 2016); *Bacteroides* – *B. uniformis*

(KOBLYIAK et al., 2016); *Akkermansia* – *A. muciniphila*; *Saccharomyces* – *S. boulardii* (CHEN, 2013).

Para assegurar a eficácia e favorecer as alterações na composição da microbiota intestinal, os alimentos probióticos precisam ser ingeridos diariamente, de modo que as concentrações fisiologicamente estejam entre 10^6 a 10^7 unidades formadoras de colônias (UFC), para garantir seu efeito. Para isso, os microrganismos probióticos devem apresenta-se na concentração de 10^6 a 10^7 UFC em 100 g de produto alimentício para atingir 10^8 a 10^9 UFC/g⁻¹ de produto (CHARTERIS et al., 1998; KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008; NINESS, 1999; ROBERFROID; 1999; SHAH, 2000; VINDEROLA; REINHEIMER, 2000, 2003).

3.4 Bebida láctea

Estudos recentes demonstram que produtos probióticos a base de leite são excelentes meios de transporta ou gerar culturas vivas e ativas. Por outro lado, existem alguns fatores que devem ser analisados antes de incluir microrganismos probióticos em produtos à base de leite (KANDYLIS, 2016; KHAN, 2014; TRIPATHI; GIRI, 2014). Os produtos lácteos fermentados podem ser produzidos a partir do leite, por vários tipos de fontes, seja ovelha, cabra, vaca, pasteurizado ou não. Alimentos não lácteos também têm sido usados, como cereais e soja (RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010). A fermentação do leite pode ser através do uso de culturas *starter* (microrganismos iniciadores de fermentação pela produção de ácido láctico), *blackslopping* (uma pequena porção de leite já fermentado que é utilizada pra iniciar uma nova fermentação) ou através de fermentação natural. Apesar de muitas dessas bebidas lácteas fermentadas sejam constituídas de bactérias do ácido láctico (LAB) (BANDIERA et al., 2013; GRAN; GADAGA; NARVHU, 2003; MARSH et al., 2014; SAARELA et al., 2000).

Nos últimos anos houve um interesse em agregar valor ao soro do leite para gerar bebidas funcionais e estudos relacionados à sua fermentação por bactérias lácticas demonstram relevância. Merece destaque que estas bactérias apresentaram sobrevida no soro do leite em bebidas probióticas (MARSH et al., 2014; KANDYLIS, 2016). No entanto, a viabilidade desses microrganismos no alimento pode ser afetada por fatores como as condições de fermentação, temperatura de armazenamento, métodos de preservação e as características de cada espécie. Isso é crítico para que as culturas desempenhem suas funções, as quais são importantes para determinar as propriedades dos alimentos (MOTTA; GOMES, 2015; SHAH,

2007). Os gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, e *Streptococcus* compõem os principais grupos de bactérias lácticas (MOZZY et al., 2010; MOTTA; GOMES, 2015). Elas possuem em comum a capacidade de produzir ácido, de se multiplicarem em alto teor de sal e serem fermentadoras de glicose (MOTTA; GOMES, 2015; ZOTTA; PARENTE; RICCIARDI, 2009). Além de suas propriedades metabólicas, tais como glicólise, lipólise e produção de diacetil, podem gerar peptídeos e aminoácidos, os quais contribuem para o crescimento da população bacteriana responsável pela fermentação, além da produção de outros metabólitos que contribuem para as características finais dos produtos fermentados (BELGACEM et al., 2010; MOTTA; GOMES, 2015).

É também muito relevante a atividade proteolítica das bactérias lácticas para os produtos lácteos fermentados (MOTTA; GOMES, 2015; TAKAFUJI et al., 1995) pois favorecem as propriedades sensoriais finais dos produtos fermentados por serem capazes de liberar peptídeos. Especificamente os peptídeos bioativos de proteínas contribuem para o aumento do papel de promover saúde do alimento probiótico (LEROY; VERLUYETEN; DE VUYST, 2006; MOTTA; GOMES, 2015).

3.5 Lactose no leite e sua intolerância

A lactose é o componente mais abundante no leite bovino (DE VRESE et al., 2001; ZHANG; ZHONG, 2018), sendo que cerca de 4,60% desse dissacarídeo também é encontrado no soro lácteo (CARMINATTI, 2001; MIZUBUTI, 1994). Ao ser hidrolisado pela β -galactosidase (lactase) no trato digestório, gera glicose e galactose (CARMINATTI, 2001; ROSSETTO; MORAES; ZANIN, 2010). A β -galactosidase é a enzima essencial para a hidrólise digestiva da lactose do leite e a sua deficiência causa a intolerância à lactose (JÄRVELÄ; TORNIAINEN; KOLHO, 2009; NUSSINOVITCH; CHAPNIK; GAL; FROY, 2012). Essa enzima se encontra na superfície da mucosa do intestino delgado, contudo sua atividade enzimática é diminuída após o desmame. Apesar de controlada geneticamente, são poucos os indivíduos que conseguem sustentar níveis elevados dessa enzima ao longo de toda a sua vida. Estima-se que 75% dos adultos apresentem baixa atividade da lactase ao longo da vida (BROWN-ESTERS; NAMARA; SAVAIANO, 2012).

Nos indivíduos com baixa atividade da β -galactosidase, a lactose não é hidrolizada ao chegar à microbiota intestinal; ela é fermentada produzindo gases a partir dos ácidos graxos de cadeia curta, com produção dos gases hidrogênio, metano e dióxido de carbono (HE et al., 2006; BROWN-ESTERS; NAMARA; SAVAIANO, 2012). O excesso desses gases ocasiona

ao indivíduo dor abdominal, inchaço, flatulência, diarreia. Por essa razão, estes indivíduos precisam reduzir o consumo de leite (SANTONOCITO et al., 2015). A conseqüente exclusão de produtos a base de leite da dieta leva a um aumento do risco de carências nutricionais (STEFANO et al., 2002; SANTONOCITO et al., 2015), como deficiência de cálcio e de aminoácidos essenciais (MEURER, 2014; PEREIRA et al., 2009). Portanto, há necessidade de desenvolver tecnologias para fornecer produtos alternativos aos consumidores que são intolerantes à lactose (ZHANG; ZHONG, 2018).

3.6 Soro do leite

De acordo com Sgarbieri (2005) e Tullio (2007), o soro é um subproduto oriundo da coagulação enzimática ou ácida do leite para a fabricação de queijo. A produção de soro no Brasil é maior por coagulação enzimática. Este soro denominado soro doce, o qual comumente é oriundo da fabricação de queijos mussarela, prato, minas frescal, entre outros. Já os de coagulação ácida, chamados de soro ácido tem um consumo mais reduzido, são eles o queijo ricota e o requeijão (CARVALHO, 2007).

O soro é o resultado de 85-90% do volume do leite coagulado e possui 55% dos nutrientes dele (BRANELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015; SISO, 1996; SMITHERS, 2008). É fonte de vitaminas, minerais e proteínas de alta qualidade se comparado com as de ovo e soja (DRGALIC; TRATNIK L; BOZANIC, 2005; PESCUMA et al., 2012; SMITHERS, 2008). Os constituintes do soro do leite podem variar com a origem do leite utilizado, podendo apresentar de 6 a 8 g/L de proteínas solúveis (GERNIGNON; SCHUCK; JEANTET, 2010; PESCUMA et al., 2012; SISO, 1996). Estes favorecem positivamente as propriedades físico-químicas do alimento como, por exemplo, a sua solubilidade, a formação de espuma, emulsificação e gelificação (JI; HAUQUE, 2003; PESCUMA et al., 2012). Estas propriedades são regidas pelas características estruturais das proteínas: tamanho, carga e hidrofobicidade as quais são modificadas através da força iônica, temperatura, entre outras interações ambientais (SINGH, 2016).

Atualmente a indústria de laticínios descarta o soro em rios e lagos sem nenhum tipo de tratamento, causando problemas de contaminação ambiental (ATHANASIADIS et al., 2004; PESCUMA et al., 2012). Tendo em vista que todo esse material é rico em matéria orgânica, ele pode ser utilizado para a fabricação de outros produtos lácteos. Quando reutilizado, o soro é armazenado em tanques separadamente, e fornecido como matéria-prima para outras empresas (FOGAÇA, 2017). Segundo Pescuma et al. (2012), uma bebida funcional elaborada

de soro fermentado através de bactérias lácticas pode favorecer tanto suas características nutricionais quanto as sensoriais. Isso se dá principalmente porque as bactérias lácticas promovem a proteólise de produtos lácteos por meio de enzimas proteolíticas que permitem que tais microrganismos possam usufruir das proteínas do soro como fonte nitrogênio para garantir seu desenvolvimento ao longo da fermentação (PESCUMA et al., 2012; MATAR et al., 1996).

3.7 Proteínas do soro do leite

Na Tabela 1, são apresentadas as principais proteínas do soro do leite bovino, do qual são constituídas de aminoácidos essenciais, conferindo o alto valor nutricional (SGARBIERI, 2005; FOGAÇA, 2017), como mencionado anteriormente.

Tabela 1 – Proteínas presentes no soro produzido a partir da produção de queijo oriundo do leite bovino.

Proteínas do soro	Concentração (g/ L)
β -Lactoglobulina (β -LG)	3,2
α -Lactoalbumina (α -LA)	1,2
Albumina sérica bovina (BSA)	0,4
Imunoglobulinas (Ig's)	0,7
Lactoferrina (Lf)	0,1

Fonte: Sgarbieri (2005), adaptado.

Os aminoácidos essenciais e não essenciais presentes nas proteínas do soro são: triptofano, cisteína, glicina, histidina, arginina, fenilalanina, metionina, glutamina, tirosina, asparagina, serina, prolina, treonina, isoleucina, valina, alanina, lisina, ácido aspártico, leucina e ácido glutâmico (ALMEIDA et al., 2013; HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006).

3.7.1 β -Lactoglobulina (β -LG) e α -Lactoalbumina (α -LA)

A β -LG e a α -LA são as proteínas mais abundantes no leite bovino (ALMEIDA et al., 2013; FOGAÇA, 2017), sendo β -LG uma molécula de 162 aminoácidos, com peso molecular de 18.362 Da (SGARBIERI, 2005). Os peptídeos derivados da β -LG estão associados à atividade antioxidante, antihipertensiva, antimicrobiana, imunoestimulante e efeito hipocolesterolêmico, apresentando resistência a altas temperaturas e ao pH ácido, sendo portanto absorvidos no intestino delgado (ALMEIDA et al., 2013; FOGAÇA, 2017). A β -LG,

também é uma proteína que aumenta a absorção e a disponibilidade de vitamina A, devido a sua capacidade de se ligar ao retinol (JACOBUCCI, 2010). Por sua alta concentração no soro está fração proteica pode ocasionar alergia em crianças, já que é um grupo de indivíduos mais sensível (FOGAÇA, 2017; SGARBIERI, 2005). Por outro lado, a β -LG praticamente não ocorre no leite humano (SGARBIERI, 2005).

A α -LA possui peso molecular de 14.176 Da com 123 aminoácidos (SGARBIERI, 2005), contém especialmente triptofano. Seus peptídeos exibem atividades biológicas ao organismo por serem anticarcinogênicos e antimicrobianos (ALMEIDA et al., 2013; FOGAÇA, 2017). Também é capaz de prevenir contra úlceras gástricas por álcool ou estresse (SGARBIERI, 2005; MATSUMOTO et al., 2001). A α -LA possui uma semelhança com a α -LA do leite humano, tornando assim viável a sua utilização em alimentos infantis (ALMEIDA et al., 2013; ZIEGLER; SGARBIERI, 2009).

3.7.2 Albumina sérica bovina (BSA)

A BSA possui cerca de 580 aminoácidos e peso molecular de 66.200 Da (SGARBIERI, 2005). É capaz de ligar-se aos ácidos graxos e transportá-los na corrente sanguínea (ALMEIDA et al., 2013; FOGAÇA, 2017). Além disso, é um precursor da síntese de glutatona, peptídeo este que intensifica a atividade imune, por exemplo, em portadores de HIV, também possuindo atividade anticarcinogênica (ALMEIDA et al., 2013; HARAGUCHI et al., 2006; SANTOS; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2011; RENHE, 2008; KRISSENSSEN, 2007).

3.7.3 Imunoglobulinas (Ig's)

São encontradas as imunoglobulinas IgG, IgA, IgM e IgE no leite bovino, sendo a IgG em maior quantidade. Seus pesos moleculares estão entre 150.000 a 1.000.000 Da, associadas às funções antioxidantes e do sistema imune, protegendo contra infecções. Também são responsáveis por impulsionar apoptose de células tumorais (ALMEIDA et al., 2013; FOGAÇA, 2017; SGARBIERI, 2004).

No soro sanguíneo de bovinos são encontradas as proteínas IgG₁ e IgG₂ que se apresentam como monômeros, possuindo aproximadamente 160.000 Da (SGARBIERI, 2005). São constituídas de cadeias leves e pesadas que, ao submetê-las a condições desnaturantes, o seu peso molecular pode variar de 50.000 a 25.000 Da (CRUZ et al., 2016).

3.7.4 Lactoferrina (Lf)

A Lf é constituída por 689 aminoácidos (ALMEIDA et al., 2013; FOGAÇA, 2017; SGARBIERI, 2004) e possui peso molecular de 86.100 Da (SGARBIERI, 2005). Sua atividade no organismo é inibir a proliferação de bactérias gram-positivas e gram-negativas e também leveduras, fungos e protozoários (ALMEIDA et al., 2013; FOGAÇA, 2017; SGARBIERI, 2004), bem como a capacidade de fixação do Ferro (SGARBIERI, 2005).

3.8 Produtos lácteos com frutas como veículos de compostos fenólicos

De acordo com Azevedo et al. (2018) e Sun-Waterhouse et al. (2011), a adição de ingredientes contendo polifenóis em produtos lácteos fermentados, antes do processo de fermentação como parte da mistura de ingredientes de iogurte ou após a fermentação para adicionar sabor e cor ao alimentos, também favorece a inovação biotecnológica de opções para ampliar o mercado de produtos lácteos funcionais.

Alguns estudos demonstram que os compostos polifenólicos aumentam as propriedades antioxidantes (AZEVEDO et al., 2018, BELGACEM; BAGCHI, 2014; THIPPESWAMY; ACHUR, 2013). Segundo Nair, Begum e Geetha (2013), antioxidantes são comumente encontrados na maior parte da planta como, por exemplo, as cascas, caules, folhas, frutos, raízes, flores, vagens e sementes. No entanto, os compostos mais efetivos para essa atividade são os flavonoides e compostos fenólicos, que estão em maior quantidade nas sementes e frutos. São capazes de prevenir doenças, cardiovasculares, câncer e distúrbios neurodegenerativos, sendo também associados com atividade antiinflamatória, anticarcinogênica e antibacteriana. O papel dos antioxidantes é proteger as células de danos causados pelos radicais livres (AZEVEDO et al., 2018, BAGCHI; BAGCHI, 2014; THIPPESWAMY; ACHUR, 2013).

A espécie *Syzygium cumini*, pertencente à família Myrtaceae (CHAUDHARY; MUCHOPADHYAY, 2012; CHASE; REVEAL, 2009), conhecido popularmente por jambolão, jamelão, jamun, jambu, amora indiana, ameixa roxa, azeitona preta e baga de feira (AYYANAR; SUBASH-BABU; IGNACIMUTHU, 2013; BEZERRA, 2015; RAMYA; NEETHIRAJAN; JAYAKUMARARAJ, 2012). Possui um alto valor medicinal por conter fitoconstituintes, como taninos, alcaloides, esteroides, flavonoides e terpenos (FREITAS et al., 2017; RAVI; RAMACHANDRAN; SUBRAMANIAN, 2004). Comumente utilizado no

auxílio do controle da diabetes (SWAMI et al., 2012). É também denominada de *Eugenia jambolana*, *Eugenia cumini* e *Syzygium jambolana*. Quando adulta, constitui-se de uma árvore tropical frutífera (CHAUDHARY; MUCHOPADHYAY, 2012; CHASE; REVEAL, 2009). Os seus frutos possuem minerais (zinco, ferro, cálcio, sódio e potássio), açúcares (frutose e glicose) e vitaminas (AMAL et al., 2013). Além do seu valor nutricional, o fruto contém um alto teor de antocianinas, que justifica seus benefícios à saúde e uso na medicina popular (CHAUDHARY; MUCHOPADHYAY, 2012). O potencial antioxidante do fruto de *S. cumini* está associado à presença de flavonoides, taninos e compostos fenólicos (AMAL et al., 2013; OOMAH et al., 2005). Dessa forma, esse fruto é interessante para ser utilizado na elaboração de produtos lácteos fermentados probióticos (BEZERRA, 2015).

3.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)

De acordo com Anema (2009) e Fogaça (2017), a eletroforese é a técnica mais eficaz para separar, detectar e quantificar as frações proteicas que compõem o leite. Ela consiste no deslocamento das moléculas, de acordo com sua carga elétrica e seu peso molecular em um campo elétrico. A migração ocorre por meio do deslocamento das moléculas de carga negativa para o polo positivo (ânodo) e as moléculas de carga positiva para o polo negativo (cátodo). A velocidade com que as proteínas irão se deslocar depende da proporção do campo elétrico e carga, e é inversamente proporcional ao seu raio de distância entre os eletrodos e a viscosidade do meio (BRAMMER, 2001).

No gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), as etapas englobam: (1) preparar um gel e montá-lo no aparelho; (2) preparar uma amostra com proteína adicionada de um tampão contendo dodecilsulfato de sódio (SDS) em uma temperatura elevada; (3) acrescentar a amostra no aparelho contendo o gel seguindo da realização da eletroforese; (4) coloração/descoloração e identificação das proteínas (ZHU; LU; LIU, 2011). As proteínas são separadas conforme o seu peso molecular. O gel nessa técnica é formado de polímeros de acrilamida com ligações cruzadas de N-N-Metil bisacrilamida e suas porcentagens habituais são 5%, 7,5%, 10%, 12,5% ou 15%. É utilizado o persulfato de amônio para fornecer radicais livres, e a tetrametiletilenodiamina (ou TEMED) como catalisador para facilitar a transferência do elétron do radical livre. Também se aplica o SDS; este sendo um detergente aniônico é capaz de desnaturar a proteína e formar um complexo de SDS-proteína, carregado negativamente. Ao se empregar uma corrente elétrica serão direcionadas para o polo positivo e separadas apenas por sua diferença de massa molar.

As proteínas menores migram mais rapidamente enquanto que as maiores mais lentamente, pois terão maior dificuldade em atravessar a malha do gel (DAVIS, 2012).

Existem diversas técnicas para coloração de géis de eletroforese. Os mais utilizados são as colorações com nitrato de prata e Coomassie Brilliant Blue. Na coloração por nitrato de prata, as primeiras etapas se iniciam com uma combinação de etanol e ácido acético. Com a adição da prata em combinação de um revelador formado por formaldeído e carbonato alcalino (PATTON, 2002), as proteínas se ligam aos íons desse metal tornando-se visíveis (DAVIS, 2012). É uma técnica elaborada por etapas, que devem ser interrompidas em algum momento arbitrário, com finalidade de evitar o excesso de desenvolvimento. Que está sujeito a uma variação em sua reprodutibilidade de um gel para outro (PATTON, 2002; QUADRONI; JAMES, 1999). Método este bastante sensível, na faixa de 0,1 ng de proteína (DAVIS, 2012). Em contraposição, a coloração por Coomassie Brilliant Blue possui uma sensibilidade na faixa de 30 a 100 ng de proteína, porém é uma técnica mais rápida e simples que a prata (DAVIS, 2012; PATTON, 2002). Baseia-se na produção de partículas de corantes coloidais que, ao longo da coloração, consegue-se um equilíbrio entre estas partículas e o corante livremente disperso em solução. A baixa concentração de corante livre penetra na matriz do gel e cora as proteínas; entretanto, a partícula de corante coloidal é excluída do gel e, dessa forma, não há coloração da matriz (PATTON, 2002).

Vários estudos têm utilizado técnicas de eletroforese, incluindo SDS-PAGE, para avaliar o perfil proteico de alimentos fermentados, bem como analisar a atividade metabólica de bactérias lácticas sobre as proteínas do leite (DONKOR, 2007, PEREIRA et al., 2017; PESCUA et al., 2012).

4 METODOLOGIA

4.1 Preparo das bebidas lácteas fermentadas

4.1.1 Obtenção da polpa do fruto do *Syzygium cumini*

Os frutos de jambolão foram coletados no estado da Paraíba durante a safra de 2017. Estes frutos foram selecionados, lavados e higienizados com hipoclorito de sódio. A polpa foi separada das sementes de modo manual. Posteriormente foi triturada em liquidificador, tratada termicamente (3 min a 85°C) e imediatamente congelada a -18 °C.

4.1.2 Obtenção do soro lácteo

O soro lácteo foi obtido por meio do processamento de queijo, utilizando o método de coagulação enzimática, conforme a metodologia descrita por Florentino (1997), com adaptações. O leite pasteurizado desnatado (Cariri *Light*, COAPECAL) foi aquecido entre 35 e 37°C e depois foi acrescentado o coagulante Hannilase (Chr. Hansen), na proporção indicada pelo fabricante, bem como o cloreto de cálcio na proporção de 0,25 g/L. O tempo de coagulação foi de 30 a 40 minutos. Em seguida, foram realizados cortes no coágulo obtido e agitações a fim de se obter o soro. Com o auxílio de uma peneira, o soro foi separado e armazenado em sacos plásticos a -18°C, até o momento do seu uso para o preparo das bebidas lácteas.

4.1.3 Elaboração das bases lácteas controle e isenta de lactose

O soro descongelado foi transferido para frascos de vidro de borosilicato e aquecido a 85 °C por 5 min, para inativação das enzimas do coagulante utilizado na fabricação de queijos. Em seguida, foi adicionado o leite em pó desnatado (Molico, Nestlé) e açúcar granulado (Estrela, Biosev), ambos na proporção de 8 g/100 g de base láctea. A mistura foi agitada até completa dissolução dos ingredientes e tratada termicamente a 85 °C por 30 min. A base produzida como descrito até esta etapa foi utilizada para a bebida láctea controle.

Para a produção da base láctea isenta de lactose foi utilizada a enzima β -galactosidase (Prozyn® Lactase, Prozyn), na proporção recomendada pelo fabricante de 0,50 g/L de base láctea. A base foi mantida na presença da enzima durante 24 h a 4 °C. Para fins de comprovação da eficiência da hidrólise da lactose, a base láctea foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) na Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio

de Janeiro, RJ), utilizando detector de índice de refração, tendo sido obtidos resultados desse dissacarídeo abaixo do limite de detecção do método (menor que 100 mg/100 g, dados não mostrados), resultado considerado isento de lactose segundo a legislação vigente (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017).

4.1.4 Elaboração das bebidas lácteas fermentadas controle e isenta de lactose

Para a fermentação, as bases lácteas controle e isenta de lactose foram acrescentadas da cultura *starter Streptococcus thermophilus* TA 40 (DuPont), na proporção de 0,004 g/100 g, e da cultura potencialmente probiótica nativa *Lactobacillus mucosae* CNPC 007, fornecida pela Embrapa Caprinos e Ovinos (Sobral, CE) na forma liofilizada. Antes de sua incorporação à base láctea, a cultura nativa foi ativada em caldo MRS (de Man, Rogosa and Sharpe). Para esse fim, com o uso de microespátula, uma alíquota de quantidade aleatória da cultura liofilizada foi adicionada em 5 mL de caldo e mantida a 37°C por 24 h. Após o período de incubação, o cultivo foi dividido em 4 criotubos que foram centrifugados (centrífuga Parsec CT 0603) a 3.000 rpm por 10 min até a completa sedimentação das células. Depois de centrifugado, foi retirado o sobrenadante e a cultura precipitada foi então lavada com solução salina a 0,85% para a remoção completa do caldo MRS. Foram utilizados os conteúdos da cultura *L. mucosae* CNPC 007 de 4 criotubos para o preparo de 1 L de base láctea.

Após a adição das culturas, as bases lácteas controle e isenta de lactose foram colocadas em estufa a 43 ± 2 °C para a fermentação, sendo medido o pH a cada hora, a partir da segunda hora de fermentação, até atingir pH 5,0 e acidez de pelo menos 0,7 g de ácido láctico/100 g. Ao término da fermentação, as bases foram imediatamente resfriadas a 4 °C para a adição da polpa de fruta (*Syzygium cumini*) na proporção de 15 g/100 g de produto final. As bebidas lácteas controle e isenta de lactose foram embaladas em garrafas plásticas e armazenadas a 4 °C durante 21 dias.

4.2 Análise do perfil proteico das bebidas lácteas fermentadas pela técnica de eletroforese de poliacrilamida dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)

4.2.1 Preparo das soluções

4.2.1.1 Acrilamida/bis-acrilamida

Foram dissolvidos 18,3g de acrilamida (A8887, Sigma-Aldrich, $\geq 98,5\%$) e 0,5 g de bis-

acrilamida (N,N'-methylenebis(acrylamide), M7256, Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$) em 50 mL de água deionizada.

4.2.1.2 Tampão do gel separador

Foi pesado 9,075 g de tris(hidroximetil)-aminometano (TRIS, #1610719, BIO-RAD Laboratories, $\geq 99.8\%$) e dissolvido em aproximadamente 20 mL de água deionizada. O pH foi ajustado para 8,8 com solução de HCl 50% (320331, Sigma-Aldrich, ACS reagent, 37%) e o volume completado com água deionizada suficiente para 50 mL.

4.2.1.3 Tampão do gel concentrador

Dissolveu-se 3 g de TRIS em aproximadamente 10 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 6,8 com solução de HCl 50% e o volume completado com água deionizada suficiente para 50 mL.

4.2.1.4 Tampão do tanque (ou do eletrodo)

Foram dissolvidos 12,64 g de TRIS, 7,98 g de glicina (#161-0719, BIO RAD $\geq 99.8\%$) e 1 g de SDS (sodium dodecyl sulfate, L3771, Sigma-Aldrich, $\geq 98.5\%$) em água deionizada suficiente para 1 L de solução de pH ajustado para 8,3 com HCl P.A. Esta solução foi armazenada sob refrigeração até o momento da corrida.

4.2.1.5 Dodecil sulfato de sódio (SDS) a 5%

Dissolveu-se 0,05 g de SDS (L3771, Sigma-Aldrich, $\geq 98.5\%$) em 1 mL de água deionizada, procedendo sua preparação no momento do uso.

4.2.1.6 Persulfato de amônia a 10%

Foram dissolvidos 0,1 g de persulfato de amônia (01993, NEON comercial, P.A.) em 1 mL de água deionizada.

4.2.1.7 Tampão de amostra

Misturou-se 2,5 mL de tampão do concentrador, 5 mL de glicerol (125, Vetec Química, P.A), 5 mL de SDS 10% (L3771, Sigma-Aldrich, $\geq 98,5\%$), 0,3g de 2-mercaptoetanol (M6250, Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$) e 2,5 mg de azul de bromofenol (Química Moderna, P.A./ACS), em água deionizada suficiente para 25 mL de solução.

4.2.1.8 Solução corante

Foram adicionados em 50 mL água deionizada, 40 mL de álcool metílico (UN1230, Qhemis, P.A.), 10 mL de ácido acético (141, Vetec Química, P.A) e 0,1 g de azul de Comassie (Coomassie Brilliant Blue R-250, powder, #161-0400, BIO-RAD Laboratories).

4.2.1.9 Solução de álcool etílico a 50%

Adicionou-se 50 mL de álcool etílico (34852, Sigma-Aldrich, $\geq 99,8\%$) em 50 ml de água destilada.

4.2.1.10 Solução de nitrato de prata

Dissolveu-se 200 mg de nitrato de prata (01803, NEON Comercial, P.A.) e 74 μ L de formaldeído (37%, NEON Comercial, P.A.) em 100 ml de água deionizada.

4.2.1.11 Solução reveladora

Em 100 mL de água deionizada foi acrescentado 6g de carbonato de sódio (reagente anidro, 00789, NEON Comercial, P.A), 50 μ L de formaldeído (37%, NEON Comercial, P.A.) e 2 mL de tiosulfato de sódio(tiosulfato de sódio pentahidratado, 02412, NEON Comercial, P.A./ACS).

4.2.2 Preparação das amostras

Os períodos de amostragem foram: bases lácteas antes da fermentação (T0); bases lácteas após a fermentação (TF); bebidas lácteas após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento (D1, D7, D14 e D21, respectivamente). Em cada período de amostragem, as bases e bebidas

láticas foram transferidas para criotubos e mantidas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ até seu uso para a adição no tampão amostra. Para esse fim, alíquotas de 0,20 g das bases e bebidas lácteas controle e isenta de lactose descongeladas foram transferidas para novos criotubos e adicionadas de 1 mL de tampão amostra. Em seguida, foram agitadas por 2 min (agitador de tubos vortex Nova Instruments NI1058) com a finalidade de solubilizar as amostras no tampão. Depois, foram tratadas a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos em estufa (estufa de secagem e esterilização, Tecnal equipamentos científicos, TE-393/2). A seguir, foram centrifugadas (centrífuga Parsec CT 0603) a 3.000 rpm por 2 minutos. Seus sobrenadantes foram descartados.

4.2.3 Preparação dos géis

Foi utilizado o sistema PAGE-SDS-2-mercaptoetanol, descrito por Laemmli (1970) e Donkor (2007), adaptado para o uso de géis em placas ($10,5 \times 10 \times 0,4\text{ cm}$) (mini vertical, modelo SE250, Hoefer). Foram aplicados nas placas o gel separador a 15% e o gel concentrador de 5% de poliacrilamida. Os géis foram compostos de tampão concentrador contendo Tris/ HCl e também soluções de acrilamida/ bis-acrilamida, água deionizada, solução de SDS à 5%, TEMED e persulfato de amônia à 10%. A ordem descrita das soluções para o preparo foi seguida rigorosamente. Na Tabela 2, são apresentados os volumes usados para os respectivos géis de separação e concentração, aplicados nesta análise.

Tabela 2 – Componentes e proporções usadas no preparo dos géis de separação e nos géis de concentração.

Componentes	Gel de separador a 15%	Gel de concentrador a 5%
Tampão Separador (Tris-HCl 3,7mol/l, pH 8.9)	4 mL	-
Tampão Concentrador (Tris-HCl 0,6 mol/l, pH 6.8)	-	1,25 mL
Solução Acrilamida (Acrilamida/ Bis-acrilamida)	6,58 mL	0,65 mL
Água Deionizada	5,14 mL	2,5 mL
Solução de SDS a 5%	0,161 mL	0,05 mL
TEMED	0,016 mL	0,005 mL
Solução de Persulfato de Amônia a 10%	0,107 mL	0,1 mL
Total	16 mL	4,5 mL

Fonte: Laemmli (1970) e Donkor (2007), adaptado.

4.2.4 Corrida eletroforética

Para avaliar o peso molecular das unidades proteicas separadas, o gel foi calibrado com padrões de proteínas do soro. O padrão foi preparado utilizando as proteínas IgG (IgG from goat serum, I9140, ~55kDa, Sigma-Aldrich, $\geq 80\%$, 0,025 mg/10 μL), α -LA (α -lactalbumin from bovine milk, L5385, 14kDa, Sigma-Aldrich, $\geq 85\%$, 0,025 mg/10 μL) e β -LG (β -lactoglobulin from bovine milk, L3908, ~18.4kDa, Sigma-Aldrich, $\geq 90\%$, 0,025 mg/10 μL), seguindo o mesmo tratamento dado às amostras das bebidas utilizando o tampão amostra com a finalidade de desnaturar as proteínas.

Foram utilizados 10 μL de amostra, como também 10 μL do padrão de proteínas preparado, por poço presente no gel concentrador. A corrida eletroforética ocorreu em presença de um tampão tanque/eletrodo em pH 8,9, entre 40 a 60 minutos, em tensão constante de 300 V e corrente de 25 mA por gel, sob refrigeração à - 4°C (Hofer RCB20-Plus). Ao fim da corrida, o gel concentrador foi descartado, permanecendo apenas o gel separador. Este foi imerso *overnight* em uma solução corante composta por álcool metílico, ácido acético e 0,1% azul de Coomassie.

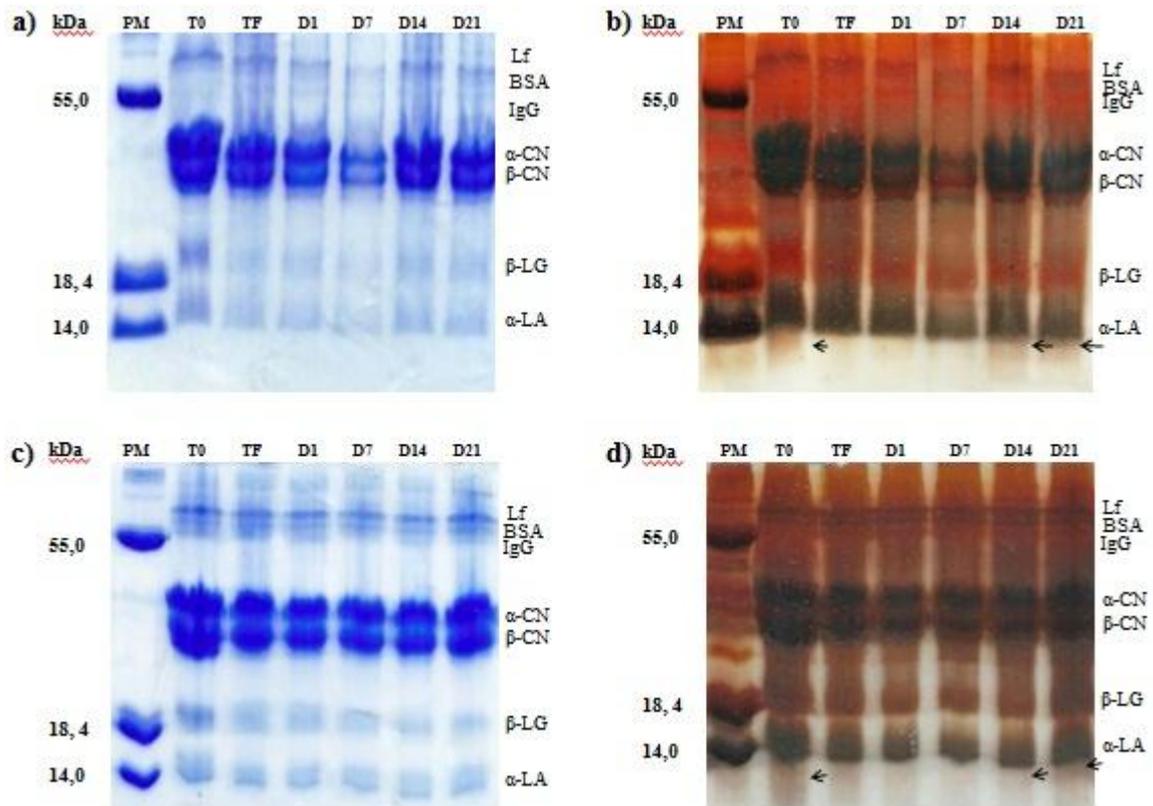
4.2.5 Revelação das proteínas

O gel imerso na solução com azul de Coomassie a 0,1% foi retirado e desidratado com uma solução de álcool etílico a 50% em três etapas de 20 min, cada. A seguir, foram realizadas três lavagens com água deionizada. O gel foi então fotografado em *scanner* e prosseguiu-se com coloração por nitrato de prata. Para esse fim, o gel foi mantido na solução de nitrato de prata por 20 min. Após, foram realizadas três lavagens com água deionizada. As bandas foram reveladas em solução composta de carbonato de sódio, formaldeído e tiosulfato de sódio. Os géis também foram fotografados em *scanner* e ambas as imagens foram analisadas através do programa GelAnalyzer 2010a.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 são apresentados os géis dos tratamentos controle, sem adição da β -galactosidase, e isento de lactose corados pelas técnicas de Coomassie Brilliant Blue e nitrato de prata.

Figura 1 – Caracterização eletroforética (SDS-PAGE) das proteínas provenientes das bases lácteas e bebidas lácteas armazenadas a 4 ± 1 °C durante 21 dias.



Legenda: a) Tratamento controle sem hidrólise da lactose pela β -galactosidase revelado por Coomassie. b) Tratamento controle revelado por nitrato de prata. c) tratamento isento de lactose revelado por Coomassie. d) Tratamento isento de lactose revelado por nitrato de prata. PM = marcador de peso molecular. T0 = base láctea antes da fermentação. TF = base láctea após a fermentação. D1 a D21 = dias de armazenamento. Lf = lactoferrina. BSA = albumina sérica bovina. IgG = imunoglobulina G. α -CN = α -caseína. β -CN = β -caseína. β -LG = β -lactoglobulina. α -LA = α -lactalbumina. Setas (\leftarrow) nos géis revelados por nitrato de prata indicam as frações menores que 14,0 kDa.

Fonte: dados de pesquisa.

Nos géis dos tratamentos controle e isento de lactose corados por ambas as técnicas pode-se verificar a presença sutil das bandas proteicas de lactoferrina (Lf) com peso molecular de 76,1 kDa (FARRELL et al., 2004), albumina sérica (BSA) com 66,3 kDa (FARRELL et al., 2004) e IgG desnaturada com 50 kDa (CRUZ et al., 2016). Verificou-se que as amostras de

bases lácteas antes e após a fermentação (T0 e TF respectivamente) e as bebidas lácteas após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento (D1, D7, D14 e D21) de ambos os tratamentos apresentaram bandas características das proteínas do soro β -LG e α -LA com, aproximadamente, 18,3 kDa e 14,1 kDa, respectivamente (FARRELL et al., 2004), bem como das proteínas do leite α -caseína (α -CN) e β -caseína (β -CN). Embora a sexta revisão de nomenclatura das proteínas do leite de vaca mencione que a α -CN e a β -CN apresentem peso molecular de, aproximadamente, 25 kDa e 24 kDa, respectivamente (FARRELL et al., 2004), outros autores revelaram tais proteínas na faixa de, aproximadamente, 31 kDa (EGITO et al., 2007). Apesar das bebidas lácteas serem caracterizadas pelo uso do soro lácteo (BRASIL, 2011), a revelação das caseínas nos géis é referente à presença dessas proteínas no leite em pó utilizado no preparo das bases lácteas. Ainda, verifica-se para os períodos de amostragem T0, D14 e D21 de ambos os tratamentos, bandas bastante evidentes na região de maior mobilidade molecular (menor que 14,0 kDa), as quais foram identificadas por setas nos géis corados por nitrato de prata na Figura 1.

A presença de pequenas frações nas amostras de base láctea antes da fermentação (T0) na região inferior a 14 kDa é sugestiva da produção de peptídeos ainda no leite cru, no leite pasteurizado durante o armazenamento refrigerado pelas bactérias não destruídas pelo tratamento térmico, ou mesmo durante a produção do queijo. Também podem ter sido oriundos do leite em pó utilizado na preparação da base láctea.

Peptídeos podem surgir pela atividade das bactérias psicrótróficas do leite, as quais são caracterizadas por se multiplicarem em baixas temperaturas e possuírem atividade proteolítica. As proteinases produzidas por essa microbiota são termoestáveis, mantendo-se íntegras e ativas após o tratamento térmico (IZIDORO et al., 2013; ROWE et al., 2003). No presente estudo, o leite pasteurizado utilizado na produção do queijo para a obtenção do soro tratou-se de um leite comercial, normalmente produzido a partir de um leite cru refrigerado, o qual passa por um tratamento térmico que tem o propósito de minimizar a contaminação por microrganismos patogênicos do leite cru. A contagem padrão em placas do leite cru refrigerado deve ser de no máximo $7,5 \times 10^5$ UFC/ml e para um leite após o tratamento térmico do tipo pasteurizado, de no máximo $8,0 \times 10^4$ UFC/ml (BRASIL, 2011). Dessa forma, o tratamento térmico aplicado não garante a eliminação total das bactérias, nem das enzimas termorresistentes das bactérias psicrótróficas do leite cru, concluindo que estes microrganismos e enzimas permaneceriam ativos metabolicamente no leite pasteurizado até o momento da fabricação do queijo. Dessa forma, os peptídeos formados ao longo do período descrito seriam visíveis nos géis contendo as amostras de base láctea antes da fermentação.

Por outro lado, nos géis corados por nitrato de prata foi evidente a ausência de frações na região menor que 14 kDa para as bases lácteas no final da fermentação (TF) de ambos os tratamentos, controle e isento de lactose. Esta ausência pode ser explicada pela capacidade das bactérias lácticas utilizarem os peptídeos presentes no leite como fonte de nitrogênio para multiplicarem-se durante a fermentação (MATAR et al., 1996; PESCUMA et al., 2011). Estas enzimas foram bem caracterizadas para *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e esta atividade proteolítica também é clara para *Lactococcus lactis* e outras espécies de lactobacilos (PEREIRA et al., 2017).

No entanto, de acordo com os estudos de Donkor et al. (2007) e de Pereira et al. (2017), a cultura *Streptococcus thermophilus* continua a se multiplicar em substrato lácteo mesmo após o fim da fermentação, apresentando atividade proteolítica bem definida durante o armazenamento. Este aspecto pode ser observado nos géis corados por nitrato de prata do presente estudo, através do aumento da produção de frações proteicas na região de maior mobilidade molecular (menor que 14,0 kDa) nas amostras de bebidas lácteas controle e isenta de lactose, particularmente após 14 e 21 dias de armazenamento (D14 e D21, respectivamente).

Em relação às amostras coletadas no fim da fermentação (TF) e após a adição de polpa de *Syzygium cumini* no primeiro dia de armazenamento (D1), não foram verificadas diferenças evidentes quanto ao perfil proteico, uma vez que esta fruta é fonte principalmente de minerais, açúcares e vitaminas (AMAL et al., 2013). A quantidade de proteína fornecida por *Syzygium cumini* foi, portanto, insuficiente para modificar o perfil proteico das bebidas.

A técnica de revelação por nitrato de prata resultou em bandas mais intensamente coradas de modo geral. A coloração por nitrato de prata é bastante sensível, detectando concentrações na faixa de 0,1 ng de proteína, se comparada com a coloração por Coomassie Brilliant Blue, que detecta concentrações mais altas, de 30 a 10 ng de proteína (DAVIS, 2012; PATTON, 2002).

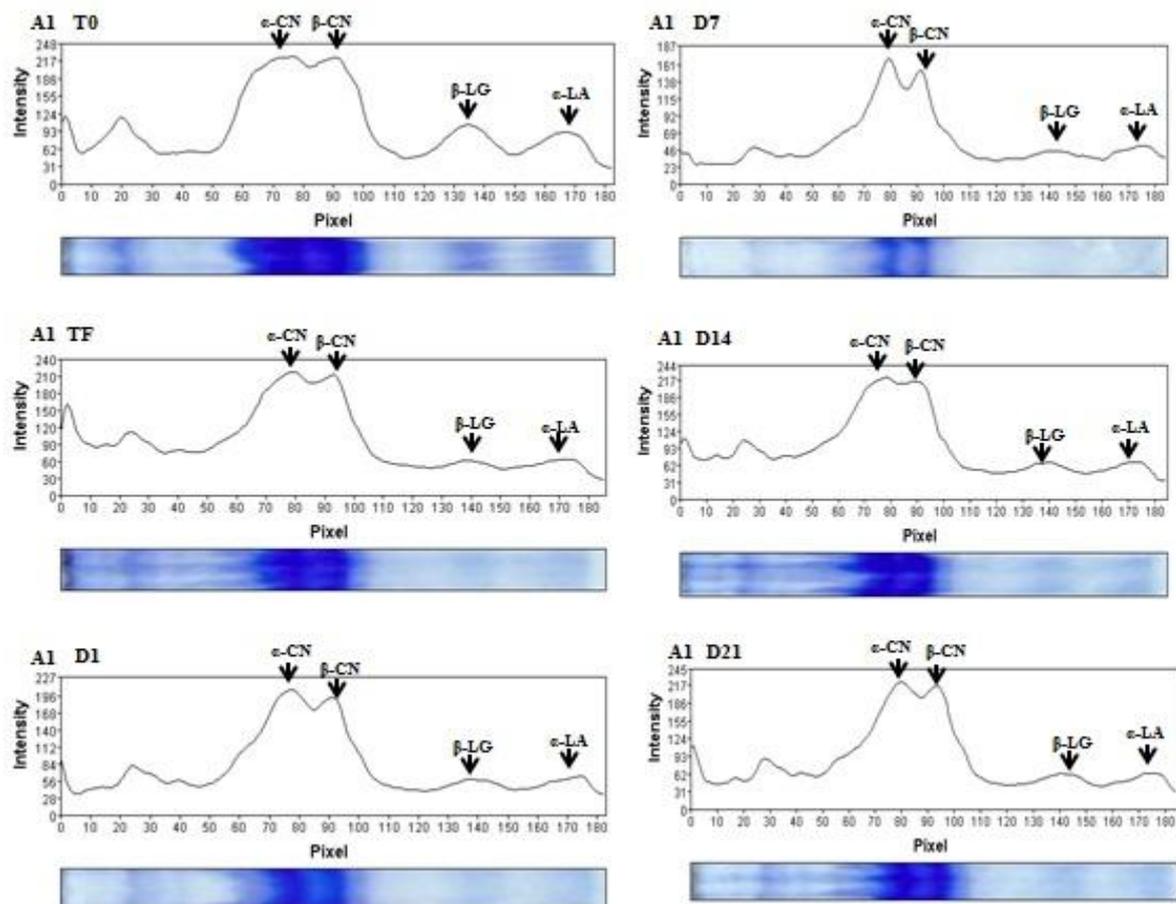
Para as bebidas isentas de lactose deste estudo, esperava-se a visualização da banda referente à β -galactosidase, principalmente no gel corado por nitrato de prata. No estudo de DaCosta et al. (2002) sobre a pesquisa de β -galactosidase a partir de SDS-PAGE e coloração por nitrato de prata, verificou-se a revelação desta enzima na região de peso molecular de 116 kDa. No entanto, o gel corado por tal técnica da bebida isenta de lactose deste estudo não apresentou banda característica para esta enzima na região em que foi encontrada por aqueles autores. Possivelmente, a concentração de β -galactosidase utilizada para a fabricação das bebidas isentas de lactose do presente estudo foi inferior aos limites de detecção dos métodos de coloração utilizados.

Outra característica observada nos géis corados tanto por Coomassie Brilliant Blue como por nitrato de prata é a ocorrência de bandas não esperadas no padrão proteico (PM) após a

revelação. O motivo deste fato é explicado pelo uso de padrões comerciais não totalmente puros, cuja informação é apontada em seus respectivos rótulos. Os padrões compreenderam IgG, α -LA e β -LG com $\geq 80\%$, $\geq 85\%$ e $\geq 90\%$ de pureza, respectivamente.

Os densitogramas dos géis corados por Coomassie Brilliant Blue são apresentados nas Figuras 2 e 3 para os tratamentos controle e isento de lactose, respectivamente.

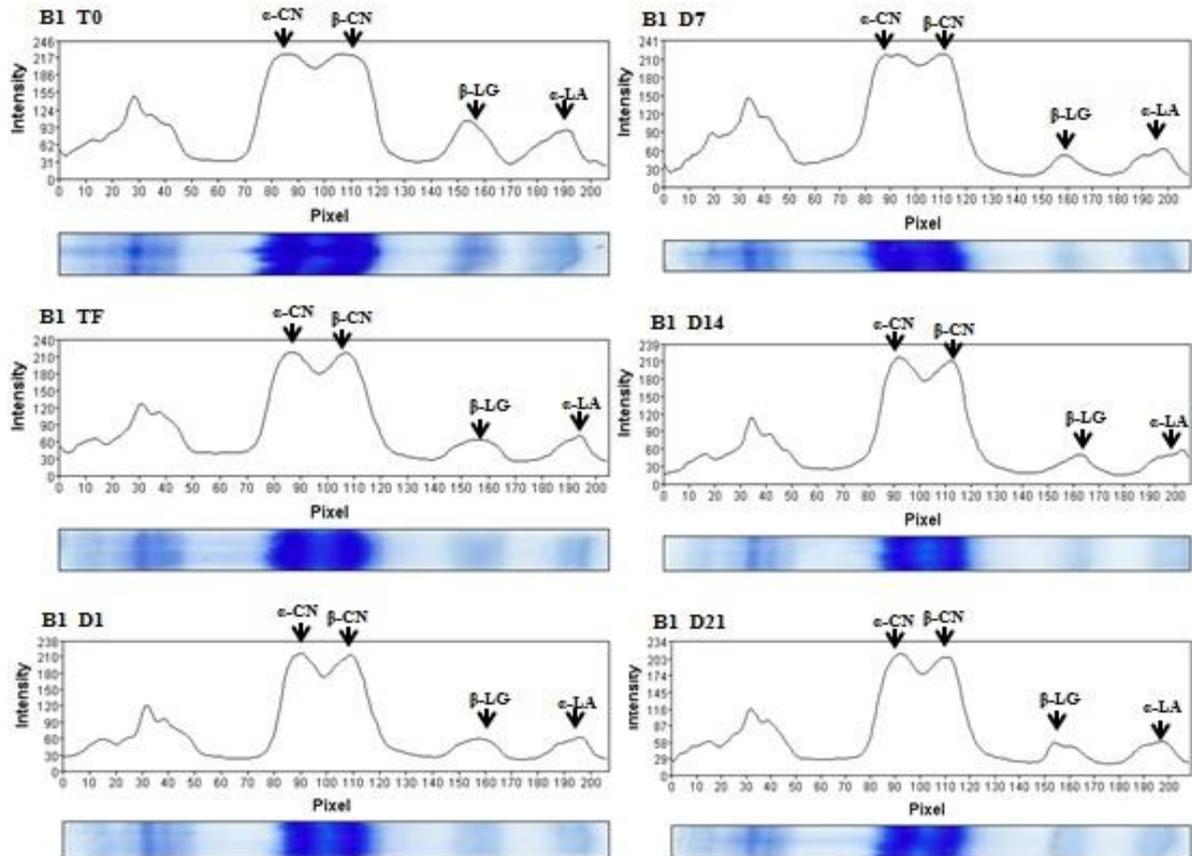
Figura 2 – Desintogramas analisados no programa GelAnalyzer a partir de imagens da caracterização eletroforética (SDS-PAGE) das proteínas provenientes das bases lácteas e bebidas lácteas armazenadas a 4 ± 1 °C durante 21 dias.



Legenda: A1 = tratamento controle sem hidrólise da lactose pela β -galactosidase revelado por Coomassie. T0 = base láctea antes da fermentação. TF = base láctea após a fermentação. D1 a D21 = dias de armazenamento. α -CN = α -caseína. β -CN = β -caseína. β -LG = β -lactoglobulina. α -LA = α -lactalbumina.

Fonte: dados de pesquisa.

Figura 3 – Desintogramas analisados no programa GelAnalyzer a partir de imagens da caracterização eletroforética (SDS-PAGE) das proteínas provenientes das bases lácteas e bebidas lácteas armazenadas a 4 ± 1 °C durante 21 dias.



Legenda: B1 = tratamento isento de lactose revelado por Coomassie. T0 = base láctea antes da fermentação. TF = base láctea após a fermentação. D1 a D21 = dias de armazenamento. α -CN = α -caseína. β -CN = β -caseína. β -LG = β -lactoglobulina. α -LA = α -lactalbumina.

Fonte: dados de pesquisa.

Apenas os densitogramas dos géis corados com Coomassie Brilliant Blue foram apresentados devido à melhor observação da proteólise das proteínas caseínas, β -LG e α -LA em comparação aos géis corados por nitrato de prata.

Foi observada, em ambos os tratamentos, redução da área correspondente às proteínas α -CN e β -CN no densitograma entre os períodos T0 e TF possivelmente devido à atividade proteolítica das bactérias lácticas adicionadas à formulação durante o processo fermentativo. Por outro lado, nas bebidas lácteas dos tratamentos controle e isento de lactose a área correspondente a tais proteínas no densitograma manteve-se sem modificações quando comparado à TF, exceto em D7 no tratamento controle, possivelmente devido à alíquotagem desta amostra. Uma vez que a atividade proteolítica das bactérias lácticas sobre as caseínas somente foi verificada durante a fermentação e não no

produto refrigerado, a estabilidade das caseínas avaliada pela técnica de SDS-PAGE poderia ser utilizada como marcador de uso adequado do armazenamento refrigerado para este tipo de produto. O acondicionamento incorreto do produto, fora da refrigeração, implicaria na degradação das caseínas, a qual seria identificada pela redução da área correspondente a estas proteínas no densitograma. Tal procedimento poderia ser utilizado em estudos futuros.

Do mesmo modo, foi verificada a degradação das proteínas β -LG e α -LA das amostras de base láctea de ambos os tratamentos entre o período anterior à fermentação (T0) e após a fermentação (TF) (Figura 2 para controle e Figura 3 para isenta de lactose). Pescuma et al. (2007) relata a capacidade de metabolismo de pelo menos uma ou ambas as proteínas β -LG e α -LA por *Streptococcus thermophilus* CRL 804, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 454 e *Lactobacillus acidophilus* CRL 636 em meio quimicamente definido contendo lactose e outros nutrientes.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que adição de polpa de jambolão (*Syzygium cumini*) e da enzima β -galactosidase não interferiu no perfil proteico de bebidas lácteas produzidas com a cocultura de *Lactobacillus mucosae* CNPC 007 e *Streptococcus thermophilus* TA40.

A presença de frações proteicas de alta mobilidade molecular (menor que 14,0 kDa) antes da fermentação pode estar associada aos ingredientes empregados na produção do queijo para a obtenção do soro, como o coagulante utilizado e o leite pasteurizado, sendo este último possível fonte de enzimas termorresistentes de bactérias psicotróficas e de bactérias lácticas proteolíticas.

A ausência de frações de maior mobilidade molecular na base láctea no final da fermentação estaria possivelmente associada à necessidade de utilização de peptídeos como mecanismo de multiplicação bacteriana para a produção de ácido láctico. A degradação das proteínas α -CN, β -CN, β -LG e α -LA ao longo do processo fermentativo, verificada nos densitogramas, também estariam associados à atividade proteolítica da cocultura, com produção de peptídeos que também teriam sido consumidos ainda durante a fermentação.

A presença de frações proteicas menores que 14,0 kDa ao final do armazenamento confirmam a atividade metabólica das bactérias lácticas da cocultura nas bebidas estudadas mantidas sob refrigeração por 21 dias. Por outro lado, as caseínas não são alteradas neste tipo de produto em função do armazenamento refrigerado.

A técnica de coloração por Coomassie Brilliant Blue foi a mais apropriada para a obtenção dos densitogramas que permitiram a melhor visualização da proteólise das proteínas durante a fermentação das bases lácteas e estabilidade das caseínas durante o armazenamento refrigerado das bebidas lácteas.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 136, de 8 de fevereiro de 2017. Requisitos para declaração obrigatória da presença de lactose nos rótulos dos alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 9 fev. 2017. Seção 1, p. 44.
- ALMEIDA, C. C.; JÚNIOR, C. A. C.; SILVA, A. C. O.; ALVARES, T. S. Proteína do soro do leite: composição e suas propriedades funcionais. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 9, n. 16, p. 1840-1854, 2013.
- AMAL, A.; ALI, S. I.; EL-BAZ, F. K. Antioxidant and antibacterial activities of crude extracts and essential oils of *Syzygium cumini* leaves. **Plos One**, Eavst Grinstead, v. 8, n. 4, p. e60269, 2013.
- ANEMA, S. G. The use of “lab-on-a-chip” microfluidic SDS electrophoresis technology for the separation and quantification of milk proteins. **International Dairy Journal**, Barking, v. 19, n. 4, p. 198-204, 2009.
- ARORA, T.; SINGH, S.; SHARMA, R. K. Probiotics: interaction with gut microbiome and antiobesity potential. **Nutrition**, Massachusetts, v. 29, p. 591-596, 2013.
- ASHWELL, M. Concepts of functional food. **Nutrition & Food Science**, Bradford, v. 34, n. 1, p. 47, 2004.
- ATHANASIADIS, I.; PARASKEVOPOULOU, A.; BLEKAS, G.; KIOSSEOGLOU, V. Development of a novel whey beverage by fermentation with kefir granules. Effect of various treatments. **Biotechnology Progress**, Washington, v. 20, n.4, p. 1091- 1095, July/ Aug. 2004.
- AZEVEDO, P. O. S.; ALIAKBARIAN, B.; CASAZZA, A. A.; LEBLANC, J.G.; PEREGO, P.; OLIVEIRA, R. P. S. Production of fermented skim milk supplemented with different grape pomace extracts: effect on viability and acidification performance of probiotic cultures. **Pharma Nutrition**, Amsterdam, v. 6, p. 64-68, 2018.
- AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P.; IGNACIMUTHU, S. *Syzygium cumini* (L.) Skeels, a novel therapeutic agent for diabetes: folk medicinal and pharmacological evidences. **Complementary Therapies in Medicine**, New York, v. 21, p. 232-243, 2013.
- BANDIERA, N. S.; CARNEIRO, I. ; SILVA, A. S.; HONJOYA, E. R.; SANTANA, E. H. W.; ARAGON-ALEGRO, L. C.; SOUZA, C. H. B. Viability of probiotic *Lactobacillus casei* in yoghurt: defining the best processing step to its addition. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 63, n. 1, p. 58-63, 2013.
- BAGCHI, B.; BAGCHI, M. Free radical scavenging, antioxidant and cancer chemoprevention by grape seed proanthocyanidin: an overview. **Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, New York, v. 768, p. 69-73, Oct. 2014.

BELGACEM, Z. B.; ABRIQUEL, H.; OMAR, N.; LUCAS, R.; MARTINEZ-CANAMERO, M.; GALVEZ, A.; MANAI, M. Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. **Food Control**, Amsterdam, v. 21, p. 462-470, 2010.

BEZERRA, M. F. **Polpa de jambolão (*Eugenia jambolana* Lam.) fresca e desidratada: características físico-químicas, bioativas e funcionais, efeitos biológicos em *Caenorhabditis elegans* e uso para produção de frozen yogurt caprino probiótico.** 2015. 195f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, 2015.

BEHARE, P.; KUMAR, H.; MANDAL, S. Y Yogurt: yogurt based products. In: **ENCYCLOPEDIA of food and health.** [Amsterdam]: Elsevier, 2016. p. 625-631. (Reference Module in Food Science).

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. **Food Research International**, Amsterdam, v.35, n.2/3, p.125-131, 2002.

BOLUDA, I. K.; CAPILLA, I. V. Consumer attitudes in the election of functional foods. **Spanish Journal of Marketing**, Barcelona, v.21, p. 65-79, 2017.

BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. **Food Research International**, New York, v. 73, p. 149-161, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 62, de 29 de dezembro de 2011. Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado, o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite pasteurizado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da União**, 30 dez. 2011. Seção 1, p. 65.

BRAMMER, S. P. **A técnica de eletroforese: importância e aplicações em análises genéticas.** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2001. (Documentos Online, 6). Disponível:<http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do06.htm>. Acesso em: 23 maio 2018.

BROWN-ESTERS, O.; NAMARA, P. MC.; SAVAIANO, D. Dietary and biological factors influencing lactose intolerance. **International Dairy Journal**, Barking, v. 22, p. 98-103, 2012.

CARVALHO, B. M. A. **Deteção de soro de queijo em leite por espectrofotometria no infravermelho médio.** 2007. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2007.

CARMINATTI, C. A. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase *Kluyveromyces lactis*.** 2001. 66 f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

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

CHASE, M. W.; REVEAL, J. L. A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 161, n. 2, p. 122–127, 2009.

CHAUDHARY, B.; MUCHOPADHYAY, K. *Syzygium cumini* (L.) skeels: a potential source of nutraceuticals. **International Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, Rewa, v. 2, n. 1, p. 43-53, Jan./ Mar. 2012.

CHEN, X.; YANG, G.; SONG, J. H.; XU, H.; LI, D.; GOLDSMITH, J.; ZENG, H.; PARSONS-WINGERTE, P. A.; REINECKER, H. C.; KELLY, C. P. Probiotic yeast inhibits VEGFR signaling and angiogenesis in intestinal inflammation. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 5, p. e64227, 2013.

CRUZ, T. K. T.; LASSEN, M. F. M.; OLIVEIRA, I. R.; TISSOT-SQUALLI, M. L. Perfil eletroforético de proteínas de leite bovino *in natura* e industrializado. In: XXIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2016, Rio Grande do Sul. Anais..., Rio Grande do Sul: UNIJUI, 2016. Modalidade: relatório técnico- científico.

DACOSTA, N.; FOWLER, S.; GERMANN, P.; LAM, M.; VICTOR, R. Quantitative assessment of the effect of glucose, lactose and sucrose on the production of β -galactosidase. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology**, Vancouver, v. 2, p. 124-129, 2002.

DAVIS, R. A. H. **Aspectos proteômicos e determinação de elementos-traço em bÍlis de peixe: potencial marcador biológico de exposição ambiental?**. 2012. 139 f. Tese (Doutorado em Química). Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

DE VRESE, M.; STEGELMANN, A.; RICHTER, B.; FENSELAU, S.; LAUE, C.; SCHREZENMEIR, J. Probiotics: compensation for lactase insufficiency. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 73, n. 2, p. 421S–429S. mar. 2001.

DIXIT, Y.; WAGLE, A.; VAKIL, B. Patents in the field of probiotics, prebiotics, synbiotics: a review. **Journal of Food: Microbiology, Safety & Hygiene**, Tokyo, v. 1, n. 1, p. 1-13, 2016.

DONKOR, O. N.; HENRIKSSON, A.; SINGH, T. K.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. ACE inhibitory activity of probiotic yoghurt. **International Dairy Journal**, Barking, v. 17, n. 11, p. 1321–1331, 2007.

DONKOR, O. N. **Influence of probiotic organisms on release of bioactive compounds in yoghurt and soy yoghurt**. 2007. 253f. Ph. D. Thesis. Victoria University, [Melbourne], 2007.

DRGALIC, I.; TRATNIK L, L.; BOZANIC, R. Growth and survival of probiotic bacteria in reconstituted whey. **Lait**, Londres, v. 85, p. 171–179, 2005.

EALES, J.; GIBSON, P.; WHORWELL, P.; KELLOW, J.; YELLOWLEES, A.; PERRY, R. H. J.; EDWARDS, M.; KING, S.; HANNAH, W.; GLANVILLE, J. Systematic review and meta-analysis: the effects of fermented milk with *Bifidobacterium lactis* CNCM I-2494 and lactic acid bacteria on gastrointestinal discomfort in the general adult population.

Therapeutic Advances in Gastroenterology, London, v.10, n.1, p. 74-88, 2017.

EGITO, A. S.; GIRARDET, J. M.; LAGUNA, L. E.; POIRSON, C.; MOLLÉ, D.; MICLO, L.; HUMBERT, G.; GAILLARD, J. L. Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine *k*-casein. **International Dairy Journal**, Barking, v. 17, p. 816-825, 2007.

FARRELL, H. M.; JIMENEZ-FLORES, R.; BLECK, G.T; BROWN, E. M.; BUTLER, J. E.; CREAMER, L. K.; HICKS, C. L.; HOLLAR, C. M.; NG-KWAI-HANG, K. F.; SWAISGOOD, H. E. Nomenclature of the proteins of cows' milk: sixth revision. **Journal Dairy Science**, Oxford, v. 87, p. 1641–1674, 2004.

FLORENTINO, E. R. **Produção de queijo coalho com leite pasteurizado**. Campina Grande: UEPB, 1997.

FOGAÇA, G. N. **Utilização de eletroforese microfluídica na detecção da adição de soro de queijo em leite cru, pasteurizado, UHT e em pó**. 2017. 71 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados). Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017.

FREITAS, E. R.; FERNANDES, D. R.; SOUZA, D. H.; DANTAS, F. D. T.; SANTOS, R. C.; OLIVEIRA, G. B.; CRUZ, C. E. B.; BRAZ, N. M.; CÂMARA, L. F.; NASCIMENTO, G. A. J.; WATANABE, P. H. Effect of *Syzygium cumini* leaves on laying hens performance and egg quality. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, Rio de Janeiro, v. 89, p. 2479-2484, 2017.

GERNIGNON, G.; SCHUCK, P.; JEANTET, R. Processing of Mozzarella cheese wheys and stretchwaters: a preliminary review. **Dairy Science and Technology**, Boca Raton, v. 90, p. 27-46, 2010.

GRAN, H. M.; GADAGA, H. T.; NARVHU, J. A. Utilization of various starter cultures in the production of Amasi, a Zimbabwean naturally fermented raw milk product. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 88, p. 19-28, 2003.

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

HILL, M. J. Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. **European Journal of Cancer Prevention: The Official Journal of The European Cancer Prevention Organization (ECP)**, v. 6, p. 43–45, 2014.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B. MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEM, S.; CALDER, P. C.; HOSADA, M.; HASHIMOTO, H.; HE, F.; MORITA, H.; HOSONO, A. Effect of administration of milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* LA-2 on fecal mutagenicity and microflora in human intestine. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, p. 745-749, 1996.

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

HE, T.; PRIEBE, M. G.; HARMSSEN, H. J.; STELLAARD, F.; SUN, X.; WELLING, G. W.; VONK, R. J. Colonic fermentation may play a role in lactose intolerance in humans. **Journal of Nutrition**, Damstadt, v. 136, p. 58-63, 2006.

Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Rome: FAO, 2001.

ISLAM, S. U. Clinical uses of probiotics. **Medicine**, [Baltimore], v. 95, p. 1-5, 2016.

IZIDORO, T. B.; PEREIRA, J. G.; SOARES, V. M.; SPINA, T. L. B.; PINTO, J. P. A. N. Atividade proteolítica de bactérias psicotróficas em leites estocados em diferentes temperaturas. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n. 4, p. 452-457, jul./ ago. 2003.

JACOBUCCI, H. B. **Propriedades nutritivas e funcionais fisiológicas de algumas proteínas alimentícias**. 2010. 183 f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

JÄRVELÄ, I.; TORNIAINEN, S.; KOLHO, K. L. Molecular genetics of human lactase deficiencies. **Annals of Medicine**, Philadelphia, v. 41, n. 8, p. 568-575, 2009.

JI, T.; HAUQUE, Z. U. Cheddar whey processing and source: I. Effect on composition and functional properties of whey protein concentrates. **International Journal of Food Science & Technology**, London, v. 38, n. 4, p. 453-461, 2003.

GUIDANCE on the scientific requirements for health claims related to the gastro-intestinal tract, the immune system, and defence against pathogenic microorganisms. **Journal of the European Food Safety Authority**, Parma, 1984. v. 14, n. 1, p. e4369, 18 Jan. 2016.

KANDYLIS, P.; PISSARIDI, K.; BEKATOROU, A.; KANELLAKI, M.; KOUTINAS, A. A. Dairy and non-dairy probiotic beverages. **Current Opinion in Food Science**, Guelph, v. 7, p. 58-63, 2016.

KERRY, R. G.; PATRA, J. K.; GOUDA, S.; PARK, Y.; SHIN, H. S.; DAS, G. Benefaction of probiotics for human health: A review. **Journal of Food and Drug Analysis**, Amsterdam, v. 1, p. 1-13, 2018.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 3, p.331-347, jul./set. 2008.

- KOBYLIAK, N.; CONTE, C.; CAMMAROTA, G.; HALEY, A. P.; STYRIAK, I.; GASPAR, L.; FUSEK, J.; KRUZLIAK, P. Probiotics in prevention and treatment of obesity: a critical view. **Nutrition & Metabolism**, London, v. 13, p. 1-13, 2016.
- KHAN, S. U. Probiotics in dairy food: a review. **Nutrition & Food Science**, London, v. 44, p. 71-88, 2014
- KRISSANSEN, G. W. Emerging health properties of whey proteins and their clinical implications. **Journal of the American College of Nutrition**, Clearwater, v. 26, n. 6, p. 713S-723S, 2007.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature: International Journal of Science**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LEROY, F.; VERLUYETEN, J.; DE VUYST, L. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 106, n. 3, p. 270-285, 2006.
- MATAR, C.; AMIOT, J.; SAVOIE, L.; GOULET, J. The effect of milk fermentation by *Lactobacillus helveticus* on the release of peptides during In vitro digestion. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, n. 6, p. 971-979, 1996.
- MATSUMOTO, H.; SHIMOKAWA, Y.; USHIDA, Y.; TOIDA, T.; HAYASAWA, H. New biological function of bovine alpha-lactalbumin: protective effect against ethanol- and stress-induced gastric mucosal injury in rats. **Journal Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Oxford, v. 65, n. 5, p. 1104-1111, 2011.
- MARSH, A. J.; HILL, C.; ROOS, R. P.; COTTER, P. D. Fermented beverages with health-promoting: past and future perspectives. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 38, p. 113-124, 2014.
- MARTINEZ, R. C. R.; BEDANI, R.; SAAD, S. M. I. Scientific evidence for health effects attributed to the consumption of probiotics and prebiotics: an update for current perspectives and future challenges. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 114, p. 1993-2015, 2015.
- MEURER, V. M. **Estudo comparativo das técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida ureia-page e lab-on-a-chip para detecção de fraude do leite de cabra pela adição de leite bovino**. 2014. 94 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados). Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2014.
- MIZUBUTI, I. Y. Soro de leite: composição, processamento e utilização na alimentação. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 15, n. 1, p. 80-94, 1994.
- MOTTA, A. S.; GOMES, M. S. M. Technological and functional properties of lactic acid bacteria: the importance of these microorganisms for food. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 70, n. 3, p. 172-184, May./ June 2015.
- MOZZY, F. F.; RAYA, R. R.; VIGNOLO, G. M. **Biotechnology of lactic acid bacteria novel applications**. Ames: Wiley-Blackwell, 2010. 408p.

NAIR, L. K.; BEGUM, M.; GEETHA, S. *In vitro* antioxidant activity of the seed and leaf extracts of *syzygium cumini*. **Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology**, Detroit, v. 7, n. 1, p. 54-62, Nov./ Dec. 2013.

NAKANO, T.; OZIMEK, L. Purification of glycomacropeptide from caseinate hydrolysate by gel chromatography and treatment with acidic solution. **Journal of Food Science: an Official Publication of the Institute of Food Technologists**, Chicago, v. 65, n.4, p. 588-590, 2000.

NINESS, K.R. Inulin and oligofructose: what are they? **Journal of Nutrition**, Darmstadt, v. 129, n.7, p. 1402S-1406S, 1999.

NUSSINOVITCH, A.; CHAPNIK, N.; GAL, J.; FROY, O. Delivery of lactase using chocolate-coated agarose carriers. **Food Research International**, London, v. 46, p. 41–45, 2012.

NGUYEN, H. T.; TRUONG, D. H.; KOUHOUNDE, S.; LY S.; RAZAFINDRALAMBO, H.; DELVIGNE, F. Biochemical engineering approaches for increasing viability and functionality of probiotic bacteria. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 17, n. 6, p. 1-18, 2016.

ONYENWEAKU, F.; OBEAGU, E. I.; IFEDIORA, A. C.; NWANDIKOR, U. U. Health benefits of probiotics. **International Journal of Innovative Applied Research**, Morocco, v. 4, p. 21-30, 2016.

OOMAH, B. D.; CARDADOR-MARTÍNEZ, A.; LOARCA-PIÑA, G. Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 85, n. 6, 2005.

PATTON, W. F. Detection technologies in proteome analysis. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 771, p. 3-31, 2002.

PESCUMA, M.; HÉBERT, E. M.; BRU, E.; VALDEZ, G. F.; MOZZI, F. Diversity in growth and protein degradation by dairy relevant lactic acid bacteria species in reconstituted whey. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 79, p. 201-208, 2011.

PESCUMA, M.; HÉBERT E. M.; MOZZI, F.; FONT DE VALDEZ, G. Hydrolysis of whey proteins by *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium. **Journal of Applied Microbiology**, Berlin, v. 103, n. 5, p. 1738–1746, 2007.

PEREIRA, A. M. S.; FARIAS, D. R. B.; QUEIROZ, B. B.; NOBRE, M. S. C.; CAVALCANTI, M. T.; SALLES, H. O.; SANTOS, K. M. O.; MEDEIROS, A. C. D.; PEREIRA, G. A.; GENARO, P. S.; PINHEIRO, M. M.; SZEJNFELD, V. L.; MARTINI, L. A. Cálcio dietético – estratégias para otimizar o consumo. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 49, n. 2, p. 164-80, 2009.

QIN, J.; LI, R.; RAES, J., et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature: International Journal of Science**, London, v. 464, p. 59–65, 2010.

QUADRONI, M.; JAMES, P. Proteomics and automation. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 20, p. 664-677, 1999.

RAVI, K.; RAMACHANDRAN, B.; SUBRAMANIAN, S. Protective effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on tissue antioxidants in streptozotocin-induced diabetic rats.

Biological & Pharmaceutical Bulletin, Rockville, v. 27, n. 8, p. 1212-1217, 2004.

RAMYA, S.; NEETHIRAJAN, K.; JAYAKUMARARAJ, R. Profile of bioactive compounds in *Syzyum cumini*: a review. **Journal of Pharmacy Research**, Mandasur, v. 5, n. 8, p. 4548-4553, 2012.

RENHE, I.R.T. O papel do leite na nutrição. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 63, n. 363, p. 36-43, 2008.

RIVERA-ESPINOZA, Y. ;GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiology**, Cambridge, v. 27, p. 1-11, 2010.

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

ROBERFROID, M.B. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, Rome, v. 34, n. 2, p. S105-S110, 2002.

ROUND, J.L.; MAZMANIAN S.K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nature Reviews: Immunology**, London, v. 9, p. 313–323, 2009.

ROSSETTO, B. P.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Determinação da atividade da enzima β -galactosidase por lactose do soro de queijo. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, Londrina, v. 1, n. 2, p.28-32, jul./dez. 2010.

ROWE, M.T.; DUNSTALL, G.; KILPATRICK, D.; WISDOM, G. B. Effect of growth phase on the subsequent growth kinetics of psychrotrophic bacteria of raw milk origin. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 56, p. 35–38, 2003.

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

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

SANDERS, M.E.; HEIMBACH, J.T.; POT, B.; TANCREDI, D.J.; LENOIR-WIJNKOOP, I.; LÄHTEENMÄKI-UUTELA, A.; GUEIMONDE, M.; BAÑARES, S. Health claims substantiation for probiotic and prebiotic products. **Gut Microbes**, Austin, v. 2, n. 3, 2011.

SANDERS, M. E.. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Consensus statements. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, London, v. 11, p. 506-514, Aug., 2014.

- SAULNIER, D.M.; KOLIDA, S.; GIBSON, G.R. Microbiology of the human intestinal tract and approaches for its dietary modulation. **Current Pharmaceutical Design**, Hilversum, v. 15, p. 1403–1414, 2009.
- SANTONOCITO, C.; SCAPATICCI, M.; GUARINO, D.; ANNICCHIARICO, E. B.; LISCI, R.; PENITENTE, R.; GASBARRINI, A.; ZUPPI, C.; CAPOLUONGO, E. Lactose intolerance genetic testing: Is it useful as routine screening? Results on 1426 south–central Italy patients. **Clinica Chimica Acta**, New York, v. 439, p. 14-17, 2015.
- SANTOS, M.J.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. Fractionation and recovery of whey proteins by hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 879, p. 475-479, 2011.
- SGARBIERI, V. C. Revisão: propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 8, n. 1, p. 45-56, jan./ mar. 2005.
- SGARBIERI, V. C. Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.
- SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, Barking, v. 17, n. 11, p. 1262–1277, 2007.
- SHAH, N.P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, p. 894-907, 2000.
- SINGH, H. Functional properties of milk proteins. In: REFERENCE module in food science. [Amsterdam]: Elsevier, 2016. p 887-893, 2016.
- SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technology**, New York, v. 57, n. 1, p. 1-11, 1996.
- SIMPSON, K.J.; NICHOLAS, K.R. The comparative biology of whey proteins. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, Dordrecht, v.7, n. 3, p. 313-326, July 2002.
- SIMRÉN, M.; BARBARA, G.; FLINT, H. J.; SPIEGEL, B. M. R.; SPILLER, R.C.; VANNER, S.; VERDU, E. F.; WHORWELL, P. J.; ZOETENDAL, E. G. Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report. **Gut: Official Journal of the British Society of Gastroenterology**, London, v. 62, n. 1, p. 159-176, 2013.
- SIMOVA, E. D.; BESHKOVA, D.B.; DIMITROV, ZH. P. Characterization and antimicrobial spectrum of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian dairy products. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.106, p. 692–701, 2009.
- SORNPLANG, P; PIYADEATSOONTORN, S. Probiotic isolates from unconventional sources: a review. **Journal Animal Science and Technology**, Bogor, v. 58, 19 July 2016.
- SMITHERS, G. W. Whey and whey proteins – from ‘gutter-to-gold’. **International Dairy Journal**, Barking, v. 18, p. 695-704, 2008.

STEFANO, M. D.; VENETO, G.; MALSERVISI, S.; CECCHETTI, L.; MINGUZZI, L.; STROCCHI, A.; CORAZZA, G. R. Lactose malabsorption and intolerance and peak bone mass. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 122, p. 1793-1799, 2002.

SUN-WATERHOUSE, D.; SIVAM, A.S. ; COONEY, J.; ZHOU, J. ; PERERA, C.O. ; WATERHOUSE, G.I.N. Effects of added fruit polyphenols and pectin on the properties of finished breads revealed by HPLC/LC-MS and size-exclusion HPLC, **Food Research International**, Essex, v. 44, p. 3047–3056, 2011.

SWAMI, S. B.; THAKOR, N. S. J.; PATIL, M. M.; HALDANKAR, P. M. Jamun (*Syzygium cumini* (L.): a review of its food and medicinal uses. **Food and Nutrition Sciences**, Irvine, v. 3, p. 1100-1117, 2012.

TAKAFUJI, S.; IWASAKI, T.; SASAKI, M.; TAN, P. S. T. Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. **Developments in Food Science**, Amsterdam, v. 37, p. 753-767, 1995.

TEJERO-SARIÑENA, S.; BARLOW, J.; COSTABILE, A.; GIBSON, G. G.; ROWLAND, I. Antipathogenic activity of probiotics against *Salmonella* Typhimurium and *Clostridium difficile* in anaerobic batch culture systems: Is it due to synergies in probiotic mixtures or the specificity of single strains?. **Anaerobe**, Bielefeld, v. 24, p. 60-65, 2013.

THIPPESWAMY, N.B.; ACHUR, R.N. Antioxidant and antibacterial properties of phenolic extract from *Carum carvi* L. **Journal of Pharmacy Research**, Hoboken, v. 7, n. 4, p.352-357, 2013.

TOMAL, A. A. B., CUNHA, M. E. T., BOSSO, A., YOUSSEF, E. Y. e SUGUIMOTO, H. H. Avanços tecnológicos na obtenção, purificação e identificação de galactoligossacarídeos e estudo de suas propriedades prebióticas. **UNOPAR Científica: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 12, n. 4, p. 41-49, 2010.

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 9, p. 225-241, 2014.

TULLIO, L. T. **Isolamento e caracterização do glicomacropéptido do soro de leite**. 2007. 81 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

VANDENPLAS, Y.; HUYS, G.; DAUBE, G. Probiotics: an update. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 1, p. 6-21, 2015.

VEIGAS, J. M.; NARAYAN, M. S.; LAXMAN, P. M.; NEELWARNE, B. Chemical nature, stability and bioefficacies of anthocyanins from fruit peel of *syzygium cumini* Skeels. **Food Chemistry**, Berlin v. 105, p. 619-627, 2007.

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

VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Research International**, Essex, v. 36, p. 895-904, 2003.

WESTERMANN, C.; GLEINSER, M.; CORR, S.C.; RIEDEL, C. U. A critical evaluation of Bifidobacterial adhesion to the host tissue. **Frontiers Microbiology**, Lausanne, v. 7, p. 1-8, 2016.

ZHANG, Y.; ZHONG, Q. Freeze-dried capsules prepared from emulsions with encapsulated lactase as a potential delivery system to control lactose hydrolysis in milk. **Food Chemistry**, Berlin, v. 241, p. 397-402, 2018.

ZHU, Z.; LU, J. J.; LIU, S. Protein separation by capillary gel electrophoresis: A review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 709, p. 21-31, 2012.

ZIEGLER, F.L.F.; SGARBIERI, V.C. Caracterização químico-nutricional de um isolado proteico de soro de leite, um hidrolisado de colágeno bovino e misturas dos dois produtos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 22, n.1, p. 61-70, jan./ fev. 2009.

ZOTTA, T.; PARENTE, E.; RICCIARDI, A. Viability staining and detection of metabolic activity of sourdough lactic acid bacteria under stress conditions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 25, n. 6, p. 1119-1124, 2009.