

ESTRUTURA E ESTABILIDADE DAS MICELAS DE CASEÍNA DO LEITE BOVINO

(Structure and stability of the casein micelles of bovine milk)

Rafaella Belchior BRASIL^{1*}, Edmar Soares NICOLAU¹, Jakeline Fernandes CABRAL², Marco Antônio Pereira da SILVA²

¹Universidade Federal de Goiás; ²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde - Goiás.

RESUMO

As proteínas do leite são veículos naturais, que fornecem micronutrientes essenciais, aminoácidos, assim como componentes do sistema imune, além disso, possuem propriedades de fundamental importância nas características de muitos produtos lácteos. As caseínas são as principais proteínas do leite, compreendem cerca de 80% das proteínas do leite e consistem de quatro proteínas principais: α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ -caseína, as quais possuem elevada estabilidade térmica, o que proporciona às indústrias de laticínio realizar o tratamento do leite a temperaturas elevadas, como o leite Ultra Alta Temperatura (UAT). No entanto, alguns fatores como a hidrólise enzimática da κ -caseína, temperatura, pH, excesso de Ca^{2+} e adição de etanol afetam a estabilidade dessas proteínas, que estão em grande parte presentes no leite na forma de partículas coloidais, conhecidas como micelas. A estrutura interna da micela de caseína é constituída predominantemente por α_{s1} -, α_{s2} -, β -caseína e de nanopartículas de fosfato de cálcio coloidal, enquanto que a κ -caseína está localizada preferencialmente na superfície da micela, assumindo importante papel na estabilidade micelar. O interesse na caseína micelar mantém-se constante ao longo dos anos, e pesquisas sobre o assunto continuam a ser realizadas, por isso a relevância de se entender a estrutura e os fatores que afetam a estabilidade micelar.

Palavras-chave: caseína; estabilidade térmica; estrutura micelar; hidrólise; proteínas.

ABSTRACT

Milk proteins are natural vehicles, which provides essential micronutrients, amino acids, and components of the immune system, in addition, possess properties characteristic of fundamental importance in many dairy products. The caseins are the major milk proteins comprise about 80% of milk protein and consist of four major proteins: α_{s1} -, α_{s2} -, β - and κ -casein, which have high thermal stability, which provides industries dairy milk perform the treatment at elevated temperatures, such as milk Ultra High Temperature (UHT). However, certain factors such as the enzymatic hydrolysis of κ -casein, temperature, pH, excessive addition of Ca^{2+} and ethanol affect the stability of these proteins, which are largely present in milk in the form of colloidal particles, known as micelles. The internal structure of the casein micelle consists predominantly of α_{s1} -, α_{s2} -, β -casein, nanoparticle colloidal calcium phosphate, whereas κ -casein is preferably located on the surface of the micelle, assuming an important role in micelle stability. Interest in micellar casein remains constant over the years, and research on the subject continue to be made, so the relevance of understanding the structure and the factors that affect the micellar stability.

Key-words: casein; thermal stability; micellar structure; hydrolysis; protein.

INTRODUÇÃO

O leite é um alimento de alto valor biológico, por conter na sua composição uma variedade de nutrientes como as

proteínas, os lipídios, os glicídios, os minerais e as vitaminas.

O leite bovino normal contém cerca de 3,5% de proteína, que tem como função natural, fornecer aos mamíferos,

*Endereço para correspondência:

rafaellabelchior@hotmail.com

aminoácidos essenciais necessários para o desenvolvimento, além disso, possuem propriedades de fundamental importância nas características de muitos produtos lácteos, pois determinam o rendimento na fabricação de queijos e outros produtos, além de seus benefícios nutricionais e propriedades estruturais e físico-químicas únicas (Ye, 2011).

As proteínas, dentre os componentes do leite são as de maior valor para a industrialização. A lucratividade das indústrias depende do rendimento representado pelo extrato seco total e eficiência da transformação do leite em co-produtos e leite fluido, que por sua vez dependem da qualidade da matéria-prima, baseada nos parâmetros de sanidade do rebanho (contagem de células somáticas) e higiene (contagem bacteriana total).

Os tratamentos de alta temperatura que o leite é submetido, só é possível devido à estabilidade elevada ao calor das principais proteínas do leite, as caseínas (Fox & McSweeney, 1998). No entanto, a hidrólise enzimática da κ -caseína, temperatura, pH, excesso de Ca^{2+} e adição de etanol estão entre os principais fatores que afetam a estabilidade coloidal das micelas de caseína (O'Connell et al., 2006).

Diante do exposto, objetivou-se com esta revisão abordar a importância de se entender a estrutura das micelas de caseína e os fatores que controlam e afetam a estabilidade micelar, que são essenciais no comportamento funcional de produtos lácteos e estabilidade do leite.

DESENVOLVIMENTO

Proteínas do leite

O leite, produto da secreção das glândulas mamárias é um fluido viscoso constituído de uma fase líquida e partículas em suspensão, formando uma emulsão natural, estável em condições normais de temperatura ou de refrigeração (Sgarbieri,

2004). É composto de água, 87,3%, e sólidos totais, 12,7%, assim distribuídos: proteínas totais, 3,3% a 3,5%; gordura, 3,5% a 3,8%; lactose, 4,9%; além de minerais, 0,7%, e vitaminas (Sgarbieri, 2005).

As proteínas do leite são veículos naturais, que fornecem micronutrientes essenciais (cálcio e fósforo), aminoácidos, assim como componentes do sistema imune (imunoglobulinas e lactoferrina), para o recém-nascido (Livney, 2010), essas proteínas são distribuídas em duas grandes classes, 80% de caseína e 20% de proteínas do soro, percentual que pode variar em função da raça dos animais, da ração fornecida e do País de origem. As principais proteínas do leite encontram-se detalhadas na Tab. 1.

As proteínas do soro são um 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 Jr et al., 2006). A maioria dessas proteínas são globulares com elevada hidrofobicidade e cadeias peptídicas densamente dobradas (Phadungath, 2005). Os dois componentes principais das proteínas do soro são α -lactalbumina e β -lactoglobulina.

A β -lactoglobulina é o maior peptídeo do soro (45% a 57%), representando, no leite bovino, cerca de 3,2g/L. Apresenta médio peso molecular (18,4 a 36,8kDa), o que lhe confere resistência à ação de ácidos e enzimas proteolíticas presentes no estômago, sendo, portanto, absorvida no intestino delgado. É o peptídeo que apresenta maior teor de aminoácidos de cadeia ramificada, com cerca de 25,1%, sendo também importante carreadora de retinol (pró vitamina A) materno para o filhote (De Wit, 1998).

Já a α -lactalbumina, em termos quantitativos é o segundo peptídeo do soro (15% a 25%) do leite bovino (Shannon et al., 2003), com peso molecular de 14,2kDa,

caracteriza-se por ser de fácil e rápida digestão. Contém o maior teor de triptofano (6%) entre todas as fontes protéicas alimentares, sendo, também, rica em lisina, leucina, treonina e cistina (Markus et al., 2002).

A α -lactalbumina é precursora da biossíntese de lactose no tecido mamário e possui a capacidade de se ligar a minerais, como cálcio e zinco, o que pode afetar positivamente sua absorção (Lönnerdal, 2003).

As demais proteínas do soro são: albumina, imunoglobulinas, peptonas de protease e pequenas quantidades de enzimas e proteínas com funções metabólicas específicas, como por exemplo a lisozima e lactoferrina (Walstra et al., 1999).

As proteínas solúveis do soro do leite apresentam um excelente perfil de aminoácidos, caracterizando-as como proteínas de alto valor biológico, e vem sendo muito utilizadas pelas indústrias de alimentos em diferentes áreas, além de serem amplamente disponíveis, de baixo custo e naturais, matéria-prima de elevado valor nutricional e boas propriedades sensoriais.

Caseína

A função biológica das caseínas na glândula mamária é transportar cálcio, fosfato e proteína para o neonato (Kruif & Holt, 2003), compreendem cerca de 80% das proteínas do leite e consistem de quatro proteínas principais: α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ -caseína, representando cerca de 38%, 10%, 35% e 15%, respectivamente, as quais são constituídas por 199, 207, 209 e 169 resíduos de aminoácidos, com pesos moleculares de 23, 25, 24 e 19kDa, respectivamente (Goff, 2009) e 8% de fosfato de cálcio coloidal aproximadamente (Dalglish, 2011).

A caseína tem atividade anfipática por possuir regiões hidrofóbicas e hidrofílicas (De Kruif & Grinberg, 2002). A

conformação das moléculas expõe consideravelmente os resíduos hidrofóbicos, o que resulta em forte associação entre as caseínas e as tornam insolúveis em água (Goff, 2009).

Possui sequências fosforiladas através das quais pode interagir com fosfato de cálcio, o que a torna capaz de sequestrar fosfato de cálcio, formando minúsculos agrupamentos de íons circundados por uma camada de proteína (Holt, 2004).

Segundo Smyth et al. (2004), além da função nutricional, a caseína é o meio pelo qual grande quantidade de cálcio pode passar pelo epitélio mamário sem provocar problemas de calcificação.

Cerca de 95% das caseínas no leite estão presentes na forma de partículas coloidais, conhecidas como micelas, que são as responsáveis pela estabilidade térmica do leite (Fox & Brodtkorb, 2008).

A estrutura interna da micela de caseína é constituída predominantemente por α_{s1} -, α_{s2} -, β -caseína e de nanopartículas de fosfato de cálcio coloidal, enquanto que a κ -caseína está localizada preferencialmente na superfície da micela (Dalglish, 2011).

A composição e estrutura das micelas de caseína têm sido estudadas por mais de 40 anos, e as descrições disponíveis são bastante precisas, embora ainda controversas (Horne, 2006; Qi, 2007). O consenso é que a estrutura das micelas de caseína é principalmente estabilizada por interações hidrofóbicas e iônicas (Holt et al., 2003).

A caseína α_{s1} precipita com níveis de cálcio muito baixos, enquanto a caseína α_{s2} é mais sensível à precipitação pelo Ca^{2+} , diferentemente das outras caseínas, a κ -caseína é uma glicoproteína e possui apenas um grupo fosfoserina, sendo, portanto, estável na presença de íons de cálcio e assumindo importante papel na estabilidade da micela de caseína. Por ser mais

fosforilada que a κ -caseína, a β -caseína é mais sensível a altas concentrações de sais de cálcio, embora seja menos sensível a precipitação com cálcio do que as caseínas α (Walstra, 1999).

O interesse na caseína micelar mantém-se constante ao longo dos anos, e pesquisas sobre o assunto continuam a ser realizadas em todo o mundo, uma vez que muitas das propriedades tecnologicamente importantes do leite, por exemplo, a cor branca, a estabilidade ao calor, ao etanol e a coagulação pelo coalho, são devidos às propriedades das micelas de caseína (Fox & Brodtkorb, 2008). Por isso, tem havido um incentivo econômico e tecnológico para caracterizar as propriedades e elucidar sua estrutura.

Fatores que alteram a estabilidade das micelas de caseína

Hidrólise enzimática

As micelas podem ser desestabilizadas por inúmeros fatores, alguns são industrialmente importantes, como a hidrólise da κ -caseína por proteases selecionadas, como os coalhos, que é explorado na produção da maior parte das variedades de queijos (Fox & Brodtkorb, 2008).

A hidrólise enzimática da caseína é realizada por endopeptidases, que hidrolisa a ligação peptídica entre a fenilalanina (105) e a Metionina (106) da cadeia peptídica da κ -caseína, eliminando a capacidade estabilizante e gerando como produtos uma porção hidrofóbica, (para- κ -caseína) e uma hidrofílica chamada glicomacropéptido, ou mais apropriadamente, caseinomacropéptido, provocando a desestabilização da micela com consequente precipitação da caseína do leite (Ordoñez, 2005).

Segundo Panyam & Kilara (1996), a hidrólise enzimática da proteína resulta em: diminuição do peso molecular, aumento do número de grupos ionizáveis e exposição

de grupos hidrofóbicos que estavam protegidos na estrutura original da proteína.

Leite com alta contagem de células somáticas (CCS) possui atividade enzimática elevada, o que contribui para o aumento da proteólise e lipólise, tanto antes da ordenha (no úbere) como após a ordenha, durante o armazenamento (Deeth, 2006).

Os lisossomos dessas células contêm enzimas proteolíticas, dentre as quais a catepsina D, que pode produzir para- κ -caseína e caseinomacropéptido a partir da κ -caseína e, em altas concentrações, pode causar a coagulação do leite (Hurley et al., 2000).

Com o armazenamento do leite em tanques refrigeradores e coleta da matéria-prima a cada 48 horas, aumentam as chances de multiplicação de bactérias psicotróficas proteolíticas, que se desenvolvem em baixas temperaturas (0°C a 15°C), produzindo enzimas termoestáveis que podem atuar sobre a κ -caseína, resultando na desestabilização do leite (Nornberg et al., 2009).

Micro-organismos psicotróficos, ao se multiplicarem no leite armazenado em baixas temperaturas, produzem enzimas proteolíticas termoestáveis, Tab. 2, a maioria das quais tem ação sobre a κ -caseína, resultando na desestabilização das micelas e coagulação do leite. A ação das proteases de psicotróficos é distinta entre as frações protéicas do leite, sendo a κ -caseína, mais susceptível à ação dessas enzimas, enquanto que as proteínas do soro são resistentes ao ataque das proteases (Gaucher et al., 2008).

Deste modo, a hidrólise da κ -caseína desestabiliza as micelas, que coagulam, e esta alteração bioquímica é associada à gelatinização do leite Ultra Alta Temperatura (UAT), que é considerado um dos principais problemas, que afetam a qualidade do leite UAT (Nornberg et al., 2009).

Temperatura e pH

A estabilidade térmica do leite se refere à resistência aos processamentos com temperaturas elevadas, sem coagulação visível ou gelatinização. A coagulação do leite por aquecimento prolongado a altas temperaturas é uma consequência da perda de estabilidade das micelas de caseína, como resultado de numerosas mudanças físicas e químicas dos componentes (Singh, 2004).

Em altas temperaturas a quantidade de fosfato de cálcio associado às micelas aumenta e ocorre dissociação da κ -caseína, diminuindo a estabilidade (O'Connell et al., 2006).

Micelas de caseína de maior tamanho são menos resistentes ao aquecimento do que micelas de menor diâmetro, devido ao menor conteúdo de κ -caseína, o que as torna mais susceptíveis ao Ca^{2+} (O'Connell & Fox, 2000).

Glantz et al. (2010) demonstraram que coágulos formados a partir de leite com micelas de caseína de tamanhos menores foram mais firmes quando comparados com o coágulo formado a partir de micelas de caseína de tamanho maior. Em relação ao tempo de coagulação, para as moléculas de tamanho reduzido a coagulação foi mais lenta.

O pH é um fator importante para se determinar a estabilidade do leite, em pH abaixo de 6,2 a estabilidade térmica do leite é mínima, uma vez que a quantidade de cálcio iônico no leite se eleva, aumentando a chance de ocorrer a precipitação, essa acidificação reduz a carga e a hidratação das proteínas e as ligações que mantêm as micelas de caseína juntas são mais fracas e escassas a pH 5,2 ou 5,3 (O'Connell et al., 2006).

De acordo com Holt (2004), o leite mastítico e do final da lactação têm três vezes mais probabilidade de ser instáveis do que leites de vacas no início ou meio da

lactação, o fator responsável por este efeito é o aumento no pH do leite, devido à maior permeabilidade do epitélio mamário a pequenas partículas e ions, uma vez que a mastite altera a permeabilidade vascular das células secretoras de leite, afetando o equilíbrio salino do leite (Na, Cl, Ca, P e K).

Concentrações de Ca^{2+} e etanol

O aumento de Ca^{2+} no leite diminui consideravelmente a capacidade da caseína em manter sua estrutura física, causando uma desestruturação micelar e consequente aumento da hidrofobicidade, o que determina maior agregação das micelas (Philippe et al., 2003).

O aumento da força iônica ou a forte ligação de ions específicos a grupos carregados da proteína pode diminuir a repulsão eletrostática e favorecer a auto-associação das proteínas (Mikheeva et al., 2003).

A prova do álcool pode ser usada como um método rápido para estimar a estabilidade das proteínas do leite, esta prova verifica a estabilidade da caseína, criando uma situação de estresse à proteína por meio de uma solução alcoólica que simula o efeito do aquecimento provocado pelo processamento térmico (O'Connell et al., 2001).

A adição de etanol ao leite induz várias alterações nas micelas de caseína, como o colapso da camada de κ -caseína, a redução na carga micelar e a precipitação do fosfato de cálcio, que colaboram para a redução da estabilidade micelar da κ -caseína (O'Connell et al., 2006).

O leite instável ao álcool é rejeitado pelo laticínio, pois sendo a caseína instável, o aumento da temperatura durante o processamento térmico pode promover a coagulação do leite, trazendo grandes transtornos à indústria (Silva et al., 2012), como deposição de proteínas nos equipamentos, ocasionando maior número

de interrupções do funcionamento para limpeza dos mesmos, o problema não inviabiliza o processamento, mas gera dificuldades e aumento de custos (Marques et al., 2007).

Para a realização da prova do álcool, atualmente a graduação mínima obrigatória é de 72% (v/v) Brasil (2011), no entanto, graduações de 76%; 78% e até 80% têm sido praticadas por diversas indústrias, na expectativa de selecionar leite de melhor qualidade.

Importância das proteínas do leite para a indústria

Do ponto de vista da indústria, as caseínas são os componentes mais importantes do leite. As propriedades nutricionais, sensoriais e de textura, dos principais produtos lácteos, como leite fluido, queijo e iogurte derivam das propriedades das caseínas (De Kruif et al., 2012).

A capacidade do leite em suportar os tratamentos de alta temperatura sem perda da estabilidade é bastante singular e torna possível a produção de muitos produtos lácteos esterilizados e com vida-de-prateleira longa (Singh, 2004).

A fabricação de queijos requer coagulação do leite e desenvolvimento de sinérese e a capacidade de coagulação do leite tem recebido atenção das indústrias de laticínios, principalmente porque a quantidade de leite utilizado para a produção de queijo está crescendo em todo o mundo (International Dairy Federation, 2011).

Na última década, a fração total de leite destinado à produção de queijo aumentou em cerca de 10% na União Européia e na América do Norte (Bittante et al., 2012).

Cerca de 90% a 95% do volume do leite usado para a fabricação de queijos resultam em soro, que contém

aproximadamente metade dos sólidos totais do leite, incluindo proteínas solúveis, sais e principalmente lactose (Chaves et al., 2010).

O soro é a porção aquosa liberada do coágulo durante a fabricação convencional de queijos, considerado um efluente residual que pode acarretar graves problemas ambientais associados ao alto teor de matéria orgânica, assim, o reaproveitamento tem sido estudado e sugerido para melhorar a eficiência econômica dos laticínios e minimizar os impactos ambientais (Bieger & Rinaldi, 2009).

A utilização industrial desse co-produto tem contribuído para o enriquecimento e desenvolvimento de novos produtos alimentícios, a exemplo cita-se a produção de bebidas lácteas enriquecidas com proteínas e sais minerais de soro de leite (Peregrine & Carrasqueira, 2008).

Além de aumentar o volume de pães e bolos e atuar como veículo anti-aglutinante em misturas secas (Zavareze et al., 2010). Nos sorvetes e sobremesas lácteas, o uso do soro doce é associado à formação de espumas estáveis e aumento da aeração do produto (Caldeira et al., 2010) além de melhoria da textura de doces de leite (Viotto & Machado, 2007).

As descobertas científicas têm demonstrado nas últimas décadas as múltiplas e importantes propriedades funcionais das proteínas do leite. As aplicabilidades são variadas e os efeitos fisiológicos altamente benéficos. As condições que favorecem a agregação das micelas de caseína são bem conhecidas, no entanto, os fatores que promovem a dissociação das micelas de caseína ainda não são completamente compreendidos (Ye & Harte, 2013). Sendo assim, é necessária a continuidade de pesquisas nesta área.

TABELA 1. Principais proteínas do leite.

Proteínas	Quantidade no leite (g/L)
CASEÍNAS	24 – 28
α_{s1}	12–15
α_{s2}	3 – 4
β	9 –11
κ	3 – 4
PROTEÍNAS DO SORO	5 – 7
β -lactoglobulina	2 – 4
α -lactalbumina	1 – 1,5
Albumina sérica	0,1 – 0,4
Imunoglobulinas	0,6 – 1,0
lactoferrina	~0,1
PROTEÍNA DA MEMBRANA DOS GLÓBULOS DE GORDURA	~0,4
Total de proteínas do leite	30 - 35

Fonte: Adaptada de Livney (2010)

TABELA 2. Valores médios de contagens de bactérias psicotróficas e atividade proteolítica em leite cru refrigerado obtido de dois laticínios do Estado do Rio Grande do Sul.

Laticínio ^a	n	Psicotróficos Totais (Log UFC/mL) ^b	Atividade Proteolítica (U/mL) ^c
L1	50	6,43 ± 0,35	12,3 ± 9,1
L2 A	20	6,36 ± 0,78	4,3 ± 7,3
L3 B	20	6,24 ± 0,63	3,3 ± 5,2

^aForam coletadas 50 amostras do silo de armazenamento do laticínio L1, 20 amostras do tanque isotérmico de caminhões (A) e 20 amostras do silo de armazenamento (B) do estabelecimento L2. ^bContagens de psicotróficos determinadas em placas de PCA incubadas por 10 dias, à 7°C. ^cAtividade proteolítica determinada pela hidrólise de gelatina solúvel.

Fonte: Nornberg et al. (2009).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As proteínas exercem diversas funções básicas de nutrição, como fonte de aminoácidos para síntese protéica e de energia e tecnológicas devido as suas propriedades funcionais e sensoriais. Devido à importância comercial, as proteínas do leite têm sido estudadas

extensivamente e são provavelmente, uma das melhores fontes de proteína alimentar.

A estabilidade das proteínas do leite é um fator importante para garantir adequadas condições de processamento, aumentar o tempo de prateleira de derivados lácteos e proporcionar maior qualidade ao consumidor final, uma vez que a elevada estabilidade térmica das principais proteínas

do leite, as caseínas, possibilitam a produção de derivados lácteos submetidos aos processamentos de alta temperatura. No entanto, alguns fatores causam a desestabilização da estrutura micelar, com consequente precipitação das caseínas do leite.

Nos trabalhos de pesquisa e análise não há nenhuma imagem uniforme do que a caseína micelar é, como sua estrutura é formada e como ela se comporta. Este fato é reconhecido e muitas vezes enfatizado em publicações sobre micelas de caseína.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 62, de 29 DE DEZEMBRO DE 2011. Diário Oficial da União, 30 de dezembro de 2011. Disponível em:

<http://www.jusbrasil.com.br/diarios/33395065/dou-secao-1-30-12-2011-pg-6>. Acesso em: 10 de Agosto de 2013.

BIEGER, A.; RINALDI, R. N. Reflexos do reaproveitamento de soro de leite na cadeia produtiva de leite do oeste do Paraná. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 47., 2009, Porto Alegre. Anais eletrônicos... [CD-ROM], Porto Alegre, 2009.

BITTANTE, G.; PENASA, M.; CECCHINATO, A. Invited review: Genetics and modeling of milk coagulation properties. *Journal of Dairy Science*, United States, v. 95, n. 12, p. 6843-6870, 2012.

CALDEIRA, L. A. et al. Desenvolvimento de bebida láctea sabor morango utilizando diferentes níveis de iogurte e soro lácteo obtidos com leite de búfala. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 40, n.10, p. 2193-2198, 2010.

DALGLEISH, D. G. On the structural models of bovine casein micelles – Review

and possible improvements. *Soft Matter*, v. 7, p. 2265-2272, 2011.

DE KRUIF, C. G.; GRINBERG, V. Y. Micellisation of β -casein. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 210, p. 183-190, 2002.

DE KRUIF, C. G. HOLT, C. Casein Micelle Structure, Functions and Interactions *Advanced Dairy Chemistry, Volume 1, Proteins, Third Edition A*, Chapter 5 Ed. P. F. Fox and P. L. H. McSweeney Kluwer Academic, New York, 2003.

DE KRUIF, C. G. et al. Casein micelles and their internal structure. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 171-172, p. 36-52, 2012.

DE WIT, J. N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in foods products. *Journal of Dairy Science*, United States, v. 81, p. 597-608, 1998.

DEETH, H. C. Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 555-562, 2006.

FARRELL JR, H. M. et al. Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 11, p. 135-147, 2006.

FOX, P. F.; BRODKORB, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal*, Canada, v. 18, p. 677-684, 2008.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Blackie Academic & Professional, London, 1998.

GAUCHER, I. et al. Effects of storage temperature on physico-chemical characteristics of semi-skimmed UHT milk. *Food Hydrocolloids*, v. 22, p. 130-143, 2008.

GLANTZ, M. et al. Importance of casein micelle size and milk composition for milk gelation. *Journal of Dairy Science*, United States, v. 93, p. 1444-1451, 2010.

- GOFF, H. D. University of Guelph. Dairy Science and Technology. [online], 2009. Disponível em: <https://www.uoguelph.ca/foodscience/dairy-science-and-technology/dairy-chemistry-and-physics>. Acesso em: 10 de Agosto de 2013.
- HOLT, C. An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein micelles and its application to the calculation of the partition of salts in milk. *European Biophysics Journal, Germany*, v. 33, p. 421-434, 2004.
- HOLT, C. et al. Substructure of bovine casein micelles by small-angle X-ray and neutron scattering. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 213, p. 275-284, 2003.
- HORNE, D. S. Casein micelle structure: models and muddles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v.11, p.148-153, 2006.
- HURLEY, M. J. et al. The milk acid proteinase cathepsin D: a review. *International Dairy Journal*, v. 10, p. 673-681, 2000.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. The world dairy situation. Bulletin 451/2011. International Dairy Federation, Brussels, Belgium 2011.
- LIVNEY, Y. D. Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid & Interfaces Science, Israel*, v. 15, p. 73-83, 2010.
- LÖNNERDAL, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 77, p.1537-43, 2003.
- MARKUS, C. R.; OLIVER, B.; DE HAAN, E. H. F. Whey Protein rich in alfa-lactoalbumin increases the ratio of plasma tryptophan to the sum of the other large neutral amino acids and improves cognitive performance in stress-vulnerable subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 75, p. 1051-6, 2002.
- MARQUES, L. T. et al. Ocorrência do leite instável ao álcool 76% e não ácido (LINA) e efeitos sobre os aspectos físico-químicos do leite. *Revista Brasileira de Agrociência, Pelotas*, v. 13, p. 91-97, 2007.
- MIKHEEVA, L. M. et al. Thermodynamics of micellization of bovine α -casein studied by high-sensitivity differential scanning calorimetry. *Langmuir*, v. 19, p. 2913-2921, 2003.
- NORNBERG, M. F. B. L.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicrotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 37, p. 157-163, 2009.
- O'CONNELL, J. E.; FOX, P. F. The two-stage coagulation of milk proteins in the minimum of the heat coagulation time-pH profile of milk: effect of casein micelle size. *Journal of Dairy Science, United States*, v. 83, p. 378-386, 2000.
- O'CONNELL, J. E. et al. Mechanism for the ethanol dependent heat-induced dissociation of casein micelles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 4424-4428, 2001.
- O'CONNELL, J. E. et al. Influence of ethanol on the rennet- induced coagulation of milk. *Journal of Dairy Research*, v. 73, p. 312-317, 2006.
- ORDONÉZ, J. A. Tecnologia de alimentos: Componentes dos alimentos e processos. Porto Alegre: Artmed, v. 1, p. 294, 2005.
- PANYAM, D., KILARA, A. Enchanting the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends in Food Science & Technology International, Cambridge*, v.7, n.4, p.120-125, 1996.
- PELEGRINI, D. H. G.; CARRASQUEIRA, R. L. Aproveitamento do soro do leite no enriquecimento nutricional de bebidas. *Brazilian Journal Food Technology*, v.62, n.6, p.1004-11, 2008.
- PHADUNGATH, C. Casein micelle structure: a concise review. *Songklanakar*

- Journal Science Technology, v. 27, p. 201-212, 2005.
- PHILIPPE, M. et al. Physicochemical characterization of calcium-supplemented skim milk. *Le Lait, Dairy Science and Technology*, v. 83 p. 45-59, 2003.
- QI, P. X. Casein micelle structure: the past and the present. *Le Lait, Dairy Science and Technology*, v.87, p.363–383, 2007.
- SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. *Revista de Nutrição, Campinas*, v. 17, p. 397–409, 2004.
- SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico Químicas das Proteínas do Leite. *Brazilian Journal of Food Technology, Campinas*, v.8, p. 43-56, 2005.
- SHANNON, L. K. et al. Glycomacropéptide and alfa- lactoalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutritional status in infant rhesus monkeys. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 77, p. 1261-8, 2003.
- SMYTH, E.; CLEGG, R. A.; HOLT, C. A biological perspective on the structure and function of caseins and casein micelles. *International Journal of Dairy Technology*, v. 57, p. 121-126, 2004.
- SILVA, L. C. C. et al. Estabilidade térmica da caseína e estabilidade ao álcool 68, 72, 75 e 78%, em leite bovino. *Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”*, v. 67, p. 55-60, 2012.
- SINGH H. Heat stability of milk. *International Journal of Dairy Technolog*, v. 57, 2004.
- VIOTTO, W. H.; MACHADO, L. M. P. Estudo sobre a cristalização da lactose em doce de leite pastoso elaborado com diferentes concentrações de soro de queijo e amido de milho modificado. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.62, n.4, p.16-21, 2007.
- WALSTRA, P. Casein sub-micelles: do they exist? *International Dairy Journal*, v. 9, p. 189-192, 1999.
- YE, A. Functional properties of milk protein concentrates: Emulsifying properties, adsorption and stability of emulsions. *International Dairy Journal*, v. 21, p. 14 20, 2011.
- YE, R.; HARTE, F. Casein maps: effect of ethanol, pH, temperature, and CaCl₂ on the particle size of reconstituted casein micelles. *Journal of Dairy Science, United States*, v. 96, p. 799–805, 2013.
- ZAVAREZE, E. R.; MORAES, K. S.; SALASMELLADO, M. M. Qualidade tecnológica e sensorial de bolos elaborados com soro de leite. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n.1, p. 102-106, 2010