# EFEITO DA ADIÇÃO DE TRANSGLUTAMINASE EM BEBIDAS LÁCTEAS

# EFFECT OF TRANSGLUTAMINASE ADDITION IN DAIRY BEVERAGES

Jaqueline de Almeida Celestino[1], Annanda Carvalho Rodrigues[2], Lais Argemiro da Silva[2], Rodrigo Stephani[1], Ítalo Tuler Perrone[2]

[1]Departamento de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora - MG, Brasil
[2]Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora - MG, Brasil

**Resumo:** As bebidas lácteas têm alta aceitação no mercado, porém sua qualidade pode ser comprometida pela instabilidade durante o processamento e armazenamento. A utilização da enzima transglutaminase (TGase) é proposta como uma abordagem para aprimorar suas propriedades físico-químicas e tecnológicas. Este estudo avaliou o impacto da TGase em variadas concentrações na formulação de bebidas lácteas. Parâmetros como pH, cálcio iônico, tempo de coagulação pelo calor e marcadores da reação de Maillard foram analisados. Os resultados demonstram que a TGase otimiza a estabilidade das bebidas, sem alterar características físico-químicas, como pH e cálcio iônico. Conclui-se que a adição de TGase é uma estratégia viável para aprimorar a formulação oferecendo um produto com melhores características tecnológicas e funcionais para a indústria.

**Palavras-chave:** Bebidas lácteas; Transglutaminase; Estabilidade.

## Introdução

A Transglutaminase microbiana (mTGase), uma enzima que promove a polimerização de proteínas lácteas através de ligações cruzadas, é amplamente utilizada na indústria alimentícia. Obtida de *Streptoverticium mobaraense*, sua produção industrial foi iniciada pela Ajinomoto Co. e Amano Enzyme Co. (DUARTE et al., 2019). A mTGase apresenta atividade em pH 4,0 a 9,0 e temperaturas de 40 °C a 70 °C, sendo inativada acima de 70 °C por alguns minutos (ANDO et al., 1989). As caseínas (CN), que compõem cerca de 80% das proteínas do leite bovino, são os principais substratos da mTGase, enquanto as proteínas do soro do leite (WP) requerem desnaturação térmica prévia para maior suscetibilidade à reticulação (YOKOYAMA et al., 2004). A aplicação da transglutaminase melhora a estabilidade, textura e viscosidade de produtos lácteos (GIOSAFATTO, AL-ASMAR & MARINIELLO, 2018).

Bebidas lácteas UHT, tratadas termicamente entre 135 °C e 145 °C por 4 a 10 segundos, apresentam vida útil estendida e podem conter leite em diferentes formas, soro de leite e aditivos diversos (ANEMA, 2019; BRASIL, 2024). Bebidas lácteas com alto teor proteico atendem necessidades nutricionais específicas, como de atletas e idosos (VASQUEZ-OREJANERA et al., 2018), e seu consumo tem crescido com o aumento da procura por alimentos funcionais (BARONE et al., 2022). No entanto, desafios relacionados à estabilidade ainda persistem, devido à sensibilidade térmica das WP, que favorece a agregação e sedimentação (SINGH et al., 2019, 2020).

Reconhecida como segura pela FDA desde 1998 (GASPAR; DE GOES-FAVONI, 2015; KIELISZEK; MISIEWICZ, 2014), a mTGase é regulamentada no Brasil pelo MAPA para uso em diversos produtos lácteos. Sua incorporação em bebidas lácteas de alto teor proteico pode reduzir a sedimentação e melhorar a resistência térmica das WP, além de favorecer características tecnológicas como textura e viscosidade (SINGH et al., 2019, 2020; DUARTE et al., 2019).

Diante disso, o estudo visa investigar o impacto de diferentes concentrações de transglutaminase na formulação de bebidas lácteas, analisando pH, cálcio iônico, tempo de coagulação pelo calor (HCT) e marcadores da reação de Maillard.

**Material e métodos**

**Formulação da bebida láctea regular e com alto teor proteico**

Para preparar a bebida láctea regular, foram utilizados: leite em pó desnatado, soro em pó desmineralizado, sal de fosfato, hidrocoloide, creme de leite pasteurizado e água deionizada. Já a bebida láctea com alto teor proteico foi fabricada com os mesmos ingredientes da versão regular, porém sem o creme de leite pasteurizado e com a adição de proteína de soro em pó (WPC 80%), visando aumentar o conteúdo proteico da formulação.

**Preparo das bebidas lácteas**

Deu-se início ao preparo partindo da pesagem dos ingredientes que em seguida foram misturados. Depois, mediu-se e ajustou-se o pH para o valor de 6,8-6,9. A mistura foi submetida a aquecimento de 85 °C e logo após foi homogeneizada em homogeneizador APV. Cada tipo de bebida láctea foi produzida em triplicata (n=3).

**Tratamento enzimático**

Após a fabricação das bebidas lácteas, os produtos foram divididos em cubas. A alíquota de 100 mL foi coletada como controle (C0) para ambas as bebidas. A enzima transglutaminase ACTIVA WM (Ajinomoto®) foi adicionada em três concentrações: baixa (0,01% $m.m^{-1}$), intermediária (0,02% $m.m^{-1}$) e alta (0,04% $m.m^{-1}$). As amostras foram submetidas a dois tratamentos temperatura/tempo: 55 °C/20 min e 6 °C/5 h, cada uma com seus respectivos controles. Foram produzidas 48 bebidas lácteas no total, sendo 24 regulares e 24 com alto teor proteico. Após o tratamento enzimático, os produtos foram analisados em triplicata.

**Determinação do pH e do cálcio iônico**

Utilizando o medidor de pH portátil (PG 1400, GEHAKA®) e o medidor de cálcio iônico LAQUAtwin $Ca^{2+}$ (Horiba Kyoto, Japão), foram realizadas as determinações do pH e cálcio iônico respectivamente.

**Avaliação da estabilidade térmica**

De acordo com o que está descrito em Dumpler & Kulozik (2015), foi realizado o tempo de coagulação pelo calor (HCT) onde o volume de 10 mL de cada amostra foi transferido para potes herméticos e o mesmo foi agitado em um banho de óleo com temperatura aproximada de 150 °C. A posição dos tubos (nível de óleo igual ao nível do banho de óleo) foi feita a fim de facilitar a visualização no momento da coagulação.

**Quantificador dos marcadores da reação de Maillard**

Pinto et al. (2024) investigou a presença dos marcadores desta reação em produtos lácteos e desenvolveu um método para que fosse possível quantificar e identificar os mesmos.

Através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa, foram avaliados a presença dos seguintes marcadores da reação de Maillard: HMF (5-hidroximetilfurfural), F (2-furaldeído), MF (5-metil2-furfural) e FMC (2-furilmetilcetona).

**Determinação do teor de HMF nas amostras**

Para determinar a variação de HMF (ΔHMF), as amostras passaram por um estresse onde foram aquecidas a 140 °C durante 15 minutos. Após isso, foi realizada a quantificação de HMF. O ΔHMF foi calculado pela equação 1, para as duas repetições:

Equação 1: $\Delta HMF\ (mg.100\ g^{-1}) = HMF_{140\ ºC/15min} - HMF_{amostra}$

**Análise estatística**

As análises estatísticas foram conduzidas com nível de significância de 5%, utilizando os testes de Tukey, por meio do software R® (versão 4.1.2), desenvolvido pela The R Foundation for Statistical Computing.

**Resultados e discussões - Bebida láctea alta proteína**

Os resultados de pH, cálcio iônico e HCT (Tabela 1) mostram que a TGase, em diferentes concentrações, não diferiu significativamente ($p>0,05$) dos controles quanto ao pH e cálcio iônico. Contudo, amostras com alta concentração da enzima resultaram em diferença significativa no HCT ($p<0,05$), conferindo maior resistência à coagulação pelo calor às bebidas. Isso demonstra que a TGase melhora a estabilidade térmica sem alterar parâmetros físico-químicos importantes.

**Tabela 1:** Resultados das análises dos testes realizados.*

| Amostras** | pH | Cálcio iônico (mmol.L$^{-1}$) | HCT (min) |
|---|---|---|---|
| C0 | 6,92 ± 0,02$^{ab}$ | 0,524 ± 0,100$^{a}$ | 12,22 ± 0,54$^{a}$ |
| C1 | 6,88 ± 0,02$^{ac}$ | 0,524 ± 0,100$^{a}$ | 11,35 ± 1,47$^{ab}$ |
| EB1 | 6,87 ± 0,02$^{ac}$ | 0,549 ± 0,100$^{a}$ | 18,73 ± 1,20$^{cd}$ |
| EI1 | 6,88 ± 0,03$^{c}$ | 0,524 ± 0,100$^{a}$ | 16,83 ± 3,57$^{c}$ |
| EA1 | 6,89 ± 0,03$^{ac}$ | 0,524 ± 0,125$^{a}$ | 24,23 ± 5,59$^{e}$ |
| C2 | 6,96 ± 0,03$^{b}$ | 0,499 ± 0,125$^{a}$ | 11,91 ± 0,33$^{ab}$ |
| EB2 | 6,96 ± 0,01$^{b}$ | 0,474 ± 0,125$^{a}$ | 20,60 ± 1,50$^{cde}$ |
| EI2 | 6,94 ± 0,02$^{b}$ | 0,474 ± 0,125$^{a}$ | 23,25 ± 0,71$^{de}$ |
| EA2 | 6,96 ± 0,01$^{b}$ | 0,449 ± 0,100$^{a}$ | 25,67 ± 2,02$^{e}$ |

*Médias seguidas da mesma letra, não diferem significativamente entre si na mesma coluna, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. **Legenda. C0: tratamento controle após aquecimento; C1: tratamento controle, tempo 20 min à 55 ºC; EA1: enzima alta concentração, tempo 20 min à 55 ºC; EI1: enzima concentração intermediária, tempo 20 min à 55 ºC; EB1: enzima baixa concentração, tempo 20 min à 55 ºC; C2: tratamento controle, tempo 5h à 6 ºC; EA2: enzima alta concentração, tempo 5h à 6 ºC; EI2 enzima concentração intermediária, tempo 5h à 6 ºC; EB2: enzima baixa concentração, tempo 5h à 6 ºC.

A análise por HPLC dos marcadores da Reação de Maillard, identificou e quantificou apenas o 5-hidroximetilfurfural (HMF). Avaliou-se o comportamento das amostras pós-estresse térmico (140 °C/15 minutos) calculando a variação do HMF (ΔHMF), conforme apresentado na Tabela 2. Amostras com TGase tratadas a quente diferiram significativamente ($p<0,05$) em ΔHMF comparado ao controle, enquanto as tratadas a frio não mostraram diferença ($p>0,05$). A amostra EI1 (TGase a 55 °C/20 min) teve o menor ΔHMF em ambas repetições. Como composto intermediário da reação de Maillard, o HMF é influenciado pelo calor e pela interação entre proteínas e açúcares redutores (CELESTINO et al., 2024; PINTO et al., 2024).

A TGase pode reduzir a formação desses compostos via reticulação proteica, diminuindo a disponibilidade de grupos funcionais (GAN et al., 2009). Assim, sua aplicação é uma estratégia para mitigar o escurecimento em bebidas lácteas UHT, melhorando sua qualidade sensorial e estabilidade.

**Tabela 2:** Variação do teor de HMF (ΔHMF) nas amostras em duas repetições.*

| Amostras** | ΔHMF (mg.100 $g^{-1}$) Repetição 1 | ΔHMF (mg.100 $g^{-1}$) Repetição 2 |
|---|---|---|
| C1 | 2,21 ± 0,08$^{a}$ | 0,97 ± 0,03$^{a}$ |
| EB1 | 2,70 ± 0,15$^{b}$ | 1,38 ± 0,13$^{b}$ |
| EI1 | 3,57 ± 0,44$^{c}$ | 1,16 ± 0,17$^{b}$ |
| EA1 | 2,36 ± 0,15$^{a}$ | 0,80 ± 0,10$^{d}$ |
| C2 | 1,66 ± 0,08$^{e}$ | 0,86 ± 0,03$^{d}$ |
| EB2 | 1,47 ± 0,03$^{f}$ | 0,89 ± 0,01$^{d}$ |
| EI2 | 1,87 ± 0,15$^{e}$ | 0,82 ± 0,03$^{d}$ |
| EA2 | 1,67 ± 0,18$^{e}$ | 0,84 ± 0,02$^{d}$ |

*Médias seguidas da mesma letra, não diferem significativamente entre si na mesma coluna, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. **Legenda. C1: tratamento controle, tempo 20 min à 55 ºC; EA1: enzima alta concentração, tempo 20 min à 55 ºC; EI1: enzima concentração intermediária, tempo 20 min à 55 ºC; EB1: enzima baixa concentração, tempo 20 min à 55 ºC; C2: tratamento controle, tempo 5h à 6 ºC; EA2: enzima alta concentração, tempo 5h à 6 ºC; EI2 enzima concentração intermediária, tempo 5h à 6 ºC; EB2: enzima baixa concentração, tempo 5h à 6 ºC.

**Resultados e discussões - Bebida láctea regular**

Os resultados de pH, cálcio iônico e HCT das bebidas lácteas regulares (Tabela 3) demonstraram que a adição de TGase, em diferentes concentrações, não causou alterações significativas no pH nem nos níveis de cálcio iônico ($p>0,05$). Isso indica que a enzima mantém a estabilidade ácido-base e a disponibilidade mineral da bebida. Estudos anteriores relatam que a TGase preserva a partição do cálcio entre a fase micelar e o soro, evitando a precipitação e contribuindo para a estabilidade coloidal (LAM et al., 2018). Quanto ao HCT, os resultados indicam que amostras com TGase em baixa concentração apresentaram maior resistência térmica (maior tempo de coagulação), tanto com aquecimento quanto com resfriamento, comparadas ao controle.

**Tabela 3:** Resultados das análises dos testes realizados.*

| Amostras** | pH | Cálcio iônico (mmol.$L^{-1}$) | HCT (min) |
|---|---|---|---|
| C0 | 6,79 ± 0,09$^{a}$ | 0,374 ± 0,150$^{a}$ | 4,86 ± 0,46$^{a}$ |
| C1 | 6,79 ± 0,02$^{a}$ | 0,449 ± 0,225$^{a}$ | 9,58 ± 0,34$^{bc}$ |
| EB1 | 6,75 ± 0,08$^{a}$ | 0,374 ± 0,150$^{a}$ | 11,50 ± 0,29$^{cd}$ |
| EI1 | 6,75 ± 0,08$^{a}$ | 0,399 ± 0,175$^{a}$ | 4,96 ± 0,24$^{a}$ |
| EA1 | 6,76 ± 0,09$^{a}$ | 0,399 ± 0,125$^{a}$ | 6,66 ± 0,69$^{ab}$ |
| C2 | 6,83 ± 0,09$^{a}$ | 0,449 ± 0,200$^{a}$ | 10,97 ± 0,31$^{c}$ |
| EB2 | 6,82 ± 0,13$^{a}$ | 0,349 ± 0,075$^{a}$ | 14,68 ± 1,80$^{d}$ |
| EI2 | 6,82 ± 0,10$^{a}$ | 0,349 ± 0,025$^{a}$ | 8,67 ± 1,08$^{abc}$ |
| EA2 | 6,83 ± 0,13$^{a}$ | 0,349 ± 0,025$^{a}$ | 9,68 ± 0,88$^{bc}$ |

*Médias seguidas da mesma letra, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ** Legenda. C0: tratamento controle após aquecimento; C1: tratamento controle, tempo 20 min à 55 ºC; EA1: enzima alta concentração, tempo 20 min à 55 ºC; EI1: enzima concentração intermediária, tempo 20 min à 55 ºC; EB1: enzima baixa concentração, tempo 20 min à 55 ºC; C2: tratamento controle, tempo 5h à 6 ºC; EA2: enzima alta concentração, tempo 5h à 6 ºC; EI2 enzima concentração intermediária, tempo 5h à 6 ºC; EB2: enzima baixa concentração, tempo 5h à 6 ºC.

Apenas o HMF foi identificado e quantificado nas amostras analisadas (Tabela 4). Os resultados mostraram que a variação do HMF (ΔHMF) foi significativamente menor nas amostras com TGase comparadas aos controles. Acredita-se que a menor formação de HMF nas bebidas com TGase esteja ligada à sua capacidade de formar ligações cruzadas entre proteínas, reduzindo a disponibilidade de grupos amina para reagir com açúcares redutores e, assim, inibindo parcialmente a reação de Maillard (GAN et al., 2009).

**Tabela 4:** Variação do teor de HMF (ΔHMF) nas amostras.*

| Amostras** | ΔHMF (mg.100 $g^{-1}$) | ΔHMF (mg.100 $g^{-1}$) |
|---|---|---|
| C1 | 4,20 ±0,01$^{b}$ | 15,34 ± 2,25$^{b}$ |
| EB1 | 2,71 ± 0,03$^{d}$ | 8,34 ± 3,04$^{c}$ |
| EI1 | 2,47 ± 0,01$^{e}$ | 8,64 ± 0,33$^{b}$ |
| EA1 | 4,16 ± 0,02$^{b}$ | 10,49 ± 0,12$^{d}$ |
| C2 | 3,88 ± 0,01$^{c}$ | 19,09 ± 0,38$^{e}$ |
| EB2 | 2,11 ± 0,01$^{g}$ | 6,98 ± 0,01$^{f}$ |
| EI2 | 3,69 ± 0,01$^{f}$ | 8,22 ± 1,70$^{d}$ |
| EA2 | 2,63 ± 0,02$^{d}$ | 9,63 ± 0,73$^{g}$ |

*Médias seguidas da mesma letra, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ** Legenda. C1: tratamento controle, tempo 20 min à 55 ºC; EA1: enzima alta concentração, tempo 20 min à 55 ºC; EI1: enzima concentração intermediária, tempo 20 min à 55 ºC; EB1: enzima baixa concentração, tempo 20 min à 55 ºC; C2: tratamento controle, tempo 5h à 6 ºC; EA2: enzima alta concentração, tempo 5h à 6 ºC; EI2 enzima concentração intermediária, tempo 5h à 6 ºC; EB2: enzima baixa concentração, tempo 5h à 6 ºC.

**Conclusão**

A adição de transglutaminase melhorou as propriedades funcionais e estruturais da bebida láctea, promovendo uma rede proteica mais coesa e maior resistência térmica. A enzima influenciou positivamente a menor formação de HMF e o maior tempo de coagulação ao calor, além de manter o pH e o cálcio iônico iguais aos respectivos controles. O estudo destaca seu potencial tecnológico e sugere novas pesquisas em diferentes formulações alimentares.

**Referências Bibliográficas**

ANDO, H. et al. 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. Age gelation, sedimentation, and creaming in UHT milk: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 1, p. 140-166, 2019.

BARONE, G. et al. Interactions between whey proteins and calcium salts and implications for the formulation of dairy protein-based nutritional beverage products: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 21, n. 2, p. 1254-1274, 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Portaria nº 1174**, de 03 de setembro de 2024. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea. Disponível em: Acesso em: 11/02/2025

CELESTINO, J. A. et al. Effect of sucrose content added to milk on the composition, yield, viscosity, color, and Maillard reaction chemical markers of dulce de leche. **European Food Research and Technology**, v. 250, n. 5, p. 1529-1536, 2024.

DUARTE, L. et al. Review transglutaminases: part II—industrial applications in food, biotechnology, textiles and leather products. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 1-20, 2020.

DUMPLER, J.; KULOZIK, U. Heat stability of concentrated skim milk as a function of heating time and temperature on a laboratory scale–Improved methodology and kinetic relationship. **International Dairy Journal**, v. 49, p. 111-117, 2015.

GAN, C.Y. et al. Assessment of cross-linking in combined cross-linked soy protein isolate gels by microbial transglutaminase and maillard reaction. **Journal of food science**, v. 74, n. 2, p. C141-C146, 2009.

GASPAR, A. L.C.; DE GÓES-FAVONI, S. P. Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: A review. **Food chemistry**, v. 171, p. 315-322, 2015.

GIOSAFATTO, C. V. L.; AL-ASMAR, A.; MARINIELLO, L. Transglutaminase protein substrates of food interest. **Enzymes in Food Technology: Improvements and Innovations**, p. 293-317, 2018.

KIELISZEK, M.; MISIEWICZ, A. Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. **Folia microbiologica**, v. 59, p. 241-250, 2014.

LAM, E. et al. The effect of transglutaminase on reconstituted skim milks at alkaline pH. **Food Hydrocolloids**, v. 85, p. 10-20, 2018.

PINTO, C. B. A. et al. Determination of Maillard reaction markers in doce de leite by HPLC-PDA. **Química Nova**, v. 47, n. 7, p. e-20240041, 2024.

ROMEIH, E. et al. Enzymatically cross-linked skim milk powder: Enhanced rheological and functional properties. **International Dairy Journal**, v. 113, p. 104885, 2021.

SINGH, J. et al. Ultra-high temperature (UHT) stability of chocolate flavored high protein beverages. **Journal of Food Science**, v. 85, n. 10, p. 3012-3019, 2020.

SINGH, J. et al. Ultra high temperature (UHT) stability of casein-whey protein mixtures at high protein content: Heat induced protein interactions. **Food Research International**, v. 116, p. 103-113, 2019.

VASQUEZ-OREJARENA, E. et al. Functional properties of a high protein beverage stabilized with oat-β-glucan. **Journal of food science**, v. 83, n. 5, p. 1360-1365, 2018.

VELAZQUEZ-DOMINGUEZ, A. et al. Transglutaminase cross-linking on dairy proteins: Functionalities, patents, and commercial uses. **International Dairy Journal**, v. 143, p. 105688, 2023.

YOKOYAMA, K.; NIO, N.; KIKUCHI, Y. Properties and applications of microbial transglutaminase. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 64, n. 4, p. 447-454, 2004.

Autor(a) a ser contatado: Jaqueline de Almeida Celestino, Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n - São Pedro, Juiz de Fora - MG, 36036-900. E-mail: jaqueline.almeida@estudante.ufjf.br