

## ESTUDO COMPARATIVO DE OBTENÇÃO DA KAPPA-CASEÍNA POR FRACIONAMENTO COM URÉIA E FILTRAÇÃO EM GEL SEPHADEX

HONÓRIO DOMINGOS BENEDET\*

O presente trabalho teve como objetivo comparar a obtenção de k-caseína em termos de pureza, rendimento e rapidez de obtenção. Concluiu-se que o fracionamento da caseína por uréia separa em alto grau de pureza a K-caseína. Os dois métodos apresentaram resultados eletroforéticos praticamente iguais, sendo que o método da filtração em gel Sephadex oferece algumas vantagens.

### 1 INTRODUÇÃO

A caseína foi por muito tempo considerada uma proteína pura, porém a partir dos estudos de LINDERSTRONG-LANG em 1925, este conceito teve que ser modificado (5). As investigações de MELLANDER em 1939, também demonstraram que a caseína era composta de no mínimo três componentes que designou como  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -caseína, de acordo com a ordem decrescente de suas mobilidades (7).

WAUGH e VON HIPPEL em 1956, descobriram que a micela de caseína era composta de caseinato de cálcio  $\beta$ -caseína e um complexo de  $\alpha$  e k-caseína, sendo que a k-caseína era o fator mais importante, responsável pela estabilização da micela e da proteína. As percentagens relativas encontradas por estes autores foram de cerca de 55% de  $\alpha$ -caseína, 30% de  $\beta$ -caseína e 15% de k-caseína (11).

São hoje conhecidos vários métodos de separação das frações da caseína, sendo que o objetivo deste trabalho foi a comparação da eficiência de dois destes na obtenção de fração k da caseína.

\*Professor Adjunto do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL

2.1.1 Leite integral de vaca holandesa da raça Holstein, não pasteurizado, utilizado logo após a ordenha.

2.1.2 Os reagentes utilizados foram do tipo analítico e das marcas: Merck, Baker, Sigma, Ecibra, Reagen e Carlo Erba. As soluções foram preparadas pelas formas usuais, utilizando-se vidrarias normais de laboratório.

2.1.3 Os equipamentos utilizados foram os seguintes:

- Potenciômetro H-5 Horiba;
- Centrifuga IEC UV-Damon/IEC Division Int. Equipment Co.;
- Centrifuga refrigerada Beckman, model j-21 B;
- Liofilizador New Brunswick Scientific Co. Inc., model XB 60-50;
- Espectrofotômetro UV Perkin-Elmer, Coleman 124 D;
- Outros equipamentos de uso comum em laboratório, como: balança analítica, estufa, dessecador, etc.

### 2.2 MÉTODOS

#### 2.2.1 Obtenção de caseína ácida

Foi obtida segundo o método de HIPP et al (4), a partir de um litro de leite fresco, não pasteurizado, centrifugado a 4500 r.p.m., com a finalidade de retirar a gordura. Ao leite desengordurado, adicionou-se HCl 0,1 N até o pH atingir 4,6, havendo a precipitação da caseína. Esta foi deixada em repouso por 30 minutos, quando a maior parte do sobrenadante foi separada por decantação. Submeteu-se o remanescente a centrifugação a 4500 r.p.m. por 10 minutos, desprezou-se o sobrenadante, dividindo-se o precipitado em duas porções, uma das quais foi lavada três vezes e novamente submetida a centrifugação como especificado acima. Finalmente, as duas porções foram congeladas a -18°C, liofilizadas e guardadas em geladeira a 4°C (Figura 1).

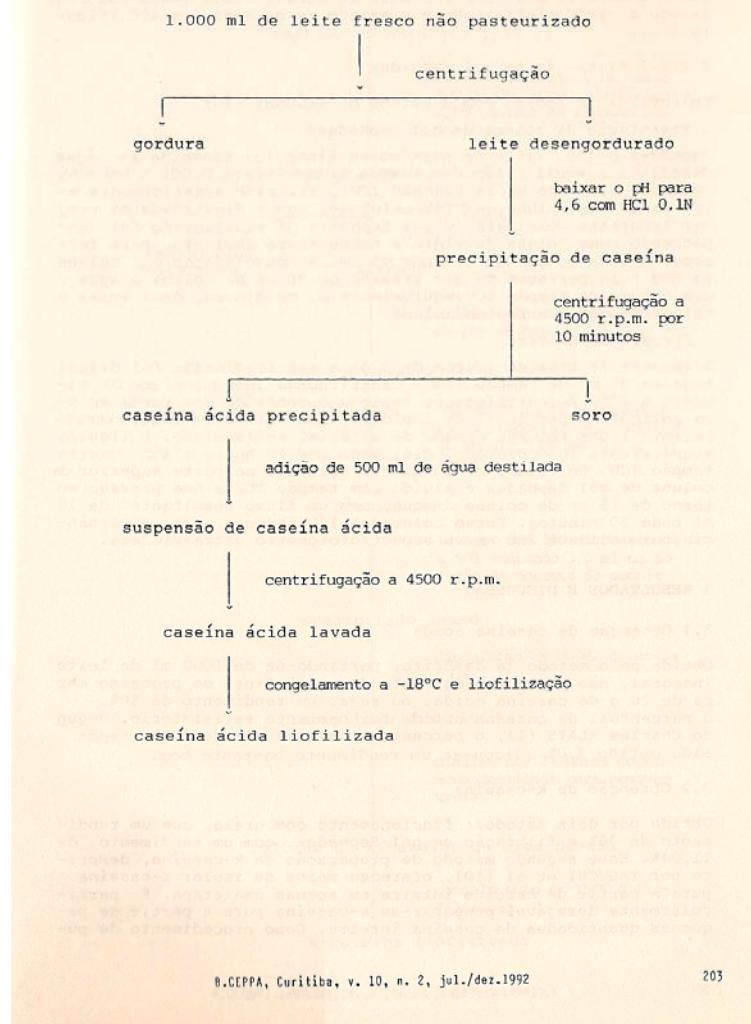
#### 2.2.2 Obtenção da k-caseína

Obtida por dois métodos: por fracionamento com uréia e por filtração em gel Sephadex.

##### 2.2.2.1 Fracionamento com uréia

Foi obtida pelo método descrito por ZITTLE (12) e Mc KENZIE e WAKE (6), a partir de 750 g de caseína ácida úmida, que foi dissolvida em 2000 ml de uma solução de uréia 6,6 M, juntando-se, em seguida, 400 ml de uma solução de ácido sulfúrico 7,0 N com agitação constante (o pH da solução final situou-se entre 1,3 a 1,5). A mistura resultante foi deixada em repouso por 2 horas e submetida a filtração. O filtrado foi dialisado por 48 h contra água destilada. Ao dialisado adicionou-se o mesmo volume em etanol absoluto, com agitação constante, seguido da adição de acetato de amônia 2,0 M em 50% de etanol (foram adicionados cerca de 3,5 ml), tomado-se bastante cuidado, pois um excesso de acetato de amônia redissolveria o precipitado. Depois de 30 minutos de agitação, descartou-se o sobrenadante e lavou-se o precipitado com 200 ml de etanol a 50% contendo 3 ml da solução de

FIGURA 1 - FLUXOGRAMA DE OBTENÇÃO DA CASEÍNA ÁCIDA



acetato de amônia e, em seguida, dissolveu-se em 30 ml de solução de uréia 6,0 M. A uréia foi removida por diálise contra água destilada (4 litros) durante 4 horas, quando trocou-se a água e deixou-se dialisar por mais 24 horas. O dialisado foi congelado a -18°C liofilizado e guardado em geladeira a 4°C (Figura 2).

#### 2.2.2.2 Filtração em gel Sephadex

Foi obtida de acordo com o método de YAGUSHI (10)

. Preparação da coluna de gel Sephadex:

Sephadex G-150, livre de partículas finas foi embebido em água destilada e equilibrado com tampão tris-citrato 0,005 M (pH 8,6), contendo 6,0 M de uréia (tampão TCU), filtrado anteriormente através de uma coluna de DEAE-celulose, com a finalidade de remover impurezas coloidais. O gel Sephadex já equilibrado foi empacotado numa coluna de vidro a temperatura ambiente, para fornecer coluna de gel de 2,5 por 95 cm. A consolidação da coluna se deu pela passagem de uma pressão de 30 cm de coluna d'água, com volume de tampão TCU equivalente a, no mínimo, duas vezes o volume de gel contido na coluna.

. Preparo da amostra:

A amostra de caseína (cerca de 2 g) a ser fracionada foi dissolvida em 35 ml de tampão TCU e centrifugada 1800 r.p.m. por 20 minutos a 2°C. A centrifugação separou o conteúdo dos tubos em uma película superficial de lipídios, uma coluna de líquido transparente e uma pequena camada de material sedimentado. O líquido transparente foi coletado, dialisado por 12 horas a 4°C contra tampão TCU. Um volume de 10 ml foi aplicado na parte superior da coluna de gel Sephadex e eluído com tampão TCU a uma pressão em torno de 15 cm de coluna d'água, com um fluxo resultante de 10 ml cada 30 minutos. Foram coletadas 120 frações cuja absorbância foi medida a 280 nm em espectrofotômetro ultra-violeta.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

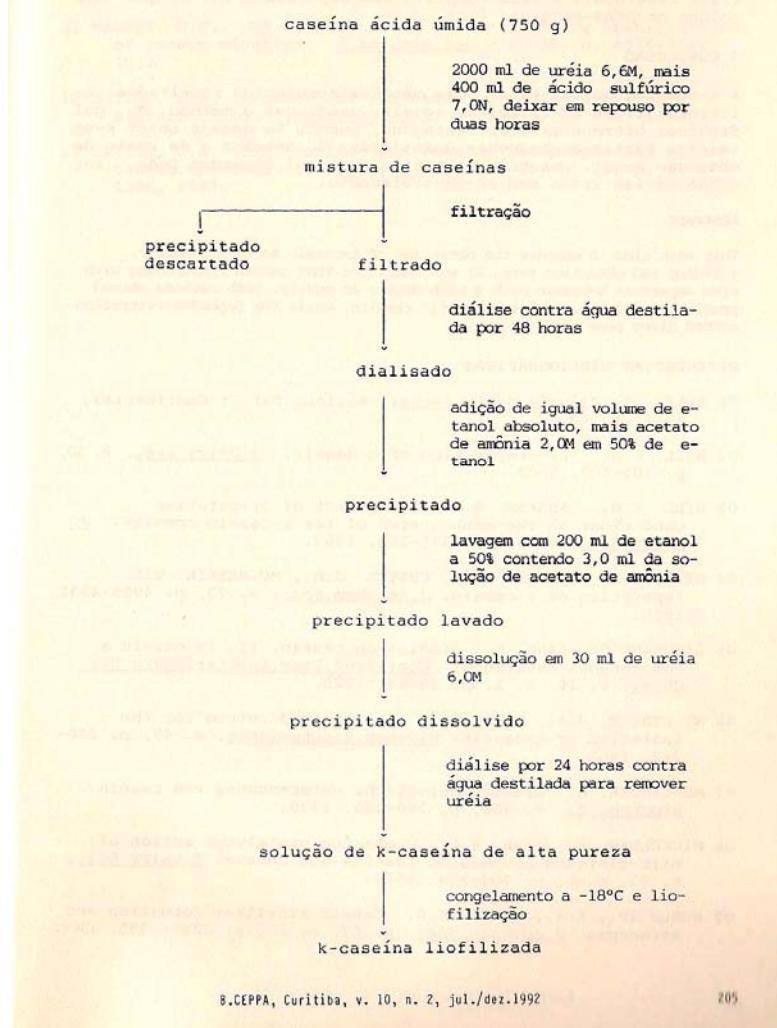
#### 3.1 Obtenção de caseína ácida

Obtida pelo método já descrito, partindo-se de 1000 ml de leite integral, não pasteurizado, obtendo-se no final do processo cerca de 20 g de caseína ácida, ou seja, um rendimento de 80%. O percentual de caseína obtido foi bastante satisfatório. Segundo Charles ALAIS (1), o percentual deveria ser de 2,5%, tendo sido obtido 2,0%, julgou-se um rendimento bastante bom.

#### 3.2 Obtenção de k-caseína

Obtida por dois métodos: fracionamento com uréia, com um rendimento de 36% e filtração em gel Sephadex, com um rendimento de 11,84%. Esse segundo método de preparação de k-caseína, descrito por YAGUCHI et al (10), ofereceu meios de isolar k-caseína pura a partir de caseína inteira em apenas uma etapa. É particularmente desejável preparar-se k-caseína pura a partir de pequenas quantidades de caseína inteira. Como procedimento de pu-

FIGURA 2 - FLUXOGRAMA DE OBTENÇÃO DE K-CASEÍNA



rificação, a filtração em gel Sephadex é preferível à cromatografia em DEAE-celulose (2, 3 e 8), ou precipitação por etanol (6, 9, 13). A separação de k-caseína a partir de outros materiais caseinosos é mais completa com Sephadex G-150 do que com coluna de DEAE-celulose (10).

#### 4 CONCLUSÃO

A k-caseína obtida pelos dois métodos apresentou resultados eletroforéticos praticamente iguais, sendo que o método do gel Sephadex oferece maiores vantagens, quando se deseja obter k-caseína a partir de pequenas quantidades de caseína e de custo de obtenção menor, uma vez que a coluna de gel Sephadex pode ser usada várias vezes sem re-empacotamento.

#### Abstract

This work aims to compare the obtention of k-casein as to its purity, yielding and obtention rate. It was concluded that casein fractioning with urea separates k-casein with a high degree of purity. Both methods showed practically identical eletrophoretic results, while the Sephadex filtration method gives some advantages.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 ALAIS, C. Ciência de la leche. México, D.F. : Continental, 1971. p. 90.
- 02 HILL, R.D. The preparation of k-casein. J.Dairy Res., v. 30, p. 101-107, 1963.
- 03 HILL, R.D., HANSEN, R.R. The effect of preparative conditions on the composition of the k-casein complex. J. Dairy Res., v. 30, p. 375-382, 1963.
- 04 HIPP, N.J., GROVES, M.L., CUSTER, J.H., MC MEEKIN, T.L. Separation of y-casein. J.Am.Chem.Soc., v. 72, p. 4928-4931, 1950.
- 05 LINDERSTRONG-LANG, K. Studies on casein. II. Is casein a homogeneous substance? Compt.Rend.Trav.Lab.Carlsburg Ser. Chim., v. 16, n. 1, p. 48-63, 1925.
- 06 MC KENZIE, H.A., WAKE, R.G. An improved method for the isolation of k-casein. Biochem.Biophys.Acta, v. 47, p. 240-242, 1961.
- 07 MELLANDER, O. Elektrophoretische untersuchung von casein. Biochem. Z., v. 300, p. 240-245, 1939.
- 08 MICKESEN, R., FISH, N.L. Comparing proteolytic action of milk-clotting enzymes on caseins and cheese. J.Dairy Sci., v. 53, n. 6, p. 704-709, 1970.
- 09 NOBLE JR., R.W., WAUGH, F.D. Casein micelles: formation and structure. J.Am.Chem.Soc., v. 87, n. 10, p. 2236-2255, 1965.

- 10 YAGUCHI, M., DAVIES, T.D., KIM, Y.K. Preparation of k-casein by gel filtration. *J.Dairy Sci.*, v. 51, n. 4, p. 473-477, 1958.
- 11 WAUGHT, D.F., VON HIPPEL, H.P. K-casein and the stabilization of casein micelles. *J.Am.Chem.Soc.*, v. 78, p. 4576-4582, 1956.
- 12 ZITTLE, C.A. Produce for isolation of k-casein by use of sulfuric acid. *J.Dairy Sci.*, v. 45, n. 5, p. 650, 1962.
- 13 ZITTLE, C.A. Purification and some of the properties of  $\alpha$ -casein and k-casein. *J.Dairy Sci.*, v. 46, n. 11, p. 1183-1188, 1963.