



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I - CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA**

ALÍCIA SANTOS DE MOURA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL PROTEICO DE QUEIJO CAPRINO OBTIDO POR
COAGULAÇÃO VEGETAL ADICIONADO DE BACTÉRIA LÁTICA NATIVA
POTENCIALMENTE PROBIÓTICA**

CAMPINA GRANDE

2021

ALÍCIA SANTOS DE MOURA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL PROTEICO DE QUEIJO CAPRINO OBTIDO POR
COAGULAÇÃO VEGETAL ADICIONADO DE BACTÉRIA LÁTICA NATIVA
POTENCIALMENTE PROBIÓTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Estadual da Paraíba como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Farmácia.

Área de concentração: Bromatologia

Orientadora:

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

CAMPINA GRANDE

2021

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.

M929a Moura, Alicia Santos de.

Avaliação do perfil proteico de queijo caprino obtido por coagulação vegetal adicionado de bactéria láctica nativa potencialmente probiótica [manuscrito] / Alicia Santos de Moura. - 2021.

37 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2021.

"Orientação : Profa. Dra. Flávia Carolina Alonso Buriti, Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS."

1. Alimento funcional. 2. Coagulantes vegetais. 3. Proteínas. 4. Lácteos caprinos. I. Título

21. ed. CDD 630

ALÍCIA SANTOS DE MOURA

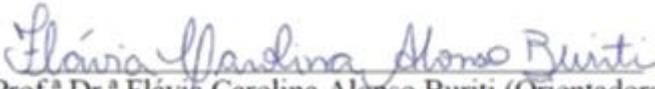
AVALIAÇÃO DO PERFIL PROTEICO DE QUEIJO CAPRINO OBTIDO POR
COAGULAÇÃO VEGETAL ADICIONADO DE BACTÉRIA LÁTICA NATIVA
POTENCIALMENTE PROBIÓTICA

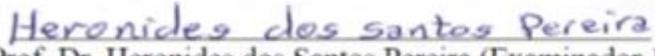
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Estadual da Paraíba como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Farmácia.

Área de concentração: Bromatologia

Aprovada em: 13/10/2021.

BANCA EXAMINADORA


Prof.ª Dr.ª Flávia Carolina Alonso Buriti (Orientadora)
DF/CCBS
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Prof. Dr. Heronides dos Santos Pereira (Examinador 1)
DF/CCBS
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Dr.ª Márcia Mafra Cândido da Silva (Examinador 2)
Núcleo Regional do Nordeste/ Embrapa Caprinos e Ovinos
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

À minha família, por todo apoio, força
e companheirismo, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda força que me fez chegar até o fim.

À minha família, por todo apoio, companheirismo e incentivo. Especialmente à minha mãe, Clarice, e minha tia, Claudenizia, que sempre me ajudaram nos momentos difíceis.

Aos meus amigos, Viviane, por toda ajuda e apoio, à Anna Júlia, por ter sido uma excelente amiga desde o dia que a conheci, à Thaynara, Milena e Mariana por terem feito desta uma jornada feliz na minha vida.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Flávia Carolina Alonso Buriti, por ter sido uma orientadora excepcional, por todas as vezes que precisei do seu auxílio nos experimentos, por todos os ensinamentos.

Ao Dr. Antônio Silvío do Egito do Núcleo Regional Nordeste da Embrapa Caprinos e Ovinos por colaborar com o projeto para a obtenção do coagulante vegetal e dos queijos, bem como, por todas as dicas de adaptações e aperfeiçoamentos para as minhas análises. Ao seu coorientando de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF/UEPB) Dôrian Cordeiro Lima Júnior, orientando da Prof.^a Dr.^a Flávia Carolina Alonso Buriti, e novamente à Viviane, bolsista de iniciação científica da mesma orientadora.

À Dr.^a Karina Maria Olbrich dos Santos, da Embrapa Agroindústria de Alimentos, pela investigação do potencial probiótico e disponibilização da cepa *L. mucosae* CNPC007.

À Terezinha Duarte e à Dr.^a Márcia Maria Cândido da Silva por todo apoio e colaboração prestados.

À Joyceana Correia, por ter ido ao laboratório comigo e passar-me os seus conhecimentos práticos sobre a técnica de eletroforese.

À banca examinadora, Prof. Dr. Heronides dos Santos Pereira e, novamente, Dr.^a Márcia Maria Cândido da Silva, por ter aceito o convite para fazer parte deste momento importante e encerrar mais uma etapa da graduação.

RESUMO

Em função do aumento do consumo de queijos e da necessidade de busca de meios alternativos para a fabricação deste produto, surgiu a demanda por sua obtenção através de coagulação vegetal. Sementes de girassol (*Helianthus annuus*) apresentam atividade coagulante no leite de cabra, além de ser fonte de compostos bioativos, que e em conjunto com o uso de probióticos na fabricação de queijos, como a cepa CNPC007 de *Limosilactobacillus mucosae*, a qual exibiu uma elevada taxa de sobrevivência em condições gástricas e entéricas simuladas em estudos anteriores, poderá originar um alimento funcional, capaz de trazer efeitos benéficos à saúde do consumidor. O objetivo do presente projeto foi avaliar o perfil proteico de queijo produzido com o extrato de sementes de *H. annuus* e a adição da cepa nativa com potencial probiótico *L. mucosae* CNPC007 pertencente à coleção de bactérias lácticas da EMBRAPA, em comparação a um queijo controle, com extrato de *H. annuus*, mas sem a adição do microrganismo. O perfil proteico do leite, soro e queijo caprino no primeiro dia de armazenamento foi avaliado por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) de 15 × 15 cm, com 15% de acrilamida, sendo os queijos também analisados no gel de 10 × 10 cm, com 17,5% de acrilamida. A partir desta técnica foi possível a separação e visualização das proteínas características de cada amostra, como lactoferrina, soroalbumina, imunoglobulina G, β -lactoglobulina e α -lactoalbumina para o soro lácteo, e as frações α -, β - e *para*- κ - da caseína para os queijos, e ainda a κ -caseína nos leites, tendo sido reveladas as mesmas proteínas para as amostras do tratamento controle, apenas com o extrato da semente de girassol, e do tratamento probiótico, com o mesmo extrato e a cultura *L. mucosae*. Uma vez que não houve interferência da adição do probiótico no perfil dos queijos no primeiro dia de estocagem, estudos adicionais ainda serão necessários para verificar se há influência dessa cultura nativa sobre as características de proteólise do queijo ao longo do período de armazenamento.

Palavras-chaves: Alimento funcional. Coagulantes vegetais. Proteínas. Lácteos caprinos.

ABSTRACT

Due to the increase in the consumption of cheese and the need to search for alternative means for the manufacture of this product, there was a demand for its obtainment through vegetable coagulation. Sunflower seeds (*Helianthus annuus*) have coagulant activity in goat milk, in addition to being a source of bioactive compounds, which together with the use of probiotics in cheese production, such as the CNPC007 strain of *Limosilactobacillus mucosae*, which exhibited a high survival rate in gastric and enteric conditions simulated in previous studies, may lead to a functional food, capable of bringing beneficial effects to the consumer's health. The aim of this project was to evaluate the protein profile of cheese produced with *H. annuus* seed extract and the addition of the native strain with probiotic potential *L. mucosae* CNPC007 belonging to the EMBRAPA lactic bacteria collection, compared to a control cheese, with *H. annuus* extract but without the addition of the microorganism. The protein profile of goat milk, whey and cheese on the first day of storage was evaluated using the polyacrylamide-sodium dodecyl sulphate gel electrophoresis (SDS-PAGE) of 15 × 15 cm, with 15% of acrylamide, being the cheeses also analysed on the 10 × 10 cm gel, with 17.5% acrylamide. Using this technique, it was possible to separate and visualize the characteristic proteins of each sample, such as lactoferrin, serum albumin, immunoglobulin G, β -lactoglobulin and α -lactalbumin for whey, and the α -, β - and *para*- κ - fractions of casein for cheeses, and also κ -casein in milk, the same proteins having been revealed for samples of the control treatment, only with the sunflower seed extract, and of the probiotic treatment, with the same extract and the culture *L. mucosae*. Since the probiotic culture did not interfere in the protein profile of the cheeses on the first day after the processing, additional studies will still be needed to verify if this autochthonous culture is able to influence the proteolytic behaviour of the cheese throughout the storage period.

Keywords: Functional food. Vegetable coagulants. Proteins. Goat dairy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Análise Eletroforética das proteínas obtidas por SDS-PAGE presentes no gel de 15 × 15 cm, com 15% de poliacrilamida contendo as amostras de leite, soro e queijo do tratamento controle (sem probiótico) e do tratamento probiótico com *Limosilactobacillus mucosae* realizado no Núcleo Regional Nordeste da Embrapa Caprinos e Ovinos.....28
- Figura 2 – Análise Eletroforética das proteínas obtidas por SDS-PAGE presentes no gel de 10 × 10 cm, com 17,5% de poliacrilamida contendo as amostras dos queijos do tratamento controle (sem probiótico) e do tratamento probiótico com *Limosilactobacillus mucosae* realizado no Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos (NUPEA).....31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Delineamento experimental dos tratamentos estudados.....	21
Tabela 2 – Reagentes e volumes usados no preparo dos géis de 10 × 10 cm (pequeno) de separação e de concentração.....	25
Tabela 3 – Reagentes e volumes usados no preparo dos géis com 15 × 15 cm (grande) de separação e concentração.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

CaCl₂	Cloreto de cálcio
CCT	Centro de Ciências e Tecnologia
G	Gramma
HCL P.A.	Ácido Clorídrico Pureza Analítica
IgG	Imunoglobulina G
kDa	Quilodalton
L	Litro
LC	Leite usado para a produção do queijo controle
Lf	Lactoferrina
LM	Leite da produção do lote contendo <i>L. mucosae</i>
Met₁₀₆	Unidade 106 da metionina
Min	Minuto
mL	Mililitro
NUPEA	Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIBIC	Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica
QC	Queijo controle
QM	Queijo contendo <i>L. mucosae</i>
RCF	Relative Centrifugal Force
SA	Soroalbumina
SC	Soro resultante do queijo controle
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS - PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
SM	Soro contendo <i>L. mucosae</i>
T1	Tratamento 1 (ausência da cultura probiótica)
T2	Tratamento 2 (presença da cultura probiótica)
TCA	Ácido Tricloroacético

TEMED	Tetrametiletenodiamina
Phe₁₀₅	Unidade 105 da fenilalanina
Tris	Hidroximetil aminometano
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
α-LA	α -lactoalbumina
α_s-CN	α_s -caseína
β-CN	β -caseína
β-Lg	β -lactoglobulina
<i>para</i>-κ-CN	<i>para</i> - κ -caseína

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo geral	16
2.2	Objetivos específicos	16
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1	Caprinocultura na região Nordeste e leite de cabra	17
3.2	Queijo obtido a partir do leite de cabra	17
3.3	Uso de coagulantes vegetais na fabricação de queijos	18
3.4	Probióticos	19
3.5	<i>Limosilactobacillus mucosae</i>	19
3.6	Técnica de Eletroforese em gel SDS-PAGE	20
4	METODOLOGIA	21
4.1	Local da pesquisa	21
4.2	Condições de coagulação do leite	21
4.3	Elaboração dos queijos	21
4.4	Períodos de amostragem	22
4.5	Preparo das soluções	22
4.5.1	<i>Solução de acrilamida</i>	22
4.5.2	<i>Tampão de separação</i>	22
4.5.3	<i>Tampão de concentração</i>	23
4.5.4	<i>Tampão do tanque (ou do eletrodo)</i>	23
4.5.5	<i>Dodecil sulfato de sódio (SDS) a 5%</i>	23
4.5.6	<i>Dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%</i>	23
4.5.7	<i>Persulfato de amônio a 10%</i>	23
4.5.8	<i>Persulfato de amônio a 30%</i>	23
4.5.9	<i>Tampão de amostra</i>	23
4.5.10	<i>Solução 0,1% de azul de coomassie</i>	24
4.5.11	<i>Solução 5% de azul de coomassie</i>	24
4.5.12	<i>Solução estoque de azul de coomassie</i>	24
4.5.13	<i>Solução de trabalho de azul de coomassie</i>	24
4.5.14	<i>Solução de fixação (álcool etílico a 50%)</i>	24
4.5.15	<i>Solução descorante</i>	24

4.6	Preparação dos géis.....	25
4.7	Preparo das amostras para eletroforese.....	26
4.8	Corrida eletroforética.....	26
4.9	Revelação das proteínas.....	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	33
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a caprinocultura é uma atividade difundida em todo o território nacional, mas com concentração de 93% na região Nordeste. Os números mais atualizados disponíveis sobre a caprinocultura brasileira mostram um total de 9,78 milhões de caprinos em 2016. Apesar da escassez de chuva no Nordeste, o rebanho caprino cresce a cada ano, de 91% em 2007 para 93% em 2016. A concentração do rebanho caprino na região Nordeste está relacionada às questões culturais e de mercado (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2016).

Comparado ao bovino, o leite de cabra possui propriedades físico-químicas e terapêuticas, que se distinguem pela maior digestibilidade, hipoalergenicidade, menor teor de colesterol e alto teor de cálcio, que também é melhor absorvido (DE PAULA et al., 2020). Pode-se destacar como outro fator marcante as características sensoriais, especialmente o aroma e sabor típicos, que são responsáveis pela aceitação ou rejeição dos produtos pelos consumidores (RIBEIRO; RIBEIRO, 2010).

A fabricação de produtos de qualidade obtidos a partir do leite de cabra é uma alternativa ao caprinocultor para agregar valor nutricional à matéria-prima. Dentre esses produtos, os queijos estão entre os derivados lácteos mais consumidos em todo o mundo pelos mais variados tipos, formas e sabores (GONZÁLEZ-MARTÍN et al., 2017). Desse modo, a fabricação de queijos produzidos com leite caprino representa uma atividade significativa que contribui diretamente para o crescimento socioeconômico da agropecuária brasileira. Foi observado também que por motivos como, intolerância à lactose e redução do consumo de gordura animal, surgem diversas alternativas ao leite de cabra e seus derivados (LIMA et al., 2017).

Devido ao aumento mundial do consumo de queijos no mercado, na primeira década dos anos 2000, surgiu-se a necessidade de buscar meios alternativos para a fabricação deste, e com isso, a demanda por queijos de coagulação vegetal, por exemplo (LIMA et al., 2009). Na perspectiva de obtenção de novos queijos derivados do leite de cabra naquela década, foram realizados experimentos visando a identificação de proteases vegetais (enzimas que hidrolisam as ligações peptídicas de outras proteínas) e sua aplicabilidade na fabricação de queijos artesanais. Em resultados preliminares, observou-se que sementes de girassol (*Helianthus annuus*) tinham atividade coagulante no leite de cabra. Bem como, estudos preliminares realizados no Laboratório de Tecnologia de Leite da Embrapa Caprinos, utilizando extratos brutos das sementes de girassol, têm comprovado que é possível a

fabricação de queijos a partir desta técnica com excelentes características sensoriais (EGITO et al., 2006).

A busca por alimentos enriquecidos em nutrientes e bioativos com propriedades que auxiliem o bom funcionamento do organismo com melhora da saúde dos consumidores revela a importância dos alimentos funcionais. Nesse sentido, a definição de um “alimento funcional” está relacionada às suas propriedades nutricionais e aos efeitos metabólicos e fisiológicos trazendo benefícios à saúde (DANTAS et al., 2021).

Um dos alimentos funcionais que merecem destaque são os probióticos. Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, afetam benéficamente a saúde do hospedeiro (HILL et al., 2014). O consumo de tais microrganismos está associado a efeitos benéficos tanto em seres humanos como em animais. Os benefícios para a saúde humana com o consumo dos alimentos contendo probióticos são amplos, incluindo a prevenção de condições tais como infecções e distúrbios gastrointestinais, processos alérgicos, carcinogênese e crescimento tumoral (TEODORO et al., 2021).

Cepas nativas de *Limosilactobacillus mucosae*, anteriormente classificada como *Lactobacillus mucosae*, isoladas do leite de cabra, foram previamente avaliadas com relação ao seu potencial probiótico por pesquisadores da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, parceiros do Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos (NUPEA) da UEPB. Dentre as cepas avaliadas, *L. mucosae* CNPC007 exibiu genes relacionados à adesão à mucosa intestinal e à tolerância aos sais biliares, além de elevada sobrevivência às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, além da susceptibilidade a antibióticos, sendo considerada um potencial probiótico para uso humano (DE MORAES et al., 2017). Posteriormente, a cepa *L. mucosae* CNPC007 foi utilizada com sucesso na produção de queijo coalho de leite de cabra, alcançando populações superiores a 8 log UFC/g ao longo de 21 dias de armazenamento (DE MORAES et al., 2018), níveis compatíveis com aqueles relatados em ensaios clínicos como necessários para resultar em efeitos benéficos à saúde do consumidor (MARTINEZ; BEDANI; SAAD, 2015). A capacidade de metabolizar nitrogênio proteico e não proteico foi demonstrada em diferentes cepas de *L. mucosae* (MAMUAD et al., 2017), incluindo a atividade proteolítica da cepa CNPC007 quando cultivada em leite de cabra (DE MORAES et al., 2017).

Nesse sentido, a utilização de uma cepa nativa de *L. mucosae* na elaboração de um queijo obtido por coagulação vegetal, poderia reforçar a proteólise durante o processamento, bem como favorecer a modificação do perfil proteico ao longo do período de maturação e

armazenamento, de modo a aumentar os benefícios quanto à textura e à liberação de peptídeos bioativos, de modo a reforçar os potenciais benefícios à saúde deste produto.

Dessa forma, espera-se que não sejam observadas mudanças no perfil proteico das amostras dos tratamentos controle e probiótico, tendo em vista que no primeiro dia de armazenamento dos queijos, os processos bioquímicos que levariam à proteólise do queijo ainda não seriam intensos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil proteico de queijo caprino obtido por coagulação com extrato de semente de girassol (*Helianthus annuus*) na presença e ausência da cepa nativa *Limosilactobacillus mucosae* CNPC007 pertencente à coleção de bactérias lácticas da EMBRAPA, em comparação a um queijo controle.

2.2 Objetivos específicos

Foram objetivos específicos do presente trabalho:

- a) determinar o perfil proteico do queijo produzido com o extrato da semente de *H. annuus* e com a cepa nativa de *L. mucosae*;
- b) determinar o perfil proteico de um queijo controle, produzido apenas com o extrato da semente de *H. annuus*, não contendo a cepa de *L. mucosae*;
- c) determinar o perfil proteico dos diferentes soros lácteos, subprodutos dos processamentos dos queijos probiótico e controle, bem como dos leites usados na produção dos respectivos queijos;
- d) verificar se a cultura de *L. mucosae* é capaz de influenciar o perfil proteico do queijo no primeiro dia de armazenamento e do soro resultante.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Caprinocultura na região Nordeste e leite de cabra

A caprinocultura desempenha importante papel socioeconômico, é fonte de renda e de alimentos (carne e leite) e contribui largamente para a viabilidade de pequenos produtores em países em desenvolvimento como o Brasil (ESCAREÑO et al., 2012), que é o maior produtor de leite caprino do continente Americano – 26 milhões de litros/ano (IBGE, 2017). No Brasil, cerca de 93% do rebanho caprino encontra-se na região Nordeste, principalmente na zona semi-árida. Há várias décadas constitui-se em uma espécie de expressiva importância econômica graças a sua rusticidade, que permite uma melhor adaptação às características do meio, ressaltando-se a qualidade dos produtos que fornece para a alimentação (DUBEUF et al., 2004).

A caprinocultura leiteira no Brasil é uma alternativa eficaz para aumentar a renda de pequenos produtores, em especial na região Nordeste. A produção de derivados caprinos se caracteriza como uma atividade de extrema importância cultural, social e econômica para o nordeste brasileiro, desempenhando um papel decisivo no desenvolvimento desta região (ALENCAR et al., 2010).

3.2 Queijo obtido a partir do leite de cabra

Diversas propriedades tornam o leite de cabra benéfico para a saúde humana, como alta digestibilidade e capacidade de tamponamento, níveis mais baixos de colesterol em comparação com o leite de vaca. O baixo potencial alergênico do leite de cabra também é uma característica importante relacionada à sua menor proporção de caseína α -s₁, proteína geralmente associada à resposta alérgica ao leite de vaca, uma das causas mais frequentes de alergia alimentar em crianças. Essas propriedades também permitem a fabricação de uma variedade de laticínios de leite de cabra, como queijo, iogurte, fermentado e bebidas lácteas não fermentadas, sorvete, manteiga, leite condensado, sobremesas, entre outros. Além disso, a adição de probióticos pode agregar maior valor funcional ao leite de cabra (DE PAULA et al., 2020; PAL et al., 2017).

Não possuir β -caroteno, resultando em uma coloração mais branca; conter duas vezes mais ácidos graxos de cadeia curta, o que confere o pronunciado sabor e aroma aos queijos; em geral, possuir menor teor de proteínas, sendo menor a quantidade de caseína e maior teor

de substâncias nitrogenadas não-proteicas; e, por fim, apresentar um teor ligeiramente maior de cálcio, são características importantes do leite caprino (GOMES et al., 2004).

A maior parte da produção mundial de leite de cabra é utilizada para a fabricação de queijos, sendo o subproduto de maior interesse tecnológico e valor econômico. A produção e comercialização de queijo caprino apresenta lucro maior que a comercialização do leite *in natura*. O queijo é o produto de maior valor econômico e tecnológico produzido com o leite de cabra (RAMOS, 2017). A maturação tem papel fundamental no desenvolvimento das características individuais de cada queijo, pois ocorrem vários processos bioquímicos primários, os quais vão determinar a sua textura (NARIMATSU et al., 2003). O processo de maturação é ainda influenciado pelo tipo de leite usado e a presença de diferentes microrganismos. De uma forma geral, em queijos obtidos a partir de leite cru, os microrganismos dominantes durante a maturação são bactérias ácido-láticas de variados gêneros, com destaque para o *Lactobacillus* spp. (DAHL et al., 2000).

3.3 Uso de coagulantes vegetais na fabricação de queijos

A coagulação é uma etapa essencial na produção do queijo. A utilização de proteases de origem vegetal para o emprego na coagulação do leite tem despertado grande interesse, pela facilidade de obtenção de extratos, fácil purificação e/ou isolamento de coagulante natural, além de agregar valor nutricional ao produto (KUMARI; SHARMA; JAGANNADHAM, 2012; SILVEIRA, 2020).

Neste contexto, as proteases exercem efeito fundamental na produção de queijos. Essas enzimas têm como função hidrolisar e sintetizar ligações peptídicas em ambientes aquosos. Podem ser obtidas a partir de fontes de origem vegetal, animal e microbiana. No entanto, os microrganismos são considerados a melhor fonte para a produção de enzimas devido ao alto rendimento na produção. A hidrólise enzimática é um tratamento que pode melhorar as propriedades funcionais, nutricionais e imunológicas das proteínas, assim, hidrolisados proteicos são utilizados amplamente como ingredientes de alimentos, bebidas energéticas e formulações de dietas para crianças e adultos doentes (PIETRO et al., 2007).

A coagulação enzimática do leite, para a fabricação de queijos, envolve modificações específicas das micelas de caseína através da proteólise limitada por proteinases selecionadas. Estudos realizados na Embrapa Caprinos e Ovinos, utilizando extratos de sementes de girassol, mostraram que através de testes bioquímicos estes extratos hidrolisam a κ caseína na

região Phe₁₀₅-Met₁₀₆, mesmo sítio de hidrólise da renina, apresentando potencial para fabricação de queijos (EGITO et al., 2007).

3.4 Probióticos

De acordo com a resolução nº 2 de 07/01/2002, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2002) que descreve alimento funcional como “todo alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido na dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica”.

Dentre os componentes de determinado grupo de alimentos que possuem propriedades funcionais estão os probióticos. Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (HILL et al., 2014). Em um intestino adulto saudável, a microflora predominante se compõe de microrganismos promotores da saúde, em sua maioria pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Esses gêneros estão presentes em queijos, iogurtes, produtos lácteos fermentados e suplementos alimentares. Para ser considerado probiótico cada cepa de bactéria deve estar em elevada concentração, sendo normalmente recomendada uma porção de alimento que ofereça 10^8 - 10^{10} unidades formadoras de colônias do probiótico ao consumidor por dia (MARTINEZ; BEDANI; SAAD, 2015).

3.5 *Limosilactobacillus mucosae*

O desenvolvimento de produtos lácteos contendo bactérias probióticas é um foco importante das indústrias de alimentos e, geralmente, a produção de alimentos contendo cepas probióticas específicas com concentrações apropriadas de células viáveis durante a vida de prateleira. Bactérias lácticas são as principais bactérias probióticas incluídas nos alimentos funcionais, uma vez que são consideradas, geralmente, como um status seguro e proporcionar vários benefícios para os organismos hospedeiros (BURITI; SAAD, 2007).

A busca por candidatos probióticos entre bactérias lácticas isoladas de alimentos pode revelar novas cepas com propriedades tecnológicas e de saúde promissoras. Cepas de *Lactobacillus mucosae*, isoladas do leite de cabra, espécie reclassificada por Zheng et al., (2020) como *Limosilactobacillus mucosae*, foram investigadas por meio de testes *in vitro*. Foi comprovada a presença de fatores genéticos relacionados à produção de hidrolase de sais

biliares, propriedades de adesão intestinal e produção de amina biogênica. A cepa CNPC007 de *Limosilactobacillus mucosae* exibiu uma elevada taxa de sobrevivência em condições gástricas e entéricas simuladas. Com relação às propriedades tecnológicas para aplicações de laticínios, foi registrada acidificação do leite, capacidade de coagulação e atividade proteolítica relativamente alta. Isto torna a cepa CNPC007 um candidato promissor como probiótico para aplicação em produtos lácteos (DE MORAES et al., 2017).

3.6 Técnica de Eletroforese em gel SDS-PAGE

A eletroforese é um método relacionado à migração de partículas carregadas em um determinado meio, sob a influência de uma diferença de potencial, sendo a mobilidade eletroforética da molécula ou partícula carregada influenciada, entre outros fatores, pela carga, pela massa molecular e pela concentração da mesma (MAGENIS, 2015).

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) é um método de separação clássico, que permite a quantificação das bandas dos géis, e assim, fornece boa separação, levando a resultados precisos e reprodutíveis. Além disso, apresenta vantagens de ser uma técnica de separação de fácil execução, rápida e de baixo custo (LIN et al., 2010).

O gel de poliacrilamida na presença do desnaturante dodecil sulfato de sódio (SDS) é uma técnica bastante utilizada no estudo de proteínas para a determinação da massa molecular ou tamanho das proteínas e é capaz de separar essas moléculas de tamanhos moleculares entre 5-150 kDa em um único gel (CONSIDINE et al., 2007).

A incubação das amostras proteicas com SDS e um agente redutor, como o β -mercaptoetanol, que promove o rompimento das ligações dissulfeto das proteínas facilitando o acesso do SDS, conduz a uma normalização da carga e da forma das proteínas, de modo que o elemento de distinção entre essas moléculas passa a ser a massa molecular. A identificação das proteínas separadas por SDS-PAGE pode ser realizada pela comparação da sua mobilidade no gel e da massa molar de proteínas padrão (MAGENIS, 2015).

4 METODOLOGIA

4.1 Local da pesquisa

As análises da pesquisa experimental foram realizadas no Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos (NUPEA), do Centro de Ciências e Tecnologia – CCT/UEPB, localizados no Campus I, Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão/Núcleo Regional Nordeste da Embrapa Caprinos e Ovinos, no município de Campina Grande, PB.

4.2 Condições de coagulação do leite

As condições de coagulação do leite de cabra com a semente de girassol (*H. annuus*) (concentração de extrato, tempo e temperatura) foram escolhidas com base nos melhores resultados obtidos por Quirino (2021). Naquele estudo, para determinar o melhor resultado (concentração de extrato, tempo e temperatura) foram realizados testes com o extrato aquoso da semente de girassol (*H. annuus*) e com a temperatura do leite mantida a 37 °C, no qual, o melhor resultado foi 50 µL de extrato para coagular 1 mL de leite em 1 h. A partir desse resultado, realizou-se adaptações e utilizou-se 440 mL de extrato para coagular 10 L de leite em 1 h. Dessa forma, para preparação do extrato vegetal do presente estudo, 120 g de sementes de girassol foram sanitizadas, trituradas e colocadas em 150 mL de solução de NaCl a 1% e acondicionadas a 8°C por 24 horas, e por fim filtradas.

4.3 Elaboração dos queijos

Foram produzidas duas formulações de queijos, na presença e ausência da cultura nativa de *Limosilactobacillus mucosae* CNPC007, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 – Delineamento experimental dos tratamentos estudados.

Tratamento	<i>L. mucosae</i> CNPC007	Extrato aquoso de <i>H. annuus</i>
T1	-	+
T2	+	+

Fonte: Quirino (2021). - = ausente; + = presente

Após o aquecimento do leite na temperatura estabelecida nos ensaios pilotos de Quirino (2021) foi adicionada a cultura de *L. mucosae* pré-ativada em caldo De Man Rogosa e Sharpe (MRS) conforme descrito por Galdino (2019). Posteriormente, para todos os tratamentos foram adicionados o cloreto de cálcio (CaCl_2) na proporção de 2,5 g para 10 L de leite e o coagulante de *Helianthus annuus*, na proporção de 440 mL para 10 L de leite. A salga da coalhada foi realizada na proporção de 90 g de sal para cada 10 L de leite, sendo o sal dissolvido em aproximadamente 1 L de soro adicionado à massa imediatamente após a dessora por um período de 10 min. Após esse período, o queijo foi enformado. Após a enformagem, os queijos foram prensados, embalados em sacos de polietileno e maturação a 8 °C.

4.4 Períodos de amostragem

A coleta das amostras de queijo foi realizada no dia seguinte à fabricação (1 dia). Porções de queijo de aproximadamente 10 g foram congeladas (-18°C) para uso nas análises. O leite usado na fabricação dos queijos, bem como o soro lácteo resultante do processamento após a coagulação foram também congelados para uso nas análises (aproximadamente 10 mL de cada amostra). O leite usado no preparo dos tratamentos controle e probiótico e o soro dos queijos obtidos desses lotes foram liofilizados para a corrida nos géis de 15×15 cm.

4.5 Preparo das soluções

4.5.1 Solução de acrilamida

Foi dissolvido 1 g de bis-acrilamida e 36,6 g de acrilamida em água ultrapura suficiente para 100 mL.

4.5.2 Tampão de separação

Foram dissolvidos 9 g de tris (hidroximetil-aminometano) em aproximadamente 20 mL de água ultrapura. O pH foi ajustado para 8.8 com HCl P.A, a solução foi filtrada e o volume foi completado com água ultrapura suficiente para 50 mL.

4.5.3 Tampão de concentração

Foram dissolvidos 3 g de tris (hidroximetil-aminometano) em aproximadamente 20 mL de água ultrapura. O pH foi ajustado para 6.8 com HCl P.A, a solução foi filtrada e o volume foi completado com água ultrapura suficiente para 50 mL.

4.5.4 Tampão do tanque (ou do eletrodo)

Foram dissolvidos 30 g de tris, 144,5 g de glicina e 30 g de SDS em água destilada suficiente para 5 L de solução. Esta solução foi armazenada na geladeira até o momento da corrida.

4.5.5 Dodecil sulfato de sódio (SDS) a 5%

Foi dissolvido 0,05 g de SDS em 1 mL de água ultrapura, procedendo sua preparação no momento do uso.

4.5.6 Dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%

Foi dissolvido 0,1 g de SDS em 1 mL de água ultrapura, procedendo sua preparação no momento do uso.

4.5.7 Persulfato de amônio a 10%

Foi dissolvido 0,1 g de persulfato de amônio em 1 mL de água ultrapura.

4.5.8 Persulfato de amônio a 30%

Foi dissolvido 0,3 g de persulfato de amônio em 1 mL de água ultrapura.

4.5.9 Tampão de amostra

Foram adicionados 2,5 mL do tampão de concentração, 5 mL de glicerol, 5 mL de SDS 10%, 0,3 g de 2-mercaptoetanol e 2,5 mg de azul de bromofenol em água ultrapura suficiente para 25 mL.

4.5.10 Solução 0,1% de azul de coomassie

Em 50 mL de água ultrapura foram adicionados 50 mL de álcool etílico, 0,1 g de azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250) e 2 g de ácido tricloroacético (TCA).

4.5.11 Solução 5% de azul de coomassie

Em 10 mL de água ultrapura foram adicionados 0,5 g de azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250).

4.5.12 Solução estoque de azul de coomassie

Em 500 mL de água destilada adicionou-se 50 g de sulfato de amônio, 6 mL de ácido fosfórico 85% e 10 mL da solução 5% de Azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250).

4.5.13 Solução de trabalho de azul de coomassie

Em 400 mL de solução estoque de azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250) foram adicionados 100 mL de etanol. Esta solução foi preparada imediatamente antes de corar o gel.

4.5.14 Solução de fixação (álcool etílico a 50%)

Foram adicionados 50 mL de álcool etílico em 50 mL de água ultrapura. Agitou-se durante 1 h.

4.5.15 Solução descorante

Em 750 mL de água destilada foram adicionados 50 mL de ácido acético e 200 mL de álcool etílico.

4.6 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 10×10 cm e 15×15 cm. Foram aplicados nas placas o gel separador a 17,5% e o gel concentrador de 3,5% de acrilamida, para os géis de 10×10 cm (pequeno – este gel, bem como a corrida, foram realizados no Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos (NUPEA). Para os géis de 15×15 cm (grande – este gel, bem como a corrida, foram realizados no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão/Núcleo Regional Nordeste da Embrapa Caprinos e Ovinos), foram aplicados o gel separador a 15% e o gel concentrador de 5% de acrilamida. Os géis são compostos de tampão separador/concentrador contendo Tris/HCl e também soluções de acrilamida/bis-acrilamida, água ultrapura, solução de SDS a 5% e 10%, tetrametiletilenodiamina (TEMED) e persulfato de amônio a 10 e 30%.

Na Tabela 2 a seguir são apresentados os volumes usados para os respectivos géis de 10×10 cm de separação e concentração, aplicados nesta análise.

Tabela 2 – Reagentes e volumes usados no preparo dos géis de 10×10 cm (pequeno) de separação e de concentração.

Reagentes	Gel Separador - 17,5%	Gel Concentrador - 3,5%
Tampão Separador	2.000 μ L	-
Tampão Concentrador	-	625 μ L
Acrilamida	4.670 μ L	583 μ L
Água ultrapura	1.230 μ L	3.610 μ L
SDS - 5%	160 μ L	100 μ L
TEMED	9 μ L	15 μ L
Persulfato - 10%	107 μ L	-
Persulfato - 30%	-	67 μ L
Volume final	8.176 μ L	5.000 μ L

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

Na tabela 3 a seguir são apresentados os volumes e concentrações usados para os respectivos géis com 15×15 cm (grande) de separação e concentração, aplicados nesta análise.

Tabela 3 – Reagentes e volumes usados no preparo dos géis com 15 × 15 cm (grande) de separação e concentração.

Reagentes	Gel Separador - 15%	Gel Concentrador - 5%
Tampão separador	7.500 µL	-
Tampão concentrador	-	2.500 µL
Acrilamida	12.300 µL	1.300 µL
Água ultrapura	9.600 µL	5.800 µL
SDS - 10%	300 µL	100 µL
TEMED	30 µL	10 µL
Persulfato - 10%	200 µL	-
Persulfato - 30%	-	200 µL
Volume final	30.000 µL	10.000 µL

Fonte: Dados da pesquisa.

4.7 Preparo das amostras para eletroforese

Para o preparo dos géis de 15 × 15 cm (grande) foram utilizados leite liofilizado (0.05 g), soro liofilizado (0.08 g) e queijo (0.02 g) dos tratamentos controle e probiótico. Para os géis de 10 × 10 cm (pequeno) foram utilizados queijo de ambos os tratamentos (0.02 g). As amostras foram transferidas para tubos tipo Eppendorf, no qual foi adicionado também 1 mL de tampão da amostra e ficaram em repouso por 1 hora. Em seguida, foram agitadas por 2 min (agitador de tubos vortex Nova Instruments NI1058) com a finalidade de solubilizar as amostras no tampão. Posteriormente, foram tratadas a 100 °C por 10 min em estufa. Em seguida, foram centrifugadas a 3.000 rcf por 2 min. Seus sobrenadantes foram descartados.

4.8 Corrida eletroforética

Foram utilizados 10 µL e 5 µL de amostra por poço para os géis grande e pequeno, respectivamente. A corrida eletroforética foi realizada na presença de um tampão tanque/eletrodo em tensão constante de 250 V e corrente de 25 mA por gel, sob refrigeração à 4 °C, para o gel pequeno. Para o gel grande, a corrida foi realizada com uma corrente de 60 mA e 500 V. Ao fim da corrida, descartou-se o gel concentrador, permanecendo apenas o gel separador. Este (gel pequeno) foi imerso durante 20 min em uma solução de fixação composta

por 50 mL de água deionizada e 50 mL de álcool etílico. O gel grande foi imerso na solução de fixação por 30 min.

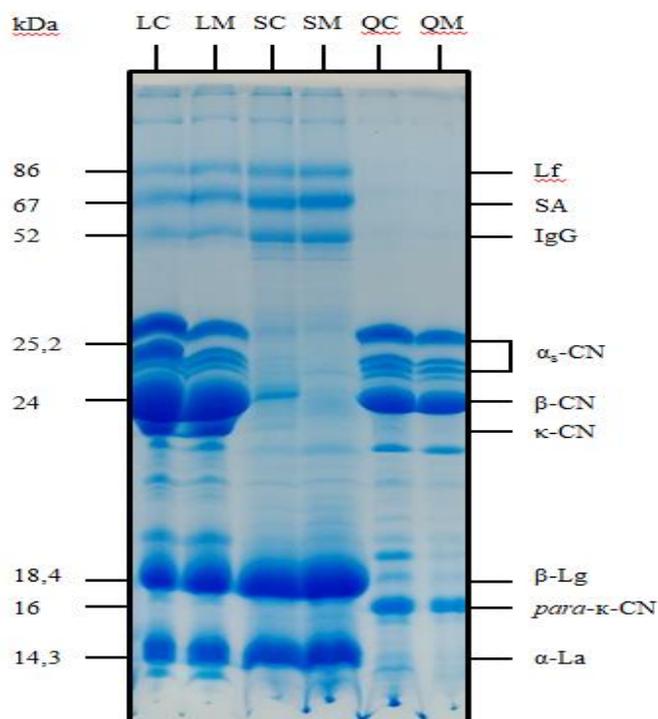
4.9 Revelação das proteínas

O gel pequeno imerso na solução de fixação foi retirado e corado com azul de Coomassie a 0,1% por 1 h. O gel grande foi corado na solução de trabalho de azul de Coomassie a 5% por 2 h. A seguir, foram realizadas sucessivas lavagens com água destilada. Para o gel grande realizou-se lavagem adicional com solução descorante (750 mL de água destilada, 50 mL de ácido acético e 200 mL de etanol). Os géis foram, então, fotografados em scanner.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil proteico das amostras LC (leite usado para a produção do queijo controle), SC (soro resultante do queijo controle) e QC (queijo controle), bem como LM (leite da produção do lote contendo *L. mucosae*), SM (soro contendo *L. mucosae*) e QM (queijo contendo *L. mucosae*) obtidos em gel de 15 × 15 cm, com 15% de acrilamida é apresentado na Figura 1 a seguir.

Figura 1 – Análise Eletroforética das proteínas obtidas por SDS-PAGE presentes no gel de 15 × 15 cm, com 15% de poliacrilamida contendo as amostras de leite, soro e queijo do tratamento controle (sem probiótico) e do tratamento probiótico com *Limosilactobacillus mucosae* realizado no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão/Núcleo Regional Nordeste da Embrapa Caprinos e Ovinos.



Fonte: Dados da pesquisa.

Onde: LC: leite controle; LM: leite usado no tratamento com *L. mucosae*; SC: soro controle; SM: soro com *L. mucosae*; QC: queijo controle; QM: queijo com *L. mucosae*; Lf: lactoferrina; SA: soroalbumina; IgG: imunoglobulina G; α_s -CN: α_s -caseína; β -CN: β -caseína; κ -CN: κ -caseína; β -Lg: β -lactoglobulina; *para*- κ -CN: *para*- κ -caseína; α -La: α -lactoalbumina.

A Figura 1 do gel, acima, representa um corte do gel 15 × 15 cm original, pois havia outras amostras analisadas que não correspondem a esta pesquisa naquele gel.

Ao analisar os leites (LC e LM) foi possível observar bandas de proteínas características: lactoferrina (Lf) encontrada na região de aproximadamente 86 kDa; soroalbumina (SA) em 67 kDa; imunoglobulina G (IgG) em 52 kDa; α_s -caseína (α_s -CN) entre 25,2 kDa e 23 kDa; β -caseína (β -CN) em 24 kDa e κ -caseína (κ -CN). Resultados semelhantes foram encontrados por Conway et al., 2010.

De acordo com Huppertz et al. (2018), a α_{s1} -caseína apresenta uma massa molecular de 23,6 kDa e a α_{s2} -caseína, 25 kDa. No entanto, estas proteínas podem realizar, além de auto associações entre si, associações com outras moléculas. Alguns fatores como, o aumento da força iônica em pH 6,6 resulta em uma maior associação, enquanto o aumento do pH para > 6,6 aumenta a repulsão eletrostática e, portanto, reduz a associação. Por este motivo, as caseínas α_{s1} e α_{s2} não foram devidamente identificadas.

Em alguns casos a β -caseína e a α_{s1} -caseína podem ficar sobrepostas, pois quando em misturas 1:1, ou seja, na proporção em que ocorrem no leite, partículas consideravelmente menores são observadas, sugerindo a formação de complexos mistos e indicando que a formação de complexos α_{s1} -caseína: β -caseína é favorecida (HUPPERTZ; FOX; KELLY, 2018).

O mesmo é válido para a κ -caseína, que apresenta uma massa molecular de 19 kDa, mas, devido a possíveis associações, é visualizada logo abaixo da β -caseína. De uma perspectiva coloidal, as micelas de caseína foram descritas como coloides estericamente estabilizados. A estabilização estérica é fornecida principalmente pela escova de κ -caseína na superfície da micela, com a região C-terminal da proteína projetando-se na fase aquosa e o N-terminal se associando com o núcleo das micelas de caseína (HUPPERTZ; FOX; KELLY, 2018).

No processo de coagulação enzimática do leite, primeira etapa na fabricação da maioria dos queijos, na presença de quimosina ou outras enzimas proteolíticas, ocorre a hidrólise da κ -caseína. No caso da quimosina, esta hidrólise ocorre na ligação peptídica existente entre as unidades 105 (fenilalanina) e 106 (metionina). Após a hidrólise, o segmento C-terminal da κ -caseína, é liberado na fase aquosa, enquanto que a *para*- κ -caseína N-terminal permanece associada às micelas, mas fornece estabilidade residual insuficiente, e ocorre agregação das micelas de *para*- κ -caseína, o que pode levar à floculação e gelificação do leite (HUPPERTZ; FOX; KELLY, 2018).

As α_s -caseínas são frações mais susceptíveis à proteólise enquanto que a degradação da β -caseína é bem menor, conforme foi verificado em uma grande variedade de queijos, a exemplo do Cheddar, Taleggio, Gorgonzola, Reggianito Argentino, Mussarela, Caciocavallo Pugliese entre outros (FONTENELLE; EGITO; BASTOS, 2010).

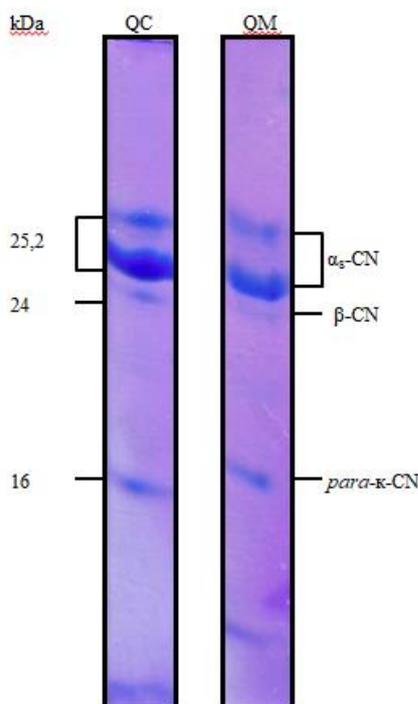
Com relação aos soros (SC e SM) foi possível visualizar, além de lactoferrina (Lf) encontrada na região de aproximadamente 86 kDa; soroalbumina (SA) em 67 kDa; imunoglobulina G (IgG) em 52 kDa; também β -lactoglobulina (β -Lg) em 18,4 kDa e α -lactoalbumina em 14,3 kDa. (CONWAY; GAUTHIER; POULIOT, 2010).

Ainda no gel 15×15 cm a 15% de acrilamida foi possível observar as proteínas características de queijos nas amostras controle QC e probiótica QM. Além das frações α -CN e β -CN foi possível a visualização do peptídeo *para*- κ -caseína (*para*- κ -CN) na região de aproximadamente 16 kDa (Figura 1), tradicional peptídeo resultante da coagulação enzimática. Resultados semelhantes foram obtidos por Egito et al. (2007) após hidrólise de caseína bovina com coagulante animal e coagulante vegetal, onde ambos os extratos hidrolisam a κ -CN na região Phe₁₀₅-Met₁₀₆, produzindo *para*- κ -CN. Do ponto de vista tecnológico, a ligação Phe₁₀₅-Met₁₀₆ da κ -caseína é extremamente importante, pois sua hidrólise pela quimosina ou outras proteinases inicia a gelificação do leite durante a fabricação do queijo (HUPPERTZ; FOX; KELLY, 2018).

Ao comparar as amostras (leite, soro e queijo) do tratamento controle (T1) com as respectivas amostras (leite, soro e queijo) do tratamento probiótico (T2), pode-se afirmar que a cepa nativa de *L. mucosae* CNPC007 no 1º dia de armazenamento não influenciou o perfil proteico, pois revelou proteínas similares. Vale ressaltar que o leite usado para a produção do tratamento com *L. mucosae* foi coletado para a análise antes da adição da cultura. No entanto, os leites usados para a produção dos queijos dos tratamentos controle e probiótico foram adquiridos em momentos diferentes, não havendo, portanto, interferência do lote utilizado sobre o perfil proteico dos leites.

Na Figura 2 a seguir, é apresentado o gel de 10×10 cm, com 17,5% de acrilamida das amostras de queijo controle e queijo contendo *L. mucosae*, para reforçar e confirmar as proteínas que foram reveladas no gel de 15×15 cm, com 15% de acrilamida.

Figura 2 – Análise Eletroforética das proteínas obtidas por SDS-PAGE presentes no gel de 10 × 10 cm, com 17,5% de poliacrilamida contendo as amostras dos queijos do tratamento controle (sem probiótico) e do tratamento probiótico com *Limosilactobacillus mucosae* realizado no Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos (NUPEA).



Fonte: Dados da pesquisa.

Onde: QC: queijo controle; QM: queijo com *L. mucosae*; α_s -CN: α_s -caseína; β -CN: β -caseína; *para*- κ -CN: *para*- κ -caseína.

A Figura 2, acima, representa um corte do gel original de modo a destacar as amostras de queijo controle (QC) e queijo com *L. mucosae* (QM), produto final da coagulação do leite, no gel de 10 × 10 cm, com 17,5% de acrilamida.

Ao analisar o corte do gel 10 × 10 cm a 17,5% de acrilamida foi possível observar, novamente, as proteínas características de queijos nas amostras controle QC e probiótica QM. Além das frações α_s -CN (entre 25,2 kDa e 23 kDa) e β -caseína (β -CN) em 24 kDa, foi possível também a visualização, novamente, do peptídeo *para*- κ -caseína (*para*- κ -CN) na região de 16 kDa, confirmando os resultados já discutidos na Figura 1.

A maior parte do glicomacropéptido, produto solúvel da hidrólise da κ -CN, é eliminado no soro; contudo, a *para*- κ -CN permanece nas micelas da caseína, ficando, por isso, incorporada apenas no queijo (VEIROS, 2005).

Foi possível determinar o perfil proteico do leite, queijo e soro caprino, na presença e ausência da cultura nativa potencialmente probiótica de *L. mucosae*, através da técnica SDS-PAGE. No leite usado na produção de ambos os tratamentos foram reveladas todas as proteínas lácteas também presentes no soro e no queijo, a exceção da *para-κ-CN*, que aparece somente nos queijos, e κ -CN que aparece somente nos leites. No soro de ambos os tratamentos foram reveladas as proteínas solúveis características, Lf, SA, IgG, β -Lg e α -La. Os queijos controle e probiótico apresentaram α s-CN, β -CN e o peptídeo *para-κ-CN*.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista as semelhanças eletroforéticas dos tratamentos controle e adicionada cultura nativa potencialmente probiótica de *Limosilactobacillus mucosae* CNPC007 discutidas no presente estudo, pode-se concluir que a produção de queijo de cabra utilizando um coagulante vegetal de extrato da semente de *Helianthus annuus* e esta cultura nativa resulta em perfil proteico característico ao de queijos de coagulação enzimática no primeiro dia de armazenamento, sendo, portanto, uma alternativa viável de produção que pode ser promissora se adotada pelos produtores.

Uma vez que as amostras foram avaliadas apenas no primeiro dia de armazenamento, estudos adicionais ainda serão necessários para verificar a influência da cultura nativa *L. mucosae* sobre as características de proteólise do queijo, ao longo do período de armazenamento, em que os processos bioquímicos que podem ocasionar modificações sensoriais e de produção de compostos bioativos tornam-se mais importantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, S. P.; MOTA, R. A.; COELHO, M. C. O. C.; et al. Perfil sanitário dos rebanhos caprinos e ovinos no Sertão de Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.1, p.131-140, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Ministério da Saúde. Resolução – RDC N°2, de 7 de janeiro de 2002. Regulamento técnico de substâncias bioativas de probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**: seção 1, Brasília, DF, ano 139, n. 136, p 78-79, 17 julh. 2002. Disponível em: <<https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=17/07/2002&jornal=1&pagina=78&totalArquivos=104>> Acesso em 16 out. 2021.

BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 57, n. 4, p. 373-380, 2007. Disponível em<http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000406222007000400010&lng=e&nrm=iso>. Acesso em 9 out. 2021.

CONSIDINE, T.; PATEL, H.A.; ANEMA, S.G.; SINGH, H.; CREAMER, L.K. Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments – A Review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, n. 1, p. 1-23, 2007.

CONWAY, V.; GAUTHIER, S.F.; POULIOT, Y. Effect of cream pasteurization, microfiltration and enzymatic proteolysis on in vitro cholesterol-lowering activity of buttermilk solids. **Dairy Science & Technology**, France, v. 90, n. 4, 2010.

DAHL, S.; TAVARIA, F. K.; MALCATA, F. X. Relationships between flavour and microbiological profiles in Serra da Estrela cheese throughout ripening. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 4, p. 255-262, 2000.

DANTAS, T. L.; BURITI, F. C. A.; FLORENTINO, E. R. Okra (*Abelmoschus esculentus* L.) as a potential functional food source of mucilage and bioactive compounds with technological applications and health benefits. **Plants**, v. 10, n. 8, p. 1683, 2021.

DE MORAES, G. M. D.; ABREU, L. R.; EGITO, A. S.; SALLES, H. O.; SILVA, L. M. F.; NERO, L. A.; TODOROV, S. D.; DOS SANTOS, K. M. O. Functional properties of *Lactobacillus mucosae* strains isolated from Brazilian goat milk. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, New York, v. 9, n. 3, p. 235-245, 2017.

DE MORAES, G. M. D.; DOS SANTOS, K. M. O.; BARCELOS, S. C.; LOPES, S. A.; EGITO, A. S. Potentially probiotic goat cheese produced with autochthonous adjunct culture of *Lactobacillus mucosae*: microbiological, physicochemical and sensory attributes. **LWT – Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 94, p. 57-63, 2018.

DE PAULA, C. M.; DOS SANTOS, K. M. O.; OLIVEIRA, L. S.; OLIVEIRA, J. S.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Fat substitution by inulin in goat milk ice cream produced with cajá (*Spondias mombin*) pulp and probiotic cultures: influence on composition, texture, and

acceptability among consumers of two Brazilian regions. **Emirates Journal of Food and Agriculture**. v. 32, n. 2, p. 140, 2020.

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.

DUBEUF, J.P.; MORAND-FEHR, P.; RUBINO, R. Situation, changes and future of goat industry around the world. **Small Ruminant Research**, v.51, n.1, p.165-173, 2004.

EGITO, A. LAGUNA, L. Produtos Regionais Derivados de Leite de Cabras e Perspectivas de Mercado para o Brasil. In: SIMPÓSIOS DA 43ª REUNIÃO ANUAL DA SBZ, João Pessoa. **Anais Eletrônicos...** João Pessoa, p. 588 – 589, 2006. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/532041/1/AACProdutosregionais.pdf> . Acesso em: 22 mai. 2021.

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

ESCAREÑO, L.; SALINAS-GONZALEZ, H.; WURZINGER, M.; INIGUEZ, L.; SOELKNER, J.; MEZA-HERRERA, C. Dairy goat production systems. **Tropical Animal Health and Production**, v. 45, p. 17-34, 2012. doi.org/10.1007/s11250-012-0246-6.

FONTENELLE, M.A.; EGITO, A.S.; BASTOS, M.S.R. Estudo eletroforético do queijo Coalho de Jaguaribe. In: CONGRESSO PAN-AMERICANO DO LEITE, 11. 2010, Belo Horizonte. **Anais ...**, Belo Horizonte: FEPAL: FEAMIG, 2010.

GALDINO, I. K. C. P. O. **Comportamento de culturas nativas de lactobacilos com potencial probiótico em leite de cabra fermentado adicionado de *Cereus jamacaru* e sua resistência às condições gastrintestinais *in vitro***. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2019.

GOMES, V. LIBERA, A. M. M. P. D; MADUREIRA, K. M; ARAÚJO, W. P. Influência do estágio de lactação na composição do leite de cabras (*Capra hircus*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 05, p. 340-342, 2004.

GONZÁLEZ-MARTÍN, M. I.; PALACIOS, V. V.; REVILLA, I.; VIVAR-QUINTANA, A. M.; HERNÁNDEZ-HIERRO, J. M. Discrimination between cheeses made from cow's, ewe's and goat's milk from unsaturated fatty acids and use of the canonical biplot method. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 56, p. 34-40, 2017. Disponível em: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201800312115>. Acesso em: 19 de maio 2021.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**. v. 11, p. 506–514, 2014.

HUPPERTZ, T., FOX, P. F., KELLY, A. L. The caseins: structure, stability, and functionality. In YADA, R. Y. **Proteins in food processing**. 2. ed. Cambridgeshire: Woodhead Publishing, 2018. p. 49–92.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Pecuária Municipal**. 2016. Disponível em: Acesso em out. 2021.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v. 45, p. 6, 2017. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2017_v45_br_informativo.pdf>. Acesso em: 08 mai. 2021.

KUMARI, M.; SHARMA, A.; JAGANNADHAM, M. V. Religiosin B, a milk-clotting serine peptidase from *Ficus religiosa*. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 131, p. 1295-1303, 2012.

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.

LIMA, M. E. O., GONDIM, V. I. L., MORAES, I. V. M., SOUZA, A. C. R., NETO, R. M. S., ABREU, F. A. P., EGITO, A. S. Microfiltração como pré-concentração de enzimas coagulantes do leite obtidas a partir de extrato de girassol. **Anais do I Simpósio de Processos de Separação com Membranas**. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/747889/1/RE09207.pdf>. Acesso em: 22 de maio de 2021.

LIMA, T. L. S. et al. Padronização do processamento de queijo Coalho caprino condimentado com cumaru produzido por agroindústria na Paraíba. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, [s.l.], v. 12, n. 3, p. 562-567, 2017. Disponível em: DOI: <https://doi.org/10.18378/rvads.v12i3.5051>. Acesso em: 19 de maio de 2021.

LIN, S.; SUN, J.; CAO, D.; CAO, J.; JIANG, W. Distinction of different heat-treated bovine milks by native-PAGE fingerprinting of their whey proteins. **Food Chemistry**, v. 121, n. 3, p. 803-808, 2010.

MAGENIS, R. B. **Avaliação das propriedades físico-químicas, reológicas e do perfil eletroforético por SDS-PAGE de queijo minas frescal**. 116 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, 2015.

MAMUAD, L. L. KIM, S. H.; CHOI, Y.I.; SORIANO, A. P.; CHO, K. K.; LEE, K.; BAE, G. S.; LEE, S. S. Increased propionate concentration in *Lactobacillus mucosae*-fermented wet brewers grains and during *in vitro* rumen fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, Hoboken, v. 123, p. 29-40, 2017.

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.

NARIMATSU, A.; DORNELLAS, J. R. F.; SPADOTI, L. M.; PIZAIA, P. D.; ROIG, S. M. Avaliação da proteólise e do derretimento do queijo prato obtido por ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 177–182, 2003.

PAL, M., DUDHREJIYA, P., PINTO, S. Goat milk products and their significance. **Beverage & Food World**, 44(7), 21-25.

PIETRO, C. A.; GUADIX, A.; GONZÁLEZ-TELLO P.; GUADIX, E. M. A cyclic batch membrane reactor for the hydrolysis of whey protein. **Journal of Food Engineering**, v. 78, 1. ed. p. 257-26, 2007.

QUIRINO, V. M. S. **Viabilidade de Coagulação de Leite de Cabra com Protease Vegetal para a Elaboração de Queijo com Potencial Probiótico e Antioxidante**. 2021. 40f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2021.

RAMOS, M. P. J. C. **Comparação dos parâmetros de qualidade de queijos de leite de cabra e de leite de vaca avaliados por alunos do ensino fundamental**. 2017. 44 f. Monografia (Graduação em Zootecnia) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2017.

RIBEIRO, A. C.; RIBEIRO, S. D. A. Specialty products made from goat milk. **Small Ruminant Research.**, v. 89, p. 225-33, 2010.

SILVEIRA, S. R. **Desenvolvimento, validação tecnológica e produção de queijo a partir de coalho oriundo da *Calotropis procera***. 2020. 156 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2020.

TEODORO, N. X.; PEREIRA, A. M. S.; SANTOS, K. M. O.; BURITI, F. C. A. Aplicação da biotecnologia na produção e desenvolvimento de alimentos funcionais: uma revisão. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 37, n. 1, jun. 2021.

VEIROS, C. B. R. **Contributo para a caracterização do queijo Terrincho: estudo da proteólise e avaliação da autenticidade por HPLC/UV**. Dissertação (Mestrado em Controlo da Qualidade em Água e Alimentos) – Universidade do Porto, Porto, 2005.

ZHENG, J., WITTOUCK, S., SALVETTI, E., FRANZ, C. M. A. P., HARRIS, H. M. B., MATTARELLI, P., O'TOOLE, P. W., POT, B., VANDAMME, P., WALTER, J., WATANABE, K., WUYTS, S., FELIS, G. E., GÄNZLE, M. G., LEBEER, S. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782-2858, (2020).