

Cony Gauche

**Polimerização de proteínas do soro de leite por
transglutaminase e propriedades físicas de iogurte
elaborado após tratamento enzimático**

Florianópolis

2007

Cony Gauche

**Polimerização de proteínas do soro de leite por
transglutaminase e propriedades físicas de iogurte
elaborado após tratamento enzimático**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial à obtenção do título
de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof.(a) Dra. Marilde T. Bordignon Luiz

Florianópolis

2007

Polimerização de proteínas do soro de leite por transglutaminase e propriedades físicas de iogurte elaborado após tratamento enzimático

Por

Cony Gauche

Dissertação aprovada como requisito final para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela comissão formada por:

Presidente:

Profa. Dra. Marilde Terezinha Bordignon Luiz

Membro:

Profa. Dra. Suzana Caetano da Silva Lannes

Membro:

Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto

Membro:

Profa. Dra. Roseane Fett

Coordenadora:

Profa. Dra. Marilde Terezinha Bordignon Luiz

Florianópolis, maio de 2007.

Agradecimentos

À minha família – pai (Ivo), mãe (Juçara), irmãos (Heide e Peter), omas (Nina e Ruth) e tio (Alex) – por me apoiarem e acreditarem neste trabalho.

Ao Miguel, que está do meu lado, sempre.

À professora Marilde, pela orientação neste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos, pela boa companhia, em especial à Joana e Thays, pela ajuda na parte prática do projeto.

Ao professor Pedro, pela paciência em ensinar e ajudar a utilizar os equipamentos.

Ao professor Paulo pela ajuda no planejamento experimental e análise dos resultados.

Aos que contribuíram de maneira indireta, mas essencial: Sérgio, Bento, D. Maria, Márcia e Mery.

À banca, por aceitar o convite de participação e pelas contribuições fornecidas.

À Ajinomoto® e à Allimentus® por fornecer a enzima transglutaminase e o soro de leite, respectivamente.

À CAPES, CNPq e FAPESC, por financiar a pesquisa e as bolsas de estudo.

A todos que realmente torceram por este trabalho. Obrigada.

Resumo

GAUCHE, Cony. **Polimerização de proteínas do soro de leite por transglutaminase e propriedades físicas de iogurte elaborado após tratamento enzimático.** 2007. 120p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – SC.

O objetivo deste trabalho foi avaliar as condições de reação enzimática das proteínas do soro de leite em pó com a transglutaminase, o efeito do tratamento térmico nesta reação, a influência da polimerização protéica na temperatura de gel e avaliar as características físicas de iogurte elaborado a partir de uma formulação de leite e soro de leite após a polimerização enzimática. A polimerização das proteínas do soro de leite por transglutaminase em soluções de soro de leite em pó (50 % m/v) foi realizada através do monitoramento do índice de consistência das soluções, considerando os fatores concentração da transglutaminase, temperatura e tempo de reação enzimática. O efeito do tratamento térmico do soro de leite antes da reação foi avaliado através do comportamento de fluxo das amostras. Determinou-se o ponto gel e a turbidez das soluções em diferentes valores de pH (6,0; 7,0; 8,0). As propriedades físicas de iogurtes elaborados com soro de leite e submetidos ao tratamento enzimático com transglutaminase (0,5 U/g de proteína) foram determinadas. Através de uma metodologia de superfície de resposta, observou-se que a reação entre a transglutaminase e as proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina é otimizada quando conduzida na temperatura de 36 °C por 4 horas, na concentração enzimática de 50 U de transglutaminase / g de proteína. Estas condições favorecem o aumento dos valores de índice de consistência das amostras de soro de leite e conferem características pseudoplásticas às soluções. O tratamento térmico do soro de leite em temperaturas de 85, 90 e 95 °C, antes do tratamento enzimático, facilitou a reação, aumentando ($p < 0,05$) o índice de consistência das soluções. O tratamento enzimático das soluções de soro de leite diminuiu o ponto gel; esta diminuição foi intensificada com o aumento do tempo de reação. Iogurtes elaborados após o tratamento enzimático prévio do leite e do soro de leite apresentaram menor sinerese, maior viscosidade e firmeza. Estes parâmetros sugerem que a transglutaminase pode ser utilizada para compensar as possíveis alterações físicas ocasionadas pela adição do soro de leite em iogurte.

Palavras-chave: soro de leite, transglutaminase, iogurte, reologia, textura.

Abstract

GAUCHE, Cony. **Transglutaminase cross-linking of whey proteins and effects of enzymatic treatment on physical properties of yoghurt.** 2007. 120p. Dissertation (Master in Food Science). Federal University of Santa Catarina. Florianópolis – SC.

The aim of this study was to assess the optimal conditions for transglutaminase cross-linking of whey proteins from reconstituted concentrated whey solutions, in regards to heat treatment effects on transglutaminase kinetics and protein polymerization effects on gel temperature. The effects of this enzymatic assay on physical properties of yogurt were also determined. The polymerization of whey proteins by the effect of transglutaminase activities was determined by the consistency index obtained from rheological measurements in reconstituted concentrated whey solutions (50 %pv⁻¹) at different temperature-time treatments and enzyme concentrations. The effects of heat treatment on whey proteins flow behavior before the reaction were determined by using the Power Law Model. The gelation temperature and turbidity of whey solutions were examined after treatment for 4–24 h at different pH values (6.0; 7.0; 8.0). Furthermore, the physical properties yogurt treated with transglutaminase (0.5 Ug⁻¹ protein) were studied. It was determined that the reaction between β -lactoglobulin, α -lactalbumin and transglutaminase was improved when carried out at 36 °C for 4 hours, at the optimum enzyme concentration of 50 Ug⁻¹. The samples submitted to this treatment showed a pseudoplastic behavior and had a higher consistency index. Heat treatment of solutions at 85, 90 e 95 °C prior to enzyme addition seemed to improve the reaction; the consistency index was higher (p<0.05) on solutions submitted to this procedure. After the enzyme activity, the gelation temperatures of whey solutions were lower than in control samples. This reduction was intensified by increasing the time of reaction. The production of yogurt with previous enzymatic treatment of milk and whey conferred less syneresis and higher gel firmness in texture analysis. These results proof that transglutaminase could be applied in order to compensate for the changes on physical properties on yoghurt caused by the addition of milk whey.

Key-words: milk whey, transglutaminase, yoghurt, rheology, texture.

Lista de Abreviaturas

α – alfa

β – beta

δ – delta

γ – gama

$\dot{\gamma}$ – taxa de deformação

σ – tensão de cisalhamento

σ_0 – limite de escoamento

Δv – diferença de velocidade (cm/s)

Δy – distância entre duas camadas de fluido adjacentes (cm)

B – coeficiente de ruptura tixotrópica

CBZ-L-glutamilglicina – Carboxibenzoxi-L-glutamilglicina

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

DTT – Dithiothreitol

EC – Classe enzimática

ESI – Ionização por *spray* eletrostático

F – força aplicada na direção do escoamento (Newton, dina)

FAO – *Food and Agriculture Organization*

G' – módulo elástico

GDL – glucono- δ -lactona

GRAS – *Generally Reconized as Safe*

K – índice de consistência (Pa.sⁿ)

K_{oc} – limite de escoamento de Casson

K_c – viscosidade plástica de Casson

n – índice de comportamento de fluxo (adimensional)

Pa – Pascal

S – área da superfície exposta ao cisalhamento (m², cm²)

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

U/g – Unidade de atividade enzimática por grama

WHO – *World Health Organization*

Sumário

Introdução	09
Capítulo 1. Revisão Bibliográfica	12
Proteínas do soro de leite	12
Iogurte	17
Transglutaminase	18
Transglutaminase em proteínas do leite	22
Transglutaminase em iogurte	29
Reologia	30
Comportamento reológico de soro de leite	36
Análise instrumental de textura	37
Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	40
Referências Bibliográficas	42
Capítulo 2. Polimerização de proteínas do soro de leite – Uma análise de superfície de resposta.	51
Capítulo 3. Efeito do tratamento térmico na polimerização protéica por transglutaminase e gelificação de proteínas do soro de leite modificadas enzimaticamente.	73
Capítulo 4. Propriedades físicas de iogurte elaborado com soro de leite e transglutaminase.	94
Conclusões	120

Introdução

Proteínas do soro de leite apresentam grande importância por fornecer aminoácidos essenciais e por sua ampla variedade de características funcionais como formação de gel, estabilização de espumas e emulsões (DAUBERT et al., 2006). A capacidade gelificante destas proteínas é desejável, pois a gelificação protéica é parte essencial da formação das propriedades de textura dos alimentos. A modificação das proteínas do soro para melhorar suas propriedades funcionais em sistemas alimentícios é foco de pesquisa.

A incorporação de proteínas do soro de leite a partir do soro na sua forma líquida em produtos lácteos, como o iogurte, é uma ferramenta útil para sua reutilização. No entanto, problemas tecnológicos surgem em decorrência da diminuição do conteúdo de sólidos totais da matéria-prima, resultando na diminuição da viscosidade e aumento da sinerese dos produtos lácteos, considerados como defeitos pelo consumidor. As propriedades físicas destes produtos podem, no entanto, serem melhoradas pela introdução de ligações químicas intermoleculares adicionais ao sistema protéico do leite e/ou soro de leite.

A indústria de alimentos normalmente utiliza estabilizantes na fabricação de produtos lácteos. O enriquecimento da matéria seca e/ou do conteúdo protéico, como também a adição de hidrocolóides são técnicas comuns empregadas para evitar problemas de processamento, como a sinerese em iogurte. Muitos agentes estabilizantes e de polimerização protéica são disponíveis, mas a utilização de enzimas para modificar as propriedades funcionais dos alimentos via ligações cruzadas de proteínas apresenta vantagens como possuir alta especificidade e requerer apenas quantidades catalíticas (SINGH, 1991); a enzima transglutaminase possibilita ainda a formação de novas redes estruturais na forma de gel a partir de soluções e dispersões com baixa concentração protéica, como também a partir de sistemas protéicos coloidais (emulsões) (DICKINSON, 1997). Assim, a capacidade da transglutaminase em mediar reações entre compostos específicos, tais como aminoácidos, como também introduzir ligações cruzadas entre proteínas, é considerada um meio potencial de melhoramento das propriedades funcionais de proteínas alimentares (CHRISTENSEN et al., 1996).

A transglutaminase apresenta atividade enzimática ótima em uma ampla faixa de pH, variando de pH 5 a pH 8. Em valores de pH 4 e pH 9, ainda apresenta alguma atividade, sendo recomendada para diversos tipos de alimentos. É considerada com GRAS (*Generally Recognized As Safe*) e, no Brasil, sua utilização é permitida em quantidades suficientes para o efeito desejável, sem limite máximo estabelecido.

Pesquisas sobre o efeito das reações catalisadas pela transglutaminase com as proteínas presentes no soro de leite no seu meio natural composto por outras proteínas, lactose, minerais e gordura, são praticamente inexistentes, onde os estudos são normalmente referentes às proteínas isoladas ou concentradas do soro (TRUONG et al., 2004; SHARMA, ZAKORA e QVIST, 2002; WILCOX e SWAISGOOD, 2002). Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as condições de reação enzimática das proteínas do soro de leite em pó com a transglutaminase, avaliar o efeito da desnaturação protéica nesta reação, observar a influência da polimerização protéica na temperatura de gelificação das proteínas do soro de leite e avaliar as características físicas de iogurte elaborado a partir de uma mistura de leite e soro de leite líquido após a polimerização enzimática com a transglutaminase.

Capítulo 1

Revisão Bibliográfica

* Parte deste capítulo foi submetido para publicação no Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos (CEPPA) como artigo de revisão intitulado: “Polimerização de proteínas do leite por transglutaminase: modificação das propriedades funcionais e aplicação em produtos lácteos”.

Revisão Bibliográfica

Proteínas do soro de leite

O leite de vaca contém aproximadamente 87,3 % de água, 3,8 % de gordura, 4,9 % de lactose, 0,72 % de cinzas e 3,3 % de proteínas (FRANCO, 1992). As proteínas do soro correspondem a 20 % das proteínas do leite sendo que a β -lactoglobulina e α -lactoalbumina representam de 70 a 80 % do total das proteínas do soro. No soro são encontradas também albumina do soro bovino, imunoglobulinas, protease-peptonas, lactoferrina, lactoperoxidase e outras enzimas (MORR e HÁ, 1993). O termo proteínas do soro é utilizado para denominar o grupo de proteínas que permanecem solúveis no soro do leite após a precipitação da caseína a pH 4,6 e temperatura de 20 °C (FARRELL et al., 2004). Em uma produção tradicional de queijo (adição de renina), dependendo do tipo de queijo, somente 6 – 30 Kg dos constituintes do leite fazem parte do coágulo partindo-se de 100 Kg de leite, enquanto o restante é soro (HINRICHS, 2001).

O soro apresenta coloração verde-amarelada, conteúdo de sólidos totais geralmente em torno de 6,0-6,5 % (m/v) e uma demanda bioquímica de oxigênio (DBO) de no mínimo 30.000. A composição do soro de leite é dependente de fatores tais como fonte (bovino, caprino ou ovino), composição do leite (raça, estágio da lactação, alimentação do animal, tipo do queijo), proporção soro/leite e práticas tecnológicas como temperatura e tempo de aquecimento, batelada *versus* processos contínuos, ultrafiltração (PINTADO, MACEDO e MALCATA, 2001).

A β -lactoglobulina representa aproximadamente 50 % do teor protéico do soro de leite bovino. Esta proteína liga cálcio e zinco, e a seqüência de aminoácidos apresenta homologia parcial com determinadas proteínas capazes de ligar retinol (KRÜGER et al., 2002).

A β -lactoglobulina é constituída por 162 aminoácidos estruturados (Figura 1) (CHEFTEL, CUQ e LORIENT, 1989). É uma proteína globular com massa molar de 18.300 g/mol, encontrada principalmente como um dímero em pH neutro e apresenta ponto isoelétrico em pH 5,2. A β -lactoglobulina nativa possui duas ligações dissulfeto e um grupo tiol livre, que está na parte interior da estrutura protéica (HONG e CREAMER, 2002) e

Esta proteína é termolábil e apresenta mudanças conformacionais reversíveis em temperaturas menores que 70 °C. Temperaturas elevadas podem provocar sua desnaturação e polimerização irreversível (GIRALDO-ZUÑIGA et al., 2002). Após o aquecimento do leite a 90 °C mais de 95 % da β -lactoglobulina é desnaturada. Em torno de 65 % de toda a β -lactoglobulina é encontrada associada às micelas de caseína após a adição de renina (VASBINDER, ALTING e KRUIF, 2003).

A β -lactoglobulina é considerada um excelente agente de gelificação (GIRALDO-ZUÑIGA et al., 2002). O tratamento térmico induz uma mudança conformacional que resulta na exposição do grupo tiol reativo. Esse grupo tiol pode formar ligações dissulfeto com outras proteínas que contém cisteína, como β -lactoglobulina ou albumina sérica bovina; ou com proteínas que possuem ligações dissulfeto, como α -lactoalbumina, κ -caseína e α_2 -caseína (VASBINDER, ALTING e KRUIF, 2003; FOX, 2001). A formação de ligações dissulfeto intermoleculares é essencial para a formação de géis de proteínas do soro induzidos termicamente e para uma estrutura de espuma estável (MORR e HÁ, 1993).

Um importante aspecto da β -lactoglobulina é sua propriedade emulsificante em sistemas alimentícios. Durante a homogeneização, ela se interpõe na interface óleo-água formando uma camada protetora. Quando a β -lactoglobulina se localiza na interface, ela desnatura parcialmente levando à exposição os grupos livres sulfidríla. Uma vez expostos na superfície da proteína, o grupo sulfidríla livre torna-se reativo e interage com os grupos sulfidríla livres inter ou intramoleculares (MCCRAE, LAW e LEAVER, 1999).

A α -lactoalbumina corresponde a 22 % das proteínas do soro (LINDEN e LORIENT, 1994). A estrutura nativa da α -lactoalbumina consiste de 2 domínios (um domínio de cadeia α -hélice e outro de cadeia β -pregueada) conectados por um *loop* ligante de cálcio. A estrutura é estabilizada por 4 ligações dissulfeto nas posições 6-120, 61-77, 73-91 e 28-111 (Figura 2). Os dois domínios são mantidos juntos por um aminoácido cisteína ligado entre os resíduos 73-91, formando um *loop* que está presente entre esses domínios e liga cálcio (ANDERSON, BROOKS e BERLINER, 1997).

Sua estrutura primária apresenta algumas semelhanças de seqüências de aminoácidos com a lisozima do ovo de galinha, onde 44 resíduos de aminoácidos são idênticos, entre os

123 da cadeia. Além disso, a localização das quatro uniões dissulfeto é idêntica, o que indica a semelhança das estruturas tridimensionais destas duas proteínas (Figura 2) (CHEFTEL, CUQ e LORIENT, 1989). A comparação entre a desnaturação de α -lactoalbumina e lisozima mostra que existe um padrão similar de desdobramento destas proteínas, apresentando um mesmo domínio da cadeia protéica sendo preferencialmente desestabilizado pelas condições desnaturantes (JONES e FERNANDEZ, 2003).

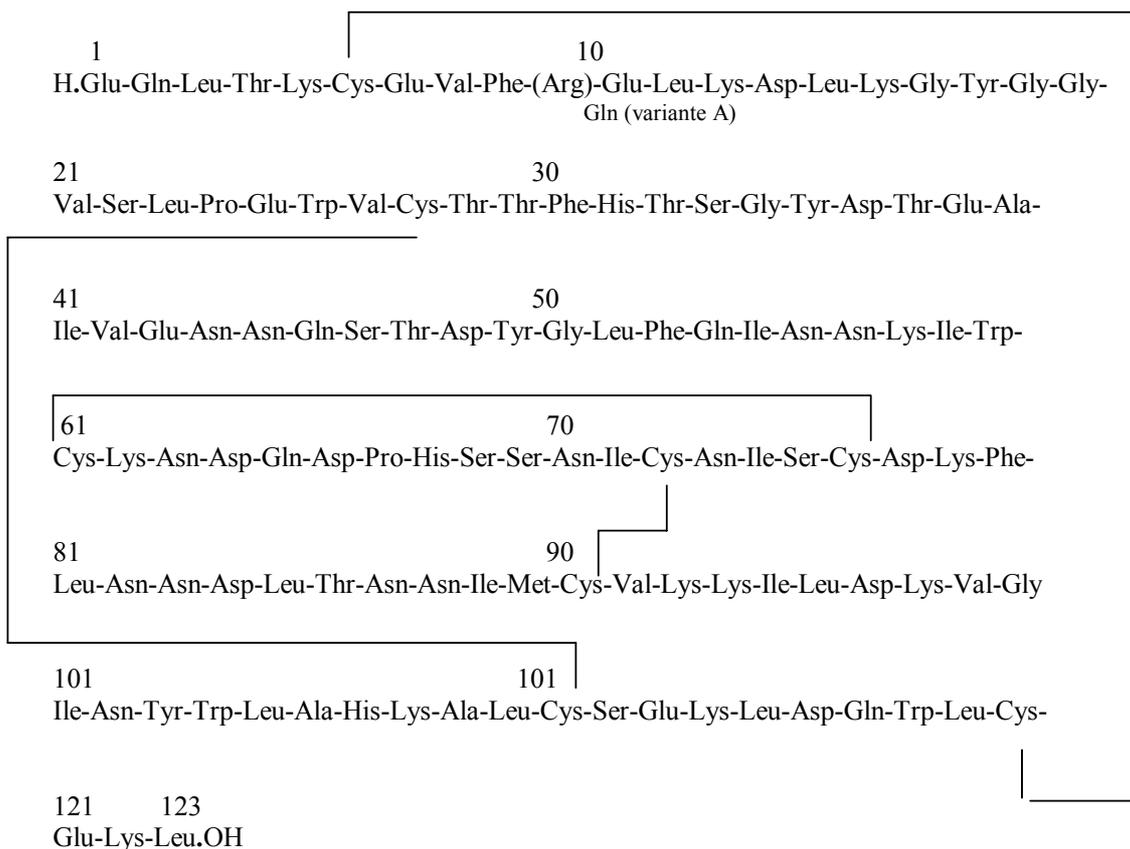


Figura 2. Estrutura primária da α -lactoalbumina. Fonte: CHEFTEL, CUQ e LORIENT, 1989.

A α -lactoalbumina é uma proteína globular com massa molar de 14.200 g/mol, ponto isoelétrico em torno de pH 4-5 e apresenta a capacidade de se ligar a cátions metálicos (PERMYAKOV e BERLINER, 2000) (Figura 4). A ligação com o cálcio estabiliza a forma nativa da α -lactoalbumina de tal forma que a temperatura de desdobramento da proteína passa de 20 °C na apo-proteína para uma temperatura próxima de 70 °C para a holo-proteína (ligada ao cálcio) (FARKAS et al., 2005). O íon cálcio na α -lactoalbumina tem um papel estrutural,

sendo requerido para o desdobraimento e formação da ligação dissulfeto nativa da proteína desnaturada (CHRYSINA, BREW e ACHARYA, 2000).

É sensível ao calor, no entanto sua desnaturação pode ser reversível. Com o tratamento térmico da α -lactoalbumina a 95 °C por 15 minutos, 40 % da proteína pode ser renaturada. Quando submetida a tratamento térmico a 77°C e imediatamente resfriada, 90 % da proteína pode ser renaturada (GIRALDO-ZUÑIGA et al., 2002). Por muitos anos a α -lactoalbumina foi considerada a proteína mais estável das proteínas do soro de leite, esse alto grau de renaturação é provavelmente o responsável pela alta resistência atribuída à α -lactoalbumina (MORR e HÁ, 1993). A renaturação da α -lactoalbumina à estrutura nativa é dependente da presença dos íons cálcio, que retém as propriedades estruturais e da estabilidade térmica da proteína (ANDERSON, BROOKS e BERLINER, 1997). Devido ao fato dos íons Ca^{2+} , Zn^{2+} e outros íons metálicos serem passíveis de ligação com a α -lactoalbumina, esta proteína é desnaturada em temperaturas mais altas, já que proteínas não ligadas a metais são desnaturadas em temperaturas de aquecimento relativamente mais baixas e não tem capacidade de se renaturar (GIRALDO-ZUÑIGA et al., 2002).

A α -lactoalbumina é utilizada principalmente para a fortificação nutricional de alimentos. Sua funcionalidade pode ser melhorada pelo aquecimento acidificado do soro (pH ~ 2,5) em temperaturas superiores a 90 °C (FOX, 2001).

A β -lactoglobulina e a α -lactoalbumina são moléculas globulares compactas com uma seqüência primária contendo resíduos polares e hidrofóbicos. Podem dobrar-se mascarando no centro da molécula os resíduos hidrofóbicos, de tal maneira que as associações intermoleculares são poucos prováveis.

A solubilidade das proteínas do soro, independente da temperatura na faixa de 40 - 60 °C, é mínima em valores de pH próximos a 4,5; nestas condições as interações proteína-proteína aumentam porque as forças eletrostáticas são menores e menos água interage com as moléculas de proteína (PELEGRINE e GASPARETTO, 2005).

Iogurte

Iogurte é definido como o produto resultante da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, cuja fermentação se realiza com cultivos protossimbióticos de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueki* subsp. *bulgaricus*. O leite utilizado na fabricação de leites fermentados pode ser em natureza ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos de origem láctea (soro de leite, concentrados de soro de leite, leite concentrado, entre outros), bem como de outras substâncias alimentícias recomendadas pela tecnologia atual de fabricação de leites fermentados (BRASIL, 2000).

Estas bactérias (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) exibem uma relação simbiótica durante o processamento do iogurte, onde a taxa de crescimento entre as espécies altera constantemente durante o seu processamento (RADKE-MITCHELL e SANDINE, 1984). *S. thermophilus* apresenta propriedades proteolíticas pobres e assimila em torno de 50 - 70 % dos aminoácidos livres liberados pelo *L. bulgaricus* no processo de produção ácida e completa coagulação do leite pela cultura mista de bactérias (BESHKOVA et al., 1998). A partir desta fermentação, um gel protéico fraco é formado devido à diminuição do pH do leite, ocasionada pela conversão de lactose em ácido láctico pela cultura de bactérias da fermentação (O'DONNELL e BUTLER, 2002).

Na produção do iogurte, o leite é normalmente aquecido (95 °C por 5 minutos), o que causa a desnaturação das proteínas do soro (α -lactoalbumina, β -lactoglobulina). Este tratamento térmico tem um efeito significativo na formação do gel ácido e de suas propriedades; as proteínas do soro desnaturadas interagem com a κ -caseína nas micelas de caseína, via interações hidrofóbicas e formação de ligações dissulfeto intermoleculares; além disso, podem ocorrer alterações do equilíbrio osmótico, inativação de enzimas sensíveis ao calor, escurecimento não enzimático e reações de Maillard (LUCEY e SINGH, 1998).

A atração caseína-caseína aumenta com a diminuição do pH do leite de 6,6 para 4,6 durante a fermentação do iogurte, o que resulta na gelificação quando as caseínas se aproximam de seu ponto isoelétrico (pH \sim 5,0) (LEE e LUCEY, 2004). Quando o pH se aproxima de 5,0, as micelas de caseína são parcialmente desestabilizadas e tornam-se ligadas umas às outras na forma de agregados; as cadeias formam parte de uma matriz protéica tridimensional em que a fase líquida do leite é imobilizada. Esta estrutura do gel contribui

substancialmente para todas as propriedades organolépticas e de textura do iogurte (O'DONNELL e BUTLER, 2002). A maioria dos estudos realizados sobre as propriedades de textura de iogurte está relacionada com a firmeza e a viscosidade; sabe-se que a desnaturação das proteínas do soro aumenta estes parâmetros no iogurte (LUCEY e SINGH, 1998).

As propriedades físicas do iogurte, incluindo a separação do soro (sinerese), apresentam um papel importante na qualidade do produto e aceitação pelo consumidor. A sinerese é parte essencial do processo de produção de queijos, no entanto, a separação do soro na superfície do produto é considerada o principal defeito na produção de iogurte (SANDOVAL-CASTILLA et al., 2004). As razões comuns para a ocorrência da sinerese incluem a utilização de alta temperatura de incubação, altas concentrações de proteínas do soro em relação às caseínas, baixa concentração de sólidos totais e alteração física do produto durante o armazenamento e distribuição (LUCEY, 2004). O enriquecimento do conteúdo de matéria seca e/ou do conteúdo protéico do leite antes da fermentação do iogurte, como também a adição de gelatina e estabilizantes são medidas comuns utilizadas para evitar este problema (LORENZEN et al., 2002).

Os efeitos benéficos do consumo de iogurte e produtos lácteos contendo bactérias ácido lácticas na saúde humana é extensivamente relatada, dentre estes benefícios destacam-se efeito hipocolesterolêmico (HEPNER et al., 1979), diminuição do risco de doença coronariana (ANDERSON e GILLILAND, 1999), aumento da imunidade (VAN de WATER, KEEN e GERSHWIN, 1999; CANO, AGÜERO e PERDIGÓN, 2002), melhoramento da função gastrointestinal (ADOLFSSON et al., 2004), atividade antitumoral (PERDIGÓN, VALDEZ e RACHID, 1998) entre outros.

Transglutaminase

A transglutaminase (EC 2.3.2.13) é uma enzima presente naturalmente na maioria dos tecidos animais e fluidos corporais, tem um papel importante na formação da coagulação sanguínea. Foi identificada por Heinrich Waelsch há mais de 40 anos como uma enzima com a função de incorporar aminas em proteínas no fígado (LORAND, 2002). Catalisa uma reação de transferência de grupos acila entre grupos γ -carboxiamida dos peptídios ligados aos

resíduos de glutamina (doador de acila) e os grupos aminos primários em uma variedade de compostos amino (receptor de acila), incluindo os peptídios ligados aos grupos ϵ -amino dos resíduos de lisina (FOLK e FINLAYSON, 1977; MOTOKI e SEGURO, 1998). Quando os grupos ϵ -amino dos resíduos de lisina nas proteínas atuam como receptores de grupos acila, ligações ϵ -(γ -glutamina)lisina são formadas tanto intra- como inter-molecularmente. Se não existe amina primária no sistema de reação, a água se torna o receptor de grupos acila, e os grupos γ -carboxiamida dos resíduos de glutamina são desaminados, tornando-se resíduos de ácido glutâmico (ANDO et al., 1989).

Esta enzima pode modificar as proteínas por meio de incorporação de aminas, ligações cruzadas e desaminação (Figura 3) (MOTOKI e SEGURO, 1998). Essas reações levam à mudanças nas propriedades funcionais de proteínas vegetais e animais e conferem a possibilidade da formação de produtos com melhores propriedades reológicas e sensoriais (NIELSEN, 1995).

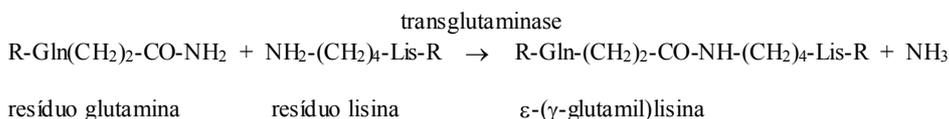
A incorporação de ligações intra- ou inter-moleculares em alimentos protéicos parece ser viável para o melhoramento das propriedades físicas e de textura de muitos produtos. Existem procedimentos químicos e enzimáticos para introduzir ligações cruzadas covalentes em proteínas. Devido à origem natural da enzima e sua alta especificidade pelo substrato, o procedimento enzimático é mais aceitável por autoridades regulatórias e pelo consumidor (NONAKA et al., 1989).

A segurança da ingestão da molécula ϵ -(γ -glutamina)lisina formada pela reação catalisada pela transglutaminase é baseada na ingestão dessa molécula em alimentos cozidos. Uma vez que a transglutaminase está presente na maioria dos tecidos e órgãos de vegetais e animais, o aumento da temperatura durante o cozimento ou processamento dos alimentos é freqüentemente lento, onde as transglutaminases endógenas podem exercer sua atividade enzimática por algum tempo (MOTOKI e SEGURO, 1998).

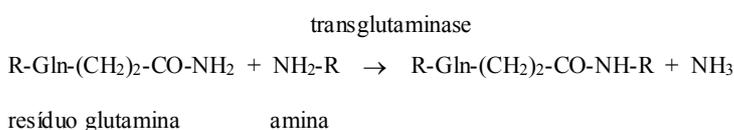
A transglutaminase é afirmada como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) por cientistas da área (KURAIISHI, YAMAZAKI e SUSA, 2001). A legislação brasileira permite a utilização da transglutaminase de origem microbiana (*Streptoverticillium mobaraense*) na

indústria de alimentos em concentração suficiente para o efeito desejado, sem especificação para limite máximo permitido (BRASIL, 2003).

Polimerização



Incorporação de aminas



Desaminação

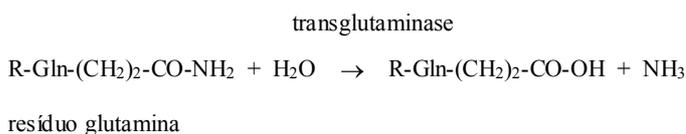


Figura 3. Reações catalisadas pela transglutaminase. Fonte: SHARMA, LORENZEN e QVIST, 2001 (adaptado).

Já na década de 50, a transglutaminase dependente de cálcio mostrava ser capaz de modificar as propriedades da gelatina e outras proteínas através da reação de transferência de grupos acila *in vitro* (CLARKE et al., 1959). Sua utilidade, no entanto, é limitada devido ao seu alto custo de produção, à dependência do cálcio para a atividade (WILCOX e SWAISGOOD, 2002) e pela dificuldade da obtenção (LASTOWKA, MAFFIA e BROWN, 2005). Assim muitas pesquisas são realizadas com objetivo de encontrar novas fontes viáveis para extração da transglutaminase. Estudos mostram a extração e purificação da transglutaminase a partir de fontes vegetais (KANG e CHO, 1996), peixes (WORRATAO e YOGSAWATDIGUL, 2005; NOZAWA, MAMEGOSHI e SEKI, 1997) e por recombinação genética (DATE et al., 2003; TAGUCHI et al., 2002). Com a recente disponibilidade da enzima a partir de fonte microbiana, sua aplicação pela indústria de alimentos é muito pesquisada.

A transglutaminase microbiana de *Streptovorticilium mobaraense* sp, independente do cálcio, linhagem S-8112 consiste de 331 aminoácidos em uma única cadeia polipeptídica e contém um resíduo de cisteína com um grupo tiol livre, que é essencial para a atividade enzimática (KANAJI et al., 1993). Sua massa molar é em torno de 40.000 g/mol, enzima monomérica de uma cadeia polipeptídica simples. Esse valor é próximo da metade da massa molar da transglutaminase derivada do fígado de *guinea pig* (porquinho da índia) (ANDO et al., 1989). KANAJI et al. (1993) confirmaram a massa molar da transglutaminase microbiana por espectrometria de massa ESI observando um valor de massa molar igual a $37.869,2 \pm 8,8$, próximo ao valor aparente determinado previamente por eletroforese em gel de poliacrilamida por Ando et al. (1989).

O ponto isoelétrico (pI) é em torno de 8,9, diferente do pI da transglutaminase derivada de fígado de porco, 4,5 (ANDO et al., 1989). O pH ótimo da transglutaminase microbiana é em torno de 5,0 - 8,0. Entretanto, em pH 4,0 ou pH 9,0, a transglutaminase microbiana ainda expressa alguma atividade enzimática, sendo considerada estável sob uma grande faixa de pH (MOTOKI e SEGURO, 1998). A temperatura ótima de atividade enzimática utilizando como substrato hidroxilamina e CBZ-L-glutamilglicina foi encontrada ser 50 °C por 10 minutos (ANDO et al., 1989).

A estabilidade térmica da transglutaminase microbiana foi avaliada por Küttemeyer et al. (2005) através da adição de diferentes sais em diferentes concentrações. A adição de íons monovalentes (NaCl, KCl) aumentou a atividade enzimática e a estabilidade térmica da transglutaminase, enquanto íons bivalentes tiveram pouca influência (MgCl₂) ou reduziram a atividade enzimática e a estabilidade térmica (CaCl₂).

Estudos sobre o efeito da transglutaminase em proteínas alimentares são destacados. A estabilidade térmica de proteínas miofibrilares aumenta com a adição da transglutaminase (AKTAS e KILIÇ, 2005), assim como a capacidade de gelificação e a força do gel de surimi são melhoradas pelo tratamento enzimático (DONDERO et al., 2006). A transglutaminase adicionada em farinha de trigo permite a formação de pães com maior volume, consistência e menor acidez (COLLAR, BOLLAÍN e ANGIOLONI, 2005). O tratamento enzimático do leite afeta sua estabilidade térmica (O'SULLIVAN, KELLY e FOX, 2002) e o iogurte produzido com o leite pré-tratado com transglutaminase apresenta menor sinerese e maior

força do gel (LORENZEN et al., 2002). Portanto, muitas aplicações são propostas para a transglutaminase como ingrediente no processamento de alimentos, devido à sua utilização ser considerada um meio seguro de modificação de proteínas e por conferir características únicas aos alimentos.

Transglutaminase em proteínas do soro de leite

Indústrias alimentícias de todo o mundo estão em busca do desenvolvimento de novos ingredientes ou produtos lácteos com novas características físicas e funcionais. Um dos objetivos é a alteração das propriedades dos produtos lácteos pela modificação das proteínas do leite utilizando a transglutaminase (RODRIGUEZ-NOGALES, 2006; SHARMA, LORENZEN e QVIST, 2001). Dentre as proteínas do leite, destacam-se as caseínas (COZZOLINO et al., 2003; O'CONNEL e KRUIF, 2003), consideradas bons substratos para a transglutaminase. A incubação de soluções de β - e κ - caseínas com transglutaminase leva a formação de ligações intramoleculares nas micelas de caseína, onde o efeito das ligações cruzadas é mais pronunciado no caso da κ -caseína (KRUIF et al., 2002). A maior reatividade das κ -caseínas é devido ao fato de que as κ -caseínas estão localizadas na superfície da micela, além disso, os macropéptidos das κ -caseínas são muito acessíveis ao ataque da transglutaminase (RODRIGUEZ-NOGALES, 2005).

O efeito da transglutaminase foi observado após a reação enzimática com as proteínas de leite em pó desnatado reconstituído. Observou-se em perfil de eletroforese SDS-PAGE que o tempo de reação de 30 minutos causou uma diminuição na intensidade das bandas de caseína, no entanto, após o aquecimento do leite os autores obtiveram uma considerável diminuição na intensidade de caseína (mais que 50 %) durante os primeiros 30 minutos de reação. O aumento adicional no tempo de reação causou uma maior diminuição na intensidade das bandas de caseína (SHARMA, LORENZEN e QVIST, 2001). Tanto a β -caseína como a κ -caseína mostraram ser mais susceptíveis à reação enzimática do que a α_s -caseína no meio natural da micela de caseína, sendo que a κ -caseína mostrou maior reatividade sem o tratamento térmico.

O mesmo comportamento é encontrado para o tratamento do leite de cabra e de ovelha com transglutaminase (RODRIGUEZ-NOGALES, 2005; RODRIGUEZ-NOGALES, 2006). A polimerização das formas monoméricas das proteínas aumenta após o tratamento térmico do leite a 85 °C por 15 minutos e é menos intensa para a α_s -caseína. O pré-aquecimento do leite causa a desnaturação das proteínas do soro e sua interação com as micelas de caseína, aumentando a susceptibilidade das proteínas à reação com a transglutaminase (SHARMA, LORENZEN e QVIST, 2001). Em geral, o aumento progressivo da temperatura desorganiza o sistema proteína-água quebrando as ligações de hidrogênio que estabilizam a estrutura protéica, o que causa o desdobramento e leva a interação proteína-proteína, aproximando as proteínas do sítio ativo da transglutaminase e levando à subsequente formação dos polímeros (NIEUWENHUIZEN et al., 2003).

A forte reatividade da κ -caseína já foi esclarecida pela sua posição externa na micela de caseína. A estrutura da micela permite o acesso da transglutaminase à β -caseína, mais acessível que a α_s -caseína (SHARMA, LORENZEN e QVIST, 2001). Enquanto a β -caseína apresenta uma estrutura aberta, desordenada e flexível, a α_s -caseína forma uma estrutura fechada, dificultando a ação da transglutaminase (RODRIGUEZ-NOGALES, 2005).

Os resíduos de glutamina localizados na região N-terminal (hidrofílica) da β -caseína são preferencialmente modificados pela transglutaminase, onde a especificidade à região N-terminal dos resíduos de glutamina da β -caseína é uma consequência da exposição do solvente ou da carga dos aminoácidos adjacentes a glutamina. Quando incubada a 35 °C por tempo suficientemente longo, a região N-terminal hidrofílica da β -caseína torna-se disponível no solvente aquoso, e é então polimerizada pela transglutaminase (O'CONNEL e KRUIF, 2003). As alterações associadas à transglutaminase nas propriedades físico-químicas da β -caseína, podem representar um aumento na hidrofobicidade da molécula e estabilidade do cálcio das micelas de β -caseína tratadas com transglutaminase.

A formação de gel induzido pela transglutaminase é possível pela polimerização enzimática de micelas de caseína (SCHORSCH, CARRIE e NORTON, 2000a). Gel de proteínas do leite é tradicionalmente formado pelo tratamento de caseína com ácido ou enzima proteolítica (renina), ou por desnaturação térmica das proteínas do soro. Uma maneira alternativa de produzir um gel de proteína do leite é por polimerização enzimática das

moléculas de proteína produzindo uma rede de ligações covalentes. Devido às diferentes ligações cruzadas formadas, espera-se que a rede protéica apresente propriedades reológicas completamente diferentes de um gel de proteínas de leite convencional (DICKINSON e YAMAMOTO, 1996).

No leite (pH 6,8), as caseínas nativas são encontradas como micelas coloidais em associação com fosfato de cálcio, estas são altamente hidratadas e possuem grande volume. Quando a transglutaminase é adicionada ao leite, não ocorre a formação de gel, sugerindo que a incapacidade da formação da rede tridimensional do gel é devido à repulsão eletrostática e/ou estérica entre as moléculas de κ -caseína na superfície. O efeito da transglutaminase é esperado quando a estabilização eletrostática e/ou estérica das proteínas é removida, por exemplo, pela acidificação do leite (SCHORSCH, CARRIE e NORTON, 2000b).

Emulsões elaboradas pela polimerização de soluções de caseinato com transglutaminase em concentrações protéicas superiores a 0,2 % resulta em emulsões finas, pouco estáveis à coalescência e floculação durante a estocagem (FAERGEMAND, OTTE e QVIST, 1998), pois moléculas protéicas polimerizadas não são absorvidas na interface óleo-água, diminuindo a estabilidade da emulsão devido a menor superfície de contato. O tratamento com transglutaminase em soluções com alta concentração protéica produz um aumento no tamanho médio das gotas que pode ser atribuído à floculação causada pela polimerização covalente envolvendo moléculas de proteínas (FAERGEMAND et al., 1999).

A estabilidade térmica de soluções de caseinato de sódio modificadas pela transglutaminase leva à agregação das proteínas em temperaturas superiores comparadas às soluções controle. A turbidez da solução de caseína permanece inalterada até a temperatura de 56 °C, aumentando até o máximo em 85 °C. Em soluções tratadas enzimaticamente, a turbidez permanece inalterada até a temperatura de 80 °C. Tratamentos mais longos (18 horas) resultam no aumento da estabilidade em até 95 °C (MUGURAMA et al., 2003).

A viscosidade tempo-dependente de filmes de α_s -caseína, β -caseína e caseinato de sódio polimerizados por transglutaminase imediatamente após a formação dos filmes resulta em um aumento de até 100 vezes da viscosidade na interface. Observa-se que o aumento da viscosidade da superfície da β -caseína é proporcional ao aumento da viscosidade do filme de caseinato de sódio, enquanto a viscosidade do filme de α_s -caseína aumenta lentamente. A taxa

similar de aumento de viscosidade para a β -caseína em relação ao caseinato de sódio pode ser devido ao fato de que a β -caseína absorve mais rápido na interface óleo-água, além disso, a β -caseína é melhor substrato para a transglutaminase do que a α_s -caseína (FAERGEMAND et al., 1999).

As proteínas do soro de leite, β -lactoglobulina e α -lactoalbumina, por apresentarem estrutura globular, tendem a formar reações cruzadas menos efetivas com a transglutaminase. Estudos mostram que a adição de agentes redutores ao sistema de reação facilita a reação das proteínas com a transglutaminase por manter o sítio ativo sulfidril no estado reduzido, aumentando o acesso da enzima aos grupos NH_2 (WILCOX e SWAISGOOD, 2002; KURAISHI, YAMAZAKI e SUSU, 2001). Em 1990, um estudo sobre a polimerização de proteínas do soro por transglutaminase dependente de cálcio já mostrava a polimerização protéica das proteínas globulares do soro. A polimerização das proteínas de soro em pó por transglutaminase, na concentração protéica de 12 %, foi possível apenas após o tratamento das soluções com DTT (agente redutor) e foi máxima em pH 7,5 (ABOUMAHMOUD e SAVELLO, 1990).

Após a incubação de proteínas isoladas de soro com transglutaminase por 60 minutos observa-se reação cruzada da α -lactoalbumina com a enzima, no entanto a reação com a β -lactoglobulina ocorre fracamente (FAERGEMAND, OTTE e QVIST, 1997). Esses dados sugerem que a α -lactoalbumina possui resíduos de glutamina e lisina disponíveis para a reação cruzada com a transglutaminase, enquanto a β -lactoglobulina apresenta estes resíduos menos disponíveis à reação enzimática. Após a adição de DTT, reduzindo as pontes dissulfeto que estabilizam a α -lactoalbumina (4 S-S) e a β -lactoglobulina (2 S-S), a reatividade da transglutaminase aumenta com as duas proteínas. A α -lactoalbumina reage imediatamente e a β -lactoglobulina, desta forma, reage com a transglutaminase dependendo da dose de proteína utilizada e da concentração protéica da solução (FAERGEMAND, OTTE e QVIST, 1997).

A utilização de concentrado industrial de α -lactoalbumina, transglutaminase, DTT (agente redutor) e SDS para a reação enzimática, levam a consideráveis ligações cruzadas observadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) entre as proteínas, ocorridas com ou sem adição de agente redutor à solução protéica (SHARMA, ZAKORA e QVIST, 2002a). A reação da α -lactoalbumina com transglutaminase na presença de cálcio e DDT leva a

formação de polímeros com massa molar de 600.000 g/mol em 15 minutos a partir de seus monômeros que apresentam massa molar de 14.200 g/mol (MATSUMURA, LEE e MORI, 2000). Os grandes agregados formados devido à polimerização da α -lactoalbumina pela transglutaminase são capazes de formar um filme coeso em curto espaço de tempo (~1 hora). Entretanto, agregados maiores absorvidos na interface óleo-água são razoavelmente rígidos e difíceis à propagação, não são capazes de aumentar a força do filme interfacial tanto quanto na proteína não polimerizada enzimaticamente (SHARMA, ZAKORA e QVIST, 2002b).

A susceptibilidade das proteínas de leite desnatado à reação cruzada com transglutaminase, avaliada por eletroforese capilar após seu aquecimento a 85 °C por 15 minutos, demonstra a polimerização enzimática das proteínas do soro pela diminuição da área do pico obtido pela eletroforese, onde a α -lactoalbumina reage tanto no leite aquecido como no leite que não sofre o processo de pré-aquecimento. A β -lactoglobulina apresenta reação com a transglutaminase somente quando o leite é submetido ao tratamento térmico (SHARMA, LORENZEN e QVIST, 2001).

O tratamento do leite de ovelha com transglutaminase mostra que a reatividade das proteínas do soro de leite aumenta com o aquecimento do leite a 85 °C por 15 minutos, causando considerável redução da concentração de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina observada em eletroforese capilar, sendo mais notável para a β -lactoglobulina (RODRIGUEZ-NOGALES, 2005). Quanto à reatividade das proteínas do soro de leite de cabra a eletroforese capilar mostra redução significativa do pico de α -lactoalbumina após a reação enzimática sem tratamento térmico (RODRIGUEZ-NOGALES, 2006).

A presença de ligações ϵ -(γ -glutamina)lisina catalisadas pela transglutaminase em soluções de isolado protéico de soro de leite, submetidas à desnaturação por DTT, impede a formação de associações hidrofóbicas entre as proteínas, diminuindo a viscosidade das soluções (EISSA e KHAN, 2006). O DTT quebra as ligações dissulfeto impedindo a formação de associações hidrofóbicas significativas. A transglutaminase produz ligações cruzadas que reduzem a exposição das moléculas hidrofóbicas através de impedimento estérico e a formação de moléculas compactas, o que afeta as interações físicas entre as proteínas, diminuindo a viscosidade da solução.

O efeito do pH no tratamento enzimático de proteínas isoladas do soro de leite avaliado pela incubação das amostras a 50 °C, por 5 horas, com 100 U de transglutaminase/g de proteína, em pH 6, 7 e 8 mostra através de SDS-PAGE a banda de β -lactoglobulina inalterada após o tratamento enzimático em valores de pH 6 e pH 7, mas se torna muito fraca em pH 8. No entanto, a α -lactoalbumina reage com a transglutaminase em todos os valores de pH, indicando que a α -lactoalbumina pode ser rapidamente polimerizada pela transglutaminase em diferentes valores de pH, enquanto a β -lactoglobulina requer condições do meio fracamente alcalinas (EISSA, BISRAM e KHAN, 2004).

As modificações nos resíduos de glutamina e lisina da α -lactoalbumina após a reação enzimática com transglutaminase microbiana ocorre em um máximo de cinco (5) lisinas e cinco (5) glutaminas que podem ser modificadas pela enzima, dependendo da temperatura, pH, presença e ausência de cálcio. Cinco (5) glutaminas (39, 43, 54, 65 e 117) e cinco (5) lisinas (5, 13, 16, 108 e 114) são disponíveis para modificação por transglutaminase na apo- α -lactoalbumina, enquanto que nenhum glutamina e quatro (4) lisinas (13, 16, 108, 114) são disponíveis na holo- α -lactoalbumina (NIEUWENHUIZEN et al., 2003). A polimerização das proteínas pela transglutaminase é afetada pela disponibilidade dos resíduos de glutamina e lisina na superfície da proteína, como também pode ser potencialmente influenciada pela compatibilidade termodinâmica de uma mistura de substratos protéicos pelo centro ativo da enzima (HAN e DAMODARAN, 1996).

Quando uma mistura de β -caseína e β -lactoglobulina é incubada com transglutaminase a 2 U/g de proteína, a concentração de β -caseína monomérica diminui e várias bandas de polímeros de alto peso molecular aparecem em SDS-PAGE. A intensidade dos monômeros de β -lactoglobulina permanece a mesma nas amostras tratadas, indicando que a β -lactoglobulina não faz parte na reação de polimerização induzida pela transglutaminase. No entanto, a β -lactoglobulina sozinha tratada enzimaticamente com transglutaminase apresenta diminuição significativa nas bandas de seus monômeros (HAN e DAMODARAN, 1996). Esses resultados indicam que em um sistema protéico simples a β -lactoglobulina atua como substrato para a transglutaminase, enquanto que na presença de β -caseína, não é utilizada pela enzima. β -Caseína e β -lactoglobulina não se aproximam simultaneamente do centro ativo da

enzima; esse fenômeno deve estar relacionado em parte à incompatibilidade termodinâmica da mistura dessas duas proteínas pelo centro ativo da transglutaminase.

O aumento na força iônica da solução diminui a efetividade da reação de polimerização das cadeias de proteínas do soro. Altas concentrações de sal favorecem o aparecimento de bandas mais escuras de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, indicando uma maior concentração de frações protéicas não polimerizadas pela transglutaminase (EISSA, BISRAM e KHAN, 2004). Em forças iônicas altas ocorre a desnaturação protéica devido a interações eletrostáticas entre as cadeias de proteínas. Essa desnaturação altera a estrutura protéica da α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, mascarando os grupos catalíticos (glutamina e lisina) requeridos para a ação da enzima.

O efeito da polimerização da α -lactoalbumina pela transglutaminase avaliada antes e após o processo de emulsificação da solução protéica confere baixa estabilidade à emulsão controle (sem transglutaminase), provavelmente devido à estrutura secundária altamente ordenada da α -lactoalbumina, que impede o desdobramento na interface óleo-água. A polimerização das proteínas antes da emulsificação leva a menor estabilidade da emulsão, atribuída à quantidade reduzida de proteína na interface; enquanto a polimerização das proteínas após o processo de emulsificação leva a formação de emulsões mais estáveis (SHARMA, ZAKORA e QVIST, 2002b). Emulsões protéicas de β -lactoglobulina tratadas com transglutaminase após o processo de emulsificação apresentam menor efetividade emulsificante pelo tratamento enzimático. Devido à polimerização da β -lactoglobulina reduzir a flexibilidade molecular da proteína globular, sua efetividade em envolver a nova interface óleo-água para formar uma camada mais estável é menor (DICKINSON e YAMAMOTO, 1996).

A alteração correspondente ao módulo elástico e viscoso após a adição de GDL (glucono- δ -lactona) às soluções protéicas na elaboração de géis ácidos de proteínas do soro polimerizadas por transglutaminase resulta em maior módulo elástico (G') para a amostra tratada enzimaticamente comparada à amostra controle (não tratada). Uma vez que G' está relacionado ao grau de polimerização, isso sugere a presença de ligações cruzadas adicionais nas amostras tratadas com transglutaminase. A presença da polimerização protéica (ligações

ϵ -(γ -glutamina)lisina), fortalece a rede estrutural e confere um aumento de 50 % na força de quebra do gel formado (EISSA, BISRAM e KHAN, 2004).

A estabilidade térmica do leite é sensível a vários fatores de sua composição (pH, sais e proteínas do leite) e processos de tratamento (pré-aquecimento, concentração, homogeneização), que podem causar coagulação parcial ou completa durante o processamento ou gelificação durante o armazenamento (SINGH e CREAMER, 1992 apud O'SULLIVAN, KELLY e FOX, 2002). O tratamento de proteínas com transglutaminase pode modificar suas propriedades de hidratação, gelificação, reologia, emulsificação e estabilidade térmica (ANEMA et al., 2005; PIETRASIK, 2003; FAERGEMAND, OTTE e QVIST, 1998), através da incorporação de aminas, ligações cruzadas e reações de desaminação (MOTOKI e SEGURO, 1998).

O tratamento do leite com transglutaminase afeta sua estabilidade térmica. No leite cru a formação de ligações cruzadas entre as caseínas individuais é responsável por prevenir a dissociação da κ -caseína das micelas em valores de pH na região de mínima estabilidade. Em leites pré-aquecidos antes da incubação com transglutaminase, a desnaturação das proteínas do soro pode permitir a formação de ligações cruzadas pela transglutaminase entre as proteínas desnaturadas do soro e as caseínas individuais que, em combinação com as ligações cruzadas das caseínas, contribuiriam para o melhoramento da estabilidade térmica do leite a pH > 6,5 (O'SULLIVAN, KELLY e FOX, 2002).

O tratamento enzimático com transglutaminase na produção de géis ácidos a partir de leite produz gel com maior rigidez e tensão de quebra e menor permeabilidade que no leite não tratado indicando que a introdução de ligações covalentes cruzadas na rede de proteínas modifica marcadamente a estrutura do gel ácido (ANEMA et al., 2005).

Transglutaminase em iogurte

O enriquecimento da matéria seca (sólidos totais) e/ou conteúdo protéico, como também a adição de hidrocolóides tais como gelatina e amido são maneiras comuns de evitar problemas no processamento de iogurte, como a sinerese (LORENZEN et al., 2002). A elaboração de iogurte a partir de leite de cabra submetido ao pré-tratamento do leite com

transglutaminase microbiana (2 e 4 U/g) aumenta a viscosidade e diminui a sinerese das amostras de iogurte elaborados a partir deste leite, segundo o estudo realizado por Farnsworth et al. (2006). O efeito do tratamento com a enzima é mais significativo no melhoramento da viscosidade do iogurte comparado ao método de aumento do conteúdo de sólidos totais do leite. O tratamento enzimático com transglutaminase leva à polimerização das proteínas do leite, principalmente das caseínas, resultando no aumento da força do gel do iogurte. Resultados similares são encontrados para iogurtes elaborados a partir de leite bovino e nenhuma diferença significativa no conteúdo de nutrientes básicos entre as amostras controle e testes foi observada (FRANSWORTH et al., 2006).

O efeito da inativação térmica (30 °C/ 1 min) e da incubação da transglutaminase simultaneamente ao processo de fermentação (não inativada), na viscosidade e índice de sinerese de iogurtes sugerem que o aumento da viscosidade e a redução da sinerese dos iogurtes são mais efetivos quando a transglutaminase não é inativada (LORENZEN et al., 2002).

Reologia

Reologia é a ciência que estuda a deformação e o escoamento dos materiais. As determinações reológicas permitem que sejam obtidas informações sobre a forma como um determinado material reage quando submetido a forças externas (TABILO-MUNIZAGA e BARBOSA-CÁNOVAS, 2005; ALVES, 2003). A etimologia da palavra *rheologia* tem origem nos vocábulos gregos *rheo* = deformação e *logia* = ciência ou estudo (MACHADO, 2002).

A caracterização das propriedades reológicas de alimentos, exata e de confiança, é necessária para o controle de qualidade e vida de prateleira dos produtos, para o delineamento do processo de fluxo (ABU-JDAYIL, 2003); é importante, pois as determinações reológicas fornecem dados sobre a textura do material, afetando dessa maneira a percepção sensorial e a aceitabilidade do produto pelo consumidor (AICHINGER et al., 2003).

Alimentos fluidos e semi-sólidos exibem uma grande variedade de comportamentos reológicos abrangendo de Newtoniano a não Newtoniano tempo-dependente, independente e

viscoelástico. Alimentos fluidos contendo quantidades relativamente grandes de compostos de baixa massa molar e sem quantidade significativa de polímeros ou sólidos insolúveis exibem comportamento Newtoniano (RAO, 1999). Seguem a Lei de Newton, ou seja, a sua viscosidade é constante, independente da velocidade de deformação ou do tempo (ALVES, 2003); são influenciados apenas pela temperatura e pressão (MACHADO, 2002). Em fluidos newtonianos a taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) é diretamente proporcional à tensão de cisalhamento (σ), e o gráfico inicia na origem. Exemplos de fluidos newtonianos incluem água, xaropes de açúcar, a maioria das bebidas carbonatadas, óleos comestíveis, sucos de frutas filtrados e leite (RAO, 1999).

A tensão de cisalhamento (σ) é a força por unidade de área cisalhante, necessária para manter o escoamento do fluido. A resistência ao escoamento é quem solicita esta tensão, que pode ser expressa por (MACHADO, 2002) (1):

$$\sigma = F / S \quad (1)$$

Sendo: F – força aplicada na direção do escoamento (N, dina), S – área da superfície exposta ao cisalhamento (m^2 , cm^2)

A taxa de deformação ($\dot{\gamma}$), definida como o deslocamento relativo das partículas ou planos de fluido, está relacionada com a distância entre eles. A taxa de deformação é também denominada de grau de deformação ou gradiente de velocidade e pode também ser definida através de uma expressão matemática que relacione a diferença das velocidades entre duas partículas ou planos vizinhos com a distância entre eles (MACHADO, 2002) (2):

$$\dot{\gamma} = \Delta v / \Delta y \quad (2)$$

Sendo: Δv – diferença de velocidade entre duas camadas de fluido adjacentes (cm/s), Δy – distância entre elas (cm)

A relação entre a tensão cisalhante (σ) e a taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) define, de certo modo, o comportamento reológico dos líquidos considerados puramente viscosos. A equação

matemática entre estas duas variáveis é conhecida como equação de fluxo, e a sua representação gráfica é conhecida como *curva de fluxo* (MACHADO, 2002).

A viscosidade de um fluido pode aumentar de maneira linear ou não linear, com uma transição de comportamento Newtoniano para não-Newtoniano, proporcional ao aumento da concentração de sólidos totais. Essa alteração é devido a menor quantidade de água favorecer o aumento na fração do volume molecular e das interações entre as partículas, diminuindo a distância entre elas (PATOCKA et al., 2006).

A maioria dos fluidos apresenta comportamento que não é descrito pela Lei de Newton (TABILO-MUNIZAGA e BARBOSA-CÁNOVAS, 2005), apresentando variação da viscosidade com a velocidade da deformação, sendo classificado como fluido não-Newtoniano ou material viscoelástico (ALVES, 2003). Em fluidos não-Newtonianos os gráficos obtidos por tensão de cisalhamento (σ) *versus* taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) não são lineares e/ou não iniciam na origem, ou o material exibe comportamento reológico tempo-dependente como resultado de alterações estruturais do material (RAO, 1999).

Fluidos não-Newtonianos são classificados conforme o aspecto da curva de fluxo e correlação com alguma equação ou modelo matemático. A viscosidade desses fluidos não é única e varia com a magnitude da taxa de deformação ($\dot{\gamma}$). Para descrever as curvas de viscosidade destes materiais são utilizados modelos matemáticos na descrição do comportamento reológico (ALVES, 2003).

Modelo Lei da Potência

O gráfico tensão de cisalhamento (σ) *versus* taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) torna-se linear quando plotado em coordenadas logarítmicas (RAO, 1999), sendo possível o modelo Lei da Potência descrever os dados de fluidos pseudoplásticos (*shear-thinning*) e dilatantes (*shear-thickening*) (MANICA e de BORTOLI, 2004). O modelo Lei da Potencia (3) não se aplica a todo e qualquer fluido, nem a todo intervalo de taxa de deformação, no entanto, um número razoável de fluidos não-Newtonianos apresentam comportamento que podem ser descritos por esta lei (MACHADO, 2002).

$$\sigma = K \left(\dot{\gamma} \right)^n \quad (3)$$

Sendo: σ – tensão de cisalhamento (Pa), K – índice de consistência ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$), $\dot{\gamma}$ – taxa de deformação (s^{-1}), n – índice de comportamento de fluxo (adimensional).

O índice de comportamento de fluxo reflete a proximidade do fluido ao comportamento Newtoniano. Para fluido Newtoniano ($n=1$), o índice de consistência (K) é igual à viscosidade do fluido (RAO, 1999). Quando $n<1$ o fluido é pseudoplástico (*shear-thinning*); quando $n>1$ o fluido é de natureza dilatante (*shear-thickening*) (PIAU e DEBIANE, 2005).

Modelo Herschel-Bulkley

Quando o limite de escoamento de um alimento é determinado, este pode ser incluído no Modelo Lei da Potência, e o modelo é então denominado Modelo Herschel-Bulkley (4) (RAO, 1999).

$$\sigma = \sigma_0 + K \left(\dot{\gamma} \right)^n \quad (4)$$

Sendo: σ – tensão de cisalhamento (Pa); σ_0 – limite de escoamento (Pa); K – índice de consistência ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$); $\dot{\gamma}$ – taxa de deformação (s^{-1}); n – índice de comportamento de fluxo (adimensional).

O Modelo Herschel-Bulkley é o modelo reológico geralmente utilizado para fluidos não-Newtonianos, especialmente purês e pastas. Embora o Modelo Lei da Potência seja empregado extensivamente para caracterização de alimentos, incluindo alimentos pseudoplásticos (*shear-thinning*), ele falha ao predizer o comportamento de fluido em taxas de cisalhamento muito baixas (DUTTA et al., 2006). O Modelo Herschel-Bulkley é extensamente utilizado, pois permite considerações tanto do limite de escoamento quanto dos efeitos de fluidos pseudoplásticos (JIE e KE-QIN, 2006).

Modelo Casson

O modelo de Casson é um modelo reológico bem conhecido para descrição de comportamento de fluidos não-Newtonianos com limite de escoamento; é utilizado em diversas dispersões de alimentos, embora tenha sido desenvolvido para a caracterização de tintas para impressora (HUIGOL e YOU, 2005; RAO, 1999). Para alimentos que seguem o modelo de Casson, uma linha reta resulta quando a raiz quadrada da taxa de cisalhamento é plotada contra a raiz quadrada da tensão de cisalhamento (5) (RAO, 1999).

$$\sigma^{0,5} = K_{oc} + K_c \times \left(\dot{\gamma} \right)^{0,5} \quad (5)$$

Sendo: σ – tensão de cisalhamento (Pa); K_{oc} – limite de escoamento (Pa); K_c – viscosidade plástica de Casson (Pa.s); $(\dot{\gamma})$ – taxa de deformação (s^{-1}).

O limite de escoamento de Casson é calculado como o quadrado do intercepto, $\sigma_{oc} = (K_{oc})^2$, e a viscosidade plástica de Casson é calculada como o quadrado da inclinação da reta, $\eta_c = (K_c)^2$.

O modelo de Casson foi desenvolvido para suspensões viscosas de partículas cilíndricas. Indiferentemente da forma ou tipo de suspensão, alguns fluidos são particularmente bem descritos por este modelo devido a sua natureza pseudoplástica com limite de escoamento não linear (ex., sangue, chocolate, soluções de goma xantana) (JOYE, 2003).

Alimentos que exibem comportamento pseudoplástico dependente do tempo apresentam comportamento de fluxo tixotrópico ou reopético (RAO, 1999). Um material é denominado tixotrópico se ele sofre uma transformação isotérmica gel-sol-gel sob agitação constante e subsequente repouso (BARNES, 1997).

A maioria dos alimentos que exhibe este comportamento são sistemas heterogêneos em que suas moléculas são mantidas unidas por interações fracas. Quando as forças hidrodinâmicas durante o cisalhamento são suficientemente grandes, as ligações

interpartículas são rompidas, resultando na diminuição do tamanho das unidades estruturais que, por sua vez, oferece menor resistência ao fluxo durante o cisalhamento (RAO, 1999).

A caracterização das propriedades reológicas de sistemas alimentícios dependentes do tempo é importante para relacionar estrutura e fluxo, correlacionando parâmetros físicos com a avaliação sensorial (ABU-JDAYIL, 2003). Segundo Weltmann (1943), três diferentes testes são sugeridos para determinar a tixotropia de um material; cada teste por si mesmo é suficiente para esta identificação. (1) A presença de tixotropia em um material pode ser observada pelo aumento contínuo de quebra estrutural proporcional ao aumento da taxa de deformação; (2) pode ser evidenciada pela reconstituição da estrutura do material sob repouso após agitação prévia; (3) e pelo aumento contínuo de quebra estrutural em função do tempo, sob agitação constante. O modelo proposto por Weltmann (1943) é descrito pela Equação 6, onde o material é submetido à taxa de deformação constante por um período de tempo, até atingir o equilíbrio.

$$\sigma = \sigma_0 - B \log t \quad (6)$$

Sendo: σ – tensão de cisalhamento (Pa), σ_0 – tensão inicial requerida (Pa), B – coeficiente de ruptura tixotrópica, t – tempo (s).

A maioria dos produtos alimentícios é de natureza complexa, e sua viscosidade depende não somente da temperatura e composição, mas também da tensão, taxa e tempo de cisalhamento, como também da história térmica e de cisalhamento do produto (ABU-JDAYIL, 2003). Produtos lácteos, tais como queijos fermentados (PRUDÊNCIO, 2006), manteiga (BUTLER e McNULTY, 1995) e iogurte (MAGENIS et al., 2005; ABU-JDAYIL, 2003) são sistemas coloidais formados por partículas de fosfato de cálcio, gordura e vários tipos de proteínas, suspensos em um sistema aquoso complexo; desenvolvem uma delicada rede estrutural (gel) durante a fermentação, exibindo comportamento reológico dependente do tempo, ou seja, tixotropia.

Comportamento reológico de soro de leite

Proteínas concentradas do soro de leite são comumente utilizadas como ingredientes em produtos alimentícios devido ao seu alto valor nutricional (fonte de aminoácidos essenciais) e por sua excelente funcionalidade tecnológica, apresentando diversas características funcionais tais como formação de gel, espumas e capacidade emulsificante (DAUBERT et al., 2006; PATOCKA et al., 2006). A gelificação das proteínas do soro de leite é resultado de interações tanto físicas (eletrostática e hidrofóbica) quanto químicas (dissulfeto) entre os constituintes das moléculas de proteína. A desestabilização da estrutura terciária das proteínas aumenta suas interações; causa principal da formação de uma rede estável e gelificação (VLIET, LAKEMOND e VISSCHERS, 2004).

Soluções de proteínas concentradas do soro de leite apresentam comportamento reológico característico de fluido Newtoniano quando preparadas em concentrações na faixa de 2 a 8 % (m/m), quando esta concentração aumenta para 10 a 24,5 % (m/m) a tensão de cisalhamento requerida aumenta, assim como o comportamento pseudoplástico (*shear-thinning*) das amostras. Soluções de proteínas concentradas do soro de leite a 32 % (m/m) apresentam comportamento pseudoplástico (*shear-thinning*) e tixotrópico (LIZARRAGA, 2006). Resultados similares foram encontrados por Patocka et al. (2006); uma alteração visível nas curvas de fluxo foi observada para soluções de concentrado protéico de soro de leite em concentrações acima de 35 %, apresentando comportamento pseudoplástico.

Os estudos das alterações das propriedades reológicas das proteínas do soro de leite submetidas à reação de polimerização com a transglutaminase, tanto na forma solúvel como imobilizada, são limitados (TRUONG et al., 2004).

A viscosidade intrínseca e a viscosidade de cisalhamento foram utilizadas para determinar o comportamento de fluxo das proteínas isoladas do soro adicionadas de transglutaminase antes do aquecimento e formação do gel (WILCOX e SWAISGOOD, 2002). A viscosidade intrínseca é uma medida das propriedades moleculares de cada biopolímero em solução, em relação ao volume hidrodinâmico dos biopolímeros e é afetada pelo peso molecular e forma das moléculas. Neste estudo foi observado um aumento na viscosidade intrínseca das soluções que foram tratadas por mais tempo com a transglutaminase indicando que, em média, biopolímeros maiores e menos esféricos foram formados. A maior taxa de

deformação levou a uma diminuição na viscosidade aparente, enquanto que o aumento do tempo de tratamento resultou em maiores valores de índice de consistência (K). O índice de comportamento de fluxo (n) e o índice de consistência (K) foram obtidos a partir da curva tensão de cisalhamento *versus* taxa de deformação, aplicando-se o modelo Lei da Potência (3). Foi observado que com a adição de transglutaminase às proteínas isoladas de soro de leite, o valor de (n) aproximou-se cada vez mais de 0 (zero), favorecendo o comportamento de fluido não-Newtoniano das amostras (WILCOX e SWAISGOOD, 2002).

A temperatura de gelificação protéica do soro de leite também é influenciada pela transglutaminase. Amostras de proteínas isoladas de soro de leite tratadas com transglutaminase por 1 hora exibiram uma temperatura de ponto gel de 65,6 °C, sendo levemente menor que a amostra não tratada com a enzima, de 67,7 °C. A rede do gel foi parcialmente formada durante a reação enzimática com a transglutaminase requerendo menos calor para a gelificação do que seria necessário para as soluções de proteínas não tratadas (TRUONG et al., 2004).

Análise instrumental de textura

Textura é um atributo de parâmetros múltiplos que corresponde à manifestação sensorial e funcional das propriedades estruturais, mecânicas e de superfície de alimentos, detectados através dos sentidos de visão, audição, tato e medidas cinéticas (SZCZESNIAK, 2002). Junto à textura, aparência e *flavor* são os fatores sensoriais principais que determinam a aceitabilidade dos alimentos pelo consumidor (BOURNE, 1978). Portanto, o desenvolvimento de métodos experimentais objetivos e precisos tem sido um alvo importante para a tecnologia de alimentos nas últimas décadas, permitindo o estudo das propriedades mecânicas de alimentos relacionados à textura (PONS e FISZMAN, 1996).

A classificação dos termos de textura para alimentos sólidos e semi-sólidos deu origem ao método de descrição do perfil de textura instrumental (TPA), aplicável tanto para medidas instrumentais como para análises sensoriais. As definições dos parâmetros obtidos através do perfil de análise instrumental para alimentos semi-sólidos estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Definição dos parâmetros de textura instrumental de alimentos semi-sólidos.

Parâmetro de textura	Definição
Fraturabilidade	Força necessária para a primeira quebra (fratura) significativa da estrutura do produto.
Firmeza	Força máxima na primeira compressão, representa a força necessária para obter a deformação resultante.
Adesividade	Trabalho necessário para retirar a sonda do interior do produto, obtido pela área negativa do primeiro ciclo.
Coesividade	Representa a força das ligações internas do produto, obtida dividindo a área positiva do segundo ciclo pela área positiva do primeiro ciclo.
Elasticidade	Corresponde à recuperação da condição original do produto após a sua deformação, obtida dividindo a altura recuperada pelo produto do segundo ciclo pela altura obtida no primeiro ciclo.
Gomosidade	Força necessária para desintegrar um alimento semi-sólido, definido pelo produto da firmeza x coesividade.
Mastigabilidade	Trabalho necessário para mastigar um alimento sólido, definido pelo produto da gomosidade x elasticidade.

Fonte: PONS e FISZMAN, 1996; TUNICK, 2000.

O método instrumental de descrição do perfil de textura envolve a compressão da substância em teste por uma sonda que perfura ou comprime o alimento e retorna ao ponto de origem; a operação é repetida, mimetizando a ação da maxila durante a mordida (PONS e FISZMAN, 1996; TUNICK, 2000). A quantificação dos parâmetros mecânicos de textura é realizada a partir da curva de deformação – força em função do tempo – gerada pelo texturômetro (Figura 4). A curva fornece sete parâmetros de textura, cinco obtidos pela curva

e dois calculados a partir das medidas obtidas. Estes parâmetros são denominados fraturabilidade, firmeza, coesividade, adesividade, elasticidade, gomosidade e mastigabilidade.

A textura apresenta um importante papel na aceitação de iogurtes pelos consumidores. Iogurtes elaborados a partir da redução de sólidos gordurosos apresentam textura pobre, onde normalmente a gordura removida é substituída por leite em pó desnatado, caseinato de sódio, ou concentrados protéicos de soro de leite. A quantidade requerida desses ingredientes necessária para alcançar o conteúdo de sólidos totais similar ao iogurte integral pode levar a um desenvolvimento ácido excessivo a partir da fermentação da lactose, firmeza excessiva, maior expulsão do soro, e textura granular (SANDOVAL-CASTILLA et al., 2004).

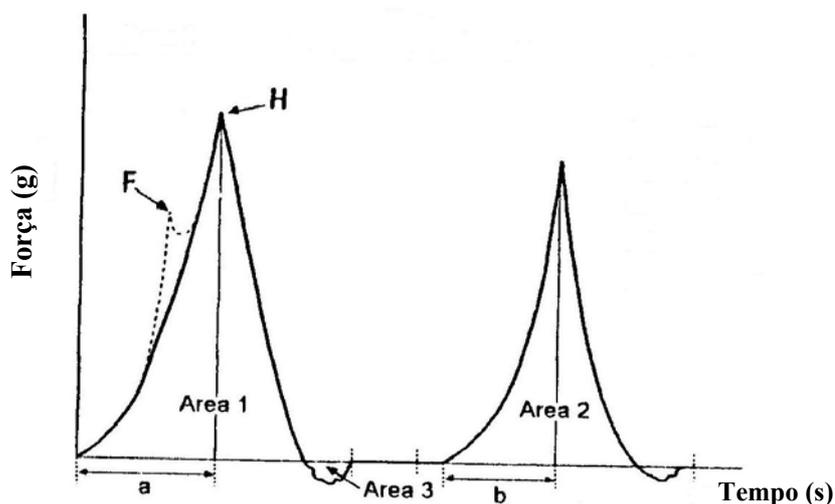


Figura 4. Representação gráfica do perfil de análise instrumental de textura – F: fraturabilidade; H: firmeza; Área 3: adesividade; Área 2 / Área 1: coesividade; b / a: elasticidade (FISZMAN, PONS e DAMÁSIO, 1998).

Uma textura extremamente firme em um gel ácido, como o iogurte, pode ser causada por fatores tais como alto conteúdo de sólidos totais da mistura, adição de estabilizadores, ou uma temperatura muito baixa de gelificação. Um gel de corpo fraco ou fino (textura pobre) poder ser causado pelo baixo conteúdo de sólidos totais da mistura, tratamento térmico do leite insuficiente, baixa acidez e alta temperatura de gelificação (LUCEY e SINGH, 1998).

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Eletroforese é um método onde moléculas carregadas em solução, normalmente proteínas e ácidos nucleicos, migram sob influência de um campo elétrico. Sua razão de migração através do campo elétrico depende da força do campo, da carga da rede, do tamanho e forma das moléculas, da força iônica, viscosidade e temperatura do meio (PATEL, 1994). A eletroforese é um método de análise simples, rápido e altamente sensível (SHI e JACKOWSKI, 1998; PATEL, 1994).

Geralmente a separação das macromoléculas da amostra é realizada em uma matriz suporte tal como gel de agarose ou poliacrilamida. O gel de poliacrilamida é utilizado para analisar tamanho, quantidade, pureza e o ponto isoelétrico de polipeptídeos e proteínas. A eletroforese em gel de poliacrilamida uni-dimensional é uma técnica relativamente simples. Entre as diferentes técnicas, a eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS) descontínuo, originalmente descrito por Laemmli (1970), é o sistema mais utilizado em que as proteínas são fracionadas estritamente pelo seu peso molecular (SHI e JACKOWSKI, 1998).

A identificação das proteínas β -lactoglobulina e α -lactoalbumina liofilizadas de soro líquido, de concentrado protéico de soro e proteínas isoladas de soro de leite foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) na presença de SDS seguindo a metodologia de Laemmli (1970), em um sistema descontínuo composto por um gel de empacotamento (4 %) e gel de separação (12 %) (ALOMIRAH e ALLI, 2004).

Para avaliar a polimerização das proteínas do soro de leite por transglutaminase o método de análise de eletroforese utilizado normalmente segue a metodologia de Laemmli (1970). Como as proteínas do soro possuem baixo peso molecular (β -lactoglobulina = 18.400 g/mol e α -lactoalbumina = 14.200 g/mol), e os polímeros formados possuem alto peso molecular, o padrão de peso molecular utilizado deve apresentar ampla faixa de variação.

O'Sullivan, Kelly e Fox (2002) avaliaram a estabilidade térmica do leite pela adição de transglutaminase e realizaram a eletroforese seguindo a metodologia de Laemmli (1970), em um sistema descontínuo composto por um gel de empacotamento (3,75 %) e gel de separação (13,5 %), padrão protéico de faixa de peso molecular variando de 14,2 a 116 Kg/mol, obtendo

a separação protéica desejada, sendo possível a visualização tanto das proteínas do soro quanto dos polímeros formados.

A polimerização de proteínas isoladas de soro de leite foi avaliada por Eissa, Bisram e Khan (2004) e a eletroforese foi realizada em sistema descontínuo composto por gel de empacotamento (4 %) e gel de separação (15 %), seguindo a metodologia proposta por Laemmli (1970). Para a observação das bandas protéicas foi utilizado padrão protéico com faixa de variação de 6.400 - 198.000 g/mol.

Referências Bibliográficas

ABOUMAHMOUD, R.; SAVELLO, P. Crosslinking of whey protein by transglutaminase. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 256-263, 1990.

ABU-JDAYIL, B. Modelling the time-dependent rheological behaviour of semisolid foodstuffs. **Journal of Food Engineering**, v. 57, p. 97-102, 2003.

ADOLFSSON, O.; MEYDANI, S.N.; RUSSELL, R.M. Yogurt and gut function. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, p. 245-256, 2004.

AICHINGER, P.-A.; MICHEL, M.; SERVAIS, C.; DILLMAN, M.-L.; ROUVET, M.; D'AMICO, N.; ZINK, R.; KLOSTERMEYER, H.; HORNE, D.S. Fermentation of a skim milk concentrate with *Streptococcus thermophilus* and chimosin: structure, viscoelasticity and syneresis of gels. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 31, p. 243-255, 2003.

ALOMIRAH, H.F.; ALLI, I. Separation and characterization of β -lactoglobulin and α -lactalbumin from whey and whey protein preparations. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 411-419, 2004.

ALVES, M.M.M. **A Reologia**. In: de Castro, A.G. A Química e a Reologia no Processamento dos Alimentos. Instituto Piaget: Lisboa, p. 37-61, 2003.

ANDERSON, P.J.; BROOKS, C.L.; BERLINER, L.J. Functional identification of calcium binding residues in bovine α -lactalbumin. **Biochemistry**, n. 36, p. 11648-11654, 1997.

ANDERSON, J.W.; GILLILAND, S.E. Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 43-50, 1999.

ANDO, H.; ADACHI, M.; UMEDA, K.; MATSURA, A.; NONAKA, M.; UCHIO, R.; TANAKA, H.; MOTOKI, M. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.53, n.10, p.2613-2617,1989.

ANEMA, S.G.; LAUBER, S.; LEE, S.K.; HENLE, T.; KLOSTERMEYER, H. Rheological properties of acid gels prepared from pressure- and transglutaminase-treated skim milk. **Food Hydrocolloids**, v.19, p. 879-887, 2005.

AKTAS, N.; KILIÇ, B. Effect of microbial transglutaminase on thermal and electrophoretic properties of ground beef. **Lebensmittel - Wissenschaft und - Technologie**, v. 38, p. 815-819, 2005.

BARNES, H.A. Thixotropy – a review. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, v. 70, p. 1-33, 1997.

- BESHKOVA, D.M.; SIMOVA, E.D.; FRENGOVA, G.I.; SIMOV, Z.I.; ADILOV, E.F. Production of amino acids by yogurt bacteria. **Biotechnological Progress**, v. 14, p. 963-965, 1998.
- BOURNE, M.C. Texture profile analysis. **Food Technology**, v. 32, n. 7, p. 62-66, 1978.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Resolução nº 5, de 13 de novembro de 2000. Oficializar os “Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados”. **Diário Oficial da União**, de 27 de novembro de 2000, seção 1, página 9, Brasília, DF.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 348, de 02 de dezembro de 2003. Aprova de forma complementar ao Anexo da Resolução CNNPA nº 24 de 1976, a utilização de enzimas na indústria de alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF.
- BUTLER, F.; McNULTY, P. Time dependent rheological characterization of buttermilk at 5°C. **Journal of Food Engineering**, v. 25, p. 569-580, 1995.
- CANO, P.G.; AGÜERO, G.; PERDIGÓN, G. Immunological effects of yogurt addition to a re-nutrition diet in a malnutrition experimental model. **Journal of Dairy Research**, v. 69, p. 303-316, 2002.
- CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L.; LORIENT, D. **Proteínas Alimentarias: Bioquímica. Propriedades funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas**. Editorial Acribia. Zaragoza, Espanha, p.179-220, 1989.
- CHRISTENSEN, B.M.; SORENSEN, E.S.; HOJRUP, P.; PETERSEN, T.E.; RASMUSSEN, L.K. Localization of potential transglutaminase cross-linking sites in bovine caseins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1943-1947, 1996.
- CHRYSINA, E.D.; BREW, K.; ACHARYA, K.R. Crystal structures of apo- and holo-bovine α -lactalbumin at 2,2 Å resolution reveal an effect of calcium on inter-lobe interactions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 47, p. 37021-37029, 2000.
- CLARKE, D.D.; MYCEK, M.J.; NEIDLE, A.; WAELSCH, H. The incorporation of amines into protein. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 79, p. 338-354, 1959.
- COLLAR, C.; BOLLAÍN, C.; ANGIOLONI, A. Significance of microbial transglutaminase on the sensorial, mechanical and crumb grain pattern of enzyme supplemented fresh pan breads. **Journal of Food Engineering**, v. 70, p. 479-488, 2005.
- COZZOLINO, A.; PIERRO, P.D.; MARINIELLO, L.; SORRENTINO, A.; MASI, P.; PORTA, R. Incorporation of whey proteins into cheese curd by using transglutaminase. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 38, p. 289-295, 2003.
- DATE, M.; YOKOYAMA, K.; UMEZAWAY, Y.; MATSUI, H.; KIKUCHI, Y. Production of native-type *Streptovorticillium mobaraense* transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 5, p. 3011-3014, 2003.

DAUBERT, C.R.; HUDSON, H.M.; FOEDING, E.A.; PRABHASANKAR, P. Rheological characterization and electrokinetic phenomena of charged whey protein dispersions of defined sizes. **Lebensmittel - Wissenschaft und – Technologie**, v. 39, p. 206-215, 2006.

DICKINSON, E. Enzymatic crosslinking as a tool for food colloid rheology control and interfacial stabilization. **Trends in Food Science and Technology**, v. 8, p. 334-339, 1997.

DICKINSON, E.; YAMAMOTO, Y. Rheology of milk protein gels and protein-stabilized emulsion gels cross-linked with transglutaminase. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 44, p. 1371-1377, 1996.

DONDERO, M.; FIGUEROA, V.; MORALES, X.; CUROTTO, E. Transglutaminase effects on gelation capacity of thermally induced beef protein gels. **Food Chemistry**, *in press*, 2006.

DUTTA, D.; DUTTA, A.; RAYCHAUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. Rheological characteristics and thermal degradation kinetics of beta-carotene in pumpkin puree. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 538-546, 2006.

EISSA, A.S.; BISRAM, S.; KHAN, S.A. Polymerization and gelation of whey protein isolates at low pH using transglutaminase enzyme. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 4456-4464, 2004.

EISSA, A.S.; KHAN, S.A.; Modulation of hydrophobic interactions in denatured whey proteins by transglutaminase enzyme. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 543-547, 2006.

FAERGEMAND, M.; OTTE, J.; QVIST, K.B. Enzymatic cross-linking of whey proteins by a Ca^{2+} -independent microbial transglutaminase from *Streptomyces lydicus*. **Food Hydrocolloids**, v. 11, n. 1, p. 19-25, 1997.

FAERGEMAND, M.; OTTE, J.; QVIST, K.B. Emulsifying properties of milk proteins cross-linked with microbial transglutaminase. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 715-723, 1998.

FAERGEMAND, M.; MURRAY, B.S.; DICKINSON, E.; QVIST, K.B. Cross-linking of adsorbed casein films with transglutaminase. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 343-346, 1999.

FARKAS, V.; VASS, E.; HANSSSENS, I.; MAJER, Z.; HOLLÓSI, M. Cyclic peptide models of the Ca^{2+} -binding loop of α -lactalbumin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 5310-5320, 2005.

FARNSWORTH, J.P.; LI, J.; HENDRICKS, G.M.; GUO, M.R. Effects of transglutaminase treatment on functional properties and probiotic cultures survivability of goat milk yogurt. **Small Ruminant Research**, v. 65, p. 113-121, 2006.

FARREL, H.M.; JIMENEZ-FLORES, R.; BLECK, G.T.; BROWN, E.M.; BUTLER, J.E.; CREAMER, L.K.; HICKS, C.L.; HOLLAR, C.M.; NG-KWAI-HANG, K.F.; SWAISGOOD,

H.E. Nomenclature of the proteins of cow's milk: sixth revision. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 1641-1674, 2004.

FIZSMAN, S.M.; PONS, M.; DAMÁSIO, M.H. New parameters for instrumental texture profile analysis: instantaneous and retarded recoverable springiness. **Journal of Texture Studies**, v. 29, p. 499-508, 1998.

FRANCO, G. **Tabela de Composição Química dos Alimentos**. 9ed. São Paulo: Atheneu, 1992.

FOLK, J.E.; FINLAYSON, J.S. The ϵ -(γ -glutamyl)lysine cross-link and the catalytic role of transglutaminase. **Advances in Protein Chemistry**, v. 31, p. 1-133, 1977.

FOX, P.F. Milk protein as food ingredients. **International Journal of Dairy Technology**, n. 54, p. 41-55, 2001.

GIRALDO-ZUÑIGA, A.D.; COIMBRA, J.S.R.; GOMES, J.C.; MINIM, L.A.; ROJAS, E.E.G. Propriedades funcionais e nutricionais das proteínas do soro de leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 325, n. 57, p. 35-46, 2002.

HAN, X.-D.; DAMODARAN, S. Thermodynamic compatibility of substrate proteins affects their cross-linking by transglutaminase. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 44, p. 1211-1217, 1996.

HEPNER, G.; FRIED, R.; JEOR, S.S; FUSETTI, L.; MORIN, R. Hypocholesterolemic effect of yogurt and milk. **The American of Clinical Nutrition**, v. 32, p. 19-24, 1979.

HINRICHS, J. Incorporation of whey protein in cheese. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 495-503, 2001.

HONG, Y., CREAMER, L.K. Changed protein structures of bovine β -lactoglobulin B and α -lactalbumin as a consequence of heat treatment. **International Dairy Journal**, n. 12, p. 345-359, 2002.

HUILGOL, R.R.; YOU, Z. Application of the augmented Lagrangian method to steady pipe flows of Bingham, Casson and Herschel-Bulkley fluids. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, v. 128, p. 126-143, 2005.

JIE, P.; KE-QIN, Z. Drag force of interacting coaxial spheres in viscoplastic fluids. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, v. 135, p. 83-91, 2006.

JOYE, D.D. Shear rate and viscosity corrections for a Casson fluid in cylindrical (Couette) geometries. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 267, p. 204-210, 2003.

JONES, T.T.; FERNANDEZ, E.J. α -Lactalbumin tertiary structure changes on hydrophobic interaction chromatography surfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 259, p. 27-35, 2003.

- KANAJI, T.; OZAKI, H.; TAKAO, T.; KAWAJIRI, H.; IDE, H.; MOTOKI, M.; SHIMONISHI, Y. Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* sp. Strain S-8112. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 16, p. 11565-11572, 1993.
- KANG, H.; CHO, Y.D. Purification and properties of transglutaminase from soybean (*Glycine max*) leaves. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 223, p. 288-292, 1996.
- KRÜGER, C.C.H.; CENI, G.C.C.; SGARBIERI, V.C.; CÂNDIDO, L.M.B. Propriedades hidrofílicas de concentrados protéicos de leite bovino. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 36, n. 2, p. 122-127, 2002.
- KURAISHI, C.; YAMAZAKI, K.; SUSU, Y. Transglutaminase: Its utilization in the food industry. **Food Reviews International**, v. 17, n. 2, p. 221-246, 2001.
- KÜTEMAYER, C.; FROECK, M.; WERLEIN, H.D.; WATKINSON, B.M. The influence of salts and temperature on enzymatic activity of microbial transglutaminase. **Food Control**, v. 16, p. 735-737, 2005.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LASTOWKA, A.; MAFFIA, G.F.; BROWN, E.M. A comparison of chemical, physical and enzymatic cross-linking of bovine type I collagen fibrils. **JALCA**, v. 100, p. 196-202, 2005.
- LE BON, C.; DURAND, D.; NICOLAI, T. Influence of genetic variation on the aggregation of heat-denatured β -lactoglobulin. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 671-678, 2002.
- LEE, W.J.; LUCEY, J.A. Structure and physical properties of yogurt gels: effect of inoculation rate and incubation temperature. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 3153-3164, 2004.
- LINDEN, G.; LORIENT, D. **Bioquímica Industrial: Revalorización alimentaria de la producción agrícola**. Editorial Acribia, Zaragoza, Espanha. p.221,1994.
- LIZARRAGA, M.S.; PIANTE VICIN, D.De; GONZÁLEZ, R.; RUBIOLO, A.; SANTIAGO, L.G. Rheological behaviour of whey protein concentrate and λ -carrageenan aqueous mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 740-748, 2006.
- LORAND, L. Transglutaminase: Remembering Heinrich Waelsch. **Neurochemistry International**, v. 40, p. 7-12, 2002.
- LORENZEN, P.C.; NEVE, H.; MAUTNER, A.; SCHLIMME, E. Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. **International Journal of Dairy Technology**, v. 55, n. 3, p. 152-157, 2002.

LUCEY, J.A. Cultured dairy products: an overview of their gelation and texture properties. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, p. 77-84, 2004.

LUCEY, J.A.; SINGH, H. Formation and physical properties of acid milk gels: a review. **Food Research International**, v. 30, n. 7, p. 529-542, 1998.

MACHADO, J.C.V. **Reologia e Escoamento de Fluidos: Ênfase na Indústria do Petróleo**. Editora Interciência: Rio de Janeiro, p. 1-37, 2002.

MAGENIS, R.B.; PRUDÊNCIO, E.S.; AMBONI, R.D.M.C.; CERQUEIRA-JÚNIOR, N.G.; OLIVEIRA, R.V.B.; SOLDI, V.; BENEDET, H.D. Compositional and physical properties of yogurts manufactured from milk and whey cheese concentrated by ultrafiltration. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 40, p. 1-9, 2005.

MANICA, R.; de BORTOLI, A.L. Simulation of sudden expansion flows for power law fluids. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, v. 121, p. 35-40, 2004.

MATSUMURA, Y.; LEE, D-S.; MORI, T. Molecular weight distributions of α -lactalbumin polymers formed by mammalian and microbial transglutaminases. **Food Hydrocolloids**, v. 14, p. 49-59, 2000.

MCCRAE, C.H.; LAW, A.J.R.; LEAVER, J. Emulsification properties of whey proteins in their natural environment: effect of whey protein concentration at 4% and 18% milk fat. **Food Hydrocolloids**, n. 13, p. 389-399, 1999.

MORR, C.; HÁ, E.W. Whey protein concentrates and isolates processing and functional properties critical reviews. **Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, 431-476, 1993.

MOTOKI, M.; SEGURO, K. Transglutaminase and its use for food processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, p. 204-210, 1998.

MUGURAMA, M.; TSURUOKA, K.; KATAMAYMA, K.; ERWANTO, Y.; KAWAHARA, S.; YAMAUCHI, K.; SATHE, S.K.; SOEDA, T. Soybean and milk proteins modified by transglutaminase improves chicken sausage texture even at reduced levels of phosphate. **Meat Science**, v. 63, p. 191-197, 2003.

NIELSEN, G.S.; PETERSEN, B.R.; MOLLER, A.J. Impact of salt, phosphate and temperature on the effect of a transglutaminase (F XIIIa) on the texture of restructured meat. **Meat Science**, v. 41, n. 3, p. 293-299, 1995.

NIEUWENHUIZEN, W.F.; DEKKER, H.L.; KONING, L.J.; GRÖNEVELD, T.; KOSTER, C.G.; JONG, G.A.H. Modification of glutamine and lysine residues in holo and apo α -lactalbumin with microbial transglutaminase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7132-7139, 2003.

NONAKA, M.; TANAKA, H.; OKIYAMA, A.; MOTOKI, M.; ANDO, H.; UMEDA, K.; MATSURA, A. Polymerization of several proteins by Ca^{2+} - independent transglutaminase

derived from microorganisms. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 2619-2623, 1989.

NOZAWA, H.; MAMEGOSHI, S.; SEKI, N. Partial purification and characterization of six transglutaminases from ordinary muscles of various fishes and marine invertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 142, n. 3, p. 302-307, 2005.

O'CONNEL, J.E.; KRUIF, C.G. β -Casein micelles: cross-linking with transglutaminase. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 216, p. 75-81, 2003.

O'DONNELL, H.J.; BUTLER, F. Time-dependent viscosity of stirred yogurt. Part I: coquette flow. **Journal of Food Engineering**, v. 51, p. 249-254, 2002.

O'SULLIVAN, M.M.; KELLY, A.L.; FOX, P.F. Effect of transglutaminase on the heat stability of milk: a possible mechanism. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 1, p. 1-7, 2002.

PATEL, D. **Gel Electrophoresis - Essencial Data**. Editora Jonh Wiley e Sons, p. 1-15, 1994.

PATOCKA, G.; CERVENKOVA, R.; NARINE, S.; JELEN, P. Rheological behaviour of dairy products as affected by soluble whey protein isolate. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 399-405, 2006.

PELEGRINE, D.H.C.; GASPARETTO, C.A. Whey protein solubility as function of temperature and pH. **Lebensmittel - Wissenschaft und - Technologie**, n. 38, p. 77-80, 2005.

PERDIGÓN, G.; VALDEZ, J.C.; RACHID, M. Antitumour activity of yogurt: study of possible immune mechanism. **Journal of Dairy Research**, v. 65, p. 129-138, 1998.

PERMYAKOV, E.A.; BERLINER, L.J. α -Lactalbumin: structure and function. **FEBS Letters**, n. 473, p. 269-274, 2000.

PIAU, J.-M.; DEBIANE, K. Consistometers rheometry of power-law viscous fluids. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, v. 127, p. 213-224, 2005.

PINTADO, M.E.; MACEDO, A.C.; MALCATA, F.X. Review: Technology, Chemistry and Microbiology of Whey Cheeses. **Food Science and Technology International**, v. 7, n. 2, p. 105-116, 2001.

PIETRASIK, Z. Binding and textural properties of beef gels processed with κ -carragen, egg albumin and microbial transglutaminase. **Meat Science**, v. 63, p. 317-324, 2003.

PONS, M.; FISZMAN, S.M. Instrumental texture profile analysis with particular reference to gelled systems. **Journal of Texture Studies**, v. 27, p. 597-624, 1996.

PRUDÊNCIO, I.D. **Propriedades físicas de queijo *Petit Suisse* elaborado com retentado de soro de queijo e estabilidade de antocianinas e betalaínas adicionadas**. 2006. 87p.

Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC).

RADKE-MITCHELL, L.; SANDINE, W.E. Associative growth and differential enumeration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*: A review. **Journal of Food Protection**, v. 47, p. 245-248, 1984.

RAO, M.A. **Rheology of fluid and semisolid foods: Principles and applications**. New York: An Aspen Publication, 1999. 433p.

RODRIGUEZ-NOGALES, J.M. Enzymatic cross-linking of ewe's milk proteins by transglutaminase. **European Food Research and Technology**, v. 00, p. 1-8, 2005.

RODRIGUEZ-NOGALES, J.M. Effect of preheat treatment on the transglutaminase-catalyzed cross-linking of goat milk proteins. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 430-437, 2006.

SANDOVAL-CASTILLA, O.; LOBATO-CALLEROS, C.; AGUIRRE-MANDUJANO, E.; VERMON-CARTER, E.J. Microstructure and texture of yogurt as influenced by fat replacers, **International Dairy Science**, v. 14, p. 151-159, 2004.

SCHORSCH, C.; CARRIE, H.; NORTON, I.T. Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase conditions for formation of transglutaminase-induced gels. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 519-528, 2000a.

SCHORSCH, C.; CARRIE, H.; NORTON, I.T. Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase: influence of cross-links in acid-induced gelation. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 529-539, 2000b.

SHARMA, R.; LORENZEN, P.C.; QVIST, K.B. Influence of transglutaminase treatment of skim milk on the formation of ϵ -(γ -glutamyl)lysine and the susceptibility of individual proteins towards crosslinking. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 785-793, 2001.

SHARMA, R.; ZAKORA, M.; QVIST, K.B. Susceptibility of an industrial α -lactalbumin concentrate to cross-linking by microbial transglutaminase. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 1005-1012, 2002a.

SHARMA, R.; ZAKORA, M.; QVIST, K.B. Characteristics of oil-water emulsions stabilized by an industrial α -lactalbumin concentrate, cross-linked before and after emulsification by a microbial transglutaminase. **Food Chemistry**, v. 79, p. 493-500, 2002b.

SINGH, H. Modifications of food proteins by covalent crosslinking. **Trends Food Science & Technology**, v. 2, p. 196-200, 1991.

SINGH, H.; CREAMER, L.K. Heat stability of milk. **Advances Dairy Chemistry I - Proteins**, ed. Elsevier Applied Science Publishers, London UK, p. 621-656, 1992. *In*: O'SULLIVAN, M.M.; KELLY, A.L.; FOX, P.F. Effect of transglutaminase on the stability of milk: a possible mechanism. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 1, p. 1-7, 2002.

SHI, Q.; JACKOWSKI, G. **One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis**. In: Hames, B.D. Gel Electroforesis of Proteins. Oxford University Press, p. 1-52, 1998.

SZCZESNIAK, A.S. Texture is a sensory property. **Food Quality and Preference**, v. 13, p. 215-225, 2002.

TABILO-MUNIZAGA, G.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Rheology for the food industry. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 147-156, 2005.

TAGUCHI, S.; ARAKAWA, K.; YOKOYAMA, K.; TAKEHANA, S.; TAKAGI, H.; MOMOSE, H. Overexpression and purification of microbial pro-transglutaminase from *Streptomyces cinnamonum* and in vitro processing by *Streptomyces albogriseolus* proteases. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 5, p. 478-481, 2002.

TRUONG, V.D.; CLARE, D.A.; CATIGNANI, G.L.; SWAISGOOD, H.E. Cross-linking and rheological changes of whey proteins treated with microbial transglutaminase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1170-1176, 2004.

TUNICK, M.H. Rheology of dairy foods that gel, stretch, and fracture. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1892-1898, 2000.

VAN de WATER, J.; KEE, C.L.; GERSHWIN, M.E. The influence of chronic yogurt consumption on immunity. **American Society for Nutritional Sciences**, p. 1492-1495, 1999.

VASBINDER, A.J.; ALTING, A.C.; KRUIF, K.G. Quantification of heat-induced casein-whey protein interactions in milk and its relation to gelation kinetics. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, n. 31, p. 115-123, 2003.

VLIET, T. van; LAKEMOND, C. M.M.; VISSCHERS, R.W. Rheology and structure of milk protein gels. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 9, p. 298-304, 2004.

WELTMANN, R.N. Breakdown of thixotropic structure as function of time. **Journal of Applied Physics**, v. 14, p. 343-350, 1943.

WILCOX, C.P.; SWAISGOOD, H.E. Modification of the rheological properties of whey protein isolate through the use of an immobilized microbial transglutaminase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5546-5551, 2002.

WORRATAO, A.; YONGSAWATDIGUL, J. Purification and characterization of transglutaminase from Tropical tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Food Chemistry**, v. 93, p. 651-658, 2005.

Capítulo 2

Polimerização de proteínas do soro de leite –

Uma análise de superfície de resposta

Polimerização de proteínas do soro de leite – Uma análise de superfície de resposta

Resumo

O soro de leite em pó na proporção de 50 % (m/v) foi utilizado para avaliar a reação de polimerização das proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina pela enzima transglutaminase. Medidas do comportamento de fluxo foram realizadas como parâmetro de monitoramento da alteração da viscosidade das soluções após a reação enzimática. Através de um planejamento experimental avaliou-se a condição ótima de reação em função da concentração de enzima, temperatura e tempo de reação. A polimerização protéica foi favorecida quando as soluções foram mantidas na temperatura de 36 °C por 4 horas. A formação de polímeros aumentou proporcionalmente com o aumento da concentração de transglutaminase até um ponto máximo de esgotamento do substrato, atingindo a concentração enzimática ideal de 50 U de transglutaminase / g de proteína. O aumento do conteúdo de polímeros de alto peso molecular nas soluções de soro de leite conferiu um aumento no índice de consistência das soluções, favorecendo o comportamento não-Newtoniano. A formação dos polímeros de alto peso molecular foi comprovada pelo perfil eletroforético em SDS-PAGE, onde se observou a diminuição das bandas de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina como resultado da reação enzimática com a transglutaminase.

Palavras-chave: α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, transglutaminase.

Introdução

A transglutaminase (EC 2.3.2.13) é uma enzima presente naturalmente na maioria dos tecidos e fluidos corporais, tem um papel importante na coagulação sanguínea (MUSZBEK, YEE e HEVESSY, 1999; NURMINSKAYA e LINSENMAYER, 2002). Catalisa uma reação de transferência de grupos acila entre o grupo γ -carboxiamida do peptídeo ligado aos resíduos de glutamina e uma variedade de aminas primárias (MOTOKI e SEGURO, 1998); quando a transglutaminase atua em moléculas protéicas, ligações cruzadas ϵ -(γ -glutamil)lisina são formadas tanto intra- como inter-molecularmente (KURAIISHI, YAMAZAKI e SUSA, 2001). A transglutaminase pode modificar as proteínas por meio de incorporação de aminas, ligações cruzadas e desaminação. Como resultado destas reações, polímeros de alto peso molecular são formados, levando a mudanças nas propriedades funcionais das proteínas, conferindo a possibilidade da formação de produtos com melhores propriedades reológicas e sensoriais (NIELSEN, PETERSEN e MOLLER, 1995).

A capacidade da transglutaminase em melhorar as propriedades funcionais de proteínas vem sendo explorada com a sua utilização em alimentos preparados como, produtos de surimi, produtos cárneos, massas, produtos lácteos, entre outros. Com a descoberta da transglutaminase de origem microbiana (ANDO et al., 1989) a sua utilização pelas indústrias de alimentos vem sendo estudada (KURAIISHI, YAMAZAKI e SUSA, 2001). Embora a polimerização de proteínas por transglutaminase seja muito estudada com algumas proteínas tais como caseínas (MUGURAMA et al., 2003; KRUIF et al., 2002; FAERGEMAND et al., 1999), gluten (COLLAR, BOLLAÍN e ANGIOLONI, 2005; BAUER et al., 2003; LARRÉ et al., 2000), globulinas (SIU, MA e MINE, 2002; SIU et al., 2002), miosina (LANTTO et al., 2005; TSENG, CHEN e LIU, 2002; JIANG, LEU e TSAI, 1998), o estudo da polimerização das proteínas do soro de leite no seu meio natural não é muito estudado, pois os estudos realizados são referentes às proteínas isoladas (α -lactoalbumina e β -lactoglobulina) ou concentrados protéicos de soro de leite.

O efeito da transglutaminase nas proteínas do leite é bastante estudado (RODRIGUEZ-NOGALES, 2006; O'SULLIVAN, KELLY e FOX, 2002; SHARMA, LORENZEN e QVIST, 2001; DICKINSON e YAMAMOTO, 1996). As caseínas,

principalmente, são bons substratos para a transglutaminase. A incubação de soluções de β - e κ -caseínas com transglutaminase levou a formação de ligações intermoleculares nas micelas de caseína, onde o efeito das ligações cruzadas foi mais pronunciado para a κ -caseína (KRUIF et al., 2002), provavelmente por estar localizada na superfície da micela (RODRIGUEZ-NOGALES, 2005). Devido à sua estrutura compacta, as proteínas do soro de leite são consideradas pobres substratos para a transglutaminase, tornando-se mais susceptíveis às ligações cruzadas na presença de agentes redutores (KURAISHI, YAMAISHI e SUSU, 2001), aumentando o acesso da enzima aos grupos NH_2 por manter o sítio ativo sulfidril no estado reduzido. No entanto, existem estudos que mostram reatividade das proteínas isoladas do soro de leite com a transglutaminase sem que haja adição de agentes redutores ou desnaturação protéica antes da reação enzimática (RODRIGUEZ-NOGALES, 2006; SHARMA, ZAKORA e QVIST, 2002; SHARMA, LORENZEN e QVIST, 2001). Através da observação em SDS-PAGE, Sharma, Zakora e Qvist (2002) mostraram que tanto a α -lactoalbumina como a β -lactoglobulina apresentaram reatividade com a transglutaminase sem modificações na solução protéica. No entanto, quando o comportamento das proteínas é observado na reação com a transglutaminase no leite, a β -lactoglobulina não apresentou reação com a enzima (SHARMA, LORENZEN e QVIST, 2001). Han e Damodaran (1996) estudaram a compatibilidade termodinâmica de substratos protéicos para reação enzimática com a transglutaminase. Os resultados indicaram que a β -lactoglobulina, em um sistema protéico simples, atua como substrato para a transglutaminase, enquanto na presença de β -caseína, não é utilizada pela enzima. β -Lactoglobulina e β -caseína não se aproximam simultaneamente do centro ativo da enzima, provavelmente devido à incompatibilidade termodinâmica da mistura dessas duas proteínas pelo centro ativo da transglutaminase.

As proteínas do soro são de fácil digestão e apresentam perfil de aminoácidos essenciais que atendem todas as exigências qualitativas e quantitativas estabelecidas pela Food and Agriculture Organization (FAO) e pela World Health Organization (WHO) e, além disso, apresenta proteínas com importantes propriedades funcionais como: emulsificante, espumante e gelificante, tornando-o ingrediente de alto valor tecnológico para a indústria de alimentos.

Com o objetivo de melhorar as propriedades funcionais das proteínas do soro de leite, este estudo avaliou a otimização da reação enzimática das proteínas α -lactoalbumina e β -

lactoglobulina com a transglutaminase em relação aos efeitos da concentração da enzima, tempo e temperatura de reação enzimática na intensidade da reação.

Material e Métodos

Material

A transglutaminase independente de Ca^{2+} (ACTIVA MP) foi fornecida pela empresa Ajinomoto no Brasil (Ajinomoto, São Paulo, SP, Brasil). A preparação da enzima contendo lactose, maltodextrina e transglutaminase apresentou atividade enzimática média de 100 U/g (dado fornecido pela indústria). A enzima foi utilizada na sua forma original, sem qualquer purificação.

O soro de leite em pó (comercial) foi gentilmente cedido pela empresa Allimentus®, com composição aproximada de >70 % lactose, > 11 % proteína, < 6 % umidade, < 8,7 % minerais e < 1,6 % gordura (dados da indústria). Água destilada foi utilizada para a preparação das amostras de soro de leite e para as soluções de eletroforese utilizou-se água Milli-Q. Todos os outros reagentes utilizados foram de qualidade analítica.

Métodos

Planejamento experimental

Os fatores que podem influenciar na reação enzimática da transglutaminase com as proteínas do soro de leite em pó – concentração da enzima, temperatura e tempo de incubação – foram analisados através de um delineamento estatístico central composto com três fatores e uma repetição. Um total de 18 experimentos foram realizados e, para estimativa do erro experimental, foram realizadas 4 replicatas do experimento correspondentes ao ponto central. As medidas de índice de consistência (K) das soluções de soro de leite adicionadas da enzima transglutaminase foram as respostas selecionadas para este estudo. Os fatores e os níveis dos mesmos são mostrados na Tabela 1, os experimentos foram realizados aleatoriamente e em triplicada para todas as amostras.

Tabela 1. Condições estabelecidas pelo planejamento experimental.

Fatores	Níveis				
	-1,68	-1	0	1	1,68
Transglutaminase (U/g proteína)	4,64	23	50	77	95,36
Temperatura (°C)	36,28	39	43	47	49,72
Tempo (min)	10,4	58	128	198	246

O delineamento estatístico experimental e a análise de variância (ANOVA) foram realizados utilizando o software Statistica® versão 6.0 a fim de determinar a significância dos efeitos dos fatores. Um modelo empírico foi construído:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2$$

Onde Y é a resposta estimada, x_j são os fatores codificados do sistema, b_0 é a constante do modelo, b_j corresponde ao coeficiente dos efeitos lineares, b_{jk} são os coeficientes das interações entre os fatores e b_{jj} corresponde ao coeficiente dos efeitos quadráticos. Os coeficientes foram calculados por análise de regressão e a sua significância foi verificada pela análise de variância (ANOVA).

Polimerização das proteínas

Amostras de soro de leite em pó foram preparadas na concentração de 50 % (m/v) em água destilada. O soro de leite foi dissolvido e homogeneizado a 100 rpm por 12 horas, para completa dissolução. A concentração protéica do soro foi determinada pelo método de Kjeldahl (A.O.A.C. 2005) e utilizada como referência para a adição da transglutaminase. O valor encontrado foi de 3,59 g de proteína / 100 mL de soro de leite (50 % m/v).

Amostras de 50 mL de soro foram preparadas pela adição da enzima transglutaminase na concentração definida pelo planejamento experimental e agitadas por 30 minutos a 100 rpm para completa dissolução e homogeneização. Cada unidade de transglutaminase é definida nos termos de sua atividade, que corresponde à quantidade de enzima necessária para catalisar a reação de CBZ-L-glutamilglicina e hidroxilamina para produzir 1 μ mol de ácido

hidroxâmico por minuto a 37 °C. As soluções foram aquecidas na temperatura de incubação, mantidas em estufa em temperatura e tempo determinados. As soluções foram resfriadas a temperatura de 25 °C. Amostras controle foram preparadas seguindo o mesmo procedimento descrito, sem a adição da transglutaminase.

Reologia

As medidas das propriedades de fluxo do soro de leite polimerizado pela transglutaminase (25 °C) foram realizadas em reômetro rotacional (*Brookfield Engineering Laboratories* model DV III Ultra, Stoughton, MA, USA), com cilindro concêntrico (*spindle* ULA), coletadas através do *software* Rheocalc® 32 versão 2.5 (*Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro MA 02346 USA*). As análises foram realizadas em temperatura de 25 °C; a taxa de deformação aumentou linearmente de 24,0 a 245,0 (s⁻¹) no tempo de 30 minutos. As amostras permaneceram em repouso por 15 minutos antes das análises. As medidas foram realizadas em triplicata.

O modelo reológico Lei da Potência (1) foi utilizado para descrever o comportamento de fluxo das amostras de soro de leite, e o índice de consistência (K) foi utilizado como parâmetro de monitoramento da alteração da viscosidade das amostras em função da reação enzimática.

$$\sigma = K \left(\dot{\gamma} \right)^n \quad (1)$$

Sendo: σ – tensão de cisalhamento (Pa), K – índice de consistência (Pa.sⁿ), $\dot{\gamma}$ – taxa de deformação (s⁻¹), n – índice de comportamento de fluxo (adimensional).

Eletrforese

As soluções de soro de leite adicionadas de transglutaminase (200 μ L) foram diluídas na proporção 1:1 com tampão da amostra (0,015 M de Tris HCl, 25 % de glicerol, 1 % SDS, 2,5 % de β -mercaptoetanol e 0,1 % de azul de bromofenol, pH 6,5).

Para a eletrforese das proteínas em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS/PAGE) utilizou-se cuba vertical (Mini Protein System, Bio Rad Laboratories, Califórnia, USA), espaçadores de 1 mm e, um sistema descontínuo composto por um gel de empacotamento (3,5 %) e um gel de separação (12 %), conforme descrito por Laemmli (1970). O padrão de peso molecular utilizado foi o Natural Unstained Standards - Broad Range (Bio Rad) com faixa de peso molecular de 6.400 a 200.000 g/mol. A eletrforese foi conduzida utilizando um tampão de corrida composto por Tris base (15 g/L), glicina (72 g/L) e SDS (5 g/L), pH 8,3. Todas as soluções foram preparadas utilizando água Milli-Q. O corante *Comassie Brilliant Blue* a 1 % foi utilizado na revelação em uma mistura de metanol (45 %), ácido acético glacial (10 %) e água destilada (45 %). Para a descoloração do gel preparou-se uma solução contendo metanol (50 %), ácido acético glacial (10 %) e água destilada (40 %) e, em seguida uma solução contendo ácido acético 7,5 %. A eletrforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada com a finalidade de observar os polímeros de alto peso molecular formados a partir da reação da transglutaminase com as proteínas do soro de leite.

Resultados e Discussão

O soro de leite na proporção 50 % (m/v) foi utilizado neste estudo para avaliar a reação de polimerização das proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina por transglutaminase em seu meio natural (lactose, proteínas, minerais e gordura). O índice de consistência (K) das soluções foi utilizado como medida de viscosidade e parâmetro de comparação entre os resultados, pois a reação catalisada pela transglutaminase leva à formação de polímeros de alto peso molecular, devido às ligações formadas tanto inter- como intra-molecularmente entre as moléculas de proteínas (ANDO et al., 1989), aumentando a

viscosidade ou índice de consistência das soluções (K) em função do tempo de reação (WILCOX e SWAISGOOD, 2002).

Em um planejamento fatorial são investigados os efeitos principais de todos os fatores experimentais de interesse e os efeitos de interação destes fatores na resposta desejada (TEÓFILO e FERREIRA, 2006). O efeito das combinações entre os fatores concentração da enzima, temperatura e tempo de incubação da reação enzimática foi avaliado; o planejamento experimental com os níveis dos fatores e os resultados obtidos para o índice de consistência (K) está apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Índice de consistência das soluções de soro de leite adicionadas de transglutaminase sob as diferentes condições experimentais definidas pelo planejamento experimental.

Teste	Fatores			Resposta
	Transglutaminase (U / g proteína)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Índice de consistência (Pa.s ⁿ)*
1	23	39	58	0,2481
2	23	39	198	0,3908
3	23	47	58	0,2227
4	23	47	198	0,2493
5	77	39	58	0,3184
6	77	39	198	0,4513
7	77	47	58	0,3400
8	77	47	128	0,4091
9	4,64	43	128	0,1208
10	95,36	43	128	0,2397
11	50	36	128	0,4629
12	50	50	128	0,3028
13	50	43	11	0,2983
14	50	43	246	0,3083
15	50	43	128	0,3260
16	50	43	128	0,2687
17	50	43	128	0,2821
18	50	43	128	0,2760

* Os valores obtidos para o índice de consistência são referentes à média dos valores obtidos em triplicata.

Através da Análise de Variância (ANOVA) podemos observar a influência significativa ($p < 0,05$) de todos os fatores – concentração da enzima, temperatura e tempo de reação – no índice de consistência (K) das soluções de soro de leite adicionadas da enzima

transglutaminase (Tabela 3), não havendo interação significativa entre os fatores ($p > 0,05$). Observa-se o efeito linear e quadrático para os fatores concentração de enzima e temperatura, enquanto o fator tempo apresentou apenas efeito linear. A metodologia de superfície de resposta baseia-se na construção de modelos matemáticos empíricos que geralmente empregam funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema estudado e, conseqüentemente, dão condições de explorar o sistema até sua otimização (TEÓFILO e FERREIRA, 2006).

Tabela 3. Análise de Variância dos valores de índice de consistência das soluções de soro de leite adicionados da enzima transglutaminase.

Fator	Soma de quadrados	Df	Quadrado médio	F	Valor p
(1) Enzima (L)	0,027069	1	0,027069	13,17563	0,006687
Enzima (Q)	0,011041	1	0,011041	5,37404	0,049057
(2) Temperatura (L)	0,015273	1	0,015273	7,43392	0,025985
Temperatura (Q)	0,022462	1	0,022462	10,93312	0,010754
(3) Tempo (L)	0,010990	1	0,010990	5,34940	0,049467
Tempo (Q)	0,002435	1	0,002435	1,18500	0,308044
(1) (L) / (2) (L)	0,002682	1	0,002682	1,30523	0,286297
(1) (L) / (3) (L)	0,000133	1	0,000133	0,06466	0,805688
(2) (L) / (3) (L)	0,004047	1	0,004047	1,96985	0,198067
Erro	0,016436	8	0,002054		
Total SS	0,120423	17			

Sendo: L = efeito linear; Q = efeito quadrático; df = grau de liberdade. Linhas em negrito correspondem aos valores que apresentaram diferença significativa ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

O modelo ajustado para o índice de consistência (K) do soro de leite adicionado de transglutaminase como função dos fatores significativos na Análise de Variância (ANOVA) foi (2):

$$K = 4,95696 + 0,00611.E - 0,00005.E^2 - 0,21962.T + 0,00246.T^2 + 0,00041.t \quad (2)$$

Sendo: E – concentração enzimática (U / g proteína), T – temperatura (°C), t – tempo (min)

A partir do modelo empírico (2) foram construídas superfícies de resposta para otimizar a reação enzimática, ou seja, encontrar os valores dos fatores que fornecem a melhor resposta desejada, isto é, a maior viscosidade das soluções de soro de leite (Figuras 1 - 3).

O efeito da concentração de transglutaminase na reação enzimática com as proteínas do soro de leite foi considerado significativo ($p < 0,05$). Soluções de soro de leite adicionadas de transglutaminase na concentração de 4,64 U / g de proteína apresentaram menor índice de consistência (K) em relação às demais soluções, no entanto, a partir de uma concentração de transglutaminase de 50 U / g de proteína (Figura 1), os valores de índice de consistência (K) obtidos permaneceram em 0,6 (Pa.sⁿ); mesmo com a adição de 77 U e 95,36 U de transglutaminase / g de proteína.

A α -lactoalbumina apresenta 8 resíduos de glutamina e 12 resíduos de lisina em sua estrutura; enquanto a β -lactoglobulina, 16 resíduos de glutamina e 15 resíduos de lisina (MORR e HÁ, 1993). No entanto, nem todos estes resíduos estão disponíveis para a reação enzimática com a transglutaminase, devido à estrutura globular das proteínas do soro de leite. A taxa de polimerização pela transglutaminase é dependente da estrutura macromolecular do substrato protéico; os resíduos de glutamina reativos, por exemplo, situam-se nas regiões flexíveis da cadeia polipeptídica ou em *loops* (DICKINSON, 1997). Nieuwenhuizen et al. (2003) estudaram as modificações nos resíduos de glutamina e lisina da α -lactoalbumina após a reação enzimática com a transglutaminase microbiana e encontraram um máximo de cinco (5) resíduos de lisina e cinco (5) resíduos de glutamina que podem ser modificadas pela enzima, dependendo da temperatura, pH, presença e ausência de cálcio. Cinco (5) resíduos de glutamina (posições 39, 43, 54, 65, 117) e cinco (5) resíduos de lisina (posições 5, 13, 16, 108, 114) são disponíveis para modificação por transglutaminase na apo- α -lactoalbumina, enquanto que nenhum resíduo de glutamina e quatro (4) resíduos de lisina (posições 13, 16, 108, 114) são disponíveis na holo- α -lactoalbumina. A utilização de concentrações de transglutaminase superiores a 50 U / g de proteína pode ter sido superior à quantidade necessária para a reação com os resíduos disponíveis da α -lactoalbumina e β -lactoglobulina,

ocorrendo a saturação do substrato protéico para a reação enzimática e, dessa maneira, não havendo alteração na viscosidade das soluções com o aumento da concentração de transglutaminase.

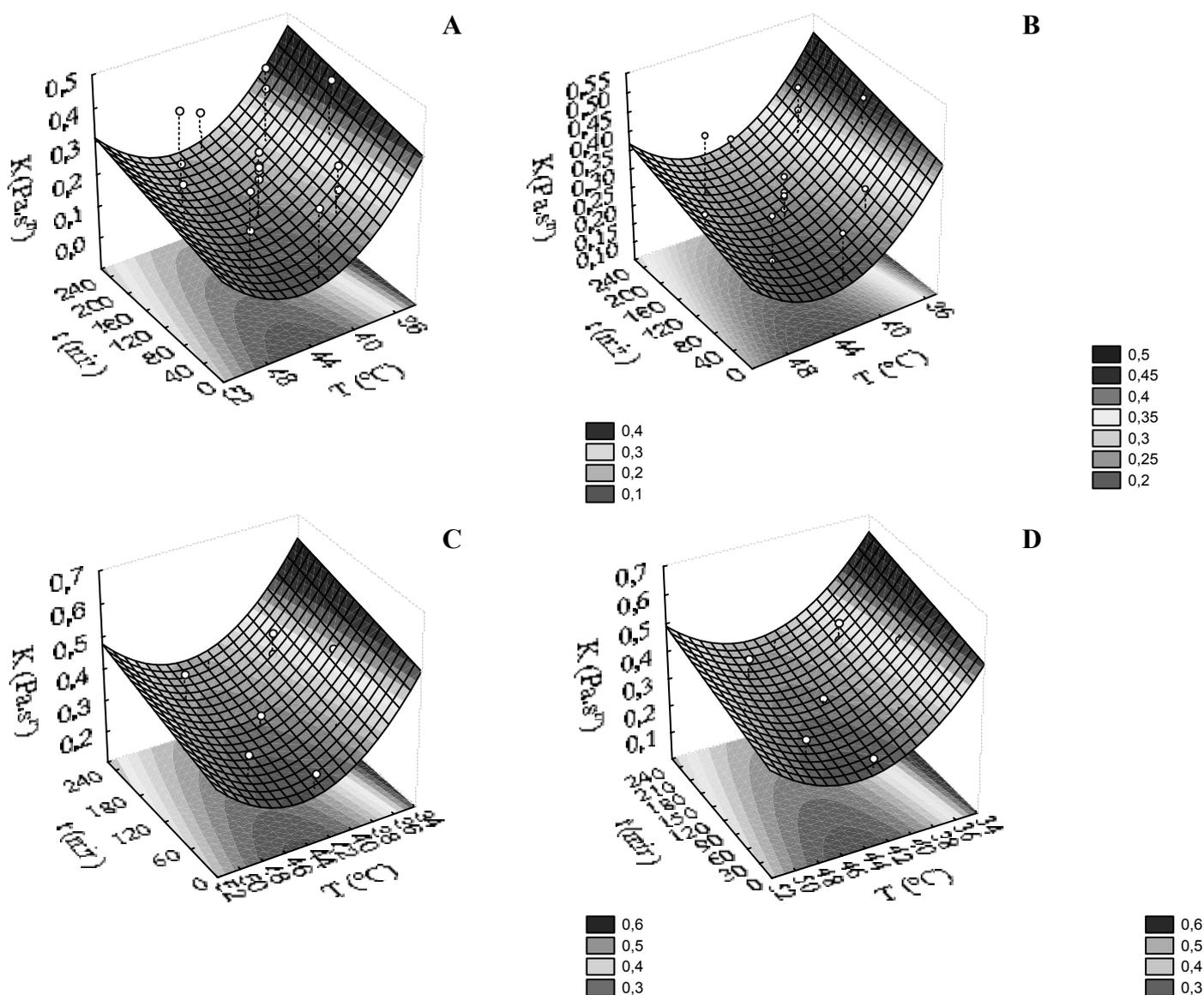


Figura 1. Análise de superfície de resposta do índice de consistência (K) das soluções de soro de leite adicionadas de transglutaminase em função do tempo e temperatura de reação enzimática (A = 4,64 U de transglutaminase / g de proteínas; B = 23,0 U de transglutaminase / g de proteínas; C = 50,0 U de transglutaminase / g de proteínas; D = 77,0 U de transglutaminase / g de proteínas; K = índice de consistência; t = tempo; T = temperatura).

Resultados similares aos encontrados neste estudo foram obtidos por Eissa, Bisram e Khan (2004). A polimerização das proteínas isolados do soro de leite, α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, foi crescente à medida que a concentração da transglutaminase aumentou e atingiu 10 U / g de proteína. Após esta concentração, a reação observada em SDS-PAGE permaneceu inalterada quando aumentos graduais foram realizados na concentração enzimática de 10 – 100 U de transglutaminase / g de proteína.

As soluções de soro de leite adicionadas de transglutaminase mantidas na temperatura de 36 °C apresentam valores de índice de consistência (K) superiores quando comparados aos valores das demais amostras de soro de leite. Conforme ilustrado na Figura 2, observa-se que as soluções mantidas em temperaturas mais amenas (36 – 39 °C), por 4 horas, apresentam valores de índice de consistência (K) superiores às amostras mantidas a 47 – 50 °C. Segundo informações fornecidas pela empresa Ajinomoto, a enzima transglutaminase é estável até a temperatura de 40 °C; sua atividade aumenta gradualmente até uma temperatura ótima de 50 °C (ideal para reações curtas), no entanto sua estabilidade não é a mesma. Os resultados demonstram que o tempo de 4 horas de reação enzimática favoreceu a maior formação de polímeros de alto peso molecular, por manter ativa a enzima transglutaminase por tempo suficientemente longo para a reação com as proteínas do soro de leite, aumentando o índice de consistência (K) das amostras.

Através da Figura 2E pode-se observar o efeito da temperatura de 50 °C, onde, a partir de concentrações de transglutaminase na faixa de 50 - 60 U / g de proteína, o tempo de reação enzimática de 100 minutos fornece valores de índice de consistência (K) semelhantes às amostras de soro de leite em maior concentração protéica, estando de acordo com as especificações da Ajinomoto. Amostras mantidas a 36 °C (Figura 2A) apresentam aumento gradual no índice de consistência, atingindo o seu valor máximo após 200 - 220 minutos de reação enzimática. O efeito da temperatura da reação pode ser melhor visualizado através da Figura 3.

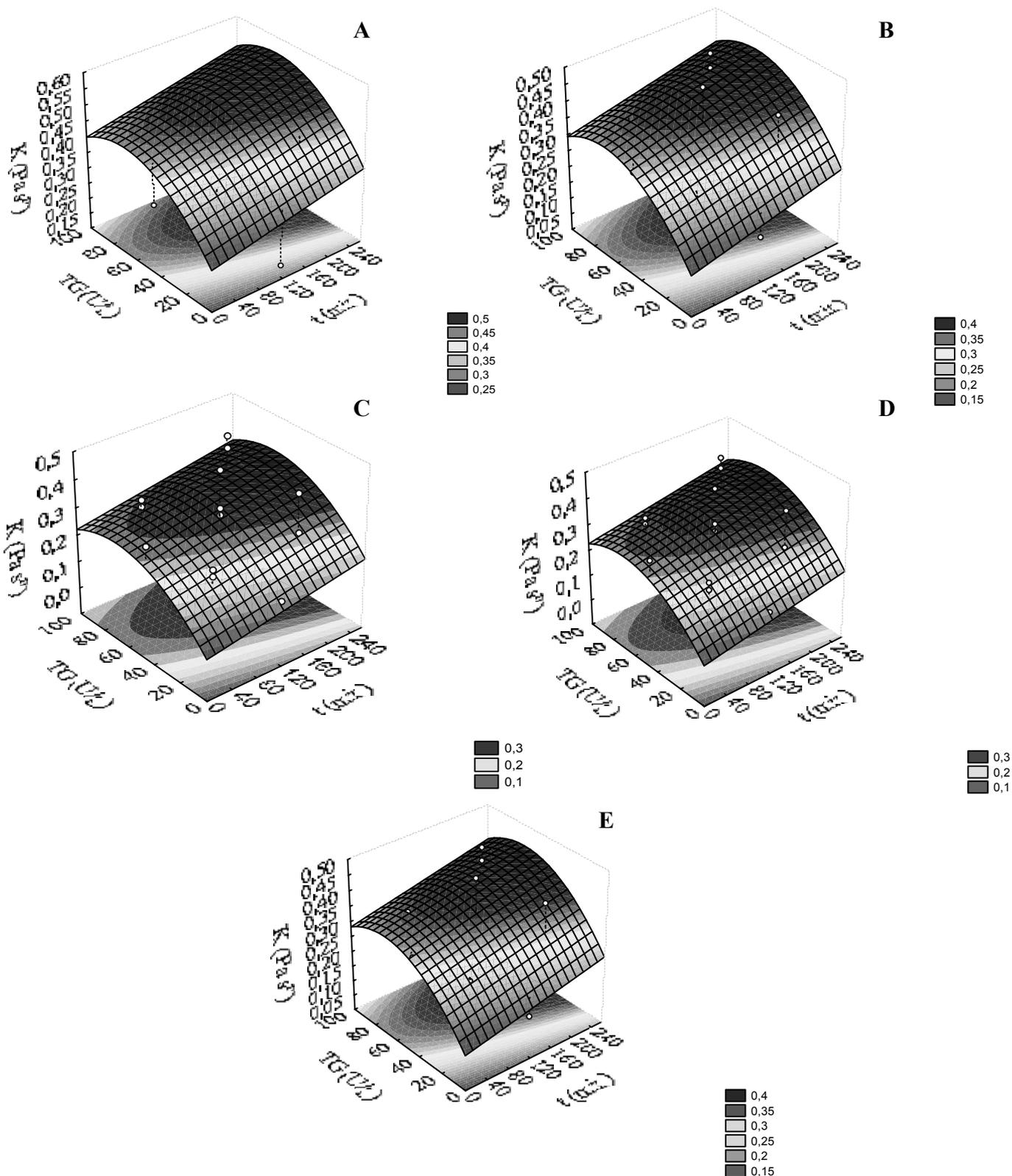


Figura 2. Análise de superfície de resposta do índice de consistência (K) das soluções de soro de leite adicionada de transglutaminase em função da concentração de enzima e tempo de reação enzimática (A = 36 °C; B = 39 °C; C = 43 °C; D = 47 °C; E = 50 °C; K = índice de consistência, TG = transglutaminase; t = tempo).

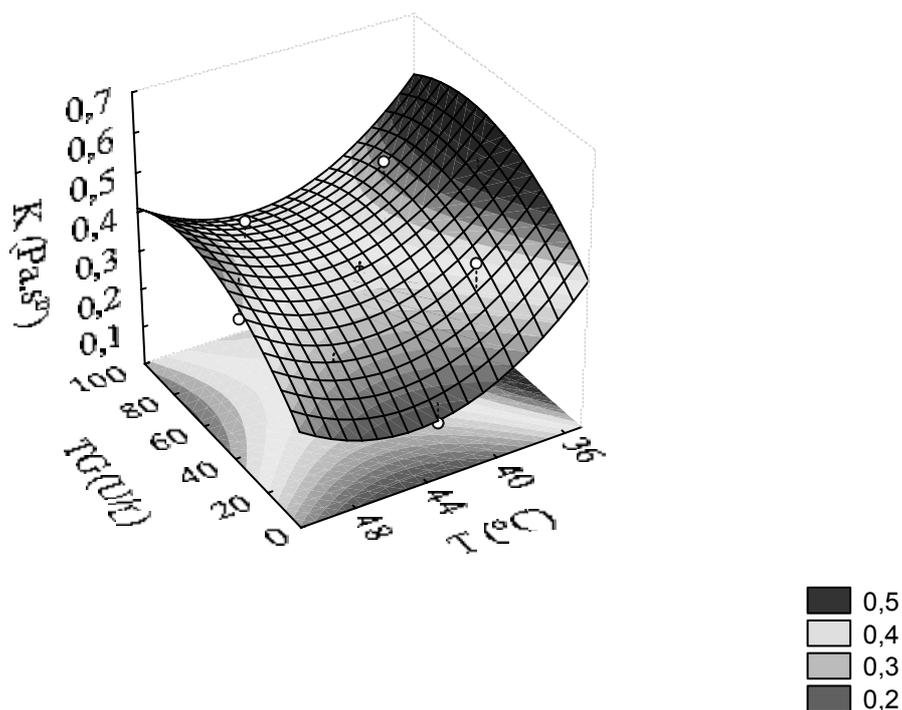


Figura 3. Análise de superfície de resposta do índice de consistência (K) da solução de soro de leite adicionada de transglutaminase em função da concentração de enzima e temperatura de reação enzimática por 246 minutos (K = índice de consistência; TG = transglutaminase; T = temperatura).

Alguns autores utilizaram em seus estudos temperaturas inferiores à temperatura de atividade ótima da enzima transglutaminase (50 °C / 10 min) na avaliação tanto de proteínas do leite (RODRIGUEZ-NOGALES, 2006) como das proteínas globulares do soro de leite (FAERGEMAND, OTTE e QVIST, 1997). O'Sullivan, Kelly e Fox (2002) avaliaram o efeito da transglutaminase sob a estabilidade térmica de leite, conduzindo a reação à temperatura de 6 °C por 24 horas, sugerindo que a reação pode ser realizada em temperaturas de refrigeração por períodos de tempo prolongados, caso haja a necessidade de controle extremo de temperatura.

Comportamento reológico das amostras de soro de leite

As soluções de soro de leite em pó preparadas na concentração de 50 % (m/v) apresentaram comportamento não-Newtoniano pseudoplástico, conforme os parâmetros descritos na Tabela 3, definidos pelo modelo Lei da Potência. Soluções de concentrados protéicos de soro de leite apresentam comportamento reológico característico de fluido Newtoniano quando preparadas em concentrações na faixa de 2 a 8 % (m/v); quando esta concentração é aumentada de 10 para 24,5 % (m/v) a tensão de cisalhamento requerida aumenta, assim como o comportamento pseudoplástico das amostras (LIZARRAGA, 2006).

Tabela 3. Parâmetros do modelo Lei da Potência do comportamento de fluxo do soro de leite controle e submetido ao tratamento enzimático com transglutaminase.

Tratamento	Índice de consistência (K) (Pa)	Índice de comportamento de fluxo (n)	R ²
soro de leite	0,2926	0,3983	0,98786
soro de leite + transglutaminase*	0,4629	0,3303	0,99911

* Reação enzimática na concentração de 50U de transglutaminase/g de proteína, a 36 °C por 128 minutos.

A viscosidade de um fluido pode aumentar em um comportamento linear ou não-linear, com uma transição de Newtoniano para não-Newtoniano, proporcional ao aumento da concentração de sólidos totais da solução. Essa alteração ocorre porque uma menor concentração de água causa um aumento na fração de volume de partículas dispersas, aumentando a interação e diminuindo a distância entre as moléculas de proteína (PATOCKA et al., 2006).

A adição da enzima transglutaminase conferiu um aumento no índice de consistência (K) das amostras, conforme observado na Tabela 3. A polimerização das proteínas do soro de leite foi correlacionada com o aumento das propriedades pseudoplásticas do fluido, devido à aproximação no índice de comportamento de fluxo ao valor zero. O índice de comportamento

de fluxo (n) e os valores de índice de consistência (K) foram obtidos a partir das curvas tensão de cisalhamento *versus* taxa de deformação (Figura 4). O índice de comportamento de fluxo (n) reflete a proximidade do fluido ao comportamento Newtoniano (RAO, 1999). Quando $n = 1$, o fluido é considerado Newtoniano; aproximando-se de $n = 0$, denomina-se fluido não-Newtoniano pseudoplástico (PIAU e DEBIANE, 2005; WILCOX e SWAISGOOD, 2002).

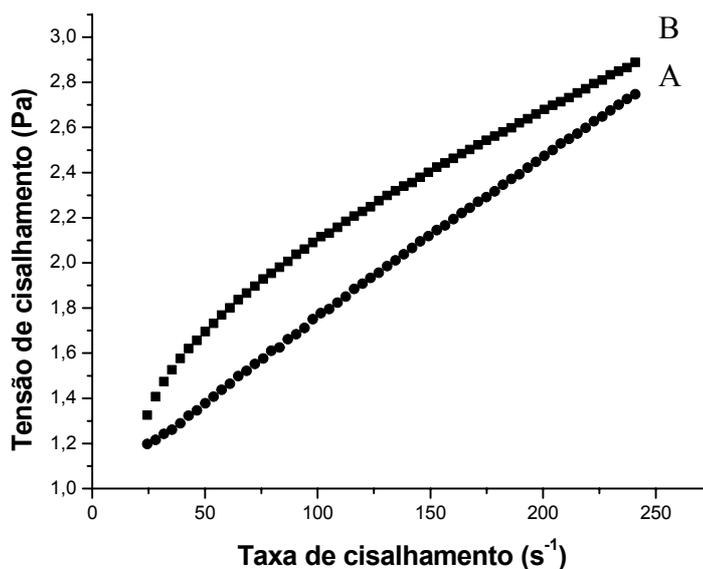


Figura 4. Comportamento de fluxo do soro de leite na concentração de 50 % (m/v) – A: soro de leite controle; B: soro de leite adicionado de transglutaminase na concentração de 50 U / g de proteína, a 36 °C por 128 minutos (as curvas são correspondentes às médias das análises em triplicata).

Estes resultados demonstram que soro de leite em pó na concentração utilizada (50 %) apresenta comportamento não-Newtoniano pseudoplástico, e a adição de transglutaminase às soluções favorece este comportamento. Alimentos fluidos que contém concentrações significantes de compostos de alto peso molecular (polímeros) dissolvidos e/ou sólidos suspensos exibem comportamento não-Newtoniano (RAO, 1999).

Eletroforese

O perfil de eletroforese em SDS-PAGE foi realizado com o objetivo de comprovar a reação de polimerização das proteínas do soro de leite pela transglutaminase, que resultou na diminuição do tamanho das bandas protéicas tanto da β -lactoglobulina como da α -lactoalbumina (Figura 5). A reação de polimerização catalisada pela transglutaminase resultou na formação de polímeros protéicos de alto peso molecular. Com o aumento do tempo de reação enzimática a polimerização ocorreu entre os próprios polímeros formados pela reação, pois não foi observada diminuição das bandas monoméricas das proteínas do soro após os 15 minutos iniciais de reação e, como foi verificado pelo comportamento reológico, o aumento do tempo de reação resultou em aumento do índice de consistência (K) das soluções. A Figura 5 ilustra a diminuição da intensidade das bandas de polímeros em função do tempo; conclui-se que os novos polímeros formados a partir destes são de tamanhos superiores aos poros do gel de separação, não fazendo parte da resolução do gel de poliacrilamida.

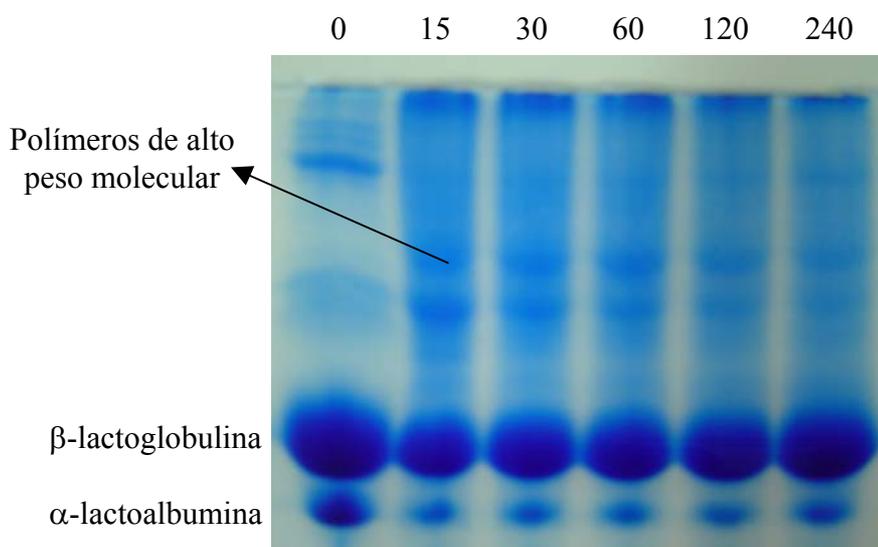


Figura 5. Reação de polimerização enzimática das proteínas do soro de leite adicionadas de transglutaminase (50 U / g de proteína) em função do tempo em minutos.

Conclusões

As proteínas do soro de leite em pó (α -lactoalbumina e β -lactoglobulina) apresentaram reatividade com a transglutaminase sem a necessidade de qualquer tratamento prévio. A metodologia de superfície de resposta utilizada foi útil na determinação das condições de reação, obtendo como resposta máxima a utilização de 50 U de transglutaminase / g de proteína, temperatura de reação de 36 °C por 240 minutos. A formação dos polímeros protéicos de alto peso molecular foi comprovada por SDS-PAGE, onde foi possível visualizar a diminuição das bandas protéicas e formação dos polímeros tanto pela reação com as proteínas monoméricas como pelos próprios polímeros formados, em função do tempo de reação. A presença destes polímeros em solução levou ao aumento do índice de consistência das amostras de soro de leite, e contribuiu para o comportamento não-Newtoniano das amostras.

Referências Bibliográficas

ANDO, H.; ADACHI, M.; UMEDA, K.; MATSURA, A.; NONAKA, M.; UCHIO, R.; TANAKA, H.; MOTOKI, M. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.53, n.10, p.2613-2617,1989.

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL**. 18th ed. Maryland: AOAC, 2005.

BAUER, N.; KOEHLER, P.; WIESER, H.; SCHIEBERLE, P. Studies on effects of microbial transglutaminase on gluten proteins of wheat. II. Rheological properties. **Cereal Chemistry**, v. 80, n. 6, p. 787-790, 2003.

COLLAR, C.; BOLLAÍN, C.; ANGIOLONI, A. Significance of microbial transglutaminase on the sensory, mechanical and crumb grain pattern of enzyme supplemented fresh pan breads. **Journal of Food Engineering**, v. 70, p. 479-488, 2005.

DICKINSON, E. Enzymatic crosslinking as a tool for food colloid rheology control and interfacial stabilization. **Trends in Food Science and Technology**, v. 8, p. 334-339, 1997.

DICKINSON, E.; YAMAMOTO, Y. Rheology of milk protein gels and protein-stabilized emulsion gels cross-linked with transglutaminase. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 44. p. 1371-1377, 1996.

EISSA, A.S.; BISRAM, S.; KHAN, S.A. Polymerization and gelation of whey protein isolates at low pH using transglutaminase enzyme. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 4456-4464, 2004.

FAERGEMAND, M.; MURRAY, B.S.; DICKINSON, E.; QVIST, K.B. Cross-linking of adsorbed casein films with transglutaminase. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 343-346, 1999.

FAERGEMAND, M.; OTTE, J.; QVIST, K.B. Enzymatic cross-linking of whey proteins by a Ca²⁺-independent microbial transglutaminase from *Streptomyces lydicus*. **Food Hydrocolloids**, v. 11, p. 19-25, 1997.

HAN, X.-D.; DAMODARAN, S. Thermodynamic compatibility of substrate proteins affects their cross-linking by transglutaminase. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 44, p. 1211-1217, 1996.

JIANG, S.; LEU, S.; TSAI, G. Cross-linking of mackerel surimi actomyosin by microbial transglutaminase and ultraviolet irradiation. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 5278-5282, 1998.

KRUIF, C.G.; TUINIER, R.; HOLT, C.; TIMMINS, P.A.; ROLLEMA, H.S. Physicochemical study of K- and β -casein dispersions and the effect of cross-linking by transglutaminase. **Langmuir**, v. 18, p. 4885-4891, 2002.

KURAIISHI, C.; YAMAZAKI, K.; SUSAKI, Y. Transglutaminase: Its utilization in the food industry. **Food Reviews International**, v. 17, n. 2, p. 221-246, 2001.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LANTTO, R.; PUOLANNE, E.; KALKKINEN, N.; BUCHERT, J.; AUTIO, K. Enzyme-aided modification of chicken-breast myofibril proteins: effect of laccase and transglutaminase on gelation and thermal stability. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 9231-9237, 2005.

LARRÉ, C.; DENERY-PAPINI, D.; POPINEAU, Y.; DESHAYES, G.; DESSERME, G.; LEFEBVRE, J. Biochemical analysis and rheological properties of gluten modified by transglutaminase. **Cereal Chemistry**, v. 77, n. 2, p. 121-127, 2000.

LIZARRAGA, M.S.; PIANTE VICIN, D.DE; GONZÁLEZ, R.; RUBIOLO, A.; SANTIAGO, L.G. Rheological behaviour of whey protein concentrate and λ -carrageenan aqueous mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 740-748, 2006.

MORR, C.; HÁ, E.W. Whey protein concentrates and isolates processing and functional properties critical reviews. **Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, 431-476, 1993.

MOTOKI, M.; SEGURO, K. Transglutaminase and its use for food processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, p. 204-210, 1998.

MUGURAMA, M.; TSURUOKA, K.; KATAMAYMA, K.; ERWANTO, Y.; KAWAHARA, S.; YAMAUCHI, K.; SATHE, S.K.; SOEDA, T. Soybean and milk proteins modified by transglutaminase improves chicken sausage texture even at reduced levels of phosphate. **Meat Science**, v. 63, p. 191-197, 2003.

MUSZBEK, L.; YEE, V.C.; HEVESSY, Z. Blood Coagulation Factor XIII: Structure and Function. **Thrombosis Research**, v. 94, p. 271-305, 1999.

NIEUWENHUIZEN, W.F.; DEKKER, H.L.; KONING, L.J.; GRÖNEVELD, T.; KOSTER, C.G.; JONG G.A.H. Modification of glutamine and lysine residues in holo and apo- α -lactalbumin with microbial transglutaminase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7132-7139, 2003.

NIELSEN, G.S.; PETERSEN, B.R.; MOLLER, A.J. Impact of salt, phosphate and temperature on the effect of a transglutaminase (F XIIIa) on the texture of restructured meat. **Meat Science**, v. 41, n. 3, p. 293-299, 1995.

NURMINSKAYA, M.V.; LINSENMAYER, T.F. Immunohistological analysis of transglutaminase factor XIIIa expression in mouse embryonic growth plate. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 20, p. 575-578, 2002.

O'SULLIVAN, M.M.; KELLY, A.L.; FOX, P.F. Effect of transglutaminase on the heat stability of milk: a possible mechanism. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 1, p. 1-7, 2002.

PATOCKA, G.; CERVENKOVA, R.; NARINE, S.; JELEN, P. Rheological behaviour of dairy products as affected by soluble whey protein isolate. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 399-405, 2006.

PIAU, J.-M.; DEBIANE, K. Consistometers rheometry of power-law viscous fluids. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, v. 127, p. 213-224, 2005.

RAO, M.A.; **Rheology of fluid and semisolid foods: Principles and applications**. New York: An Aspen Publication, 1999. 433p.

RODRIGUEZ-NOGALES, J.M. Enzymatic cross-linking of ewe's milk proteins by transglutaminase. **European Food Research and Technology**, v. 00: p. 1-8, 2005.

RODRIGUEZ-NOGALES, J.M. Effect of preheat treatment on the transglutaminase-catalyzed cross-linking of goat milk proteins. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 430-437, 2006.

SHARMA, R.; LORENZEN, P.C.; QVIST, K.B. Influence of transglutaminase treatment of skim milk on the formation of ϵ -(γ -glutamyl)lysine and the susceptibility of individual proteins towards crosslinking. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 785-793, 2001.

SHARMA, R.; ZAKORA, M.; QVIST, K.B. Susceptibility of an industrial α -lactalbumin concentrate to cross-linking by microbial transglutaminase. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 1005-1012, 2002.

SIU, N.; MA, C.; MINE, Y. Physicochemical and structural properties of oat globulin polymers formed by a microbial transglutaminase. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, p. 2660-2665, 2002.

SIU, N.; MA, C.; MOCK, W.; MINE, Y. Functional properties of oat globulin modified by a calcium-independent microbial transglutaminase. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, p. 2666-2670, 2002.

TEÓFILO, R.F.; FERREIRA, M.M.C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

TSENG, T.; CHEN, M.; LIU, D. Purification of transglutaminase and its effects on myosin heavy chain and actin of spent hens. **Meat Science**, v. 60, p. 267-270, 2002.

WILCOX, C.P.; SWAISGOOD, H.E. Modification of the rheological properties of whey protein isolate through the use of an immobilized transglutaminase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**

Capítulo 3

Efeito do tratamento térmico na polimerização protéica por transglutaminase e gelificação de proteínas do soro de leite modificadas enzimaticamente

Efeito do tratamento térmico na polimerização protéica por transglutaminase e gelificação de proteínas do soro de leite modificadas enzimaticamente

Resumo

Este estudo avaliou o efeito do tratamento térmico das proteínas do soro de leite em pó (50 % m/v) em diferentes temperaturas (75, 80, 85, 90 e 95 °C), antes do tratamento enzimático com transglutaminase microbiana. O ponto gel das soluções também foi avaliado após a adição da enzima, assim como a turbidez das soluções em diferentes valores de pH. Observou-se interação significativa entre a adição de transglutaminase e o tratamento térmico, sendo que, somente em temperaturas superiores a 85 °C foi possível observar efeito significativo no aumento do índice de consistência das amostras tratadas enzimaticamente, comparadas às amostras controle. Em relação ao ponto gel das amostras de soro de leite, este diminuiu com a transglutaminase em solução; a diminuição foi acentuada com o aumento do tempo de reação devido à formação de polímeros protéicos com alto peso molecular catalisada pela transglutaminase, observada também pela análise de turbidez.

Palavras-chave: transglutaminase, soro de leite, desnaturação térmica, reologia, gelificação.

Introdução

O soro de leite representa uma mistura rica e heterogênea de proteínas com atributos nutricionais, funcionais e biológicos (CHATTERTON et al., 2006), é utilizado como agente espessante, emulsificante e gelificante, estabilizador de espuma, ligante de água e como suplemento protéico. Devido à sua alta qualidade nutricional e sua funcionalidade inerente, as proteínas do soro são utilizadas em uma grande variedade de produtos alimentícios (FUENTE, SINGH e HEMAR, 2002). As proteínas majoritárias no soro de leite são a β -lactoglobulina e a α -lactoalbumina, somando aproximadamente 70 – 80 % das proteínas do soro.

A β -lactoglobulina representa aproximadamente 50 % do teor protéico do soro de leite bovino. É uma proteína globular com massa molar de 18.300 g/mol e apresenta ponto isoelétrico em pH 5,2. Em pH entre 3,0 – 7,0 encontra-se em solução como um dímero, com massa molar efetiva em torno de 36.000 g/mol (CHATTERTON, et al., 2006). A β -lactoglobulina nativa possui duas ligações dissulfeto e um grupo tiol livre, localizada na parte interior da estrutura protéica (HONG e CREAMER, 2002) e apresenta um importante polimorfismo genético, com no mínimo sete variantes genéticas (LE BON, DURAND e NICOLAI, 2002). Esta proteína é termolábil e apresenta mudanças conformacionais reversíveis em temperaturas menores que 70 °C. Temperaturas elevadas podem provocar sua desnaturação e polimerização irreversível (GIRALDO-ZUÑIGA et al., 2002). Sob tratamento térmico, os dímeros nativos dissociam-se progressivamente em monômeros nativos, induzindo uma mudança conformacional que resulta na exposição do grupo tiol reativo, levando à formação de agregados formados via ligações dissulfeto intermoleculares e interações não-covalentes (HONG e CREAMER, 2002). Esse grupo tiol pode formar ligações dissulfeto com outras proteínas que contêm cisteína, como β -lactoglobulina ou albumina sérica bovina, ou com proteínas que possuem ligações dissulfeto, como α -lactoalbumina, κ -caseína e α_{s2} -caseína (VASBINDER, ALTING e KRUIF, 2003; FOX, 2001). A formação de ligações dissulfeto intermoleculares é essencial para a formação de géis de proteínas do soro induzidos termicamente e para uma estrutura de espuma estável (MORR e HÁ, 1993).

A α -lactoalbumina corresponde a 20 % das proteínas do soro de leite (LINDEN e LORIENT, 1994). Apresenta estrutura com massa molar de 14.200 g/mol, ponto isoelétrico na faixa de pH 4 - 5, é muito estável a tratamentos térmicos (HONG e CREAMER, 2002) e apresenta a capacidade de se ligar a cátions metálicos (PERMYAKOV e BERLINER, 2000). A α -lactoalbumina apresenta a característica de adotar uma conformação estrutural que se conhece como estado *molten globule* em temperaturas elevadas, pH baixo ou na ausência de íons cálcio em pH 7 e temperatura de 40 – 50 °C (RELKIN, 1996). A ligação com o cálcio, estabiliza a forma nativa da α -lactoalbumina de tal maneira que a temperatura de desnaturação protéica na apo-proteína é de 20 °C e na holo-proteína (ligada ao cálcio) é 70 °C (FARKAS et al., 2005). O íon cálcio na α -lactoalbumina tem um papel estrutural, sendo requerido para o desdobramento e formação da ligação dissulfeto nativa da proteína desnaturada (CHRYSINA, BREW e ACHARYA, 2000). Esta proteína é sensível ao calor, no entanto quando sua desnaturação ocorre em temperaturas inferiores a 95 °C, pode ser reversível (GIRALDO-ZUÑIGA et al., 2002). A renaturação da α -lactoalbumina à estrutura nativa é dependente da presença dos íons cálcio, que retém as propriedades estruturais e a estabilidade térmica da proteína (ANDERSON, BROOKS e BERLINER, 1997). A irreversibilidade da desnaturação térmica da α -lactoalbumina é melhor evidenciada quando está presente em um sistema heterogêneo na presença de β -lactoglobulina (HONG e CREAMER, 2002), acelerando a perda de sua estrutura nativa.

A modificação das proteínas do soro para melhorar suas propriedades funcionais em sistemas alimentícios específicos tem-se tornado foco de pesquisas. Estudos são realizados visando à modificação enzimática das proteínas do soro de leite por polimerização protéica através da reação catalisada pela enzima transglutaminase de origem microbiana, conferindo melhores propriedades funcionais às proteínas (EISSA e KHAN, 2006; TRUONG et al., 2004; COZZOLINO et al., 2003; SHARMA, ZAKORA e QVIST, 2002; MATSUMURA, LEE e MORI, 2000; FAERGEMAND, OTTE e QVIST, 1997; ABOUMAHMOUD e SAVELLO, 1990). A transglutaminase é uma enzima que catalisa a formação de ligações cruzadas covalentes em diferentes proteínas e fornece uma importante ferramenta para o processamento de alimentos. Esta enzima pode modificar as proteínas por meio de incorporação de aminas, ligações cruzadas e desaminação (MOTOKI e SEGURO, 1998), através de uma reação de transferência de grupos acila entre os grupos γ -carboxiamida dos

peptídios ligados aos resíduos de glutamina (doador de acila) e os grupos aminos primários em uma variedade de compostos amino (receptor de acila), levando à formação de ligações tanto inter- como intra-moleculares entre as proteínas. Essas reações levam a mudanças nas propriedades funcionais de proteínas vegetais e animais, conferindo a possibilidade da formação de produtos com melhores propriedades reológicas e sensoriais (NIELSEN, 1995).

As proteínas do soro de leite (β -lactoglobulina e α -lactoalbumina) por apresentarem estrutura globular, tendem a formar reações cruzadas menos efetivas com a transglutaminase comparada à reação com outras proteínas, tais como as caseínas. A β -lactoglobulina e a α -lactoalbumina são moléculas globulares compactas com uma seqüência primária uniformemente repartida em resíduos polares e hidrofóbicos. Podem dobrar-se mascarando no centro da molécula os resíduos hidrofóbicos, de tal maneira que as associações intermoleculares são poucos prováveis (LINDEN e LORIENT, 1994). No entanto, a desnaturação protéica por tratamento térmico parece aumentar a susceptibilidade das proteínas do soro de leite à reação com a transglutaminase (EISSA e KHAN, 2005; SHARMA, LORENZEN e QVIST, 2001).

A polimerização enzimática das proteínas do soro (β -lactoglobulina e α -lactalbumina) com a transglutaminase em seu meio natural composto por lactose, proteínas, minerais, e gordura em menor quantidade é pouco abordada. Os estudos realizados sobre esta reação após a desnaturação das proteínas por aquecimento, são referentes a isolados ou concentrados protéicos de soro de leite com a transglutaminase (SHARMA, ZAKORA e QVIST, 2002). O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da desnaturação das proteínas do soro de leite em pó e o comportamento reológico do soro após reação com a enzima transglutaminase, como também o efeito da reação enzimática na temperatura de gelificação das proteínas do soro de leite em pH 6,0; pH 7,0 e pH 8,0.

Material e Métodos

Material

A transglutaminase independente de Ca^{2+} (ACTIVA MP) produzida a partir do microrganismo *Streptoverticillium mobaraense* foi fornecida pela empresa Ajinomoto no Brasil, produzida pela Ajinomoto Co., Inc., Tokyo, Japan. A preparação da enzima contendo lactose, maltodextrina e transglutaminase apresentou atividade enzimática média de 100U/g (dado fornecido pela indústria). A enzima foi utilizada na sua forma original, sem qualquer purificação.

O soro de leite em pó (comercial) foi gentilmente cedido pela empresa Allimentus®, com composição aproximada de >70 % lactose, > 11 % proteína, < 6 % umidade, < 8,7 % minerais e < 1,6 % gordura (dados da indústria). Água destilada foi utilizada para a preparação das amostras de soro de leite. Todos os outros reagentes utilizados foram de qualidade analítica.

Métodos

Polimerização das proteínas

Amostras de soro de leite em pó foram preparadas na concentração de 50 % (m/v) em água destilada. O soro de leite foi dissolvido e homogeneizado a 100 rpm por 12 horas, para completa dissolução. A concentração protéica do soro foi determinada pelo método de Kjeldahl (A.O.A.C. 2005) e utilizada como referência para a adição da transglutaminase.

Amostras de 50 mL de soro foram preparadas pelo aquecimento a 75, 80, 85, 90 e 95 °C por 15 minutos em banho-maria, seguido pelo resfriamento das soluções a 25 °C e adição da enzima transglutaminase na concentração de 50 U de transglutaminase / g de proteína. As amostras foram agitadas por 30 minutos a 100 rpm para completa dissolução e homogeneização. As soluções foram aquecidas na temperatura de incubação de 36 °C e mantidas em estufa por 240 minutos. As soluções foram resfriadas a temperatura de 25 °C e a

análise reológica foi realizada em seguida. Amostras controle foram preparadas seguindo o mesmo procedimento descrito, sem a adição da enzima transglutaminase.

As medidas das propriedades de fluxo do soro de leite controle e do soro submetido à reação enzimática foram realizadas em reômetro rotacional (*Brookfield Engineering Laboratories* model DV III Ultra, Stoughton, MA, USA), com cilindro concêntrico (*spindle* ULA), coletadas através do *software* Rheocalc® 32 versão 2.5 (*Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro MA 02346 USA*). O reômetro foi controlado termostaticamente por banho de água circulante (TE-184, TECNAL, Brasil) a 25 °C. O comportamento de fluxo das amostras foi avaliado através do aumento linear da taxa de deformação de 24,0 a 245,0 (s⁻¹), no tempo de 30 minutos. As amostras permaneceram em repouso por 15 minutos antes das análises. As medidas foram realizadas em duplicata.

O modelo reológico Herschel-Bulkley (1) foi utilizado para descrever o comportamento de fluxo das amostras de soro de leite, e o índice de consistência (K) foi utilizado como parâmetro de monitoramento da alteração da viscosidade das amostras em função da reação enzimática. O modelo de Casson (2) foi utilizado para a determinação do limite de escoamento (σ_0) das amostras, para fins de cálculo do modelo Herschel-Bulkley.

$$\sigma = \sigma_0 + K \left(\dot{\gamma} \right)^n \quad (1)$$

Sendo: σ – tensão de cisalhamento (Pa); σ_0 – limite de escoamento (Pa); K – índice de consistência (Pa.sⁿ); $\dot{\gamma}$ – taxa de deformação (s⁻¹); n – índice de comportamento de fluxo (adimensional).

$$\sigma^{0,5} = K_{oc} + K_c \times \left(\dot{\gamma} \right)^{0,5} \quad (2)$$

Sendo: σ – tensão de cisalhamento (Pa); K_{oc} – limite de escoamento (Pa); K_c – viscosidade plástica de Casson (Pa.s); $\dot{\gamma}$ – taxa de deformação (s⁻¹).

Gelificação das proteínas do soro de leite

Amostras de soro de leite foram preparadas pela reconstituição do soro em pó na concentração de 10 % (m/v) em água destilada. O soro foi dissolvido e homogeneizado a 100 rpm por 12 horas, para completa dissolução. Após a adição da enzima transglutaminase (50 U de transglutaminase / g de proteína) as amostras foram agitadas por 30 minutos a 100 rpm para completa dissolução e homogeneização. A correção do valor de pH foi realizada em pHmêtro (MP 220 meter – Metler – Toledo) utilizando soluções de NaOH 0,1N; NaOH 1N e HCl 0,1N obtendo-se os valores de pH 6,0; 7,0 e 8,0. As soluções foram aquecidas na temperatura de incubação de 36 °C e mantidas em estufa por 4 e 24 horas. As soluções foram resfriadas a temperatura de 25 °C e a análise reológica foi realizada em seguida, em duplicata. As amostras permaneceram em repouso no compartimento de amostras por 15 minutos antes das análises. O monitoramento da viscosidade aparente das amostras em função do aumento da temperatura foi realizado mantendo-se a taxa de deformação constante em 0,12 (s⁻¹). O reômetro foi controlado termostaticamente por banho de água circulante (TE-184, TECNAL, Brasil), e as análises foram realizadas na faixa de temperatura de 30 – 95 °C.

Turbidez

A análise de turbidez das soluções de soro de leite foi realizada segundo Wilcox e Swaisgood (2002), pela diluição das amostras em água destilada na concentração protéica de 2 mg / mL de solução, seguida pela leitura em espectrofotômetro (Hitachi U2010) a 600 nm.

Resultados e Discussão

O tratamento térmico do soro de leite (50 % m/v) antes do tratamento enzimático com transglutaminase foi avaliado nas temperaturas de 75, 80, 85, 90 e 95 °C. O aumento da temperatura favoreceu o aumento ($p < 0,05$) do limite de escoamento (σ_0) e do índice de consistência (K) das soluções de soro de leite (Figuras 1, 2 e Tabela 1), como resultado da agregação das proteínas e da maior polimerização protéica catalisada pela transglutaminase.

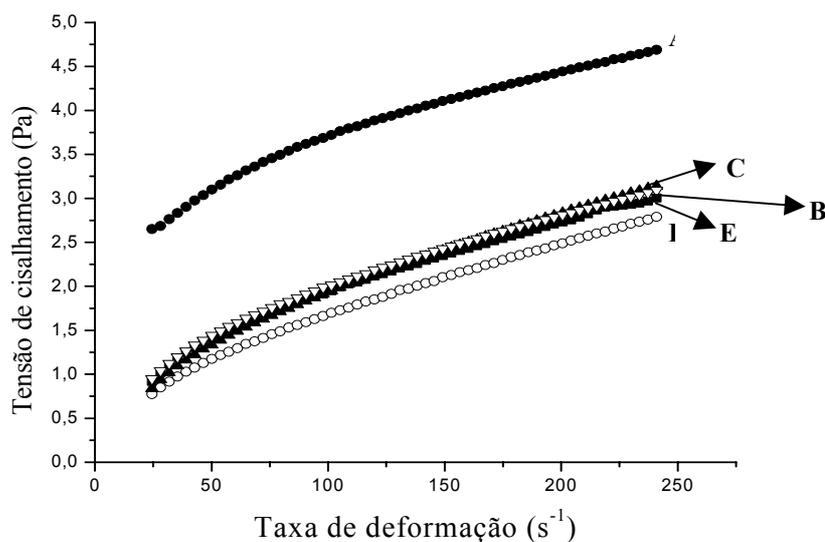


Figura 1. Tensão de cisalhamento *versus* taxa de deformação das amostras de soro de leite (50 % m/v) submetidas ao tratamento térmico (A – 95 °C; B – 90 °C; C – 85 °C; D – 80 °C; E – 75 °C).

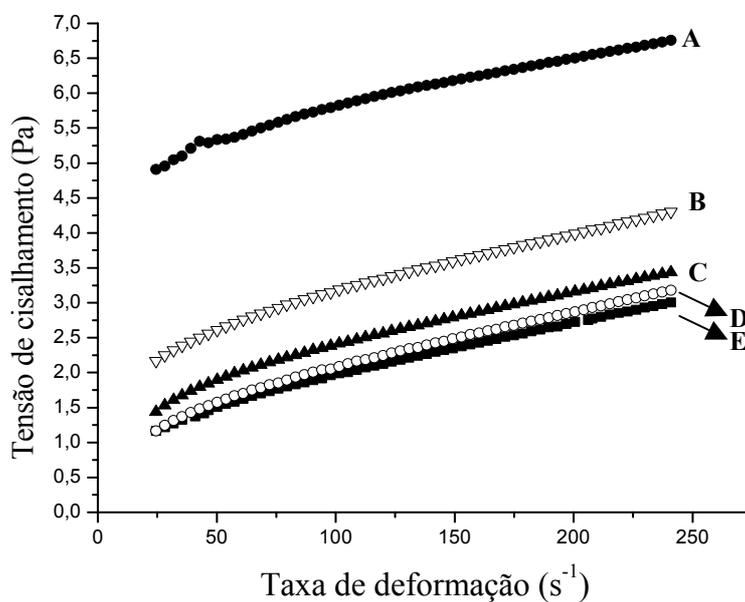


Figura 2. Tensão de cisalhamento *versus* taxa de deformação das amostras de soro de leite (50 % m/v) submetidas ao tratamento enzimático com transglutaminase (50 U / g proteína) após tratamento térmico (A – 95 °C; B – 90 °C; C – 85 °C; D – 80 °C; E – 75 °C).

Tabela 1. Parâmetros reológicos obtidos pelos modelos de Casson e Herschel-Bulkley nas curvas de ida (aumento da taxa de deformação) para as amostras de soro de leite (50 % m/v) controle e submetidas ao tratamento enzimático com transglutaminase (50 U /g de proteína).

Teste	T (°C)	σ_0	K (Pa.s ⁿ)	n	Histerese (área)
Controle	75	0,49 ^a	0,06 ^{a b}	0,68 ^a	-68,44 ^a
	80	0,33 ^a	0,05 ^a	0,73 ^a	-72,14 ^a
	85	0,38 ^a	0,06 ^{a b}	0,71 ^a	-70,88 ^a
	90	0,50 ^{a b}	0,06 ^b	0,69 ^a	-35,80 ^b
	95	2,00 ^d	0,10 ^d	0,60 ^b	125,70 ^c
TG	75	0,63 ^{a b}	0,07 ^{b c}	0,64 ^b	-36,18 ^b
	80	0,64 ^{a b}	0,07 ^{b c}	0,65 ^b	-34,12 ^b
	85	0,92 ^b	0,08 ^c	0,63 ^b	3,15 ^d
	90	1,51 ^c	0,10 ^d	0,60 ^b	44,58 ^e
	95	4,24 ^e	0,13 ^e	0,55 ^c	253,94 ^f

* Os valores correspondem às médias dos valores obtidos em duplicata.

** Letras diferentes em uma mesma coluna diferem significativamente entre si ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

*** TG = transglutaminase; T = temperatura; σ_0 = limite de escoamento; K = índice de consistência; n = índice de comportamento de fluxo.

Como pode ser observado na Tabela 1 e na Figura 1, o índice de consistência (K) das soluções controle aumentou significativamente ($p < 0,05$) quando estas foram submetidas ao tratamento térmico a 95 °C, resultando na maior desnaturação protéica, o que reflete na viscosidade da solução. Segundo Fuente, Singh e Hemar (2002), a contribuição das interações não-covalentes ao mecanismo de agregação total torna-se importante em temperaturas próximas a 95 °C, enquanto que estas interações pouco contribuem para a agregação em temperaturas inferiores a 75 °C. A desnaturação térmica da β -lactoglobulina (proteína majoritária no soro de leite) é caracterizada por alterações na estrutura secundária e terciária, expondo os resíduos hidrofóbicos ao solvente, levando a um processo de agregação e formação de ligações intermoleculares (RENARD et al., 2000); geralmente, ligações covalentes e não-covalentes são responsáveis pela estrutura tridimensional do gel formado (GLIBOWSKI, MLEKO e WESOLOWSKA-TROJANOWSKA, 2006). O desdobramento da proteína, resultando na exposição e ativação dos grupos sulfidríla livres, é considerado um

passo limitante no processo de agregação (FUENTE, SINGH e HEMAR, 2002), que envolve principalmente as interações com a β -lactoglobulina (BOYE et al., 1995).

Observa-se na Tabela 1 o aumento significativo ($p < 0,05$) do limite de escoamento e do índice de consistência das soluções submetidas ao tratamento enzimático com a transglutaminase a partir da temperatura de 85 °C, comparadas às soluções controle. A temperatura de 95 °C conferiu o aumento mais pronunciado nestes valores, sugerindo que a desnaturação térmica induziu maior exposição dos resíduos de glutamina e lisina para a polimerização enzimática. A menor efetividade de reação em temperaturas inferiores a 95 °C pode ser explicada, pois, β -lactoglobulina e α -lactoalbumina apresentam mudança conformacional reversível dependendo da temperatura e do tempo de exposição ao calor (RELKIN, LAUNAY e LIU, 1998; GIRALDO-ZUÑIGA et al., 2002). A desnaturação protéica favorece o acesso da enzima transglutaminase aos grupos NH_2 das proteínas globulares do soro de leite, possibilitando a formação de ligações cruzadas. A quantidade destas ligações depende da acessibilidade dos resíduos reativos de lisina e glutamina no substrato protéico (DICKINSON e YAMAMOTO, 1996), que é beneficiada pelo tratamento térmico. Estudos realizados com leite de cabra (RODRIGUEZ-NOGALES, 2006), leite de ovelha (RODRIGUEZ-NOGALES, 2005) e proteínas isoladas de soro de leite (SHARMA, LORENZEN e QVIST, 2001) evidenciam a maior efetividade da transglutaminase na reação com proteínas desnaturadas termicamente.

A Figura 3 ilustra a interação significativa ($p < 0,05$) observada entre o tratamento térmico e adição da enzima transglutaminase. Comparando os valores do limite de escoamento (σ_0) e do índice de consistência (K) das soluções adicionadas de transglutaminase e soluções controle, observa-se que o aquecimento das soluções em temperaturas a partir de 85 °C contribuem significativamente para o aumento destes parâmetros, em consequência da reação enzimática.

O Modelo Herschel-Bulkley ajustou adequadamente os dados ($R > 0,99$). O índice de consistência (K) foi utilizado como parâmetro de monitoramento da viscosidade das soluções, pois estes parâmetros estão diretamente correlacionados entre si (WILCOX e SWAISGOOD, 2002). O aumento na temperatura de tratamento térmico do soro de leite conferiu menores valores de índice de comportamento de fluxo (n) às amostras (Tabela 1). O índice de

comportamento de fluxo indica a proximidade de um fluido ao comportamento Newtoniano ($n = 1$). A maior efetividade de reação da transglutaminase reflete na formação de maior quantidade de polímeros de alto peso molecular, conferindo comportamento pseudoplástico ($n < 1$) às soluções submetidas ao tratamento térmico.

A Tabela 1 mostra os valores de histerese encontrados para as amostras de soro de leite, obtidos através da curva tensão de cisalhamento *versus* taxa de deformação. A histerese corresponde à área entre as curvas obtida quando uma amostra é submetida ao aumento da taxa de cisalhamento, seguida pela diminuição desta, indicando que o fluido apresenta viscosidade dependente do tempo de cisalhamento (TÁRREGA, DURAN e COSTELL, 2004). Pode-se verificar que nas amostras controle (95 °C) e nas amostras submetidas ao tratamento enzimático (85, 90, 95 °C), os valores de histerese obtidos são positivos. Estes valores são referentes à quebra da estrutura do gel formado a partir da desnaturação protéica na solução controle a 95 °C. Enquanto nas soluções adicionadas da enzima transglutaminase, são devido à quebra da estrutura do gel formado pela polimerização protéica catalisada pela reação enzimática, que resultou na maior formação de gel a partir da temperatura de 85 °C. A Figura 4 ilustra a histerese das amostras submetidas ao tratamento térmico a 95 °C. O efeito da polimerização protéica catalisada pela transglutaminase na formação do gel pode ser visualizado pela quebra estrutural mais acentuada na amostra tratada enzimaticamente, assim como pela maior viscosidade aparente obtida tanto no início quanto ao fim do ciclo de cisalhamento.

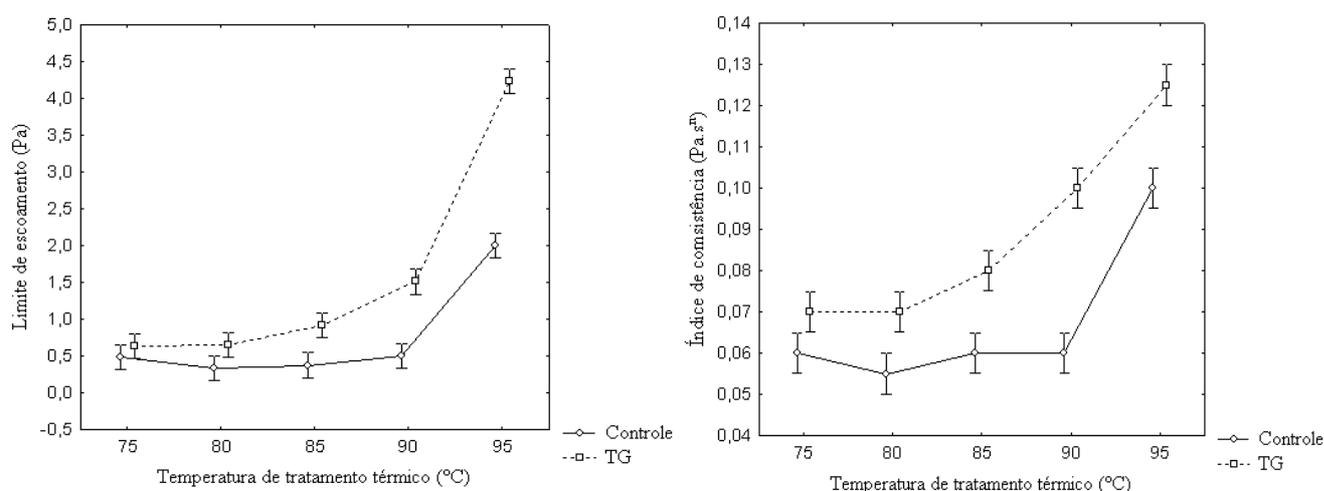


Figura 3. Interação entre o tratamento térmico e adição de transglutaminase (0,5 U/g de proteína) em solução de soro de leite (50 % m/v).

As soluções de proteínas de soro de leite desnaturadas termicamente são geralmente tixotrópicas e pseudoplásticas, no entanto, comportamentos dilatante e reopético também são observados (GLIBOWSKI, MLEKO e WESOLOWSKA-TROJANOWSKA, 2006). Os valores negativos obtidos para a histerese das amostras onde não ocorreu a formação de gel – controle (75, 80, 85, 90 °C) e adicionadas de transglutaminase (75, 80 °C) – são devido ao aumento da viscosidade das soluções de soro de leite durante a deformação da amostra, representadas pela sobreposição da curva de volta (diminuição da taxa de deformação) à curva de ida (aumento da taxa de deformação) (Figura 5). Segundo Daubert et al. (2006), este aumento da viscosidade, representado pelo aumento do limite de escoamento e do índice de consistência das soluções, pode ser explicado devido à destruição da atmosfera iônica em torno de cada partícula pelo fluxo do cisalhamento, produzindo valores de viscosidade superiores comparados aos valores obtidos das partículas iniciais. Mesmo em uma solução altamente diluída, a interação do íon e sua atmosfera aumenta a energia de dissipação, aumentando dessa maneira a viscosidade intrínseca da solução. O aumento do índice de consistência (K) das amostras nas curvas de volta (diminuição da taxa de deformação) comparado aos valores nas curvas de ida (Tabela 1) pode ser visualizado na Tabela 2.

A gelificação das proteínas do soro de leite submetidas ao aquecimento a temperaturas superiores a 70 °C, em pH próximo ou superior à neutralidade, pode ser atribuída às alterações moleculares da β -lactoglobulina e minimamente à α -lactoalbumina (BOYE et al., 1995). A agregação da β -lactoglobulina é muito sensível ao pH do meio de reação (FUENTE, SINGH e HEMAR, 2002) e, sendo esta a proteína majoritária no soro de leite (MORR e HÁ, 1993), considerada um excelente agente de gelificação (GIRALDO-ZUÑIGA et al., 2002), este estudo avaliou o efeito da variação do pH do meio na reação de polimerização das proteínas do soro de leite em pó por transglutaminase e o seu efeito na temperatura de gelificação das soluções protéicas (Tabela 3).

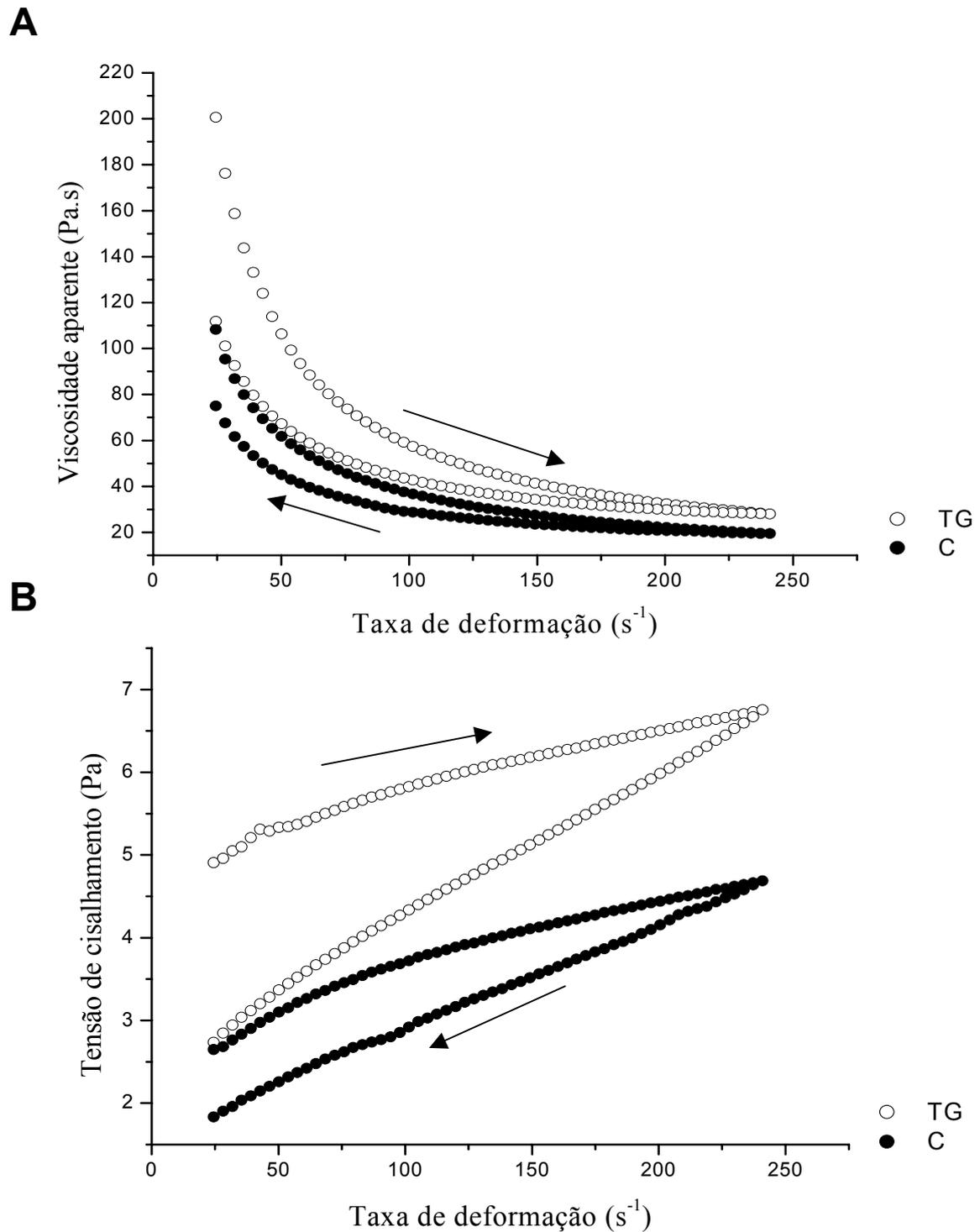


Figura 4. Curvas de histerese para as amostras submetidas ao tratamento térmico de desnaturação protéica a 95 °C (A – viscosidade aparente *versus* taxa de deformação; B – tensão de cisalhamento *versus* taxa de deformação; TG – amostra de soro de leite 50 % m/v adicionada de transglutaminase 50 U / g de proteína; C – amostra de soro de leite controle 50 % m/v).

Tabela 2. Parâmetros reológicos obtidos pela Lei da Potência nas curvas de volta (diminuição da taxa de cisalhamento) para as amostras de soro de leite (50 % m/v) controle e submetidas ao tratamento enzimático com transglutaminase (50 U / g de proteína).

Teste	T (°C)	σ_0	K (Pa.s ⁿ)	n
Controle	75	1,25 ^{bc}	0,04 ^a	0,68 ^c
	80	1,09 ^{ab}	0,04 ^a	0,66 ^c
	85	1,26 ^{bc}	0,08 ^{ab}	0,56 ^{ab}
	90	1,04 ^{ab}	0,08 ^{ab}	0,58 ^a
	95	0,88 ^a	0,12 ^d	0,62 ^{abc}
TG	75	1,11 ^{ab}	0,08 ^{ab}	0,57 ^a
	80	1,12 ^{ab}	0,08 ^{ab}	0,58 ^a
	85	0,81 ^a	0,08 ^{bc}	0,60 ^{ab}
	90	1,14 ^{abc}	0,12 ^c	0,60 ^{ab}
	95	1,46 ^c	0,16 ^e	0,62 ^{abc}

* Os valores correspondem às médias dos valores obtidos em duplicata.

** Letras diferentes em uma mesma coluna diferem significativamente entre si ao nível de 5% de significância (p<0,05) pelo teste de Tukey.

*** TG = transglutaminase; T = temperatura; σ_0 = limite de escoamento; K = índice de consistência; n = índice de comportamento de fluxo.

Tabela 3. Turbidez e ponto gel das soluções de soro de leite em pó (10 % m/v) submetidas ao tratamento enzimático com transglutaminase (50 U / g de proteína).

pH	Tratamento	Turbidez (OD _{600nm})	Ponto gel (°C)
6,0	controle	1,690 ^a	95°C
	TG 4hs	1,713 ^b	91°C
	TG 24hs	1,944 ^c	88°C
7,0	controle	1,664 ^a	96°C
	TG 4hs	1,797 ^d	95°C
	TG 24hs	2,224 ^e	92°C
8,0	controle	1,877 ^f	96°C
	TG 4hs	2,006 ^g	93°C
	TG 24hs	2,183 ^h	85°C

* Os valores de turbidez correspondem às médias dos valores obtidos em triplicata.

** Letras diferentes em uma mesma coluna diferem significativamente entre si ao nível de 5% de significância (p<0,05) pelo teste de Tukey.

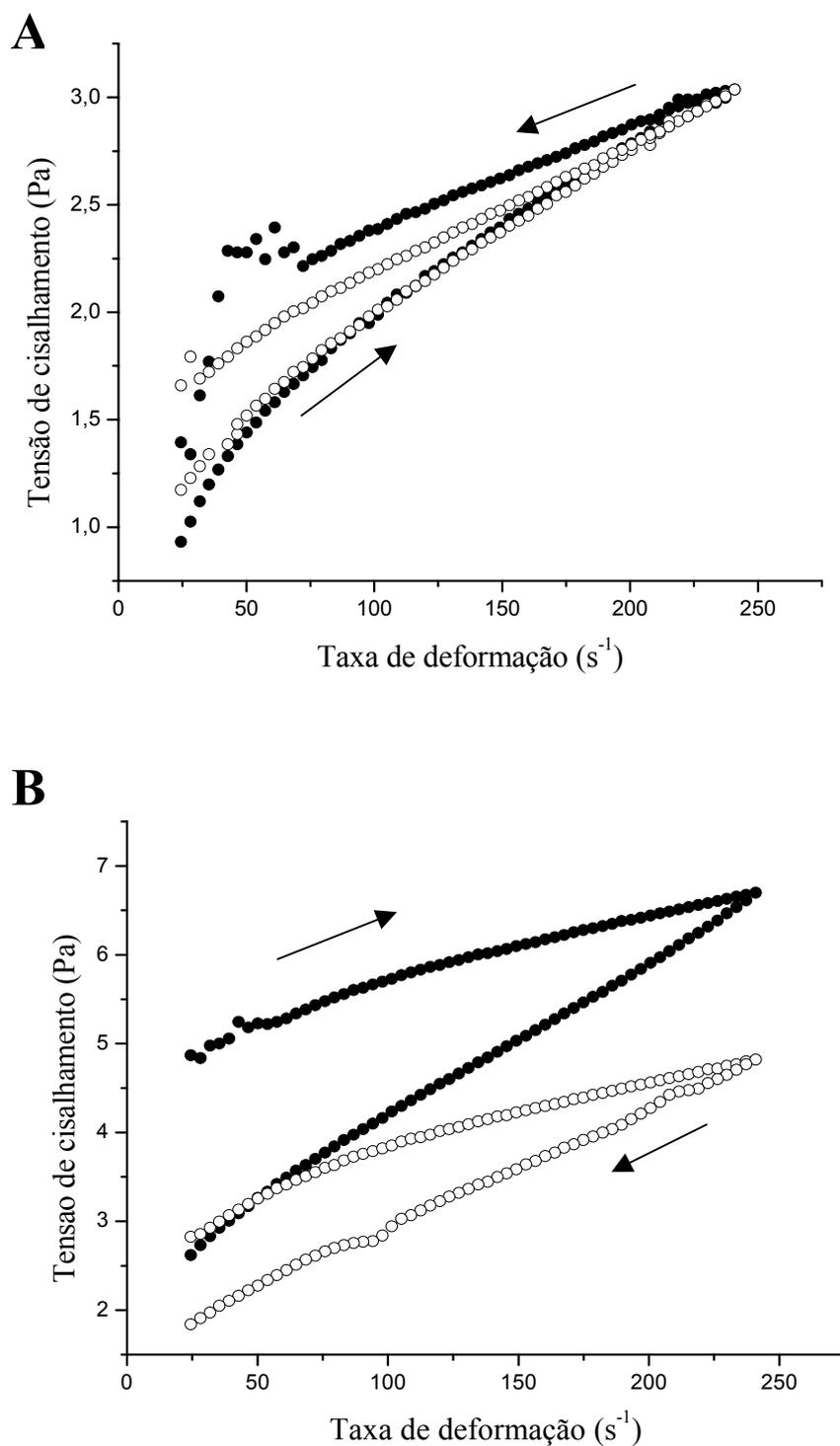


Figura 5. Curvas de histerese obtidas para as amostras submetidas ao tratamento térmico de 75 °C (A) e 95 °C (B) – o: soro de leite controle (50 % m/v); ●: soro de leite (50 % m/v) submetido ao tratamento enzimático com transglutaminase (50 U / g de proteína).

Em valores de pH superiores a 8,0 e inferiores a 5,0, a atividade enzimática da transglutaminase diminui significativamente (ANDO et al., 1989; EISSA, BISRAM e KHAN, 2004). A faixa de pH estudada foi de 6,0 – 8,0 devido a maior estabilidade da enzima nestes valores de pH, e porque em valores de pH próximos a 5,2 a β -lactoglobulina encontra-se no seu ponto isoelétrico, desnaturada em solução.

A temperatura de gelificação foi definida no ponto em que houve o aumento da viscosidade da solução protéica, definido como ponto gel. A reação de polimerização das proteínas do soro de leite pela transglutaminase refletiu na diminuição da temperatura de gelificação das soluções protéicas. Truong et al. (2004) afirmam que a rede protéica é formada parcialmente durante a polimerização enzimática, requerendo menos calor para a gelificação do que seria necessário para as soluções não tratadas. Observa-se também que o aumento do tempo de reação (24 horas) levou à diminuição mais acentuada do ponto gel, provavelmente pela maior formação dos polímeros protéicos de alto peso molecular, catalisada pela transglutaminase.

No estudo realizado por Truong et al. (2004), o ponto de gelificação de soluções contendo isolado protéico de soro de leite foi avaliado através da reologia de oscilação após a reação enzimática com transglutaminase na sua forma imobilizada e adição do agente redutor DTT, em pH 7,5. Estes pesquisadores encontraram valores diferentes aos encontrados neste estudo, sendo que, para as soluções controle, o ponto de gelificação foi de 67,6 °C, enquanto que as soluções tratadas enzimaticamente por 1 hora apresentaram valores de ponto gel de 65,6 °C.

A formação dos polímeros de alto peso molecular em função do tempo de reação enzimática pode ser visualizada pelos valores de turbidez obtidos (Tabela 3). O maior tempo de reação conferiu maior turbidez às amostras devido ao aumento do tamanho dos agregados protéicos formados a partir da reação catalisada pela transglutaminase. Resultados semelhantes foram observados por Wilcox e Swaisgood (2002). A turbidez de soluções de isolados protéicos de soro de leite adicionadas de transglutaminase e agente redutor (DTT) foi avaliada; o tempo prolongado de reação enzimática favoreceu o aumento da turbidez das soluções.

O maior valor de turbidez encontrado para as soluções controle foi observado em pH 8,0. Acredita-se que a β -lactoglobulina torna-se parcialmente desnaturada em pH de valor elevado (pH 8,0) (EISSA, BISRAM e KHAN, 2004), resultando no aumento da turbidez. Em pH 8,0, o grupo tiol da β -lactoglobulina torna-se rapidamente disponível para reações, aumentando a taxa de polimerização via ligações dissulfeto, enquanto que, em valores de pH inferiores (7,0 por exemplo), a molécula deve ser aquecida, ou desnaturada de outra maneira para expor o grupo tiol (FUENTE, SINGH e HEMAR, 2002). Em relação às amostras submetidas ao tratamento com a transglutaminase, os maiores valores de turbidez foram observados nas soluções em pH 7,0, provavelmente devido a maior estabilidade da transglutaminase neste valor de pH.

Conclusões

O tratamento térmico do soro de leite antes do tratamento enzimático com a transglutaminase conferiu um aumento do índice de consistência das soluções. Este aumento foi significativo ($p < 0,05$) quando a temperatura utilizada foi superior a 85 °C. O ponto gel das soluções nos valores de pH estudados (6,0; 7,0 e 8,0) diminuiu com a adição da transglutaminase e com o aumento do tempo de reação enzimática. Através da análise de turbidez foi possível verificar que esta diminuição do ponto gel pode ser devido ao aumento da formação de polímeros, observando que, com o aumento do grau de polimerização, menos energia é requerida para a formação do gel protéico.

Referências Bibliográficas

ABOUMAHMOUD, R.; SAVELLO, P. Crosslinking of whey protein by transglutaminase. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 256-263, 1990.

ANDERSON, P.J.; BROOKS, C.L.; BERLINER, L.J. Functional identification of calcium binding residues in bovine α -lactalbumin. **Biochemistry**, n. 36, p. 11648-11654, 1997.

ANDO, H.; ADACHI, M.; UMEDA, K.; MATSURA, A.; NONAKA, M.; UCHIO, R.; TANAKA, H.; MOTOKI, M. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.53, n.10, p.2613-2617,1989.

AOAC. (2005). **Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL**. 18th ed. Maryland: AOAC, 2005.

BOYE, J.I.; ALLI, I.; ISMAIL, A.A.; GIBBS, B.F.; KONISHI, Y. Factors affecting molecular characteristics of whey protein gelation. **International Dairy Journal**, v. 5, p. 337-353, 1995.

CHATTERTON, D.E.W.; SMITHERS, G.; ROUPAS, P.; BRODKORB, A. Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin – Technological implications for processing. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1229-1240, 2006.

CHRYSINA, E.D.; BREW, K.; ACHARYA, K.R. Crystal structures of apo- and holo-bovine α -lactalbumin at 2,2 Å resolution reveal an effect of calcium on inter-lobe interactions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 47, p. 37021-37029, 2000.

COZZOLINO, A.; PIERRO, P.D.; MARINIELLO, L.; SORRENTINO, A.; MASI, P.; PORTA, R. Incorporation of whey proteins into cheese curd by using transglutaminase. **Biotechnololy and Applied Biochemistry**, v. 38, p. 289-295, 2003.

DAUBERT, C.R.; HUDSON, H. M.; FOEGEDING, E.A.; PRABHASANKAR, P. Rheological characterization and electrokinetic phenomena of charged whey protein dispersions of defined sizes. **Lebensmittel - Wissenschaft und – Technologie**, v. 39, p. 206-215, 2006.

DICKINSON, E.; YAMAMOTO, Y. Rheology of milk protein gels and protein-stabilized emulsion gels cross-linked with transglutaminase. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 44, p. 1371-1377, 1996.

EISSA, A.S.; BISRAM, S.; KHAN, S.A. Polymerization and gelation of whey protein isolates at low pH using transglutaminase enzyme. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4456-4464, 2004.

EISSA, A.S.; KHAN, S.A. Acid-gelation of enzymatically modified, preheated whey proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 5010-5017, 2005.

EISSA, A.S.; KHAN, S.A.; Modulation of hydrophobic interactions in denatured whey proteins by transglutaminase enzyme. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 543-547, 2006.

FAERGEMAND, M.; OTTE, J.; QVIST, K.B. Enzymatic cross-linking of whey proteins by a Ca^{2+} -independent microbial transglutaminase from *Streptomyces lydicus*. **Food Hydrocolloids**, v. 11, n. 1, p. 19-25, 1997.

FARKAS, V.; VASS, E.; HANSSENS, I.; MAJER, Z.; HOLLÓSI, M. Cyclic peptide models of the Ca^{2+} -binding loop of α -lactalbumin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 5310-5320, 2005.

FOX, P.F. Milk protein as food ingredients. **International Journal of Dairy Technology**, n. 54, p. 41-55, 2001.

FUENTE, M.A. de la; SINGH, H.; HEMAR, Y. Recent advances in the characterization of heat-induced aggregates and intermediates of whey proteins. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p. 262-274, 2002.

GIRALDO-ZUÑIGA, A.D.; COIMBRA, J.S.R.; GOMES, J.C.; MINIM, L.A.; ROJAS, E.E.G. Propriedades funcionais e nutricionais das proteínas do soro de leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 325, n. 57, p. 35-46, 2002.

GLIBOWSKI, P.; MLEKO, S.; WESOŁOWSKA-TROJANOWSKA, M. Gelation of single heated vs. double heated whey proteins isolate. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1113-1118, 2006.

HONG, Y., CREAMER, L.K. Changed protein structures of bovine β -lactoglobulin B and α -lactalbumin as a consequence of heat treatment. **International Dairy Journal**, n. 12, p. 345-359, 2002.

LE BON, C.; DURAND, D.; NICOLAI, T. Influence of genetic variation on the aggregation of heat-denatured β -lactoglobulin. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 671-678, 2002.

LINDEN, G.; LORIENT, D. **Bioquímica Industrial: Revalorización alimentaria de la producción agrícola**. Editorial Acribia, Zaragoza, Espanha. p.221,1994.

MATSUMURA, Y.; LEE, D.-S.; MORI, T. Molecular weight distributions of α -lactalbumin polymers formed by mammalian and microbial transglutaminases. **Food Hydrocolloids**, v. 14, p. 49-59, 2000.

MORR, C.; HÁ, E.W. Whey protein concentrates and isolates processing and functional properties critical reviews. **Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, 431-476, 1993.

MOTOKI, M.; SEGURO, K. Transglutaminase and its use for food processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, p. 204-210, 1998.

NIELSEN, G.S; PETERSEN, B.R.; MOLLER, A.J. Impact of salt, phosphate and temperature on the effect of a transglutaminase (F XIIIa) on the texture of restructured meat. **Meat Science**, v. 41, n. 3, p. 293-299, 1995.

PERMYAKOV, E.A.; BERLINER, L.J. α -Lactalbumin: structure and function. **FEBS Letters**, n. 473, p. 269-274, 2000.

RELKIN, P. Thermal unfolding of β -lactoglobulin, α -lactalbumin, and bovine serum albumin: A thermodynamic approach. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 36, p. 565-601, 1996.

RELKIN, P.; LAUNAY, B.; LIU, T.-X. Heat- and cold-setting of β -lactoglobulin solutions. A DSC and TEM study. **Thermochimica Acta**, v. 308, p. 69-74, 1998.

RENARD, D.; ROBERT, P.; GARNIER, C.; DUFOUR, E. ; LEFEBVRE, J. Gelation by phase separation in a whey protein system : in-situ kinetics of aggregation. **Journal of Biotechnology**, v.79, n. 3, p. 231-244, 2000.

RODRIGUEZ-NOGALES, J.M. Enzymatic cross-linking of ewe's milk proteins by transglutaminase. **European Food Research and Technology**, v. 00, p. 1-8, 2005.

RODRIGUEZ-NOGALES, J.M. Effect of preheat treatment on the transglutaminase-catalyzed cross-linking of goat milk proteins. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 430-437, 2006.

SHARMA, R.; LORENZEN, P.C.; QVIST, K.B. Influence of transglutaminase treatment of skim milk on the formation of ϵ -(γ -glutamyl)lysine and the susceptibility of individual proteins towards crosslinking. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 785-793, 2001.

SHARMA, R.; ZAKORA, M.; QVIST, K.B. Susceptibility of an industrial α -lactalbumin concentrate to cross-linking by microbial transglutaminase. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 1005-1012, 2002.

TRUONG, V.-D.; CLARE, D.A.; CATIGNANI, G.L.; SWAISGOOD, H.E. Cross-linking and rheological changes of whey proteins treated with microbial transglutaminase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1170-1176, 2004.

TÁRREGA, A.; DURAN, L.; COSTELL, E. Flow behaviour of semi-solid dairy desserts. Effect of temperature. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 345-353, 2004.

VASBINDER, A.J.; ALTING, A.C.; KRUIF, K.G. Quantification of heat-induced casein-whey protein interactions in milk and its relation to gelation kinetics. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, n. 31, p. 115-123, 2003.

WILCOX, C.P.; SWAISGOOD, H.E. Modification of the rheological properties of whey protein isolate through the use of an immobilized microbial transglutaminase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5546-5551, 2002.

Capítulo 4

Propriedades físicas de iogurte elaborado com soro de leite e transglutaminase

Propriedades físicas de iogurte elaborado com soro de leite e transglutaminase

Resumo

O efeito da polimerização das proteínas do leite antes do processo de fermentação do iogurte foi avaliado pela reação enzimática com transglutaminase de origem microbiana (*Streptoverticillium mobaraense*). O iogurte foi preparado com leite ou por substituição de percentual de leite por soro de leite líquido, com o objetivo de buscar uma maneira de utilização do soro de leite na sua forma natural em produtos lácteos. A transglutaminase foi adicionada às amostras na proporção de 0,5 U / g de proteína, e propriedades físicas tais como comportamento reológico, índice de sinerese e perfil de textura foram avaliados. A adição do soro de leite à formulação conferiu maior índice de sinerese e menor viscosidade às amostras; enquanto a adição da enzima transglutaminase contribuiu para a prevenção da sinerese e aumento do índice de consistência. A elaboração de iogurte com substituição de 20 % de leite por soro de leite, seguido pelo tratamento enzimático levou à formação de um produto com características semelhantes ao iogurte elaborado de maneira tradicional, com valores de índice de sinerese significativamente iguais e parâmetros de textura próximos ao iogurte controle.

Palavras-chave: iogurte, soro de leite, reologia, textura, transglutaminase.

Introdução

A substituição de percentual de leite por soro de leite líquido (na sua forma natural) na elaboração de produtos lácteos, como iogurte, poderia ser uma alternativa para sua utilização, minimizando seu descarte pelas indústrias e a necessidade de outros processos tais como ultrafiltração, spray-dryer entre outros; considerados processos de alto custo. No entanto, esta substituição leva a alterações no produto final, tais como a diminuição da viscosidade e o aumento do fenômeno de sinerese, considerado um defeito primário do processamento do iogurte, afetando a aceitação pelo consumidor. Pode conduzir também a uma excessiva diminuição na concentração de sólidos totais, levando à formação de um iogurte de corpo fraco e fino, considerado um defeito de textura do produto (LUCEY e SINGH, 1998). Alternativas para a sua utilização são pesquisadas, pois o soro de leite no Brasil é descartado em efluentes e as indústrias de alimentos importam isolados e concentrados protéicos de soro de leite para a elaboração de produtos.

Modificações químicas e físicas são normalmente utilizadas para modificar proteínas alterando suas propriedades funcionais. A utilização de enzimas é considerada aceitável pelos consumidores por requerer condições mais amenas, possuir alta especificidade, ser somente requerida em quantidades catalíticas e por apresentar menor probabilidade de produzir compostos tóxicos (SINGH, 1991). A enzima transglutaminase permite a formação de estruturas em rede na forma de gel a partir de soluções e dispersões protéicas de baixa viscosidade (DICKINSON, 1997); catalisa a formação de ligações cruzadas covalentes em diferentes proteínas e fornece uma importante ferramenta para o processamento de alimentos. Esta enzima pode modificar as proteínas por meio de incorporação de amina, desaminação e ligações cruzadas (MOTOKI e SEGURO, 1998) através de uma reação de transferência de grupos acila entre grupos γ -carboxiamida dos peptídios ligados aos resíduos de glutamina (doador de acila) e os grupos aminos primários em uma variedade de compostos amino (receptor de acila), incluindo os peptídios ligados aos grupos ϵ -amino dos resíduos de lisina (FOLK e FINLAYSON, 1977). Essas reações levam à mudanças nas propriedades funcionais de proteínas vegetais e animais e conferem a possibilidade da formação de produtos com melhores propriedades reológicas e sensoriais (NIELSEN, 1995).

Os métodos tradicionais utilizados para melhorar a textura de iogurte e diminuir a sinerese incluem o enriquecimento da matéria seca (sólidos totais) e/ou conteúdo protéico, como também a adição de hidrocolóides tais como gelatina e amido (LUCEY e SINGH, 1998; LORENZEN et al., 2002). A polimerização das cadeias de proteínas do leite pela transglutaminase para a estabilização da rede tridimensional do iogurte surge como uma nova tecnologia na prevenção de problemas comuns no processamento de produtos lácteos.

A adição de transglutaminase ao leite antes do processo de fermentação de iogurte resulta em aumento da força do gel de iogurte (LORENZEN et al., 2002). A polimerização intermolecular das caseínas induzida por transglutaminase melhora a gelificação, produzindo mudanças significativas nas propriedades funcionais das proteínas do leite (LAUBER et al., 2000) e na microscopia do gel, diminuindo o tamanho dos poros da rede resultando em uma distribuição estrutural mais regular, diminuindo a sinerese (LORENZEN et al., 2002).

Estrutura, firmeza e viscosidade são importantes propriedades de qualidade do iogurte. Essas propriedades são critérios primordiais para a avaliação de sua qualidade em relação à aceitação sensorial (MOHAMEED, ABU-JDAYIL e AL-SHAWABKEH, 2004). Os géis de caseína são responsáveis pela maioria das propriedades reológicas de produtos lácteos tais como gel, extensibilidade e fratura. Os estudos reológicos são realizados como um método de controle de qualidade em indústrias de laticínios e como uma técnica de estudo da estrutura do produto (TUNICK, 2000). A caracterização reológica de alimentos, em especial os efeitos dependentes do tempo, é requerida para o controle de qualidade, textura e vida de prateleira, como também para o delineamento dos equipamentos de processo (ABU-JDAYIL e MOHAMEED, 2002). A reologia de iogurte é de grande importância e sua correta avaliação poderia fornecer importantes informações utilizadas no controle de qualidade da produção comercial, estabilidade no armazenamento, avaliação sensorial de consistência e o conhecimento dos efeitos dos processos mecânicos na estrutura do iogurte.

Este estudo tem por objetivo avaliar a influência da enzima transglutaminase de origem microbiana (*Streptoverticillium mobaraense*) nas propriedades físicas (índice de sinerese, comportamento reológico e perfil de textura) de iogurtes elaborados com substituição de leite por soro de leite na forma líquida.

Material e Métodos

Material

A transglutaminase independente de Ca^{2+} (ACTIVA MP) foi fornecida pela empresa Ajinomoto no Brasil (Ajinomoto, São Paulo, SP, Brasil). Esta enzima (ACTIVA MP – composta por lactose, maltodextrina e transglutaminase) apresentou atividade enzimática média de 100 U/g (dado fornecido pela indústria). A enzima foi utilizada na sua forma original, sem qualquer purificação. O leite integral Tipo C foi adquirido comercialmente e o soro de leite utilizado foi obtido a partir da coagulação enzimática do leite com renina (Chr. Hansen®, Valinhos, SP, Brasil). Os demais reagentes foram de qualidade analítica.

Elaboração do iogurte e tratamento enzimático com transglutaminase

O iogurte foi elaborado a partir do tratamento térmico do leite (95 °C/5 minutos), seguido pelo resfriamento (42 °C), adição da cultura láctea (50mg/L) (Chr. Hansen ®, Valinhos, SP, Brasil) e incubação na temperatura de 42 °C. A fermentação foi interrompida por resfriamento das amostras a temperatura de 8 °C quando o pH do iogurte atingiu o valor de 4,3. Amostras de iogurte controle foram elaboradas com 100 % de leite (Controle 100). A adição de soro de leite líquido foi realizada antes do processo de fermentação dos demais iogurtes. Amostras de iogurte foram elaboradas com substituição de 20 % (Controle 80) ou 30 % (Controle 70) de leite por soro de leite líquido. A transglutaminase foi adicionada, após o tratamento térmico, em todas as amostras na proporção de 0,5 U / g de proteína (denominadas TG 100, TG 80, TG 70); a reação enzimática ocorreu a 40 °C/2 horas, seguida por inativação enzimática a 80 °C / 2 minutos, resfriamento (42 °C), adição da cultura láctea (50 mg/mL) e incubação a 42 °C até pH 4,3.

Caracterização físico-química

As amostras de iogurte elaboradas com leite ou diferentes proporções de soro de leite e transglutaminase foram congeladas em congelador de placas (Frigostrella, modelo PF-5, São Paulo, Brasil) e mantidas na temperatura de -18 °C. Após 30 dias de armazenamento, as amostras foram descongeladas (12 horas/8 °C). Foram realizadas as seguintes análises físico-químicas após 30 dias de armazenamento (-18 °C) (AOAC, 2005): umidade (% m/m), cinzas (% m/m), sólidos totais (% m/m), lipídios (% m/m), proteínas totais (% m/m) e acidez em ácido láctico. O pH das amostras foi medido em pHmêtro (MP 220 meter – Metler – Toledo). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Índice de sinerese

O índice de sinerese das diferentes amostras de iogurte foi determinado por centrifugação segundo metodologia proposta por Farnsworth et al. (2006), com modificações. Amostras (15 g) foram centrifugadas a 350 g por 10 minutos (Jaetzki K24, Jena, Alemanha), sob refrigeração, em duplicata. O sobrenadante foi coletado, pesado e o índice de sinerese foi calculado de acordo com a seguinte equação (1):

$$\text{Sinerese}(\%) = \frac{\text{Sobrenadante}(g)}{\text{Iogurte}(g)} \times 100\% \quad (1)$$

Medidas de comportamento de fluxo

As características reológicas das amostras de iogurtes foram realizadas em reômetro rotacional (*Brookfield Engineering Laboratories model DV III Ultra*, Stoughton, MA, USA) com cilindro concêntrico (spindle SC 27), coletadas através do Software Rheocalc® 32 versão 2.5 (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro MA 02346 USA). As medidas foram realizadas em duplicata para cada amostra e os dados avaliados empregando o Software Origin® versão 6.0 (Microcal Software Inc., Northampton, MA 01060 USA). O reômetro foi controlado termostaticamente por banho de água circulante (TE-184, TECNAL,

Brasil) a 5 °C. Para as medidas de viscosidade aparente em função da taxa de deformação, as amostras permaneceram em repouso por 15 minutos na temperatura de 5 °C; a taxa de deformação aumentou linearmente de 7,0 a 68,0 (s⁻¹) nos primeiros 30 minutos de análise e retornou para 7,0 s⁻¹ nos 30 minutos seguintes. A viscosidade aparente das amostras de iogurte em função do tempo de cisalhamento foi avaliada após o período de repouso de 15 minutos na temperatura de 5 °C, sob taxa de cisalhamento constante de 7 s⁻¹, por 30 minutos.

Análise Instrumental de Textura

A análise instrumental de textura foi realizada em texturômetro (Stevens LFRA, Modelo TA1000, UK, Inglaterra) e os dados coletados através do software Interface®. As amostras foram mantidas em recipiente de 80 mL e refrigeradas na temperatura de 9 ± 1 °C até o momento da análise (3 dias após o preparo do iogurte). A análise de dupla compressão foi realizada utilizando um sensor cilíndrico (2,54 cm de diâmetro e 3,81 cm de altura); a velocidade de operação foi de 2,0 mm/seg e a distância percorrida no interior da amostra foi de 20 mm. Foram realizadas 14 repetições para cada amostra. A partir da curva de penetração Força *versus* Tempo, foram calculados os seguintes parâmetros: fraturabilidade, firmeza, coesividade, adesividade, e gomosidade (PONS e FISZMAN, 1996).

Análise Estatística

A análise estatística dos valores médios obtidos na composição centesimal e dos parâmetros reológicos dos iogurtes foi realizada por Análise de Variância (ANOVA) e o teste de Tukey foi aplicado quando verificada diferença ao nível de 1 % de significância entre estes valores. A análise de índice de sinerese foi realizada através de regressão linear e os parâmetros de textura instrumental foram avaliados por uma Análise de Componentes Principais, após a ANOVA. Todas as análises foram realizadas através do Software STATISTICA versão 6.0 (StatSoft 1984-2001, Tulsa OK 74104 USA).

Resultados e Discussão

Caracterização físico-química

Os valores médios obtidos na caracterização físico-química dos iogurtes elaborados com leite ou pela substituição de percentual de leite por soro de leite e submetidos ao tratamento enzimático com a transglutaminase estão apresentados na Tabela 1. Observa-se que a adição de soro de leite à formulação contribuiu para a diminuição significativa ($p < 0,01$) do conteúdo de sólidos totais, enquanto que, nos iogurtes adicionados de transglutaminase, estes valores permaneceram iguais aos seus respectivos controles.

Tabela 1. Composição físico-química das amostras de iogurte elaboradas com leite ou pela substituição de percentual de leite por soro de leite e submetidas ao tratamento enzimático com transglutaminase (0,5 U / g de proteína).

	C 100	TG 100	C 80	TG 80	C 70	TG 70
pH	4,26 ^g ± 0,01	4,32 ^{ad} ± 0,01	4,36 ^c ± 0,01	4,34 ^{abe} ± 0,01	4,34 ^{def} ± 0,01	4,35 ^{bcf} ± 0,01
Acidez (% ácido láctico)	0,89 ^a ± 0,01	0,87 ^a ± 0,01	0,80 ^b ± 0,00	0,79 ^b ± 0,00	0,79 ^c ± 0,01	0,74 ^c ± 0,01
Umidade (% m/m)	88,12 ^a ± 0,04	87,87 ^a ± 0,12	89,03 ^b ± 0,04	89,13 ^b ± 0,10	90,13 ^c ± 0,05	90,08 ^c ± 0,07
Sólidos totais (% m/m)	11,88 ^a ± 0,04	12,13 ^a ± 0,12	10,97 ^b ± 0,04	10,87 ^b ± 0,10	9,77 ^c ± 0,12	9,92 ^c ± 0,07
Cinzas (% m/m)	0,67 ^a ± 0,02	0,74 ^a ± 0,20	0,87 ^b ± 0,08	0,64 ^a ± 0,07	0,44 ^c ± 0,04	0,64 ^a ± 0,05
Gordura (%m/m)	3,13 ^a ± 0,12	3,07 ^a ± 0,12	2,47 ^b ± 0,12	2,47 ^b ± 0,12	2,20 ^b ± 0,20	2,20 ^b ± 0,00
Proteína (% m/m)	3,04 ^a ± 0,12	2,93 ^a ± 0,07	2,88 ^a ± 0,07	3,12 ^a ± 0,13	2,13 ^b ± 0,20	2,40 ^b ± 0,20

* Os valores correspondem às médias dos valores obtidos em triplicata seguidos pelo desvio padrão.

** Letras diferentes em uma mesma linha diferem significativamente entre si ao nível de 1 % de significância pelo Teste de Tukey.

*** C 100 – iogurte elaborado com 100 % de leite; TG 100 – iogurte elaborado com 100 % de leite submetido ao tratamento enzimático com transglutaminase (0,5 U / g proteína); C 80 – iogurte elaborado com substituição de 20 % de leite por soro de leite líquido; TG 80 – iogurte elaborado substituição de 20 % de leite por soro de leite líquido submetido ao tratamento enzimático com transglutaminase (0,5 U / g proteína); C 70 – iogurte elaborado com substituição de 30 % de leite por soro de leite líquido; TG 70 – iogurte elaborado substituição de 30 % de leite por soro de leite líquido submetido ao tratamento enzimático com transglutaminase (0,5 U / g proteína).

Índice de sinerese

A substituição de leite por soro de leite líquido antes do processo de fermentação do iogurte nas proporções de 20 % (Controle 80) e 30 % (Controle 70), conferiu um aumento no índice de sinerese das amostras em 31 e 73 %, respectivamente (Tabela 2), quando calculados em relação às amostras de iogurte elaboradas com 100 % de leite (Controle 100). A sinerese é um defeito comum no processamento de produtos lácteos fermentados e refere-se ao aparecimento de líquido (soro) na superfície de géis, tal como o iogurte (LUCEY e SINGH, 1998), pela retração do gel e conseqüente perda do soro. Razões comuns para a ocorrência da sinerese incluem a utilização de temperaturas elevadas de incubação, quantidade excessiva de proteínas do soro de leite em relação às caseínas, baixo conteúdo de sólidos totais e agitação mecânica do produto durante distribuição e armazenagem (LUCEY, 2004).

Tabela 2. Índice de sinerese das amostras de iogurte elaboradas com leite ou substituição de percentual de leite por soro de leite e por tratamento enzimático com transglutaminase (0,5 U / g de proteína).

Iogurte	Sinerese	% Sinerese C 80 ou C 70 / C 100	Iogurte	Sinerese	% Sinerese TG / C
C 100	22,93 ^a	-	TG 100	15,80 ^d	-31%
C 80	30,14 ^b	+31%	TG 80	23,92 ^a	-21%
C 70	39,64 ^c	+73%	TG 70	33,12 ^e	-16%

* Os valores correspondem às médias dos valores obtidos em duplicata.

** Letras diferentes diferem significativamente entre si ao nível de 1 % de significância pelo Teste de Tukey.

*** C 100 – iogurte elaborado com 100 % de leite; TG 100 – iogurte elaborado com 100 % de leite submetido ao tratamento enzimático com transglutaminase (0,5 U / g proteína); C 80 – iogurte elaborado com substituição de 20 % de leite por soro de leite líquido; TG 80 – iogurte elaborado substituição de 20 % de leite por soro de leite líquido submetido ao tratamento enzimático com transglutaminase (0,5 U / g proteína); C 70 – iogurte elaborado com substituição de 30 % de leite por soro de leite líquido; TG 70 – iogurte elaborado substituição de 30 % de leite por soro de leite líquido submetido ao tratamento enzimático com transglutaminase (0,5 U / g proteína).

O índice de sinerese em função do conteúdo de leite utilizado na formulação foi avaliado através de regressão linear obtendo-se valor de $R^2 = 0,92$, concluindo que o aumento da sinerese ocorre de maneira linear em função do aumento da relação soro de leite / leite ($p = 0,0022$) (Figura 2). A equação que relaciona a sinerese com o conteúdo de leite na formulação do iogurte é a seguinte (2):

$$\text{Sinerese} = 22,08750 + 0,52875 \times S \quad (2)$$

Sendo: S = percentual de soro de leite utilizado na elaboração do iogurte.

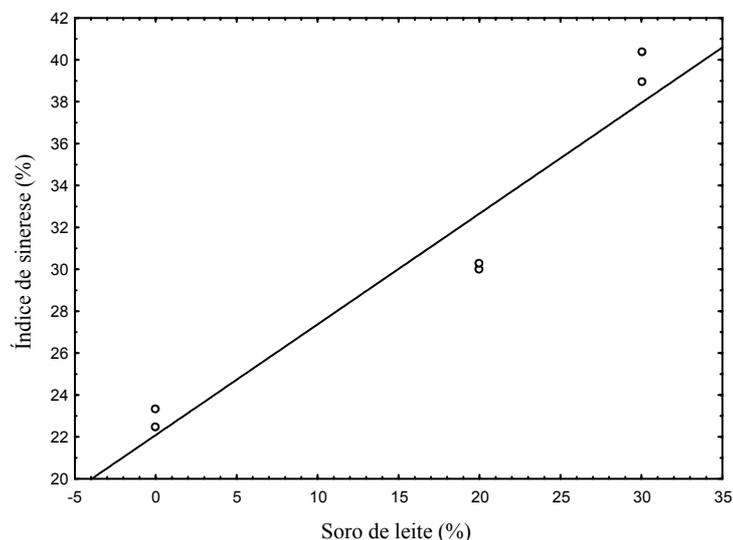


Figura 2. Representação do aumento linear do índice de sinerese de iogurte em função do aumento da relação % soro de leite / % leite.

As amostras de iogurte preparadas com 100 % de leite submetidas ao tratamento com a transglutaminase resultaram em menor índice de sinerese, apresentando diminuição de 31 % em relação às amostras controle 100. Para as amostras adicionadas de transglutaminase e soro de leite líquido nas proporções de 20 % (TG 80) e 30 % (TG 70) em substituição ao leite, os índices de sinerese diminuíram 21 e 16 %, respectivamente, em comparação com as amostras controle 80 e controle 70, respectivamente (Tabela 2).

A adição da enzima transglutaminase contribuiu para a diminuição do índice de sinerese em todas as amostras, o que está de acordo com a literatura que relata que a polimerização das cadeias protéicas pode estabilizar a rede tridimensional do gel de iogurte e prevenir a expulsão do soro como resultado da diminuição dos poros do gel, reduzindo a sinerese (LORENZEN et al., 2002).

O índice de sinerese em função do conteúdo de leite utilizado na formulação das amostras de iogurte tratadas enzimaticamente foi avaliado através de regressão linear obtendo-se valor de $R^2 = 0,95$, concluindo que o aumento da sinerese também ocorre de maneira linear em função do aumento da relação soro de leite / leite nos iogurtes submetidos ao tratamento com a transglutaminase ($p = 0,0010$) (Figura 3). A equação que relaciona a sinerese com o conteúdo de leite na formulação do iogurte tratado enzimaticamente é a seguinte (3):

$$\text{Sinerese} = 15,06929 + 0,55264 \times S \quad (3)$$

Sendo: S = percentual de soro de leite utilizado na elaboração do iogurte

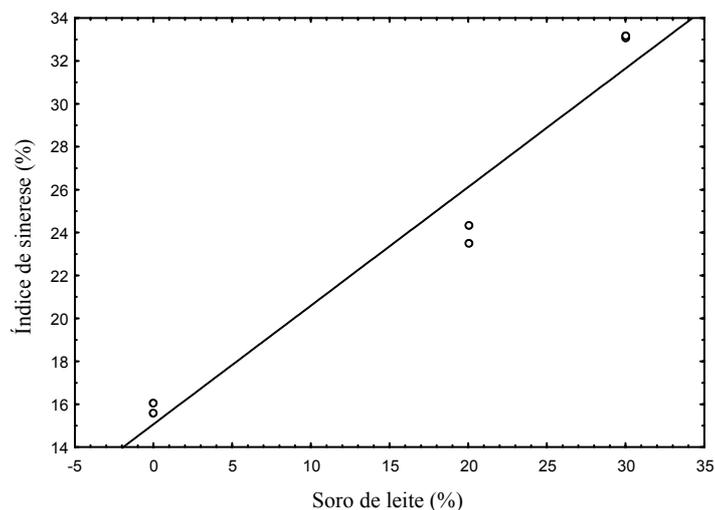


Figura 3. Representação do aumento linear do índice de sinerese de iogurte submetido ao tratamento enzimático com transglutaminase (0,5 U / g de proteína) em função do aumento da relação % soro de leite / % leite.

Observou-se que a adição de 20 % de soro de leite à formulação e o tratamento enzimático com a transglutaminase (TG 80) conferiu valores de índice de sinerese significativamente iguais ao iogurte preparado de maneira tradicional (Controle 100) (Tabela 2), o que viabiliza a utilização de soro de leite líquido na produção de produtos lácteos, como o iogurte, quanto ao índice de sinerese do produto.

Medidas de comportamento de fluxo

O comportamento de fluxo das amostras de iogurte está representado na Figura 4. A adição do soro líquido à formulação contribuiu para a formação de uma rede protéica menos estável, resultando em menor viscosidade aparente das amostras. A viscosidade aparente das amostras de iogurte foi superior quando as amostras foram submetidas ao tratamento enzimático com transglutaminase na proporção de 0,5 U / g de proteína antes do processo de fermentação; o tratamento enzimático leva à polimerização das proteínas do leite, principalmente das caseínas, resultando no aumento da força do gel (FARNSWORTH et al., 2006). Pode-se observar o efeito da transglutaminase no aumento da viscosidade, pois não foram encontradas diferenças significativas entre os valores de sólidos totais (proteína e gordura) nos iogurtes elaborados sob os diferentes tratamentos (com e sem transglutaminase) (Tabela 1). A viscosidade de produtos lácteos fermentados é afetada por ligações físicas fracas, interações hidrofóbicas e eletrostáticas (KINSELLA, 1984; MOHAMEED, ABU-JDAYIL e AL-SHAWABKEH, 2004). O comportamento pseudoplástico observado é esperado devido ao rompimento destas interações, levando a uma queda brusca na viscosidade observada no início do cisalhamento, principalmente na amostra com 100 % de leite, onde a rede protéica é formada mais fortemente.

O comportamento não-Newtoniano pseudoplástico dos iogurtes foi avaliado utilizando o modelo matemático Lei da Potência (4); obtido pela regressão linear dos valores de viscosidade aparente *versus* a taxa de deformação, plotado em coordenadas logarítmicas, sendo possível descrever os dados de fluidos pseudoplásticos, como o iogurte (RAO, 1999).

$$\eta = K \left(\dot{\gamma} \right)^{n-1} \quad (4)$$

Sendo: η – viscosidade aparente (Pa.s), K – índice de consistência (Pa), $\dot{\gamma}$ – taxa de deformação (s^{-1}) e n – índice de comportamento de fluxo.

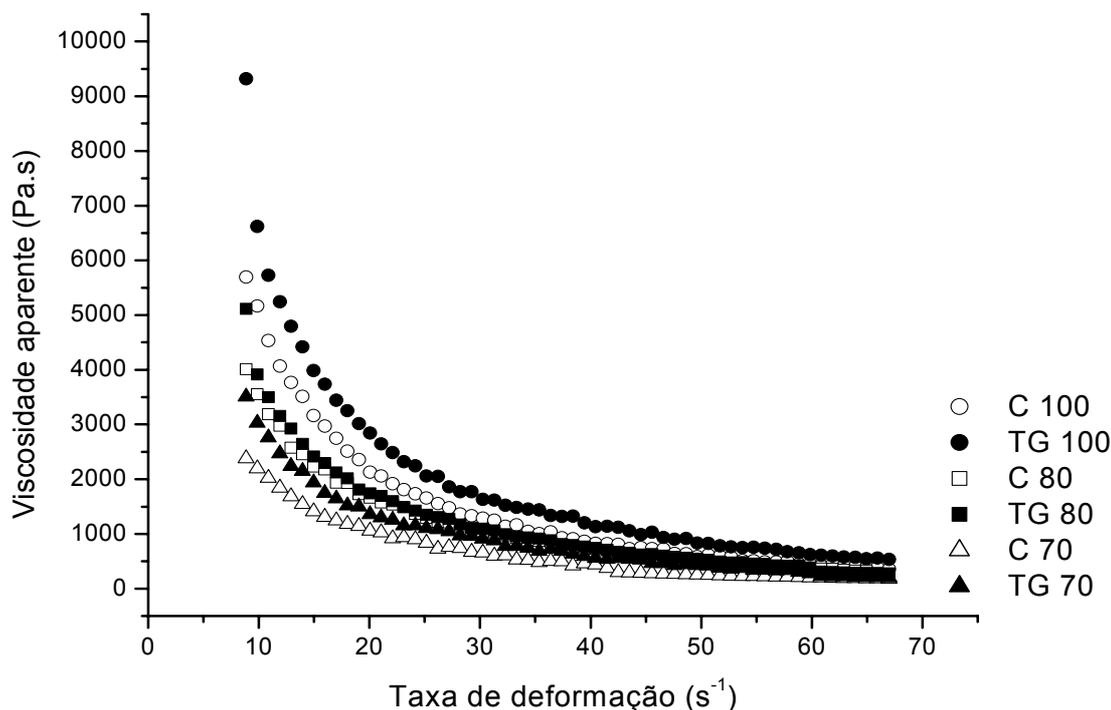


Figura 4. Efeito da taxa de deformação na viscosidade aparente das amostras de iogurte elaboradas pela substituição de percentual de leite por soro de leite. * As curvas representam os valores médios obtidos em duplicata. ** C 100 – 100 % leite; TG 100 – 100 % leite com transglutaminase (0,5 U / g proteína); C 80 – 80 % leite e 20 % soro de leite líquido; TG 80 – 80 % leite e 20 % soro de leite líquido com transglutaminase (0,5 U / g proteína); C 70 – 70 % leite e 30 % soro de leite líquido; TG 70 – 70 % leite e 30 % soro de leite líquido; TG 80 – 80 % leite e 20 % soro de leite líquido com transglutaminase (0,5 U / g proteína).

O iogurte é considerado um material semi-sólido e sofre deformação irreversível após força exercida (TUNICK, 2000). Durante o cisalhamento houve intensa quebra da estrutura, o que refletiu na diminuição da tensão requerida com o aumento da taxa de deformação, devido à quebra das ligações que estabilizam a rede protéica (Figura 5). O resultado dessa quebra acentuada foi uma queda linear da tensão de cisalhamento proporcional ao aumento da taxa de deformação. Os parâmetros reológicos obtidos através do modelo proposto, tanto para as curvas de ida (aumento da taxa de cisalhamento) como para as curvas de volta (diminuição da taxa de cisalhamento), são apresentados na Tabela 3.

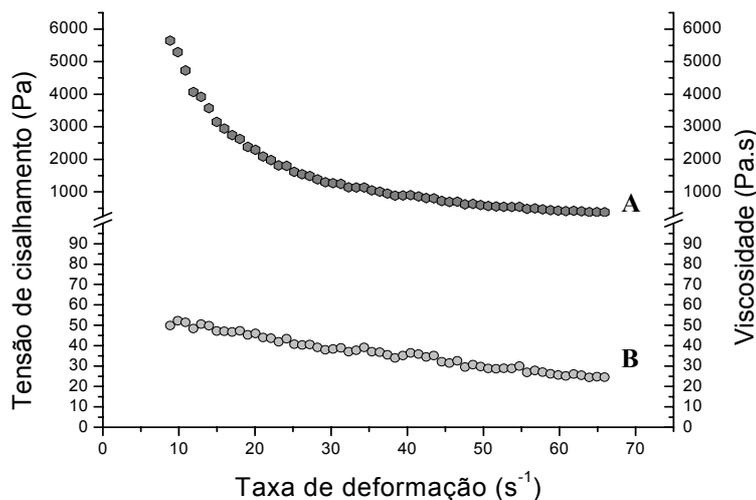


Figura 5. Efeito da taxa de deformação na viscosidade (A) e tensão de cisalhamento (B) requerida para a deformação de iogurte controle (C 100). * As curvas representam os valores médios obtidos em duplicata. ** C 100 – iogurte elaborado com 100 % de leite.

Tabela 3. Parâmetros reológicos das amostras de iogurte obtidos pela Lei da Potência.

Amostra	K (Pa.s ⁿ) x 10 ³		n	
	ida	volta	ida	volta
C 100	115,50 ^a	0,77	-0,38	0,73
TG 100	110,67 ^a	2,25	-0,30	0,52
C 80	72,66 ^b	1,69	-0,27	0,52
TG 80	94,55 ^c	2,48	-0,34	0,46
C 70	57,78 ^d	1,10	-0,35	0,53
TG 70	71,94 ^b	1,40	-0,34	0,50

* Os valores correspondem às médias dos valores obtidos em duplicata.

** Letras diferentes em uma mesma coluna diferem significativamente entre si ao nível de 5 % de significância pelo Teste de Tukey.

*** C 100 – iogurte elaborado com 100% de leite; TG 100 – iogurte elaborado com 100 % de leite submetido ao tratamento enzimático com transglutaminase (0,5 U / g proteína); C 80 – iogurte elaborado com substituição de 20 % de leite por soro de leite líquido; TG 80 – iogurte elaborado substituição de 20 % de leite por soro de leite líquido submetido ao tratamento enzimático com transglutaminase (0,5 U / g proteína); C 70 – iogurte elaborado com substituição de 30 % de leite por soro de leite líquido; TG 70 – iogurte elaborado substituição de 30 % de leite por soro de leite líquido submetido ao tratamento enzimático com transglutaminase (0,5 U / g proteína); K – índice de consistência; n – índice de comportamento de fluxo.

Através dos parâmetros obtidos pela Lei da Potência nas curvas de ida (aumento da taxa de deformação) (Tabela 3), nota-se que os valores de índice de consistência (K) das amostras diminuem com a utilização do soro de leite líquido na formulação do iogurte, quando comparado ao Controle 100. Enquanto o tratamento enzimático com a transglutaminase favorece o aumento destes parâmetros nas amostras em que o soro de leite líquido é adicionado (TG 80 e TG 70) comparando com os valores de índice de consistência de seus respectivos controles (Controle 80 e Controle 70). A presença da transglutaminase contribui para o aumento do índice de consistência pela sua capacidade de formar polímeros de alto peso molecular a partir de monômeros de proteínas, não alterando as características físico-químicas do iogurte (Tabela 1).

O comportamento das amostras de iogurte foi avaliado após a diminuição da taxa de deformação (curva de volta), onde foi observada a diminuição do índice de consistência (K) das amostras, provavelmente devido à quebra estrutural da rede protéica do gel do iogurte. Por outro lado, houve um aumento significativo nos valores de índice de comportamento de fluxo (n). Com a quebra estrutural do gel, o material adquiriu características mais próximas de um fluido Newtoniano, pois a rede protéica desfeita e o rompimento dos polímeros favorecem este comportamento.

Uma característica importante da relação viscosidade aparente / taxa de deformação, obtida pelo aumento da taxa de deformação e sua conseqüente diminuição, é a formação de histerese (ABU-JDAYIL e MOHAMEED, 2002; PENNA, SIVIERI e OLIVEIRA, 2001). A área sob as curvas indica que o fluxo da amostra é dependente do tempo (TÁRREGA, DURAN e CISTELL, 2004), e quanto maior a área, maior é a correlação com a tixotropia do produto. A Figura 6 ilustra um exemplo de histerese do comportamento reológico de iogurtes elaborados com substituição de percentual de leite por soro de leite.

A adição de soro de leite à formulação do iogurte conferiu menor grau de histerese às amostras (Tabela 4). Segundo Mohameed, Abu-Jdayil e Al-Shawabkeh (2004) o aumento da concentração de sólidos totais de iogurte leva ao aumento do efeito tixotrópico, onde pequenas alterações na concentração de sólidos podem afetar fortemente suas propriedades reológicas. O tratamento enzimático com a transglutaminase conferiu maior grau de histerese às amostras de iogurte (TG 100 e TG 70).

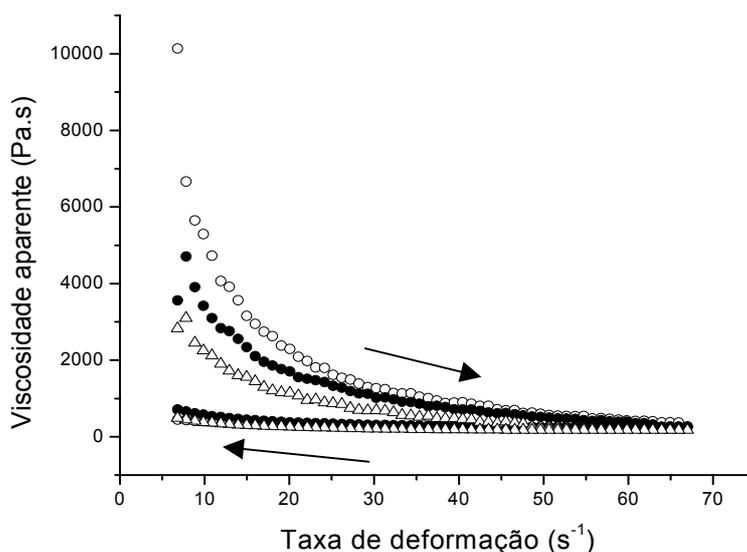


Figura 6. Representação da curva de histerese obtida através da viscosidade aparente *versus* taxa de deformação das amostras de iogurte elaboradas com substituição de percentual de leite por soro de leite (o - C 100; • - C 80; Δ - C 70). * As curvas representam os valores médios obtidos em duplicata. ** C 100 – iogurte elaborado com 100 % de leite; C 80 – iogurte elaborado com substituição de 20 % de leite por soro de leite líquido; C 70 – iogurte elaborado com substituição de 30 % de leite por soro de leite líquido.

Tabela 4. Valores de histerese obtidos para as amostras de iogurte controle e submetidas ao tratamento enzimático com transglutaminase (0,5 U / g de proteína).

Amostra	Histerese
Controle 100	1518,07 ^a
TG 100	1751,80 ^b
Controle 80	1099,32 ^c
TG 80	1040,24 ^c
Controle 70	603,28 ^d
TG 70	908,90 ^e

* Os valores correspondem às médias dos valores obtidos em duplicata.

** Letras diferentes em uma mesma coluna diferem significativamente entre si ao nível de 5 % de significância pelo Teste de Tukey.

*** C 100 – iogurte elaborado com 100 % de leite; TG 100 – iogurte elaborado com 100 % de leite submetido ao tratamento enzimático com transglutaminase (0,5 U / g proteína); C 80 – iogurte elaborado com substituição de 20 % de leite por soro de leite líquido; TG 80 – iogurte elaborado substituição de 20 % de leite por soro de leite líquido submetido ao tratamento enzimático com transglutaminase (0,5 U / g proteína); C 70 – iogurte elaborado com substituição de 30 % de leite por soro de leite líquido; TG 70 – iogurte elaborado substituição de 30 % de leite por soro de leite líquido submetido ao tratamento enzimático com transglutaminase (0,5 U / g proteína).

Os dados reológicos tempo-dependentes foram ajustados através do Modelo de Weltmann (1943) (5), com o objetivo de caracterizar o comportamento tixotrópico das amostras de iogurte. Os resultados obtidos através do modelo Lei da Potência são úteis para demonstrar que os iogurtes elaborados com a adição de soro de leite e submetidos ao tratamento enzimático com transglutaminase apresentam comportamento não-Newtoniano, pseudoplástico, dependente do tempo, porém estudos mais detalhados são necessários para o delineamento e processamento de fluxo de equipamentos (NGUYEN, JENSEN e KRISTENSEN, 1998).

$$\sigma = \sigma_0 - B \log t \quad (5)$$

Sendo: σ – tensão de cisalhamento (Pa), σ_0 – tensão inicial requerida (Pa), B – coeficiente de ruptura tixotrópica, t – tempo (s).

A adição de soro de leite à formulação do iogurte conferiu menores valores de tensão necessária para iniciar a degradação do produto, enquanto a presença da transglutaminase contribuiu para o aumento da tensão inicial, devido à formação de uma rede protéica mais estável (Tabela 5) nas amostras de iogurte TG 100 e TG 70. Observa-se que o parâmetro que indica a intensidade de degradação estrutural (B) não apresentou diferença significativa entre as amostras controle e tratadas enzimaticamente; mas somente entre as amostras elaboradas com diferentes concentrações de soro de leite na formulação.

Tabela 5. Parâmetros reológicos obtidos através do Modelo de Weltmann para as amostras de iogurte controle e submetidas ao tratamento enzimático com transglutaminase (0,5 U / g de proteína).

Amostra	Parâmetros reológicos		
	A	-B	R
C 100	65,60 ^a	20,68 ^a	-0,99
TG 100	80,10 ^b	21,10 ^a	-0,98
C 80	45,00 ^c	15,04 ^b	-0,96
TG 80	45,89 ^c	15,44 ^b	-0,96
C 70	24,62 ^d	8,64 ^c	-0,96
TG 70	32,71 ^e	11,26 ^c	-0,97

* Os valores correspondem às médias dos valores obtidos em duplicata.

** Letras diferentes em uma mesma coluna diferem significativamente entre si ao nível de 5 % de significância pelo Teste de Tukey.

*** C 100 – iogurte elaborado com 100 % de leite; TG 100 – iogurte elaborado com 100 % de leite submetido ao tratamento enzimático com transglutaminase (0,5 U / g proteína); C 80 – iogurte elaborado com substituição de 20 % de leite por soro de leite líquido; TG 80 – iogurte elaborado substituição de 20 % de leite por soro de leite líquido submetido ao tratamento enzimático com transglutaminase (0,5 U / g proteína); C 70 – iogurte elaborado com substituição de 30 % de leite por soro de leite líquido; TG 70 – iogurte elaborado substituição de 30 % de leite por soro de leite líquido submetido ao tratamento enzimático com transglutaminase (0,5 U / g proteína).

Análise Instrumental de Textura

A substituição de parte do leite por soro de leite (Controle 80 e Controle 70) na elaboração de iogurte contribuiu para uma diminuição significativa ($p < 0,01$) em praticamente todos os parâmetros de textura analisados (Tabela 6). A adição de soro de leite líquido antes do processamento do iogurte contribuiu para a diminuição significativa ($p < 0,01$) da adesividade do produto (Tabela 6), o que está de acordo com a literatura que relata que as proteínas globulares na sua forma nativa, tais como as do soro de leite (α -lactoalbumina e β -lactoglobulina), apresentam conformação compacta, o que diminui a capacidade adesiva do sistema (LEEDEN, RUTTEN e FRENS, 2000). Além disso, a diminuição da concentração de lipídios no iogurte também contribuiu para a menor adesividade do produto (SANDOVAL-CASTILLA et al., 2004).

As amostras de iogurte preparadas com 100 % de leite apresentaram maior firmeza e maior fraturabilidade ($p < 0,01$), o que representa uma força maior necessária para romper a estrutura do produto. A matriz protéica do gel é responsável pela firmeza do iogurte (RAWSON e MARSHALL, 1997), que é dependente do conteúdo de sólidos totais (LUCEY

e SINGH, 1998), do conteúdo protéico e do tipo de proteína do sistema (MAGENIS et al., 2005). Portanto, a adição de soro de leite líquido confere menores valores a estes parâmetros por diminuir a concentração protéica (Tabela 1), diminuindo a força necessária para romper a rede protéica formada. Outro fator que pode ter influenciado a textura do iogurte seria a atividade proteolítica da cultura bacteriana do iogurte. Proteínas do soro são hidrolisadas em quantidade limitada durante o processo de fermentação (BERTRAND-HARB et al., 2003); o aumento da concentração de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina no sistema diminuiu o conteúdo de hidrólise protéica, formando um gel mais fraco.

A adição da transglutaminase na proporção de 0,5 U / g de proteína antes do processo de fermentação do iogurte conferiu aumento significativo ($p < 0,01$) em praticamente todos os parâmetros de textura analisados (Tabela 6). Os parâmetros fraturabilidade, firmeza, e gomosidade obtiveram aumento significativo ($p < 0,01$) em todas as amostras de iogurte tratadas enzimaticamente, pois a transglutaminase catalisa a polimerização de proteínas do leite levando ao aumento do peso molecular destas proteínas (CHRISTENSEN et al., 1996; HAN e DAMODARAN, 1996; NIEUWENHUIZEN et al., 2003). Lauber, Henle e Klostermeyer (2000) sugerem que a polimerização protéica ocorre predominantemente de forma intermolecular e que o aumento da força necessária para romper o gel do iogurte esta correlacionado com o nível de oligomerização das caseínas catalisada pela transglutaminase, aumentando proporcionalmente com o tempo de reação enzimática.

Tabela 6. Parâmetros de análise instrumental de textura das amostras de iogurte elaboradas com transglutaminase e soro de leite.

Parâmetros de Textura					
Sample	F	F_{máx}	Co	A	G
C 100	114,91 ^a ± 5,51	142,86 ^a ± 6,34	0,49 ^{a e f} ± 0,02	-200,34 ^c ± 25,30	69,03 ^a ± 6,89
TG 100	158,50 ^b ± 7,95	179,19 ^b ± 9,53	0,45 ^g ± 0,04	-175,80 ^d ± 31,18	80,33 ^b ± 9,03
C 80	77,40 ^c ± 3,53	101,50 ^c ± 4,24	0,51 ^{a b c} ± 0,02	-80,46 ^a ± 12,31	52,21 ^c ± 3,38
TG 80	94,05 ^d ± 1,93	121,42 ^d ± 4,24	0,50 ^{b d e} ± 0,02	-96,61 ^a ± 9,23	61,29 ^d ± 3,54
C 70	54,68 ^e ± 2,41	74,00 ^e ± 3,40	0,55 ^h ± 0,02	-41,60 ^b ± 3,12	40,40 ^e ± 1,28
TG 70	62,00 ^f ± 7,79	88,18 ^f ± 2,19	0,52 ^{c d f} ± 0,02	-57,97 ^b ± 6,01	45,46 ^f ± 2,16

* Os valores correspondem às médias dos valores obtidos em 14 repetições.

** Letras diferentes em uma mesma coluna diferem significativamente entre si ao nível de 5 % de significância pelo Teste de Tukey.

*** C 100 – iogurte elaborado com 100 % de leite; TG 100 – iogurte elaborado com 100 % de leite submetido ao tratamento enzimático com transglutaminase (0,5 U / g proteína); C 80 – iogurte elaborado com substituição de 20 % de leite por soro de leite líquido; TG 80 – iogurte elaborado substituição de 20 % de leite por soro de leite líquido submetido ao tratamento enzimático com transglutaminase (0,5 U / g proteína); C 70 – iogurte elaborado com substituição de 30 % de leite por soro de leite líquido; TG 70 – iogurte elaborado substituição de 30 % de leite por soro de leite líquido submetido ao tratamento enzimático com transglutaminase (0,5 U / g proteína); F – fraturabilidade; F_{máx} – firmeza; Co – coesividade; A – adesividade; G – gomosidade.

Observa-se que, quando o iogurte foi preparado com substituição de 20 % de leite por soro de leite e submetido ao tratamento enzimático com a transglutaminase, os valores obtidos para os parâmetros de textura instrumental aproximaram-se aos valores obtidos para a amostra controle (100 % de leite) (Tabela 6), indicando a possibilidade da utilização do soro de leite na sua forma natural na elaboração de iogurte, com o objetivo de minimizar seu descarte ou o reaproveitamento sem a necessidade de sofrer algum processo de beneficiamento.

Os parâmetros de textura obtidos através da análise instrumental foram avaliados por uma análise de componentes principais (ACP). A ACP explicou 94,95 % da variância dos dados. Fraturabilidade (-0,980650), firmeza (-0,991807), adesividade (0,904106), gomosidade (-0,958619) e mastigabilidade (-0,945163) estão correlacionadas fortemente e negativamente com o Fator 1, enquanto a coesividade (0,762483) está fortemente e positivamente correlacionada com este Fator (Tabela 7).

Tabela 7. Cargas fatoriais para os parâmetros de textura de iogurtes elaborados com soro de leite e transglutaminase.

Parâmetros de textura	Fator 1 (85,75 %)	Fator 2 (9,20 %)
Fraturabilidade	-0,980714	-0,028749
Firmeza	-0,989886	-0,054643
Coesividade	0,803749	0,593428
Adesividade	-0,903628	0,129503
Gomosidade	-0,939700	0,295478

A Figura 7 representa o gráfico do Fator 1 *versus* Fator 2. Observa-se alta correlação positiva entre os parâmetros fraturabilidade – firmeza ($r = 0,982739$); à medida que a firmeza do iogurte aumenta, a força necessária para romper o gel aumenta consequentemente. A firmeza foi correlacionada negativamente com a coesividade ($r = -0,762863$), ou seja, iogurtes com gel de menor firmeza (maior quantidade de soro líquido adicionado), apresentaram tendência à maior coesividade. O aumento significativo ($p < 0,01$) da coesividade após a adição do soro de leite na elaboração do iogurte pode ser explicado pela diminuição do percentual de gordura do produto final (Tabela 1). Com a retirada de parte da gordura do sistema houve uma predominância protéica na composição do iogurte, promovendo um maior número de ligações caseína – caseína e interação caseína – proteínas do soro, reforçando a associação entre as micelas (SANDOVAL-CASTILLA et al., 2004).

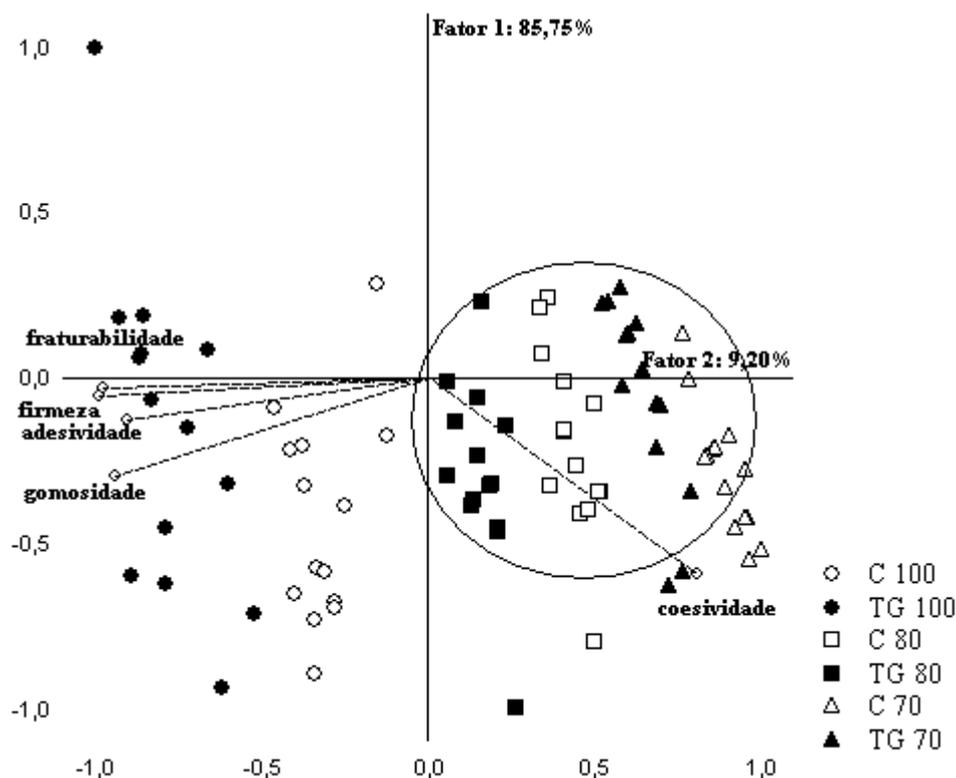


Figura 7. Análise de componentes principais dos parâmetros de textura instrumental obtidos de iogurtes elaborados com soro de leite líquido e transglutaminase. * C 100 – 100 % leite; TG 100 – 100 % leite com transglutaminase (0,5 U / g proteína); C 80 – 80 % leite e 20 % soro de leite líquido; TG 80 – 80 % leite e 20 % soro de leite com transglutaminase (0,5 U / g proteína); C 70 – 70 % leite e 30 % soro de leite líquido; TG 70 – 70 % leite e 30 % soro de leite líquido com transglutaminase (0,5 U / g proteína).

A partir da Figura 7 pôde-se observar que a adição de soro de leite à formulação contribuiu para a maior coesividade dos iogurtes, pois as amostras 80 e 70 (adicionadas de soro de leite) comparadas às amostras 100 (100 % leite), apresentaram-se à direita no gráfico, em direção a este parâmetro. A adição da transglutaminase ao iogurte apresentou efeito significativo apenas nas amostras elaboradas com 100 % de leite, conferindo diminuição deste parâmetro. Estudos relatam que quantidade excessiva de polimerização protéica pode levar à formação de uma estrutura com maior força de quebra, porém, com textura frágil, quebradiça e não flexível (KURAIISHI, YAMAZAKI e SUSA, 2001); o que indica a necessidade da utilização de quantidades apropriadas de transglutaminase para cada tipo de alimento, evitando a polimerização excessiva. O efeito da adição de transglutaminase à formulação antes do processo de fermentação do iogurte também pode ser visualizada na Figura 7.

Comparando as amostras C 100 e TG 100, iogurtes adicionados de transglutaminase se situam à esquerda do gráfico, em direção aos demais fatores (fraturabilidade, firmeza, adesividade, gomosidade e mastigabilidade), confirmando os resultados obtidos através da análise de variância. O mesmo pode ser observado para os demais iogurtes adicionados de transglutaminase (TG 80 e TG 70).

Conclusões

A elaboração de iogurtes com 20 % de soro de leite, submetidos ao tratamento enzimático com transglutaminase (TG 80) conferiu valores de sinerese significativamente iguais aos valores obtidos para as amostras elaboradas com 100 % de leite (C100). Os parâmetros reológicos e de textura confirmam que a enzima transglutaminase pode ser utilizada para compensar as possíveis alterações físicas ocasionadas pela adição do soro de leite em iogurte.

Referências Bibliográficas

- ABU-JDAYIL, B.; MOHAMEED, H. Experimental and modeling studies of the flow properties of concentrated yogurt as affected by the storage time. **Journal of Food Engineering**, v. 52, p. 359-365, 2002.
- AOAC. **Association of Official Analytical Chemists** – Official Methods of analysis of the Association Analytical Chemists, (18 th ed.) Washington, DC: AOAC. (2005).
- BERTRAND-HARB, C.; IVANOVA, I.V.; DALGALARRONDO, M.; HAERTLLÉ, T. Evolution of β -lactoglobulin and α -lactalbumin content during yoghurt fermentation. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 39-45, 2003.
- CHRISTENSEN, B.M.; SORENSEN, E.S.; HOJRUP, P.; PETERSEN, T.E.; RASMUSSEN, L.K. Localization of potential transglutaminase cross-linking sites in bovine caseins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1943-1947, 1996.
- DICKINSON, E. Enzymatic crosslinking as a tool for food colloid rheology control and interfacial stabilization. **Trends in Food Science and Technology**, v. 8, p. 334-339, 1997.
- FARNSWORTH, J.P.; LI, J.; HENDRICKS, G.M.; GUO, M.R. Effects of transglutaminase treatment on functional properties and probiotic culture survivability of goat milk yogurt. **Small Ruminant Research**, v. 65, p. 113-121, 2006.
- FOLK, J.E.; FINLAYSON, J.S. The ϵ -(γ -glutamyl)lysine cross-link and the catalytic role of transglutaminase. **Advances in Protein Chemistry**, v. 31, p. 1-133, 1977.
- HAN, X.-Q.; DAMODARAN, S. Thermodynamic compatibility of substrate proteins affects their cross-linking by transglutaminase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1211-1217, 1996.
- KINSELLA, J. Milk proteins: physical chemical and functional properties. **CRC. Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 21, p. 197-262, 1984.
- KURAIISHI, C.; YAMAZAKI, K.; SUSU, Y. Transglutaminase: Its utilization in the food industry. **Food Reviews International**, v. 17, n. 2, p. 221-246, 2001.
- LAUBER, S.; HENLE, T.; KLOSTERMEYER, H. Relationship between the crosslinking of caseins by transglutaminase and the gel strength of yoghurt. **European Food Research and Technology**, v. 210, p. 305-309, 2000.
- LEEDEN, M.C. van der; RUTTEN, A.A.C.M.; FRENS, G. How to develop globular proteins into adhesives. **Journal of Biotechnology**, v. 79, p. 211-221, 2000.
- LORENZEN, P.C.; NEVE, H.; MAUTNER, A.; SCHLIMME, E. Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. **International Journal of Dairy Technology**, v. 55, n. 3, p. 152-157, 2002.

LUCEY, J.A.; SINGH, H. Formation and physical properties of acid milk gels: a review. **Food Research International**, v. 30, n. 7, p. 529-542, 1998.

LUCEY, J.A. Cultured dairy products: an overview of their gelation and texture properties. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, p. 77-84, 2004.

MAGENIS, R.B.; PRUDÊNCIO, E.S.; AMBONI, R.D.M.C.; CERQUEIRA-JÚNIOR, N.G.; OLIVEIRA, R.V.B.; SOLDI, V.; BENEDET, H.D. Compositional and physical properties of yogurts manufactured from milk and whey cheese concentrated by ultrafiltration. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 40, p. 1-9, 2005.

MOHAMEED, H.A.; ABU-JDAYIL, B.; AL-SHAWABKEH, A. Effect of solids concentration on the rheology of labneh (concentrated yogurt) produced from sheep milk. **Journal of Food Engineering**, v. 61, p. 347-352, 2004.

MOTOKI, M.; SEGURO, K. Transglutaminase and its use for food processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, p. 204-210, 1998.

NGUYEN, Q.D.; JENSEN, C.T.B.; KRISTENSEN, P.G. Experimental and modeling studies of the properties of maize and waxy starch pastes. **Chemical Engineering Journal**, v. 70, p. 165-171, 1998.

NIELSEN, G.S.; PETERSEN, B.R.; MOLLER, A.J. Impact of salt, phosphate and temperature on the effect of a transglutaminase (F XIIIa) on the texture of restructured meat. **Meat Science**, v. 41, n. 3, p. 293-299, 1995.

NIEUWENHUIZEN, W.F.; DEKKER, H.L.; KONING, L.J. de; GRÖNEVELD, T.; KOSTER, C.G. de; JONG, G.A.H. de. Modification of glutamine and lysine residues in holo and apo α -lactalbumin with microbial transglutaminase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7132-7139, 2003.

PENNA, A.L.B.; SIVIERI, K.; OLIVEIRA, M.N. Relation between quality and rheological properties of lactic beverages. **Journal of Food Engineering**, v. 49, p. 7-13, 2001.

PONS, M.; FISZMAN, S.M. Instrumental texture profile analysis with particular reference to gelled systems. **Journal of Texture Studies**, v. 27, p. 597-624, 1996.

RAO, M.A. **Rheology of fluid and semisolid foods: Principles and applications**. New York: An Aspen Publication, 1999. 433p.

RAWSON, H.L.; MARSHALL, V.M. Effect of 'ropy' strains of *Lactobacillus delbrueckii* spp. *Bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* on rheology of stirred yogurt. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 32, p. 213-220, 1997.

SANDOVAL-CASTILLA, O.; LOBATO-CALLEROS, C.; AGUIRRE-MANDUJANO, E.; VERNON-CARTER, E.J. Microstructure and texture of yogurt as influenced by fat replacers. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 151-159, 2004.

SINGH, H. Modifications of food proteins by covalent crosslinking. **Trends Food Science & Technology**, v. 2, p. 196-200, 1991.

TÁRREGA, A.; DURAN, L.; COSTELL, E. Flow behaviour of semi-solid dairy desserts. Effect of temperature. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 345-353, 2004.

TUNICK, M.H. Rheology of dairy foods that gel, stretch and fracture. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1892-1898, 2000.

WELTMANN, R.N. Breakdown of thixotropic structure as a function of time. **Journal of Applied Physics**, v. 14, p. 343-350, 1943.

Conclusões

Através da metodologia de superfície de resposta concluiu-se que a reação entre as proteínas do soro de leite e a enzima transglutaminase é favorecida quando as condições de reação são mantidas na temperatura de 36°C por 4 horas, utilizando 50 U de TG/g de proteína.

O tratamento térmico do soro de leite antes da reação de polimerização enzimática com as proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, conferiu aumento nos valores de índice de consistência das soluções. Este aumento foi significativo somente em temperaturas superiores a 85°C. A temperatura de gel diminuiu com o tratamento enzimático, esta diminuição foi intensificada com o aumento do tempo de reação, provavelmente devido ao aumento da formação de polímeros protéicos de alto peso molecular, observados pela análise de turbidez.

Iogurtes elaborados com substituição de percentual de leite por soro de leite apresentaram diminuição no conteúdo de sólidos totais, maior índice de sinerese, menores valores de viscosidade aparente, tixotropia, firmeza e adesividade. O tratamento prévio do leite e da formulação (leite e soro de leite) com TG, antes do processo de fermentação do iogurte, conferiu diminuição da sinerese, aumento da firmeza, viscosidade aparente, tixotropia e fraturabilidade. Os valores obtidos para o conteúdo de sólidos totais das amostras de iogurte controle comparadas às amostras submetidas ao tratamento enzimático não apresentaram diferença significativa ($p > 0,01$), concluindo que as características obtidas foram decorrentes da polimerização protéica catalisada pela TG.