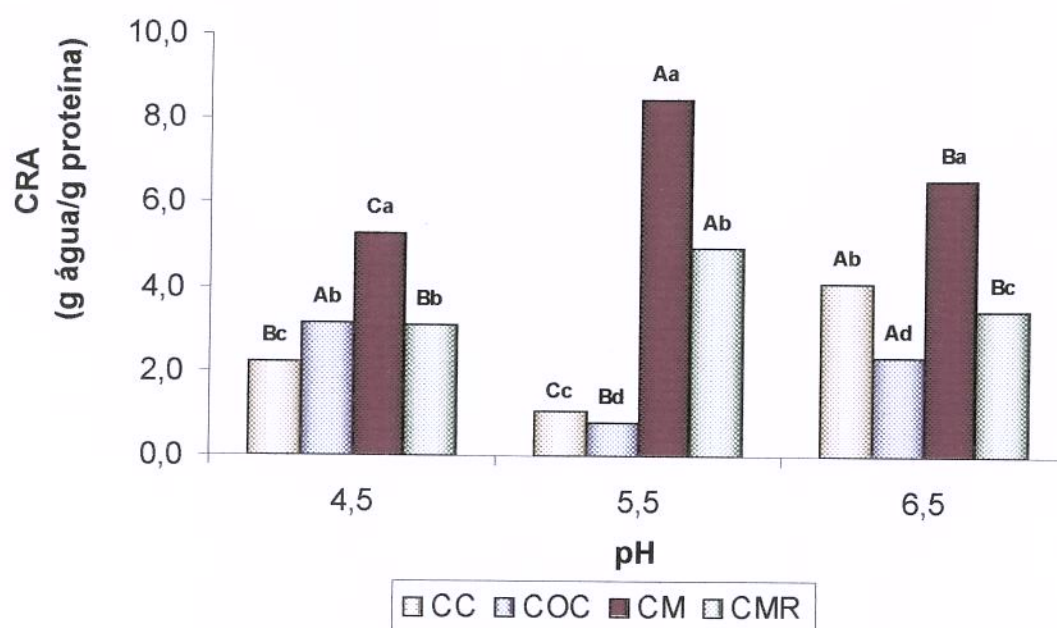


ERRATA

Página	Linha/ilustração	Onde se lê	Leia-se
xxix	8	Todas	Todos
xxxi	12	capacity casein, due	capacity and emulsifying properties. The rennet casein, due
xxxi	17	dot	not
4	7	protéica	proteína
25	4	aumenta	aumentam
38	19	à	há
49	7	calorimétrica	colorimétrica
49	9	espectofotometro	espectrofotômetro
62	1	eficiência protéica	eficiência líquida da proteína
63	Tabela 2.6-título	coeficiente	quociente
86	11	solubilidad e	solubilidade
86	13	deferentes	diferentes
94	6	caseína comercial	caseína micelar
94	7	a caseína micelar reconstituída	o coágulo de caseína
105	5	drenagem do soro de espuma	drenagem de espuma
119	3	nsolúveis	insolúveis
142	Tabela 5.2	5,7; 12,8; 20,1	12,8: 20,1%; 5,7%
147	15	Não houve	Houve
154	7	na figura 5.11	na tabela 5.3

Pg 84.





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE PLANEJAMENTO ALIMENTAR E NUTRIÇÃO

*“Propriedades físico-químicas, nutritivas e
funcionais da caseína de leite bovino
obtida por diferentes processos”*

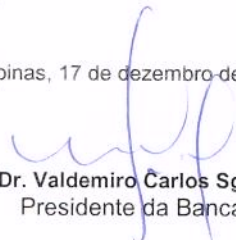
Janesca Alban Roman
Tecnóloga em Alimentos

Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
Orientador

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Janesca Alban Roman** aprovada pela Comissão Julgadora em 17 de dezembro de 2002.

Campinas, 17 de dezembro de 2002.


Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
Presidente da Banca

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de mestre em Alimentos e Nutrição.

Campinas, 2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

200207529

UNIDADE BC
 Nº CHAMADA UNICAMP
R661p
 V EX
 TOMBO BC/ 527 26
 PROC 16-124103
 C D 8
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 15/03/03
 Nº CPD _____

CM00181005-5

18 ID 284945

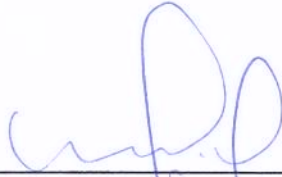
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

R661p Roman, Janesca Alban
 Propriedades físico-químicas, nutritivas e funcionais da
 caseína de leite bovino obtida por diferentes processos / Janesca
 Alban Roman. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

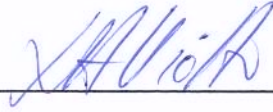
Orientador: Valdemiro Carlos Sgarbieri
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
 Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Caseína. 2.Coagulação. 3.Hidrólise. 4.Funcionalidade.
 I.Sgarbieri, Valdemiro Carlos. II.Universidade Estadual de
 Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
(Orientador) FEA/UNICAMP



Prof. Dr. Luiz Antonio Viotto
(Membro) FEA/UNICAMP



Dra. Vera Lucia Signoreli Baldini
(Membro) ITAL

Prof. Dra. Flávia Maria Neto
(Membro) FEA/UNICAMP

*Ao meu esposo Evandro, aos meus
pais Sérgio e Cledis por todo o
carinho, compreensão, paciência,
apoio e incentivos hoje e sempre!*

Dedico

AGRADECIMENTOS

*À Faculdade de Engenharia de Alimentos / UNICAMP,
especialmente ao Departamento de Alimentos e Nutrição
pela oportunidade profissional e pessoal.*

*À FAPESP,
pelo auxílio financeiro indispensável
à realização desta pesquisa
(processo n° 00/10806-2).*

*Ao ITAL,
Ao Centro de Química - Bioquímica,
pela disposição dos laboratórios e equipamentos
essenciais para a execução deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*A DEUS,
que em seu infinito amor
me deu a vida e a NOSSA SENHORA
pela constante proteção.*

*À minha família,
gratidão é a única palavra
que pode exprimir a síntese de meus
sentimentos ao final desta jornada.
Obrigada por compreenderem minha ausência.*

*Agradeço com carinho minhas irmãs Sergiane e Fernanda,
meu cunhado Celso, minha vó Gema e a minha tia Zizele
por toda a compressão e pelas orações.*

*Ao Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri,
pela excelente orientação na execução deste trabalho.*

*Aos professores membros da banca,
pelas sugestões e contribuições apresentadas.*

*Ao Alexandre ,
pesquisador do CPQBA, pela colaboração.*

*As amigas Renata, Luciana e Ana Maria,
pela convivência nas aulas de francês e pelos valiosos conselhos,
Merci beaucoup.*

*As companheiras de laboratório,
Ana, Caroline, Denise, Eunice, Helaine, Izabela, Leonice,
Leonidea, Margareth, Nádia, Renata, Saula e Tereza
pelo apoio durante a execução do trabalho
e pelos valiosos momentos de convivência.*

*Aos amigos e funcionários do Centro de Química - Bioquímica,
Ana Rauen, Beth Gomes, Bete Lima, Ciça, Ercília, Kátia,
Luzimara, Renato, Renatinho, Sandra e Vera
pelas imprescindíveis orientações.*

*Às amigas do DEPAN,
Eliana, Elisabete, Cida, Karla, Larissa, Vera, Renata,
pela amizade e apoio.*

*Aos amigos da Informática
especialmente a Fátima, Carlinhos e Estefani
pelas contribuições.*

*Ao amigo Fábio (Sorriso)
por sempre estar disposto a ajudar.*

*A todos os amigos (as) que encontrei neste caminho,
que ao partirem levam um pouco de nós,
mas com certeza deixam um pouco de si,
Muito obrigada.*

*A todos que contribuíram
de uma forma ou de outra para a realização desta pesquisa.*

Meu muito obrigada e gratidão eterna!

Janesca

*“Sem esforço de nossa parte,
jamais atingiremos
o alto da montanha.
Não desanime no
meio da estrada:
siga à frente,
porque os horizontes se
tornarão amplos e maravilhosos à
medida que for subindo.
Mas não se iluda,
pois só atinge o topo da montanha
se estiver decidido a enfrentar o
esforço da caminhada”.*
(Carlos Torres Pastorino)

*“Não ignoramos tudo e
nem sabemos tudo,
mas estamos
aprendendo sempre”.*
(Paulo Freire)

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	xix
LISTA DE FIGURAS	xxiii
RESUMO GERAL.....	xxix
GENERAL SUMMARY.....	xxxi
 INTRODUÇÃO GERAL.....	 1
 CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	 7
1.1. CASEÍNA	9
1.2. OBTENÇÃO DA CASEÍNA	13
1.3. PROPRIEDADES FUNCIONAIS	16
1.3.1. Propriedades hidrofílicas	19
1.3.2. Propriedades de superfície.....	20
1.4. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	23
1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
 CAPÍTULO 2. OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E NUTRICIONAL DE DIFERENTES CONCENTRADOS DE CASEÍNA	 35
RESUMO	37
2.1. INTRODUÇÃO	38
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	40
2.2.1. Matéria-prima	40
2.2.2. Métodos	40
2.2.2.1. <i>Produção de caseína pela coagulação enzimática.....</i>	40
2.2.2.2. <i>Produção de micelas de caseína a partir do leite em pó (CMR).....</i>	43
2.2.2.3. <i>Produção de micelas de caseína a partir do leite “in natura”(CM)....</i>	45
2.2.2.4. <i>Caracterização química</i>	48
2.2.2.5. <i>Avaliação nutricional em ratos</i>	50
2.2.2.6. <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida</i>	56
2.2.2.7. <i>Análise estatística</i>	57

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
2.3.1. Fluxo de permeado da caseína micelar obtida leite bovino	58
2.3.2. Composição centesimal	59
2.3.3. Composição de aminoácidos	60
2.3.4. Avaliação nutricional	61
2.3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	64
2.4. CONCLUSÕES.....	68
2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

CAPÍTULO 3. PROPRIEDADES FUNCIONAIS HIDROFÍLICAS DE DIFERENTES CONCENTRADOS DE CASEÍNA	73
RESUMO	75
3.1. INTRODUÇÃO	76
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	78
3.2.1. Material	78
3.2.2. Métodos	78
3.2.2.1. Capacidade de absorção espontânea de água (CAA)	78
3.2.2.2. Capacidade de absorção espontânea de óleo (CAO).....	79
3.2.2.3. Capacidade de retenção de água (CRA).....	80
3.2.2.4. Solubilidade (%SP)	80
3.2.2.5. Análise estatística	81
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
3.3.1. Capacidade de absorção espontânea de água e óleo	82
3.3.2. Capacidade de retenção de água	84
3.3.3. Solubilidade (%Sp)	85
3.4. CONCLUSÕES	94
3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

CAPÍTULO 4. PROPRIEDADES FUNCIONAIS ESPUMANTES E EMULSIFICANTES DE DIFERENTES CONCENTRADOS DE CASEÍNA ...	99
RESUMO	101
4.1. INTRODUÇÃO	102

4.2. MATERIAL E MÉTODOS	104
4.2.1. Material	104
4.2.2. Métodos	104
4.2.2.1. <i>Capacidade espumante e estabilidade da espuma</i>	104
4.2.2.2. <i>Capacidade emulsificante e estabilidade de emulsão</i>	106
4.2.2.3. <i>Análise estatística</i>	107
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	108
4.3.1. Propriedades espumantes	108
4.3.2. Propriedades emulsificantes	117
4.4. CONCLUSÕES	122
4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
 CAPÍTULO 5. EFEITO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA SOBRE AS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO COÁGULO DE CASEÍNA.....	 127
RESUMO	129
5.1. INTRODUÇÃO	130
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	131
5.2.1. Material	131
5.2.2. Métodos	131
5.2.2.1. <i>Obtenção dos hidrolisados</i>	131
5.2.2.2. <i>Determinação do grau de hidrólise (GH)</i>	133
5.2.2.3. <i>Determinação do nitrogênio solúvel em TCA</i>	134
5.2.2.4. <i>Composição dos hidrolisados</i>	134
5.2.2.5. <i>Eletroforese</i>	135
5.2.2.6. <i>Propriedades funcionais hidrofílicas</i>	135
5.2.2.6.1. <i>Capacidade de absorção espontânea de água (CAA)</i>	135
5.2.2.6.2. <i>Capacidade de retenção de água (CRA)</i>	136
5.2.2.6.3. <i>Solubilidade</i>	136
5.2.2.7. <i>Propriedades de superfície</i>	137
5.2.2.7.1. <i>Formação de espuma</i>	137
5.2.2.7.2. <i>Estabilidade da espuma</i>	138
5.2.2.7.3. <i>Capacidade emulsificante (CE)</i>	138

5.2.2.7.4. Estabilidade de emulsão	138
5.2.2.8. <i>Análise estatística</i>	139
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	140
5.3.1. Obtenção dos hidrolisados e determinação do grau de hidrólise	140
5.3.2. Composição dos hidrolisados	142
5.3.3. Eletroforese	143
5.3.4. Propriedades hidrofílicas	145
5.3.4.1. <i>Capacidade de absorção espontânea de água (CAA)</i>	145
5.3.4.2. <i>Capacidade de retenção de água (CRA)</i>	145
5.3.4.3. <i>Solubilidade protéica (%SP)</i>	147
5.3.5. Propriedades de superfície	149
5.3.5.1. <i>Propriedades espumantes</i>	149
5.3.5.2. <i>Propriedades emulsificantes</i>	152
5.4. CONCLUSÕES	155
5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	156
 CONCLUSÕES GERAIS	 161

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Principais características físico-químicas das caseínas.....	10
Tabela 1.2	Classificação das propriedades funcionais.....	18
Tabela 1.3	Fatores que afetam a hidrólise enzimática das proteínas.....	25
Tabela 2.1	Composição básica da dieta, segundo AIN-93G para ratos em crescimento.....	51
Tabela 2.2	Mistura mineral AIN G-MX.....	52
Tabela 2.3	Formulação da mistura vitamínica AIN-93 VX.....	53
Tabela 2.4	Composição centesimal e determinação de cálcio do coágulo de caseína (COC), caseína comercial (CC), caseína micelar reconstituída (CMR), caseína micelar (CM) todos em base seca.....	59
Tabela 2.5	Composição de aminoácidos essenciais dos produtos: caseína comercial (CC), coágulo de caseína (COC), caseína micelar (CM) e caseína micelar reconstituída (CMR), e o padrão de referência da FAO/WHO (1990).....	61
Tabela 2.6	Valores obtidos da ingestão de dieta, ingestão de proteína, ganho de peso e quociente de eficiência protéica (PERop) e coeficiente de eficiência líquida da proteína (NPR) na caseína comercial (CC), coágulo de caseína (COC) e caseína micelar (CM), foram avaliados em ratos Wistar recém-desmamados mantidos em experimento por 21 dias.....	63

Tabela 2.7	Valores obtidos para digestibilidade verdadeira, nitrogênio ingerido e nitrogênio fecal para a caseína comercial (CC), coágulo de caseína (COC) e caseína micelar (CM).....	63
Tabela 3.1	Valores obtidos para a solubilidade em ausência de sais a 25°C com variação do pH, sendo CC (caseína comercial), COC (coágulo de caseína), CM (caseína micelar) e CMR (caseína micelar de leite em pó reconstituído).....	86
Tabela 3.2	Valores obtidos para a solubilidade do coágulo de caseína em água a 25°C com variação do pH e da concentração de sal (NaCl e CaCl ₂).....	87
Tabela 3.3	Valores obtidos para a solubilidade da caseína micelar obtida do leite em pó reconstituído (CMR) com variação do pH e da concentração de sal.....	90
Tabela 3.4	Valores obtidos para a solubilidade do coágulo de caseína 25, 35 e 45°C nas diferentes concentrações de cloreto de sódio ou de cálcio.....	93
Tabela 4.1	Parâmetros que descrevem a drenagem do líquido da espuma de dispersões de 3% de proteína da caseína micelar (CM).....	113
Tabela 4.2	Parâmetros que descrevem a drenagem do líquido da espuma de dispersões de 3% de proteína da caseína comercial (CC).....	113
Tabela 4.3	Razão entre a capacidade de absorção de água (CAA) e a capacidade de absorção de óleo (CAO) para a caseína comercial (CC), coágulo de caseína (COC) e caseína micelar (CM).....	121
Tabela 5.1	Determinação do grau de hidrólise por diferentes métodos dos produtos obtidos a partir do coágulo de caseína.....	142

Tabela 5.2	Composição dos hidrolisados comparados ao coágulo de caseína (COC), quanto o teor de proteína, umidade e cinzas.....	142
Tabela 5.3	Resultados obtidos para capacidade emulsificante (CE) e estabilidade da emulsão (EE) para o coágulo de caseína e o hidrolisado com GH 5,7%.....	153

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Seqüência primária da κ -para-caseína (resíduos 1 a 105) e do glicomacropeptídeo (resíduos 106-169) da κ -caseína. A seta indica o sítio de ação da quimosina. Adaptado por Kinsella, 1989 (Lourenço, 2000).....	12
Figura 1.2	Representação esquemática da reação de coagulação do leite. a) micelas com revestimento de k-caseína intacto; b) remoção parcial da k-caseína pela quimosina (Q); c) remoção final da k-caseína e início da reação de agregação micelar.....	14
Figura 1.3	Representação Esquemática do Processo de Membranas (Marshall & Harper, 1988).....	15
Figura 2.1	Etapas iniciais dos processos de obtenção do coágulo de caseína (COC). a) homogeneização e aquecimento do leite a 30-35°C e b) “grânulos” de caseína após o corte da massa com liras (horizontais e verticais).....	41
Figura 2.2	Obtenção do coágulo de caseína desidratado (COC) através do processo de coagulação enzimática do leite bovino.....	42
Figura 2.3	Equipamentos utilizados para promover a secagem a) spray-dryer e b) liofilizador, respectivamente para obtenção do coágulo de caseína e micelas de caseína.....	43
Figura 2.4	Obtenção das micelas de caseína a partir do leite em pó reconstituído (CMR) por microfiltração, seguido de diafiltração e liofilização.....	44
Figura 2.5	Obtenção das micelas de caseína por microfiltração seguido de diafiltração a partir do leite bovino fluido.....	46

Figura 2.6	Membranas poliméricas utilizadas para promover a separação das micelas de caseína das proteínas do soro no leite bovino..	47
Figura 2.7	Equipamento utilizado para promover a etapa de microfiltração na obtenção das micelas de caseína.....	47
Figura 2.8	Fluxo de permeado da caseína micelar (CM) obtida de leite bovino fluído.....	58
Figura 2.9	Curva de crescimento de ratos alimentados por 21 dias com dietas contendo 10% de proteína proveniente de caseína comercial (CC), coágulo de caseína (CC), caseína micelar (CM) e dieta isenta de proteína (APRO).....	62
Figura 2.10	Eletroforese em gel de poliacrilamida dos concentrados de caseína a) URÉIA-PAGE e b)SDS-PAGE. (1a) caseinato de sódio, (1b) padrão (Pharmacia™), (2) caseína comercial, (3) coágulo de caseína, (4) caseína micelar obtida do leite fluído e (5) caseína micelar obtida do leite em pó reconstituído.....	66
Figura 3.1	Equipamento utilizado para medir a capacidade de absorção espontânea de água (CAA) e de óleo (CAO). a) pipeta graduada, b) mangueira de silicone, 30 cm de comprimento e c) funil de porcelana.....	79
Figura 3.2	Representação gráfica da capacidade de absorção espontânea de água em função do tempo para as amostras de caseína comercial (CC), coágulo de caseína (COC), caseína micelar (CM) e caseína micelar do leite em pó reconstituído (CMR).....	83
Figura 3.3	Representação gráfica da capacidade de absorção espontânea de óleo para as amostras: caseína comercial (CC), coágulo de caseína (COC), caseína micelar (CM), caseína micelar reconstituída (CMR).....	83

Figura 3.4	Representação gráfica da capacidade de retenção de água (CRA) em função do pH para a caseína comercial (CC), coágulo de caseína (COC), caseína micelar (CM) e caseína micelar do leite em pó reconstituído (CMR). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas a 5% de probabilidade. Letras minúsculas se referem aos diferentes hidrolisados no mesmo pH e as letras maiúsculas indicam o mesmo concentrado em diferentes pHs.....	84
Figura 3.5	Representação do perfil de solubilidade do coágulo de caseína (COC) à 25°C, em diferentes pHs e concentrações de solução de cloreto de sódio.....	88
Figura 3.6	Representação do perfil de solubilidade do coágulo de caseína (COC) à 25°C, em diferentes pHs e concentrações de solução de cloreto de cálcio.....	88
Figura 3.7	Representação do perfil de solubilidade da CMR á 25°C, a diferentes pHs e diferentes concentrações de solução de cloreto de sódio.....	91
Figura 3.8	Representação do perfil de solubilidade da CMR a 25°C, à diferentes pHs e diferentes concentrações de solução de cloreto de cálcio.....	91
Figura 4.1	Representação gráfica da capacidade de expansão de espuma (%CESP) para caseína micelar (CM). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas. Letras minúsculas mesmo pH em função da concentração de NaCl. Letras maiúsculas nos diferentes pHs para a mesma concentração de NaCl.....	109

Figura 4.2	Representação gráfica da capacidade de expansão de espuma (%CESP) para caseína comercial (CC). Letras minúsculas mesmo pH em função da concentração de NaCl. Letras maiúsculas nos diferentes pHs para a mesma concentração de NaCl.....	109
Figura 4.3	Representação gráfica da estabilidade da espuma (%EEs) após 30 e 60 minutos para a caseína micelar (CM) em função da concentração de NaCl e do pH. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p > 0,05$).....	111
Figura 4.4	Representação gráfica da estabilidade da espuma (%EEs) após 30 e 60 minutos para a caseína comercial (CC) em função da concentração de NaCl e do pH. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p > 0,05$).....	111
Figura 4.5	Representação gráfica da estabilidade da espuma para a caseína comercial (CC) e para a caseína micelar (CM) em função da concentração de sal e em pH 4,0. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas na estabilidade após 60 min.....	115
Figura 4.6	Representação gráfica da estabilidade da espuma para a caseína comercial (CC) e para a caseína micelar (CM) em função da concentração de sal e em pH 6,0. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas na estabilidade após 60 min.....	116
Figura 4.7	Representação gráfica da estabilidade da espuma para a caseína comercial (CC) e para a caseína micelar (CM) em função da concentração de sal e em pH 8,0. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas na estabilidade após 60 min.....	116

Figura 4.8	Representação gráfica da capacidade emulsificante (CE) para a caseína comercial (CC), coágulo de caseína (COC) e para a caseína micelar (CM) em função do pH. Letras minúsculas indicam resultados estatísticos para as diferentes amostras em cada pH. Letras maiúsculas mostram resultados da estatística para cada amostra em diferentes pHs.....	118
Figura 4.9	Representação gráfica da estabilidade da emulsão (EE) para a caseína comercial (CC), coágulo de caseína (COC) e para a caseína micelar (CM) em função do pH. Letras minúsculas indicam resultados estatísticos para as diferentes amostras em cada pH. Letras maiúsculas mostram resultados da estatística para cada amostra em diferentes pHs.....	120
Figura 5.1	Fluxograma que representa a obtenção dos hidrolisados a partir do coágulo de caseína (COC), através da hidrólise enzimática com a Flavourzyme.....	132
Figura 5.2	Representação gráfica da influência da relação [enzima]/[substrato] sobre a hidrólise enzimática do coágulo de caseína. Condições de hidrólise: [S]=8% proteína; enzima Flavourzyme 500L; T=38°C; pH inicial= 7,0, sem ajuste do pH durante a reação; volume de reação=200mL.....	141
Figura 5.3	Eletroforese em gel de poliacrilamida dos concentrados de caseína C4% e S12% a) SDS-PAGE e b) SDS-PAGE com gradiente 10-16%. (1) padrão (Pharmacia), (2) coágulo de caseína, (3) GH 5,7%, (4) GH 12,8%, (5) GH 20,1% e (6) GH 35,8%.....	144
Figura 5.4	Representação gráfica da capacidade de absorção espontânea de água (CAA) em função do tempo para o coágulo de caseína (COC) e seus hidrolisados. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas na CAA após 30 min	146

Figura 5.5	Representação gráfica da capacidade de retenção de água (CRA) em função do tempo do pH para o coágulo de caseína (COC) e seus hidrolisados GH I, GH II, GH III E GH IV, respectivamente: 5,7; 12,8; 20,1 e 35,8%. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas na CRA em pH 6.5.....	146
Figura 5.6	Representação do perfil de solubilidade do coágulo de caseína (COC) e seus hidrolisados em pH 6,5 e a 25°C. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas na solubilidade nas concentrações de cloreto de sódio (0,00; 0,05; 0,10 e 0,15M)...	148
Figura 5.7	Representação gráfica da capacidade de expansão de espuma (%CESP) para os três diferentes hidrolisados do coágulo de caseína em pH 6,0 e em função de diferentes concentrações de cloreto de sódio. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística a 5% de probabilidade. Letras minúsculas se referem a cada hidrolisado nas diferentes concentrações salinas e as maiúsculas para diferentes hidrolisados na mesma concentração de sal.....	149
Figura 5.8	Representação gráfica da estabilidade da espuma do hidrolisado GH 5,7% em função da concentração de NaCl em pH 6,0. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas do líquido drenado após 300 seg.....	150
Figura 5.9	Representação gráfica da estabilidade da espuma do hidrolisado com GH 12,8% em função da concentração de NaCl e em pH 6,0. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas na estabilidade da espuma após 60 seg.....	151
Figura 5.10	Representação gráfica da estabilidade da espuma do hidrolisado com GH 20,1% em função da concentração de NaCl e em pH 6,0. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas na estabilidade da espuma após 60 seg.....	151

RESUMO GERAL

Os concentrados de caseína de leite bovino utilizados neste trabalho foram obtidos por diferentes processos: caseína coagulada enzimaticamente, coágulo de caseína (COC), caseína micelar obtida por microfiltração/diafiltração do leite fluido (CM) e do leite em pó reconstituído (CMR). Essas preparações foram comparadas quando às características físico-químicas, nutricionais e funcionais com a caseína comercial (CC). O coágulo de caseína também foi hidrolisado (enzima Flavourzyme) e os graus de hidrólises (GH) obtidos foram: 5,7; 12,3; 20,1 e 35,8%. Todos os concentrados de caseína utilizados neste estudo apresentaram perfil de aminoácidos essenciais que atenderam ao padrão de referência da FAO/WHO para crianças na faixa etária de 2 a 5 anos e elevado valor nutritivo para ratos em crescimento. A caseína micelar apresentou solubilidade entre 75-95%, absorção, retenção de água e estabilidade da espuma superiores aos demais concentrados. A caseína comercial mostrou-se superior quanto à capacidade de formação de espuma e as propriedades emulsificantes. O coágulo de caseína, devido à sua baixa solubilidade, de modo geral inferior a 20%, não apresentou resultados satisfatórios quanto às suas propriedades funcionais. Em relação aos hidrolisados da caseína coagulada (COC), observou-se que, quanto maior o grau de hidrólise maior a solubilidade da proteína e menor a capacidade de retenção de água. A hidrólise enzimática melhorou a capacidade de formação de espuma com os GH 5,7; 12,8 e 20,1% tendo atingido seu máximo com GH 12,8%. O aumento do GH causou diminuição na estabilidade da espuma. O hidrolisado com GH 35,8% não formou nem espuma nem emulsão. A estabilidade da emulsão foi melhorada com GH 5,7%, uma vez que os demais hidrolisados não apresentaram propriedades emulsificantes.

GENERAL SUMMARY

The bovine milk casein concentrates utilized in this work were obtained by different process: enzymatically coagulates casein (COC), casein micelles obtained by microfiltration/diafiltration (CM), and casein micelles obtained from reconstitutes powered milk (CMR). These preparations were compared to a commercial casein (CC) as to physicochemical characteristics, nutritional and functional properties, The coagulated casein was also hydrolyzed (flavourzyme) to the following degrees of hydrolysis: 5.7, 12.3, 20.1 and 35.8%. All casein concentrates utilized showed essential amino acid profile, which reached the FAO/WHO standard for children 2 to 5 years of age and high nutritive value for the growing rat. The casein micelles showed solubility water absorption and water retention, and foam stability superior to the other concentrates. The commercial casein showed superior foaming capacity casein, due to its low solubility (< 20%), did not show satisfactory functional properties. Regarding the coagulates casein hydrolysates, it was demonstrated that solubility was proportional to the degree of hydrolysis. Enzymatic hydrolysis (GH 5.7, 12.8, 20.1%) improved foaming capacity with its maximum at 12.8% DH. Foam stability decreased with increased DH. The hydrolysate with 35.8% DH did not form foam nor emulsion. Emulsion stability was good for the hydrolysates with 5.7% DH. All other hydrolysates did not form emulsions.

Introdução Geral

INTRODUÇÃO GERAL

Vários estudos têm sido conduzidos com diferentes tipos de proteínas, no sentido de melhorar ou ampliar seu uso como ingrediente funcional (Haque, 1993). As proteínas do leite são usadas como valiosos ingredientes alimentícios, devido ao seu elevado valor nutricional e funcional (Mulvihill, 1992; Jayaprakasha & Brueckner, 1999).

Entre as diversas propriedades funcionais diretamente relacionadas ao uso das proteínas lácteas como ingredientes, destaca-se a solubilidade, capacidade de hidratação e retenção de água, propriedades emulsificantes e espumantes (Furtado et al., 2001). O leite bovino possui 80% de suas proteínas na forma de caseína e apenas 20% como proteínas do soro (Sgarbieri, 1996).

A caseína é um dos mais importantes derivados do leite e é essencial na produção de muitos alimentos formulados (Early, 1998) como bebidas, queijos processados, produtos para confeitarias, indústria de chocolates, produtos fermentados, sobremesas, pastas, sopas, cereais matinais e produtos cárneos (Evans, 1982; Mulvihill, 1992; Southward, 1989, 1994).

Além do elevado valor nutritivo, as caseínas conferem aos produtos formulados melhor aparência e melhores propriedades sensoriais, em virtude de suas propriedades funcionais (Lawson, 1994).

Sabendo que os métodos de obtenção / processamento da caseína alteram a estrutura da proteína e pelo fato de se encontrar na literatura poucos estudos com propriedades funcionais envolvendo a caseína micelar e a caseína obtida pela coagulação enzimática, surgiu o interesse em estudar as propriedades funcionais tecnológicas de concentrados de caseína obtidos por diferentes processos e avaliar as possíveis semelhanças ou diferenças comparando-as com uma caseína comercial.

Neste trabalho, os principais objetivos foram: a) produzir concentrados de caseína através de diferentes processos, coagulação enzimática (coágulo de caseína – COC) e por microfiltração/diafiltração do leite bovino fluido (caseína micelar – CM) e do leite em pó reconstituído (caseína micelar reconstituída-CMR); b) caracterização física e química das frações protéicas obtidas; c) determinação de índices de avaliação nutricional, quociente de eficiência protéica (PERop), quociente de eficiência líquida da protéica (NPR), escore químico de aminoácidos essenciais (EAE), digestibilidade verdadeira (DV) e EAE corrigido pela digestibilidade verdadeira (PDCCAS), para os concentrados obtidos em planta piloto comparativamente a uma caseína comercial (CC); d) estudar propriedades funcionais como a solubilidade, capacidade de absorção e retenção de água, capacidade de emulsificação e capacidade espumante; e) verificar os efeitos da hidrólise enzimática controlada sobre as propriedades da caseína obtida por coagulação enzimática (COC).

O presente trabalho encontra-se dividido em cinco capítulos. O capítulo 1 aborda uma revisão de literatura sobre a importância da caseína, métodos de processamento, propriedades funcionais de interesse tecnológico e hidrólise enzimática. O capítulo 2 trata da obtenção dos concentrados de caseína por diferentes processos, bem como a caracterização química e nutricional destes materiais. Nos capítulos 3 e 4 foram avaliadas as propriedades funcionais hidrofílicas e as de superfície e finalmente no capítulo 5 estudou-se os efeitos da hidrólise enzimática sobre as propriedades funcionais da caseína obtida por coagulação enzimática (COC).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

EARLY, R. The technology of dairy products. 2º ed. Blackie Academic & Professional, 1998.

EVANS, E.W. Uses of milk protein in formulated foods. In: Development in Food Proteins –I. London: Applied Science Publisher Ltd, Cap. 4, p.131-169, 1982.

FURTADO, M.A.M.; GOMES, J.C.; SILVA, C.A.S.; ORNELLAS, C.B.; SILVESTRE, M.P.C. Propriedades funcionais de hidrolisados de proteína lácteas co-precipitada. **Ciência Agrotécnica**. Lavras, v.25, n.3, p.625-639, 2001.

HAQUE, Z. U. Influence of milk peptides in determining the functionality of milk proteins; a review. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v.76, n.1, p.311-320, 1993.

JAYAPRAKASHA, H.M.; BRUECKNER, H. Whey protein concentrate: a potential functional ingredient for food industry. **Journal of Food Science and Technology**. Oxford, v.36, n.3, p.189-204, 1999.

LAWSON, M.A. Milk protein as food ingredients. **Food Technology**. Chicago, v.48, n.10, p.101, 1994.

MULVIHILL, D.M. Production, functional properties and utilization of milk protein products. In: Advanced Dairy Chemistry, vol.1 – proteins. London: Blackie Academic & Professional. Cap. 9, p.369-404, 1992.

SGARBIERI, V.C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações, São Paulo: Varela, 517 p., 1996.

SOUTHWARD, C.R. Uses of casein and caseinates. In: Developments in Dairy Chemistry. Vol.4. London: Elsevier Applied Science. Cap.5, p.173-244, 1989.

SOUTHWARD, C.R. Utilization of milk components: casein. In: Modern Dairy Technology. Vol 1. London: A Chapman & Hall, Cap.8, p.375-432, 1994.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. CASEÍNA

O leite é uma suspensão coloidal que contém uma dispersão de glóbulos de gordura, micelas de caseína e proteínas do soro em solução, lactose, minerais e outros pequenos constituintes (Singh et al., 1997). A composição do leite é bastante variável, em espécies diferentes, particularmente no que diz respeito aos teores de proteína, de gordura e lactose (Sgarbieri, 1996). Segundo Giese (1994), o leite bovino é composto de 87,5% de água, 3,5% de gordura; 4,5% de lactose; 1,0% de cinzas e 3,5% de proteínas.

O leite não é somente importante para a manufatura de produtos lácteos, mas também devido à sua múltipla funcionalidade e seu elevado valor nutricional (Spreer, 1998). Nutricionalmente, as proteínas são uma fonte de energia e aminoácidos, as quais são essenciais para o crescimento e manutenção (Giese, 1994) e, podem ser usadas em aplicações de formulações infantis, sucos de frutas enriquecidos com proteínas, barras de cereais e outras bebidas para esportistas com fins nutricionais (Lawson, 1994). Funcionalmente, as proteínas são importantes porque possuem propriedades únicas que conferem aos alimentos.

As proteínas do leite compreendem duas frações principais: caseínas, que se apresentam principalmente no estado coloidal; e proteínas do soro, que estão em solução (Scott et al., 1998). O leite tem um conteúdo de proteína, expresso como %N x 6,38, de 30-35 g proteína/litro. Ao redor de 78% destas proteínas são caseínas, que são organizadas na forma de micelas contendo 92% proteínas e 8% de sais inorgânicos, principalmente fosfato de cálcio (Rollema, 1992).

O termo micelas tem sido usado para designar as partículas dispersas do leite formado de uma mistura complexa de proteínas. A caseína micelar pode ser utilizada na produção de peptídios biologicamente ativos, tais como β -casomorfina, fosfopeptídios e peptídios envolvidos na imunomodulação (Fitzgerald, 1998; Paquin, 1998; Smithers, 1991; Southward, 1994). A caseína micelar contribui na melhoria do rendimento durante a produção de queijos e diminuição de perda de soro. Além de caseína, as micelas contêm elevada percentagem de fosfato de cálcio coloidal (Spreer, 1998), associado através de ligações não covalentes (Kruif, 1999).

Segundo o modelo de Walstra (1990), as micelas são formadas por submicelas, aproximadamente esféricas, agregando várias moléculas de caseína, com a seguinte relação: $\alpha_{s1} : \alpha_{s2} : (\beta + \gamma) : \kappa = 4 : 1 : 4 : 1$ mantidas unidas por interações hidrofóbicas e pontes salinas. Além disso, citrato, cálcio e principalmente o fosfato coloidal de cálcio são componentes que integram e coletivamente estabilizam a micela (Sgarbieri, 1996; Moreno et al., 2000). A tabela 1.1 ilustra, segundo Sgarbieri (1996), a composição protéica das frações caseína do leite bovino.

TABELA 1.1 – Principais características físico-químicas das caseínas

Fração Protéica	% Leite Desnatado	pH isoelétrico	Peso Molecular	Variantes Genéticos
Caseína α_{s1} (α_{s0} , α_{s2} , α_{s3} , α_{s4} e α_{s5})	45 - 55	4,1	23.613	A, B, C, D
Caseína β	23 - 35	4,5	24.000	A ₁ , A ₂ , A ₃ , B, C, D
Caseína κ	8 - 15	4,1	19.000	A, B
Caseína γ	3 - 7	5,8	21.000	
γ_1			20.500	A ₁ , A ₂ , A ₃ , B,
γ_2			11.800	A ₁ ou A ₂ , A ₃ , B,
γ_3			11.500	A ₁ ou A ₂ ou A ₃ , B,

Caseína α_s

As caseínas α_{s1} e α_{s2} são classificadas como cálcio-sensitivas, pois apresentam baixa solubilidade em concentrações de 0,4M de cloreto de cálcio em pH 7,0 e na temperatura de 4°C (Ginger & Grigor, 1999). As proteínas dessas duas famílias possuem estruturas secundárias pouco ordenadas, abertas e flexíveis, com baixo conteúdo de α -hélice e estruturas em conformação- β (7%); em razão dessas características estruturais, são pouco susceptíveis à desnaturação pelo calor (Lourenço, 2000).

Caseína α_{s1}

Formada por 199 resíduos de aminoácidos, apresenta peso molecular de 23.600 daltons (Luquet et al., 1991) e é a maior fração de proteína do leite bovino. Esta é uma proteína bastante fosforilada, a qual possui de 8-9 ligações de grupos fosfato/mol (Ginger & Grigor, 1999). Contém um segmento hidrofílico (resíduos 43-70) com elevada densidade de cargas. Os segmentos 1-42 e 80-199 apresentam caráter hidrofóbico. É bastante rica em prolina, o que dificulta a formação em α -hélice (Sgarbieri, 1996).

Caseína α_{s2}

Formada por 207 resíduos de aminoácidos e 10-13 grupos fosfato, o que dá lugar à existência de distintas formas moleculares, conhecidas como α_{s2} , α_{s3} , α_{s4} e α_{s6} . Seu peso molecular varia de 25.150 - 25.390 daltons, tem resíduos de cisteína e é muito sensível ao cálcio em qualquer temperatura, devido a grande quantidade de grupos fosfato (Luquet et al., 1991).

Caseína β

Esta fração de caseína encontra-se em quantidades importantes (25-35%), tem 209 resíduos de aminoácidos, ausência de cisteína, porém com 5 grupos fosfato e um peso molecular de 24.000 daltons. É sensível aos íons cálcio à temperatura ambiente, porém insensível a baixas temperaturas (4°C) (Luquet et al., 1991). A seqüência dos aminoácidos revela um segmento N-terminal (142) com elevada densidade de carga e bastante hidrofílico. O restante do peptídeo é

fortemente hidrofóbico contendo elevada concentração de prolina, o que impede a formação de estrutura secundária em α -hélice (Sgarbieri, 1996).

Caseína κ

A κ -caseína é susceptível à clivagem por quimosina (renina). A clivagem ocorre em uma ligação específica Phe-Met na porção C-terminal da κ -caseína bovina (figura 1.1). A κ -caseína é a única das frações de caseína solúvel na presença de íons cálcio (Ginger & Grigor, 1999). Essas caseínas não reagem com o cálcio mas, na presença de íons cálcio, reagem com as α_{s1} e β para formar micelas termodinamicamente estáveis (Sgarbieri, 1996; Fox & McSweeney, 1998).

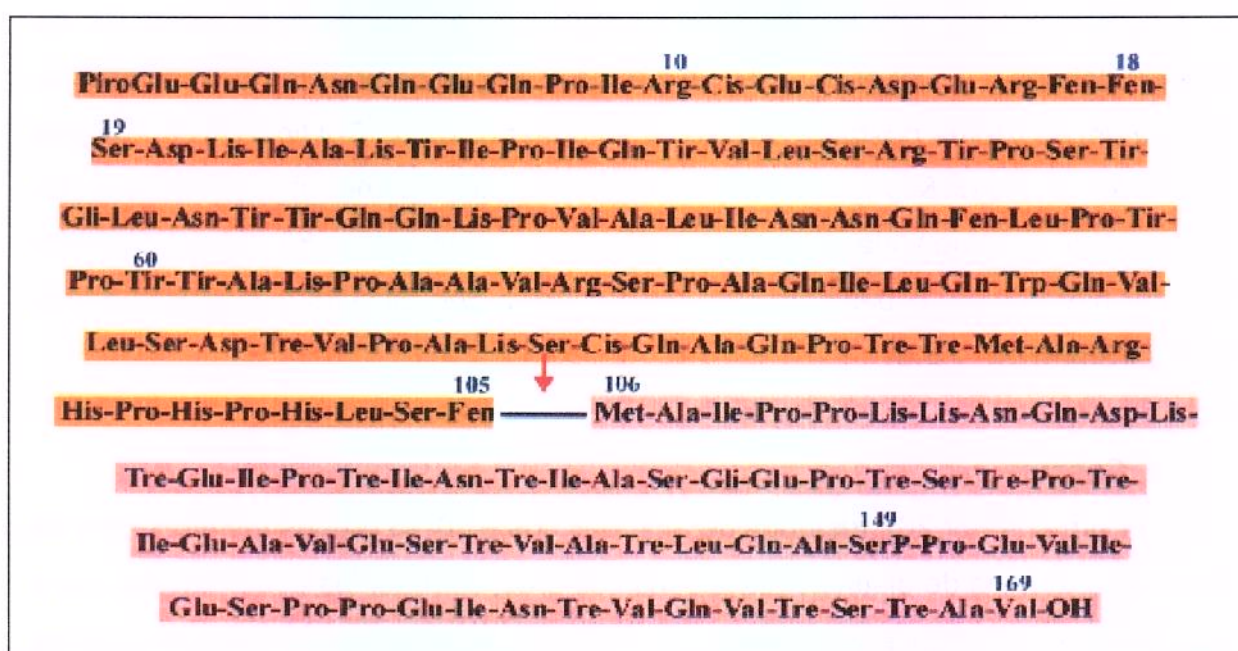


FIGURA 1.1 – Sequência primária da κ -para-caseína (resíduos 1 a 105) e do glicomacropeptídeo (resíduos 106-169) da κ -caseína. A seta indica o sítio de ação da quimosina. Adaptado por Kinsella, 1989 (Lourenço, 2000).

A κ -caseína, em virtude das características estruturais e localização de suas moléculas na superfície das micelas, atua como agente estabilizador dessas partículas, porque previne a precipitação das caseínas cálcio-sensíveis por ação dos sais de cálcio no leite (Lourenço, 2000).

Caseína γ

Esta fração representa de 3-7% das caseínas e é o resultado da hidrólise da β -caseína (Luquet et al., 1991); é encontrada no leite de boa qualidade em baixas proporções (5%) (Early, 1998). As γ -caseínas são altamente hidrofóbicas e se comportam de maneira semelhante às β -caseínas em relação à dependência da temperatura e pH, no fenômeno de associação-dissociação (Sgarbieri, 1996).

1.2. OBTENÇÃO DA CASEÍNA

A produção de caseína e caseinato é ao redor de 250.000 ton/ano. Enquanto algumas caseínas são usadas em aplicações industriais, a maioria é usada em alimentos (Fox & McSweeney, 1998). A caseína comercial produzida através da precipitação ácida ou com uso de coalho, é uma das principais proteínas funcionais alimentares; apresenta propriedades que não podem ser substituídas por outras proteínas em certas aplicações, e vem sendo produzida há cerca de 70 anos (Fox, 1989).

Há dois principais processos estabelecidos para a produção da caseína em escala industrial: precipitação no ponto isoeletrico e coagulação pela renina (Maubois & Olliver, 1997). A caseína coagulada difere da caseína ácida, pois no processo de coagulação a κ -caseína é hidrolisada (Fox & McSweeney, 1998). A caseína ácida é produzida usualmente com HCl a pH 4,6; acidificação através de culturas lácticas é também amplamente empregada, especialmente na Nova Zelândia, o principal produtor de caseína. O coalho/soro é aquecido a 50°C, separado por telas perfuradas ou centrífugas de decantação, lavado com água, seco (pressão) e moído. Os caseinatos são usualmente secos em spray (Fox & McSweeney, 1998).

A coagulação da caseína é realizada a partir do leite desnatado por tratamento com enzimas proteolíticas, conhecidas como reninas (Fox & McSweeney, 1998). A coagulação do leite pelo coalho enzimático ou extrato

enzimático adicionado ao leite na fabricação de queijo (*rennet* é a designação em inglês) é um processo que consiste em dois estágios: o primeiro é o ataque de enzimas proteolíticas (quimosina, pepsina ou proteases microbianas) do coalho às moléculas de κ -caseína que revestem a superfície das micelas de caseínas, desestabilizando sua estrutura; o segundo é a agregação e a coagulação das micelas em virtude da desestabilização (Lourenço, 2000). Na figura 1.2 está representado, de uma forma esquemática, o processo de coagulação enzimática do leite.

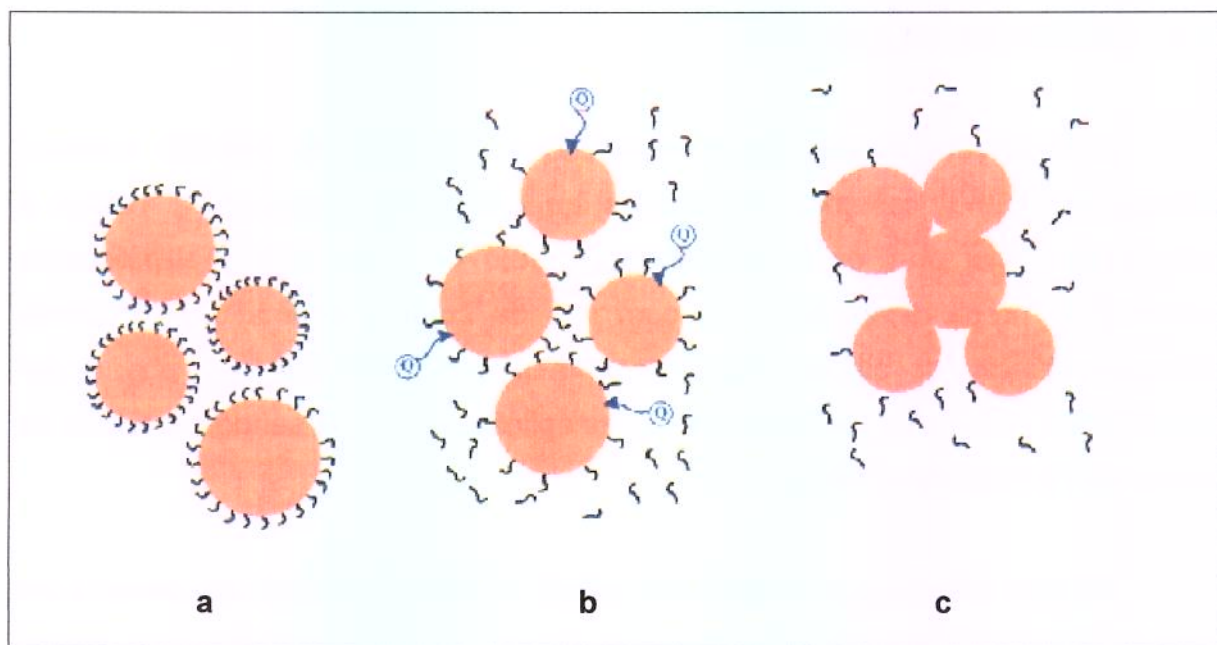


FIGURA 1.2 – Representação esquemática da reação de coagulação do leite. **a)** micelas com revestimento de κ -caseína intacto; **b)** remoção parcial da κ -caseína pela quimosina (Q); **c)** remoção final da κ -caseína e início da reação de agregação micelar.

Os métodos tradicionais de fabricação de caseína promovem alterações químicas irreversíveis na estrutura da micela de caseína, através da acidificação ou modificação enzimática, a fim de facilitar a separação das proteínas coaguladas dos constituintes do soro (Smithers, 1991).

O leite desnatado pode ser separado em frações ricas de caseína e de proteínas do soro, usando-se membranas cerâmicas (Punidades & Rizvi, 1998). A

principal vantagem da filtração por membrana é que se trata de um processo termicamente suave e puramente mecânico. Isto significa que o processo não tem um impacto negativo nas propriedades funcionais e nutricionais do produto (Osterland, 1998).

Segundo Spreer (1998), o processo de filtração por membranas pode ser definido como o processo de separação no qual é usada uma pressão sobre os pequenos poros da membrana, separando as moléculas de água e pequenas moléculas, enquanto que macromoléculas coloidais são retidas e concentradas. O líquido contendo as macromoléculas é chamado de concentrado ou retentado, enquanto que o líquido formado de pequenas moléculas é chamado de permeado. Na figura 1.3, o processo de microfiltração está representado de uma forma esquemática.

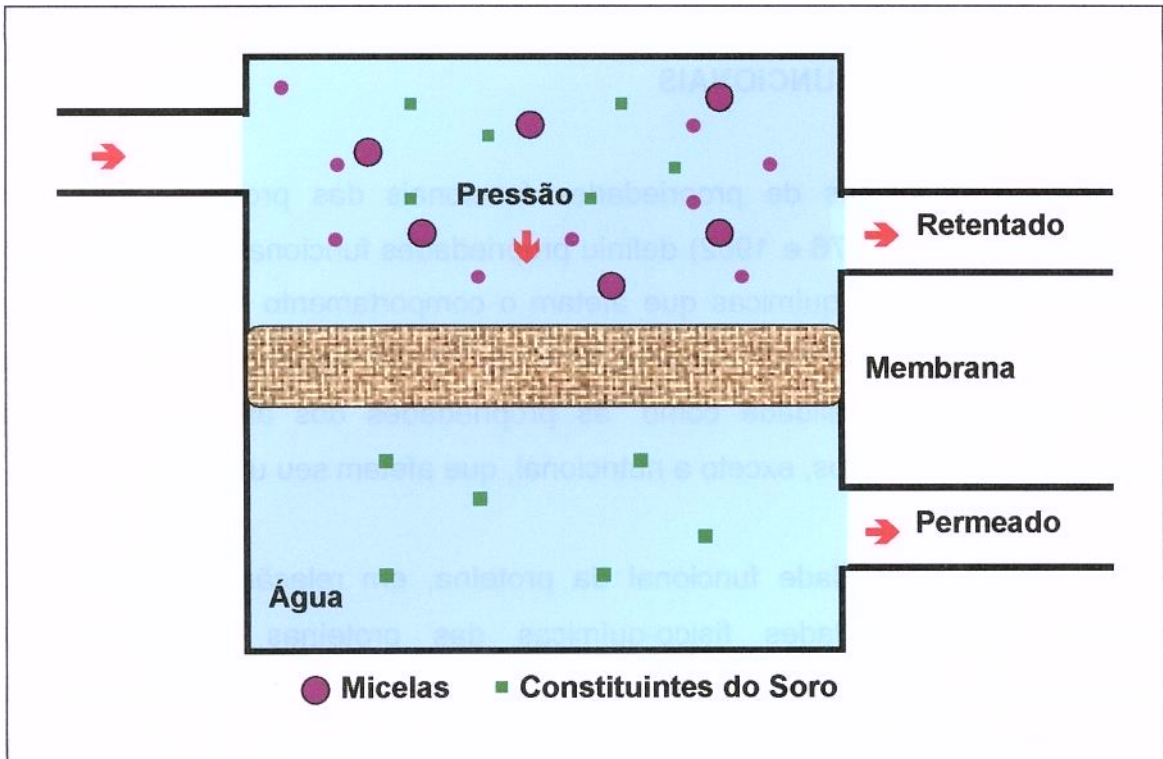


FIGURA 1.3 – Representação Esquemática do Processo de Membranas (Marshall & Harper, 1988).

As vantagens deste processo são: a) a obtenção de concentrados de caseína, b) obtenção de concentrado protéico de soro e c) obtenção de proteínas nativas, conservando a qualidade do produto (Punidada & Rizvi, 1998).

As aplicações da microfiltração na indústria de laticínios inclui a remoção de bactérias e outras substâncias particuladas e o fracionamento de proteínas do leite (Rosenberg, 1995). A comercialização de membranas de microfiltração permitiu o seu uso no fracionamento de proteínas. A microfiltração do leite desnatado em uma membrana de porosidade de 0,2 μm permite a separação de dois líquidos: um microfiltrado desnatado, contendo grande parte das proteínas do soro, e um retentado, rico em caseína micelar (Fauquant et al., 1988; Jost & Jelen, 1997).

1.3. PROPRIEDADES FUNCIONAIS

Muitas definições de propriedades funcionais das proteínas têm sido propostas. Kinsella (1976 e 1982) definiu propriedades funcionais como “aquelas propriedades físicas e químicas que afetam o comportamento das proteínas no sistema de alimentos durante o processamento, estocagem e consumo”. Pour-El (1981) definiu funcionalidade como “as propriedades dos alimentos, ou dos ingredientes de alimentos, exceto a nutricional, que afetam seu uso”.

O termo propriedade funcional da proteína, em relação aos alimentos, refere-se às propriedades físico-químicas das proteínas que afetam a funcionalidade dos alimentos, como a textura, cor, flavor, absorção/ligação de água e estabilidade. Provavelmente, algumas das mais importantes propriedades físico-químicas são a solubilidade, hidratação, atividade de superfície e gelatinização (Fox & McSweeney, 1998).

As propriedades funcionais de interesse tecnológico dependem das propriedades físicas e químicas de seus componentes e que afetam o processamento e o seu comportamento em um sistema alimentar, julgada pelos

atributos de qualidade do produto final, sendo muito importantes para o preparo de determinados tipos de alimentos e para a sua aceitação pelo consumidor (Sgarbieri, 1998). São essas propriedades que indicam a melhor utilização dos vários tipos de ingredientes. A tabela 1.2 ilustra a classificação das propriedades funcionais mais estudadas e os fatores a serem considerados, descritos por Sgarbieri (1996).

As propriedades funcionais das proteínas têm sido classificadas de acordo com as suas propriedades físico-químicas, tais como hidrofílicas, interfásicas, intermoleculares e organolépticas, às quais contribuem para o desenvolvimento das características dos produtos alimentícios (Morr & Ha, 1993).

Deve-se assinalar que algumas propriedades funcionais dependem de mais de uma característica: a geleificação, a viscosidade e a solubilidade dependem da interação proteína-proteína, e da interação proteína-água. A emulsificação depende da solubilidade, hidrofobicidade, e do tamanho molecular (Damodaram, 1993).

As propriedades hidrodinâmicas são fundamentalmente afetadas pelo tamanho, forma e flexibilidade das proteínas, enquanto que as propriedades de superfície relacionam-se às características hidrofóbicas, hidrofílicas, eletrostáticas e estéricas e, portanto da composição e distribuição de aminoácidos, conformação e flexibilidade da cadeia (Morr & Ha, 1993).

TABELA 1.2 - Classificação das propriedades funcionais.

CLASSIFICAÇÃO	FATORES A CONSIDERAR	PROPRIEDADES FUNCIONAIS
<i>Hidrofílicas</i>	Dependem da afinidade água-proteína.	-Solubilidade -Capacidade de hidratação -Capacidade de retenção de água
<i>Interfásicas</i>	Dependem da capacidade das moléculas de proteína se unirem e formarem uma película entre duas fases imiscíveis.	-Emulsificação -Formação de espuma
<i>Intermoleculares</i>	Dependem da habilidade da proteína de formar ligações cruzadas entre suas próprias moléculas ou com outros componentes do alimento.	-Formação de fibras de proteínas -Geleificação -Formação da massa visco-elástica
<i>Reológicas</i>	Propriedades que dependem de características físicas e químicas específicas das proteínas.	-Viscosidade
<i>Organolépticas</i>	São propriedades que se manifestam através dos órgãos dos sentidos sendo, por isso, também chamadas de propriedades sensoriais.	-Textura -Cor -Gosto -Aroma

1.3.1. Propriedades Hidrofílicas

Muitas propriedades funcionais das proteínas são afetadas pela interação do solvente com a água (Sgarbieri, 1998). Interações proteína-água são importantes na aplicação de proteína em sistemas alimentícios, porque afeta diretamente as características de solubilidade, considerada essencial nas propriedades físico-químicas como a dispersibilidade e viscosidade e que acabam por governar outras propriedades, tais como propriedades de superfície e geleificação (Damodaram, 1996; Kinsella et al., 1994).

A solubilidade das proteínas é afetada pelo pH, força iônica, temperatura, polaridade do solvente, condições de processamento, método de isolamento, interações com outros componentes do alimento e tratamentos mecânicos (Vojdani, 1996). Estes agentes afetam a solubilidade das proteínas principalmente causando alterações nas interações hidrofílicas e hidrofóbicas da superfície da proteína (Damodaram, 1996).

As variações de pH modificam a carga líquida da proteína, alterando as forças atrativas e repulsivas entre as proteínas e a sua capacidade de interagir com a água (Borderías & Monteiro, 1988). O pH afeta a densidade de cargas e o balanço eletrostático intra e intermolecular, modificando a habilidade da proteína em participar das interações hidro e lipofílicas. O aumento da densidade de cargas da proteína em pHs afastados da região do ponto isoelétrico favorece as interações proteína-água, resultando num aumento das propriedades de hidratação (Elizalde et al., 1996).

A presença de sais altera a solubilidade das proteínas devido à competitividade entre as moléculas de água e de sais pelos grupos laterais dos aminoácidos. Em baixas concentrações de sais a solubilidade pode aumentar (salting-in), devido às interações dos íons com as cargas da proteína, reduzindo a atração eletrostática entre as cargas opostas de grupos vizinhos. Em altas concentrações salinas pode ocorrer precipitação das proteínas (salting-out) devido

à predominância das interações água-sal, em detrimento das interações água-proteína (Cheftel et al., 1989).

As propriedades de absorção e retenção de água são propriedades hidrofílicas importantes pois, assim como a solubilidade, dependem das interações da proteína com o solvente aquoso e desempenham um papel fundamental, principalmente relacionado com a textura de diversos alimentos (Cheftel et al., 1989; Sgarbieri, 1998).

Para que exista a propriedade de absorção ou retenção de água deve haver a atração hidrofílica que pode ser medida como o grau de hidratação (mL água/g de proteína) e como a habilidade do produto em captar água espontaneamente. Relaciona-se também com a quantidade de água que permanece na proteína ou no alimento protéico, após exposição a um excesso de água e aplicação de uma força centrífuga ou pressão (capacidade de retenção de água) (Sgarbieri, 1996).

1.3.2. *Propriedades de Superfície*

As propriedades de superfície são importantes nas aplicações em alimentos, as quais requerem a emulsificação do óleo em uma fase aquosa ou a formação de espumas (Leman & Kinsella, 1989). As propriedades de superfície dependem da capacidade das moléculas da proteína de formarem uma película entre duas fases imiscíveis. As proteínas são as macromoléculas mais utilizadas como agentes espumantes e estabilizantes (Hill, 1998). Devido às suas características de afinidade (polaridade - apolaridade) são capazes de concentrarem-se nas interfaces, baixar a tensão interfacial entre óleo-água e água-ar, formando emulsões ou espumas, respectivamente (Lourenço, 2000).

Emulsões e espumas são sistemas constituídos de duas fases, sendo uma fase dispersa e uma fase contínua. A espuma pode ser definida como o sistema coloidal no qual o ar é disperso na fase contínua (Damodaram, 1996). Enquanto que a emulsão é definida como uma dispersão coloidal de dois líquidos imiscíveis

(Mangino, 1989), onde um líquido é disperso em outro líquido. Existem basicamente dois tipos de emulsão: a) quando o óleo é disperso na fase aquosa tem-se a emulsão tipo óleo em água (O/A), b) e quando a água é dispersa na fase contínua óleo, tem-se emulsão do tipo água em óleo (A/O) (Damodaram, 1997).

A capacidade de formar espuma estável em presença de ar é uma propriedade funcional importante das proteínas em muitos produtos alimentícios do tipo bolos de anjo, suspiros, suflês, vários tipos de coberturas de bolos e sobremesas, além de bebidas como as cervejas (Sgarbieri, 1998). A capacidade de uma proteína formar espuma refere-se à expansão de volume da dispersão protéica, com a incorporação de ar por batimento, agitação ou aeração formando um filme na interface ar/água (Damodaram, 1996; Sgarbieri, 1996). Em relação à capacidade espumante, três atributos devem ser considerados: poder espumante, a estabilidade da espuma e a consistência ou densidade da espuma (Giese, 1994).

A capacidade de formação de espuma é uma propriedade funcional de interfase que depende da natureza da proteína, concentração e solubilidade protéica, dependendo do estado de desnaturação da proteína, pH, presença de sais e hidratos de carbono (Sgarbieri, 1996) e fatores intrínsecos à proteína que são a hidrofobicidade total e superficial, as cargas, a flexibilidade e a conformação molecular e a susceptibilidade ao trabalho mecânico durante a formação da espuma (Wagner, 2000).

A estabilidade da espuma está relacionada com a flexibilidade molecular da proteína. Proteínas que exibem ótimas interações intermoleculares na interfase da espuma formam uma rede contínua, coesiva e freqüentemente formam espumas muito estáveis (Damodaram, 1996). Os mecanismos de desestabilização de espuma têm sido descritos como drenagem, quebra ou escoamento do líquido da lamela com o decorrer do tempo após formação da espuma, devido à ação da gravidade, diferenças de pressão e mesmo evaporação (Kinsella, 1976).

As emulsões alimentares mais comumente encontradas são o leite, a gema de ovo, o leite de coco e de soja, cremes, manteigas, margarinas, maioneses, molhos para saladas, salsichas, sorvetes, bolos, chocolates, todos os tipos de cobertura, dentre outras (Sgarbieri, 1998). Muitos alimentos emulsionados contêm proteínas do leite, especialmente caseína, que desempenham papel de estabilizante e emulsificante (Dickinson, 1989; 1999).

As propriedades emulsionantes podem ser classificadas em princípio em dois grupos: processo de formação de emulsão (poder emulsionante) e o processo de desestabilização da emulsão (poder estabilizante) (Wagner, 2000). A tensão interfacial entre a água e o óleo é muito elevada, por isso, as emulsões são termodinamicamente instáveis e a separação das fases ocorre com o tempo. No entanto, a estabilidade das emulsões pode ser melhorada adicionando-se moléculas de superfície anfipática, como as proteínas que atuam como agentes surfactantes (Damodaram, 1996).

Existem muitos fatores que influenciam as características da emulsão, dos quais podemos citar a concentração, solubilidade e tipo de proteína; pH, força iônica, tipos de íons, presença de hidrocolóides e açúcares (fase dispersante); tipo de óleo, presença de fosfolipídios, ácidos graxos livres, mono e diglicerídios, presença de outros surfactantes lipossolúveis (fase dispersa); e a incorporação de ar e a viscosidade (em ambas as fases). Os principais fatores vinculados ao método de emulsificação são o tipo, geometria do homogeneizador (efeitos mecânicos) e o tempo de homogeneização (Wagner, 2000).

As propriedades físico-químicas e funcionais do caseinato de sódio e da caseína têm sido estudadas por inúmeros autores, citados por Jahaniaval et al., (2000). Estas propriedades dependem da flexibilidade molecular (Swaigood, 1993) e de fatores extrínsecos como pH e temperatura (Morr & Ha, 1993), força iônica e a modificação dos grupos funcionais.

O desejo de melhorar a qualidade industrial de produtos alimentícios processados tem provocado um grande interesse nas propriedades funcionais dos

ingredientes protéicos (Nielsen, 1997). A modificação da estrutura de proteínas pela hidrólise enzimática tem sido empregada no intuito de melhorar as propriedades funcionais, devido à sua especificidade, segurança e capacidade de modificar uma grande variedade de grupos funcionais (Murad et al., 1993).

1.4. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Os hidrolisados podem ser aplicados para elaboração de produtos nutricionalmente modificados especialmente para nutrição enteral e parenteral para crianças e para determinadas patologias; suplementação e obtenção de novos produtos alimentícios; componentes de sabor; redução do potencial alergênico de alimentos; para fins não alimentícios como a indústria de cosméticos e implementação de propriedades funcionais (Cândido, 1997).

Vários estudos têm sido conduzidos com diferentes tipos de proteínas, no sentido de melhorar ou ampliar seu uso como ingrediente funcional (Haque, 1993). Entre as diversas propriedades funcionais diretamente relacionadas ao uso das proteínas lácteas como ingredientes, destaca-se a solubilidade, capacidade de hidratação e retenção de água, propriedades emulsificantes e espumantes (Furtado et al., 2001).

A hidrólise pode alterar as propriedades funcionais e o valor nutricional das proteínas (Howell, 1996). O valor nutricional dos produtos hidrolisados depende principalmente de três fatores: a origem da proteína, o tipo de hidrólise (enzimática ou química) e o tamanho da cadeia peptídica (Cheftel et al., 1989). As proteínas hidrolisadas possuem propriedades funcionais que as tornam atrativas como fonte de proteínas para a nutrição humana, tanto para uso medicinal quanto para produtos comuns de uso geral.

Modificações químicas e enzimáticas têm sido usadas para melhorar as propriedades funcionais das proteínas. A modificação enzimática geralmente envolve o uso de enzimas proteolíticas para a hidrólise específica das ligações

peptídicas (Qi et al., 1997). Este método apresenta maiores benefícios e vantagens sobre a química porque inclui a especificidade da enzima em relação ao substrato, havendo pouca probabilidade de ocorrer reações indesejáveis, que resultem na formação de produtos tóxicos, além de se processar sob condições mais amenas (Phillips & Beuchat, 1981).

Na reação enzimática, uma série de variáveis devem ser controladas para a obtenção de resultados confiáveis, mostrados na tabela 1.3. A inativação enzimática ao final do processo e o método de determinação do grau de hidrólise (Lahl & Braun, 1994) são fatores que também devem ser considerados.

Os parâmetros mais importantes da reação da hidrólise são: concentração de substrato (proteína), relação enzima/substrato, pH e temperatura. O critério quantitativo da reação de proteólise é o grau de hidrólise (Nielsen & Olsen, 2002), definido como a porcentagem de ligações peptídicas clivadas (Pomeranz, 1991). Ele é essencial porque as propriedades das proteínas estão diretamente relacionadas com o GH (Nielsen, 1997).

As proteínas tanto podem aumentar como diminuir a funcionalidade, dependendo do grau de hidrólise aplicado, sendo geralmente aceito que uma hidrólise branda é benéfica, ao passo que uma hidrólise extensiva é considerada prejudicial (Haque, 1993). O grau ótimo de hidrólise depende do produto requerido (Howell, 1996) e da propriedade funcional de interesse.

As enzimas proteolíticas são classificadas pelo seu mecanismo de hidrólise em endopeptidases e exoproteases. Endopeptidases hidrolisam as ligações peptídicas das moléculas de proteína e produzem peptídios de vários pesos moleculares. Exopeptidases sistematicamente removem aminoácidos N-terminais ou C-terminais pela hidrólise das ligações peptídicas (Clemente, 2000). Muitas proteases comerciais são uma mistura de diferentes tipos. Por exemplo a pancreatina, papaína e outras proteases de *B. amyloliquefaciens*, *A. oryzae*, *Streptomyces* e *P. dupointi*, principalmente utilizadas em alimentos (Nielsen & Olsen, 2002).

TABELA 1.3 - Fatores que afetam a hidrólise enzimática das proteínas.

Fatores	Comentários
Especificidade da enzima	Não somente proteases hidrolisam completamente a proteína. Misturas de proteases são utilizadas.
Extensiva desnaturação de proteínas	As proteínas desnaturadas são mais susceptíveis à hidrólise.
Concentração enzima/substrato	São fatores que devem ser controlados.
pH	O pH ótimo varia com a enzima utilizada.
Temperatura	Preferencialmente temperaturas >45°C.
Força iônica	Parâmetros críticos que não devem ser ignorados.
Substâncias inibidoras	Devem estar ausentes.

Fonte: Kilara (1985)

Segundo Nielsen (1997) a hidrólise das ligações peptídicas causa muitas mudanças nas proteínas, e estas mudanças afetam drasticamente as propriedades funcionais: a) O conteúdo de grupos NH_3^+ e COO^- aumenta, os quais aumenta a solubilidade; b) O peso molecular da proteína/polipeptídeos diminui e c) a estrutura globular da proteína é destruída e os grupos hidrofóbicos tornam-se expostos.

Quando a estrutura da proteína é modificada por proteólise, vários efeitos são considerados positivos ou negativos, dependendo se este efeito é desejável ou não. Efeitos desejáveis de importância incluem aumento de solubilidade, redução da tensão de superfície, aumento da capacidade de emulsificação e espuma. Efeitos indesejáveis produzidos seriam o aumento do amargor e desenvolvimento de flavor (Nielsen & Olsen, 2002).

A solubilidade é um pré-requisito importante por influenciar a maioria das propriedades funcionais das proteínas (Nielsen, 1997). Segundo Panyam & Kilara (1996), uma das principais consequências da hidrólise enzimática é o aumento da solubilidade, e normalmente este aumento está associado ao aumento do grau de hidrólise, e é atribuído à formação de unidades polipeptídicas menores, mais hidrofílicas e solvatadas (Furtado et al., 2001).

A hidrólise enzimática pode modificar as propriedades de formação de espuma das caseínas. Segundo Flanagan & Fitzgerald (2002) o caseinato de sódio não hidrolisado apresentou baixas propriedades de formação de espuma, enquanto que os seus hidrolisados com Protamex (0,5 e 1,0% GH) aumentaram a expansão de espuma quando comparada ao caseinato não hidrolisado (Slattery & Fitzgerald, 1998).

Na literatura encontram-se dados que mostram que a proteólise ocasiona um aumento do número de peptídios na interface óleo-água, que reflete um aumento da capacidade emulsificante. No entanto estes peptídios são pequenos e de baixo peso molecular, revestindo com menos resistência a camada do glóbulo de gordura, o que reflete na diminuição da estabilidade da emulsão (Kilara, 1985).

Morato et al. (2000) estudaram a utilização de hidrolisados de caseína para obtenção de alto conteúdo de pequenos peptídios, utilizando-se subtilisina e tripsina e observaram que diversos fatores influenciam o tamanho da cadeia polipeptídica: a enzima utilizada isolada ou combinada, a relação enzima/substrato, o efeito da temperatura, o efeito do pH, tempo de reação e o grau de hidrólise. O grau de hidrólise e o conteúdo de aminoácidos livres de caseína hidrolisada é significativamente afetada pela especificidade de endopeptidases (Ge et al., 1996).

A caseína e seus hidrolisados enzimáticos possuem várias propriedades funcionais desejáveis, e por isso, a sua utilização em maior escala na indústria de alimentos apresenta grande interesse (Touati et al., 1992). Segundo Kitts & Yuan (1992; citados por Frokjaer, 1994), fosfopeptídios de caseína obtidos da caseína hidrolisada têm um potencial para aumentar a absorção gastrointestinal de cálcio.

1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BORDERÍAS, A.J.; MONTERO, P. Fundamentos de la funcionalidad de las proteínas em alimentos. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**. Madrid, v.28, n.2, p.159-169, 1988.

CÂNDIDO, L. M. B. Produção de hidrolisados protéicos para uso como suporte nutricional e hospitalar. In: Seminário Internacional: Tópicos especiais em ciência e tecnologia de proteínas. Instituto de Tecnologia em Alimentos - ITAL - Campinas, p.129-137, 1997.

CHEFTEL, J.C. CUQ, J.L.; LORIENT, D. Proteinas Alimentarias – Bioquímica, propiedades funcionales, valor nutritivo, modificaciones químicas. Zaragoza: Acribia, 346p.,1989.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**. Cambridge, v.11, p.254-262, 2000.

DAMODARAN, S. Structure-function relationships of food protein. In: Abstracts of the 1993 IFT-IUFOST Basic Symposium Papers. **Food Technology**. Chicago, v.47, n.3, p.72-76, 1993.

DAMODARAM, S. Functional Properties. In: Food Proteins – properties and characterization. Shryo Nakai and H.Wayne Modler (Eds). New York: Wiley-VCH, Cap.4, p.167-234, 1996.

DAMODARAM, S. Food proteins: an overview. In: Food proteins and their applications. Srinivasan Damodaram and Alain Paraf (Eds). New York: Macel Dekker, INC, Cap.1, p.1-24, 1997.

DICKINSON, E. Surface and emulsifying properties of casein. **Journal of Dairy Research**. Cambridge, v.56, p.471-477,1989.

DICKINSON, E. Casein in emulsions: interfacial properties and interactions. **International Dairy Journal**. Barking, v.9, p.305-312, 1999.

EARLY, R. The technology of dairy products. 2º ed. Blackie Academic & Professional, 1998.

ELIZALDE, B.E.; BARTHOLOMAI, G.B.; ; PILOSOFF, A.M.R. The effect of pH on the relationship between hydrophilic/lipophilic characteristics and emulsification properties of soy proteins. **Food Science and Technology**. Chicago, v.19, p.334-339, 1996.

FAUQUANT, J.; MAUBOIS, J.L.; PIERRE, A. Microfiltration di lait sur membrane minerale, **Technique Laitere & Marketing**. v.1028, p.21-23, 1988.

FITZGERALD, R.J. Potencial uses of caseinophosphopeptides. **International Dairy Journal**. Barking, v.8, n.(5-6), p.451-457, 1998.

FLANAGAN, J.; FITZGERALD, R.J. Functionality of *Bacillus* proteinase hydrolysates of sodium caseinate. **International Dairy Journal**. Barking, v.12, p.737-748, 2002.

FOX, P.F. The milk protein system. In: Developments in Dairy Chemistry - 4. FOX, P.F. ed. New York: Elsevier Applied Science Publishers, p.1-53, 1989.

FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. Milk Proteins. In: Dairy Chemistry and Biochemistry. London: Blackie Academic & Professional, Cap.4, p.147-238, 1998.

FROKJAER, S. Use of hydrolysates for protein supplementation. **Food Technology**. Chicago, v.48, n.10, p.86-88, 1994.

FURTADO, M.A.M.; GOMES, J.C.; SILVA, C.A.S.; ORNELLAS, C.B.; SILVESTRE, M.P.C. Propriedades funcionais de hidrolisados de proteína lácteas co-precipitada. **Ciência Agrotécnica**. Lavras, v.25, n.3., p.625-639, 2001.

GE, S.; BAI, H.; YUAN, H.; ZHANG, L. Continuous production of high degree casein hydrolysates by immobilized proteases in column reactor. **Journal of Biotechnology**. Amsterdam, v.50, p.612-170, 1996.

- GIESE, J. Proteins as ingredients: types, functions, applications. **Food Technology**. Chicago, v.48, n.10, p. 50-60, 1994.
- GINGER, M.R.; GRIGOR, M.R. Comparative aspects of milk casein. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**. New York, v.124, p.133-145, 1999.
- HAQUE, Z. U. Influence of milk peptides in determining the functionality of milk proteins; a review. **Journal of Dairy Science**. Champaing, v.76, n.1, p.311-320, 1993.
- HILL, S.E. Emulsions and foams. In: Functional properties of food macromolecules. S.E.Hill, D.A. Ledward and J.R. Mitchell (eds.) Gaithersburg, Maryland: A Chapman & Hall Food Science Book , 2ºed., Cap.8, p.302-334, 1998.
- HOWELL, K. N. Chemical and enzymatic modification. In: Food proteins – properties and characterization. Shuryo Nakai and H. Wayne Modler (eds.). New York: Wiley-VCH, Cap.5, p.235-280, 1996.
- JAHANIAVAL, F.; KAKUDA, Y.; ABRAHAM, V.; MARCONE, M.F. Soluble protein fractions from pH and heat treated sodium caseinate: physicochemical and functional properties. **Food Research International**. Essex, v.33, p.637-647, 2000.
- JOST, R.; JELEN, P. Cross-flow microfiltration - an extension of membrane processing of milk and whey. **Bulletin of the International Dairy Federation**. Philadelphia, v.320, p.9-15, 1997.
- KILARA, A. Enzyme-modified protein foods ingredients. **Process Biochemistry**. Rickmansworth, v.23, n.5, p.149-157, 1985.
- KINSELLA, J.E. Functional properties of food proteins: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. Boca Raton, v.7, n.3, p.219-280, 1976.
- KINSELLA, J.E. Relationship between structure and functional properties of food protein. In: Food proteins, P.F. Fox and J.J Condon (eds.). New York: Applied Science, 1982.

KINSELLA, J.E.; WHITEHEAD, D.M.; PHILLIPS, L.G. In: Structure – Functions properties of food proteins, San Diego: Academic Press p.25-69;111-169, 1994.

KRUIF, C.G. Casein micelle interactions. **International Dairy Journal**. Barking, v.9, p.183-188, 1999.

LAWSON, M.A. Milk protein as food ingredients. **Food Technology**. Chicago, v.48, n.10, p.101, 1994.

LAHL, W. J.; BRAUN, S. D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food Technology**. Chicago, v.48 , n.10, p.68-71, 1994.

LEMAN, J.; KINSELLA, J.E. Surface activity, film formation, and emulsifying properties of milk proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. Boca Raton, v.28, n.2, p.115, 1989.

LOURENÇO, E.J. Tópicos de proteínas de alimentos. Jaboticabal: Funep, 344p., 2000.

LUQUET, F.M.; KEILLING, J.; DE WILDE, R. Leche y productos lacteos: vaca-oveja-cabra. La leche de la mamma a la lecheria. Acriba, S.A. Zaragoza, Vol 1. (España), 1991.

MANGINO, M.E. Molecular properties and functionality of proteins in food emulsions: liquid food systems. In: Food Proteins. Kinsella, J.E. and Souie, W.C., (Eds). Champain: American Oil Chemistry Society. Cap.9, p.159-177, 1989.

MARSHAL, K.R.; HARPER, W.J. Whey protein concentrates. **Bulletin of the International Dairy Federation**. Philadelphia, v.233, p.21-23, 1988.

MAUBOIS, J.L.; OLLIVER, G. Extraction of milk proteins. In: Food proteins and their applications. Srinivasan Damodaram; Alain Paraf (Eds). New York: Marcel Dekker, INC, Cap.20, p.579-595, 1997.

MORR, C.V.; HA, E.Y.W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. Orlando, v.33, n.6, p.431-476, 1993.

MORATO, A.F.; CARREIRA, R.L.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Optimization of casein hydrolysis for obtain high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. **Journal of Food Composition and Analysis**. Orlando, v.13, p.843-857, 2000.

MORENO, I.; BALDINI, V.L.S.; LERAYER, A.L.S; VIALTA, A. Modificações das proteínas do leite no processamento de queijos. **Revista Indústria de Laticínios**. v.26, p.44-49, 2000.

MURAD, A.L.; GOMES, J.C.; COELHO, D.T.; SANT'ANA, R. Desenvolvimento e caracterização química e funcional de um isolado protéico de soja modificado. **Arq. Biologia Technology**. v.36, p.695-707, 1993.

NIELSEN, P.M. Functionality of protein hydrolyses. In: Food proteins and their applications. Srinivasan Damodaram and Alain Paraf (eds). New York: Marcel Dekker, INC, Cap.15, p.443-472, 1997.

NIELSEN, P.M.; OLSEN, H.S. Enzymic modification of food protein. In: "Enzymes in food technology". Robert J. Whitehurst and Barry A. Law (eds.) Sheffield Academic Press, Cap.6, p.109-143, 2002.

OSTERLAND, N. New developments in membrane processing. XXV International Dairy Congress, Aarhus, Denmark, 21-24 september, International Dairy Federation, p.30-31, 1998.

PANYAM, D.; KILARA, A. Enchanting the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in Food Science & Technology**. Cambridge, v.7, n.4, p.120-125, 1996.

- PAQUIN, P. The key to added value: fractionation and the use of milk constituents, **Canadian Journal of Animal Science**. Ottawa, v.78, Supplement: p.149-157, 1998.
- PHILLIPS, R.D.; E BEUCHAT, L.R. Protein functionality in foods. **ACS Symposium Series**. Washington D.C., p.275, 1981.
- POMERANZ, Y. Functional properties of food components. 2º ed. San Diego: Academic Press, Inc., 569p., 1991
- POUR-EL, A. Protein functionality: classification, definition and methodology. In: Protein Functionality in Foods, J.p. (Cherry (ed.) pp, 1-9. Amerciam Chemical Society, Wastington, DC, 1981.
- PUNIDADAS, P. RIZVI,S.S.H. Separation of milk proteins into fractions rich in casein or whey proteins by cross flow filtration. **Food Research International**. Essex, v.31, n.4, p.265-272, 1998.
- Qi, M.; HETTIARACHCHY, N.S.; KALAPATHY, U. Solubility and emulsifying properties of soy proteins isolates modified by pancreatin. **Journal of Food Science**. Chicago, v.62, n.6, p.1110-1115, 1997.
- ROLLEMA, H.S. Casein association and micelle formation. In: Advanced Dairy Chemistry. Vol 1 – Proteins. London: Blackie Academic & Professional, Cap.3, p.111-140, 1992.
- ROSENBERG, M. Current and future applications form membrane process in the dairy industry. **Trends in Food Science & Technology**. Cambridge, v.6, v.1, p. 12-19, 1995.
- SCOTT, R.; ROBINSON, R.K.; WILBEY, R.A. Cheesemaking practice. A Chapman & Hall Food Science Book. 3º ed. 437p., 1998
- SGARBIERI, V.C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações, São Paulo: Varela, 517 p., 1996.

SGARBIERI, V. C. Propriedades Funcionais de proteínas em Alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência de Tecnologia de alimentos**. Campinas, v.32, p.105-126, 1998.

SINGH, H.; MCCARTH, O.J.; LUCEY, J.A. Physic-Chemical properties of milk. In: Advanced Dairy Chemistry – Lactose, water, salts and vitamins. 2º ed. Vol.3. P.F. Fox. (ed.). Chapman & Hall, p.469-518, 1997.

SLATTERY, H., FITZGERALD, R.J. Functional properties and bitters of sodium caseinate hydrolysates prepared with *Bacillus* proteinase. **Journal of Food Science**. Chicago, v.63, n.3, p.418-422, 1998.

SMITHERS, G. Value added milk protein products. **Australian Biotechnology**. v.1, n.1, p. 36-39, 1991.

SOUTHWARD, C.R. Utilization of milk components: casein. In: Modern Dairy Technology. Vol 1. London: A Chapman & Hall, Cap.8, p.375-432, 1994.

SPREER, E. Milk as a raw material and food. In: Milk and dairy product technology. Translated by Axel Mixa. New York: Marcel Dekker, Inc., 1998.

SWAISGOOD, H.E. Review and update of casein chemistry. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v.76, n.10, p.3054-3062, 1993.

TOUATI, A.; CREUZENET, C.; CHOBERT, J.M.; DUFOUR, E.; HAERTLÉ, T. Solubility and reactivity of casein and β -lactoglobulin in protic solvent. **Journal Protein Chemistry**. v.11, p.613-621, 1992.

VOJDANI, F. Solubility. In: Methods of testing protein functionality. G.M. Hall (ed.). London: Blackie Academic & Professional, Cap.2, p.11-60, 1996.

WALSTRA, P. On the stability of casein micelles. **International Journal of Dairy Science**. v.73, n.8, p.1965-1979, 1990.

WAGNER, J.R. Propiedades Superficiales. In: Caracterizacion funcional y estructural de proteínas. Pilosof, A.M.R & Bartholomai G. B. (Eds.) Buenos Aires Aeudeba. Cap.3, p.41-74, 2000.

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E
NUTRICIONAL DE DIFERENTES CONCENTRADOS DE
CASEÍNA.**

CAPÍTULO 2

OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E NUTRICIONAL DE DIFERENTES CONCENTRADOS DE CASEÍNA

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar quatro concentrados de caseína obtidos por diferentes processos: caseína comercial (CC), caseína obtida pela coagulação enzimática do leite bovino fluido (COC), caseína micelar obtida respectivamente pelos processos de microfiltração/diafiltração do leite bovino fluido (CM) e caseína micelar obtida do leite em pó reconstituído (CMR). Estudou-se estes concentrados de caseína quanto à composição química, perfil de aminoácidos, perfil eletroforético e perfil nutricional (avaliação com ratos). Observou-se que a caseína comercial possui concentração de proteína superior à caseína micelar e ao coágulo. O perfil de aminoácidos dos diferentes concentrados de caseína está de acordo com o padrão FAO/WHO que atende as necessidades de aminoácidos essenciais na faixa etária de 2 a 5 anos. Os animais submetidos às diferentes fontes de proteína não apresentaram diferenças significativas quanto ao ganho de peso e ingestão de dieta. A caseína comercial foi a que apresentou a maior digestibilidade. O coágulo de caseína apresentou valores inferiores as demais amostras quando avaliados pelos índices NPR (quociente de eficiência líquida da proteína) e PERop (quociente de eficiência protéica). A eletroforese foi realizada por duas diferentes metodologias, sendo que a em SDS-PAGE atendeu melhor os nossos objetivos que era mostrar possíveis diferenças entre as amostras que deveriam ser atribuídas aos processos de obtenção. A eletroforese em SDS-PAGE pode ser utilizada para verificar diferenças de processamento entre os concentrados de caseína, apresentando informações que não foram observados na eletroforese em URÉIA-PAGE.

2.1. INTRODUÇÃO

O leite constitui uma das principais fontes de proteínas na alimentação de animais jovens e de humanos de todas as idades. Pode ser considerado o alimento mais completo da natureza e o único que satisfaz as necessidades dos recém-nascidos, nos primeiros meses de vida (Sgarbieri, 1996).

As proteínas do leite compreendem duas frações principais, caseínas e proteínas do soro. O leite bovino possui 80% de suas proteínas na forma de caseína (Swaigood, 1992), as quais consistem de quatro componentes principais α_{s1} , α_{s2} , β e κ , aproximadamente nas proporções: 4:1:4:1, as quais são precipitadas em pH 4,6 (Srinivasan et al., 2002).

As caseínas podem ser separadas das proteínas do soro principalmente por dois processos, precipitação no pH isoeletrico (pH 4,6; 20°C) e coagulação pela ação da enzima quimosina - pepsina, no processo industrial de fabricação de queijos (Wrong et al., 1996). Dois tipos básicos de caseína são produzidos, a ácida e a de coalho e possuem essa denominação em função do agente coagulante envolvido (Southward, 1986).

A caseína comercial produzida através da precipitação ácida ou com uso de coalho, é uma das principais proteínas funcionais alimentares, apresenta propriedades que não podem ser substituídas por outras proteínas em certas aplicações, e vem sendo produzida a cerca de 70 anos (Fox, 1989). Caseínas e caseinatos são comumente utilizados na formulação de produtos cárneos (Kinsella, 1984), produtos lácteos, produtos de panificação (Giese, 1994), chocolates e confeitos, coberturas comestíveis, bebidas lácteas e achocolatados, salgadinhos e "snacks" (Southward, 1989), filmes comestíveis e impermeabilizantes (Torres, 1994).

A tecnologia de membrana é uma ferramenta bastante útil para o fracionamento das proteínas do leite. Seu uso pela indústria de laticínios já tem levado à criação de novos produtos com alto valor agregado (Maubois & Plliver,

1992). Tem sido possível separar a fase micelar do leite, simplesmente por processo físico através da utilização de membranas comerciais de microfiltração com porosidade de 0,1-0,2 μm (Jost et al., 1999).

A caseína micelar pode ser utilizada na produção de peptídios biologicamente ativos, tais como β -casomorfina, fosfopeptídios e peptídios envolvidos na imunomodulação (Fitzgerald, 1998; Paquin 1998; Smithers, 1991; Southward, 1994). A caseína micelar contribui na melhoria do rendimento durante a produção de queijos e diminuição de perda de soro.

O objetivo deste capítulo foi obter quatro concentrados de caseína por diferentes processos e os avaliar quanto à composição química, perfil de aminoácidos, perfil eletroforético e perfil nutricional (avaliação com ratos).

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Matéria-Prima

Foi utilizado leite em pó desnatado, elaborado pela Sancor Coop. Unidas Ltda, gentilmente fornecido pela Kerry do Brasil Ltda e leite bovino fluido obtido da Cooperativa dos Produtores de Leite da Região de Campinas, Jaguariúna, SP. Utilizou-se coágulo de caseína desidratado obtido através da coagulação enzimática do leite bovino (COC), micelas de caseína desidratadas obtidas do leite em pó reconstituído (CMR), micelas de caseína obtidas do leite bovino fluído (MC), e caseína comercial (CC) (M. Cassab Ltda).

2.2.2. Métodos

2.2.2.1. Produção de caseína pela coagulação enzimática (COC)

Todo o processo de obtenção do coágulo de caseína foi efetuado na planta piloto de leite – Tecnolat (ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas – SP). O leite bovino, tipo B, foi recebido desnatado e pasteurizado (72°C, 20") e transferido para dois tanques de camisa dupla (ou encamisado) de aço inox, com capacidade para 500 litros, da marca TQ-BIASINOX, onde foi homogeneizado e aquecido entre 30-35°C (figura 2.1a).

Adicionou-se o coalho, contendo renina e pepsina (30mL/100L), e solução de cloreto de cálcio a 50% (25mL/100L de leite) deixando-se em repouso por aproximadamente 40-60 minutos para coagulação. À medida que as micelas de caseína se desintegravam formava-se o coágulo, ou seja, um gel mole, tri-dimensional de caseína, que ocupava o mesmo volume original do leite.

Em seguida o coágulo foi cortado em pequenos cubos por meio de uma lira (horizontal e vertical com 1cm de espessamento entre os fios) e depois a massa foi agitada por meio de uma pá, de modo a facilitar a dessoragem, pois este processo provocava a contração do gel e conseqüentemente expulsão da água e constituintes solúveis do leite do interior dos cubos. Depois de aproximadamente 20 minutos o coágulo encontrava-se devidamente dividido em grãos finos (figura 2.1b). O líquido expelido dos cubos, o soro, contém os constituintes solúveis do leite.

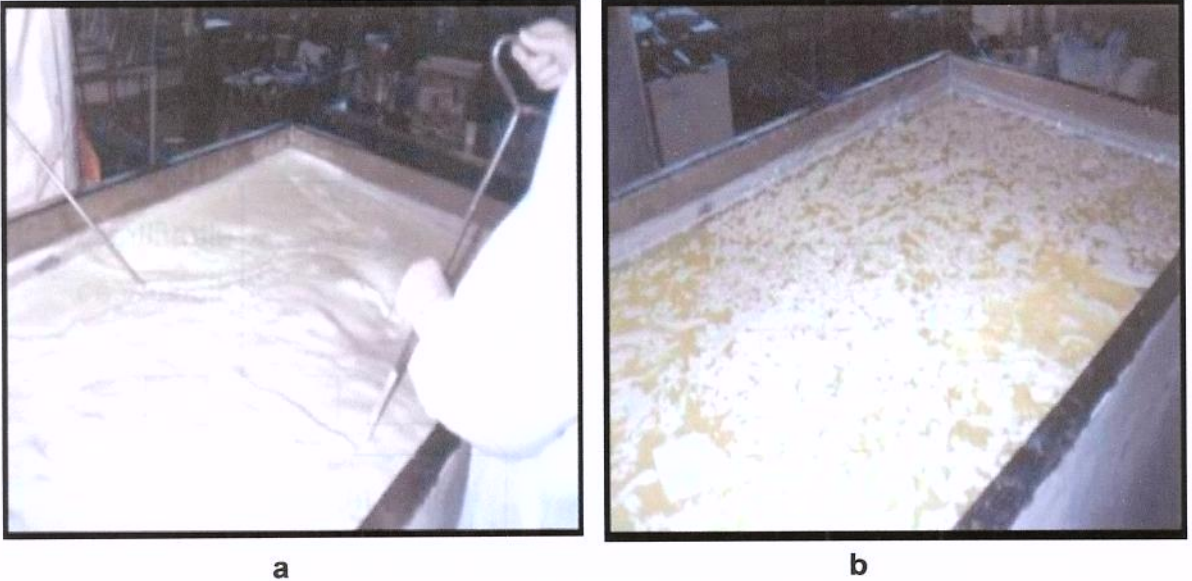


FIGURA 2.1 - Etapas iniciais dos processos de obtenção do coágulo de caseína (COC). **a)** homogeneização e aquecimento do leite a 30-35°C e **b)** “grânulos” de caseína após o corte da massa com liras (horizontais e verticais).

A figura 2.2 ilustra o fluxograma das operações para obtenção do coágulo de caseína desidratado. O coágulo obtido após separação do soro por filtração foi lavado com água, triturado em presença de solução alcalina para se obter suspensão homogênea a pH entre 7,0-7,5. Essa suspensão ($\cong 15\%$ de sólidos) foi pré-aquecida a 60-70°C, para a secagem em “spray dryer” (figura 2.3a), com temperatura de 210°C na entrada e cerca de 80°C na saída do spray, com vazão de 40 litros por hora. O material líquido, soro, foi drenado, ultrafiltrado (concentrado) e diafiltrado, para obtenção de concentrado protéico de soro e permeado.

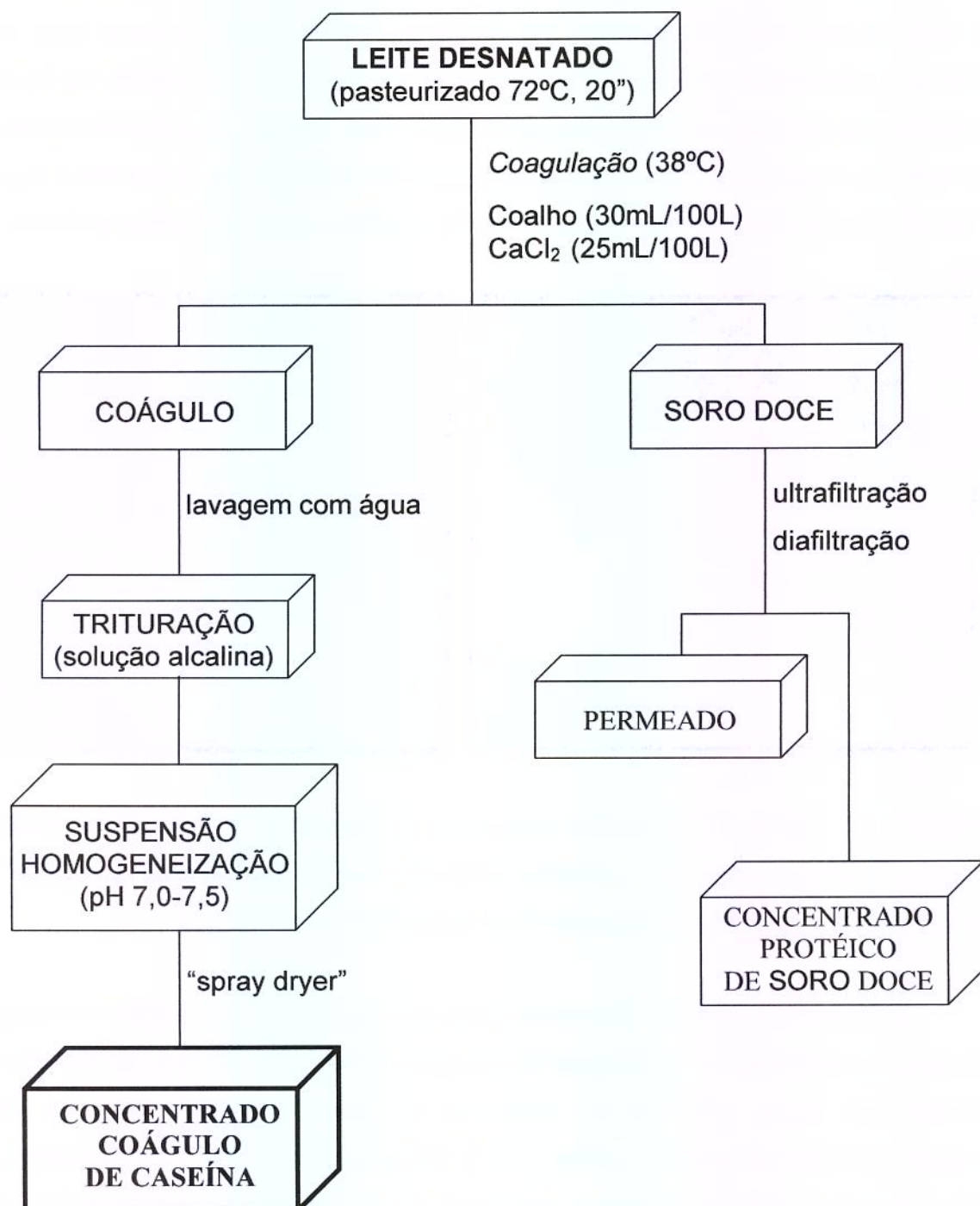


FIGURA 2.2 - Obtenção do coágulo de caseína desidratado (COC) através do processo de coagulação enzimática do leite bovino.

2.2.2.2. Produção de micelas de caseína a partir do leite em pó (CMR).

O leite foi reconstituído na proporção de 1Kg de leite em pó para cada 10kg de água deionizada, até 80 Kg de leite. Um homogeneizador foi utilizado, a baixa rotação, para dissolver o pó. A microfiltração foi realizada numa membrana cerâmica, sendo o suporte e a membrana constituídos de alumina (Al_2O_3), com diâmetro médio de poro de $0,1\text{ }\mu\text{m}$, 19 canais, área de permeação de $0,241\text{m}^2$ e $1,02\text{ m}$ de comprimento, marca Membralox[®], da SCT (Société des Ceramiques Techniques).

O leite foi concentrado a um fator de concentração quatro ($\text{FC}=4$) e em seguida diafiltrado ($\text{CD}=4$), em quatro ciclos de diafiltração. O equipamento foi operado em batelada (100L), pela recirculação de retentado ao tanque de alimentação, até que o fator de concentração ($\text{FC}=4$) fosse atingido. A diafiltração foi realizada com água deionizada, a 50°C , em modo semi-contínuo, sendo adicionado 1kg de água para cada kg de permeado coletado. O produto obtido foi liofilizado (figura 2.3b).

**a****b**

FIGURA 2.3 – Equipamentos utilizados para promover a secagem **a)** spray-dryer e **b)** liofilizador, respectivamente para obtenção do coágulo de caseína e micelas de caseína.

A figura 2.4 mostra o fluxograma do processamento de obtenção da caseína micelar a partir do leite em pó reconstituído:

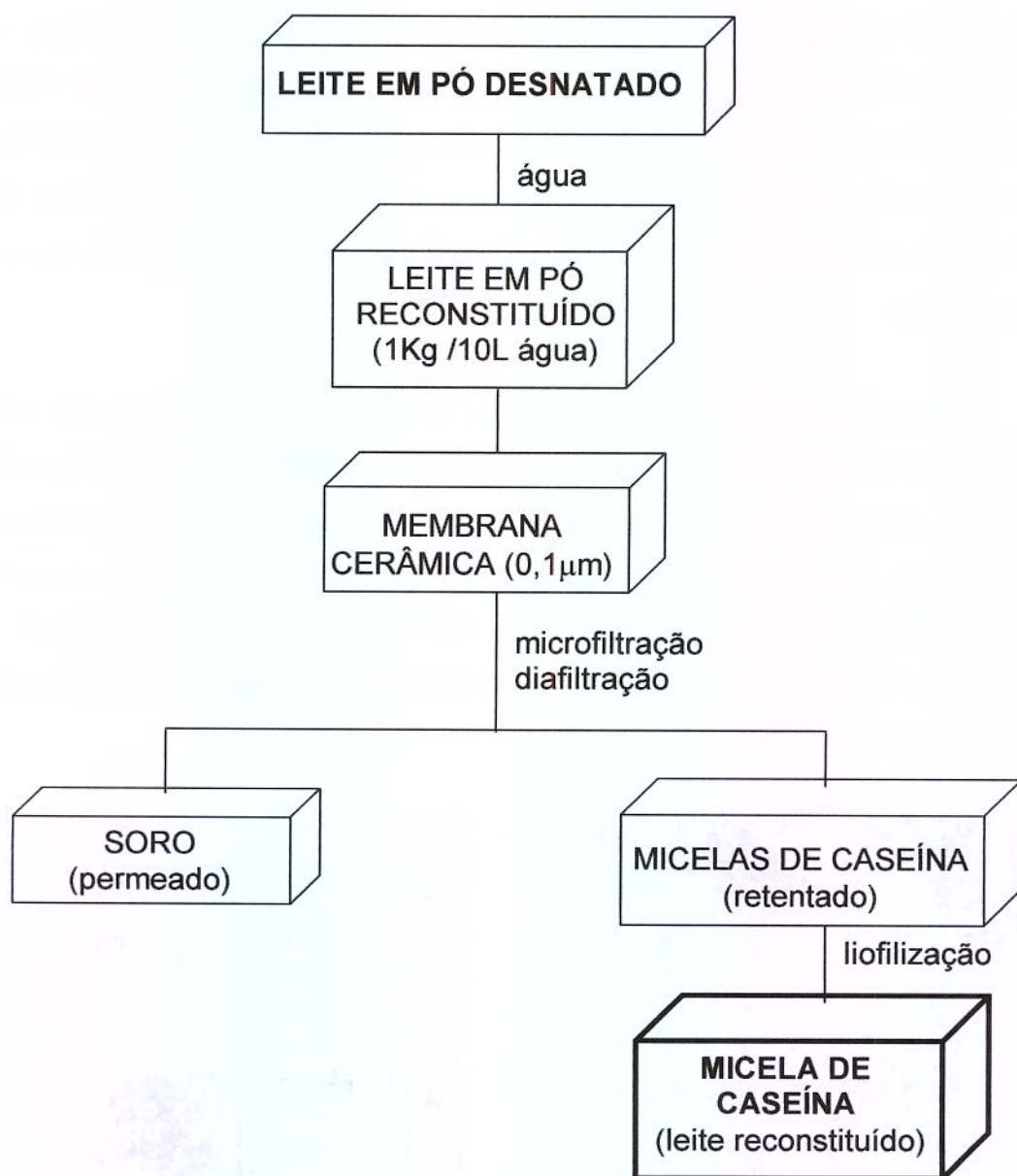


FIGURA 2.4 - Obtenção das micelas de caseína a partir do leite em pó reconstituído (CMR) por microfiltração, seguido de diafiltração e liofilização.

O concentrado de micelas de caseína obtidas do leite reconstituído foram gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Luiz Antonio Viotto do Departamento de Engenharia de Alimentos da UNICAMP e usado para comparação com o produto que foi obtido a partir do leite fluido "in natura".

2.2.2.3. Produção de micelas de caseína a partir do leite “in natura” (CM).

Para a obtenção das micelas de caseína, foi utilizado leite bovino, tipo B, desnatado e pasteurizado (72°C, 20"). As frações contendo as micelas foram obtidas pelos processos de microfiltração e diafiltração, respectivamente em membrana polimérica (1,0 µm) (WGM-Kock Membrane Systems) e membrana cerâmica (0,1 µm) (Membralox® - Societé des Ceramiques Techniques). Após a obtenção, o material foi liofilizado. O processo de obtenção das micelas de caseína está descrito na figura 2.5.

O leite foi concentrado a um fator de concentração quatro e em seguida, diafiltrado em quatro ciclos. O equipamento, da mesma forma que para a obtenção da CMR foi operado em batelada (2x 100L). As condições experimentais foram; temperatura fixa de 50°C, velocidade tangencial 6,1 m/s determinadas mediante otimização deste processo, descrito por Ferreira (2001).

A figura 2.6 mostra as membranas poliméricas espirais utilizadas no sistema de microfiltração do leite (figura 2.7) antes do fracionamento em membrana cerâmica.

As curvas de permeação foram construídas através do monitoramento de peso do permeado, em intervalos de tempo pré-determinados, através de balança analítica, usando a equação:

$$\text{Fluxo Permeado (kg/h.m}^2\text{)} = \frac{m \text{ (massa - Kg)}}{\Delta T(\text{tempo - horas}). A(\text{área membrana - 0,241m}^2\text{)}}$$

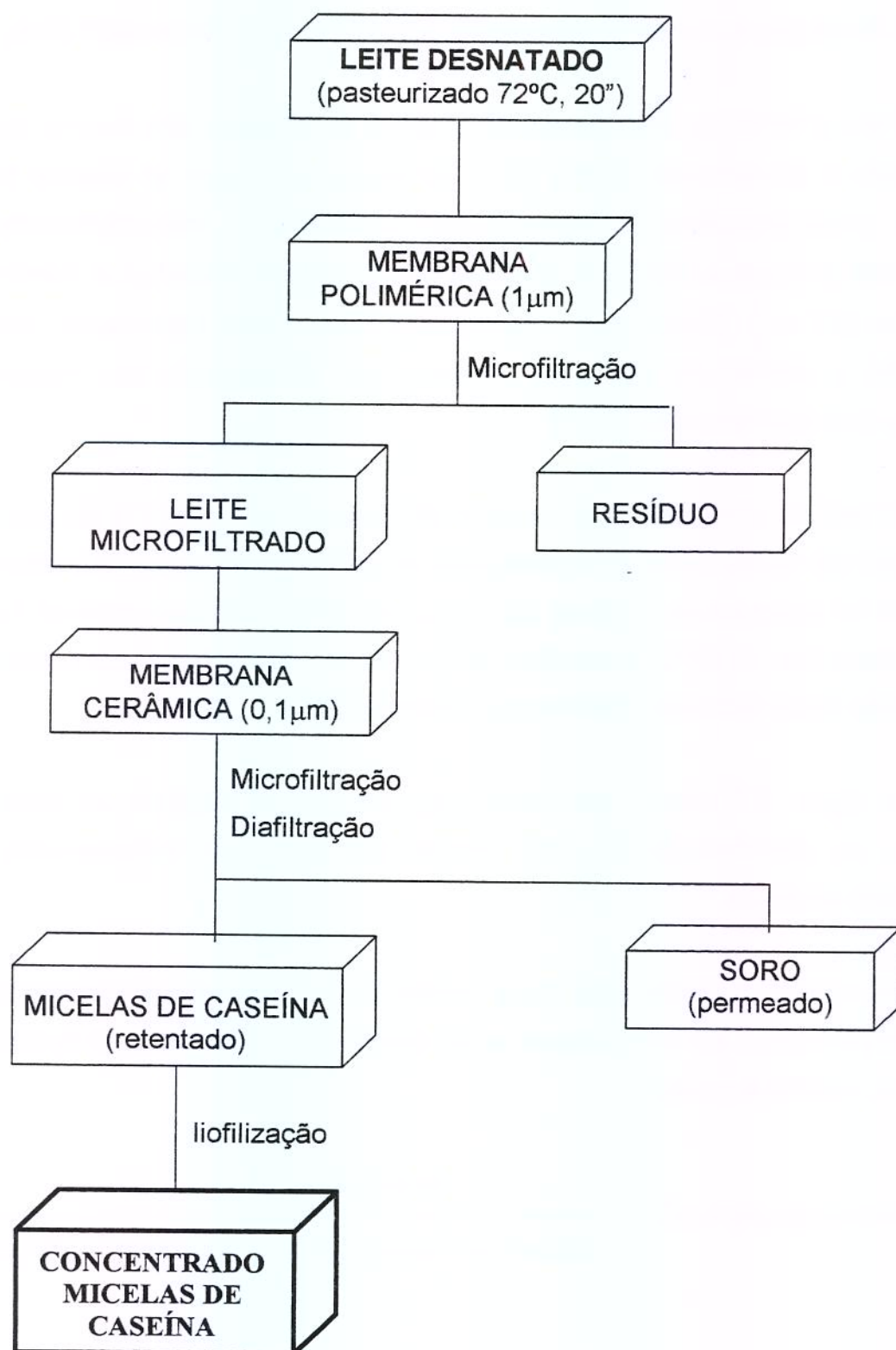


FIGURA 2.5 - Obtenção das micelas de caseína por microfiltração seguido de diafiltração a partir do leite bovino fluido.



FIGURA 2.6 – Membranas poliméricas utilizadas para promover a separação das micelas de caseína das proteínas do soro no leite bovino.



FIGURA 2.7 - Equipamento utilizado para promover a etapa de microfiltração na obtenção das micelas de caseína.

2.2.2.4. Caracterização Química

Composição centesimal

- **Umidade e sólidos totais:** foram determinadas de acordo com os procedimentos descritos no AOAC (1990). Fundamenta-se na evaporação da água presente no alimento e pesagem do resíduo sólido.
- **Resíduo mineral (cinzas):** foi determinada de acordo com os procedimentos descritos no AOAC (1990). Baseia-se na determinação do resíduo inorgânico que fica depois de calcinar a matéria orgânica de uma amostra.
- **Lipídios Totais:** foram determinados pelo método descrito por Bligh & Dyer (1959), empregando-se os solventes clorofórmio, metanol e água (10, 20, e 8 mL, respectivamente) para extração dos lipídios.
- **Nitrogênio Total:** determinado pelo método microKjeldahl, segundo método descrito na AOAC (1990). A proteína bruta foi obtida multiplicando-se o nitrogênio total pelo fator 6,38.
- **Carboidratos:** determinados por diferença, subtraído de 100% a soma dos valores obtidos para as determinações anteriores.

Determinação de cálcio

Determinado de acordo com os procedimentos descritos na AOAC (1995).

Determinação de aminoácidos

Para identificação e quantificação dos aminoácidos, as amostras foram hidrolisadas com HCl 6N em tubos de hidrólise, seladas a vácuo e mantidas a 110°C por 22 horas. Após a incubação, o ácido clorídrico foi então evaporado e fez-se a recuperação da amostra em tampão citrato pH 2,2.

Uma alíquota de 25µL foi injetada no analisador (Dionex Dx-300), para separação dos aminoácidos em coluna de troca catiônica e reação colorimétrica pós-coluna com ninidrina (Spackman et al., 1958). Solução padrão de aminoácidos Pierce foi utilizada como referência.

O aminoácido triptofano, que é destruído durante a hidrólise ácida, foi quantificado segundo o método de Spices (1967), onde fez-se a hidrólise enzimática com a pronase a 40 °C por 24h, seguida de reação colorimétrica com dimetilamino benzaldeído (DAB) e nitrito de sódio, na ausência de luz e posterior leitura em espectrofotometro a 590 nm e a concentração de triptofano foi determinada a partir de uma curva padrão.

Escore Químico

O escore químico de aminoácidos essenciais (EAE) foi determinado relacionando a concentração de cada um dos aminoácidos essenciais das frações protéicas em estudo com os aminoácidos do padrão de referência da FAO/WHO (1990), de acordo com a metodologia de Henley & Kuster (1994), pela seguinte expressão:

$$\text{EAE} = \frac{\text{mg de aminoácidos / g proteína teste}}{\text{mg de aminoácidos / g proteína padrão ou referência}}$$

Segundo Sgarbieri (1996), este quociente indicará: a) ordem dos aminoácidos limitantes na proteína em estudo, em relação à referência ou proteína padrão; b) o valor encontrado para o aminoácido mais limitante é uma estimativa do valor biológico da proteína em estudo em relação à referência ou proteína padrão.

2.2.2.5. Avaliação Nutricional em ratos

A caracterização nutricional foi determinada comparativamente à caseína comercial (CC), variando somente a fonte de proteína. Foram utilizadas como fontes protéicas, o coágulo de caseína (COC) e a caseína micelar (CM).

O ensaio biológico foi realizado no Laboratório de Ensaio Biológicos do Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas. Foram utilizados para o experimento 32 ratos machos da linhagem Wistar livres de patógenos (SPF), recém-desmamados, com 21 dias de idade, provenientes do Centro de Bioterismo (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Após a pesagem inicial, os animais foram mantidos em gaiolas individuais contendo dieta e água a vontade. Os ratos foram divididos em 4 grupos de 8 animais e foram mantidos nas dietas durante todo o período de experimentação (21 dias). As condições ambientais do biotério foram controladas a fim de manter a temperatura em $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, e períodos alternados de claro e escuro de 12 horas.

Todos os animais foram pesados antes do início do experimento e uma tabela com ordem crescente de peso foi elaborada. Os grupos mantidos em dietas experimentais foram selecionados tomando-se um animal de menor peso e um animal de maior peso até completar o grupo com 8 animais. O peso médio dos animais em cada grupo foi de $61,3 \pm 10,82$ (média $\pm$ desvio padrão).

Composição e Preparo das Dietas

Todas as dietas foram preparadas segundo as especificações da AIN-93 G (Reeves et al., 1993), exceto pela concentração de proteína, a qual foi mantida a 10%. A composição da dieta é apresentada na tabela 2.1.

TABELA 2.1 - Composição básica da dieta, segundo AIN-93 G para ratos em crescimento.

Componentes	g/Kg
Amido de milho	397,5
Fonte de proteína (17%)	200,0
Amido dextrinizado	132,0
Sacarose	100,0
Óleo de soja	70,0
Fibra	50,0
Mistura mineral	35,0
Mistura vitamínica	10,0
L- cistina	3,0
Bitartarato de colina	2,5
Tert-butil-hidroquinona	0,014

Fonte: Reeves et al. (1993).

Para a execução dos ensaios, as seguintes dietas foram preparadas utilizando diferentes fontes protéicas: 1) dieta padrão, de caseína comercial (CC), marca M. Cassab; 2) dieta contendo como única fonte protéica o coágulo de caseína (COC); 3) dieta contendo caseína micelar (CM) e 4) dieta isenta de proteína, aprotéica (APRO).

As misturas minerais e vitamínicas (Roche) foram preparadas segundo as especificações da AIN-93 G e estão descritas nas tabelas 2.2 e 2.3, respectivamente.

TABELA 2.2 - Mistura mineral AIN G-MX

Componentes	g/Kg
<i>Elementos Minerais Essenciais</i>	
Carbonato de cálcio anidro – 40,04% Ca	357,00
Fosfato de potássio monobásico – 22,76% P; 28,73% K	196,00
Citrato de potássio, tri-K, monohidratado – 36,16% K	70,78
Cloreto de sódio – 39,34% Na; 60,665 Cl	74,00
Sulfato de potássio – 44,87% K; 18,39% S	46,60
Óxido de magnésio – 60,32% Mg	24,00
Citrato férrico – 16,5% Fe	6,06
Carbonato de zinco – 52,14% Zn	1,65
Carboanto de manganês – 47,70% Mn	0,63
Carbonato de cobre – 57,47% Cu	0,30
Iodeto de potássio – 59,3% I	0,01
Selenito de sódio anidro – 41,79% Se	0,01025
Paramolibdato de amônio – 4 H ₂ O – 54,34% Mo	0,00795
<i>Elementos minerais potencialmente benéficos</i>	
Meta-silicato de sódio – 9 H ₂ O – 9,88% Si	1,45
Sulfato de potássio crômico – 12 H ₂ O – 10,42% Cr	0,275
Cloreto de lítio – 16,38% Li	0,0174
Ácido bórico – 17,5% B	0,0815
Fluoreto de sódio – 42,24% F	0,0635
Carbonato de níquel – 45% Ni	0,0318
Vanadato de amônio – 43,55% V	0,0066
Sacarose	221,026

Fonte: Reeves et al. (1993).

TABELA 2.3– Formulação da mistura vitamínica AIN-93 VX

Componentes	g/Kg
Ácido nicotínico	3,000
Pantotenato de cálcio	1,600
Piridoxina – HCl	0,700
Tiamina – HCl	0,600
Riboflavina	0,600
Ácido fólico	0,200
D-biotina	0,020
Cianocobalamina (B-12) (0,1% em manitol)	2,500
Acetato de all-rac- α -tocoferol (E) (500 UI/g)	15,000
Palmitato de all-trans-retinol (A) (500.000 UI/g)	0,800
Colicalciferol (D ₃) (400.000 UI/g)	0,250
Filoquinona (vitamina K)	0,075
Sacarose	974,655

Fonte: Reeves at al. (1993).

Determinação do valor nutritivo da proteína

O valor nutritivo da proteína foi estimado através dos seguintes índices nutricionais: NPR (quociente de eficiência líquida da proteína), PER (quociente de eficiência protéica) e Dv (digestibilidade verdadeira), segundo metodologia descrita por Sgarbieri (1987).

Fez-se o controle do consumo de dieta para os cálculos de dosagem de nitrogênio e os dados de consumo e ganho de peso das 3 semanas foram utilizados para o cálculo de PERop (PER operacional) e NPR.

O grupo em dieta aprotéica serviu para determinação da perda de peso corporal durante todo o período do experimento, dado necessário para o cálculo do NPR e também para o cálculo de nitrogênio fecal endógeno (origem corporal)

utilizado na transformação do índice de digestibilidade aparente da proteína em digestibilidade verdadeira.

Quociente de Eficiência Protéica (PER)

O PER mede o quociente do ganho de peso em gramas pela quantidade de proteína ingerida também em gramas, de um grupo de animais submetidos a dieta contendo a proteína em estudo conforme a expressão abaixo:

$$\text{PER} = \frac{\text{ganho de peso (g)}}{\text{proteína consumida (g)}}$$

A metodologia convencional recomenda ensaio de 4 semanas para o PER. Portanto, neste ensaio, realizado com 3 semanas, o PER deve ser interpretado como operacional (PERop).

Quociente de eficiência líquida da proteína (NPR)

Este método constitui apenas em uma modificação do PER e consiste em somar ao ganho de peso do grupo que recebe a dieta protéica a perda de peso de um grupo equivalente que recebeu dieta aprotéica. A relação que permite o cálculo do NPR é a seguinte:

$$\text{NPR} = \frac{\text{ganho de peso GI (g)} + \text{perda de peso GII (g)}}{\text{proteína consumida GI (g)}}$$

Onde: GI= grupo em dieta protéica

GII= grupo em dieta aprotéica

Digestibilidade Verdadeira (Dv)

A digestibilidade verdadeira é a medida da porcentagem das proteínas que são absorvidas na forma de aminoácidos ou qualquer outro composto nitrogenado. A digestibilidade é determinada pela medida do nitrogênio ingerido com a dieta e o nitrogênio eliminado nas fezes, levando-se em consideração o nitrogênio proveniente do próprio animal que é excretado nas fezes juntamente com a proteína de origem alimentar não digerida. A Dv é calculada segundo a expressão:

$$Dv = \frac{NI - NFa}{NI} \times 100$$

Onde: NFa= NF – NFe

Dv= digestibilidade verdadeira

NI= nitrogênio ingerido

NF= nitrogênio fecal de origem alimentar

NFe= nitrogênio fecal de origem endógena

Escore químico corrigido pela digestibilidade verdadeira (PDCAAS)

Este índice descrito por Henley & Kuster (1994) avalia a qualidade da proteína em estudo através do produto entre o escore de aminoácidos essenciais (EAE) do coágulo de caseína (COC), caseína micela (CM) e da caseína comercial (CC), pela digestibilidade verdadeira (Dv), através da seguinte fórmula:

$$PDCCAS = EAE \times Dv$$

Onde:

Dv= digestibilidade verdadeira

EAE= escore químico de aminoácidos essenciais

2.2.2.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese é um processo no qual espécies carregadas eletricamente (íons ou partículas coloidais) são separadas através da migração diferenciada dos componentes da amostra em um campo elétrico. É um dos principais métodos empregados na separação e análise de proteínas, polinucleotídeos e outros biopolímeros.

A determinação do perfil eletroforético dos concentrados de caseína obtidos por diferentes processos foi realizada por dois procedimentos: gel contendo o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e gel contendo uréia (URÉIA-PAGE), descritos respectivamente por Laemmli (1970) e Andrews (1983).

SDS-PAGE

Na eletroforese em SDS-PAGE foi utilizado gel de poliacrilamida a 4% no gel de concentração e a 12% no gel de separação. A eletroforese foi conduzida em aparelho vertical Bio-Rad modelo 3000 Xi, sendo as dimensões da placa de 20 x 16 cm. As amostras (solução de 0,25% de proteína) foram dispersas em 100 μ L de solução tampão contendo 0,5M tris-HCl (pH 6,8), 10% SDS, 10% glicerol, 5% β -mercaptoetanol e 0,1% azul de bromofenol, aquecidas a 95°C por 4 minutos e após resfriadas; alíquotas de 35 μ L de cada amostra foram aplicadas no gel. A corrida foi efetuada à temperatura ambiente, sendo a corrente fixa de 25mA. Após a corrida (6h), os géis foram corados em solução corante 0,1% (p/v) de Coomassie Blue 250R e 20% de ácido acético e descorados em solução aquosa contendo 25% metanol e 7% de ácido acético.

O padrão dos pesos moleculares utilizado foi o LMW Calibration Kit (Pharmacia) contendo: fosforilase B (94,0 kDa); albumina bovina (67,0 kDa); ovalbumina (43,0 kDa); anidrase carbônica (30,0 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa).

URÉIA-PAGE

Na eletroforese em URÉIA – PAGE foi utilizado gel contendo 9% de poliacrilamida e 7M de uréia. As amostras (solução a 0,4% de proteína) foram dispersas em 1mL de tampão contendo 0,062M tris-HCl (pH 6,7), 7M uréia, aquecidas em um banho a 37°C por 60 minutos. Adicionou-se β -mercaptoetanol e as amostras continuaram no banho à mesma temperatura por 45 minutos. Adicionou-se pequena quantidade de azul de bromofenol para servir como indicador da corrida. A eletroforese foi conduzida à temperatura ambiente, utilizando uma unidade vertical Protein II – Bio-Rad, com placas de 8,3 x 10,2 cm empregando-se voltagem constante de 120V. Foi injetado 5 μ L das amostras no gel, sendo o tempo de corrida aproximadamente 2 horas. Para a coloração dos géis foi utilizado 0,1% Coomassie Blue 250R; 2% ácido fosfórico e 15% sulfato de amônio. Os géis foram corados por 24 horas e descorados em água destilada.

2.2.2.7. Análise Estatística

Todos os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey (Gomes 1982), utilizando-se o programa “Statística: Basic Statistics and Tables”.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Fluxo de permeado da caseína micelar obtida de leite bovino fluído

O perfil da curva de fluxo de permeado de CM está representado na figura 2.8. O leite foi concentrado a um fator de concentração quatro e em seguida, diafiltrado em quatro ciclos. As condições experimentais foram; temperatura fixa de 50°C, velocidade tangencial 6,1 m/s e pressão transmembrana 2 bar determinadas mediante otimização deste processo, descrito por Ferreira (2001).

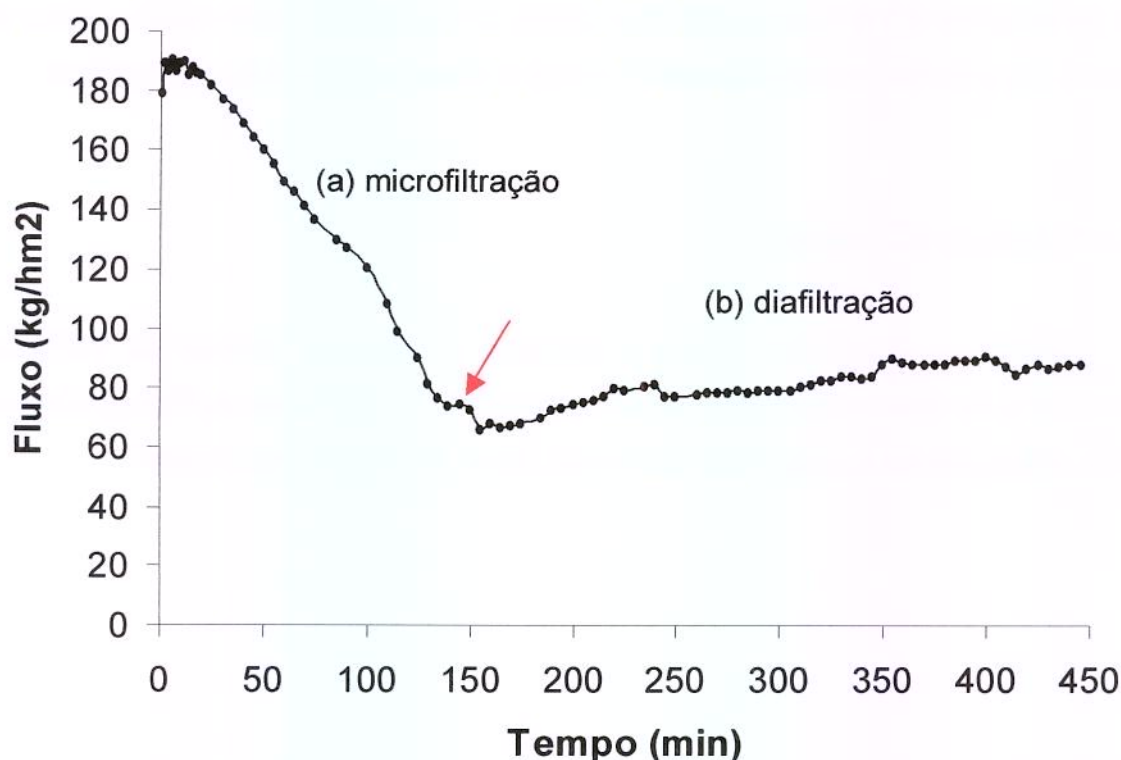


FIGURA 2.8 - Fluxo de permeado de caseína micelar (CM) obtida de leite bovino fluído.

Observa-se que ao final do processo de microfiltração (a) (duração 135 min.), obteve-se um fluxo de permeado próximo a 70 Kg/hm², sendo que este, durante o processo de diafiltração (b), apresentou um relativo aumento, aproximadamente 90 Kg/hm².

Este aumento de fluxo de permeado se deve à retirada parcial de vários componentes do leite (lactose, gordura, proteínas do soro, sais minerais) que provoca um efeito de aumento da permeabilidade da camada de gel polarizada, tornando-a mais porosa, enquanto que no interior dos poros da membrana também ocorre uma eliminação parcial desses componentes de baixo peso molecular.

2.3.2. Composição Centesimal

Na tabela 2.4 está apresentada a composição centesimal dos produtos estudados. Pode-se observar que o componente de maior concentração foi a proteína para as quatro amostras, seguido de cinzas, com exceção do coágulo e da caseína comercial. Pode-se observar que a caseína comercial possui uma maior quantidade de proteína, superior à caseína micelar e ao coágulo. Observa-se que todos os resultados diferiram significativamente entre a mesma análise.

TABELA 2.4 - Composição centesimal e determinação de cálcio de caseína comercial (CC), coágulo de caseína (COC), caseína micelar (CM) e caseína micelar do leite em pó reconstituído (CMR), todos em base seca.

Componentes (% base seca)	CC	COC	CM	CMR
<i>Proteínas</i>	91,98±0,53 ^a	72,36±0,21 ^d	86,14±0,39 ^b	82,32±0,38 ^c
<i>Cinzas</i>	2,41±0,02 ^d	9,33±0,09 ^a	8,44±0,02 ^b	7,96±0,04 ^c
<i>Lipídios</i>	2,26±0,05 ^d	3,12±0,03 ^c	4,30±0,06 ^a	3,58±0,21 ^b
<i>Carboidrato*</i>	3,35	15,19	1,12	6,14
<i>Cálcio (mg/100g)</i>	233±3 ^c	2653±108 ^a	2627±67 ^a	2381±36 ^b

* Carboidrato = 100 – (proteína + lipídeos totais + cinzas)

Resultados são média de 3 determinações analíticas ± desvio padrão. Letra minúscula (linha) indica a avaliação estatística de Tukey a 5% de probabilidade.

A elevada taxa de material inorgânico presente no coágulo de caseína poderia ser explicada pelo método de obtenção do mesmo. A formação do coágulo de caseína provavelmente permite algum tipo de ligação entre os minerais e o gel formado, aumentando assim a concentração de minerais neste produto. Uma lavagem mais exaustiva do coágulo, previamente à secagem, poderia reduzir o teor de minerais.

A quantidade de cálcio presente nos concentrados de caseína foi bastante elevada, aproximadamente 2%, com exceção da caseína comercial. Os teores de cálcio podem ser explicados com base no método de obtenção destes produtos. A caseína comercial provavelmente foi produzida através da precipitação ácida em pH 4,6, ocasionando uma maior solubilização dos íons cálcio. Para a obtenção do coágulo de caseína, foi adicionado CaCl_2 (25mL para cada 100L de leite) e, como encontrado na literatura, as micelas de caseína são mantidas por ligações de fosfato de cálcio coloidal, o que justifica a presença elevada de cálcio neste material.

2.3.3. Composição de aminoácidos

Na tabela 2.5 encontram-se os valores dos perfis de aminoácidos essenciais (g por 100g de proteína) dos diferentes concentrados de caseína (CC, COC, CM e CMR), comparados com o padrão da FAO/WHO (1990).

As caseínas, segundo Fox & McSweeney (1998), têm um alto conteúdo (35-45%) de aminoácidos apolares (Val, Leu, Ile, Phe, Try, Pro) e um baixo conteúdo de aminoácidos sulfurados, os quais limitam seu valor biológico nutritivo. Como pode ser observado na tabela 2.5, no entanto, o conteúdo de aminoácidos essenciais em todas as amostras estudadas satisfazem aos requerimentos da FAO/WHO, tendo-se um EAE igual a 1.

TABELA 2.5 – Composição de aminoácidos essenciais dos produtos: caseína comercial (CC), coágulo de caseína (COC), caseína micelar (CM) e caseína micelar reconstituída (CMR), e o padrão de referência da FAO/WHO (1990).

Aminoácidos (g/100g de proteína)	Padrão				
	FAO/WHO	CC	COC	CM	CMR
Treonina	3,4	5,29	4,08	4,62	5,10
Metionina + Cistina	2,5	4,03	3,71	3,10	2,54
Valina	3,5	7,55	6,55	6,38	6,82
Leucina	6,6	11,99	11,03	10,30	10,66
Isoleucina	2,8	5,56	4,75	4,95	5,33
Fenilalanina + Tirosina	6,3	13,51	8,18	11,05	11,15
Lisina	5,8	9,06	8,08	8,50	8,48
Histidina	1,9	3,51	3,36	3,03	3,03
Triptofano	1,1	1,17	1,44	1,43	1,22
Escore Químico - EAE	-	1,00	1,00	1,00	1,00
PDCCAS	-	93,78	91,23	91,12	-

O PDCCAS (escore químico corrigido pela digestibilidade verdadeira) indica a proporção em que determinada fonte protéica é utilizada pelo organismo de acordo com o padrão. Como o escore químico de aminoácidos essenciais está de acordo com o padrão da FAO/WHO (1990), observa-se que o valor do PDCCAS será igual ao da digestibilidade da proteína, sendo que a caseína comercial (93,78%) possui um valor superior ao da caseína coagulada e da caseína micelar.

2.3.4. Avaliação Nutricional

A caracterização nutricional tanto do coágulo como das micelas de caseína foi feita com base na composição de aminoácidos, no escore químico de aminoácidos essenciais tendo por padrão de referência o perfil recomendado pela FAO/WHO (1990) e no ensaio com animais em que foram determinados digestibilidade verdadeira (Dv), quociente de eficiência da proteína (PER) e

quociente de eficiência protéica (NPR) usando como referência à caseína comercial (M. Cassab Ltda).

O registro do ganho de peso semanal dos grupos de animais utilizados no ensaio, durante o período de 21 dias, foi utilizado para a construção de curvas de crescimento médio, ilustradas na figura 2.9. Embora, a composição em aminoácidos tenha sido diferente para os concentrados protéicos que compunham as dietas, seus efeitos em promover crescimento foram estatisticamente iguais.

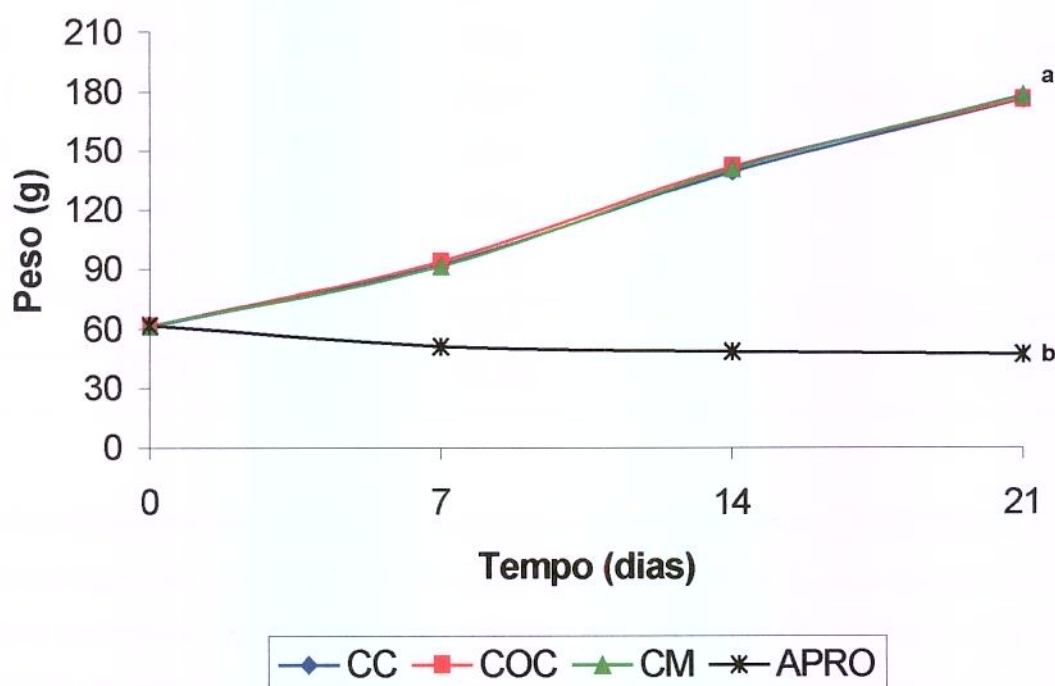


FIGURA 2.9 – Curva de crescimento de ratos alimentados por 21 dias com dietas contendo 10% de proteína proveniente de caseína comercial (CC), coágulo de caseína (COC), caseína micelar (CM) e dieta isenta de proteína (APRO).

Determinou-se uma perda de peso média em torno de 26% dos animais em dieta aprotéica e em relação aos demais tratamentos. Os animais em dietas protéicas, alimentados com diferentes concentrados de caseína, tiveram um aumento de peso médio de 84% após 21 dias de experimento.

Os dados referentes à ingestão de dieta, ingestão de proteína, ganho de peso, PERop e NPR avaliados durante o ensaio biológico encontram-se na tabela 2.6. Na tabela 2.7 estão representados os valores obtidos para digestibilidade verdadeira, nitrogênio ingerido e nitrogênio fecal.

TABELA 2.6 – Valores obtidos da ingestão de dieta, ingestão de proteína, ganho de peso, quociente de eficiência protéica (PERop) e coeficiente de eficiência líquida da proteína (NPR) na caseína comercial (CC), coágulo de caseína (COC) e caseína micelar (CM) foram avaliados em ratos Wistar recém-desmamados mantidos em experimento por 21 dias.

Fonte Protéica	Ingestão Dieta (g)	Ingestão Proteína (g)	Ganho de Peso (g)	PER operacional	NPR
CC	305,00±27,93 ^a	34,04±3,62 ^b	114,58±8,69 ^a	3,36±0,19 ^a	3,85±0,20 ^a
COC	332,57±16,85 ^a	37,41±1,90 ^a	114,69±9,62 ^a	3,06±0,15 ^b	3,50±0,15 ^b
CM	314,26±11,57 ^a	35,45±1,30 ^b	116,26±6,45 ^a	3,28±0,18 ^a	3,74±0,19 ^a

Resultados são média de 8 animais por tratamento ± desvio padrão. Médias seguidas por uma mesma letra (coluna) não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste deTukey.

TABELA 2.7 - Valores obtidos para digestibilidade verdadeira, nitrogênio ingerido e nitrogênio fecal para a caseína comercial (CC), coágulo de caseína (COC), e caseína micelar (CM).

Tratamento	N ingerido (g)	N fecal (g)	Dv
CC	5,36±0,49 ^b	1,62±0,14 ^b	93,78±2,45 ^a
COC	5,87±0,30 ^a	1,79±0,08 ^a	91,23±1,34 ^b
CM	5,56±0,20 ^b	1,79±0,09 ^a	91,12±1,58 ^b

Resultados são média de 8 animais por tratamento ± desvio padrão. Médias seguidas por uma mesma letra (coluna) não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste deTukey.

Os resultados obtidos na tabela 2.6 mostraram não haver diferença significativa ($p>0,05$) na ingestão da dieta e do ganho de peso entre os grupos de animais, mantidos em diferentes preparações de caseína.

Na dieta com o coágulo observou-se um maior consumo de proteína pelos ratos que nos demais concentrados. Quanto aos valores de PERop e NPR as dietas contendo caseína comercial e caseína micelar não diferiram tendo sido superiores ao coágulo. Friedman (1996), considera de alto valor nutritivo, proteínas com valor de PER acima de 2,0.

Existem alguns fatores que podem influenciar os valores de PER, dentre eles, a concentração lipídica da dieta e a concentração protéica. Elevadas concentrações de proteínas acrescentadas na dieta, com valores entre 12 a 15% elevam os gastos energéticos, diminuindo a eficiência da proteína para a síntese de novas proteínas corpóreas.

Segundo Sgarbieri (1996), a concentração de proteína ideal para análise do índice de PER está no intervalo de 9 a 12% para a proteína de alto valor nutritivo, onde esta proteína será mais utilizada por estar limitante e assim deve ser preferencialmente utilizada para a síntese de proteínas corporais.

A digestibilidade verdadeira (tabela 2.7) do coágulo de caseína e caseína micelar foi significativamente menor que a da caseína comercial. Esta baixa digestibilidade do COC pode estar relacionada ao processo de obtenção e secagem, e da caseína micelar pode estar relacionada à integridade da micela.

2.3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em SDS-PAGE é uma técnica das mais utilizadas para determinar o peso molecular das proteínas (Nandi, 1997). As proteínas tratadas com SDS apresentam um grande excesso de cargas negativas devido ao SDS que se liga às moléculas de proteína. Por esse motivo o fator de mobilidade das proteínas ocorre por diferenças de peso molecular (Sgarbieri, 1996).

As proteínas também podem ser separadas de acordo com a carga da fração de proteína independente da sua conformação. Por incorporação de 6-8M de uréia é possível mudar a solubilidade da proteína, desnaturação e subunidades de dissociação, facilitando a separação estritamente de acordo com a carga das frações das proteínas (Yada et al., 1996).

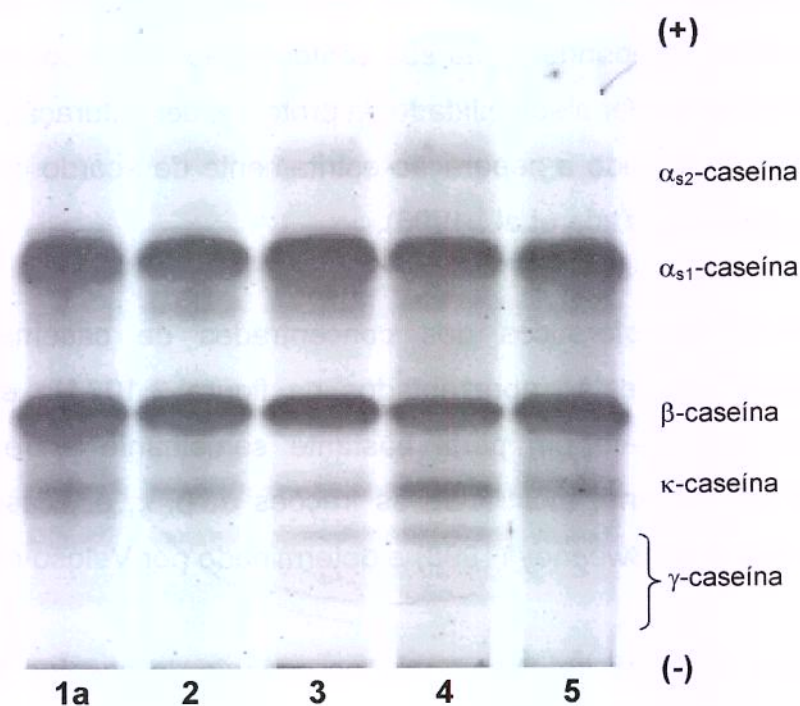
Os perfis eletroforéticos dos concentrados de caseína, obtidos por diferentes processos, estão apresentados na figura 2.10. Na eletroforese em URÉIA-PAGE observa-se um perfil bastante semelhante entre os diferentes concentrados de caseína, mostrando as frações α , β , κ , e γ -caseína, conforme ilustrado por Fox & McSweeney (1998) e determinado por Veloso et al. (2002).

Na figura 2.10 (a), verifica-se que no coágulo de caseína (3) a κ -caseína está presente em menor quantidade que nos demais concentrados. Este fato pode ser justificado, pois segundo a literatura no processo de coagulação enzimática do leite para obtenção do coágulo de caseína, a κ -caseína é hidrolisada em dois peptídios: um amino-terminal formado pelos resíduos de aminoácidos 1 a 105 da sequência primária que permanece ligado às caseínas e outro peptídio constituído dos resíduos 106 a 169 do segmento carboxi-terminal, que se dissolve no soro de leite (Lourengo, 2000).

Na eletroforese em SDS-PAGE (figura 2.10b), os concentrados de caseína apresentaram diferenças importantes entre os processamentos as quais não foram observadas na eletroforese em URÉIA-PAGE (figura 2.10a), possivelmente por diferenças de princípios das metodologias avaliadas.

Ao comparar as amostras separadas em SDS-PAGE, observa-se que o coágulo de caseína e a caseína micelar obtida do leite bovino fluido possuem frações de peso molecular inferiores a 30 kDa que não estão presentes na caseína comercial, possivelmente bandas de κ -caseína e de proteínas soro: β -lactoglobulina e α -lactoalbumina, com pesos moleculares de 18.363 e 14.176, respectivamente (Fox & McSweeney, 1998).

a



b

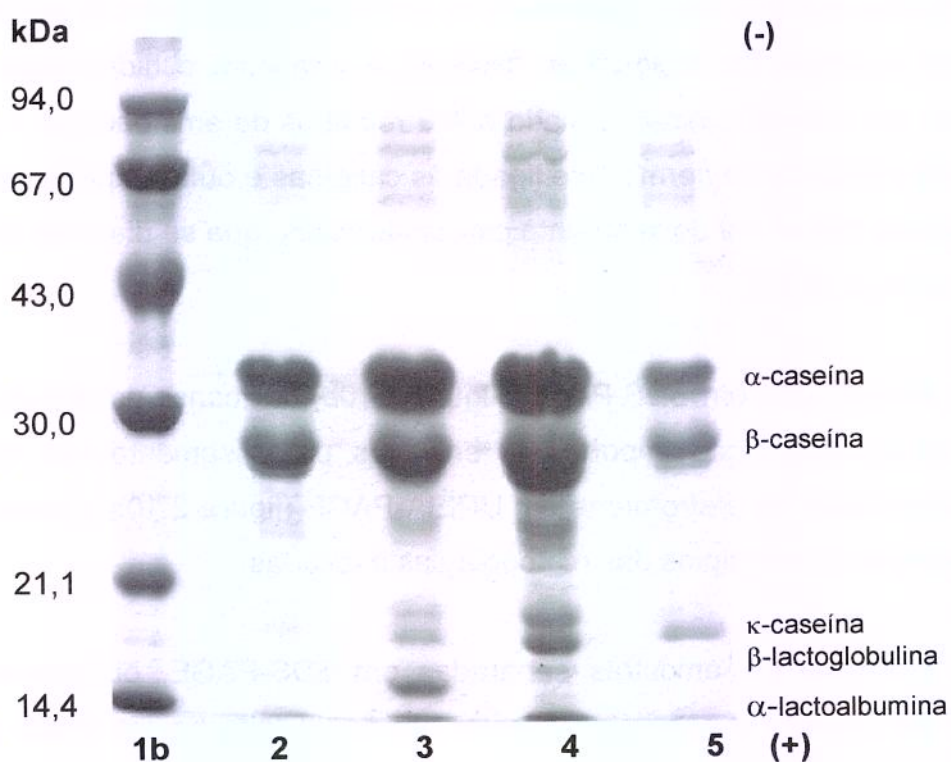


FIGURA 2.10 – Eletroforese em gel de poliacrilamida dos concentrados de caseína a) URÉIA-PAGE e b) SDS-PAGE. (1a) caseinato de sódio, (1b) padrão (Pharmacia™), (2) caseína comercial, (3) coágulo de caseína, (4) caseína micelar obtida do leite fluido e (5) caseína micelar obtida do leite em pó reconstituído.

Observa-se também que a caseína micelar (4) apresenta frações de α e β -caseína em maior quantidade que a caseína obtida do leite reconstituído, por estar mais íntegra, pois foi obtida através da microfiltração do leite bovino fluido, enquanto que na obtenção da caseína micelar reconstituída, foi utilizado o leite em pó o qual sofreu processo prévio de secagem. A existência de menor número de bandas de menor peso molecular nas micelas de leite reconstituído também refletem o efeito da secagem prévia da reconstituição e microfiltração.

Observa-se que os concentrados possuem uma pequena quantidade de proteínas de alto peso molecular (60 - 86 kDa), sendo que a maior concentração das bandas das proteínas foi determinada em valores próximos a 30kDa, referentes às frações de α e β -caseína. As razões de largas bandas e pesos moleculares aparentes das caseína intactas em SDS-PAGE foram previamente reportadas por Creamer & Richardson (1984), devido ao volume hidrodinâmico e à distribuição de cargas negativas não usuais ao longo da cadeia polipeptídica.

Os resultados do perfil eletroforético indicam que a eletroforese SDS-PAGE pode ser utilizada para verificar diferenças de composição devido aos diferentes processamentos dos concentrados de caseína, sendo que este método apresenta detalhes que na eletroforese em URÉIA-PAGE foram ocultados.

2.4. CONCLUSÕES

Os concentrados de caseína obtidos por diferentes processos (COC, CM e CMR) apresentaram diferenças significativas quanto à composição centesimal. A caseína comercial possui uma maior quantidade de proteína. O teor de cálcio e o de cinzas foi significativamente inferior para a caseína comercial, quando comparada aos demais concentrados.

Verificou-se que todos os concentrados de caseína estudados, caseína comercial, coágulo de caseína, caseína micelar obtida do leite bovino fluido e caseína micelar obtida do leite reconstituído atendem os padrões de aminoácidos essenciais recomendados pela FAO/WHO (1990) para crianças de 2-5 anos de idade.

Apesar da composição de aminoácidos ter sido diferente, seus efeitos em promover o crescimento dos ratos nos diferentes tratamentos foram estatisticamente iguais. O melhor resultado de digestibilidade (93,78%) foi conseguido com a caseína comercial. Quando avaliados os índices de PERop e NPR observou-se que esses índices foram significativamente inferiores aos demais tratamentos para a dieta com caseína coagulada.

Os resultados determinados na eletroforese SDS-PAGE indicaram que esta metodologia pode ser utilizada para verificar diferenças de processamento entre os concentrados de caseína, sendo que este método apresenta detalhes que na eletroforese em URÉIA-PAGE não foram observados. Determinou-se que a caseína micelar obtida do leite bovino apresentou maiores concentrações de α , β e κ -caseína, confirmando a integridade da micela obtida por um processamento mais brando que os demais concentrados.

Observa-se que os perfis eletroforéticos da caseína comercial e da caseína micelar obtida do leite reconstituído são bastante parecidos, evidenciando menor heterogeneidade em função de não apresentarem algumas bandas que parecem ser provenientes do soro. O coágulo de caseína e a caseína micelar obtidas do leite fluido se assemelham.

2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, A.T. Proteinases in normal bovine milk and their action on casein. **Journal of Dairy Research**. Cambridge, v.50, n.1, p.45-55, 1983.

A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists – Official Methods of Analysis, W. Horwitz (ed.), 15th edition, Washington, D.C., p.1141, 1990.

A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists – Official Methods of Analysis, W. Cunnif (ed.), 16th edition, Virginia, D.C., p.13, 1995.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**. Ottawa, v.37, n.8, p.911-917, 1959.

CREAMER, L.W.; RICHARDSON, T. Anomalous behavior of bovine α_{s1} and β -casein on geel eletrophoresis in sodium dodecyl sulfate buffers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.234, n.2, p.476-486, 1984.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nation / World Health Organization. Report on a joint FAO/WHO Expert Consolation on Protein Quality Evaluation, Bethesda, 1990.

FERREIRA, C. V. Influência da velocidade tangencial e da pressão transmembrana na obtenção de caseína por microfiltração. Tese (mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, Campinas –SP, 75p., 2001.

FITZGERALD, R.J. Potencial uses of caseinophosphopeptides, **International Dairy Journal**. Barking, v.8, n.(5-6), p.451-457, 1998.

FOX, P.F. The milk protein system. In: “Developments in Dairy Chemistry – 4”. FOX, P.F.(ed.). London: Elsevier Applied Science Publishers, p.1-55, 1989.

- FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. Milk Proteins. In: Dairy Chemistry and Biochemistry. London: Blackie Academic & Professional, Cap.4, p.147-238, 1998.
- FRIEDMAN, M. Nutritional value of proteins from different food sources. A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Whashington, v.44, n.1, p.6-29, 1996.
- GIESE, J. Proteins as ingredients: types, functions, applications. **Food Technology**. Chicago, v.48, n.10, p.50-60, 1994.
- GOMES, F.P. Curso de estatística experimental. 10 ed., São Paulo: Nobel, 430p., 1982.
- HENLEY, E.C.; KUSTER, J.M. Protein quality evaluation by protein digestibility-corrected amino scoring. **Food Technology**. Chicago, v.48, n.4, p.74-77, 1994.
- JOST, R.; BRANDSMA, R.; RIZVI, S. Protein composition of micelar casein obtained by cross-flow micro-filtration of skimmed milk. **International Dairy Journal**. Barking, v.9, n.(3-6), p.389-390, 1999.
- KINSELLA, J.E. Milk proteins: physic-chemical and functional properties. **Review in Food Science and Nutrition**. Boca Raton, v.21, n.2, p.197-262, 1984.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. London, v.227, n.15, p.680-685, 1970.
- LOURENÇO, E.J. Tópicos de proteínas de alimentos. Jaboticabal:Funep, 344p., 2000.
- MAUBOIS, J.L.; PLLIVER, G. Milk protein fractionation, In: "International Dairy Federation", ed. New Applications of Membrane Processes. **International Dairy Federation Special Issue**. p.15-22, 1992.
- NANDI, P.K. Chemical and physical methods for the ceracterization of proteins. In: Fod proteins and their aplications. Srinivasan Damodaran and Alain Paraf (eds.). New York: Marcel Dekker, INC, Cap.5, p.235-280, 1997.

- PAQUIN, P. The key to added value: fractionation and the use of milk constituents, **Canadian Journal of Animal Science**. Ottawa, v.78 : Supplement 149-157, 1998.
- REEVES, P.G.P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.N. AIN-93. Purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the formulation of the AIN-76. rodent diet. **Journal of Nutrition**. Bethesda, v.123, p.467-472, 1993.
- SGARBIERI, V.C. Alimentação e Nutrição – Fator de saúde e desenvolvimento. São Paulo: Almed, 387 p., 1987.
- SGARBIERI, V.C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Varela, 517 p., 1996.
- SMITHERS, G. Value added milk protein products. **Australian Biotechnology**. v.1, n.1, p.36-39, 1991.
- SOUTHWARD, C.R. Utilization of milk components. In: **Modern dairy technology – advances in milk processing**. New York: Elsevier Applied Science, p.317-368, 1986.
- SOUTHWARD, C.R. Use of casein and caseinates. In: **Development in Dairy Chemistry**. Fox, P.F. (ed). New York: Elsevier Applied Science, p.173-224, 1989.
- SOUTHWARD, C.R. Utilization of milk components: Casein. In: **Modern Dairy Technology**. Vol 1. London: Chapman & Hall, Cap.8, p.375-432, 1994.
- SPACKMAN, D.C.; STEIN, W.H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Analytical Biochemistry**. New York v.30, n.9, p.1190-1206, 1958.
- SPIES, J.R. Determination of tryptofan in proteins. **Analytical Chemistry**. Arlington, v.39, n.12, p.1412-1415, 1967.

SRINIVASAN, M.; SINGH, H.; MURNO, P.A. Formation and stability of sodium caseinate emulsions: influence of retorting (121°C for 15 min) before or after emulsification. **Food Hydrocolloids**. Oxford, v.16, p.153-169, 2002.

SWAISGOOD, H.E. Chemistry of the casein. In: *Advanced Dairy Chemistry – 1: Proteins*. P.F. fox (ed) Elsevier Applied Science, p.63-110, 1992.

TORRES, J.A. Eddible films and Coating from proteins. In: "Protein Functionality in Food Systems", N.S. Hettiarachechy. Ziegler, G.R. (eds.). Marcel Dekker, p.467-507; 519,1994.

VELOSO, A.C.A.; TEIXEIRA, N.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O. Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and ureia-polyacrylamide gel electrophoresis - Detection of milk adulterations. **Journal of Chromatography A**. Amsterdam, v.967, p.209-218, 2002.

YADA, R.Y; JACKMAN, R.L.; SMITH, J.L.; MARANGONI, A.G. Analysis: Quantification and physical characterization. In: *Food properties: properties and characterization*. Shuryo Nakai & Wayne Modler (eds.). New York: Wilwy-VCH, Cap.7, p.333-404, 1996.

WRONG, D.W.S.; CAMIRANT, W.M.; PAVLATH, A.E. Structures and functionalities of milk proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. Orlando, v.36, n.8, p.807-844, 1996.

PROPRIEDADES FUNCIONAIS HIDROFÍLICAS DE
DIFERENTES CONCENTRADOS DE CASEÍNA

CAPÍTULO 3

PROPRIEDADES FUNCIONAIS HIDROFÍLICAS DE DIFERENTES CONCENTRADOS DE CASEÍNA

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades hidrofílicas da caseína obtida por coagulação enzimática do leite bovino (COC), caseína micelar obtida do leite fluido (CM), caseína micelar obtida do leite em pó reconstituído (CMR), comparativamente a uma caseína comercial (CC). A capacidade de absorção espontânea de água (CAA) e de óleo (CAO) foram determinadas em função do tempo, e a capacidade de retenção de água (CRA) foi avaliada em diferentes valores de pH (4,5; 5,5 e 6,5). Na solubilidade protéica (%SP) foram estudados os efeitos do pH (faixa de 3,5 a 7,5), da força iônica produzida por dois sais, cloreto de sódio (NaCl) e de cálcio (CaCl₂) em diferentes concentrações (0,00 – 0,20M). Para o COC estudou-se também o efeito da temperatura (25, 35 e 45°C) na solubilidade. A capacidade de absorção espontânea de água e de óleo foi significativamente superior para a caseína micelar reconstituída e a menor capacidade de absorção de água e óleo foi verificada para o coágulo de caseína. A maior capacidade de retenção de água foi conseguida com a caseína micelar em pH 5,5. A solubilidade em presença de NaCl foi mais elevada que em CaCl₂ na maioria dos pHs estudados, tanto para o COC como para a CMR. A maior solubilidade para o COC foi conseguida em pH 3,5 em solução aquosa. No entanto, para a CM o melhor resultado foi obtido em pH 5,5 em solução de NaCl 0,10M. Verificou-se para o COC um aumento de solubilidade em função da elevação da temperatura de 25 para 35°C em solução aquosa.

3.1. INTRODUÇÃO

As propriedades de hidratação dependem das interações da proteína com o solvente aquoso como a solubilidade, capacidade de absorção e retenção de água (Sgarbieri, 1998) e influenciam diversos aspectos relacionados com a formulação, processamento e textura dos alimentos (Pilosof, 2000).

As propriedades funcionais de interação proteína-água como solubilidade, ligação e retenção de água (g de água ligada/ g de proteína) são importantes na formulação de alimentos, sobretudo de produtos cárneos (embutidos, salsichas, almôndegas, salgados); produtos de panificação e confeitaria (tortas, massas, doces, pudins, cremes de cobertura e sobremesas), nos quais devem embeber e reter água sem dissolver e, simultaneamente, conferir corpo (espessamento) e viscosidade aos produtos protéicos (Lourenço, 2000).

Dentre todas as propriedades funcionais, a solubilidade reveste-se de particular importância na medida em que todas as outras propriedades estão diretamente relacionadas ao desempenho desta característica (Mulvihill & Fox, 1989). O balanço entre forças intermoleculares atrativas e repulsivas entre as proteínas (proteína-proteína), e entre proteína-solvente determina a solubilidade (Augustin, 2000).

Para efeito das propriedades funcionais, a solubilidade é difícil de ser definida, uma vez que a maioria dos componentes macromoleculares, quando em meio aquoso, pode formar uma solução verdadeira ou uma solução coloidal ou ainda, uma suspensão estável de partículas insolúveis. A solubilidade de uma proteína depende da proporção entre grupos hidrofóbicos e de grupos hidrofílicos situados na superfície (Sgarbieri, 1998).

Alguns fatores que afetam a solubilidade das proteínas são pH, distribuição de cargas, força iônica ou concentração de sais, temperatura, natureza do solvente e condições de processamento (Giese, 1994). Estes agentes afetam a solubilidade das proteínas principalmente por causa das alterações iônicas,

hidrofílicas e interações hidrofóbicas da superfície da proteína (Damodaram, 1996).

O pH afeta a densidade e a distribuição de cargas na molécula de proteína de tal forma que a um determinado pH (pH isoelétrico) a proteína apresentará um mínimo de solubilidade. Proteínas são menos solúveis no ponto isoelétrico, o qual normalmente está entre 4 e 6 (Rupnow, 1991).

Em força iônica ou concentração salina baixa, a solubilidade das proteínas tende a aumentar, fenômeno conhecido como 'salting in'; porém, à medida que se eleva a concentração salina além de certos limites, as proteínas tendem a se insolubilizar e a precipitar ('salting out') (Sgarbieri, 1996).

A temperatura aumenta a solubilidade das proteínas até o ponto em que começa a ocorrer a desnaturação protéica (Karleskind et al., 1996). Em temperaturas acima de 60 a 70°C, começam a ocorrer mudanças na conformação da estrutura de algumas dessas proteínas afetando propriedades funcionais como solubilidade, formação de espuma, emulsificação, viscosidade, capacidade de reter água e geleificação (Fachin & Veiga, 1998).

O objetivo deste capítulo foi avaliar as propriedades hidrofílicas: capacidade de absorção espontânea de água, capacidade de retenção de água e solubilidade protéica de quatro concentrados de caseína obtidos por diferentes processos.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Material

Foram utilizados coágulo de caseína, micelas de caseína (obtidas do leite em pó resconstituído e do leite bovino fluido) e caseína comercial. O coágulo de caseína e a caseína na forma de micelas foram obtidos segundo metodologias descritas no capítulo 2.

3.2.2. Métodos

Foram estudadas as propriedades funcionais hidrofílicas capacidade de absorção espontânea de água (CAA) e óleo (CAO); capacidade de retenção de água (CRA) e solubilidade (%SP) dos concentrados de caseína obtidos por diferentes processos.

3.2.2.1. Capacidade de absorção espontânea de água (CAA)

O método utilizado foi o empregado por Torgensen & Toledo (1977), o qual consiste em um aparelho com um funil conectado a uma pipeta graduada (figura 3.1). Uma massa conhecida de amostra (100 mg) foi espalhada sobre um papel de filtro Whatman nº1, úmido, colocado no topo de funil de Büchner, com água ao nível da placa perfurada. O ensaio foi conduzido à temperatura ambiente, sendo que as leituras de água absorvida foram feitas em intervalos de tempo, totalizando 30 minutos. O resultado foi expresso em mL de água absorvida por g de amostra.

$$CAA = \frac{\text{volume de água absorvida (mL)}}{\text{massa de amostra(g)}}$$

3.2.2.2. Capacidade de absorção espontânea de óleo (CAO)

Utilizou-se o método sugerido por De Kanterewicz et al. (1989), que consiste na utilização do mesmo equipamento usado para análise da absorção espontânea de água (figura 3.1), no qual substitui-se apenas o tipo de papel de filtro, que passa a ser o Whatman com microfibras de vidro GF/C, agora umidecido com óleo de soja comercial. O ensaio foi conduzido à temperatura ambiente, sendo que as leituras foram feitas em intervalos, totalizando um tempo de 30 minutos. O resultado foi expresso em mL de óleo absorvido por grama de amostra.

$$\text{CAO} = \frac{\text{volume de óleo absorvido (mL)}}{\text{massa de amostra (g)}}$$

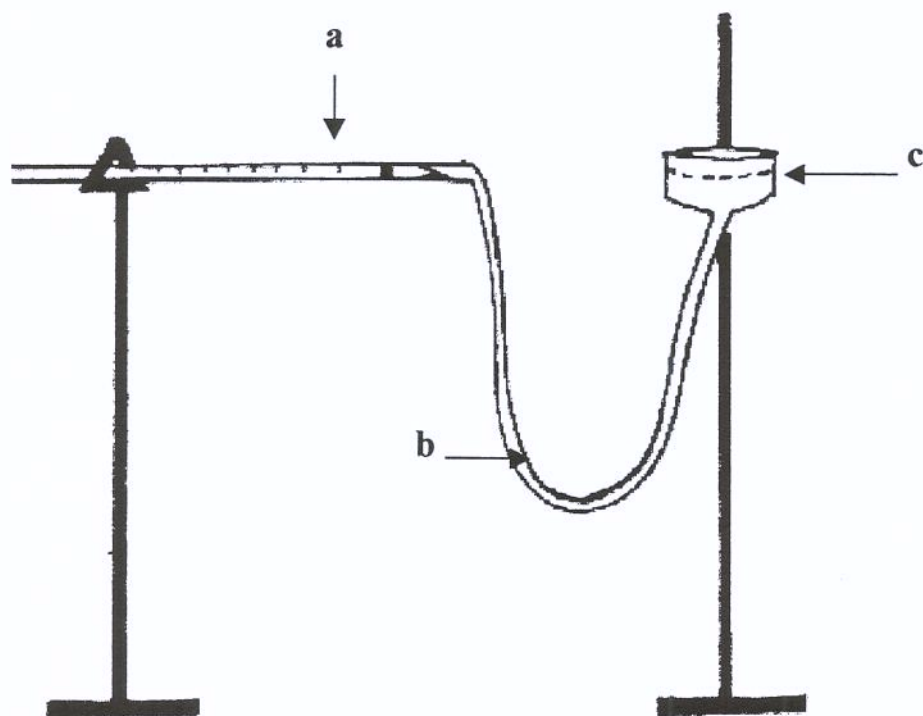


FIGURA 3.1 - Equipamento utilizado para medir a capacidade de absorção espontânea de água (CAA) e de óleo (CAO). a) pipeta graduada, b) mangueira de silicone, 30 cm de comprimento e c) funil de porcelana.

3.2.2.3. Capacidade de retenção de água (CRA)

Para essa determinação foi seguida a técnica de Regenstein et al. (1984). As dispersões tiveram os valores de pH ajustados para 4,5; 5,5 e 6,5 com NaOH ou HCl 0,1N, e o volume aferido, no final, para resultar em dispersões com 1% de proteína.

Após agitação por uma hora à temperatura ambiente, alíquotas de 30 mL foram centrifugadas a 30.000 g por 15 minutos à temperatura de 5°C. A seguir, o sobrenadante de cada amostra foi reservado, determinando-se o conteúdo de proteína nos sobrenadantes. A capacidade de retenção de água foi dada pela equação:

$$CRA = \frac{\text{peso amostra hidratada (g)} - \text{peso amostra original (g)}}{\text{concentração de proteína na amostra (g)}}$$

3.2.2.4. Solubilidade (%SP)

A solubilidade protéica (%SP) foi determinada de acordo com o método de Morr et al. (1985), que consiste em uma modificação do método de determinação do índice de nitrogênio solúvel. Foram estudados os efeitos do pH (faixa de 3,5 a 7,5), da força iônica produzida por dois sais diferentes, cloreto de sódio (NaCl) e de cálcio (CaCl₂) a diferentes concentrações (0,00 - 0,20M) e o efeito da temperatura (25, 35 e 45°C).

Suspendeu-se 0,5g de amostra, ajustou-se o pH com NaOH ou HCl 0,1N. As suspensões foram agitadas por uma hora em banho-maria com temperatura controlada, e após centrifugação das suspensões, foi determinada a proteína solúvel no sobrenadante pelo método de Kjeldahl (semi-micro), onde a % proteína = % nitrogênio x 6,38 (AOAC, 1990). A porcentagem de proteína solúvel foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ SP} = \frac{\text{concentração de proteína no sobrenadante (mg/mL)} \times 50}{\text{peso da amostra (mg)} \times \frac{\text{conteúdo de proteína da amostra (\%)}}{100}}$$

3.2.2.5. Análise Estatística

Todos os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) e as possíveis diferenças entre médias ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey (Gomes, 1982), utilizando-se o programa "Statística: Basic Statistics and Tables".

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Capacidade de absorção espontânea de água e óleo

A capacidade de absorção de água é uma importante propriedade dos alimentos uma vez que a água absorvida contribui para dar corpo e aumentar a viscosidade. Neste ensaio não se estudou os efeitos do pH na absorção de água, já que o objetivo foi avaliar o efeito do processamento sobre esta propriedade funcional.

Na figura 3.2 observa-se um aumento lento e gradual da absorção de água para CC, COC e CM, que foi inicialmente mais rápida. Vale a pena ressaltar a absorção de água muito rápida que ocorreu com a CMR, provavelmente refletindo a integridade da micela e a presença de grande número de grupos hidrofílicos na superfície da micela, podendo estes grupos estar mais expostos que os da caseína micelar obtida do leite fluido.

A CMR foi submetida a processos mais enérgicos (inclusive secagem para produzir o leite em pó) o que pode ter tido influência no sentido de maior exposição de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos. Da mesma forma a solubilização de partículas produzidas pela atomização no spray dryer também poderá ter influenciado favoravelmente a absorção espontânea de água.

Na figura 3.3 pode ser observada uma redução considerável na absorção de óleo da caseína comercial, do coágulo de caseína e da caseína micelar obtida do leite bovino fluido, ao se comparar com a caseína micelar reconstituída. Talvez seja mais correto atribuir a diferença à estrutura micelar comparada com as caseínas comercial e coágulo de caseína parcialmente desnaturadas.

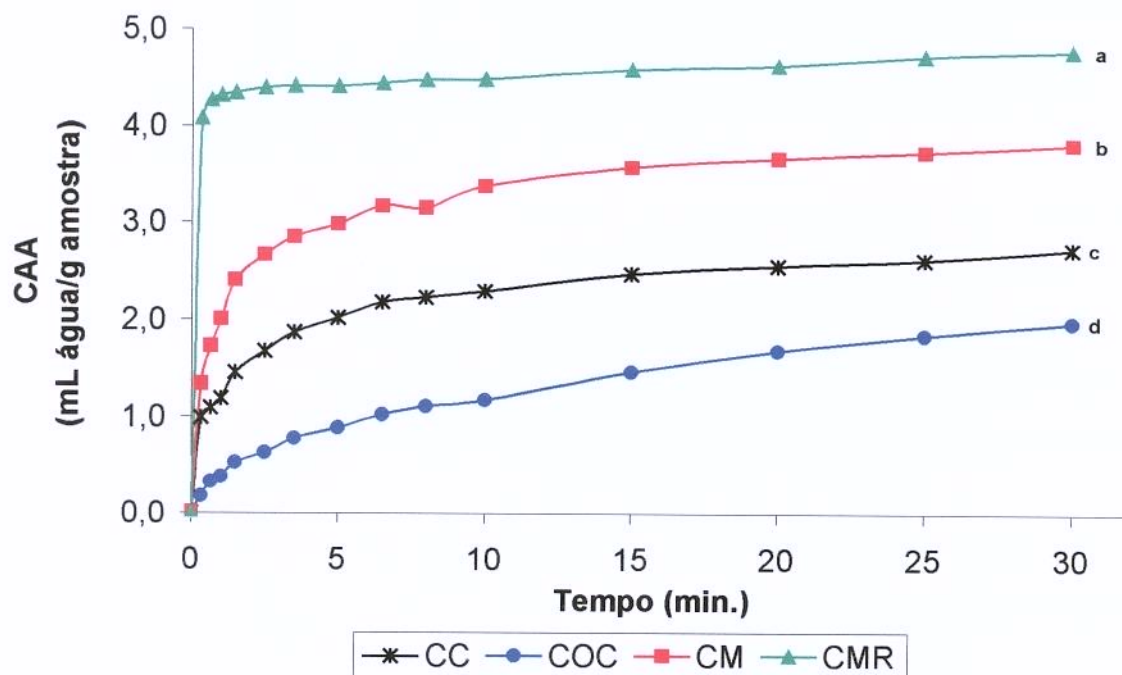


FIGURA 3.2 - Representação gráfica da capacidade de absorção espontânea de água (CAA) em função do tempo para as amostras de caseína comercial (CC), coágulo de caseína (COC), caseína micelar (CM) e caseína micelar do leite em pó reconstituído (CMR).

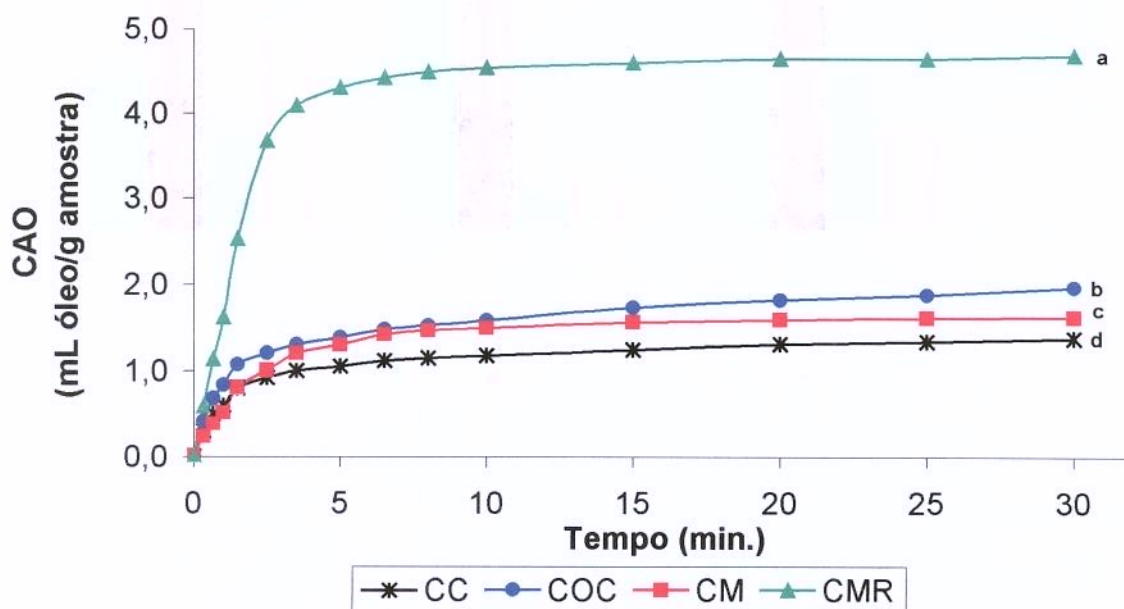


FIGURA 3.3 - Representação gráfica da capacidade de absorção espontânea de óleo para as amostras: caseína comercial (CC), coágulo de caseína (COC), caseína micelar (CM), caseína micelar do leite em pó reconstituído (CMR).

3.3.2. Capacidade de retenção de água (CRA)

Segundo Sdzislaw & Sirorsk (1997), a capacidade da proteína de reter água é afetada principalmente pela estrutura das proteínas. Verifica-se que a capacidade de retenção de água se inverte com a capacidade de absorção de água para as amostras de caseína micelar. Segundo Kinsella et al. (1989), a capacidade de absorção de água depende de propriedades físico-químicas (composição de aminoácidos e pH) e a retenção de água é mais afetada pela estrutura da proteína.

Na figura 3.4 observam-se os resultados obtidos para a CRA os concentrados de caseína em diferentes pHs.

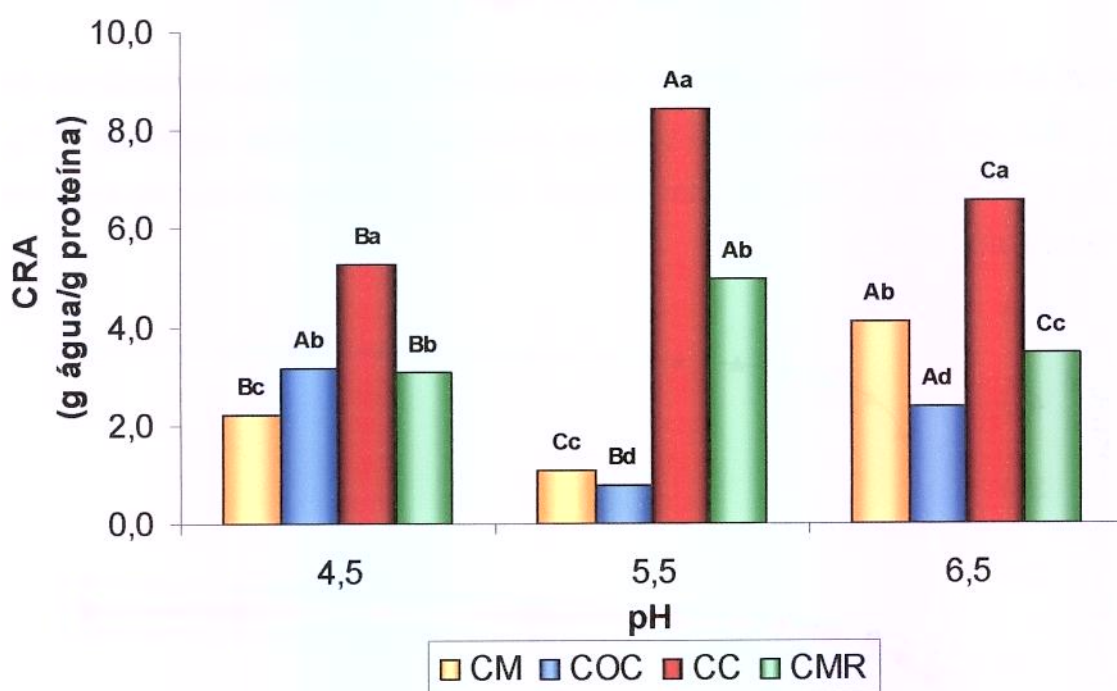


FIGURA 3.4 - Representação gráfica da capacidade de retenção de água (CRA) em função do pH para a caseína comercial (CC), coágulo de caseína (COC), caseína micelar (CM) e caseína micelar do leite em pó reconstituído (CMR). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas a 5% de probabilidade. Letras minúsculas se referem aos diferentes hidrolisados no mesmo pH e as letras maiúsculas indicam o mesmo concentrado em diferentes pHs.

Observa-se um significativo aumento na retenção de água, quando se passa do pH 4,5 para 5,5 para a CM e a CMR e uma diminuição para o coágulo de caseína e para a caseína comercial, nesta mesma variação de pH.

Observa-se na figura 3.4 que quando o material em estudo foi analisado no mesmo pH, houve diferença significativa na CRA em todas as amostras analisadas. Observa-se também um aumento significativo na retenção de água, quando se passa do pH 4,5 para 5,5 para a CM e a CMR e uma diminuição para o coágulo de caseína e para a caseína comercial, nesta mesma variação de pH.

Para o coágulo de caseína, a capacidade de retenção de água no pH 6,5, não difere estatisticamente da obtida em pH 4,5. Para a caseína comercial, a CRA apresentou diferença significativa nos pHs 4,5 e 5,5, sendo estas bem inferiores à do pH 6,5. A CMR em pH 6,5 apresentou CRA estatisticamente inferior à da CC e CM, porém superior ao COC.

Observa-se uma semelhança nos dados de capacidade de retenção de água entre as caseínas micelares, sendo que a obtida do leite fluído possui uma CRA superior à da caseína micelar obtida do leite em pó reconstituído.

Segundo Spreer (1998), as micelas de caseína são sensíveis às mudanças de carga. A mudança da estrutura pode ser observada em pH <5,0, quando um gel é formado e a mínima estabilidade é atingida no ponto isoelétrico e, segundo Lourenço (2000), a alcalinização também leva à desintegração micelar, mas por outros meios, o íon OH^- aumenta a repulsão eletrostática entre os segmentos carregados das diferentes caseínas.

3.3.3. Solubilidade (SP%)

A influência do pH (3,5 a 7,5) na solubilidade da caseína comercial (CC), do coágulo de caseína desidratado (COC), da caseína micelar obtida do leite fluído

(CM) e da caseína micelar obtida do leite em pó reconstituído (CMR), em solução aquosa a 25°C, é mostrada na tabela 3.1.

A menor solubilidade dos concentrados de caseína estudados foi obtida em pH 4,5. Segundo Sdzislaw & Sikorsk (1997), no ponto isoelétrico (normalmente está entre 4 e 6) não à repulsão eletrostática entre as moléculas, as interações da proteína-proteína são favorecidas e geralmente a solubilidade é mínima tendendo a formar precipitados (Mangino, 1990).

TABELA 3.1- Valores obtidos para a solubilidade em ausência de sais a 25°C com variação do pH, sendo CC (caseína comercial), COC (coágulo de caseína), CM (caseína micelar) e CMR (caseína micelar do leite em pó reconstituído).

pH	CC	COC	CM	CMR
3,5	10,05±0,71 ^{Cd}	45,05±1,11 ^{Ac}	54,39±0,94 ^{Bb}	75,65±3,95 ^{Aa}
4,5	1,70±0,27 ^{Dbc}	1,17±0,04 ^{Dc}	13,44±0,17 ^{Da}	2,62±0,65 ^{Cb}
5,5	2,48±0,18 ^{Dd}	4,63±0,70 ^{Bc}	23,20±0,20 ^{Ca}	17,14±0,11 ^{Bb}
6,5	26,16±0,08 ^{Ab}	2,98±0,29 ^{Cd}	53,55±0,33 ^{Ba}	17,57±0,15 ^{Bc}
7,5	15,52±0,08 ^{Bc}	4,89±0,14 ^{Bd}	65,02±0,44 ^{Aa}	18,49±0,49 ^{Bb}

Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula (coluna) e minúscula (linha), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A desnaturação da proteína durante o processamento altera significativamente o balanço hidrofóbico/hidrofílico da sua superfície, afetando desta forma a solubilidade (Damodaram, 1996). A desnaturação da proteína é comumente avaliada pela menor solubilidade e por agregações que resultam em mudanças na conformação (Morr & Foegeding, 1990).

No pH 5,5 a caseína micelar obtida por diferentes processos apresentou solubilidades próximas, porém estatisticamente diferentes e superiores à da CC e COC. Nos pHs 6,5 e 7,5 a CM apresentou solubilidade significativamente superior aos demais concentrados. Nesses pHs o COC foi menos solúvel sendo que o CMR e a CC apresentaram solubilidade intermediária entre o COC e a CM.

Na tabela 3.2 pode-se observar com detalhes os resultados numéricos e a análise estatística relativa à solubilidade do COC a 25°C em diferentes pHs e concentrações salinas. Em ausência de sal e em solução 0,2M de NaCl a solubilidade do COC foi muito baixa e independente das variações do pH, exceto em pH 3,5 em que determinou-se uma solubilidade da ordem de 45%.

TABELA 3.2 - Valores obtidos para a solubilidade do coágulo de caseína em água a 25°C com variação do pH e da concentração de sal (NaCl e CaCl₂).

pH	NaCl 0,00M	NaCl 0,05M	NaCl 0,10M	NaCl 0,15M	NaCl 0,20M
3,5	45,05±1,11 ^{Aa}	14,8 ±0,77 ^{Bb}	4,12±0,05 ^{Dc}	5,69±0,67 ^{Dc}	1,38±0,03 ^{Dd}
4,5	1,17±0,04 ^{Dd}	4,46±0,49 ^{Da}	2,12±0,20 ^{Ec}	3,59±0,10 ^{Eb}	1,27±0,15 ^{Dd}
5,5	4,63±0,70 ^{Bd}	9,60±0,08 ^{Cc}	16,15±0,09 ^{Bb}	32,95±0,19 ^{Aa}	9,61±,08 ^{Ac}
6,5	2,98±0,29 ^{Cd}	22,13±1,08 ^{Aa}	16,91±0,41 ^{Ab}	17,01±0,08 ^{Bb}	5,65±0,13 ^{Bc}
7,5	4,89±0,14 ^{Bc}	5,78±0,66 ^{Dc}	7,14±0,40 ^{Cb}	9,69±0,39 ^{Ca}	2,52±,20 ^{Cd}
pH	CaCl ₂ 0,00M	CaCl ₂ 0,05M	CaCl ₂ 0,10M	CaCl ₂ 0,15M	CaCl ₂ 0,20M
3,5	45,05±1,11 ^{Aa}	10,71±0,10 ^{Ab}	6,09±0,10 ^{Cc}	6,29±0,63 ^{Bc}	1,71±0,07 ^{Bd}
4,5	1,17±0,04 ^{De}	7,43±0,03 ^{Cc}	11,00±0,17 ^{Aa}	10,16±0,32 ^{Ab}	4,97±0,58 ^{Ad}
5,5	4,63±0,70 ^{Bc}	8,79±0,18 ^{Bb}	10,01±0,22 ^{Ba}	9,67±0,52 ^{Aab}	2,28± 0,16 ^{Bd}
6,5	2,98±0,29 ^{Cc}	4,84±0,26 ^{Db}	5,98±0,17 ^{CDa}	5,33±0,28 ^{BCb}	1,76±0,07 ^{Bd}
7,5	4,89±0,14 ^{Ba}	3,88±0,05 ^{Eb}	5,06±0,74 ^{Da}	4,75±0,14 ^{Cab}	1,96±0,06 ^{Bc}

Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula (coluna) e minúscula (linha), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A solubilidade em pH 4,5 (pl) foi a mais baixa para todas as amostras. Na presença de sal a solubilidade mais elevada foi em pH 5,5 em solução de 0,15M de NaCl. A solubilidade em pH 6,5 foi semelhante em solução 0,05; 0,10 e 0,15M de NaCl, superior à solubilidade em água e em solução 0,20M de NaCl. Em pH 7,5 a solubilidade foi inferior a 10% e semelhante nas várias concentrações salinas estudadas.

Nas figuras 3.5 e 3.6 são apresentadas a solubilidade do COC em função do pH (pHs 3,5 a 7,5) e da concentração dos sais NaCl e CaCl₂, (0,00M a 0,20M), respectivamente.

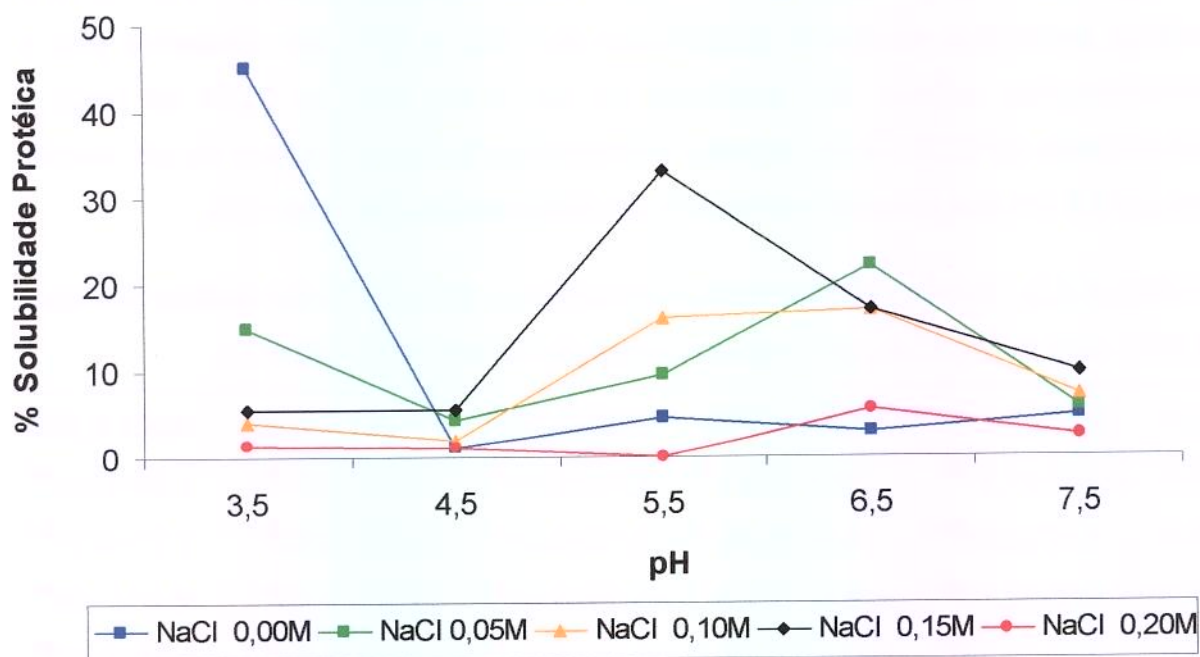


FIGURA 3.5 - Representação do perfil de solubilidade do coágulo de caseína (COC) à 25°C, em diferentes pHs e concentrações de solução de cloreto de sódio.

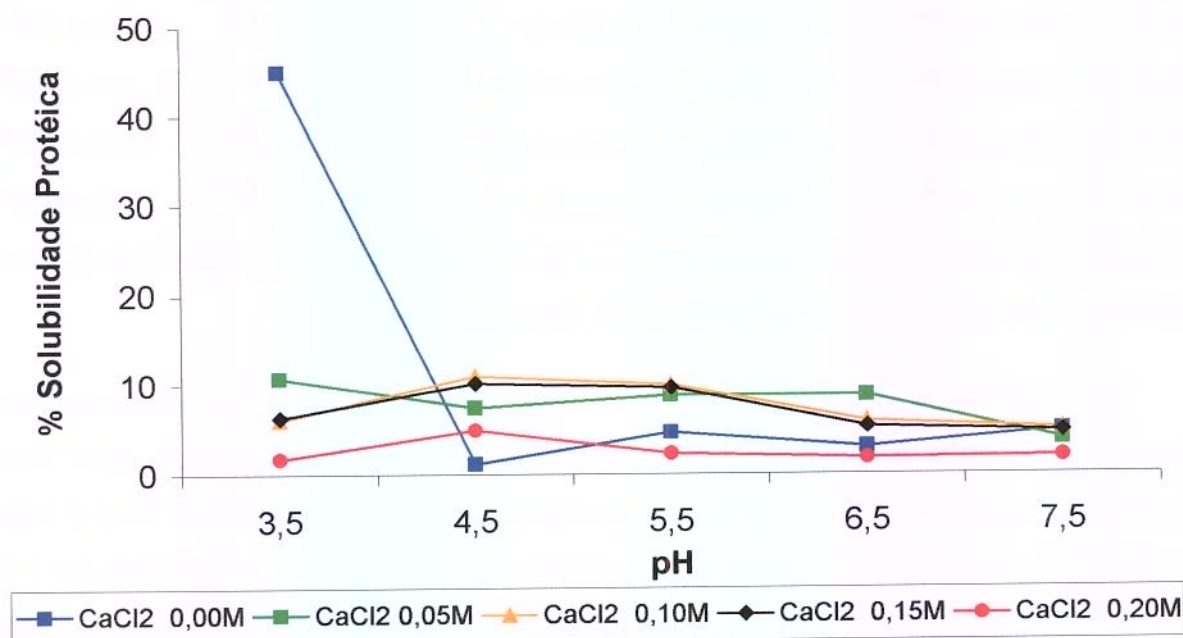


FIGURA 3.6 - Representação do perfil de solubilidade do coágulo de caseína (COC) à 25°C, em diferentes pHs e concentrações de solução de cloreto de cálcio.

Em forças iônicas ou concentrações salinas baixas, a solubilidade das proteínas tende a aumentar, fenômeno conhecido como 'salting in' (Sgarbieri, 1998), como mostrado na figura 3.5. Porém, à medida que se eleva a concentração de NaCl (0,20M) as proteínas tendem a flocular, mesmo estando carregadas eletricamente (salting-out). Além disso, íons salinos competem com as cargas das proteínas pela água, diminuindo a capa de hidratação e permitindo a atração proteína-proteína (Silva et al., 2000).

Quanto ao efeito do CaCl_2 na solubilidade do COC (25°C) (figura 3.6), observa-se que a solubilidade foi razoável (~45%) apenas na ausência do sal. Todas as concentrações de CaCl_2 testadas prejudicaram a solubilidade do COC, resultando em solubilidade inferior a 12% nos vários pHs e concentrações de CaCl_2 .

Estudos citados por Famelart et al. (1999), têm investigado a força iônica através da adição do cloreto de sódio e cálcio e suas alterações nas características físico-químicas do leite, mostrando que a adição de cloreto de cálcio causa pequenas alterações na hidratação e solubilização da caseína.

Na tabela 3.3 pode-se observar com detalhes os resultados numéricos e a análise estatística relativa à solubilidade do CMR a 25°C em diferentes pHs e concentrações salinas.

O pH tem efeito nas propriedades de agregação da caseína micelar, bem como, na estrutura interna da micela (Schkoda et al., 1999). O aumento da densidade de cargas da proteína em pHs afastados da região do ponto isoelétrico, (mais ácidos ou mais alcalinos), favorece a interação proteína-água, resultando num aumento das propriedades de hidratação (Elizalde et al., 1996).

Segundo Lourenço (2000), alguns sais neutros, entre eles o NaCl, alteram as características de solubilidade das proteínas em água, promovem o efeito salting in, isto é, o aumento da solubilidade, mesmo em concentrações molares elevadas, e isto pode ser verificado na figura 3.7.

TABELA 3.3 -Valores obtidos para a solubilidade da caseína micelar obtida do leite em pó reconstituído (CMR) com variação do pH e da concentração de sal.

pH	NaCl 0,00M	NaCl 0,05M	NaCl 0,10M	NaCl 0,15M	NaCl 0,20M
3,5	75,65±3,95 ^{Aa}	24,87±2,16 ^{Cb}	5,67±0,16 ^{Dc}	4,80±0,72 ^{Dc}	2,97±0,45 ^{Ecd}
4,5	2,62±0,65 ^{Cc}	7,49 ±0,26 ^{Ea}	5,15±0,21 ^{Db}	4,88±0,57 ^{Db}	7,87±0,43 ^{Da}
5,5	17,14±0,11 ^{Bd}	76,19±0,05 ^{Ac}	95,62±0,40 ^{Aa}	87,14±1,09 ^{Ab}	87,28±0,37 ^{Ab}
6,5	17,57±0,15 ^{Bc}	68,41±1,62 ^{Ba}	66,97±0,40 ^{Ba}	48,06±1,13 ^{Bb}	50,43±0,72 ^{Bb}
7,5	18,49±0,49 ^{Bc}	11,37±0,13 ^{Dd}	27,71±1,52 ^{Ca}	17,49±0,31 ^{Cc}	21,23±0,87 ^{Cb}
pH	CaCl ₂ 0,00M	CaCl ₂ 0,05M	CaCl ₂ 0,10M	CaCl ₂ 0,15M	CaCl ₂ 0,20M
3,5	75,65±3,95 ^{Aa}	9,22 ±0,08 ^{Bbc}	6,99±0,24 ^{Bc}	12,35±0,36 ^{Cb}	7,85±0,11 ^{Cbc}
4,5	2,26±0,65 ^{Cd}	5,91±0,18 ^{Dc}	7,69±0,37 ^{ABc}	34,33±1,54 ^{Aa}	19,84±0,09 ^{Ab}
5,5	17,14±0,11 ^{Ba}	16,10±1,38 ^{Aa}	8,02±0,13 ^{Ac}	15,67±0,01 ^{Ba}	12,75±0,57 ^{Bb}
6,5	17,57±0,15 ^{Ba}	8,07±0,49 ^{BCd}	5,79±0,42 ^{Ce}	14,32±1,29 ^{BCb}	12,41±0,21 ^{Bc}
7,5	18,49±0,49 ^{Ba}	6,18±0,61 ^{CDc}	,42±0,09 ^{Ab}	9,05±0,89 ^{Db}	7,71±0,21 ^{Cb}

Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula (coluna) e minúscula (linha), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nas figuras 3.7 e 3.8 são apresentadas a influência do pH (3,5 a 7,5) e da concentração dos sais NaCl e CaCl₂ (0,00M a 0,20M) na solubilidade da CMR. Em pH 3,5 a maior solubilidade foi em ausência de sal, seguida pela solubilidade em 0,05M e as demais concentrações de NaCl com solubilidade inferior a 6%. No entanto, a solubilidade em pH 4,5 foi a mais baixa para todos os concentrados.

A solubilidade da caseína micelar foi mais elevada em pH 5,5, em todas as concentrações de cloreto de sódio estudadas, sendo a maior solubilidade conseguida em 0,10M (~95%), seguida das concentrações de 0,15 e 0,20M que não diferiram estatisticamente entre si. A solubilidade em NaCl 0,05M foi inferior às outras concentrações salinas, porém bem superior a solubilidade em ausência de sal neste mesmo pH.

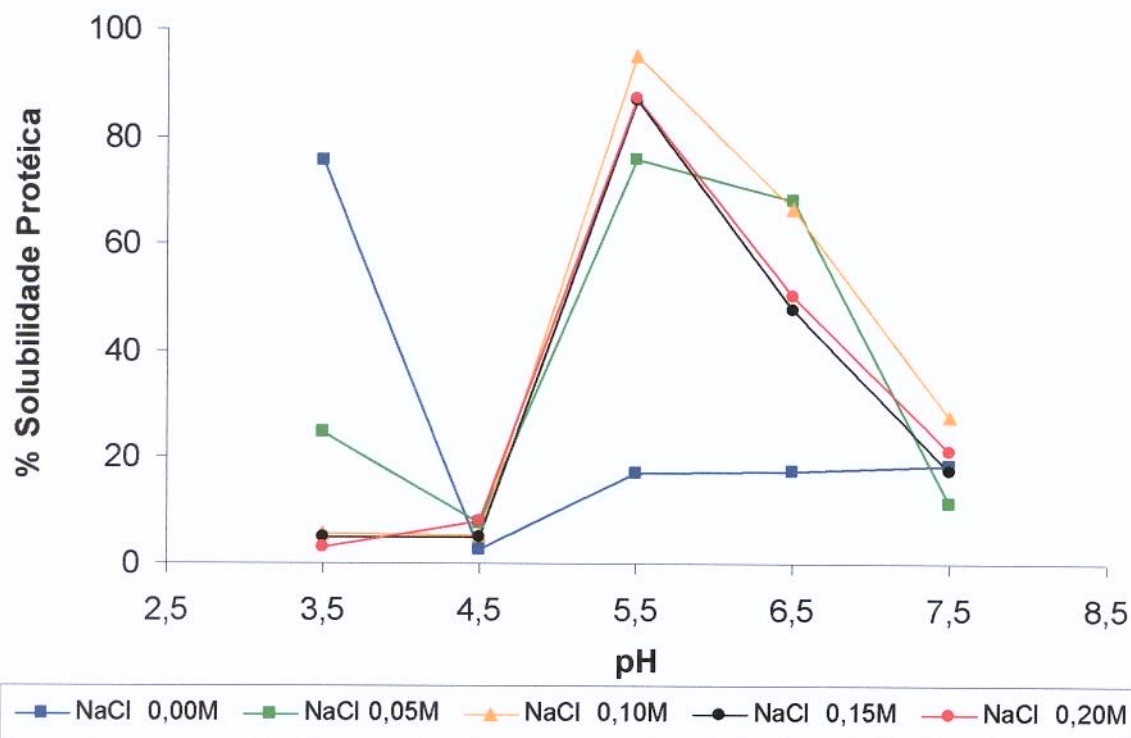


FIGURA 3.7- Representação do perfil de solubilidade da CMR á 25°C, em diferentes pHs e diferentes concentrações de solução de cloreto de sódio.

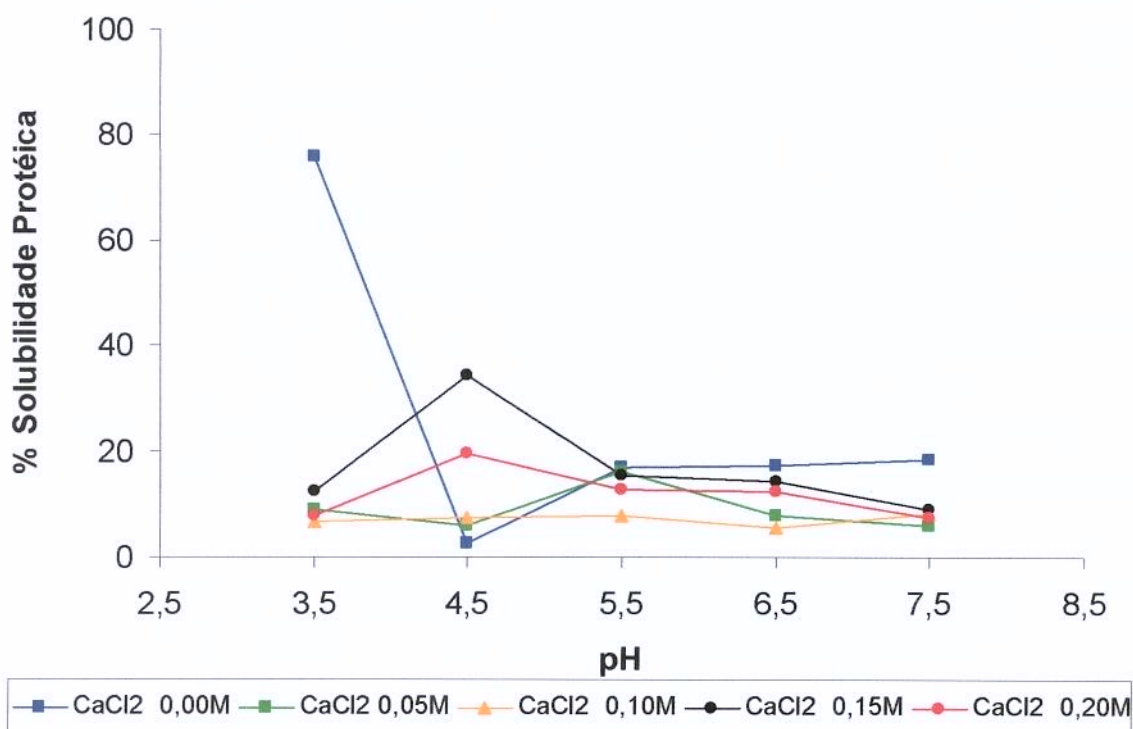


FIGURA 3.8 - Representação do perfil de solubilidade da CMR a 25°C, em diferentes pHs e diferentes concentrações de solução de cloreto de cálcio.

A solubilidade da CMR mostrada na figura 3.7, em presença de sal em pH 6,5 foi inferior à solubilidade em pH 5,5, porém, superior ao pH 7,5 em todas as concentrações salinas estudadas. A CMR apresentou solubilidade intermediária nas concentrações de 0,15 e 0,20M de NaCl, nos pHs 5,5 >6,5 >7,5. Em ausência de sal nestes mesmos pHs, a solubilidade não diferiu estatisticamente. Em pH 7,5 a solubilidade para a CMR nas concentrações de NaCl estudadas foram semelhantes, sendo a solubilidade mais elevada em 0,10M de NaCl (~27%).

A figura 3.8 ilustra o perfil de solubilidade da CMR (25°C) em diferentes pHs e concentrações de CaCl₂. A maior solubilidade foi em ausência de sal (~75%) em pH 3,5, seguida pela solubilidade de 35% em 0,15M de CaCl₂. Todas as demais concentrações de CaCl₂ testadas prejudicaram a solubilidade do CMR, resultando em solubilidade inferior a 20% nos vários pHs e concentrações do CaCl₂.

Outro fator importante, que influencia a solubilidade de proteína é a temperatura. A maioria das proteínas é solúvel à temperatura ambiente e a solubilidade tende a aumentar à medida que a temperatura se eleva até 40-50°C (Sgarbieri, 1998). A temperatura aumenta a solubilidade das proteínas até o ponto em que começa a ocorrer a desnaturação protéica (Karleskind et al., 1996).

Na tabela 3.4 aparecem os valores de solubilidade para o coágulo de caseína à 25°C, determinados em função da concentração salina e do pH em três temperaturas diferentes (25, 35 e 45°C).

Verifica-se na tabela 3.4 que a temperatura diminui significativamente a solubilidade do coágulo de caseína tanto na presença de NaCl como de CaCl₂, pois a maior solubilidade foi encontrada em ausência de concentração salina (76,69%), não diferindo estatisticamente nas temperaturas de 35 e 45°C.

TABELA 3.4 - Valores obtidos para a solubilidade do coágulo de caseína a 25, 35 e 45°C nas diferentes concentrações de cloreto de sódio ou de cálcio.

pH	Concentração	25°C	35°C	45°C
	de sais (M)			
3,5	0,00M	45,05±1,11 ^{Ab}	76,46±1,08 ^{Aa}	76,69±5,82 ^{Aa}
6,5	NaCl 0,05M	22,13±1,08 ^{Ca}	9,99±1,55 ^{Cb}	8,87±0,43 ^{Bb}
6,5	NaCl 0,10M	16,91±0,41 ^{Da}	16,42±2,15 ^{Ba}	9,41±0,73 ^{Bb}
6,5	NaCl 0,10M	32,95±0,19 ^{Ba}	19,65±1,44 ^{Bb}	7,16±0,54 ^{Bc}
3,5	CaCl ₂ 0,05M	10,71±0,10 ^{Ea}	8,62±0,29 ^{Cb}	7,18±0,65 ^{Bc}
3,5	CaCl ₂ 0,10M	6,09 ± 0,10 ^{Fa}	6,81±0,80 ^{Ca}	6,85±0,32 ^{Ba}
4,5	CaCl ₂ 0,15M	10,16 ± 0,32 ^{Ea}	7,59±0,34 ^{Cc}	8,87±0,19 ^{Bb}

Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula (coluna) e minúscula (linha), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.4. CONCLUSÕES

A capacidade de absorção espontânea de água/óleo foram significativamente superiores para a caseína micelar reconstituída e a menor capacidade de absorção de água e óleo foi verificada para o coágulo de caseína.

A capacidade de retenção de água da CC, COC e CMR em pH 4,5 foram semelhantes, mas diferiram estatisticamente nos três materiais estudados. Em pH 6,5 a maior retenção de água foi verificada à caseína comercial e a menor para a caseína micelar reconstituída. A maior capacidade de retenção de água foi conseguida com a caseína micelar em pH 5,5.

Quanto à solubilidade em água as amostras diferiram entre si em todos os pHs testados, exceto em pH 4,5. A solubilidade em presença de NaCl foi mais elevada que em CaCl_2 na maioria dos pHs estudados, tanto para o COC como para a CMR. A maior solubilidade para o COC foi conseguida em pH 3,5 em ausência de sais; no entanto, para a CM o melhor resultado foi obtido em pH 5,5 em solução de NaCl 0,10M.

Verificou-se que a elevação da temperatura de 25 para 45°C, diminuiu significativamente a solubilidade do coágulo de caseína em presença tanto de NaCl como de CaCl_2 . Verificou-se aumento de solubilidade em função da elevação da temperatura de 25 para 35°C em ausência de sal, permanecendo o valor mais elevado também a 45°C.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O.A.C. Association of official Analytical Chemists – Official Methods of Analysis, W. Horwitz (ed.), 15th edition, Washington, D.C., p.1141, 1990.

AUGUSTIN, M.A. Mineral salts and their effect on milk functionality. **The Australian Journal of Dairy Technology**. Highett, v.55, p.61-64, 2000.

DAMODARAM, S. Functional Properties. In: "Food Proteins – properties and characterization. Edited by Shryo Nakai e H.Wayne Modler. New York: Wiley-VCH, p.167-234, 1996.

DE KANTEREWICZ, A.M.R.; PILOSOFY, A.M.R.; BHARTOLOMANI, G.B. A simple method for determining the spontaneous oil absorption capacity of proteins and the kinetics of oil uptake. **Journal of the American Oil Chemistry's Society**. Champaign, v.66, n.6, p.809-812, 1989.

ELIZALDE, B.E.; BARTHOLOMAI, G.B; PILOSOFF, A.M.R. The effect of pH on the relationship between hydrophilic/lipophilic characteristics and emulsification properties of soy proteins. **Food Science and Technology**. Chicago, v.29, p.334-339, 1996.

FACHIN, L.; VEIGA, P. G. Otimização da geleificação das proteínas totais do leite. **Revista Leite e Derivados**. v.39, p.18-22, 1998.

FAMELART, M.H.; GRAET, Y.L.; RAULOT, K. Casein micelle dispersions into water, NaCl and CaCl₂: physicochemical characteristics of micelle and rennet coagulation. **International Dairy Journal**. Barking, v.9, p.293-297, 1999.

GIESE, J. Proteins as ingredients: types, functions, applications. **Food Technology**. Chicago, v.48, n.10, p.50-60, 1994.

GOMES, F.P. Curso de estatística experimental. 10 ed., São Paulo: Nobel, 430p., 1982.

KARLESKIND, D. LAYE, I., MORR, C.V.; SCHINZ. Emulsifying properties of lipid-reduced and calcium-reduced whey protein concentrates. **Journal of Food Science**. Chicago, v.61, n.1, p.54-58, 1996.

KINSELLA, J.E.; WHITEHEAD, D.M.; BRADY, J.; BRINGE, N.A. Milk proteins: possible relationship of structure and function. In: "Developements in Dairy Chemistry - 4". Functional Milk proteins. (ed. P.F. Fox), London: Elsevier Applied Science, p.55-95, 1989.

LOURENÇO, E. Tópicos de proteínas de alimentos. Jaboticabal : Funep, 344p., 2000

MANGINO, M.E. Functionality of whey protein concentrates. In: "Proceedings of dairy production technology conference". **American Dairy Production Institute**, Chicago, p.73, 1990.

MORR, C. V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J.E.; REGENSTEIN, J.P.; BUREN, V.; KILARA, A.; LEWIS, B.A.; MANGINO, M.E. Collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**. Chicago, v.50, n.6, p.1715-1718, 1985.

MORR, C. V.; FOEGEDING, E.A. Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates: a status report. **Food Technology**. Chicago, v.44, n.4, p.100-112, 1990.

MULVIHILL, M.D.; FOX, P.F. Physico-chemical and functional properties of milk proteins. In: "Developments in Dairy Chemistry – 4". FOX, P.F. ed. Elsevier Applied Science Publishers, p.131-172, 1989.

PILOSOFF, A.M.R. Propriedades de Hidratación.. In: "Caracterización funcional y estructural de proteínas". Ed. Pilosoff, A.M.R & Bartholomai G. B. Buenos Aires: Aeudeba, 2000. Cap.1, p.17-28, 2000.

REGENSTEIN, J.M.; JAUREGUI, C.A., BAKER, R. The effect of pH, phyphosphates and different salts on water retention properties of ground trout muscles. **Journal of Food Biochemistry**. Trumbull, v.8, n.2, p.123-131, 1984.

RUPNOW, J.H. Proteins: Biochemistry and applications. In "Encyclopedia of Food Science and Technology," ed. Y.H. Hui, v.3, p.2182-2191, 1991.

SCHKODA, P.; HECHLER, A.; KESSLER, H.G. Effect of minerals and pH on rheological properties and syneresis of milk-based acid gels. **International Dairy Journal**. Barking, v. 9, p.269-273, 1999.

SDZISLAW W.; SIRORSK. Chemical and Functional properties of food components. Edited by Sdzislaw & Sikorski, Technomic publishing Co., INC, Lancaster-Basel, 1997.

SGARBIERI, V.C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações, São Paulo: Varela, 517 p., 1996.

SGARBIERI, V. C. Propriedades Funcionais de proteínas em Alimentos. **Boletim Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.32, n.1, p.105-126, 1998.

SILVA, J.G.; ORNELLAS, C.B.D.; CARVALHO, M.G.; JUNQUEIRA, R.G.; OLIVERIRA, A.L.; SILVESTRE, M.P.C. Caracterização química e funcional do caseinato de sódio e da globina bovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.20, n.2, p.212-219, 2000.

SPREER, E. Milk as a raw material and food. In: "Milk and dairy product technology". Traslated by Axel Mixa. New York – Edited by Marcel Dekker, Inc., 1998.

TORGENSEN, H.; TOLEDO, R.T. Physical properties of protein preparation related to their functional characteristics in comminuted meat systems. **Journal of Food Science**. Chicago, v. 42, n.6, p.1615-1620 ; 1645, 1977.

**PROPRIEDADES FUNCIONAIS ESPUMANTES E
EMULSIFICANTES DE DIFERENTES
CONCENTRADOS DE CASEÍNA**

CAPÍTULO 4

PROPRIEDADES FUNCIONAIS ESPUMANTES E EMULSIFICANTES DE DIFERENTES CONCENTRADOS DE CASEÍNAS

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades funcionais de superfície de três caseínas obtidas por diferentes processos. As propriedades espumantes do coágulo de caseína obtido por coagulação enzimática (COC), caseína comercial (CC) e caseína micelar (CM) foram estudadas através da expansão de volume e estabilidade de espuma após o período de 30 e 60 minutos, em função dos diferentes pHs (4,0 a 8,0) e das diferentes concentrações de cloreto de sódio (0,00M a 0,15M). As propriedades emulsificantes dos materiais foram estudadas através da determinação da capacidade emulsificante (CE) e da estabilidade da emulsão (EE) em função dos pHs 4,0 e 7,0. Pode-se concluir que as proteínas diferem bastante em relação às suas propriedades de superfície, devido às diferenças das propriedades moleculares: composição e a seqüência de aminoácidos, flexibilidade conformacional e relação hidrofobicidade/hidrofiliicidade, às quais estão associadas às estruturas das proteínas. O coágulo de caseína não apresentou propriedades espumantes nas condições estudadas. A caseína micelar apresentou a melhor capacidade de expansão de espuma em pH 4,0 e a caseína comercial em pH 6,0. Quanto à estabilidade da espuma, a caseína micelar mostrou-se bastante estável nas diferentes concentrações salinas após 60 minutos; no entanto a presença de sal diminuiu a estabilidade da espuma para a caseína comercial. A capacidade emulsificante da proteína foi significativamente mais elevada no pH 7,0 do que no pH 4,0 nas três amostras estudadas, sendo que a CC > CM > COC. A caseína comercial apresentou emulsões mais estáveis em relação ao coágulo de caseína e a caseína micelar.

4.1. INTRODUÇÃO

As propriedades de superfície dependem da formação de películas bipolares na interface entre duas fases imiscíveis, como as propriedades emulsificantes e espumantes (Sgarbieri, 1998). Espumas e emulsões são sistemas heterogêneos e se constituem de uma fase dispersa em outra. Uma emulsão é uma dispersão ou suspensão de dois líquidos imiscíveis, enquanto na espuma a fase gasosa é dispersa no líquido (Hill, 1998).

Espumas são sistemas dispersos de duas fases distintas, onde uma delas líquida circunda uma fase dispersa constituída de bolhas de ar, que são separadas por uma fina camada de líquido denominada lamela, formando uma interface ar-líquido de elevada tensão, resultando num filme adsorvido nesta região que previne a coalescência das bolhas de ar (Halling, 1981).

Segundo Lourenço (2000), as emulsões podem ser definidas como dispersões coloidais macroscópicas de dois líquidos imiscíveis, freqüentemente óleo em água. Um dos componentes formam a fase contínua externa ou fase de dispersão, o outro forma a fase descontínua ou fase dispersa em forma de finas gotículas suspensas na fase líquida imiscível. Existem basicamente dois tipos de emulsão: a) de óleo em água (O/A) por exemplo salsichas, leite, maionese e b) de água em óleo (A/O), por exemplo, manteiga e margarina (Damodaram, 1997).

Diversos fatores podem influenciar as propriedades de superfície das proteínas. Para ser um bom agente formador de espuma, a proteína deve: a) absorver rapidamente na interfase ar-água durante a batidura; b) sofrer rápido arranjo e rearranjo na interface e formar um filme coesivo e viscoelástico (Giese, 1994), enquanto um bom agente emulsificante deve diminuir a tensão interfacial e formar uma película na interface. As substâncias que favorecem a formação de uma emulsão são conhecidas como agentes emulsificantes (Wagner, 2000).

Um dos mais convenientes ingredientes da proteína do leite é o caseinato de sódio, que apresenta boa solubilidade, atividade de superfície, resistência ao aquecimento, e propriedades de retenção de água. O caseinato de sódio é amplamente utilizado como agente estabilizante de emulsões nos alimentos, tais como sorvetes, café cremoso e cremes líquidos (Doxastakis, citado por Dickinson, 1999).

O objetivo deste capítulo foi avaliar as propriedades funcionais espumantes e emulsificantes de três caseínas obtidas por diferentes processos: coágulo de caseína obtido por coagulação enzimática (COC), caseína micelar obtida pelos processos de microfiltração e diafiltração do leite bovino fluido (CM) e caseína comercial (CC).

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Material

Foram utilizadas as caseínas obtidas por coagulação enzimática (COC), micelas de caseína obtida do leite bovino fluído (CM), e caseína comercial (CC) (M. Cassab Ltda). Os processos de obtenção do coágulo de caseína e da caseína micelar estão descritos no capítulo 2.

4.2.2. Métodos

4.2.2.1. Capacidade espumante e estabilidade da espuma

Formação de Espuma

A capacidade de formação de espuma foi determinada através do método descrito por Mohanty et al. (1988). Foram preparadas dispersões das proteínas (COC, CM, CC) a 3% em diferentes pHs (4,0; 6,0 e 8,0) e concentrações de cloreto de sódio (0,00; 0,05 e 0,15M). As dispersões foram mantidas sob agitação durante 30 minutos em agitador magnético.

Posteriormente o pH das dispersões foi ajustado e o volume aferido para 100mL. As suspensões foram batidas em batedeira (Black Deker), na velocidade máxima (980rpm) por um período de 5 minutos. A espuma foi imediatamente transferida para provetas e o volume inicial de espuma (V_o) foi registrado. A porcentagem de espuma formada (CESP%) foi calculada pela equação:

$$\text{CESP \%} = \frac{V_o \text{ (mL)}}{\text{Volume original da solução de proteína (mL)}} \times 100$$

Estabilidade da espuma

A espuma foi deixada por 60 minutos em provetas de 250, 500 ou 1000mL (de acordo com o volume de espuma obtido) e foram medidos, simultaneamente, o volume da coluna de espuma e o volume do líquido drenado com o decorrer do tempo. O modelo empírico proposto por Elizalde et al. (1991), foi utilizado para determinar o perfil de drenagem do soro de espuma para diferentes proteínas, por se ajustar perfeitamente aos dados experimentais. Por este modelo, o volume de líquido drenado em função do tempo é dado por:

$$v(t) = \frac{V \times t}{(B + t)} \quad [1]$$

onde:

$v(t)$ = volume de líquido drenado no tempo t

V = volume máximo de líquido drenado

B = tempo necessário para drenar $V/2$ (tempo de meia vida da espuma)

A taxa de drenagem do líquido pode ser obtida derivando a equação (1) com respeito ao tempo.

$$\frac{dv}{dt} = \frac{(V - v)^2}{(VB)} \quad [2]$$

onde:

$(V-v)$ = representa a quantidade de líquido que permanece na espuma;

$(VB)^{-1}$ = representa a constante de drenagem (K). Então K pode ser calculado, como:

$$K = (V \times B)^{-1} \quad [3]$$

A taxa inicial de drenagem R_0 pode ser obtida da equação (2), bastando para isso tomar $v=0$ para $t=0$, assim:

$$R_0 = \frac{(dv)}{(dt)^{t=0}} = \frac{V}{B} \quad [4]$$

A estabilidade da espuma foi avaliada pela redução percentual do seu volume após 30 e 60 minutos em relação ao seu volume inicial, conforme descrito por Patel et al., (1988).

$$\% \text{ EEs} = \frac{\text{Volume de espuma após 30 ou 60 min.}}{\text{Volume inicial da espuma incluindo o volume do líquido (Vo)}} \times 100$$

4.2.2.2. Capacidade emulsificante e estabilidade de emulsão

Capacidade emulsificante (CE)

É definida como a quantidade máxima de óleo que pode ser dispersa em fase aquosa para um dado procedimento experimental. Esta análise foi realizada conforme o procedimento descrito por De Kanterewicz et al. (1987), utilizando-se o homogeneizador Ultra-Turrax T-25.

Dispersões a 1% de proteína e óleo foram combinadas em diferentes proporções mantendo o volume total igual a 50mL, até encontrar o ponto onde ocorreu o colapso da emulsão, visualizada pela separação de fases e utilizando-se corante lipossolúvel – Sudan III para facilitar essa visualização. As emulsões foram agitadas à velocidade de 9500 rpm por um tempo de três minutos, antes de se adicionar incrementos de óleo, sendo mantidas em banho de gelo para evitar o aquecimento da amostra. A capacidade de emulsificação foi expressa em mL de óleo adicionado até alcançar o ponto de inversão por g de proteína.

Estabilidade de emulsão (EE)

Foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Acton & Safle (1970) com algumas adaptações às condições do laboratório. As emulsões foram feitas com 50mL de óleo de soja e 50mL de dispersões de proteína a 1%, que foram homogeneizadas a 9500 rpm em homogeneizador Ultra-Turrax T-25 por três minutos em banho de gelo. Alíquotas de 10mL foram colocadas em tubos de ensaio e deixadas por 24 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Foi determinada a umidade (U) da emulsão recém preparada. Após 24 horas a 37°C , removeu-se com pipeta, 5mL da amostra do fundo do tubo e foi determinada a umidade.

A razão estabilidade para cada amostra foi determinada com base na alteração da porcentagem de umidade (água) retirada na emulsão após 24 horas, onde U representa a umidade.

$$\text{EE (\%)} = \frac{100 - U_{24h}}{100 - U_{\text{inicial}}} \times 100$$

4.2.2.3. Análise Estatística

Todos os resultados encontrados no estudo foram analisados através da análise de variância (ANOVA) e as possíveis diferenças entre médias ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey (Gomes, 1982), utilizando-se o programa "Statística: Basic Statistics and Tables".

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Propriedades Espumantes

As propriedades espumantes do coágulo de caseína obtido por coagulação enzimática (COC), caseína comercial (CC) e caseína micelar (CM) foram estudadas através da % de expansão de volume e estabilidade de espuma após o período de 30 e 60 minutos, em função dos diferentes pHs (4,0; 6,0 e 8,0) e das diferentes concentrações de cloreto de sódio (0,00M, 0,05M e 0,15M). O coágulo de caseína não apresentou propriedades espumantes nas condições estudadas.

A capacidade de expansão de espuma (% CESP) está apresentada nas figuras 4.1 e 4.2. Não houve influência significativa das concentrações salinas estudadas nos pHs 4,0 e 8,0 para as amostras analisadas.

A figura 4.1 ilustra que a melhor capacidade de formação de espuma para a CM foi conseguida em pH 4,0 independente da concentração salina. De acordo com a literatura, a máxima capacidade espumante para proteínas não desnaturadas tem sido observada em pHs ácidos, e o pH afeta de maneira marcante as propriedades espumantes das proteínas (Sgarbieri, 1998).

Dos valores de pHs estudados, houve diferença significativa em função da concentração salina somente em pH 6,0, onde a % CESP a 0,15M de NaCl foi superior, em relação a 0,05M e em ausência de sal. Nos pHs 6,0 e 8,0, as proteínas encontram-se ionizadas, uma vez que esse valor de pH situa-se acima da faixa de seu ponto isoelétrico. No entanto, segundo Demetriadis et al. (1997), a adição de cloreto de sódio pode provocar a floculação de proteínas, mesmo estando carregadas eletricamente, porque os íons interferem nas forças repulsivas que contribuem para a manutenção das proteínas em solução.

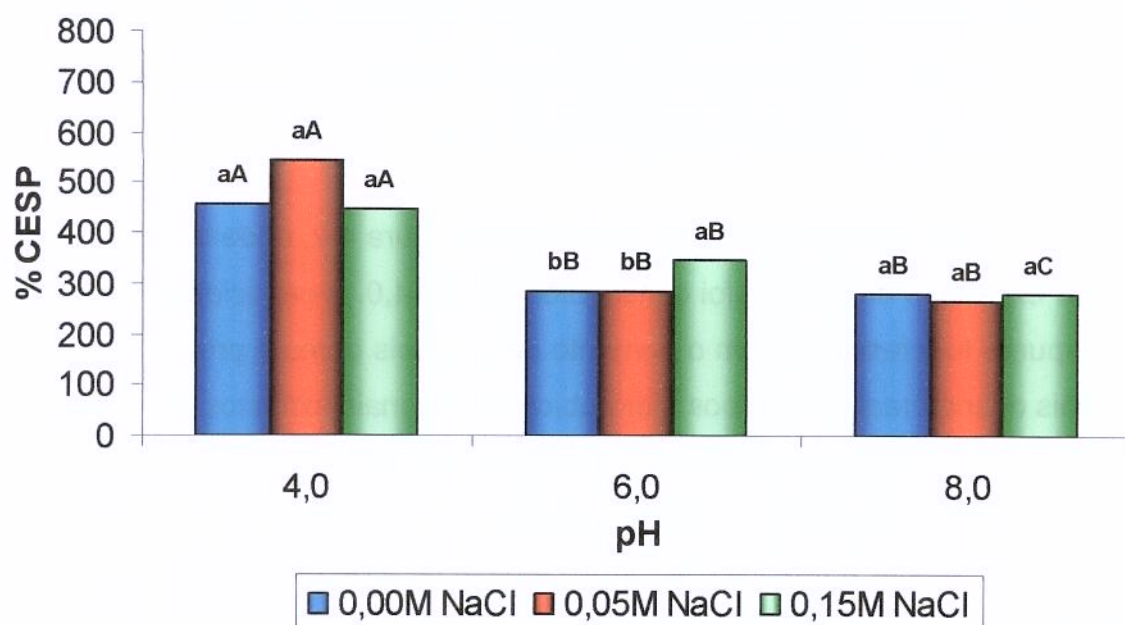


FIGURA 4.1 - Representação gráfica da capacidade de expansão de espuma (%CESP) para caseína micelar (CM). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas. Letras minúsculas mesmo pH em função da concentração de NaCl. Letras maiúsculas nos diferentes pHs para a mesma concentração de NaCl.

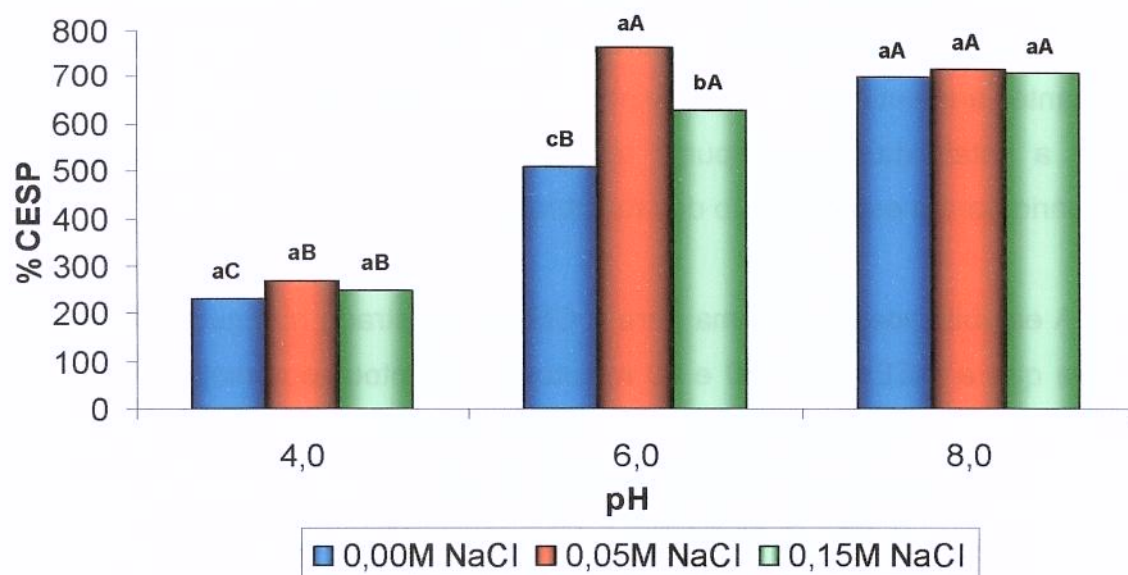


FIGURA 4.2 - Representação gráfica da capacidade de expansão de espuma (%CESP) para caseína comercial (CC). Letras minúsculas mesmo pH em função da concentração de NaCl. Letras maiúsculas nos diferentes pHs para a mesma concentração de NaCl.

Além disso, íons salinos competem com as cargas das proteínas pela água diminuindo a capa de hidratação e permitindo a atração proteína-proteína, redução da solubilidade e conseqüente diminuição da expansão de volume.

O inverso ocorre com a CC, mostrada na figura 4.2, onde se observa que a menor expansão de volume foi conseguido em pH 4,0. A capacidade de formação de espuma foi crescente com o aumento do pH, pois como a proteína apresenta-se mais desnaturada, os grupos hidrofóbicos estão mais expostos, proporcionando um aumento da solubilidade ('salting in'), fazendo com que a proteína se difunda rapidamente à superfície, desdobrando-se e orientando-se, ocasionando conseqüentemente a redução da tensão interfacial e permitindo o aprisionamento de maior quantidade de ar pelo filme protéico, melhor flexibilidade da lamela e uma maior formação de espuma.

Nas figuras 4.3 e 4.4 estão apresentados os efeitos do pH e da concentração salina na estabilidade da espuma (%EEs) após 30 e 60 minutos, para a caseína micelar e para a caseína comercial, respectivamente. Segundo Sgarbieri (1998), dependendo da concentração, o sal deve afetar a propriedade espumante, aumentando ou diminuindo a solubilidade da proteína o que pode reduzir a estabilidade da espuma retardando o grau crítico de desnaturação necessário para a estabilização das membranas.

A estabilidade da espuma para a CM está ilustrada na figura 4.3, onde se observa que a %EEs após 30 e 60 minutos apresentou-se semelhante nos pHs 6,0 e 8,0, independente das diferentes concentrações salinas. A estabilidade foi bastante baixa no pH 4,0 em água e em 0,05M de NaCl, apresentando boa estabilidade em pH 8,0 até 30 minutos. A caseína micelar, segundo a literatura, é desestabilizada quando o pH é ajustado para próximo do ponto isoelétrico (Fox & McSweeney, 1998), pois quando o pH é reduzido, o fosfato de cálcio coloidal (FCC) dissolve-se e a micela sofre alterações desintegrando-se em partículas menores (Kruif, 1999).

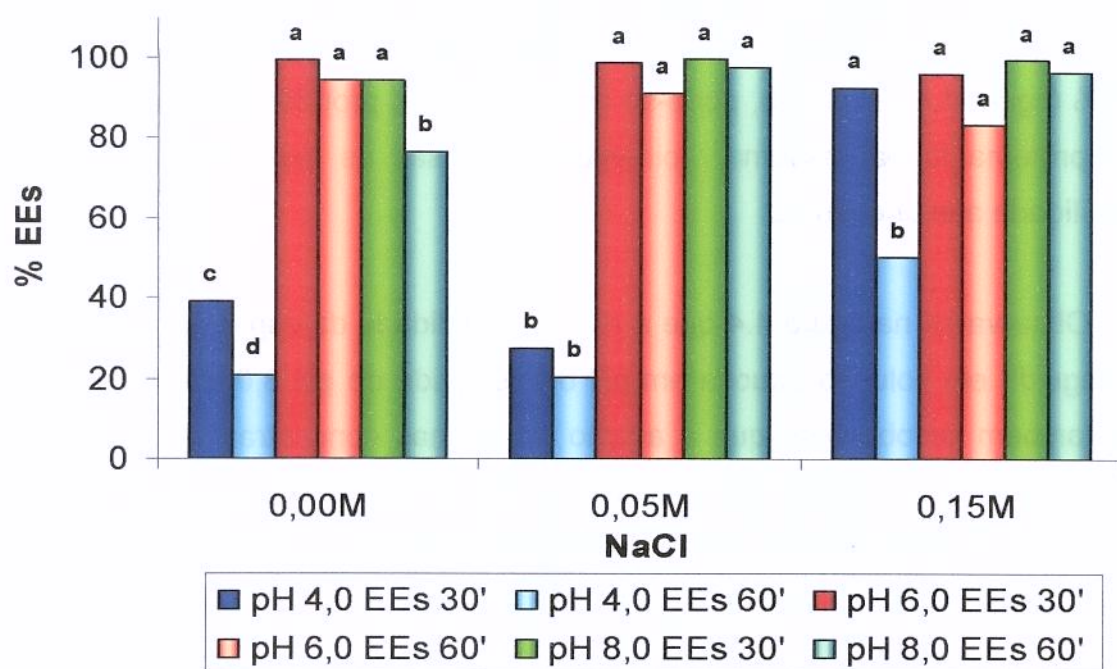


FIGURA 4.3 - Representação gráfica da estabilidade da espuma (%EEs) após 30 e 60 minutos para a caseína micelar (CM) em função da concentração de NaCl e do pH. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p > 0,05$).

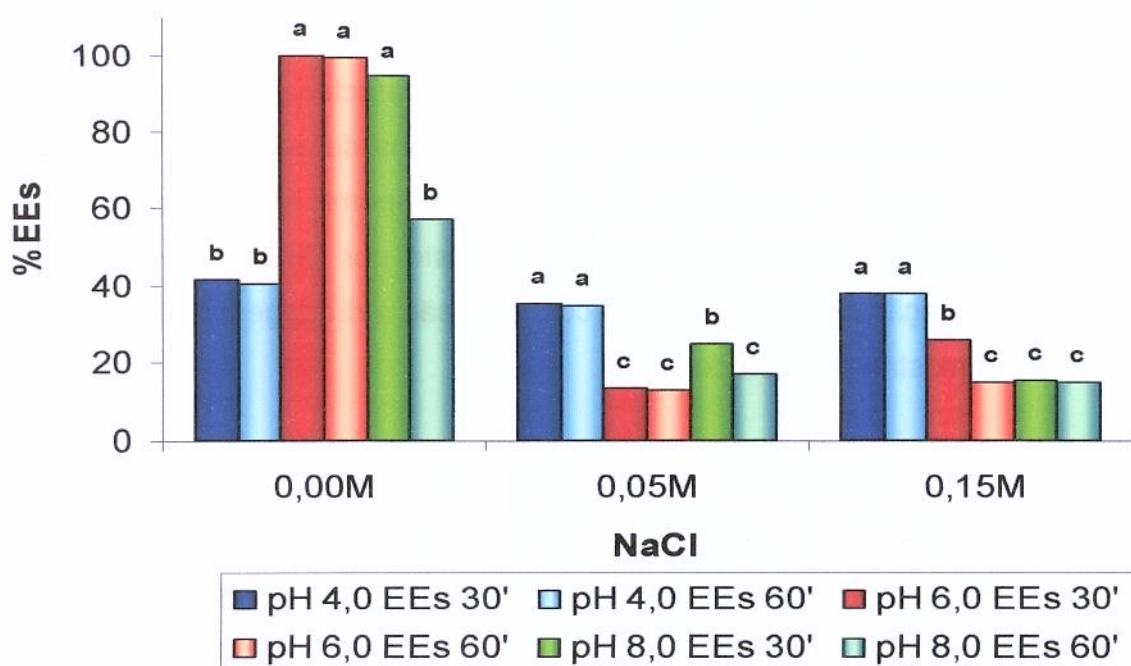


FIGURA 4.4 - Representação gráfica da estabilidade da espuma (%EEs) após 30 e 60 minutos para a caseína comercial (CC) em função da concentração de NaCl e do pH. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p > 0,05$).

Embora a CC em presença de NaCl tenha a capacidade de adsorver-se rapidamente, diminuindo a tensão superficial, a estabilidade da espuma foi inferior a 40% (figura 4.4). Portanto, pode-se concluir que as propriedades que permitem uma proteína formar espuma rapidamente não são as mesmas que conferem estabilidade a esta espuma.

Observa-se na figura 4.4 que a maior estabilidade da espuma para a CC foi conseguida em solução aquosa em pH 6,0, seguido do pH 8,0. Nestes mesmos pHs também se observou que a adição de sal nas concentrações de 0,05M e 0,15M diminuiu a %EEs. Isso ocorreu pois, segundo a literatura, proteínas altamente hidrofóbicas como a CC, formam filmes delgados e menos viscosos, por causa da hidratação deficiente.

Além disso, proteínas com elevada densidade de cargas em que a hidratação não é um fator limitante, a maior repulsão eletrostática entre moléculas de proteína causa desestabilização dos filmes e conseqüente drenagem do líquido (Sgarbieri, 1998)

Geralmente são utilizados dois processos para caracterizar a estabilidade da espuma, a drenagem do líquido e o colapso da coluna de espuma. Pelos dados experimentais obtidos da drenagem do líquido de espuma em função do tempo (60min.), utilizou-se o modelo matemático proposto por Elizalde et al. (1991), sendo que a equação permite descrever com precisão a drenagem do líquido para as diferentes amostras em estudo.

Os valores obtidos encontram-se nas tabelas 4.1 e 4.2, onde estão apresentados os parâmetros que descrevem a drenagem do líquido da espuma de dispersões de 3% de proteína da caseína micelar e da caseína comercial, respectivamente.

TABELA 4.1 - Parâmetros que descrevem a drenagem do líquido da espuma de dispersões de 3% de proteína da caseína micelar (CM).

pH	[] NaCl	V (mL)	B (min.)	Ro (mL/min.)	K (mL/min) ⁻¹
4,0	0,00 M	78 ± 2,52 ^a	12,29	6,35	0,0010
	0,05M	80 ± 0,58 ^a	6,97	11,48	0,0018
	0,15M	78 ± 3,61 ^a	8,17	9,53	0,0016
6,0	0,00 M	75 ± 0,58 ^a	1,03	72,82	0,0129
	0,05M	77 ± 1,53 ^a	2,05	37,56	0,0063
	0,15M	72 ± 5,29 ^a	3,75	19,20	0,0037
8,0	0,00 M	83 ± 1,73 ^a	0,51	162,75	0,0236
	0,05M	72 ± 2,00 ^a	2,24	32,14	0,0131
	0,15M	74 ± 1,53 ^a	2,69	27,51	0,0050

TABELA 4.2 - Parâmetros que descrevem a drenagem do líquido da espuma de dispersões de 3% de proteína da caseína comercial (CC).

pH	[] NaCl	V (mL)	B (min.)	Ro (mL/min.)	K (mL/min) ⁻¹
4,0	0,00 M	88 ± 2,00 ^a	0,66	133,33	0,0172
	0,05M	93 ± 5,69 ^a	0,72	129,17	0,0149
	0,15M	86 ± 1,53 ^a	0,59	145,76	0,0197
6,0	0,00 M	79 ± 5,77 ^a	10,26	7,70	0,0012
	0,05M	98 ± 5,00 ^a	8,33	11,76	0,0012
	0,15M	83 ± 2,89 ^a	10,66	7,79	0,0011
8,0	0,00 M	93 ± 2,52 ^a	13,25	7,02	0,0008
	0,05M	96 ± 4,04 ^a	9,02	10,43	0,0011
	0,15M	92 ± 2,08 ^a	2,93	31,40	0,0059

V= volume máximo de líquido drenado; B= tempo de meia-vida da espuma; R₀= taxa de drenagem inicial K= constante de drenagem. Resultados são média de 3 determinações analíticas ± desvio padrão. Médias seguidas por uma mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A meia-vida de espuma (B), que corresponde ao tempo necessário para drenar metade do volume máximo do líquido (V), serviu como parâmetro de comparação da estabilidade da espuma para as diferentes amostras. De acordo com Britten & Lavoire (1992), o índice B, pode ser o mais indicado para comparar a estabilidade da espuma, porque ele não depende do volume inicial da espuma formada.

Como espumas mais estáveis apresentaram maiores valores de B e valores mais baixos de K (constante de drenagem), a CC em pH 8,0 foi a que obteve a maior estabilidade, seguida da CM em pH 4,0, ambas em ausência de solução de NaCl. No entanto, os maiores valores da constante de drenagem ao longo do tempo (K) foram determinados para a CM em pH 8,0 e para a CC em pH 4,0, ambas em solução aquosa, indicando que nestas condições as amostras foram menos estáveis.

As figuras 4.5, 4.6 e 4.7 representam a cinética de drenagem do líquido (mL) em função de tempo, respectivamente nos pHs 4,0; 6,0 e 8,0. O pH exerce uma influência marcante nas propriedades de espuma, particularmente na estabilidade, por seu efeito direto na carga líquida da proteína.

Observa-se na figura 4.5 que não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações salinas para a CC, sendo que esta obteve uma drenagem significativamente mais elevada e mais rápida que a CM no pH 4,0. Segundo Lourenço (2000), as proteínas que possuem boa capacidade de formação de espuma, em virtude de sua flexibilidade estrutural, suas espumas são instáveis por causa das propriedades viscoelásticas, viscosidade, resistência ao cisalhamento, elasticidade do filme protéico que encapsula o ar.

Isso foi determinado, segundo os dados experimentais, para a caseína comercial, a qual teve uma porcentagem de expansão elevada, porém baixa estabilidade, portanto uma drenagem mais rápida do líquido.

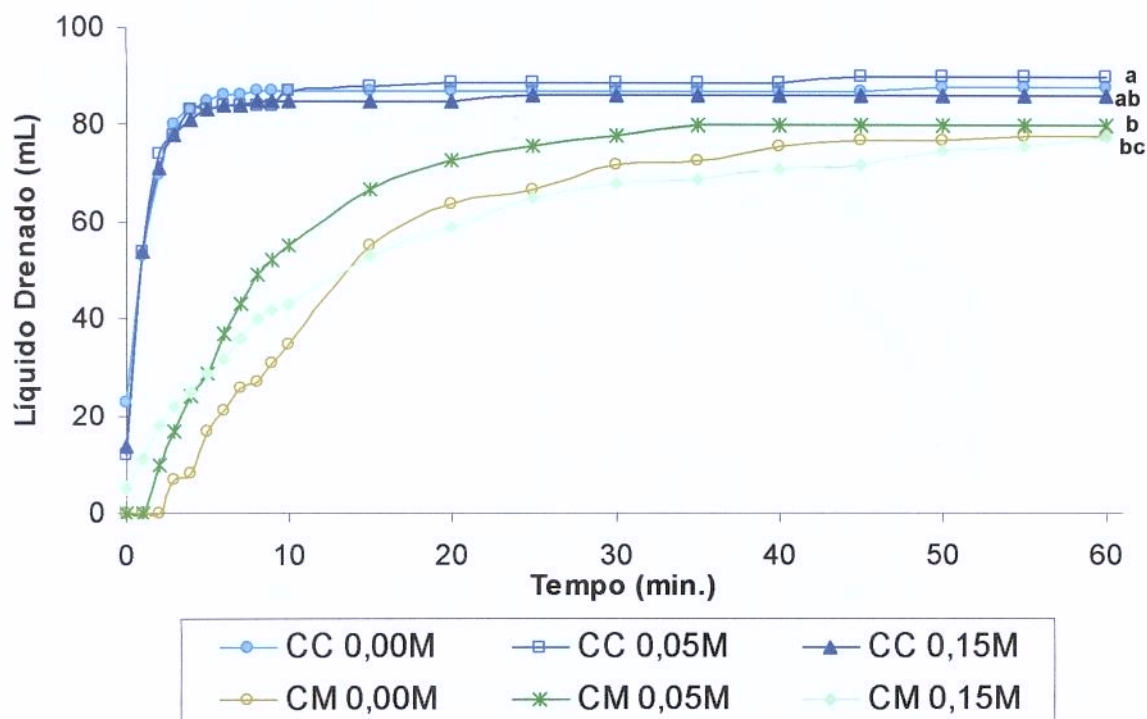


FIGURA 4.5 - Representação gráfica da estabilidade da espuma para a caseína comercial (CC) e para a caseína micelar (CM) em função da concentração de sal e em pH 4,0. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas na estabilidade após 60 min.

A figura 4.6 ilustra a cinética de drenagem das amostras CM e do CC em pH 6,0, onde observa-se uma tendência semelhante de drenagem do líquido para os diferentes tratamentos nas diferentes concentrações salinas, com exceção da CC em 0,05M de NaCl, que teve um volume drenado significativamente superior aos demais tratamentos. A CC mostrou-se mais estável até um tempo de 10 minutos, verificando-se que a presença de sal tende a melhorar a estabilidade da CM e a desestabilizar a CC.

Observa-se que na figura 4.7 as curvas de drenagem em pH 8,0, foram semelhantes às obtidas em pH 6,0, ou seja, a CC mostrou-se mais estável nos primeiros 5 minutos; no entanto, as amostras de CM apresentaram-se mais estáveis nas concentrações de 0,05 e 0,15M de cloreto de sódio. Conforme citado por Augustin (2000), as micelas de caseína têm diferentes afinidades na interface, e respondem diferentemente quando na presença de sal.

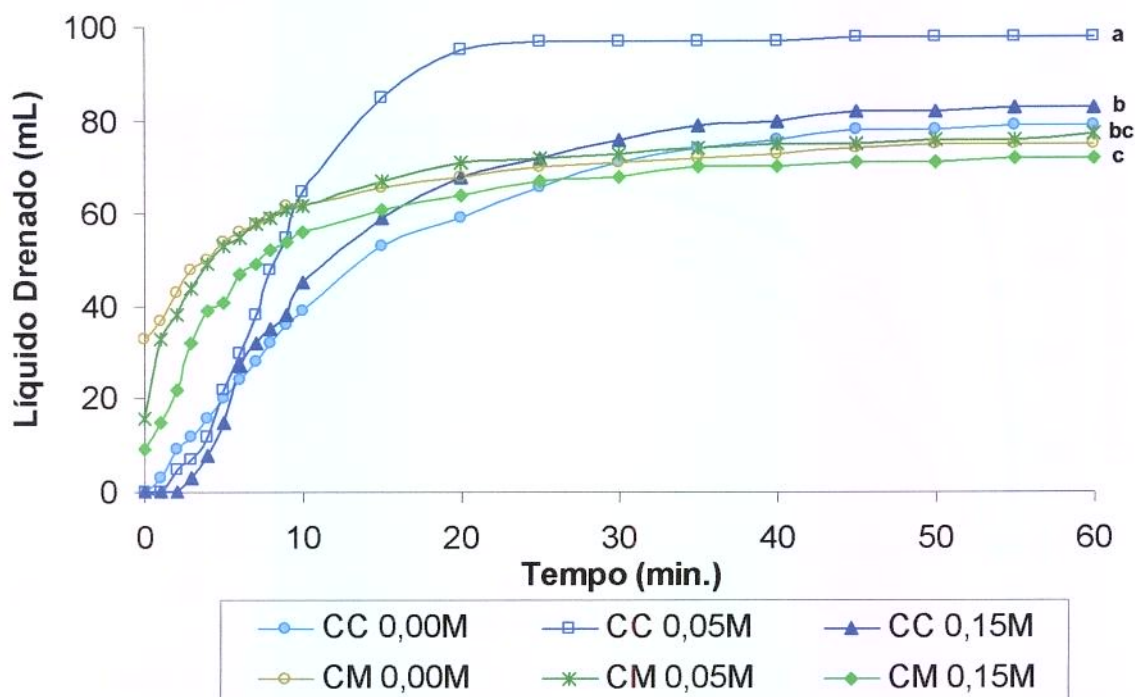


FIGURA 4.6 - Representação gráfica da estabilidade da espuma para a caseína comercial (CC) e para a caseína micelar (CM) em função da concentração de sal e em pH 6,0. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas na estabilidade após 60 min.

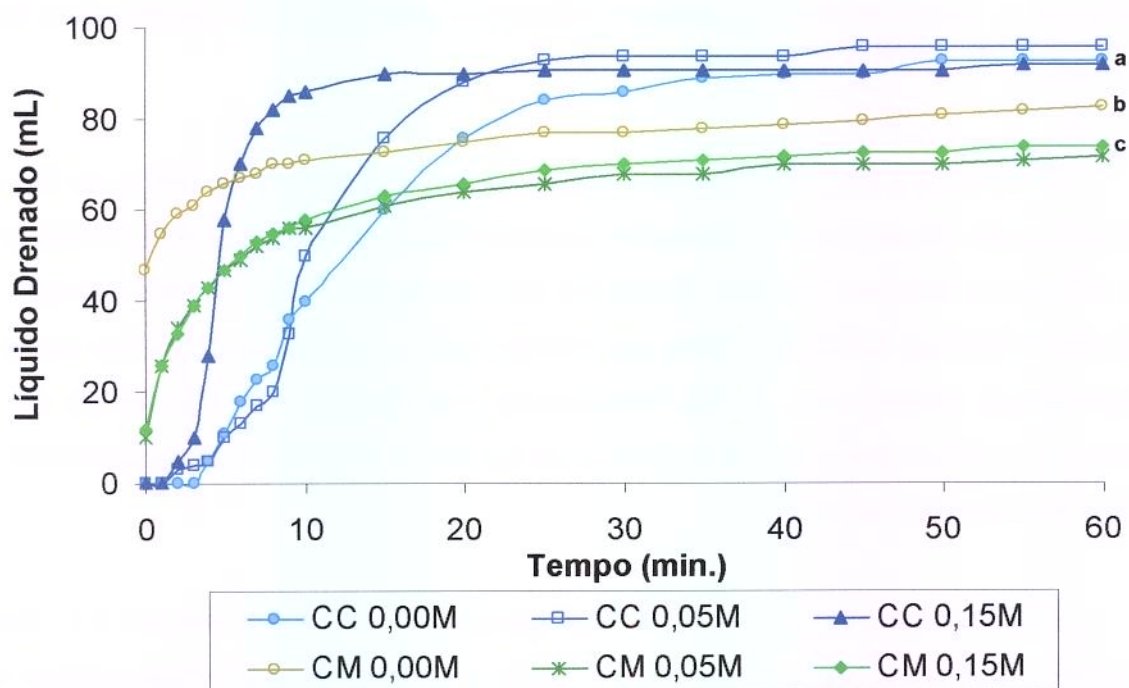


FIGURA 4.7 - Representação gráfica da estabilidade da espuma para a caseína comercial (CC) e para a caseína micelar (CM) em função da concentração de sal e em pH 8,0. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas na estabilidade após 60 min.

Observa-se pela drenagem do líquido nos pHs 6,0 e 8,0, que a caseína comercial apresentou-se inicialmente mais estável que a caseína micelar. No entanto, com o passar do tempo a drenagem do líquido tornou-se mais rápida, portanto de menor estabilidade de espuma. Segundo a literatura, a desnaturação resulta da ruptura de ligações ou interações intramoleculares, de tal forma, que a proteína desnaturada conterá muitos grupos potencialmente capazes de formar ligações com os solventes ou entre as moléculas de proteína (Sgarbieri, 1996). Isso foi o que aconteceu com a CC.

4.3.2. Propriedades Emulsificantes

Interações de proteínas e lipídeos são comumente encontradas em alimentos e a habilidade da proteína de formar emulsões estáveis é importante (Kim et al., 1990). As propriedades emulsificantes da caseína comercial (CC), coágulo de caseína (COC) e caseína micelar (CM) foram estudadas através da determinação da capacidade emulsificante (CE) e da estabilidade da emulsão (EE) em função dos pHs 4,0 e 7,0.

A capacidade emulsificante da proteína foi significativamente mais elevada no pH 7,0 do que no pH 4,0 nas três amostras estudadas. Os resultados apresentados estão de acordo com a literatura, ou seja, conforme o pH se distancia do ponto isoelétrico da proteína ocorre um aumento da carga elétrica e possivelmente melhora da solubilidade da proteína; ocorre ainda uma elevação da capacidade emulsificante. Esse efeito do pH sobre a capacidade emulsificante da proteína está representado na figura 4.8.

A quantidade máxima de óleo que pode ser emulsificada pela dispersão 1% de proteína da caseína comercial foi superior às demais amostras. Segundo Duarte et al. (1998), na faixa de pH 3,0 a 5,0 a solubilidade da caseína é praticamente zero. Mesmo assim, apresenta razoável capacidade emulsificante. Esta influência do pH na solubilidade, segundo alguns autores, pode interferir na quantidade da proteína absorvida na interface óleo/água (O/A) e, dessa maneira modificar as propriedades emulsificantes da proteína.

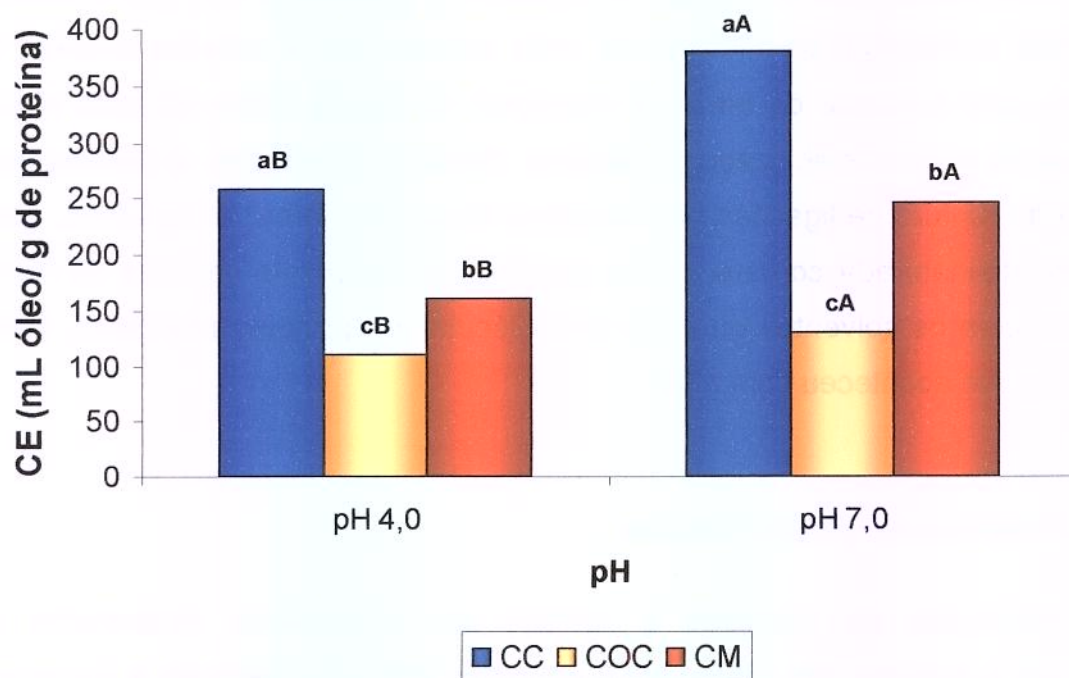


FIGURA 4.8 - Representação gráfica da capacidade emulsificante (CE) para a caseína comercial (CC), coágulo de caseína (COC) e para a caseína micelar (CM) em função do pH. Letras minúsculas indicam resultados estatísticos para as diferentes amostras em cada pH. Letras maiúsculas mostram resultados da estatística para cada amostra em diferentes pHs.

As amostras podem ser separadas em dois grupos dependendo da estrutura ordenada (micelas) e desordenada (caseína comercial). Observa-se que a proteína desordenada tem uma maior capacidade emulsificante que as proteínas agregadas pois, segundo Euston & Hirst (2000) a CM tem uma maior proporção de grupos hidrofílicos e a superfície menos hidrofóbica condiciona uma redução da adsorção na interface A/O.

A caseína micelar apresentou uma capacidade emulsificante inferior ao da caseína comercial. Os resultados experimentais obtidos estão de acordo com a literatura ao citar que muitas estruturas de proteína agregadas do leite, tais como a caseína micelar não são boas formadoras de emulsão porque são inflexíveis (a estrutura se mantém junta pelas pontes de cálcio) e não migram rapidamente para a interface óleo-água (Euston & Hirst, 2000).

Das amostras estudadas, o coágulo de caseína apresentou a menor capacidade emulsificante. Esta característica pode ser atribuída à sua baixa solubilidade (inferior a 5%) pois, segundo Lourenço (2000) as proteínas insolúveis com hidrofobicidade elevadas são pouco eficazes porque agregam-se extensivamente na interface.

Courthaudon et al. (1999), concluíram em seus estudos que o caseinato de sódio tem uma superfície mais ativa que as micelas de caseína, e emulsões com as micelas são mais viscosas que aquelas feitas com o caseinato. Conseqüentemente, a estrutura desordenada da caseína tem grande influência na atividade de superfície e na adsorção na interface óleo-água.

Um mínimo de solubilidade é requerido, pois o lado hidrofóbico da proteína orienta-se para a face apolar (óleo) enquanto que cargas e/ou segmentos polares se orientam para contactar a fase aquosa e a maior parte das moléculas ocupa a interface, interagindo com as moléculas vizinhas e conferindo força e viscoelasticidade ao filme (Sgarbieri, 1998).

Cada proteína ou produto protéico se comporta de forma peculiar na estabilidade das emulsões, em virtude das características que regulam a habilidade de cada uma responder ao conjunto de fatores ou condições extrínsecas da emulsão à interface (Lourenço, 2000).

As caseínas do leite são agentes eficazes para formar emulsões, mas não dão origem a filmes rígidos, resistentes e estáveis por longo tempo, isto é, não são agentes estabilizadores adequados (Lourenço, 2000). A figura 4.9 ilustra a estabilidade da emulsão após 24 horas para a CC, COC e CM nos pHs 4,0 e 7,0. Observa-se que a estabilidade da emulsão é influenciada pelo pH, e que em pH 4,0 existem diferenças significativas entre as amostras. A menor estabilidade da emulsão (50%) foi determinada para a caseína micelar em pH 4,0.

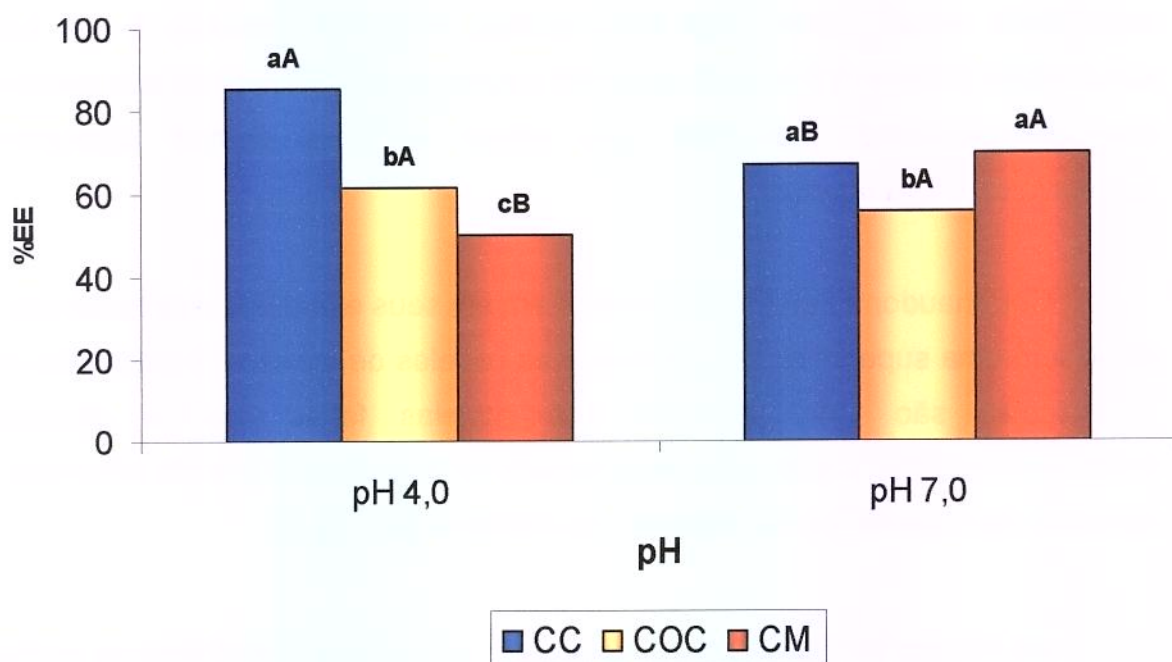


FIGURA 4.9 - Representação gráfica da estabilidade da emulsão (EE) para a caseína comercial (CC), coágulo de caseína (COC) e para a caseína micelar (CM) em função do pH. Letras minúsculas indicam resultados estatísticos para as diferentes amostras em cada pH. Letras maiúsculas mostram resultados da estatística para cada amostra em diferentes pHs.

Observa-se na figura 4.9 que a emulsão mais estável (85%) foi conseguida com a CC em pH 4,0 e que está de acordo com a literatura. Fennema (1985) sugere que quanto mais hidrofóbica for a proteína, maior será sua concentração na interface e menor a tensão superficial, sendo a emulsão, mais estável.

De acordo com Mangino (1994), em valores próximos ao pI , as proteínas são capazes de formar filmes interfaciais mais coesos e mais viscosos, o que é benéfico para a estabilidade da emulsão. Entretanto, em alguns casos como foi observado para a caseína, a capacidade emulsificante pode ser mais elevada em uma faixa de pH distante do ponto isoelétrico.

Mulvihill & Murphy (1991) também encontraram resultados mostrando que o caseinato de cálcio e a caseína micelar dão maior estabilidade às emulsões que o caseinato de sódio, mas não são boas formadoras de emulsões. Leman et al. (1988) mostraram que em pH neutro a estabilidade das emulsões das proteínas do leite decresce na ordem da caseína micelar > leite desnatado > proteínas do soro.

De Kanterewicz et al. (1987) estudaram a relação entre a capacidade de absorção espontânea de água (CAA) e de óleo (CAO) e a capacidade de emulsificação e chegaram à conclusão de que a capacidade emulsificante (CE) está diretamente relacionada com a razão entre a absorção de água e a de óleo (CAA/CAO) expressa em mL de água absorvida/mL de óleo absorvido. Dessa forma pode-se prever a capacidade emulsificante pelo cálculo do balanço hidrofílico/lipofílico (CAA/CAO). Na tabela 4.3, pode-se perceber que, quanto maior a relação CAA/CAO tanto maior deverá ser a capacidade de emulsificação do sistema.

TABELA 4.3 – Razão entre a capacidade de absorção de água (CAA) e a capacidade de absorção de óleo (CAO) para a caseína comercial (CC), coágulo de caseína (COC) e caseína micelar (CM)

Amostra	CAA (mL água absorvida)	CAO (mL óleo absorvido)	CAA/CAO (mL de água/ mL de óleo)	CE pH 4,0	CE pH 7,0
CC	2,74±0,11 ^b	1,97±0,21 ^b	1,41±0,19 ^a	258,15±3,59 ^a	381,15±3,59 ^a
COC	1,98±0,13 ^c	1,38±0,08 ^c	1,44±0,14 ^a	110,01±6,17 ^c	129,21±10,20 ^c
CM	4,80±0,13 ^a	4,69±,06 ^a	1,02±0,03 ^b	160,38±1,78 ^b	246,31± 2,26 ^b

Médias seguidas por uma mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No entanto, para o COC os dados experimentais não condizem com a citação de De Kanterewicz et al. (1987), talvez porque essa razão CAA/CAO não possa ser aplicada para amostras com uma solubilidade muito baixa, inferior a 5%, como é o caso do COC.

4.4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que as várias preparações de caseína diferem bastante em relação às suas propriedades de superfície. As variações são atribuídas principalmente às diferenças nas propriedades moleculares como composição e a sequência de aminoácidos, flexibilidade conformacional e relação hidrofobicidade/hidrofilicidade, as quais estão associadas às estruturas das proteínas.

O coágulo de caseína não apresentou propriedades espumantes nas condições estudadas. A caseína micelar apresentou a melhor capacidade de expansão de espuma em pH 4,0 e a caseína comercial em pH 6,0.

Quanto à estabilidade da espuma, a caseína micelar mostrou-se bastante estável nas diferentes concentrações salinas após 60 minutos. No entanto, a presença de sal diminuiu a estabilidade da espuma para a caseína comercial.

A capacidade emulsificante da proteína foi significativamente mais elevada no pH 7,0 do que no pH 4,0 nas três amostras estudadas (CC > CM > COC). A caseína comercial apresentou emulsões mais estáveis que o coágulo de caseína e caseína micelar.

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACTON, J.C.; SAFLE, R.L. Stability of oil-in-water emulsions. 1- Effect of surface tension, level of oil, viscosity and type of meat protein. **Journal of Food Science**. Chicago, v.35, n.1, p.852-855, 1970.

AUGUSTIN, M.A. Mineral salts and their effect on milk functionality. **The Australian Journal of Dairy Technology**. Highett, v.55, p.61-64, 2000.

BRITTEN, M.; LAVOIRE, L. Foaming properties of proteins as affected by concentration. **Journal of Food Science**. Chicago, v.57, n.5, p.1218-11221; 1241, 1992.

COURTHAUDON, J.L; GIRARDET, J.M; CAMPAGNE, S.; ROUHIER, L.M.; CAMPAGNA, S.; LINDEN, G.; LORIENT, D. Surface active and emulsifying properties of casein micelles compares to those of sodium caseinate. **International Dairy Journal**. Barking, v.9, p. 411-412, 1999.

DAMODARAM, S. Food proteins: an overview. In: Food proteins and their applications. Srinivasan Damodaram and Alain Paraf (Eds). New York: Marcel Dekker, INC, Cap. 1, p.1-24, 1997.

DE KANTEREWICZ, R.J.; ELIZALDE, B.E.; PILOSOFF, A.M.R.; BARTHOLOMAI, G.B. Water-oil absorption index (WOAI): a simple method for predicting the emulsifying capacity of food proteins. **Journal of Food Science**. Chicago, v.52, n.5, p.1381-1383, 1987.

DEMETRIADIS, K.; COUPLAND, J.N.; McCLEMENTS, D.J.; Physicochemical properties of whey protein-stabilized emulsions as affected by heating and ionic strength. **Journal of Food Science**. Chicago, v.62, n.3, p.462-467, 1997.

DICKINSON, E. Casein in emulsions: interfacial properties and interactions. **International Dairy Journal**. Barking, v.9, p.305-312, 1999.

DUARTE, A.J.; CARREIRA, R.L.; JUNQUEIRA, R.G.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Propriedades emulsificantes e solubilidade da caseína bovina e de seus hidrolisados trópicos: 1. efeito do pH e do tempo de hidrólise. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.18, n.3, p.295-302, 1998.

ELIZALDE, B.E.; GIACCAGLIA, D.; PILOSOFF, A.M.R.; BARTHOLOMAI, G.B. Kinetics of liquid drainage from protein-stabilized foams. **Journal of Food Science**. Chicago, v.56, n.1, p.24-26, 1991.

EUSTON, S.R.; HIRST, R.L. The emulsifying properties of commercial milk protein products in simple oil-in-water emulsions and in a model food system. **Journal of Food Science**. Chicago, v.65, n.6, p.925-1098, 2000.

FENNEMA, O.R. **Food Chemistry**. New York: Marcel Dekker, 991p. 1985.

FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. Milk Proteins. In: Dairy Chemistry and Biochemistry. London: Blackie Academic & Professional, Cap. 4, p.146-238, 1998.

GIESE, J. Proteins as ingredients: types, functions, applications. **Food Technology**. Chicago, v.48, n.10, p.50-60, 1994.

GOMES, F.P. Curso de estatística experimental, 10 ed, São Paulo: Nobel. 430p. 1982.

HALLING, P.J. Protein-stabilized foams and emulsions. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. Boca Raton, v.15, n.2, p.155-203, 1981.

HILL, S.E. Emulsions and foams. In: Functional properties of food macromolecules. S.E.Hill, D.A. Ledward and J.R. Mitchell (eds.). A Chapman & Hall Food Science Book. Gaithersburg, Maryland, 2ªed., Cap.8, p.302-334, 1998.

KIM, S.Y.; PARK, P.S.W.; RHEE, K.C. Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. **Journal Agriculture Food Chemistry**. Washington, v.38, p.651-656, 1990.

KRUIF, C.G. Casein micelle interactions. **International Dairy Journal**. Barking, v.9, p.183-188, 1999.

LEMAN, J. HAQUE, Z. KINSELLA, J.E. Creaming stability of liquid emulsions containig different milk protein preparations. **Milchwissenschaft**. Munchen, v.13, p.286-289, 1988..

LOURENÇO, E.J. Tópicos de proteínas de alimentos 2000. Jaboticabal: FUNEP, 344p., 2000.

MANGINO, M.E. Protein interactions in emulsions: protein-lipid interactions. In Hettiarachchy, N.S.; Ziegler, G.R. (ed). Protein functionality in food systems, New York: Marcel Dekker, p.147-173, 1994.

MOHANTY, B. MULVIHILL, D.M.; FOX, P.F. Emulsifying and foaming properties of acidic caseins and sodium caseinate. **Food Chemistry**. Barking, n.1, v.28, p.17-30, 1988.

MULVIHILL, D.M.; MURPHY, P.C. Surface-active and emulsifying properties of milk caseins/caseinates as influenced by state of aggregation. **International Dairy Journal**. Barking, v.1, p.13-17, 1991.

PATEL, P.D.; STRIPP, A.M.; FRY, J.C. Whipping test for the determination of foaming capacity of protein: a collaborative study. **International Journal of Food Science and Technology**. London, v.23, n.1, p.57-63, 1988.

SGARBIERI, V. C. Propriedades Funcionais de proteínas em Alimentos. **Boletim Sociedade brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.32, n.1, p. 105-126, 1998.

SGARBIERI, V.C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Varela, 517 p., 1996.

WAGNER, J.R. Propriedades superficiales. In: Caracterizacion funcional y estructural de proteínas. Pilosof, A.M.R.; Bartholomai, G.B. (eds) Programa iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo – CYTED, Buenos Aires, p. 41-74, 2000.

**EFEITO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA SOBRE AS
PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO COÁGULO DE
CASEÍNA**

CAPÍTULO 5

EFEITO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA SOBRE AS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO COÁGULO DE CASEÍNA

RESUMO

Com o objetivo de verificar a influência do grau de hidrólise sobre as propriedades funcionais hidrofílicas (capacidade de absorção espontânea de água-CAA, capacidade de retenção de água-CRA e solubilidade da proteína-SP) e de superfície (capacidade de formação e estabilidade de espumas e de emulsões), a caseína obtida por coagulação enzimática (COC) foi submetida à hidrólise controlada, usando-se a enzima comercial Flavourzyme, produzida pela Novo Nordisk S.A. O grau de hidrólise (GH) foi determinado seguindo-se a reação em um pH-stat porém sem ajuste do pH, e foi determinado através da reação do TNBS (ácido trinitrobenzeno sulfônico). Os graus de hidrólise obtidos foram: 5,7; 12,8, 20,1 e 35,8%. Observou-se que quanto maior o grau de hidrólise maior a solubilidade e menor a capacidade de retenção de água dos hidrolisados. Quanto à capacidade de absorção espontânea de água no COC (não hidrolisado), observou-se resultados mais elevados (1,98mL água/g proteína) que os hidrolisados de GH 20,1 e 35,8%, porém inferiores aos com GH 5,7 e 12,8%. A hidrólise enzimática melhorou a capacidade de formação de espuma, pois o COC controle não formou espuma nas condições estudadas. A melhor capacidade de formação de espuma foi conseguida com o GH 12,8 % (CESP= 733); no entanto, a maior estabilidade foi obtida com o hidrolisado com 5,7% de grau de hidrólise. Não houve diferenças significativas entre o GH 5,7% e o COC quanto à formação da emulsão, mas a estabilidade da emulsão do hidrolisado a 5,7% de grau de hidrólise foi significativamente superior ao coágulo de caseína. Os demais hidrolisados, 12,8; 20,1 e 35,8% não formaram emulsão devido à baixa estabilidade apresentada.

5.1. INTRODUÇÃO

A hidrólise de proteínas pode ser produzida com dois objetivos distintos, alteração de propriedades funcionais e produção de pequenos peptídios e aminoácidos para serem utilizados em alimentos dietéticos ou como agentes flavorizantes (Kilara, 1985).

A funcionalidade das proteínas pode ser alterada por tratamentos físicos e químicos tais como pH, força iônica, aquecimento, força mecânica, bem como tratamentos enzimáticos (Nielsen, 1997). A modificação enzimática apresenta maiores benefícios e vantagens sobre a química (Kilara, 1995), além de ser uma alternativa para modificar a estrutura da proteína melhorando as propriedades funcionais (Chobert et al., 1996).

A modificação da estrutura da proteína melhora a solubilidade, as propriedades de formação de espuma, emulsão e geleificação (Nielsen & Olsen, 2002). Segundo Panyam & Kilara (1996), a hidrólise enzimática da proteína resulta em: a) diminuição do peso molecular, b) aumento do número de grupos ionizáveis e, c) exposição de grupos hidrofóbicos que estavam escondidos. A mudança das propriedades funcionais de uma proteína é resultado destes efeitos.

O grau de hidrólise (GH) é a medida da extensão da degradação hidrolítica de proteínas isto é, refere-se à porcentagem de ligações peptídicas clivadas. É considerado o meio mais prático e conveniente para controlar o processo de hidrólise (Adler-Nissen, 1986). O GH é também o melhor indicador para comparar diferentes amostras de hidrolisados protéicos, visto que é o principal determinante das propriedades dos hidrolisados (Mahmoud et al., 1992). O ótimo grau de hidrólise depende do produto requerido. As propriedades funcionais de um hidrolisado são muito diferentes da proteína nativa (Ortiz & Wagner, 2002), sendo então governados pelo peso molecular e hidrofobicidade dos polipeptídios resultantes (Adler-Niessen, 1986).

Este capítulo teve como objetivos verificar a influencia do grau de hidrólise sobre as propriedades funcionais da caseína obtida por coagulação enzimática (COC).

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Material

A matéria-prima usada para a produção dos quatro hidrolisados enzimáticos foi o coágulo de caseína (processo de obtenção descrito no Cap.2). A enzima utilizada foi a Flavourzyme 500L (Novo Nordisk) com atividade declarada de 500 LAPU/g proteína, mantida sob refrigeração durante todo o experimento.

5.2.2. Métodos

5.2.2.1. Obtenção dos Hidrolisados

A caseína obtida através da coagulação enzimática (coágulo de caseína-COC) foi hidrolisada com a enzima Flavourzyme, mantendo-se a agitação constante. A reação foi feita em água deionizada, suspensão de 8% de proteína (peso/volume) à temperatura de $38 \pm 1^\circ\text{C}$ e em sistema descontínuo. O pH inicial foi o da suspensão da matéria-prima em água ($\text{pH } 7,0 \pm 0,3$). Durante a hidrólise não houve ajuste do pH.

Foram realizados ensaios empregando-se diferentes relações enzima substrato ($[\text{e/s}] = 1:30$ e $1:9$) e tempos de incubação dependentes do grau de hidrólise pretendido nas condições preconizadas pelo fabricante. Determinou-se a solubilidade dos produtos hidrolisados a pH 6,5 seguindo-se o método de Morr et al. (1985), e então definiu-se a % GH desejado para posteriores testes funcionais.

O ponto final da reação foi obtido mediante inativação térmica da enzima a 75°C por 10 minutos. O material obtido foi seco por liofilização. O fluxograma do processo de obtenção dos hidrolisados protéicos está ilustrado na figura 5.1.

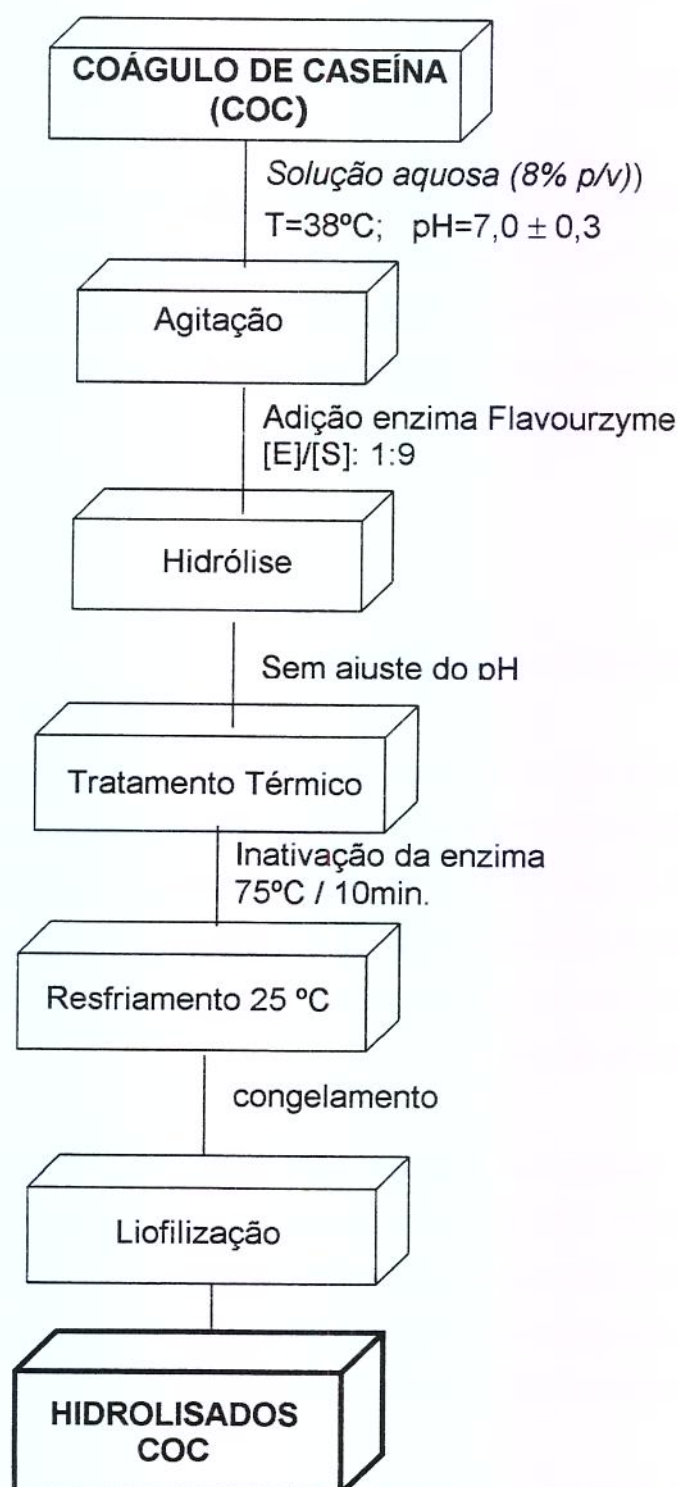


FIGURA 5.1- Fluxograma que representa a obtenção dos hidrolisados a partir do coágulo de caseína (COC), através da hidrólise enzimática com a Flavourzyme.

5.2.2.2. Determinação do grau de hidrólise (GH)

O GH foi definido segundo Adler-Nissen (1986) como o número de ligações peptídicas clivadas ou número de grupos amino livres formados durante o processo de hidrólise, expresso em equivalente de hidrólise (h). O número total de ligações peptídicas antes da hidrólise (H total) foi determinado pela composição de aminoácidos da proteína em mmol/g de proteína.

De acordo com Adler-Niessen (1979) o H total da caseína é 8.2. O H total determinado para o coágulo de caseína (9,88) foi utilizado nos cálculos para determinação do grau de hidrólise. O GH foi calculado segundo a expressão:

$$GH = \frac{h}{h \text{ total}} = \frac{\text{nº de ligações peptídicas clivadas}}{\text{nº total de ligações peptídicas}} \times 100$$

Para a determinação do grau de hidrólise (GH) foi utilizado o método proposto por Adler-Niessen (1979), que consiste na medida espectrofotométrica do cromóforo formado pela reação entre o ácido trinitro-benzenosulfônico (TNBS) e grupos amínicos sob condições alcalinas.

O progresso da hidrólise foi seguido através da retirada periódica de alíquotas do meio de reação e conseqüentemente inativação térmica da enzima (75°C por 10 minutos), seguindo-se de reação com TNBS para a determinação do grau do número de ligações peptídicas clivadas.

Após 1 hora de incubação a reação foi interrompida por abaixamento do pH (HCl 0,1N). A amostra foi dispersa em dodecil sulfato de sódio (SDS) e a reação ocorreu em presença de tampão fosfato 0,2125M e pH 8,2. Como padrão utilizou-se a L-leucina. A leitura foi efetuada a 340 nm.

5.2.2.3. Determinação do nitrogênio solúvel em TCA

O GH também foi determinado através do nitrogênio solúvel de amostras tratadas com 10% de ácido tricloroacético –TCA (Kim et al., 1990), onde 1g da amostra hidrolisada foi suspensa em 100 mL de água, ou seja, solução a 1%. Uma alíquota desta suspensão foi utilizada para a determinação do nitrogênio através do método Kjeldahl (AOAC, 1990).

Uma alíquota de 10mL da suspensão aquosa da amostra hidrolisada foi misturada com 10mL de TCA 20% e posteriormente centrifugada a 12.100g por 15 minutos. O nitrogênio solúvel foi então determinado no sobrenadante através do Kjeldahl (AOAC, 1990). A %GH foi determinado segundo a expressão:

$$GH = \frac{\text{nitrogênio solúvel em solução de TCA 10\%}}{\text{nitrogênio total}} \times 100$$

5.2.2.4. Composição dos Hidrolisados

- **Umidade e sólidos totais:** foram determinadas de acordo com os procedimentos descritos no AOAC (1990). Fundamenta-se na evaporação da água presente no alimento e pesagem do resíduo sólido.
- **Resíduo mineral (cinzas):** foi determinada de acordo com os procedimentos descritos no AOAC (1990). Baseia-se na determinação do resíduo inorgânico que fica depois de calcinar a matéria orgânica de uma amostra.
- **Nitrogênio Total:** determinado pelo método microKjeldahl, segundo método descrito na AOAC (1990). A proteína bruta foi obtida multiplicando-se o nitrogênio total pelo fator 6,38.

5.2.2.5. Eletroforese

A determinação do perfil eletroforético dos hidrolisados foi realizada de acordo com Laemmli (1970), metodologia descrita no capítulo 2 (2.2.6). Também se determinou o perfil eletroforético dos hidrolisados conforme método de Schagger & Jagow (1987), onde foi preparado um gel de poliacrilamida com gradiente entre 10 e 16% contendo tricina.

As dimensões da placa utilizada foram de 8,3 x 10,2 cm. A eletroforese foi conduzida à temperatura ambiente, utilizando uma unidade vertical Protein II – Bio-Rad empregando-se voltagem constante de 120 V. Foi injetado no gel 10 μ L de cada amostra (solução a 1% de proteína). Os géis foram corados em Coomassie Brilliant Blue G Colloidal (Sigma) por 24 horas e descorados em água destilada.

Como marcador de peso molecular foi utilizado: a) LMW Calibration Kit (Pharmacia) contendo: fosforilase B (94,0 kDa); albumina bovina (67,0 kDa); ovalbumina (43,0 kDa); anidrase carbônica (30,0 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa); e b) padrão de peptídios Pharmacia (2,512 a 16,949 kDa), contendo: globina (16,9 kDa), globina I + globina II (14,4 kDa), globina I + globina III (10,7 kDa), globina II (6,2 kDa) e globina III (2,6 kDa).

5.2.2.6. Propriedades Funcionais Hidrofilicas

5.2.2.6.1. Capacidade de absorção espontânea de água (CAA)

O método utilizado foi o empregado por Torgensen & Toledo (1977), o qual consiste em um aparelho com um funil conectado a uma pipeta graduada (figura 3.1 – Cap.3). Uma massa conhecida de amostra (100 mg) foi espalhada sobre um papel de filtro Whatman nº1, úmido, colocado no topo de funil de Büchner, com água ao nível da placa perfurada.

O ensaio foi conduzido à temperatura ambiente, sendo que as leituras de água absorvida foram feitas em intervalos de tempo, totalizando 30 minutos. O resultado foi expresso em mL de água absorvida por g de amostra.

$$CAA = \frac{\text{volume de água absorvida (mL)}}{\text{massa de amostra(g)}}$$

5.2.2.6.2. Capacidade de retenção de água (CRA)

Para essa determinação foi seguida a técnica de Regenstein et al. (1984). As dispersões tiveram os valores de pH ajustados para 6,5 com NaOH ou HCl 0,1N, e o volume aferido no final, para resultar em dispersões com 1% de proteína. Após agitação por uma hora à temperatura ambiente, alíquotas de 30 mL foram centrifugadas a 30.000g por 15 minutos à temperatura de 5°C. A seguir, o sobrenadante de cada amostra foi reservado, e determinando-se o conteúdo de proteína nos sobrenadantes. A capacidade de retenção de água foi dada pela equação:

$$CRA = \frac{\text{peso amostra hidratada} - \text{peso amostra original}}{\text{concentração de proteína na amostra}} \times 100$$

5.2.2.6.3. Solubilidade

A porcentagem de solubilidade da proteína (%SP) foi determinada de acordo com o método de Morr et al. (1985), que consiste em uma modificação do método de determinação do índice de nitrogênio solúvel. Foram estudados os efeitos da força iônica produzida por cloreto de sódio (NaCl) a diferentes concentrações (0 a 0,15M) em pH 6,5 a 25°C.

Suspendeu-se 0,5g de amostra, ajustou-se o pH com NaOH ou HCl 0,1N. As suspensões foram mantidas sob agitação constante durante uma hora, monitorando-se o pH estabelecido e, após centrifugação das suspensões, foi determinada a proteína solúvel no sobrenadante pelo método de Kjeldahl (semimicro), onde a %proteína= %nitrogênio x 6,38 (AOAC, 1990). A porcentagem de proteína solúvel foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ SP} = \frac{\text{concentração de proteína no sobrenadante (mg/mL)} \times 50}{\text{peso da amostra (mg)} \times \frac{\text{conteúdo de proteína da amostra (\%)}}{100}}$$

5.2.2.7 Propriedades de Superfície

5.2.2.7.1 Formação de Espuma

A capacidade de formação de espuma foi determinada através do método descrito por Mohanty et al. (1988). Foram preparadas dispersões dos hidrolisados a 3% de proteína em diferentes concentrações de cloreto de sódio (0,00; 0,05; e 0,15M). As dispersões foram mantidas em agitação durante 30 minutos em agitador magnético. Posteriormente, o pH das dispersões foi ajustado para 6,0 e o volume aferido para 100mL.

As suspensões foram batidas em batedeira (Black Deker), na velocidade máxima (980rpm) por um período de 5 minutos. A espuma foi imediatamente transferida para provetas (de acordo com o volume de espuma obtido) e o volume inicial de espuma (Vo) foi registrado. A porcentagem de espuma formada (CESP%) foi calculada pela equação:

$$\text{CESP \%} = \frac{\text{Vo (mL)}}{\text{Volume original da solução de proteína (mL)}} \times 100$$

5.2.2.7.2. Estabilidade da espuma

A espuma foi deixada por 5 minutos em provetas de 500 ou 1000mL (de acordo com o volume de espuma obtido) e foram medidos, simultaneamente, o volume da coluna de espuma e o volume do líquido drenado com o decorrer do tempo. A estabilidade da espuma foi avaliada pela redução percentual do seu volume em relação ao seu volume inicial, conforme descrito por Patel et al. (1988).

5.2.2.7.3. Capacidade emulsificante (CE)

É definida como a quantidade máxima de óleo que pode ser dispersa em fase aquosa para um dado procedimento experimental. Esta análise foi realizada conforme o procedimento descrito por De Kanterewicz et al. (1987), utilizando-se o homogeneizador Ultra-Turrax T-25.

Dispersões a 1% de proteína (pH 7,0) e óleo foram combinados em diferentes proporções mantendo o volume total igual a 50 mL, até encontrar o ponto onde ocorreu o colapso da emulsão, visualizada pela separação de fases e utilizando-se o corante lipossolúvel – Sudan III para facilitar essa visualização. As emulsões foram agitadas à velocidade de 9500 rpm por um tempo de três minutos, antes de se adicionar incrementos de óleo, sendo mantidas em banho de gelo para evitar o aquecimento da amostra. A capacidade de emulsificação foi expressa em mL de óleo adicionado até alcançar o ponto de inversão por g de proteína.

5.2.2.7.4 Estabilidade de emulsão (EE)

Foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Acton & Safle (1970), com algumas adaptações às condições do laboratório. As emulsões foram feitas com 50mL de óleo de soja e 50mL de dispersões de proteína a 1% (pH 7,0) foram homogeneizadas a 9500 rpm em homogeneizador Ultra-Turrax T-25, por

três minutos em banho de gelo. Alíquotas de 10mL foram colocadas em tubos de ensaio e deixadas por 24 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Foi determinada a umidade da emulsão recém preparada. Após 24 horas a 37°C , removeu-se com pipeta, 5mL da amostra do fundo do tubo e foi determinada a umidade.

A razão estabilidade para cada amostra foi determinada com base na alteração da porcentagem de umidade (água), retirada na emulsão após 24 horas, onde U representa a umidade.

$$\text{EE (\%)} = \frac{100 - U_{24h}}{100 - U_{\text{inicial}}} \times 100$$

5.2.2.8. Análise Estatística

Todos os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (Gomes, 1982), utilizando-se o programa “Statística: Basic Statistics and Tables”.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Obtenção dos hidrolisados e determinação do grau de hidrólise (GH).

A enzima Flavourzyme[®] (Novo Nordisk), obtida através do fungo *Aspergillus oryzae* é uma preparação composta de uma mistura de proteases aspárticas, metaloproteases e carboxipeptidase (Nielsen & Olsen, 2002). É uma enzima termolábil, pois é possível inativá-la ao término da hidrólise (10 min, a 75°C), tendo como característica a formação de flavor.

Na figura 5.2 está apresentado o grau de hidrólise em função do tempo. Observa-se a influência da concentração enzima/substrato ($[E]:[S]$) sobre a velocidade da reação. Verificou-se que quanto menor a relação $[E]:[S]$ maior a velocidade da reação e conseqüentemente maior o grau de hidrólise. Observa-se que no tempo de 20 minutos o grau de GH está próximo a 5 e 18%, respectivamente para $[E]:[S]= 1:30$ e $1:9$. Segundo Kilara (1985), o tempo necessário para atingir o grau de hidrólise é inversamente proporcional à relação enzima/substrato.

Pode também ser analisado na figura 5.2 que o perfil típico da curva de reação enzimática não foi verificado, fato este que pode ser atribuído ao não ajuste do pH. O pH final médio da reação determinado no tempo de 50 min foi 6,65 e 6,41, respectivamente para $[E]/[S]=1:30$ e $[E]/[S]=1:9$.

No decorrer do processo de hidrólise ocorre a formação de grupos carboxílicos terminais, que contribuem para o abaixamento do pH, e conseqüentemente aumentando a atividade da enzima.

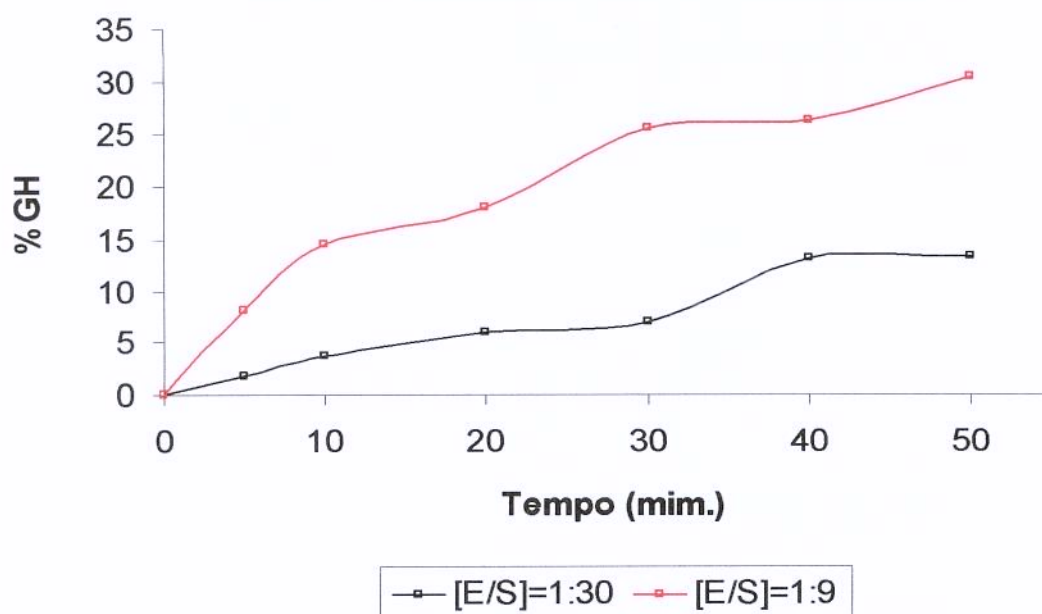


FIGURA 5.2 – Representação gráfica da influência da relação [enzima]/[substrato] sobre a hidrólise enzimática do coágulo de caseína. Condições de hidrólise: [S]=8% proteína; enzima Flavorzyme 500L; T=38°C; pH inicial= 7,0, sem ajuste do pH durante a reação; volume de reação=200mL.

A escolha do grau de hidrólise em função da solubilidade foi calculada nos pré-testes realizados e observou-se que quanto maior o grau de hidrólise maior foi a solubilidade da proteína.

Segundo Panyam & Kilara (1996), uma das principais consequências da hidrólise enzimática é o aumento da solubilidade e, normalmente este aumento está associado ao aumento do grau de hidrólise. O aumento da solubilidade dos hidrolisados é provavelmente devido à diminuição do tamanho da molécula e correspondente do aumento da exposição de grupos amino e carboxil ionizáveis.

Na tabela 5.1 estão demonstrados os valores obtidos na determinação do grau de hidrólise através dos métodos do TNBS e do TCA. Observa-se que o grau de hidrólise determinado através do TCA foi superior ao determinado pelo TNBS, pois o método do TCA representa apenas uma aproximação do grau de hidrólise. Neste estudo os valores que serão adotados correspondem ao GH determinado através da reação do TNBS.

TABELA 5.1 – Determinação do grau de hidrólise por diferentes métodos, dos produtos obtidos a partir do coágulo de caseína.

TNBS (GH%)	TCA (GH%)
5,7	12,9
12,8	19,8
20,1	28,0
35,8	43,7

5.3.2. Composição dos Hidrolisados

Na tabela 5.2 estão mostrados os resultados obtidos da composição de proteínas, umidade e cinzas dos hidrolisados com diferentes graus de hidrólise, comparados à do concentrado que lhes deu origem. Apesar de proveniente de uma mesma matéria-prima os hidrolisados não apresentaram idêntica composição. Estes mesmos resultados foram encontrados por Cândido (1998), que estudou a obtenção de concentrados e hidrolisados de Tilápia do Nilo.

TABELA 5.2 Composição dos hidrolisados comparados ao coágulo de caseína (COC), quanto ao teor de proteína, umidade e cinzas.

Amostras	Proteína*	Umidade	Cinzas*
COC	72,36±1,55 ^a	4,26±0,31 ^d	9,33±0,09 ^a
GH 5,7%	69,71±0,29 ^b	5,51±0,34 ^c	9,27±0,03 ^a
GH 12,8%	69,21±0,35 ^b	7,64±0,58 ^b	9,30±0,13 ^a
GH 35,8%	66,53±0,66 ^c	9,22±0,28 ^a	8,90±0,24 ^a
GH 20,1%	70,31±0,98 ^b	8,29±0,14 ^{ab}	9,51±0,02 ^a

* resultados expressos em base seca para proteína e cinzas.

Resultados obtidos de 3 determinações, média ± desvio padrão. Média seguidas por uma mesma letra minúscula (coluna) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Observa-se que os teores de proteína do concentrado são significativamente superior a de seus hidrolisados. Os teores de umidade foram variáveis e diferiram entre as amostras estudadas. Não houve diferenças significativas entre os teores de cinzas nos materiais estudados.

5.3.3. Eletroforese

Na figura 5.3 está mostrado o perfil eletroforético dos diferentes hidrolisados e do concentrado não hidrolisados: a) SDS-PAGE com gel de 4% de concentração (C) e 12% de separação (S) e b) SDS- PAGE com gradiente de concentração 10-16%.

Observa-se que à medida que aumenta o grau de hidrólise de 5,7 para 35,8% (linhas 1-5), ocorre uma aparente diminuição das frações de α e β -caseína, sendo bastante visíveis as alterações nos hidrolisados de maior grau de hidrólise (linhas 4 e 5) e um conseqüente aumento de bandas de menor peso molecular, inferiores a 20 kDa.

Após a hidrólise do coágulo de caseína com a enzima Flavourzyme observa-se nos hidrolisados bandas de 16,9, 14,4 e 10,7 kDa bem definidas. E no hidrolisado de maior grau de hidrólise (35,8%) verifica-se quase o desaparecimento das bandas de α e β -caseína (linha 5).

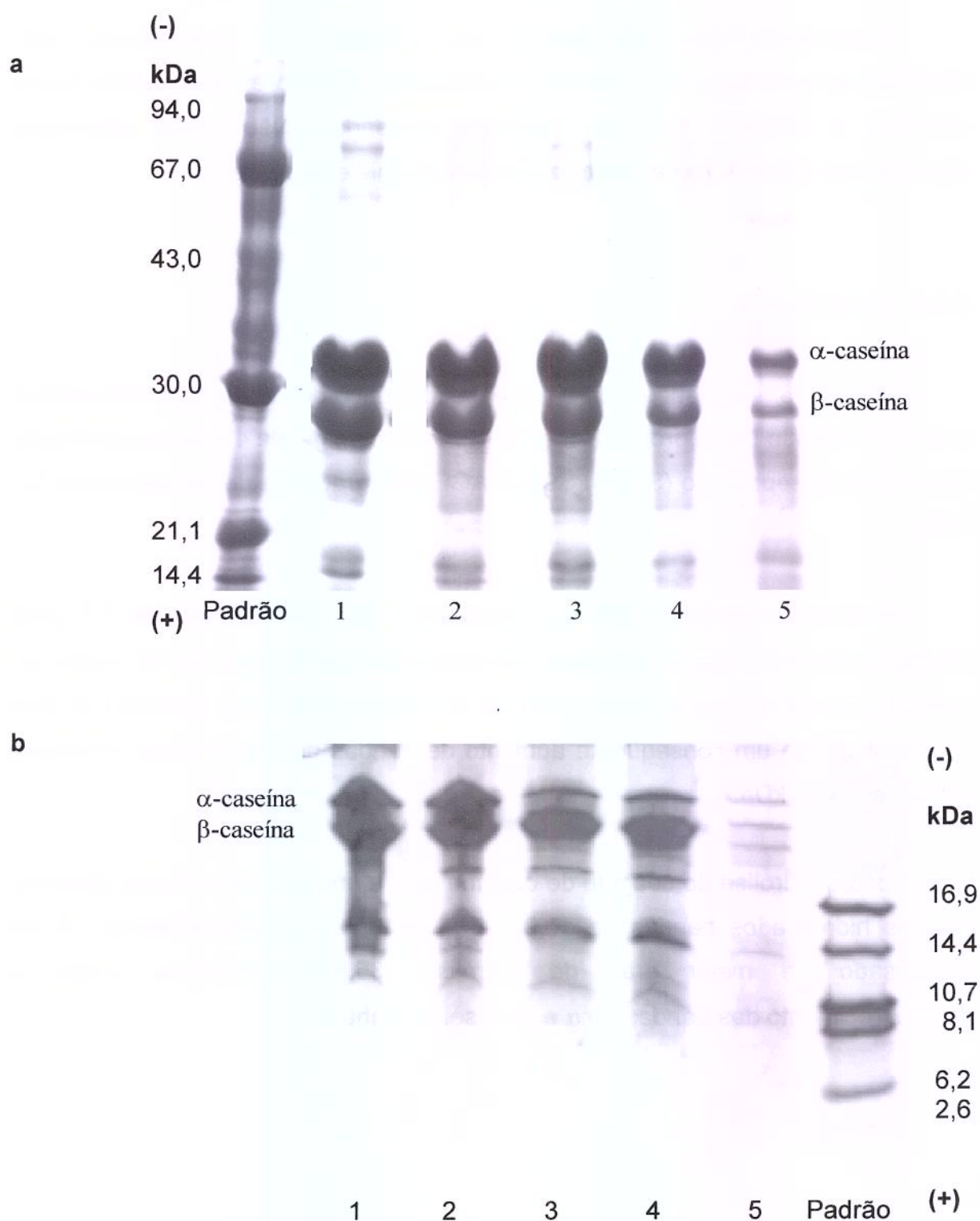


FIGURA 5.3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida dos concentrados de caseína
 a) SDS-PAGE C4% e S 12% (gel de poliacrilamida a 12% no gel de separação) e
 b) SDS-PAGE com gradiente 10-16%. Padrão (Pharmacia), (1) coágulo de caseína, (2) GH 5,7%, (3) GH 12,8%, (4) GH 20,1% e (5) GH 35,8%.

5.3.4. Propriedades Hidrofílicas

As propriedades hidrofílicas como capacidade de absorção espontânea de água (CAA), capacidade de retenção de água (CRA) e solubilidade da proteína (SP) foram estudadas nos quatro hidrolisados obtidos, comparativamente ao concentrado que lhes deu origem.

5.3.4.1. Capacidade de Absorção Espontânea de Água (CAA)

Na figura 5.4 estão ilustrados os dados obtidos na determinação da capacidade de absorção espontânea de água em função do tempo (30 min.). Verifica-se que os hidrolisados GH 5,7 e 12,8% tiveram um aumento da hidroflicidade superficial uma vez que a CAA é superior à do concentrado (COC). Segundo Panyam & Kilara (1996), a hidrólise altera a conformação da proteína e produz peptídios de cadeia curta, aumentando a disponibilidade de sítios polares, concorrendo para uma maior absorção de água.

Observa-se na figura 5.4 que na amostra não hidrolisada (COC) a CAA foi superior aos hidrolisados com GH 35,8 e 20,1%, porém inferior aos graus de hidrólise 5,7 e 12,8%. O que pode ter acontecido é que nos graus de hidrólise mais extensivos (20,1 e 35,8%) ocorreu uma maior exposição dos grupos hidrofóbicos na superfície diminuindo a CAA das amostras, além de maior ruptura da rede protéica, em função da proteólise. Segundo Nielsen (1997) a hidrólise extensiva das ligações peptídicas causam mudanças na estrutura das proteínas e maior exposição dos grupos hidrofóbicos.

5.3.4.2. Capacidade de Retenção de Água (CRA)

A figura 5.5 ilustra a CRA nos diferentes hidrolisados obtidos a partir do coágulo de caseína em pH 6,5.

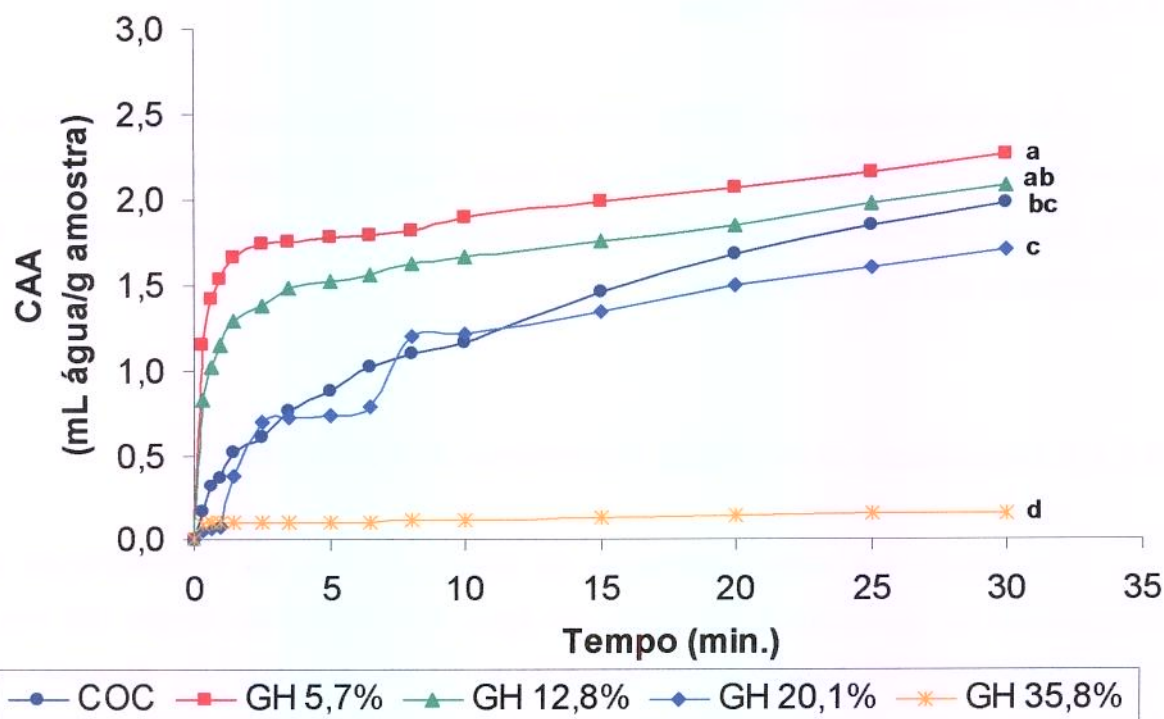


FIGURA 5.4 - Representação gráfica da capacidade de absorção espontânea de água (CAA) em função do tempo para o coágulo de caseína (COC) e seus hidrolisados. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas na CAA após 30 min.

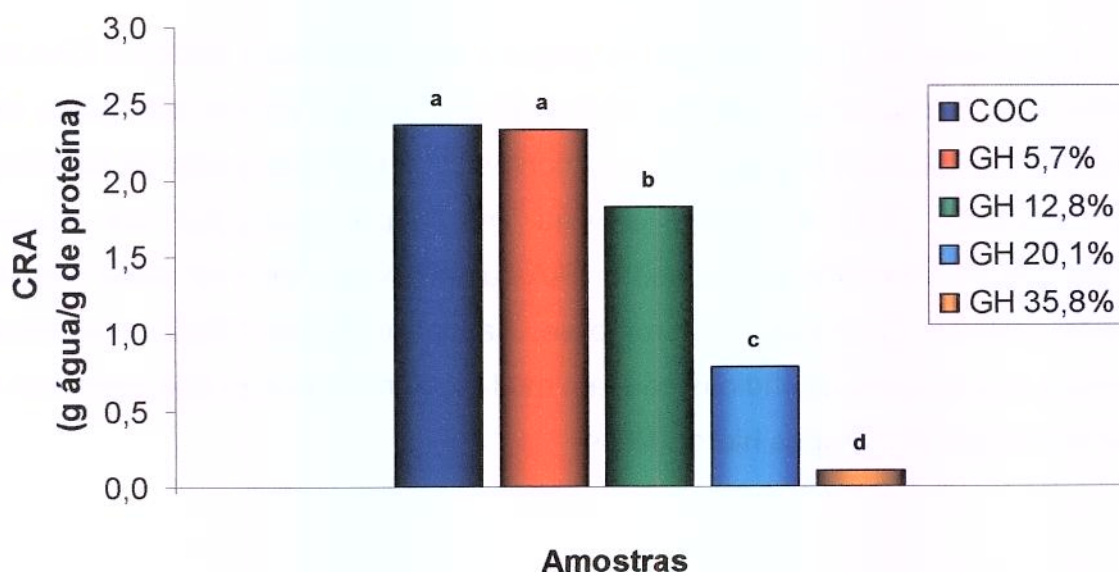


FIGURA 5.5 – Representação gráfica da capacidade de retenção de água (CRA) para o coágulo de caseína (COC) e seus hidrolisados GH respectivamente 5,7; 12,8; 20,1 e 35,8%. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas na CRA em pH 6,5 ($p < 0,05$).

Segundo Pilosof (2000), a absorção de água indica a capacidade de um material de absorver a água em sua estrutura de uma forma espontânea quando em contato com a água através de uma superfície que se mantém úmida por imersão. Sendo que, a retenção de água indica a capacidade de um material hidratado para reter água frente à ação de uma força externa de gravidade, centrifugação ou compressão dos alimentos.

Segundo Kinsella (1984), a quantidade de água associada à proteína depende de uma série de fatores, como a sua composição, conformação, número de grupos polares expostos, presença de sais, pH, etc.

A CAA está relacionada com a superfície da proteína. Como os hidrolisados de maior grau são mais hidrofóbicos, menor será a CAA. No entanto, a CRA está relacionada com a água ligada no interior da molécula; com a hidrólise a molécula fica mais “aberta” e conseqüentemente menor será a capacidade de retenção de água.

Observa-se que a capacidade de reter água diminuiu com o aumento do grau de hidrólise. Não houve diferenças significativas entre os hidrolisados com GH 12,8; 20,1 e 35,8% que tiveram valores de CRA significativamente inferiores quando comparados ao hidrolisado com GH 5,7% e com o coágulo (não hidrolisado).

5.3.4.3. Solubilidade Protéica (%SP)

A solubilidade depende do GH e de características físico-químicas resultantes dos peptídios e conseqüentemente da localização das ligações peptídicas hidrolisadas (Chobert, 1996). Segundo Nielsen (1997), a solubilidade da proteína aumenta com o aumento do GH e isto é principalmente ocasionado por uma redução do peso molecular e um aumento dos grupos polares expostos.

A figura 5.6 ilustra os resultados da solubilidade em pH 6,5, em temperatura ambiente, nas diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl). Observa-se que quanto maior o grau de hidrólise maior a solubilidade dos materiais. O efeito das diferentes concentrações salinas sobre os hidrolisados obtidos do coágulo de caseína também pode ser observado.

A solubilidade do COC (não hidrolisado), e dos hidrolisados com GH 5,7; 12,8 e 20,1% em solução aquosa foram inferiores à solubilidade em concentração 0,05M de cloreto de sódio. Nas concentrações de 0,10 e 0,15M, somente o hidrolisado de GH 5,7% apresentou diferenças significativas de solubilidade, sendo a solubilidade em 0,15M de cloreto de sódio superior. A maior solubilidade foi conseguida com o GH 35,8%, não havendo diferenças significativas nas concentrações salinas estudadas (0,00; 0,05; 0,10 e 0,15M).

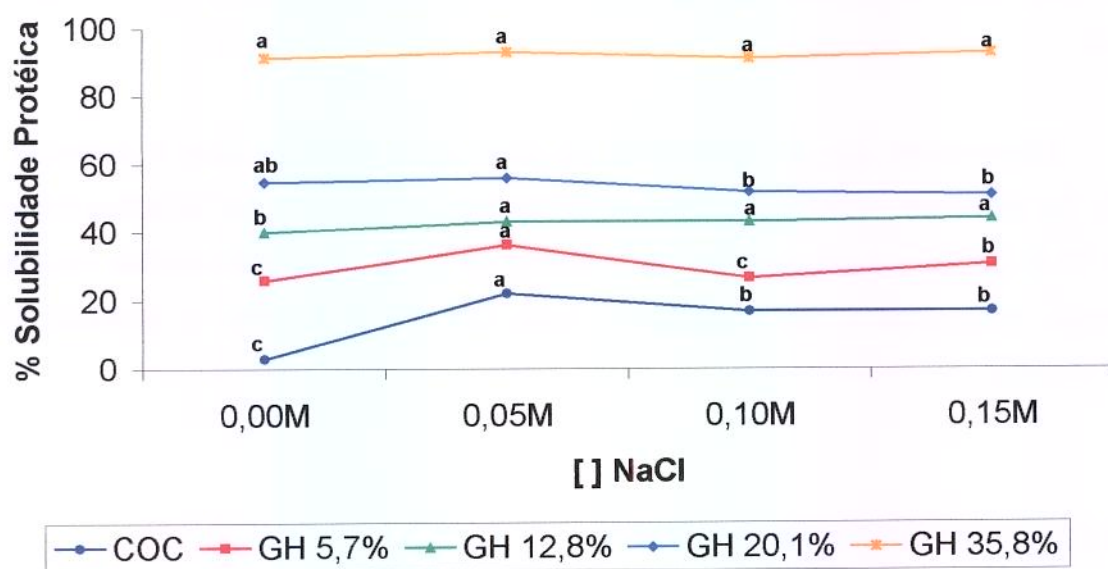


FIGURA 5.6 - Representação do perfil de solubilidade do coágulo de caseína (COC) e seus hidrolisados em pH 6,5 e a 25°C. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas na solubilidade nas diferentes concentrações de cloreto de sódio (0,00; 0,05; 0,10 e 0,15M).

5.3.5. Propriedades de Superfície

5.3.5.1. Propriedades Espumantes

A formação e estabilidade da espuma em sistema protéico é dependente de uma série de fatores. Segundo vários autores citados por Kinsella et al. (1989), o ideal para que uma proteína obtenha os melhores resultados em formação e estabilidade da espuma, é que possua peso molecular maior que 20kDa, carga líquida mínima, presença de sítios de ligação hidrofóbicos, além da conformação flexível.

A figura 5.7 mostra o efeito do GH sobre a capacidade de formação de espuma dos hidrolisados do coágulo de caseína. O coágulo original não formou espuma, bem como o hidrolisado GH (35,8%).

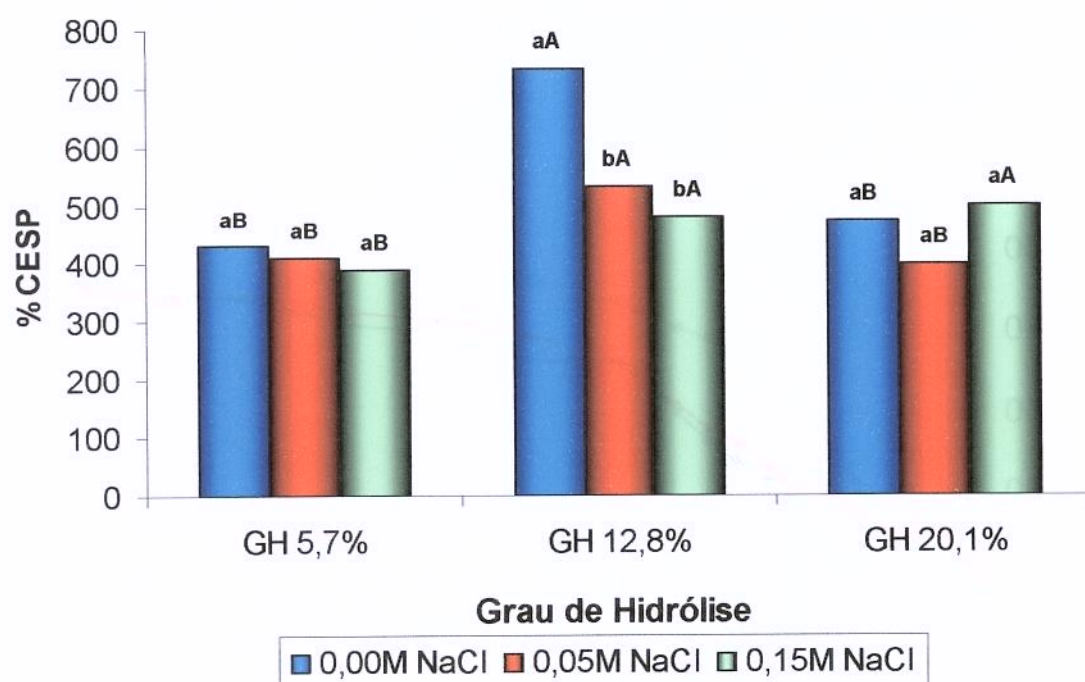


FIGURA 5.7 - Representação gráfica da capacidade de expansão de espuma (%CESP) para os três diferentes hidrolisados do coágulo de caseína em pH 6,0 e em função de diferentes concentrações de cloreto de sódio. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística a 5% de probabilidade. Letras minúsculas se referem a cada hidrolisado nas diferentes concentrações salinas e as maiúsculas para diferentes hidrolisados na mesma concentração de sal.

Observa-se que a maior expansão de espuma foi conseguida com o hidrolisado com GH 12,8% em ausência de NaCl e que a concentração salina influenciou significativamente a expansão de espuma somente neste hidrolisado, pois nos demais não houve diferenças significativas.

Não somente fatores relacionados com o GH podem influir no desempenho das propriedades de espuma, mas também o pH e outros aspectos relacionados à composição dos hidrolisados em questão (Furtado et al., 2001). A massa molecular é importante, pois os peptídeos de elevada massa molecular exercem ação inibidora sobre as características espumantes dos peptídeos de baixo peso molecular (Mulilangi, et al., 1996), que tende a desestabilizar a espuma (Nielsen, 1997).

A cinética de desestabilização da espuma em pH 6,0 em função do tempo está representada nas figuras 5.8, 5.9 e 5.10; respectivamente para os hidrolisados com GH 5,7; 12,8 e 20,1%.

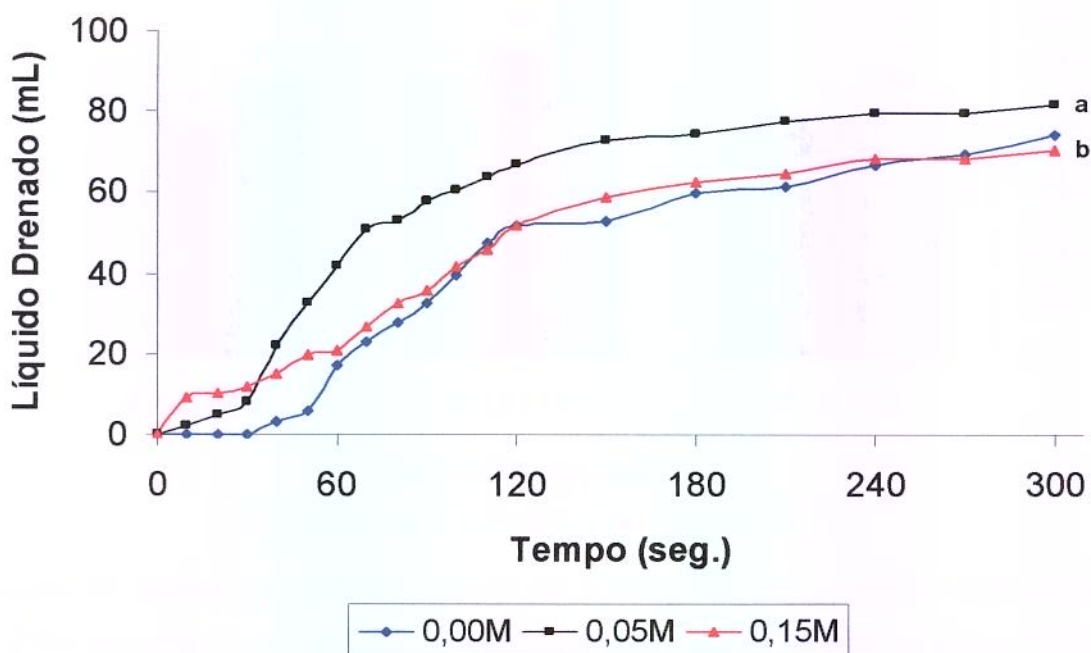


FIGURA 5.8 - Representação gráfica da estabilidade da espuma do hidrolisado com GH 5,7% em função da concentração de NaCl em pH 6,0. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas do líquido drenado após 5 min (300 seg).

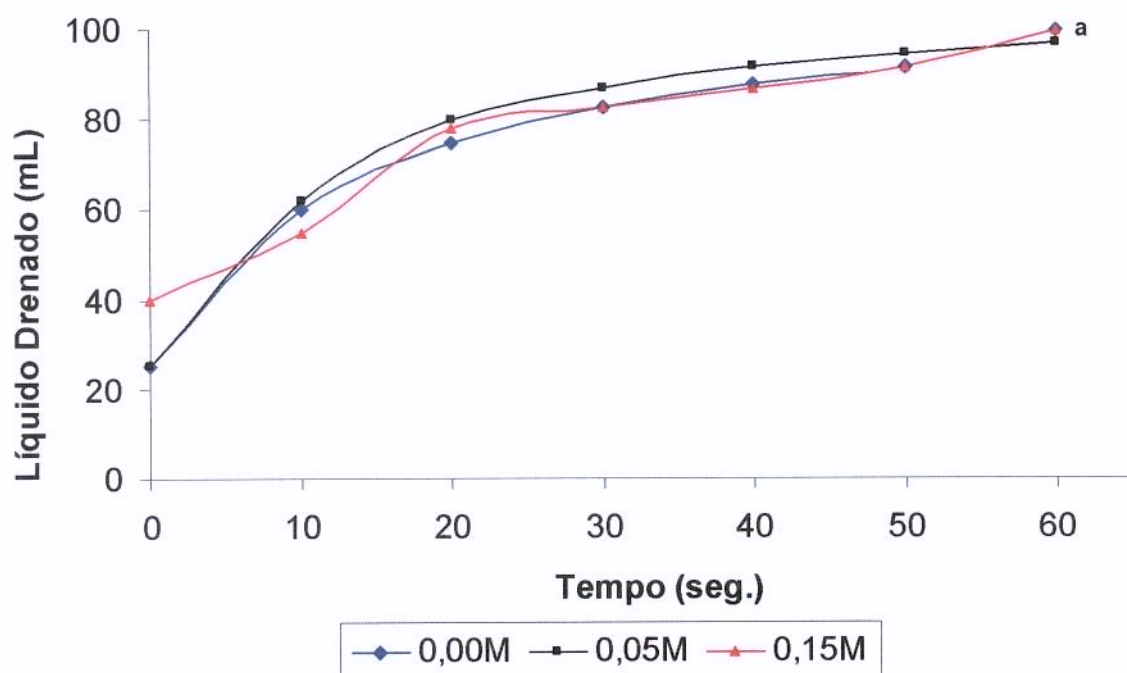


FIGURA 5.9 - Representação gráfica da estabilidade da espuma do hidrolisado com GH 12,8% em função da concentração de NaCl e em pH 6,0. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas na estabilidade da espuma após 60 seg.

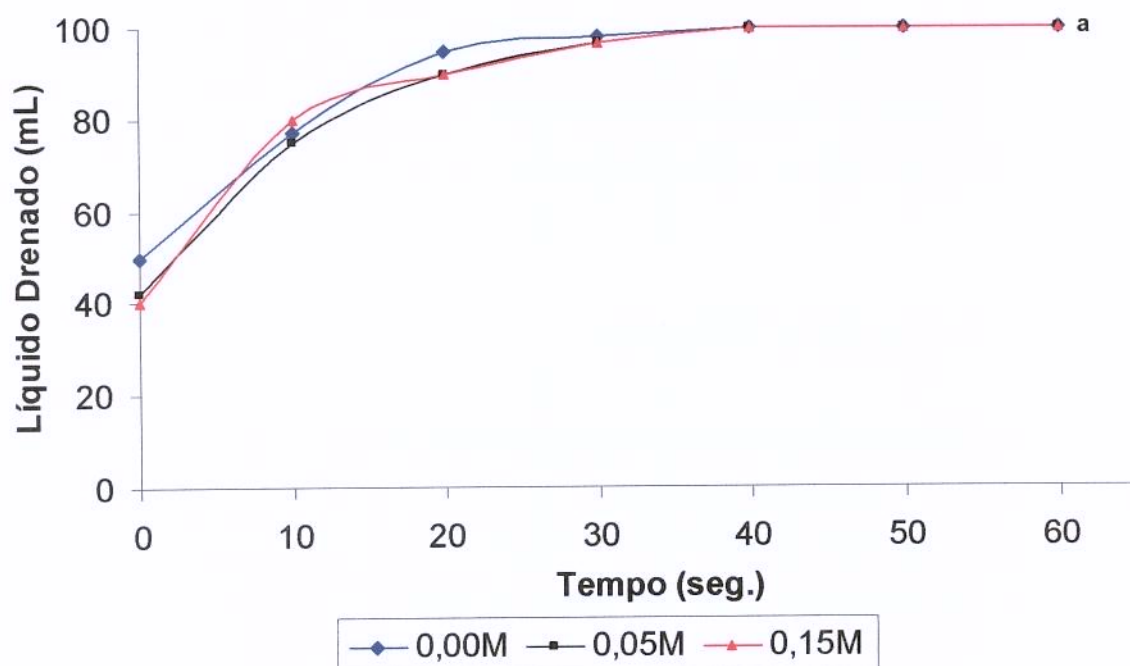


FIGURA 5.10 - Representação gráfica da estabilidade da espuma do hidrolisado GH 20,1% em função da concentração de NaCl e em pH 6,0. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas na estabilidade da espuma após 60 seg.

Observa-se que a estabilidade da espuma do hidrolisado com menor grau de hidrólise foi bem superior (300 seg.) aos hidrolisados com GH 12,8 e 20,10% (60 seg.), respectivamente representados nas figuras 5.9 e 5.10.

Na figura 5.8 pode-se observar que a estabilidade da espuma foi maior em solução aquosa e em solução de 0,15M as quais não diferiram estatisticamente. Na concentração de 0,05M de cloreto de sódio a estabilidade foi menor, fato este que pode ser justificado, pois a solubilidade nesta concentração, ilustrada na figura 5.5, é significativamente superior a das demais concentrações salinas.

Verificou-se também que nos hidrolisados com menor estabilidade (GH 12,8 e 20,1% que não houve diferenças significativas entre as concentrações salinas estudadas, sendo que o hidrolisado com 12,8% de grau de hidrólise foi mais estável que o de 20,1% confirmando que quanto maior o grau de hidrólise menor a estabilidade da espuma.

A estabilidade da espuma diminui e a capacidade de formação de espuma aumenta com o aumento do grau de hidrólise. Isto sugere que as propriedades moleculares afetam a capacidade de formação e a estabilidade de espuma dos hidrolisados atuam de forma diferente (Nielsen, 1997).

5.3.5.2. Propriedades Emulsificantes

A hidrólise parcial das proteínas geralmente aumenta o número de grupos polares e hidrofílicos, diminui o peso molecular, altera a estrutura globular das proteínas podendo expor maior número de grupos hidrofóbicos. Estas alterações podem afetar as propriedades emulsificantes (Nielsen, 1997).

De acordo com Panyam e Kilara (1996), a atividade emulsificante da caseína diminui linearmente com o aumento do grau de hidrólise. Peptídeos maiores promovem maior estabilidade da emulsão, ao passo que a presença de

peptídeos menores prejudica a estabilidade. A hidrólise extensiva das proteínas resulta em uma drástica perda das propriedades emulsificantes.

A tabela 5.3 mostra os resultados obtidos para a capacidade de formação e de estabilidade da emulsão do hidrolisado com 5,7% de grau de hidrólise comparado ao do concentrado que lhe deu origem (coágulo de caseína). Dos hidrolisados produzidos, somente o de menor grau de hidrólise apresentou propriedade emulsificante, pois as “emulsões” dos demais hidrolisados eram desestabilizadas antes mesmo da homogeneização do material (batimento de 3 min.).

TABELA 5.3 - Resultados obtidos para capacidade emulsificante (CE) e estabilidade da emulsão (EE) para o coágulo de caseína (COC) e o hidrolisado com GH 5,7%.

Amostras	CE (mL de óleo/g proteína)	EE (%)
COC	129,21±3,20 ^a	55,52±1,27 ^b
GH 5,7%	134,91±5,78 ^a	83,63±2,03 ^a

Resultados de 3 determinações, média ± desvio padrão. Médias seguidas por uma mesma letra minúscula (coluna) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Segundo Furtado et al. (2001), pouca ou nenhuma estabilidade das emulsões da grande maioria dos hidrolisados desidratados foi observada, independente de sua origem (tipo de proteína) ou do pH em que foi analisado. Segundo Choubert (1996), a estabilidade da emulsão destes hidrolisados é mais baixa que a do controle (não hidrolisado). Uma das razões para isto é que os peptídios produzidos não são anfipáticos o suficiente para aumentar a estabilidade da emulsão.

As propriedades emulsificantes das proteínas também dependem da solubilidade inicial. Quanto mais solúvel a proteína estiver no sistema da emulsão, mais efetiva poderá ser a interface entre a fase óleo e a fase contínua durante a

emulsificação (Qi et al., 1997). No entanto, a formação de um filme interfacial coeso por adsorção de moléculas de proteína na interface pode ser limitado pela predominância de pequenos peptídios. Esta pode ser uma razão da diminuição da estabilidade (Kinsella, 1984).

Mahmoud et al. (1992) reportaram que a atividade emulsificante da caseína diminui com o aumento do grau de hidrólise de 25-67% com pancreatina suína. Observa-se na figura 5.11 que não houve diferenças estatísticas significativas da capacidade emulsificante entre o hidrolisado e o concentrado. No entanto, a estabilidade da emulsão do hidrolisado com GH 5,7% foi significativamente superior à do concentrado de caseína.

5.4. CONCLUSÕES

Verificou-se no presente estudo que as propriedades funcionais da caseína coagulada são diferentes dos de seus hidrolisados. O grau de hidrólise influenciou as propriedades hidrolíticas e de superfície da caseína obtida por coagulação enzimática.

Observou-se que à medida que aumentou o grau de hidrólise, ocorreu uma diminuição visível das frações de α , e β -caseína e um aumento de peptídios de menor peso molecular.

A maior capacidade de absorção de água foi do hidrolisado com 5,7 e 12,8% de grau de hidrólise, que não mostraram diferenças significativas. Hidrólises mais extensivas tiveram valores de absorção de água inferiores aos do coágulo de caseína.

A solubilidade aumentou proporcionalmente ao GH. O hidrolisado com 5,7% de grau de hidrólise apresentou a maior CRA que não diferiu estatisticamente do COC, sendo estes significativamente superiores aos demais hidrolisados.

A maior expansão de espuma foi conseguida com o grau de hidrólise de 12,8% e a maior estabilidade de espuma foi observada no hidrolisado com GH 5,7%. O hidrolisado de maior grau de hidrólise, GH 35,8%, não apresentou propriedades funcionais de superfície, nas condições estudadas.

Propriedades emulsificantes foram verificadas apenas no hidrolisado com 5,7% GH, que não diferiu do COC quanto à capacidade emulsificante tendo porém formado emulsão mais estável que o coágulo.

5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACTON, J.C.; SAFFLE, R.L. Stability of oil-in-water emulsions. 1- Effect of surface tension, level of oil, viscosity and type of meat protein. **Journal of Food Science**. Chicago, v.35, n.1, p.852-855, 1970.
- ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. Washington, v.27, n.6, p.1256-1262, 1979.
- ADLER-NISSEN, J. Enzymic hydrolysis of food proteins. London: Elsevier Applied Science, 426 p., 1986.
- A.O.A.C. Association of official Analytical Chemists – Official Methods of Analysis, W. Horwitz (ed.), 15th edition, Washington, D.C., 1990.
- CÂNDIDO, L. M. B. Obtenção de concentrados e hidrolisados protéicos de tilápia do Nilo (*Oreochromus niloticus*): composição, propriedades nutritivas e funcionais. 207p. Tese (Doutor em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas -UNICAMP, 1998.
- CHOBERT, J.M.; BRIAND, L.; GUÉGUEN, J.; POPINEAU, Y.; LARRÉ, C.; HAERTLÉ, T. Recent advances in enzymatic modifications of food proteins for improving their functionality. **Nahrung**. Berlin, v.40, n.4, p.177-182, 1996.
- DE KANTEREWICZ, R.J.; ELIZALDE, B.E.; PILOSOFF, A.M.R.; BARTHOLOMAI, G.B. Water-oil absorption index (WOAI): a simple method for predicting the emulsifying capacity of food proteins. **Journal of Food Science**. Chicago, v.52, n.5, p.1381-1383, 1987.
- FURTADO, M.A.M.; GOMES, J.C.; SILVA, C.A.S.; ORNELLAS, C.B.; SILVESTRE, M.P.C. Propriedades funcionais de hidrolisados de proteína latices co-precipitada. **Ciência Agrotécnica**. Lavras, v.25, n.3., p.625-639, 2001.

- GOMES, F.P. Curso de estatística experimental. 10 ed., São Paulo: Nobel, 430p., 1982.
- KILARA, A. Enzyme-modified protein foods ingredients. **Process Biochemistry**. Rickmansworth, v.23, n.5, p.149-157, 1985.
- KIM, S.Y.; PARK, P.S.W.; RHEE, K.C. Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. **Journal Agriculture Food Chemistry**. Washington, v.38, p.651-656, 1990.
- KILARA, A. Enzyme-modified protein foods ingredients. **Process Biochemistry**. Wattford, v.20, n.5, p.149-157, 1985.
- KINSELLA, J.E. Milk proteins: physic-chemical and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. Cleveland, v.21, p.197-262, 1984.
- KINSELA, J.E.; WHITEHEAD, D.M.; BRADY, J.; BRINGE, N.A. Milk proteins: possible relationship of structure and function. In: "Developementes in Dairy Chemistry - 4". Functional Milk proteins. (ed. P.F. Fox), London: Elsevier Apllied Sience, p.55-95, 1989.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. London, v.227, n.15, p.680-685, 1970.
- MAHMOUD, M.I.; MALONE, W.T.; CORDLE, C.T. Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. **Journal of Food Science**. Chicago, v.57, n.5, p.1223-1229, 1992.
- MOHANTY, B. MULVIHILL, D.M.; FOX, P.F. Emulsifying and foaming properties of acidic caseins and sodium caseinate. **Food Chemistry**. Barking, v.28, n.1, p.17-30, 1988.
- MORR, C. V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J.E.; REGENSTEIN, J.P.; BUREN, V.; KILARA, A.; LEWIS, B.A.; MANGINO, M.E. Collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**. Chicago, v.50, n.6, p.1715-1718, 1985.

- MUTILANGI, W.A.M., PANYAM, D.; KILARA, A. Functional properties of hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey protein isolate. **Journal of Food Science**. Chicago, v.61, n.2, p.270-303, 1996.
- NIELSEN, P.M. Functionality of protein hydrolyses. In: Food proteins and their applications. Srinivasan Damodaram and Alain Paraf (eds). New York: Marcel Dekker, INC, Cap. 15, p.443-472, 1997.
- NIELSEN, P.M.; OLSEN, H.S. Enzymic modification of food protein. In: "Enzymes in food technology". Robert J. Whitehurst and Barry A. Law (eds.) Sheffield Academic Press, Cap. 6, 109-143, 2002.
- ORTIZ, S.E.M.; WAGNER, J.R. Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: structural characteristics, solubility and foaming properties. **Food Research International**. Essex, v.35, p.511-518, 2002.
- PATEL, P.D.; STRIPP, A.M.; FRY, J.C. Whipping test for the determination of foaming capacity of protein: a collaborative study. **International Journal of Food Science and Technology**. London, v.23, n.1, p.57-63, 1988.
- PANYAM, D., KILARA, A. Enchanting the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in Food Science & Technology**. Cambridge, v.7, n.4, p.120-125, 1996.
- PILOSOFF, A.M.R. Propriedades de Hidratación.. In: "Caracterización funcional y estructural de proteínas". Ed. Pilosoff, A.M.R & Bartholomai G. B. Buenos Aires: Aeudeba, 2000. Cap.1, p.17-28, 2000.
- Qi, M.; HETTIARACHCHY, N.S.; KALAPATHY, U. Solubility and emulsifying properties of soy proteins isolates modified by pancreatin. **Journal of Food Science**. Chicago, v.62, n.6, p.1110-1115, 1997.
- REGENSTEIN, J.M.; JAUREGUI, C.A.; BAKER, R. The effect of pH, phosphates and different salts on water retention properties of ground trout muscles. **Journal of Food Biochemistry**. Trumbull, v.8, n.2, p.123-131, 1984.

SCHÄGGER, H.; JAGOW, G.V. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of protein in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**. New York, v.166, p.368-379, 1987.

TORGENSEN, H.; TOLEDO, R.T. Physical properties of protein preparation related to their functional characteristics in comminuted meat systems. **Journal of Food Science**. Chicago, v.42, n.6, p.1615-1620; 1645, 1977.

TURGEON, S.L.; GAUTHIER, S.F.; PAQUIN, P. Emulsifying property of whey peptide fractions as a function of pH and ionic strength. **Journal of Food Science**. Chicago, v.57, n.3, p.601-604, 1992.

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos no decorrer desta pesquisa conduziram às seguintes conclusões:

1) Os concentrados de caseína são de elevado valor nutritivo, pois atendem os requisitos determinados pela FAO/WHO quanto ao padrão de aminoácidos essenciais e diferem em relação às suas propriedades funcionais;

2) A caseína micelar apresentou solubilidade, absorção, retenção de água e estabilidade da espuma superiores aos demais concentrados. A caseína comercial mostrou-se superior quanto à capacidade de formação de espuma e as propriedades emulsificantes;

3) O coágulo de caseína apresentou solubilidade inferior a 20% e não apresentou bons resultados quanto às propriedades funcionais, porém, quando hidrolisado (GH 5,7; 12,3; 20,1 e 35,8%) observou-se que, quanto maior o grau de hidrólise maior a solubilidade da proteína e menor a capacidade de retenção de água;

4) A hidrólise enzimática (GH 5,7, 12,8 e 20,1%) proporcionou melhora na capacidade de formação de espuma, no entanto com o aumento do GH houve uma diminuição da estabilidade da espuma formada. O hidrolisado com GH 35,8% não apresentou propriedades de superfície. A estabilidade da emulsão foi melhorada somente com GH 5,7%, uma vez que os demais hidrolisados não apresentaram propriedades emulsificantes.