

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Industrialização de produtos lácteos

EFEITO DA TEMPERATURA NO PERFIL PROTÉICO DE AMOSTRAS DE LEITE ULTRACENTRIFUGADAS

¹Fabiano Freire Costa

²Maria Aparecida Vasconcelos Paiva e Brito

²Humberto de Melo Brandão

²Marta Fonseca Martins Guimarães

³Isabela Fonseca

⁴Saulo Ribeiro da Silva

RESUMO

O presente trabalho objetivou avaliar o efeito da temperatura no perfil protéico de amostras de leite ultracentrifugadas nas temperaturas de 4°C e 20°C. Amostras de leite de três animais, após armazenamento durante 24 horas em refrigerador convencional (4°C) foram ultracentrifugados (40.000 x g) a 4°C e a 20°C respectivamente, por 60 minutos, utilizando ultracentrífuga refrigerada (Sorvall Centrifuges acoplada ao rotor A-841, USA). Após ultracentrifugação, o sobrenadante foi retirado e analisado pela técnica de eletroforese capilar utilizando o equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies GmbH, Waldbronn Germany), empregando kit específico para determinação protéica (Protein 230 LabChip kit). Os resultados mostraram que existe variação no perfil protéico das amostras de acordo com a temperatura da ultracentrifugação. As amostras ultracentrifugadas na temperatura de 4°C apresentaram quantidades superiores de proteínas no sobrenadante em comparação com as amostras submetidas a 20°C. Estes resultados contribuem para o entendimento dos mecanismos que envolvem o fenômeno de coagulação do leite e sua variação em função da temperatura.

Palavras chave: proteínas, leite, temperatura, eletroforese.

INTRODUÇÃO

O leite é composto principalmente por lipídios, proteínas, lactose, cinzas e sólidos totais. As proteínas representam cerca de 3,5% da matéria total do leite variando de acordo com a raça, nutrição, estágio de lactação e estações do ano (Holt, 1997). No leite as proteínas se dividem em caseínas e soroproteínas. As caseínas representam cerca de 80% das proteínas totais. Elas são constituídas pela α_{s1} , α_{s2} , β e κ -caseína, e formam uma estrutura supramolecular conhecida como micelas, cuja estrutura vem sendo estudada extensivamente (Dalgleish & Morris, 1988). As proteínas do soro são compostas principalmente pela α -lactoalbumina e a β -lactoglobulina. Muitas das propriedades dos produtos lácteos e, em geral, a existência destes, dependem principalmente das propriedades físico-químicas dos componentes protéicos, dos lipídeos e dos sais minerais. Mudanças na solubilidade das proteínas ocasionadas pela variação dos níveis de cálcio, temperatura e pH são estudadas no intuito de entender mais sobre o comportamento destas em solução (Fox & McSweeney, 1998).

Na América Latina, o teste de estabilidade ao etanol ainda é utilizado na qualificação do leite para o processamento industrial, considerando-o como indicação da estabilidade

¹ Bolsista de Pós-Doutoramento Capes: e-mail: fafreosta@bol.com.br

² Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite: Rua Eugênio do Nascimento nº 610 Bairro Dom Bosco, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. CE: 36038-330 Tel: 55 32 32494885 Fax: 55 32 3249 4701

³ Bolsista da FAPEMIG BAT II

⁴ Aluno do curso de Farmácia Bioquímica da UFJF e bolsista do CNPQ na Embrapa Gado de Leite

térmica. Este teste se baseia na capacidade das proteínas do leite coagularem ou não, a uma determinada concentração alcoólica. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através da Instrução Normativa nº 51, regulamenta a concentração alcoólica mínima de 72% (v/v) para o controle diário do leite cru refrigerado na propriedade rural. Entretanto, diversas indústrias, no intuito de garantir que o leite esteja em condições ideais ao processamento térmico, mesmo com ausência de comprovação que mostre correlação entre estabilidade ao etanol e estabilidade térmica, empregam uma concentração alcoólica mais elevada. Outro aspecto é que o teste do álcool vem sendo empregado no leite refrigerado, com temperaturas em geral, abaixo de 10°C.

Estudos realizados por Costa et al (2004) mostraram que a estabilidade do leite ao etanol sofre influência da temperatura. Estes pesquisadores observaram que leites com baixa contagem bacteriana total, baixa CCS, pH e acidez normal comportavam de maneira diferente quando a temperatura da amostra era 4°C ou 21°C. Na temperatura de 21°C, cerca de 65% das amostras analisadas mantiveram-se estáveis em concentrações alcoólicas superiores em comparação com a temperatura de 4°C.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da temperatura no perfil protéico de amostras de leite ultracentrifugadas a temperaturas de 4°C e 20 °C submetidas à eletroforese capilar.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Ultracentrifugação: Foram coletadas amostras de leite bovino de 3 animais mantidos no rebanho experimental da Embrapa Gado de Leite no Campo Experimental de Coronel Pacheco. As amostras foram armazenadas em frascos estéreis, refrigerados e encaminhados ao Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite. Após armazenamento de 24 horas em refrigerador convencional (4°C) foram retiradas de cada amostra duas alíquotas de 35 ml. Estas alíquotas foram mantidas à temperatura de 4°C e 20°C respectivamente. As amostras submetidas à variação de temperatura foram ultracentrifugadas em quadruplicata (40.000 x g) a 4°C e 20°C por 60 minutos utilizando uma ultracentrífuga refrigerada (Sorvall Centrifuges acoplada ao rotor A-841, USA). Após a ultracentrifugação, o precipitado e o sobrenadante foram separados para análise do perfil protéico.

2. Distribuição das proteínas no sobrenadante: O perfil protéico das amostras ultracentrifugadas mantidas às temperaturas de 4°C e 20°C respectivamente, foi determinado através da técnica de eletroforese capilar utilizando o equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies GmbH, Waldbronn Germany) e kit específico para determinação protéica (Protein 230 LabChip kit).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram a porcentagem total das frações protéicas (sinais 1, 2, 3, 4, 5 e 6) presentes nas amostras de leite. De acordo com os resultados foi observado variação do perfil protéico nas amostras submetidas à variação de temperatura durante o processo de ultracentrifugação (Figura 1). Comparando os sinais detectados nas amostras de leite submetidas às temperaturas de 4°C e 20°C respectivamente, foi possível observar uma variação na quantificação das proteínas nas três amostras de leite. Neste experimento não foi possível identificar quais sinais são representados pelas respectivas frações protéicas (α_{s1} , α_{s2} , β , κ -caseína, β -lactoglobulina e α -lactoalbumina). Novos experimentos estão sendo realizados no intuito de identificar a sequência de distribuição das frações protéicas no eletroferograma.

Tabela 1. Porcentagem de proteínas presentes no sobrenadante após ultracentrifugação a 4 °C e 20°C.

Amostras	Temperatura (°C)	Sinais (Porcentagem das Proteínas)					
		1	2	3	4	5	6
A1	4	9,5	14,8	2,1	52,4	16,8	0,5
	20	11,7	17,7	1,9	46,6	16,6	0,9
A2	4	9,0	14,0	2,6	55,3	14,6	1,7
	20	10,9	17,6	1,9	50,7	12,8	0,9
A3	4	9,0	13,6	2,0	54,8	17,2	0,4
	20	10,9	17,2	2,1	50,4	11,3	0,7

De acordo com a literatura (Zhang & Goff, 2004), das frações protéicas existentes na fase solúvel do leite, a β -caseína é a que possui a capacidade de mobilidade da forma agregada para a forma molecular, ocasionando mudanças no tamanho das micelas de caseína e conseqüentemente, alterações nas propriedades físico-químicas do leite. As β -caseínas representam cerca de 30% das caseínas totais sendo uma das mais solúveis e com propriedades surfactantes (Dauphas et al., 2008), e também possuem natureza anfipática devido aos grupamentos hidrofílicos (N-terminal) e hidrofóbicos (C-terminal), permitindo sua organização em micelas, induzindo a atração ou repulsão em solução.

O equilíbrio entre a forma molecular e a forma agregada da β -caseína é altamente influenciado pela concentração, temperatura e presença de íons cálcio. Em concentrações críticas, as β -caseínas interagem entre si, via grupamentos hidrofóbicos. Tal interação permite a formação de micelas com centros hidrofóbicos e uma camada externa menos densa com propriedades hidrofílicas (De Kruif & Holt, 2003; O'Connell et al., 2003).

O número de micelas e seus tamanhos dependem da temperatura, devido ao aumento nas interações hidrofóbicas. O tamanho das micelas são também dependentes do pH e da força iônica, os quais modificam as cargas da proteína e também a repulsão eletrostática (Dickinson et al., 2001). A estabilidade de uma solução micelar é conseqüência das repulsões eletrostáticas existentes entre a camada externa hidrofílica das micelas (McClements, 1999).

Estas propriedades da β -caseína podem complementar a explicação da instabilidade do leite ao etanol em temperaturas de refrigeração. Quando ocorre abaixamento da temperatura a β -caseína migra de dentro das micelas de caseínas para a fase aquosa do leite. Com esta migração, as micelas diminuem de tamanho (Costa et al., 2008) liberando água e íons cálcio para a fase aquosa do leite. Esse fato poderia causar alteração nas cargas micelares totais, o que ocasionaria maior capacidade de agregação entre as micelas e desta forma, diminuiria o ponto de coagulação do leite frente ao etanol.

CONCLUSÃO

A alteração do perfil protéico do sobrenadante das amostras ultracentrifugadas a 4°C e 20°C pode contribuir para explicar fenômenos de instabilidade frente ao etanol das micelas de caseínas de amostras de leite refrigeradas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, 12042/09) pelo auxílio financeiro, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal (CAPES, PNPd 02858/09-6) pelo fornecimento da bolsa de Pós-Doutoramento a Fabiano Freire Costa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COSTA, F.F.; BRITO, M. A. V. P.; SOUZA, G. N.; BRITO, J. R. F.; ARCURI, E. F. Influência da temperatura no teste de estabilidade do leite frente ao etanol. **Revista do Instituto de laticínios Cândido Tostes**, v. 59, n. 339, p 154-156, Jul/Ago 2004.

COSTA, F. F.; RESENDE, J. V.; ABREU, L. R.; GOFF, H. D. Effect of calcium chloride addition on ice cream structure and quality. **Journal of Dairy Science.**, Champaign, v.91, n.6, p.2165-2174, June 2008.

DALGLEISH, D. G.; MORRIS, E.R. Interactions between carrageenans and casein micelles: electrophoretic and hydrodynamic properties of the particles. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.2, n. 3, p.311-320, 1988.

DAUPHAS, S.; AMESTOY, A.; LLAMAS, G.; ANTON, M.; RIAUBLANC, A. Modification of the interactions between β -casein stabilized oil droplets with calcium addition and temperature changing. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.22, n.2, p.231-238, Mar. 2008.

DE KRUIF, C. G.; HOLT, C. Casein micelle structure, functions and interactions. In: FOX, P.F.; MCSWEENEY, P.L.H. (Ed.). **Advanced Dairy Chemistry: 1. Proteins**. 3rd ed. New York: Kluwer Academic, 2003. p. 233-276.

ICKINSON, E.; SEMENOVA, M.G.; BELYAKOVA, L. E.; ANTIPOVA, A. S. Analyses of light scattering data on the calcium ion sensitive of caseinate solution thermodynamics: Relationship to emulsions flocculation. **Journal of Colloid and Interface Science, San Diego**, v.239, n.1, p.87-97, 2001.

FOX, P. F. and P. L. H. MCSWEENEY. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. Thomson Science, New York. 1998.

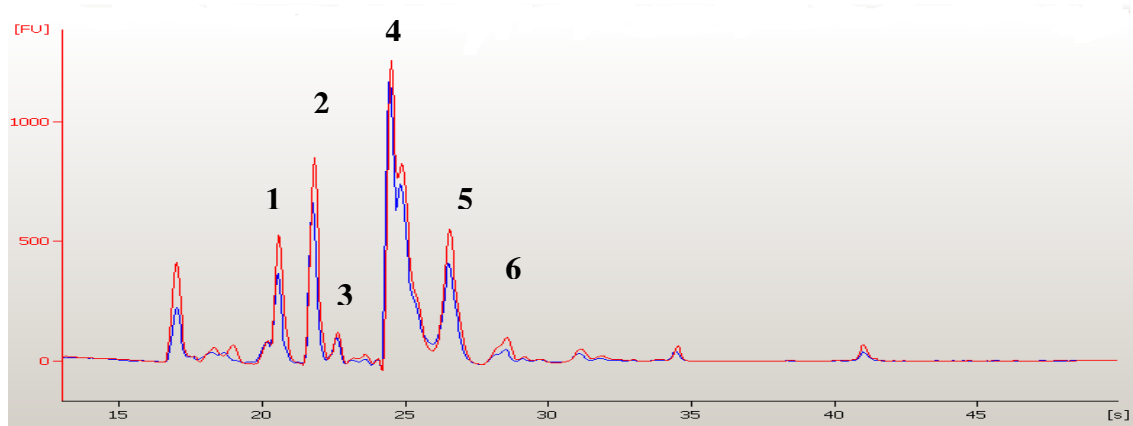
HOLT, C. The milk salts and their interaction with casein. In: ____ **Advanced Dairy Chemistry**. Vol. 3. 2nd ed. Ed. Fox, P. F. London. P. 243-255. 1997.

MCLEMENTS, D. J. **Food Emulsions: principles, practice and techniques**. London: CRC, 1999. 378 p.

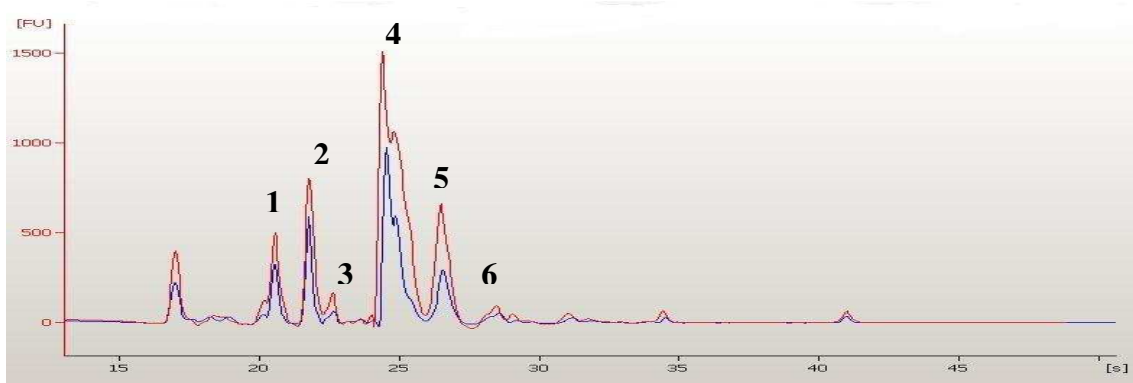
O'CONNELL, J. E.; GRINBERG, C. G.; DE KRUIF, C. D. Association behavior of β -casein. **Journal of Colloids and Interface Science** Amsterdam, v. 258, n.1, p.33-39, 2003.

ZHANG, Z.; GOFF, H.D. Protein distribution at air interfaces in dairy foams and ice cream as affected by casein dissociation and emulsifiers. **International Dairy Journal**, Oxford, v.14, n.7, p.647-657, July 2004.

A1



A2



A3

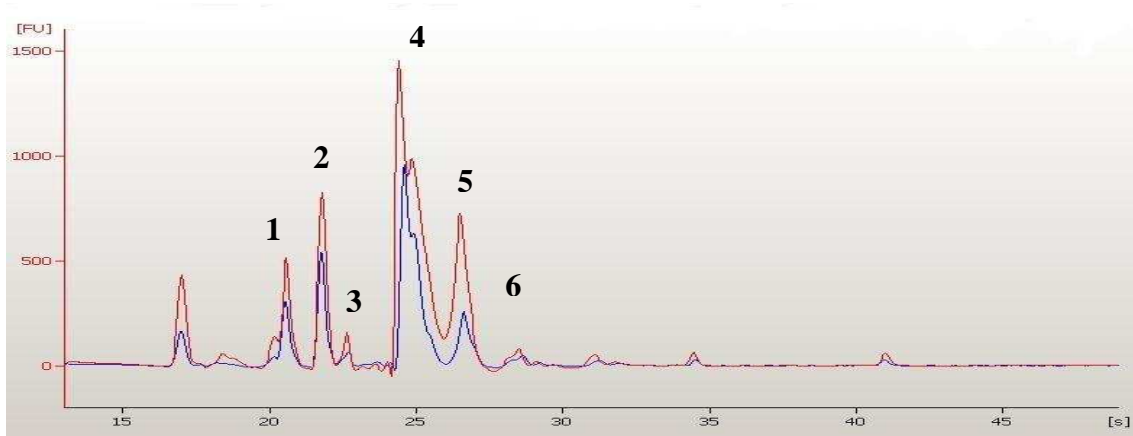


Figura 1. Eletroferogramas de três amostras de leite submetidas à ultracentrifugação nas temperaturas de 4°C (linha em vermelho) e 20°C (linha em azul).