

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

Contribuição ao estudo da ação das
enzimas coagulantes sobre a caseína
ácida e suas frações α , β e K.

Honório Domingos Benedet

Orientador

Prof.Dr. Yong Kun Park

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

-1980-

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais, que me mostraram o
caminho do futuro.

A minha esposa e ao meu filho, pela
compreensão, estímulo e amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. *Yong Kun Park* pela sua valiosa orientação na preparação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. *Andrê Tosello*, Diretor da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas.

Ao Professor *Hêlcio João Moreira da Silveira*, Chefe do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Ao Prof. Dr. *Fumio Yokoya*, Coordenador dos Cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas.

Ao pessoal técnico do laboratório de Bioquímica de Alimentos e a todos os demais que colaboraram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

Í N D I C E

	pag.
RESUMO	i
SUMMARY	iii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
3. MATERIAIS	19
3.1. Amostras utilizadas	19
3.2. Reagentes	19
3.3. Equipamentos	19
4. MÉTODOS	21
4.1. Obtenção das enzimas	21
4.1.1. Renina	21
4.1.2. Enzima do <i>Mucor miehei</i>	21
4.1.3. Determinação da atividade das enzimas	22
4.2. Obtenção das caseínas	23
4.2.1. Obtenção da caseína ácida	23
4.2.2. Obtenção da α e β -caseína	24
4.2.3. Obtenção da K-caseína	25
4.2.3.1. Por fracionamento com uréia	25
4.2.3.2. Filtração em gel Sephadex	26
4.3. Tratamento das frações de caseína purificadas com as enzimas coagulantes	27
4.4. Diferenciação de enzimas coagulantes em meio gel de agar-caseína	28
4.4.1. Preparo do meio	28
4.5. Eletroforese em gel de Dodecil sulfato de sódio (SDS)/poliacrilamida	29
4.6. Estudo da ação das enzimas coagulantes sobre a k-caseína	30
4.6.1. Preparo das frações de K-caseína e incubação com a enzima	30

	pag.
5. RESULTADOS	32
5.1. Obtenção das enzimas	32
5.1.1. Renina	32
5.1.2. Enzima do <i>Mucor miehei</i>	32
5.1.3. Enzima da <i>Endothia parasitica</i>	32
5.2. Obtenção das caseínas	32
5.2.1. Obtenção da caseína ácida	32
5.2.2. Obtenção da α e β -caseínas	32
5.2.3. Obtenção da K-caseína	33
5.2.3.1. Fracionamento com uréia	33
5.2.3.2. Filtração em gel Sephadex	33
5.3. Tratamento das frações de caseína purificadas com as enzimas coagulantes	33
5.4. Diferenciação das enzimas coagulantes em meio gel de agar-caseína	34
5.5. Eletroforese em gel de Dodecil sulfato de sódio (SDS)/poliacrilamida	34
5.6. Estudo da ação das enzimas coagulantes sobre K-caseína tratada a diversas temperaturas	34
6. DISCUSSÃO	35
6.1. Obtenção das enzimas	35
6.2. Obtenção das caseínas	35
6.2.1. Obtenção da caseína ácida	35
6.2.2. Obtenção da α e β -caseína	36
6.3. Tratamento das frações de caseína purificada com as enzimas coagulantes	36
6.4. Diferenciação das enzimas coagulantes em meio gel de agar-caseína	37
6.5. Eletroforese em gel de SDS/poliacrilamida	38
6.5.1. K-caseína	38
6.5.2. α -caseína	39
6.5.3. β -caseína	39

6.6.	Estudo da ação das enzimas coagulantes sobre a K-caseína tratada a diversas temperaturas	39
7.	CONCLUSÕES	55
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

ÍNDICE DE FIGURAS

	pag.
FIGURA 1 - Fluxograma de obtenção da caseína ácida	41
FIGURA 2 - Fluxograma de obtenção da α -caseína	42
FIGURA 3 - Fluxograma de obtenção da β -caseína	43
FIGURA 4 - Fluxograma da obtenção da K-caseína	44
FIGURA 5 - Eletroforese em gel de SDS/policarilamida da caseína ácida, K-caseína, β -caseína e α -caseína	45
FIGURA 6 - Aumento da absorbância a 280 nm em função do aumento da concentração de proteína em cada fração eluída	46
FIGURA 7 - Ação das enzimas coagulantes em meio gel de agar-caseína	47
FIGURA 8 - Eletroforese em gel de SDS/poliacrilamida da K-caseína incubadas com as enzimas coagulantes	48
FIGURA 9 - Eletroforese em gel de SDS/poliacrilamida da α -caseína incubada com as enzimas coagulantes	49
FIGURA 10 - Eletroforese em gel SDS/poliacrilamida da β -caseína incubada com as enzimas coagulantes	50
FIGURA 11 - Pesos moleculares das bandas de proteína da K-caseína incubada com as enzimas coagulantes e submetida a eletroforese em gel de SDS/poliacrilamida	51
FIGURA 12 - Pesos moleculares das bandas de proteínas da α -caseína incubada com as enzimas coagulantes e submetida a eletroforese em gel de SDS/poliacrilamida	52

FIGURA 13 - Pesos moleculares das bandas de proteína da α -caseína incubada com as enzimas coagulantes e submetida a eletroforese em gel de SDS/poliacrilamida 53

FIGURA 14 - Eletroforese em gel SDS/poliacrilamida - da K-caseína tratada a diversas temperaturas e incubada com enzima do *Mucor miehei*. 54

RESUMO

As enzimas coagulantes do *Mucor miehei*, *Endothia parasitica* e renina foram estudadas para determinarmos se havia ou não diferenças de ação sobre a caseína ácida e suas frações α , β e K.

Através da diferenciação de enzimas coagulantes em meio gel de agar-caseína, as três apresentaram zonas de difusão bastante diferentes, mostrando, portanto, que suas características físicas são diferentes.

Após incubação das mesmas com o substrato, observamos visualmente que a caseína ácida e suas frações α e β , aparentemente não sofreram alterações, enquanto que a fração K apresentou -floculação bastante intensa com todas as enzimas, deduzindo-se que, aparentemente, tenham as mesmas características.

A caseína ácida e suas frações α , β e K, após o tratamento referido no parágrafo anterior, foram liofilizadas e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de íons dodecil sulfato de sódio (SDS) e mercaptoetanol, mostrando-nos que as bandas de proteína da fração K, de peso molecular entre 17.000 e 30.000, foram hidrolisadas pelas três enzimas em bandas de peso molecular 8.000 e 14.000. No caso da fração α , a banda de proteína de peso molecular 34.000 foi hidrolisada por todas as enzimas em bandas de peso molecular 29.000. A enzima da *Endothia parasitica* hidrolisou também as bandas de

proteína de peso molecular 16.000, 22.000 e as situadas entre 34.000 e 91.000, inclusive. Quanto à fração β , nenhuma das enzimas a hidrolisou.

A fração K, após tratamento a diversas temperaturas, incubada com a enzima coagulante do *Mucor miehei*, foi submetida a eletroforese como citado anteriormente, apresentando diferenças em relação à fração K não aquecida, ou seja, observamos que a não aquecida foi hidrolisada, enquanto que a aquecida, praticamente nada sofreu, concluindo-se que a mesma tenha sido desnaturada.

SUMMARY

Calf rennin and coagulating enzymes from *Mucor miehei* and *Endothia parasitica* were used in tests to compare their actions upon acid casein and its fractions α , β and K.

The three coagulating enzymes showed distinct diffusion bands in casein-agar gel which indicated that they have different physical properties.

Incubation of whole acid casein and its fractions α , β and K with the three different coagulating enzymes showed that only with the K fraction was there an intense flocculation and this occurs similiary with all three enzymes. After the incubation the treated protein preparations were lyophilized and submitted to gel electrophoresis in poliacrylamide in the presence of sodium dodecyl sulfate and mercaptoethanol. The results indicated that the K fraction of molecular weight from 17,000 to 30,000 was hydrolyzed by the three coagulating enzymes giving rise to bands of molecular weight of 8,000 and 14,000. In the case of the α fraction, all the three enzymes hydrolyzed the 34,000 molecular weight bands to 29,000 molecular weight bands. Furthermore, the enzyme from *Endothia parasitica* also hydrolyzed the bands of molecular weight of 16,000 and 22,000 and the ones from 34,000 to 91,000. None of the coagulating enzymes hydrolyzed the β fraction.

In the experiment to check the effect of heating upon the K fraction before being treated by the coagulating enzyme from

Mucor miehei, it was found that, after heating, the hydrolysis did not occur, suggesting that denaturation of the K fraction protein inhibited the enzyme action.

1. INTRODUÇÃO

Abordamos, aqui, um assunto que, certamente, não é dos mais importantes, mas que emergiu nesses últimos anos e ainda é objeto de debates: o coalho para caseificação. Este, que juntamente com enzimas tradicionais foi usado desde os tempos remotos da nossa pré-história, tende agora a ficar cada vez mais escasso, mais caro e de baixa qualidade.

Este fenômeno pode ser devido ao aumento da produção de queijo, que exigiu maior quantidade de coagulante, bem como à maior demanda de carne, o que diminuiu, sensivelmente, o abate de vitelos, em cujos quartos estômagos a renina prevalece sobre outras enzimas.

Enzimas coagulantes são muito difundidas entre os seres vivos e são encontradas no mundo animal, vegetal e, sobretudo, no mundo dos micróbios, seja de bactérias ou de mofos, onde foram isolados há poucos anos, coagulantes propostos como substitutos do coalho de vitelo, no momento em que este está se tornando de difícil aquisição.

Muitos foram os microrganismos que forneceram resultados positivos, porém, somente de três deles conseguiu-se obter produtos comerciais já disponíveis no mercado: *Mucor pusillus*, *Mucor miehei* e *Endothia parasitica*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A caseína foi por muito tempo, considerada uma proteína pura, porém, a partir dos estudos de Linderstrong-Lang (28) em 1925, esse conceito teve de ser modificado.

As investigações de Melander (33) em 1939, também demonstraram que a caseína era composta de, no mínimo, três componentes que designou como α , β e γ -caseína, de acordo com a ordem decrescente de suas mobilidades.

Em 1944, Warner (52), descobriu o primeiro método químico para separar α e β -caseína porém, esse método dependia das diferenças de solubilidade das duas frações em água a pH 4,4 e temperatura de 2°C. Além disso, requeria repetidas precipitações a partir de soluções diluídas, tornando-se tedioso quando grandes quantidades desses componentes eram desejadas.

Em 1950, Hipp et al (21), descreveram um método de separação da γ -caseína, baseado na sua solubilidade em álcool a 50%.

Hipp et al (22), 1952, descreveram dois métodos para a separação dos componentes eletroforéticos da caseína. No primeiro, a separação foi acompanhada por precipitação em solução alcoólica a 50%, por meio de variações de temperatura, pH e força iônica e, o segundo, baseado na solubilidade dos componentes da caseína em solução aquosa de uréia. Esse método é relativamente simples e fornece produtos com a mesma composição e propriedades daqueles obtidos por pH e solução alcoólica a 50%.

Waugh e Von Hippel (54) em 1956, descobriram que a micela de caseína era composta de caseinato de cálcio, β -caseína e um complexo de α e K-caseína, sendo que a K-caseína era o fator mais importante, responsável pela estabilização da micela e da proteína sobre a qual a renina atuava imediatamente. As porcentagens relativas relatadas por eles, foram cerca de 55% de α -caseína, 30% de β -caseína e 15% de K-caseína.

Em 1958, Tessier e Dyson Rose (50), descobriram que o leite continha cerca de 2,5 a 3,4 mM de cálcio por litro. Descobriram também, que a adição de cálcio ao leite precipitava tanto o fosfato como o citrato, porém, aumentava o cálcio iônico. Outro fato por eles descrito, foi que o aquecimento do leite desnatado causava a precipitação do fosfato de cálcio e diminuía o cálcio iônico. Já a concentração do leite causava também a precipitação do fosfato de cálcio porém, aumentava o cálcio iônico.

Yaguchi et al (56), em 1958, descreveram um procedimento para a separação de K-caseína pura por filtração em gel Sephadex, onde a caseína inteira era filtrada através de uma coluna de gel Sephadex G-150, equilibrada com tampão citrato 0,005 M, pH 8,6, contendo 6,0 M de uréia.

Zittle et al (63), em 1959, descreveram uma modificação relativamente simples do método de fracionamento da caseína por solução de uréia, para se obter α -caseína sensível ao cálcio. A porcentagem obtida foi de 40% do total da α -caseína.

Ainda em 1959, Warren (53), desenvolveu um ensaio colorimétrico para o ácido siálico, onde o mesmo era oxidado com periodato de sódio em ácido fosfórico concentrado. O produto da oxidação era adicionado ao ácido tiobarbitúrico e o cromóforo resultante era extraído com ciclo-hexano. Segundo o autor, esse ensaio é reproduzível, sensível e consideravelmente mais específico que outros métodos e permite análises acuradas para o ácido siálico diretamente em hidrolisados de tecidos.

Em 1961, Mc Kenzie e Wake (30), descreveram um método melhorado para o isolamento da K-caseína, onde o material de partida era a caseína ácida. Segundo os mesmos autores, a K-caseína tem sido caracterizada por velocidade de sedimentação, solubilidade ao cálcio e renina e por eletroforese de zona em uréia concentrada.

Em 1961, Zittle (60), investigando várias preparações de K-caseína submetidas ao calor, descobriu que algumas eram termo-estáveis e que, depois do aquecimento, tinham ainda a habilidade de estabilizar a α -caseína sensível ao cálcio, enquanto que outras eram termo-láveis. As últimas eram adequadas estabilizadoras antes do aquecimento, porém, depois perdiam parte ou toda essa propriedade. A explicação dessa diferença após o efeito do aquecimento ainda não foi evidenciada.

Hill e Hansen (20), em 1963, estudaram os efeitos de mudanças nas condições de preparação do complexo de K-caseína e um método de separação foi sugerido, reunindo todas as condições ótimas. As várias condições incluíram temperatura de precipitação

da caseína ácida, pH, temperatura, concentração de cloreto de cálcio, duração do tratamento com cloreto de cálcio e condições de centrifugação.

Ainda em 1963, Hill (19), descreveu um método de preparação da K-caseína e sua purificação por cromatografia em DEAE-celulose, onde as condições de preparação foram escolhidas de maneira a evitar alterações drásticas na K-caseína e permitir o isolamento em forma relativamente pura de, pelo menos, a metade da quantidade teoricamente possível.

Segundo Zittle e Walter (62), 1963, a β -caseína foi precipitada em 80% por 10 mM de cloreto de sódio a 30°C. A K-caseína, a razão de 0,15 K/ α -caseína previniu, completamente, a precipitação. Essa estabilização pela K-caseína dependeu também do pH e, principalmente, da concentração de β -caseína, sendo que a efetividade máxima da K-caseína foi em pH 7,0.

Marier et al (29), em 1963, examinaram o conteúdo de ácido siálico do leite em pó desnatado, usando uma modificação do método do ácido tio-barbitúrico de Warren. Segundo os autores, a lactose interferiu no método.

Segundo Neelen (37), 1964, a adição de pequenas concentrações de cistina ou mercaptoetanol à solução concentrada de uréia para a eletroforese de zona em gel de amido, melhorou, marcadamente, a resolução das zonas de K-caseína, tanto da caseína ácida, como em várias preparações de K-caseína. Essa resolução demonstrou variações da K-caseína em leites individuais.

Em 1965, Purkayastha e Dyson Rose (42), informaram que a eletroforese em gel de poliacrilamida da K-caseína em presença de mercaptoetanol e uréia, apresentou, no mínimo, três bandas na região da K-caseína. O tratamento da K-caseína com a enzima - neuraminidase, que remove seletivamente o ácido siálico, poderia reduzir sua contribuição e, conseqüentemente, sua mobilidade, porém, experimentos preliminares indicaram que apenas uma das zonas da K-caseína foi afetada por esse tratamento. Essa observação, aliada a outras considerações, sugere que a mobilidade do ácido siálico da K-caseína estaria contido apenas em uma das zonas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida.

Noble Jr. e Vaugh (39), em 1965, estudaram as interações ocorridas antes e durante a formação da micela, usando uma variedade de misturas de α e K-caseína ou leite em pó solubilizado. - Em ausência de cálcio, a pH 7,0 e 2°C a α e K-caseínas mostraram pequena ou nenhuma tendência a interagir. Os produtos da interação não se desenvolveram depois do tratamento com uréia ou álcali.

Ainda em 1965, segundo Delfour et al (9), quando a renina reagiu com caseína a pH 6,8, a para-caseína precipitou em presença de cálcio e, sem cálcio, no caso da K-caseína. Segundo os autores, o sobrenadante continha, principalmente, um caseíno - glicopeptídeo solúvel em ácido tricloracético a 12% e não dialisável.

De acordo com Paterson e Kopfler (41), 1966, se a eletroforese for conduzida em tampão ácido fórmico/ácido acético a pH 3,0, as 4 β -caseínas podem ser separadas da mistura.

Segundo Shapiro et al (46), 1967, a eletroforese em gel de poli-acrilamida, em presença do detergente aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS), tem provado ser um ótimo instrumento para a separação e identificação de cadeias polipeptídicas. Esta mesma técnica, segundo os autores, pode ser usada para a rápida e simples estimação do peso molecular das proteínas e suas sub-unidades.

De acordo com Yaguchi e Tarassuk (57), 1967, os componentes da caseína são agregados a pH neutro e temperatura ambiente e tendem a formar vários complexos com outros componentes. Esses agregados e complexos são dissociados em pequenas unidades, provavelmente em monômeros, em certas condições, como a presença de uréia, extremos de pH e baixas temperaturas.

Em 1968, El Negoumy (11), investigou através de eletroforese em gel de amido de alta resolução, a fase primária e secundária da ação da renina sobre a caseína e K-caseína. Verificou que a K-caseína foi o único componente da caseína inteira, atacada durante 50 minutos de ação da enzima, resultando num componente maior e dois menores com a mobilidade maior que a da α -caseína e dois menores com mobilidades menores que a da K-caseína. Nenhuma mudança eletroforética específica acompanhou o coágulo caracterizando a fase secundária da renina sobre a caseína.

Ashworth (2), em 1968, trabalhando com solução pura de K-caseína em concentrações menores do que 0,1%, produziu turbidez mensurável em tampão acetato em presença de soluções diluídas de renina a pH 5,8 e a 30°C. Em mistura de α -caseína e K-caseína, o aumento da turbidez depois de 5 minutos foi proporcional à porcentagem de K-caseína na mistura. A turbidez da α -caseína pura não foi afetada pela adição de renina. Aumentos variáveis na turbidez, depois da ação da renina em β -caseína purificada, foram devidos à dificuldade de separação da K-caseína da β -caseína. A caseína inteira reage mais vagarosamente do que a K-caseína.

Melachouris e Tukey (32), em 1968, investigaram e compararam as propriedades coagulantes da enzima de uma cultura de *Bacillus cereus* com a renina de estômago. A atividade da enzima microbiana foi menos sensível a mudanças de pH do que a renina. Distribuição de nitrogênio, eletroforese e placas de agar contendo caseína foram usadas para determinar a ação proteolítica das duas enzimas. A enzima microbiana foi mais proteolítica do que a renina e exibiu uma ação proteolítica sobre a K-caseína similar à obtida pela renina. Outras frações foram degradadas continuamente e não especificamente, mas a β -caseína foi a fração mais suscetível à hidrólise.

Ainda em 1968, Hagemeyer et al (17), purificaram a protease do fungo *Endothia parasitica* por dois métodos, sendo que o primeiro envolveu fracionamento por sulfato de amônia, filtração em gel Sephadex G-100 e duas vezes cromatografia em DEAE-celulose a pH 4,6. O segundo método envolveu fracionamento

por sulfato de amônia, acetona, tratamento com carvão ativo, filtração em gel Sephadex G-100 e cristalização a partir de uma solução água/isopropanol. O pH isoelétrico foi abaixo de 4,6.

Segundo Ledford e Chen (27), em 1968, o extrato da enzima renina parece degradar preferivelmente a α -caseína. A β -caseína, evidentemente, é mais resistente à proteólise. Os resultados obtidos sugerem que o sucesso dos substitutos da renina precisam ter a delicada e diferente característica proteolítica da renina.

De acordo com Hansen (18), 1969, o colóide hidrofílico carrageenan estabiliza a α -caseína contra a precipitação pelos íons cálcio, por uma interação entre a α -caseína e um componente talvez presente tanto na K-caseína como no delta-carrageenan. Esse componente ocorre, predominantemente, na fração K. O complexo resultante é semelhante ao complexo da α -caseína, porém, não é atacado pela renina. A estabilidade ao calor do complexo cálcio/carrageenan/ α -caseína é maior do que o correspondente complexo cálcio/K-caseína/ α -caseína.

Rose et al (45), em 1969, realizaram uma determinação quantitativa das caseínas α , β e K contidas nas amostras de caseína inteira através de cromatografia em DEAE-celulose em presença de uréia. A resolução das caseínas não foi completa, porém, reproduzível até 3% de erro e a acuidade estimada do método foi de mais ou menos 5%. Em contraste aos métodos baseados na determinação do conteúdo em ácido siálico ou por turbidez,

o cromatográfico é aplicável a misturas de caseínas de larga e variada composição e não é afetado pela variação da quantidade de carboidratos da molécula de K-caseína ou pela presença de componentes como a gama-caseína e caseínas mais sensíveis à temperatura.

Segundo Zittle (58), 1969, uma solução aquosa de K-caseína a pH 7,0 não é afetada por aquecimento (100°C por 15 minutos). - Se, todavia, cloreto de sódio 0,05M ou outros sais estiverem presentes, a K-caseína torna-se lábil ao calor, julgamento feito pela perda da habilidade de estabilizar a α -caseína contra a precipitação pelo cálcio.

De acordo com Ilany e Netzer (23), 1969), muitas enzimas proteolíticas coagulam o leite mas, em muitos casos, o queijo formado não é estável, já que o coágulo é completamente digerido - por contínua proteólise. A renina é distinguida pela ação proteolítica praticamente limitada que tem sobre o queijo. As seguintes enzimas e preparações enzimáticas foram comparativamente estudadas em relação à coagulação do leite e suas atividades proteolíticas: renina, pepsina, tripsina, pancreatina, quimotripsina, papaína, fiscina e bromelina. Estes estudos permitiram aos autores preparar reninas vegetais substitutas para o processamento de queijo cheddar, que depois de curado apresentou sabor e textura comparáveis aos fabricados com renina comercial.

Em 1969, Melachouris (31) descreveu um sistema horizontal e descontínuo de eletroforese em gel para a separação de proteí-

nas. O método foi usado para análise de proteínas com propriedades marcadamente diferentes (proteínas de soro de leite, caseína e enzimas coagulantes). A separação foi bem maior por esse método do que pela técnica contínua em gel de poliacrilamida.

Weber e Osborn (55) em 1969 estudaram, por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio, quarenta proteínas com cadeias polipeptídicas e pesos moleculares bem caracterizados, seguindo o procedimento de Shapiro et al. Os resultados mostraram que o método pode ser usado com grande segurança para determinar o peso molecular de cadeias polipeptídicas de grande variedade de proteínas.

Segundo Larson e Whitaker (15), 1970, a protease da *Endothia pa*rasítica teve sua estabilidade máxima a pHs entre 3,8 e 4,5. Aquecida a 50°C, apenas 30% da atividade foi perdida depois de 30 minutos. A 24,1°C, a enzima manteve-se estável num pH entre 3,0 e 6,5 por três horas, porém, foi inativada rapidamente a pH abaixo de 2,5 e acima de 7,0. Foi rapidamente desnaturada por baixas concentrações de uréia (2 M) a pH 2,5 e 6,5, mas permaneceu razoavelmente estável a uma concentração de 2 M de uréia a pH 3,5. Nenhum efeito foi notado na estabilidade da enzima em uma solução de mercaptoetanol a pHs 2,5; 3,5 e 6,5.

Ainda em 1970, Richardson e Chaudhari (44), prepararam extrato de enzima ativada dos tecidos do quarto estômago de bovinos adultos, contendo de 5 a 15% de atividade coagulante atribuída-

ã pepsina. A eletroforese em gel de amido, uréia e mercaptoetanol, revelou diferentes bandas em relação ao extrato de renina de vitelo. Também foram detectadas diferenças em difusão - em meio gel de agar-caseína a pH 6,8.

Mickelsen e Fish (34) em 1970, estudaram as propriedades proteolíticas das enzimas fúngicas da *Endothia parasitica* e *Mucor pusillus*, variedade Lindt, comparando-as com as de vitelo e pepsina. Os compostos nitrogenados solúveis em 12% de ácido tricloracético, produzidos pela ação dessas enzimas sobre a caseína e suas frações α e β e sobre queijo fresco, foram determinadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. As reninas fúngicas mostraram maior atividade proteolítica sobre a caseína e suas frações α e β , do que a renina de vitelo e pepsina. Das duas reninas fúngicas, a da *Endothia parasitica* teve maior ação proteolítica sobre as preparações de caseína. As bandas eletroforéticas mostraram diferenças consideráveis entre as enzimas no tocante à degradação de proteínas específicas do leite.

Morr (35), em 1971, preparou por eletroforese de zona, tanto em gel de amido como em gel de poliacrilamida, produtos de degradação da caseína em cinco variedades de queijo variando em idade de 1 dia a 13 meses, por solubilização em oxalato, extração por hexano e dispersão direta em tampão alcalino de uréia. Não foram observadas diferenças significativas nas amostras submetidas a eletroforese, relacionadas com o método de preparação da proteína e, portanto, o procedimento da dispersão direta foi recomendado. Eletroforese em gel de amido e po

poliacrilamida apresentou um número e localização das bandas de proteínas para diferentes variedades, sendo que as zonas em gel de amido foram mais simétricas e melhor definidas. A eletroforese em gel de amido promoveu uma melhor separação de zonas de K-caseína do que a poliacrilamida e também permitiu um exame simultâneo de produtos de degradação catiônica da caseína.

Segundo Bingham (5), 1971, tanto a temperatura quanto o pH afetam a solubilidade da K-caseína e β -caseína na região dos seus pontos isoelétricos. Esta investigação cobriu uma faixa de 5 a 25°C e 3,9 a 5,2 de temperatura e pH, respectivamente. De pH 4,7 a 5,2 a K-caseína tornou-se mais solúvel quando a temperatura decaiu. Todavia, a temperatura não teve influência na solubilidade da K-caseína em pHs entre 3,9 e 4,6. A solubilidade da β -caseína aumentou com o acréscimo da temperatura dentro da faixa de pH 3,9 a 5,2. O aumento da solubilidade da β -caseína foi bastante grande entre 5 e 15°C. A solubilidade da α -caseína foi afetada em menor extensão pela temperatura. A solubilidade da α -caseína foi bem maior a 5°C do que a 25°C a valores de pH abaixo de 4,0 e acima de 5,0.

De acordo com Trop e Pinski (51), 1971, a enzima coagulante de leite do *Mucor pusillus*, comparada à renina crua de vitelo, foi estimulada simultaneamente por alumínio, ferro, cálcio e íons magnésio. Os íons trivalentes foram mais efetivos que os bivalentes. As baixas concentrações de íons, a adição de enzima do *Mucor pusillus* à renina, aumentaram muito a atividade desta última, comparada a preparações em separado. Todavia, -

um sistema enzimático parece ser sinergista do outro, sugerindo dois mecanismos separados de coagulação.

Ainda em 1971, Sternberg (48), separou uma protease em forma cristalizada a partir de filtrados de *Mucor miehei*. Segundo o autor, este é o componente mais proteolítico produzido por microrganismos e tem um peso molecular de 34.000 a 39.000. O pH ótimo para a proteólise da hemoglobina, caseína e albumina de soro bovino, classificou a enzima como uma protease ácida. A enzima foi mais estável em pH ácido e o efeito de inibidores, indicou que esta enzima não é dependente de metal e não possui serina ou grupos ativos SH. O sulfato de alumínio tem uma ação depressiva peculiar na atividade coagulante e estudos do mecanismo têm eliminado semelhanças entre essa enzima e a renina de vitelo.

Em 1972, Tam e Whitaker (49), determinaram as taxas de hidrólise e sua extensão, após 1,44 minutos de reação da caseína inteira, α , β e K-caseína com renina cristalizada, pepsina cristalizada, protease do *Mucor pusillus* e *Endothia parasitica* a pH 3,0; 3,5; 5,5 e 6,0. A protease da *Endothia parasitica* teve, geralmente, maior atividade do que as outras três enzimas em todos os substratos e em todos os pHs.

Shouvers e Fossun (47), em 1972 desenvolveram um sistema de eletroforese em gel de poliacrilamida para separar coagulantes comerciais e misturas de coagulantes. As bandas eletroforéticas das amostras foram tornadas visíveis derramando-se leite sobre os pedaços de gel de poliacrilamida. As áreas onde ha-

via atividade coagulante, exibiam zonas de leite coagulado, - que eram imediatamente visualizadas. O sistema também foi sen- sível para separar e tornar visível uma pequena quantidade de até 5% de uma mistura de coagulantes de diferentes velocidades de migração.

Mullin e Wolfe (36), em 1974 trataram o caseinato de cálcio, α -caseína, β -caseína e K-caseína purificadas com lisosima, β -glicosidase, renina e tripsina. A renina precipitou o casei- nato de cálcio e a K-caseína, enquanto que o tratamento com - tripsina resultou numa solução clara no caso do caseinato de cálcio, coagulou a K-caseína e reduziu, significativamente, a turbidez da solução de β -caseína. A eletroforese de disco e, gel de dodecil sulfato de sódio, revelou mudanças na α -caseína e β -caseína depois do tratamento com renina, porém, depois do tratamento com lisosima, não houve mudanças significativas em nenhum caso.

Em 1975, Cheryan et al (7), usaram enzimas imobilizadas como - instrumento para estudar a fase secundária à parte da fase en- zimática da coagulação do leite. O leite desnatado, depois de passar através de uma ponte de pepsina ou renina em vidro poro- so, foi submetido a mudanças de pH, temperatura e diluição e seus efeitos foram estudados na taxa de coagulação. A fase se- cundária exibiu um alto coeficiente de temperatura de 11 a 12, entre 20 a 50°C, decrescendo o tempo de coagulação, enquanto o pH desta fase era baixado de 6,7 para 5,6. Quando o leite des- natado era adicionado em quantidade crescente ao efluente do

leite tratado anteriormente ensaiado, a mistura resultante coagulou em tempo proporcional, indicando que nem toda a K-caseína tem que ser enzimaticamente atacada para haver a coagulação, mas apenas a quantidade necessária para haver agregação das micelas.

Em 1976, Neelin et al (38), compararam preparações de α , β , λ e K-caseína por eletroforese em gel de amido e em solução livre, sendo que a caseína ácida foi separada em 17 zonas. Todas as frações da caseína continham numerosas proteínas, porém, o procedimento de preparação trouxe algum enriquecimento considerável de certas zonas. Outras enfraqueceram e outras ainda, foram eliminadas mas, ainda assim, foi possível identificar as zonas específicas de cada fração de caseína.

Ainda em 1976, Kotts e Jenness (24), isolaram K-caseína a partir de leite de vaca, cabra, cavalo, rato e coelho. Quando - tratadas com renina, todas as K-caseínas isoladas aumentaram - as bandas de para-K-caseína na eletroforese em gel. A taxa de clivagem deste componente pela renina foi determinada pela medida do material solúvel em ácido tricloracético. As curvas foram características de um ataque limitado e específico da renina sobre estas proteínas.

Segundo Green e Pastewka (16), 1976, a caseína do leite de rato é uma fosfoproteína que precipita a pH 4,6. Quatro caseínas foram separadas eletroforeticamente em gel de dodecil sulfato de sódio/poliacrilamida, variando de 8,5 a 15% a concentração de poliacrilamida. O peso molecular de três dessas proteí

nas foram 43.200, 27.700 e 25.900. O peso molecular determinado para a α -caseína e β -caseína bovina, por esse método, foi similar a outros obtidos por outros métodos. A quarta caseína continha carboidrato, fósforo e ácido siálico. Esta proteína foi sensível à renina e comportou-se anormalmente na eletroforese em dodecil sulfato de sódio/poliacrilamida, como a K-caseína bovina ela foi designada K-caseína do leite de rato.

Em 1977, El Shibiny e ABC El Salan (12), isolaram a α -caseína do leite de búfalo e de vaca e hidrolisaram com renina, pepsina bovina e proteases microbianas do *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* e *Endothia parasítica*. A taxa de hidrólise foi seguida pela determinação da α -caseína inalterada no digerido depois da eletroforese em gel de poliacrilamida. A taxa de hidrólise da α -caseína das duas espécies com as diferentes enzimas, foi comparável talvez, um pouco mais rápida com as enzimas microbianas particularmente a da *Endothia parasítica*. Todavia, as bandas eletroforéticas dos produtos da degradação da α -caseína de búfalo e de vaca produzidos pelas enzimas não foram idênticas.

Segundo Girdhar e Hansen (15), 1978), as diferentes solubilidades das frações de caseína em soluções de cloreto de cálcio foram usadas como base para separar K-caseína solúvel em cálcio - das outras frações insolúveis. A quantidade de proteína aumentou linearmente com o aumento de cálcio acima de 0,5 M. A temperatura de reação da caseína com o cálcio e a temperatura de extração para separar as partes solúveis foram encontradas com significativas variações, independente das variações na concen

tração de cálcio. A temperatura de reação de 5°C, forneceu preparações impuras devido à reorganização dos complexos da caseína, enquanto que a temperatura de reação de 60°C causou pesada contaminação, predominantemente com β -caseína.

Em 1979, Doi et al (10) investigaram a heterogeneidade e algumas das propriedades da K-caseína. Preparações independentes de K-caseína foram obtidas a partir do leite de uma única vaca pelo método modificado uréia/ácido sulfúrico e por filtração - em gel. As duas preparações foram fracionadas por cromatografia em DEAE-celulose na qual a fração eluída no front foi P₁, e cinco frações (P₂ a P₆) eluídas com concentrações crescentes de sal. A composição em aminoácidos das frações P₂ a P₆ foram idênticas, sendo que as frações eluídas com altas concentrações de sal continham mais carboidratos (ácido siálico, hexoses e hexosaminas). As frações P₂ a P₆ mostraram a mesma mobilidade na eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio/poliacrilamida e seu resíduo terminal carboxil foi a valina em todas as frações. Cada fração apresentou uma mobilidade diferente em eletroforese de disco contendo uréia, porém, as mobilidades de cresceram para a mesma fração que se moveu menos depois do tratamento com neuraminidase. A capacidade de estabilização da micela de cada fração foi similar. Em experimentos com ultracentrifugação, cada fração apresentou um pico e o coeficiente de sedimentação ficou entre 17,5 s e 12,5 s. A viscosidade intrínseca foi similar em várias temperaturas.

3. MATERIAIS

3.1. Amostras utilizadas

- a) leite integral de vaca holandesa da raça Holstein, não pasteurizado, utilizado logo após a ordenha;
- b) enzima da *Endothia parasitica*, obtida na Indústria Farmacêutica Pfizer em Guarulhos, Estado de São Paulo, já em estado purificado, com o nome de "Sure Curd";
- c) *Mucor miehei* e renina, que foram obtidos em laboratório.

3.2. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram do tipo analítico das marcas: Merck, Baker, Sigma, Ecibra, Teagen, Carlo Erba.

As soluções foram preparadas pelas formas usuais, sendo utilizadas vidrarias usuais de laboratório, tais como: tubos de ensaio, provetas, bekers, erlenmeyers, etc.

3.3 Equipamentos

Potenciômetro H-5 Horiba

Fotocolorímetro Spectronic 20, Baush & Lomb.

Liofilizador New Brunswick Scientific, Co. Inc. Model XB 60-50.

Banho-maria, Soc. Fabbe Ltda. Model L 69, com temperatura controlada.

Agitador, Rotary Shaker.

Centrífuga IEC UV-Damon/IEC Division, International Equipment Co.

Centrífuga refrigerada Beckman Model j-21 B.

Espectrofotômetro UV Perkin-Elmer, Coleman 124 D.

Outros equipamentos de uso comum em laboratório, como: ba
lança analítica, estufa, dessecador, etc.

4. MÉTODOS

4.1. Obtenção das enzimas.

4.1.1. Renina

Foi obtida segundo o método descrito por Berridge (4), - ou seja, a partir do quarto estômago de bezerros lactentes, o qual foi lavado com água fria, cortado em pequenos pedaços, colocado num erlenmayer e o pH acertado com HCl para 2,0. Em seguida, os pedaços foram triturados num liquidificador e a massa resultante deixada em banho-maria por 20 minutos. Depois de decorrido este tempo, centrifugou-se a 846 x g por 10 minutos e separou-se o sobrenadante, ao qual foi adicionado 70% do volume em álcool etílico, havendo a precipitação da enzima renina. Essa solução foi deixada em repouso por 24 horas a temperatura de 4°C para completa sedimentação, quando a maior parte do sobrenadante foi separado por decantação e a enzima separada por centrifugação a 11.140 x g por 10 minutos e seca a temperatura ambiente.

4.1.2. Enzima do *Mucor miehei*

Foi obtida por fermentação em meio semi-sólido de farelo de trigo durante 72 horas. Depois da fermentação, a enzima foi extraída em água destilada e posteriormente, filtrada. Ao filtrado foi adicionada 0,5 g de cloreto de sódio, mais 70% do volume em álcool etílico sempre com agitação, havendo a precipitação da enzima, a qual-

permaneceu em repouso por 24 horas para a completa sedimentação. A maior parte do sobrenadante foi retirada - por decantação e o restante, contendo a enzima precipitada, foi centrifugado a 11.140 x g por 10 minutos. O sobrenadante resultante da centrifugação foi separado - por decantação e o precipitado congelado a -18°C e liofilizado. Esse liofilizado foi dissolvido em 500 ml de água destilada e centrifugado a 11.140 x g durante 10 minutos. Ao sobrenadante recuperado foi adicionado, vagorosamente e com agitação constante, sulfato de amônio até obter-se uma solução a 80% de saturação. Esta solução foi deixada de repouso por 24 horas a temperatura de 4°C e, em seguida, centrifugado a 11.140 x g. O precipitado foi dissolvido em 20 ml de água destilada e dialisado contra água destilada durante 72 horas, sendo a água trocada quatro vezes e o dialisado guardado à temperatura de 4°C .

4.1.3. Determinação da atividade das enzimas

Foi determinada de acordo com o método de Soxhlet (48).

- a) Substrato: 10 g de leite em pó desnatado, marca Silhouette, fabricado por Produtos Fleischmann & Royal Ltda, em 100 ml de água destilada contendo 0,01 M de cloreto de cálcio.
- b) Solução de enzima: 0,5 mg/ml em água destilada.
- c) Procedimento: 5,0 ml da solução de leite (substrato) foram colocados em um tubo de ensaio e equilibrado à temperatura de 35°C por 15 minutos. Adicionou-se -

0,5 ml da solução de enzima e marcou-se o tempo de coagulação. Para o branco procedeu-se da mesma maneira, adicionando-se, porém, água em lugar da solução de enzima. O cálculo foi feito utilizando-se a fórmula seguinte:

$$\text{Unidade Soxhlet} = \frac{\text{ml de substrato}}{\text{Enzima (em mg)}} \times \frac{2.400}{\text{Tempo (em seg)}}$$

4.2. Obtenção das caseínas

Os fluxogramas de obtenção das caseínas estão apresentados nas Figuras 1, 2, 3 e 4.

4.2.1. Obtenção da caseína ácida

Foi obtida segundo o método de Hipp et al (21), a partir de um litro de leite fresco, não pasteurizado, centrifugado a 846 x g, com a finalidade de retirar a gordura. Ao leite desengordurado foi adicionado 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. O remanescente foi submetido a centrifugação a 846 x g, por 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante, enquanto que o precipitado foi dividido 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.

4.2.2. Obtenção da α e β -caseína

Foram obtidas pelo método de Hipp et al (22), ou seja, por fracionamento com solução de uréia como explicado a seguir: 1.500 g de caseína úmida foram dissolvidas pela adição de 1.500 g de uréia e água, totalizando um volume de 3,75 l, numa concentração final de 6,6 M de uréia. Para a obtenção da α -caseína, a solução foi aquecida a temperatura ambiente e 1,65 litros de água destilada foram adicionados lentamente com agitação constante, fazendo com que a solução de uréia baixasse sua concentração para 4,63 M. O precipitado formado nestas condições, apresentou alto teor de α -caseína que foi removida da solução por centrifugação. A α -caseína crua, foi purificada, re-dissolvida em 1.500 ml de uma solução de uréia 6,6 M, contendo 15,9 g de cloreto de sódio e novamente precipitada pela adição de 1.500 ml de água destilada. Mais impurezas foram removidas pela lavagem do precipitado com solução de uréia 4,7 M. Para remover traços de β -caseína, o produto foi novamente dissolvido em uréia e precipitado como anteriormente. A uréia foi removida pela lavagem do precipitado com excesso de água destilada. Em seguida, o precipitado foi congelado a -18°C , liofilizado e guardado em geladeira a 4°C .

A β -caseína foi obtida a partir da solução após a remoção do precipitado de α -caseína. Esse filtrado foi diluído a 3,3 M de uréia pela adição de água. A pequena

quantidade de precipitado obtida foi uma mistura de α e β -caseína, que aqui ocorrem como caseína infracionável. A mistura foi centrifugada e descartada. A porção solúvel em solução de uréia 3,3 M, foi diluída a uma solução 1,7 M e o pH ajustado para 4,7, pela adição de aproximadamente 20 ml de HCl 0,1 N, ocorrendo a precipitação da β -caseína. A mesma foi purificada por dissolução em 2 litros de solução de uréia 4,6 M e fracionada pela adição de água. Novamente a porção solúvel em 3,3 M de uréia, porém, insolúvel em 1,7 M de uréia, contém a β -caseína pura. Através da re-precipitação, conseguiu-se eliminar traços de α -caseína remanescentes.

4.2.3. Obtenção da K-caseína

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

4.2.3.1. Fracionamento com uréia

Foi obtida pelo método descrito por Zittle (59) e McKenzie e Wake (30), a partir de 750 g de caseína ácida úmida, que foi dissolvida em 2.000 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 duas horas e submetida a filtração. O filtrado foi dialisado por 48 horas contra água destilada. Ao dialisado foi adicionado o mesmo volume em etanol ab-

soluto, com agitação constante, seguido da adição de acetato de amônia 2,0 M em 50% de etanol (foram adicionados cerca de 3,5 ml), tomando-se bastante cuidado, pois um excesso de acetato de amônia redissolveria o precipitado. Depois de 30 minutos de agitação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 200 ml de etanol a 50% contendo 3,0 ml da solução de acetato de amônia e, em seguida, dissolvido 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 .

4.2.3.2. Filtração em gel Sephadex

Foi obtida de acordo com o método de Yaguchi (56).

a) 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 uma coluna de gel de 2,5 por 95 cm. A coluna foi consolidada pela passagem através da mesma, a uma pressão de 30 cm de

uma coluna de água de um volume de tampão TCU equivalente a, no mínimo, duas vezes o volume de gel contido na coluna.

- b) Preparo da amostra: A amostra de caseína (cerca de 2,0 g) a ser fracionada foi dissolvida em 35 ml de tampão TCU e centrifugada a $36.145 \times g$ 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 de 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 Perkin-Elmer, Coleman 124 D.

4.3. Tratamento das frações de caseína purificadas com as enzimas coagulantes

Pesou-se 6 porções de caseína ácida, α , β e K-caseína, sendo cada fração dissolvida em 4,0 ml de água destilada, adicionando-se NaOH 0,2 N até o pH atingir 11,0 e posterior abaixamento pela adição de HCl 0,2 N até pH 6,8, completando-se o volume para 5,0 ml com água destilada. Foram, então, colocadas em tubos de ensaio e deixadas em banho-ma-

ria a 35°C por 15 minutos. Após a estabilização da temperatura, juntou-se a cada tubo 1,0 ml da solução enzimática contendo 109 unidades Soxhlet por ml, sendo que nos controles, as enzimas foram previamente inativadas por aquecimento. A incubação prosseguiu por 30 minutos e, a seguir, foram transferidas para frascos de vidro de 20 ml de volume, bem limpos e, imediatamente, congeladas a -18°C e liofilizadas.

4.4. Diferenciação de enzimas coagulantes em meio gel de agar-caseína

Esse meio foi preparado pelo método descrito por Richardson (43).

4.4.1. Preparo do meio: Em 50 ml de uma solução de acetato de sódio pH 6,8, adicionou-se 1,0 g de caseína ácida e 110 mg de cloreto de cálcio. Agitou-se durante 15 minutos, para dissolver cerca de 50%, acertando-se novamente o pH para 6,8 com NaOH 0,2 N. Colocou-se 50 ml de água destilada num erlenmayer de 250 ml, juntou-se 1 g de agar e aqueceu-se à ebulição até dissolver. Esfriou-se a aproximadamente 40°C e adicionou-se o sobrenadante da solução de caseína ácida anteriormente preparada, vagarosamente e com agitação lenta para evitar a formação de espuma. Imediatamente verteu-se cerca de 25 ml desse meio em 4 placas de petri que foram deixadas solidificando. Após a solidificação, foram feitos três furos em cada placa de cerca de 1,0 cm de diâmetro, colocando-se duas gotas da enzima do *Mucor miehei*, *Endothia para-*

sítica e renina, contendo 109 US de atividade por ml no primeiro, segundo e terceiro furo de cada placa, respectivamente. A seguir foi adicionada uma gota de toluol em todos os furos das 4 placas sendo as mesmas incubadas a 30°C por 24 horas.

4.5. Eletroforese em gel de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) poliacrilamida

Utilizou-se o método descrito por Weber e Osborn (55) para a determinação do peso molecular por eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio SDS/poliacrilamida e os reagentes usados eram provenientes da BIO-RAD Laboratories. As amostras liofilizadas, obtidas em 4.3. e 4.6.1. numa concentração de 1,0 mg e 6,25 mg/ml, respectivamente, foram incubadas a 35°C durante 3 horas em tampão fosfato de sódio 0,01 M e pH 7,0 contendo 1% de dodecil sulfato de sódio e 1% de β -mercaptoetanol. A solução dos géis foi preparada com acrilamida (13,5 ml), tampão gel (15 ml da solução preparada com 7,8 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ mais 20,4 g de Na_2HPO_4 mais 2,0 g de dodecil sulfato de sódio para um litro de água destilada), persulfato de amônia (1,5 ml) e N,N,N',N'-tetrametilenodiamina (0,01 ml). Essa solução foi colocada em tubos de vidro e deixada polimerizar durante uma hora.

O aparelho utilizado para a eletroforese consiste de uma fonte estabilizadora da FANEM, modelo 1050, tubos de vidro de 0,5 cm x 8,0 cm, suporte para cubas, duas cubas de acrílico de 14 x 14 cm de base por 7,0 cm de altura, cada

qual com um eletrodo na posição central. A cuba superior apresenta oito perfurações ao redor do eletrodo para encaixe dos tubos.

Na parte superior dos tubos com gel de SDS/poliacrilamida foram colocados 10 µl de azul de bromofenol, 40 µl de solução de proteína previamente preparada e 40 µl de uma solução de sacarose a 40%. Os tubos de gel com as amostras foram colocados na célula de eletroforese. Foi usado tampão gel diluído 1:1 com água destilada e aplicou-se 6 mA de corrente por gel durante três horas e meia. Após medir a migração do corante (azul de bromofenol), os géis foram removidos dos tubos de eletroforese e colocados em tubos de ensaio com ácido tricloracético (TCA) a 50% para fixar as proteínas, durante 15 horas, aproximadamente. A coloração foi feita com azul de comassie em TCA a 20% durante 2 horas. A descoloração foi feita por lavagem contínua com ácido acético a 7% durante 3 dias. Após a descoloração completa, mediu-se o comprimento do gel e a migração das bandas de proteína e calculou-se a mobilidade através da fórmula:

$$\text{MOBILIDADE} = \frac{\text{Migração da proteína}}{\text{Migração do corante}}$$

4.6. Estudo da ação de enzimas coagulantes sobre a K-caseína - tratada a diversas temperaturas

4.6.1. Preparação das frações de K-caseína e incubação com a enzima: Pesou-se 130 mg de K-caseína num becker de 50 ml

adicionou-se 12 ml de água destilada e agitou-se durante, aproximadamente, 10 minutos. Em seguida, elevou-se o pH para 11,0, com a adição de NaOH 0,2 N, seguida da adição de HCl 0,2 N para baixar o pH até 6,8 (essa adição foi feita vagarosamente sob agitação constante, mantendo-se, assim, a K-caseína em suspensão aquosa). Obteve-se um volume final de 20 ml, que foram distribuídos em 4 tubos de ensaio. Um dos tubos permaneceu em temperatura ambiente e os outros foram submetidos a temperaturas de 40, 50 e 60°C, respectivamente, durante 1 hora. Decorrido esse tempo, os quatro tubos foram colocados em banho-maria a 35°C por 20 minutos para estabilizar a temperatura, quando foi juntado 1,0 ml de solução de enzima do *Mucor miehei* contendo 109 US/ml de atividade em cada tubo, permanecendo em banho-maria por mais 30 minutos. Em seguida, mediu-se as absorbâncias a um comprimento de onda de 660 nm num espectrofotômetro ultravioleta Perkin-Elmer, Coleman 124 D. Posteriormente, o conteúdo dos tubos foi congelado a -18°C, liofilizado e submetido a eletroforese em dodecil sulfato de sódio (SDS)/poliacrilamida.

5. RESULTADOS

5.1. Obtenção das enzimas

5.1.1. Renina: Obtida do quarto estômago de vitelos, pelo método descrito em 4.1.1., em estado semi-purificado, cuja atividade foi determinada pelo método de Soxhlet, descrito em 4.1.3., fornecendo 505 US/mg de enzimas.

5.1.2. Enzima do *Mucor miehei*: obtida pelo método descrito em 4.1.2., em estado semi-purificado. Sua atividade também foi determinada pelo método de Soxhlet descrito em 4.1.3., fornecendo 4.980 US/mg de enzimas.

5.1.3. Enzima da *Endothia parasitica*: foi adquirida na Indústria Farmacêutica Pfizer do Brasil, já em estado purificado, sendo sua atividade medida pelo método de Soxhlet descrito em 4.1.3., resultando em 1.920 US/mg de enzima.

5.2. Obtenção das caseínas: Os resultados eletrofréticos estão apresentados na Figura 5.

5.2.1. Obtenção da caseína ácida: foi obtida pelo método descrito em 4.2.1., 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%.

5.2.2. Obtenção de α e β -caseínas: foram obtidas pelo método descrito em 4.2.2., partindo de 5.000 ml de leite fresco integral, não pasteurizado, dos quais foram obtidos

1.500 g de caseína ácida úmida, resultando, no final do processo, 16,33 g de α -caseína e 3,57 g de β -caseína fornecendo um rendimento de 32,66% para a α -caseína e 9,52% para a β -caseína.

5.2.3. Obtenção da K-caseína

5.2.3.1. Por fracionamento com uréia: foi obtida pelo método - descrito em 4.2.3.1., partindo-se de 2.600 ml de leite fresco e integral, não pasteurizado, obtendo-se - 70 g de caseína ácida úmida, o que resultou em 2,054-g após o processamento, ou seja, um rendimento de 36%.

5.2.3.2. Por filtração em gel Sephadex: foi obtida pelo método descrito em 4.2.3.2., partindo-se de 2 g de caseína ácida, resultando, após a filtração e liofilização, 36 mg de K-caseína de alta pureza com um rendimento - de 11,84%. O comportamento da filtração está apresentado na figura 6, e os percentuais de caseína foram - calculados de acordo com Charles Alais (1).

5.3. Tratamento das frações de caseína purificadas com as enzimas coagulantes

Foram obtidas 24 frações de 50 mg de proteínas liofilizadas, de acordo com o método descrito em 4.3. Esse tratamento resultou na floculação da K-caseína tratada com a renina, enzima da *Endothia parasitica* e enzima do *Mucor miehei* enquanto que com a α e β -caseína, aparentemente, - não houve mudanças devido à ação das enzimas mencionadas.

5.4. Diferenciação das enzimas coagulantes em meio gel de agar-caseína

Um grama de caseína, após ser tratado pelo método descrito em 4.4., resultou no aparecimento de halos ao redor dos furos onde haviam sido depositadas as enzimas, como podemos observar na Figura 7.

5.5. Eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio (SDS)/poliacrilamida

Foi desenvolvida segundo a metodologia apresentada no item 4.5., sendo que a K, α e β -caseínas, após tratamento com as enzimas coagulantes e submetidas a eletroforese em gel de SDS/poliacrilamida, apresentaram os resultados mostrados nas Figuras 8, 9 e 10 e seus pesos moleculares, respectivamente, apresentados nas Figuras 11, 12 e 13. Os pesos moleculares aproximados foram calculados por interpolação na curva padrão construída por Guerra e Park (14)

5.6. Estudo da ação das enzimas coagulantes sobre a k-caseína, tratada a diversas temperaturas

Essas frações de K-caseína foram obtidas pelo método descrito em 4.6. e tratadas por eletroforese em SDS/poliacrilamida como descrito em 4.5., obtendo-se o resultado apresentado na Figura 14.

6. DISCUSSÃO

6.1. Obtenção das enzimas

A enzima coagulante do *Mucor miehei* foi por nós produzida para esta pesquisa, a partir da mesma linhagem comercialmente vendida para a produção de queijo. Foi purificada por fracionamento com sulfato de amônia somente até o primeiro estágio. A enzima em questão, não apresentou nenhuma atividade proteolítica.

A renina, extraída do quarto estômago de bezerros, foi purificada pelo método recomendado por Berridge (4), descrito em 4.1.1., sendo que esta também não apresentou atividade proteolítica.

A enzima da *Endothia parasitica* foi obtida, já em estado-purificado, na Indústria Farmacêutica Pfizer.

Conseguimos produzir, no laboratório, queijos razoáveis - com todas as três enzimas.

6.2. Obtenção das caseínas

6.2.1. Obtenção da caseína ácida: o percentual de caseína ácida obtido foi bastante satisfatório, como podemos observar no item 5.2.1. Segundo Charles Alais (1), o percentual deveria ser de 2,5%, sendo que o rendimento por nós obtido foi de 2,0%, que é considerado bastante bom.

6.2.2. Obtenção da α e β -caseína: Hipp et al (22), partindo de 400 g de caseína ácida seca, obtiveram um rendimento

60% em α -caseína e 40% em β -caseína, o que não foi o nosso caso, já que os percentuais obtidos foram bastante inferiores, ou seja, 32,66% para α -caseína e 9,52% para a β -caseína.

6.2.3. Obtenção da K-caseína: foi obtida por dois métodos: - fracionamento com uréia, com um rendimento de 36% e filtração em gel Sephadex. Esse segundo método de preparação da K-caseína, descrito por Yaguchi et al (56), 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 purificação, a filtração em gel Sephadex é preferível à cromatografia em DEAE-celulose (19, 20 e 34), ou precipitação por etanol (30, 39 e 61). 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 e, ainda, com vantagens de a coluna de gel Sephadex poder ser usada várias vezes sem re-empacotamento (56).

A K-caseína obtida pelos dois métodos apresentou resultados eletroforéticos praticamente iguais.

6.3. Tratamento das frações de caseína purificadas com as enzimas coagulantes

Quando a renina coagula o leite, o substrato específico - hidrolisado é a K-caseína (61). Após a ação das enzimas-

coagulantes da *Endothia parasítica*, *Mucor miehei* e renina, sobre a caseína e suas frações, observamos que a caseína-ácida e suas frações α e β , aparentemente não sofreram alterações, enquanto que a K-caseína sofreu hidrólise, havendo floculação bastante intensa quando da incubação com as enzimas coagulantes já citadas mostrando, aparentemente, a mesma característica. Essa turbidez, previamente relatada por Beeby e Lawrence (3 e 26) é devida à capacidade das enzimas de atacar a K-caseína a pH 6,7 pela ruptura de uma ligação peptídica específica, dando como produto a para-K-caseína que é insolúvel e um macropeptídeo-solúvel. A formação desses compostos é independente da presença de íons cálcio.

6.4. Diferenciação das enzimas coagulantes em meio gel de agar-caseína

O método gel de agar-caseína, de Cheeseman (6) para o ensaio de reninas, tem sido o melhor caminho para revelar a maioria dessas reações fundamentais. A formação do para-caseinato de cálcio pela ação da renina sobre a caseína-do meio, resulta na formação de zonas de precipitação devido à difusão das moléculas de enzima no gel. Segundo Ganguli e Bhalero (13), parece que tanto a natureza da enzima como o tipo de caseína, tem influência na formação das zonas de precipitação. A aparência das zonas de precipitação em gel de agar-caseína com enzima vegetal e enzima microbiana, revela a diferença básica nos seus modos de ação quando comparadas com renina animal.

Em nosso experimento, a renina, enzima do *Mucor miehei* e da *Endothia parasitica*, apresentou zonas de difusão bastante diferentes, como podemos observar na Figura 7, mostrando que suas características físicas são diferentes.

6.5. Eletroforese em gel de SDS/poliacrilamida

Davis (28) e Ornstein (40), demonstraram que o fracionamento das proteínas nativas sobre gel de poliácridamida não depende somente da carga, mas também do peso molecular das mesmas. Weber e Osborn (55) utilizaram a ligação de íons SDS e mercaptoetanol à proteína, como princípio para fracionamento das proteínas em forma linear em eletroforese sobre gel de poliácridamida.

Assume-se, portanto, que as cargas de cada proteína são totalmente mudadas por ligações de ânions SDS, resultando em moléculas carregadas negativamente.

6.5.1. Na figura 8, mostramos a eletroforese em gel de SDS/poliácridamida da K-caseína incubada com renina (tubo 1), com enzima do *Mucor miehei* (tubo 2) e *Endothia parasitica* (tubo 3), que, comparadas com o controle (tubo 4) mostraram que as bandas de proteínas de peso molecular entre 27.000 e 30.000 foram hidrolisadas pelas enzimas coagulantes em questão, resultando em bandas de proteína de peso molecular mais baixo, ou seja, entre 8.000 e 14.000. A figura 11 apresenta os pesos moleculares das bandas da K-caseína após a eletroforese.

6.5.2. A Figura 9 mostra a eletroforese em gel de SDS/poliacrilamida da α -caseína incubada com renina (tubo 1), enzima do *Mucor miehei* (tubo 2) e *Endothia parasitica* (tubo 3). Quando comparados com o controle (tubo 4), verificou-se que as enzimas hidrolisaram as bandas de proteína de peso molecular 34.000, resultando em bandas de peso molecular 29.000. Além disso, a enzima da *Endothia parasitica* hidrolisou as bandas de proteínas de peso molecular 8.000, 16.000 e 26.000. Por outro lado, houve um aumento nas bandas de peso molecular 14.000 e 22.000. A Figura 12 mostra os pesos moleculares das bandas de α -caseína após eletroforese.

6.5.3. A β -caseína praticamente não sofreu ação das enzimas coagulantes, como mostra a Figura 10. Comparando-se com o controle (tubo 4), observamos que a renina teve uma ação muito fugaz (tubo 1), sendo mais acentuada pela enzima do *Mucor miehei* (tubo 2) e *Endothia parasitica* (tubo 3) nas bandas de proteína de peso molecular entre 30.000 e 34.000, resultando em bandas de peso molecular entre 8.000 e 14.000. Provavelmente, esta β -caseína continha pequena quantidade de K-caseína, o que pode ter provocado o aumento da banda de peso molecular 8.000. A Figura 13 mostra os pesos moleculares das bandas de β -caseína após a eletroforese.

6.6. Estudo da ação das enzimas coagulantes sobre a K-caseína, tratada a diversas temperaturas

Podemos observar pela Figura 14, que a K-caseína não tra-

tada pelo calor (tubo 1) e a tratada à temperatura de 40°C (tubo 2), foram atacadas pela enzima coagulante do *Mucor miehei* enquanto que a K-caseína tratada à temperatura de 50 e 60°C (tubos 3 e 4 respectivamente), não foi atacada - significativamente pela enzima, como podemos observar nas bandas de proteína de peso molecular 30.000, significando - que, provalmente, após o aquecimento, a referida caseína - tenha sofrido alterações, tornando-se insensível à enzima - do *Mucor miehei*.

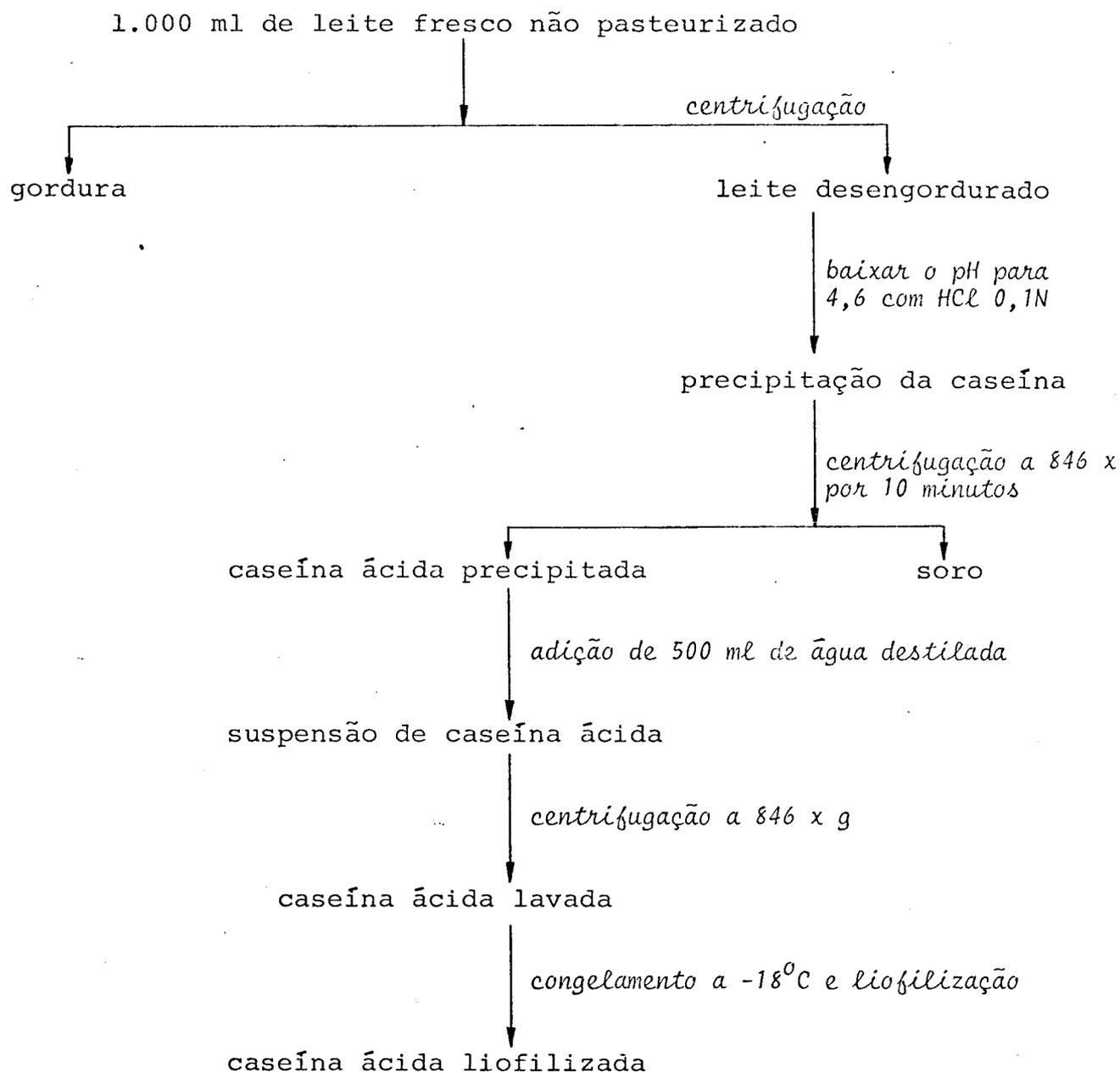


FIGURA 1 - Fluxograma de obtenção da caseína ácida.

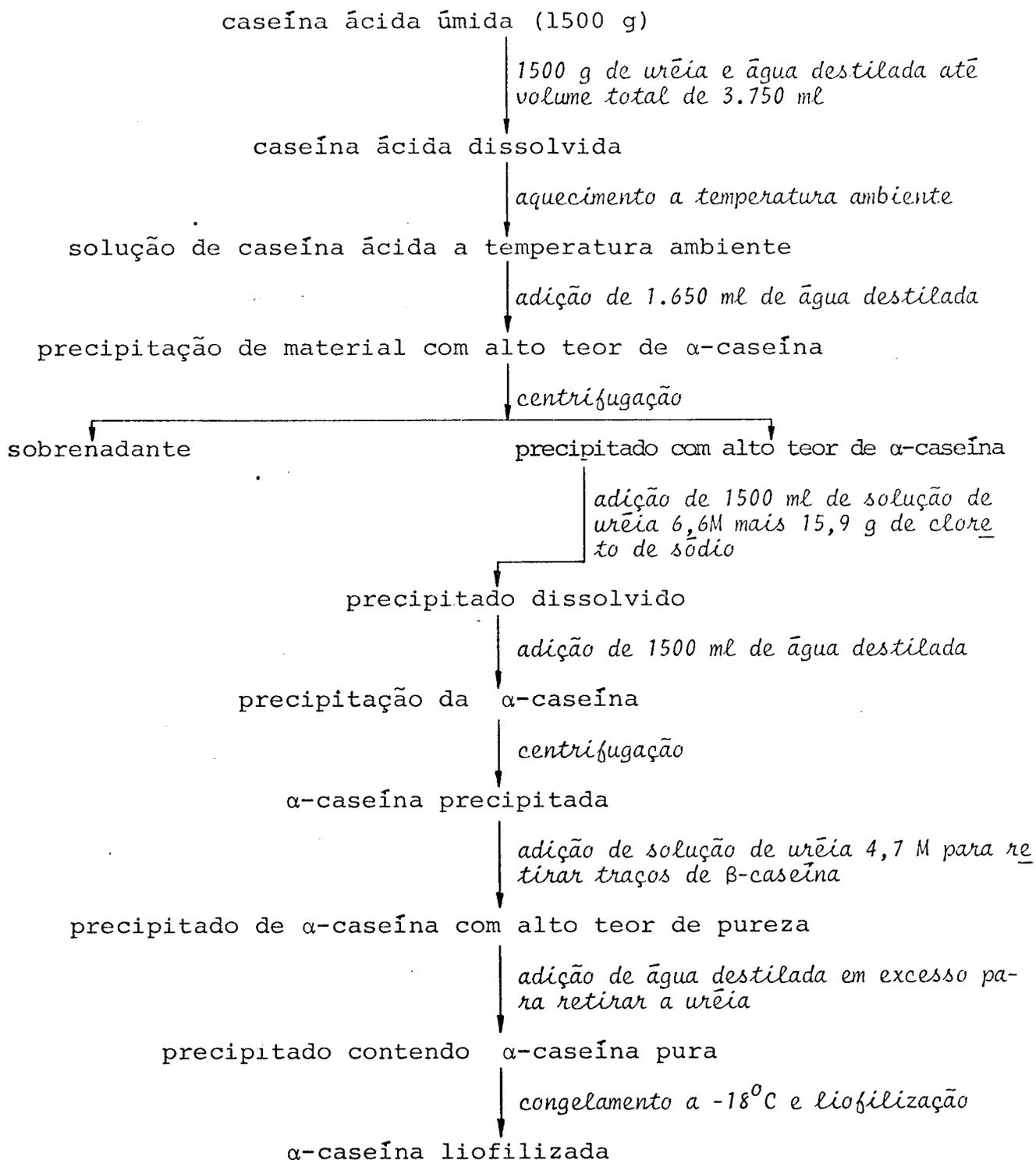


FIGURA 2 - Fluxograma de obtenção da α -caseína.

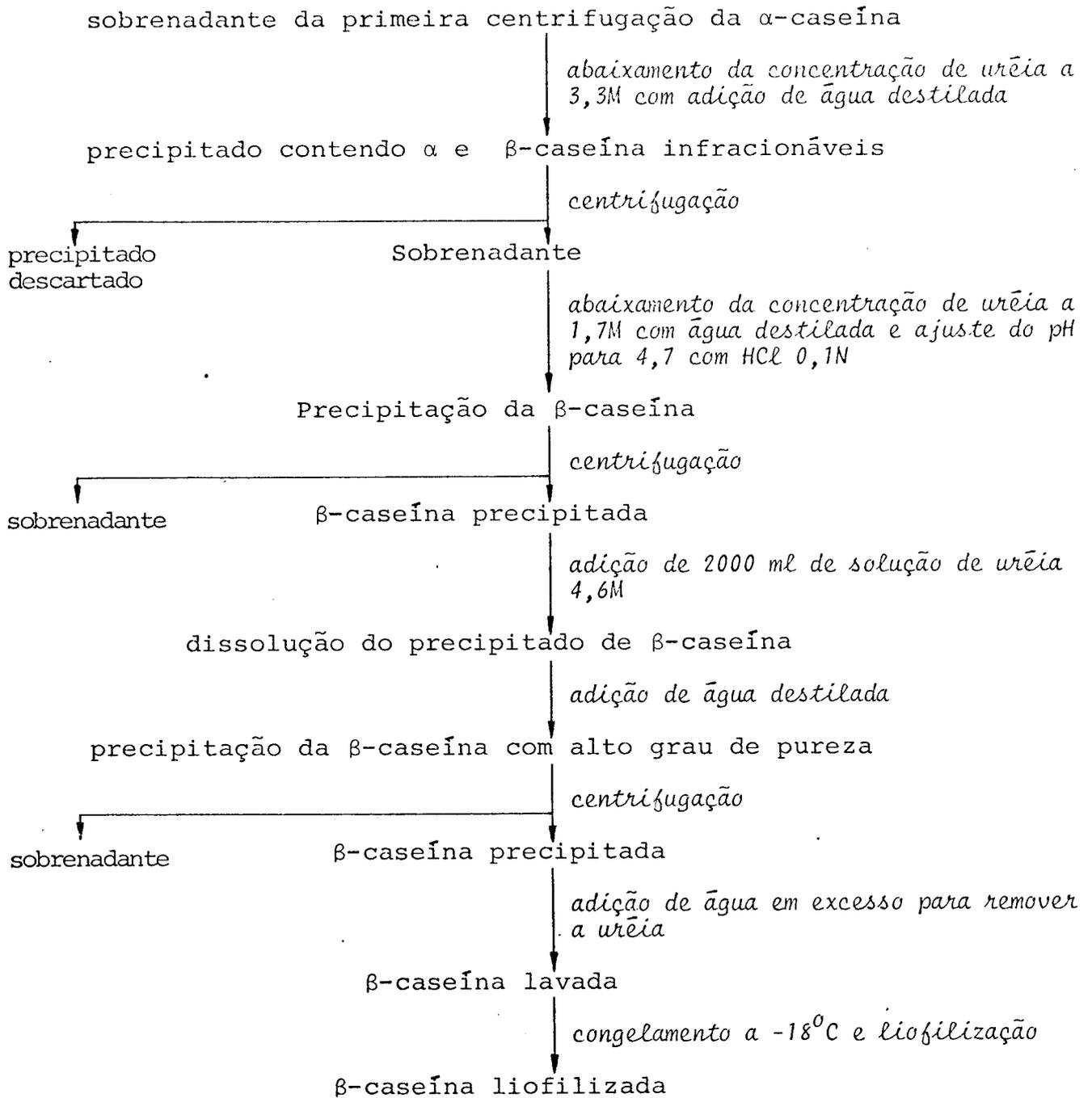


FIGURA 3 - Fluxograma da obtenção da β -caseína

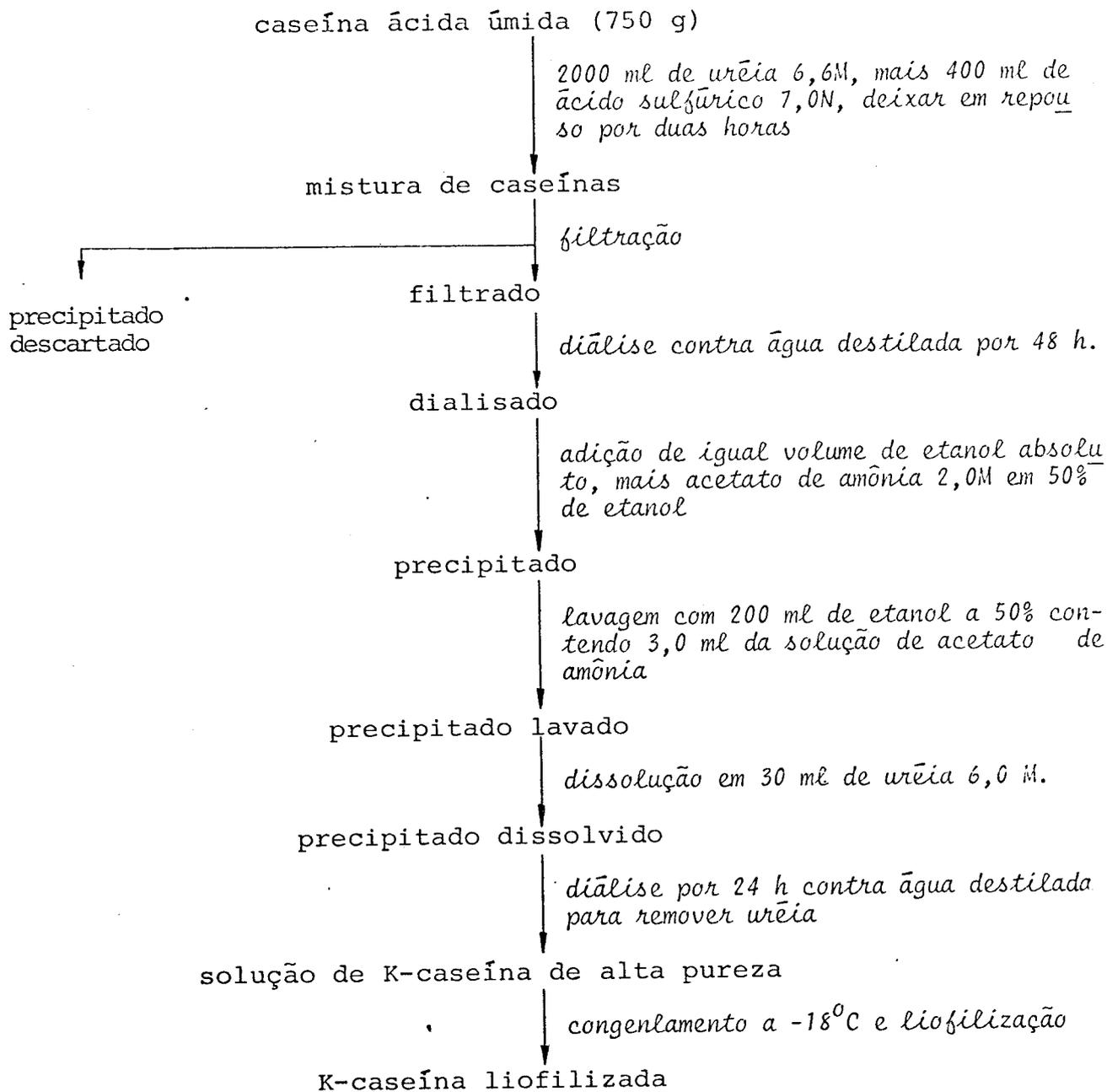
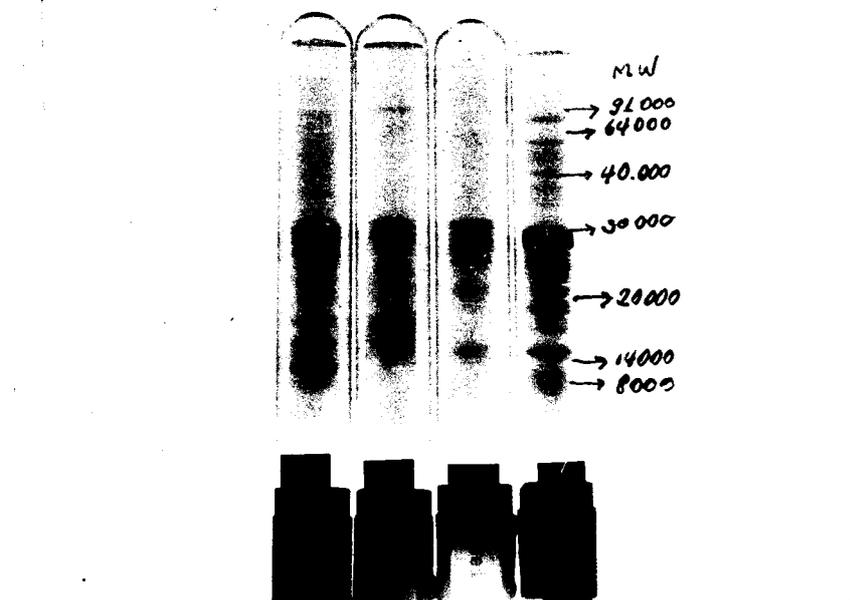


FIGURA 4 - Fluxograma de obtenção da K-caseína



Da esquerda para a direita temos:

Tubo 1 - caseína ácida

Tubo 2 - K-caseína

Tubo 3 - β -caseína

Tubo 4 - α -caseína

FIGURA 5 - Eletroforese em gel de SDS/poliacrilamida da caseína ácida, K-caseína, β -caseína e α -caseína.

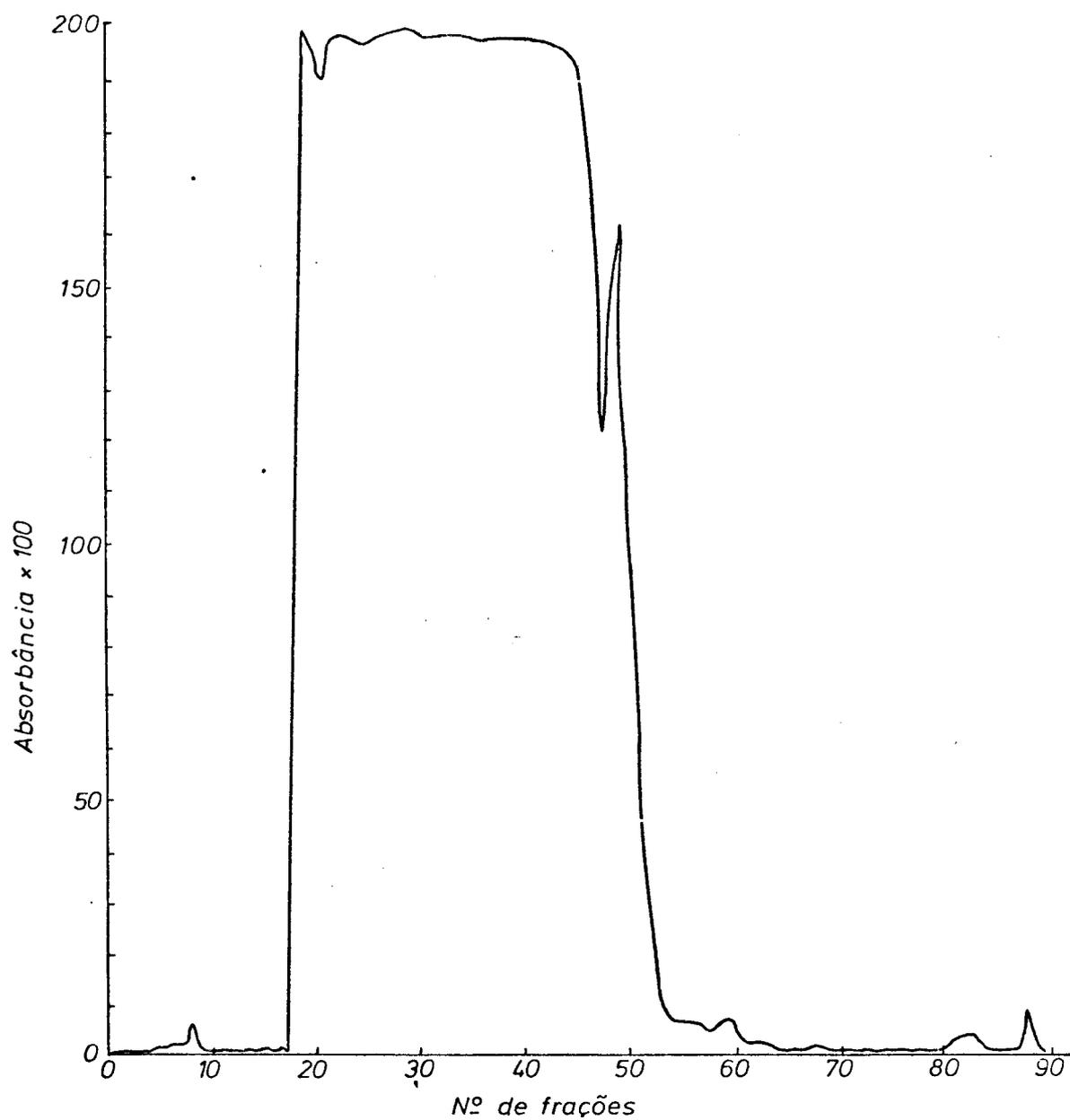
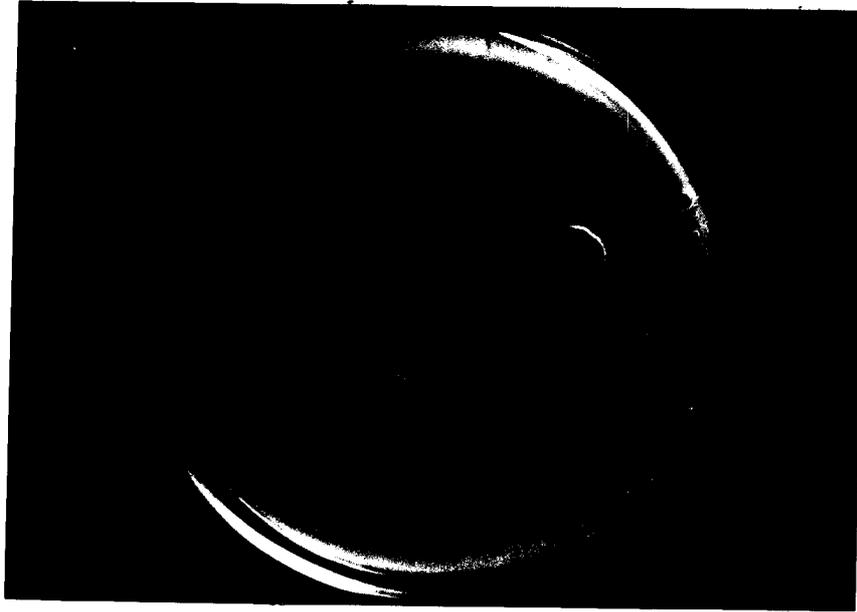
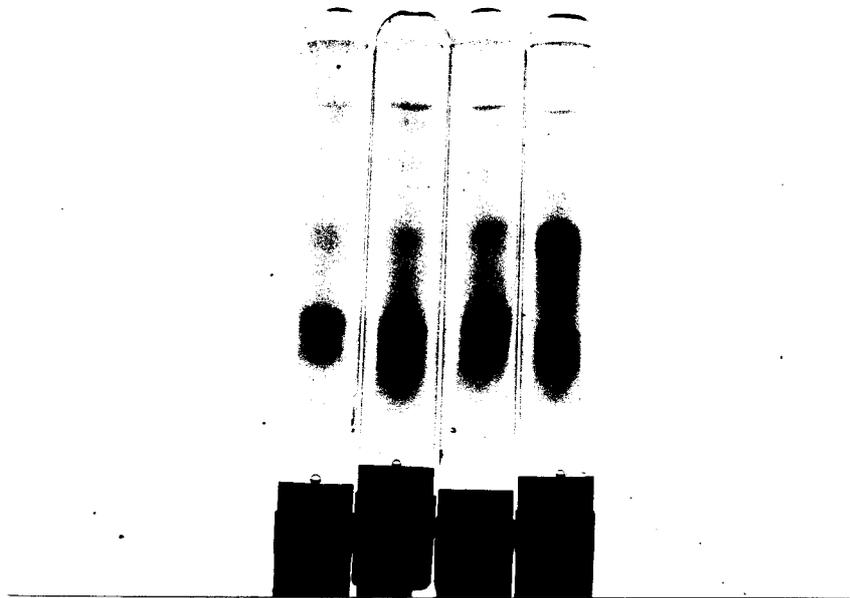


FIGURA 6 - Aumento da absorbância a 280 nm em função do aumento da concentração de proteína em cada fração eluída.



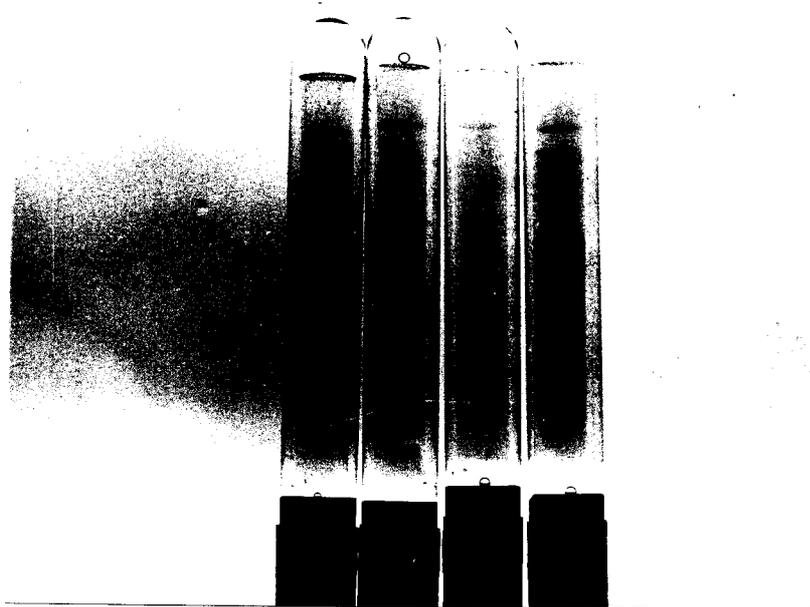
- G - Ação da renina gástrica
- M - Ação da enzima do *Mucor miehei*
- E - Ação da enzima da *Endothia parasitica*

FIGURA 7 - Ação das enzimas coagulantes em meio gel de agar-caseína.



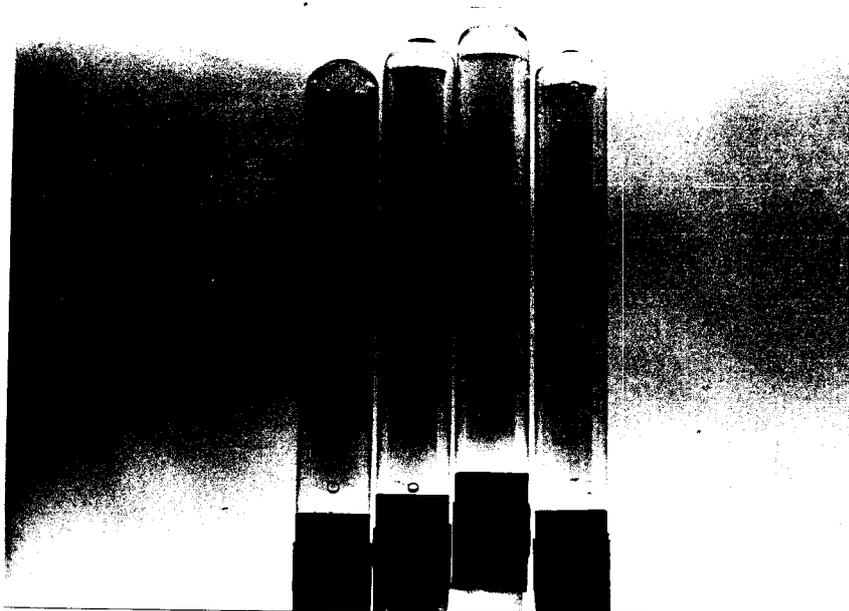
- Tubo 1 - Tratada com renina
Tubo 2 - Tratada com enzima do *Mucor miehei*
Tubo 3 - Tratada com enzima da *Endothia parasitica*
Tubo 4 - Tratada com enzima inativada (controle)

FIGURA 8 - Eletroforese em gel de SDS/poliacrilamida da K-caseí
na incubada com as enzimas coagulantes.



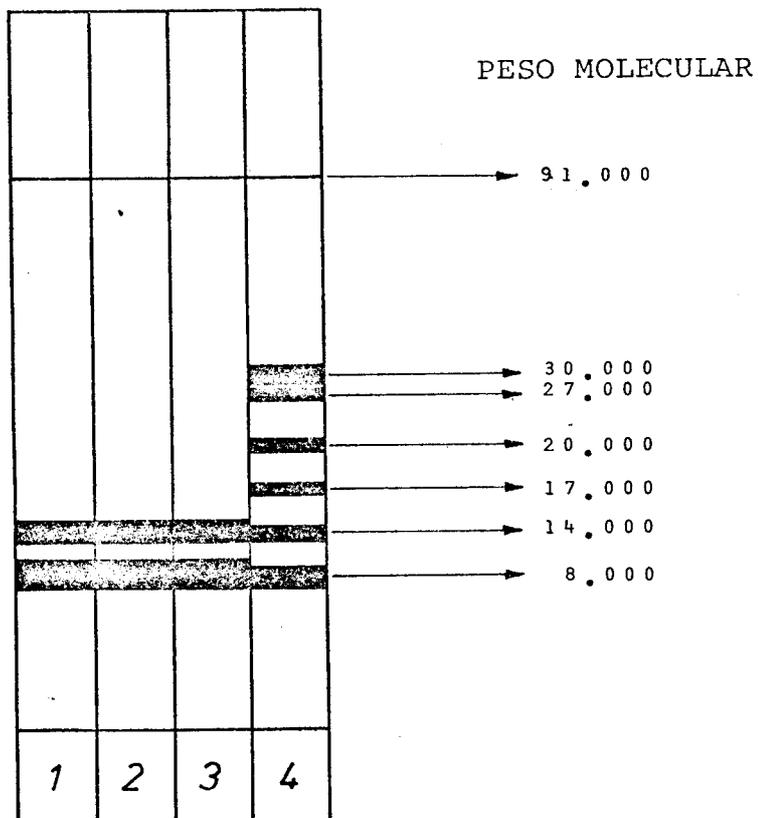
- Tubo 1 - Tratada com renina
- Tubo 2 - Tratada com enzima do *Mucor miehei*
- Tubo 3 - Tratada com enzima da *Endothia parasitica*
- Tubo 4 - Tratada com enzima inativada (controle)

FIGURA 9 - Eletroforese em gel de SDS/poliacrilamida da α -caseína incubada com as enzimas coagulantes.



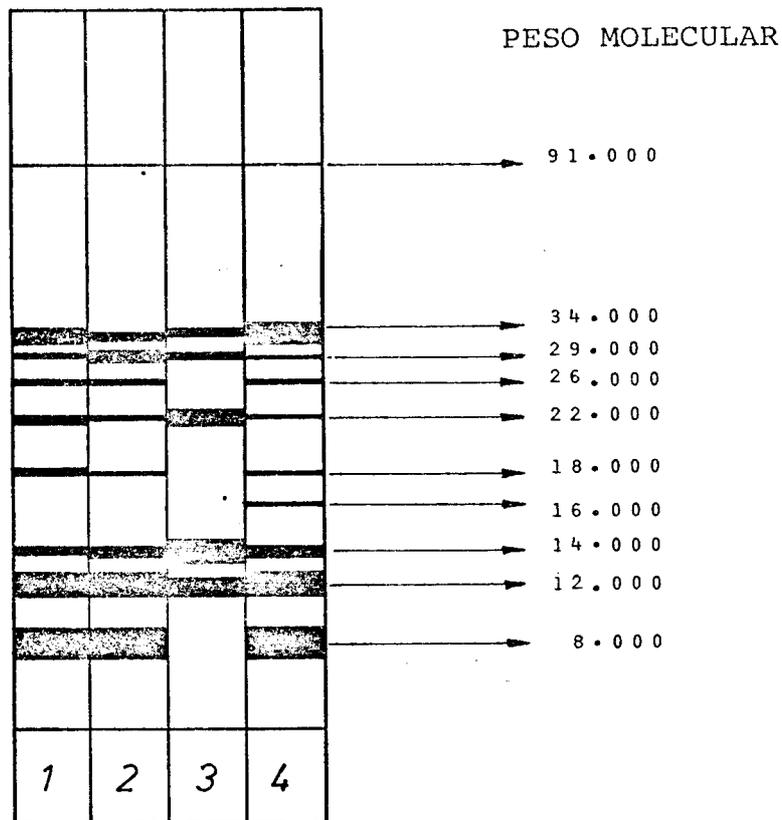
- Tubo 1 - Tratada com renina
Tubo 2 - Tratada com enzima do *Mucor miehei*
Tubo 3 - Tratada com enzima da *Endothia parasitica*.
Tubo 4 - Tratada com enzima inativada (controle)

FIGURA 10 - Eletroforese em gel de SDS/poliacrilamida da β -caseína incubada com as enzimas coagulantes.



- Tubo 1 - Tratada com renina gástrica
 Tubo 2 - Tratada com enzima do *Mucor miehei*
 Tubo 3 - Tratada com enzima da *Endothia parasitica*
 Tubo 4 - Tratada com enzima inativada (controle)

FIGURA 11 - Pesos moleculares das bandas de proteína da K-caseína incubada com as enzimas coagulantes e submetida a eletroforese em gel de SDS/poliacrilamida.



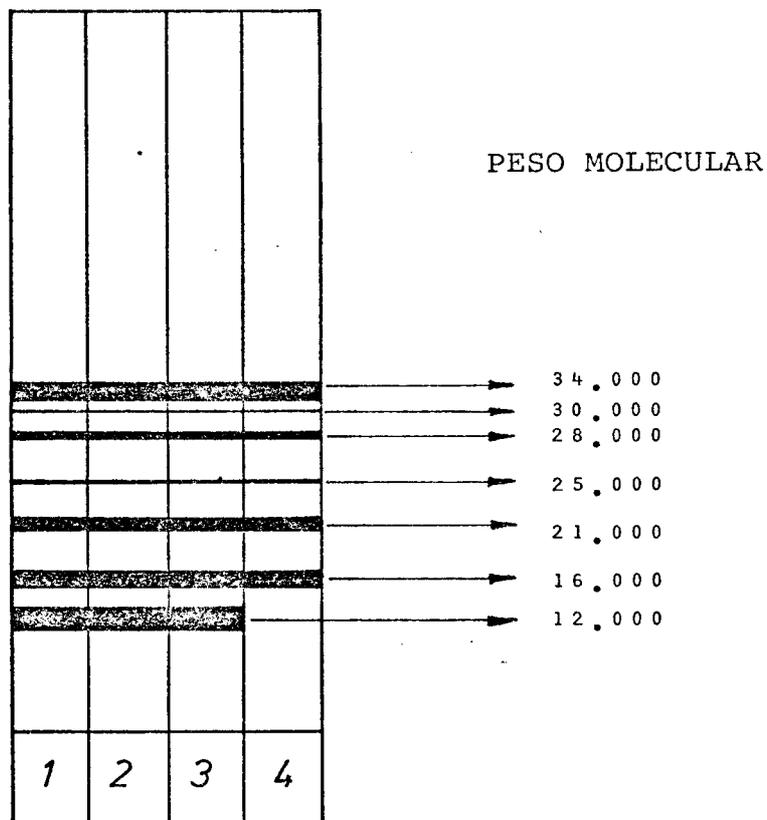
Tubo 1 - Tratada com renina gástrica

Tubo 2 - Tratada com enzimas do *Mucor miehei*

Tubo 3 - Tratada com enzima da *Endothia parasitica*.

Tubo 4 - Tratada com enzima inativada (controle)

FIGURA 12 - Pesos moleculares das bandas de proteínas da α -caseína incubada com as enzimas coagulantes e submetida a eletroforese em gel de SDS/poliacrilamida.



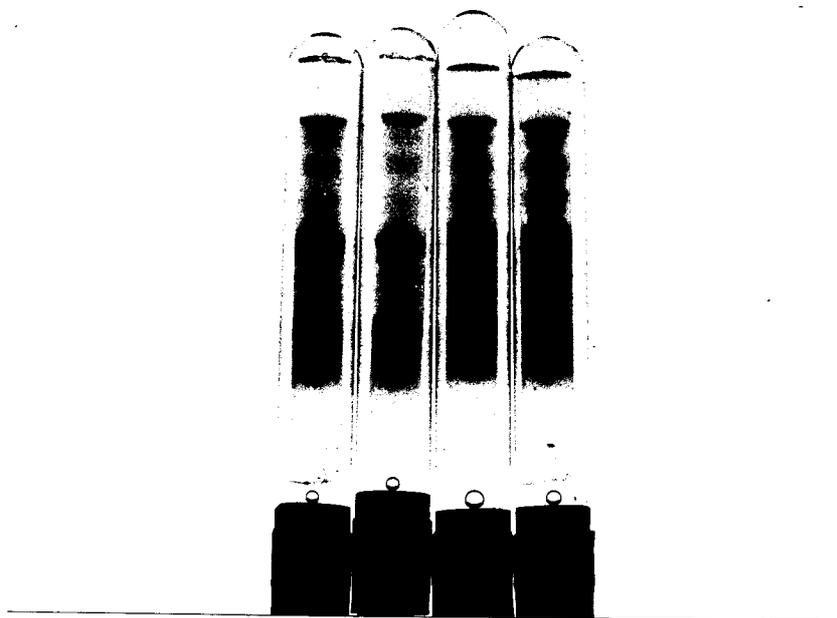
Tubo 1 - Tratada com renina gástrica

Tubo 2 - Tratada com enzima do *Mucor miehei*

Tubo 3 - Tratada com enzima da *Endothia parasitica*

Tubo 4 - Tratada com enzima inativada (controle)

FIGURA 13 - Pesos moleculares das bandas de proteína da β -caseína incubada com as enzimas coagulantes e submetida a eletroforese em gel SDS/poliacrilamida.



- Tubo 1 - K-caseína tratada a temperatura ambiente
- Tubo 2 - K-caseína tratada a temperatura de 40°C
- Tubo 3 - K-caseína tratada a temperatura de 50°C
- Tubo 4 - K-caseína tratada a temperatura de 60°C

FIGURA 14 - Eletroforese em gel de SDS/poliacrilamida da K-caseína tratada a diversas temperaturas e incubada com enzima do *Mucor miehei*.

7. CONCLUSÕES

1. Tanto a renina quanto a enzima do *Mucor miehei* são perfeitamente viáveis para a fabricação de queijos, uma vez que nem uma nem outra apresentou atividade proteolítica.
2. O fracionamento da caseína por uréia separa em alto grau de pureza as frações α , β e Kappa, sendo que a K-caseína também foi obtida por filtração em gel Sephadex. Os dois métodos apresentaram resultados eletroforéticos praticamente iguais sendo que o método do gel Sephadex oferece maiores vantagens.
3. As enzimas da *Endothia parasitica*, *Mucor miehei* e renina, - quando incubadas com caseína ácida e suas frações α e β , não apresentaram turvação do meio, porém, quando incubadas com a K-caseína, apresentaram turvação intensa, devido à hidrólise da mesma pelas enzimas em questão, resultando a para-K-caseína insolúvel e um macropetídeo solúvel.
4. Através da diferenciação das enzimas coagulantes do *Mucor miehei*, *Endothia parasitica* e renina em meio gel de agar-caseína, concluímos que a difusão das moléculas das enzimas é diferente.
5. As três enzimas hidrolisaram as bandas de proteína da k-caseína de peso molecular entre 17.000 e 30.000 em bandas de proteína de peso molecular 8.000 e 14.000. No caso da α -caseína, foram hidrolisadas por todas as enzimas as bandas de proteína de peso molecular 34.000 em bandas de peso molecu-

lar 29.000. Além disso, a enzima da *Endothia parasitica* hidrolisou também as bandas de proteína de peso molecular entre 34.000 e 91.000 além das de peso molecular 22.000 e 16.000. Quanto à β -caseína, não foi hidrolisada por nenhuma das enzimas, havendo um pequeno aumento das bandas de proteína de peso molecular 8.000 e 14.000, devido à presença de K-caseína.

6. Comparando-se a K-caseína submetida ao aquecimento com a que não foi aquecida, ambas submetidas à ação da enzima coagulante, notamos que a primeira praticamente não sofreu hidrólise, podendo-se concluir que a mesma foi desnaturada.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALAIS, C. Ciência de la leche. trad. por Antonio Lacasa Godina. Mexico, D.F. Compañía Editorial Continental S.A., 1971, cap.6, pg. 90.
2. ASHWORTH, U.S. Turbidimetric behavior of casein fractions after treatment with rennet. J. Dairy Sci. 51(10): :1583-1587, 1968.
3. BEEBY, R. & NITSCHMANN, H. The action of rennin on K-casein; the disruption of the K-casein complex. J. Dairy Res. 30(1):7-16, 1963.
4. BERRIDGE, N.J. Purification and assay of rennin. In: Colowick, S.P. & Kaplan, N.O. Methods in enzymology. New York, Academic Press, 1975. v.2, p.69-77.
5. BINGHAN, W.E. Influence of temperature and pH on the solubility of α_s , β and K-casein. J. Dairy Sci. 54(7):1077-1079, 1971.
6. CHEESEMANN, G.C. Action of rennet and other proteolytic enzymes on casein in casein-agar gels. J. Dairy Res. 30(1):17-22, 1963.
7. CHERYAN, M.; VAN WYK, P.J.; OLSON, N.F. & RICHARDSON, T. Secondary phase and mechanism of enzymatic milk coagulation. J. Dairy Sci. 58(4):477-481, 1975.
8. DAVIS, B.J. Disc eletrophoresis. 2. Method and application to human serum proteins. Ann., N.Y. Acad. Sci. 121:404-427, 1964.

9. DELFOUR, A.; JOLLÈS, J.; ALAIS, C. & JOLLÈS, P. Caseino-glycopeptides: Characterization of a methionine residue and of the N-terminal sequence. Biochem. and Biophys. Research Comm. 19(4):452-455, 1965.
10. DOI, H.; IBUKI, F. & KANAMORI, M. Heterogeneity of reduced bovine K-casein. J.Dairy Sci. 62(2):195-203, 1979.
11. EL NEGOMY, A.M. Starch gel electrophoresis of products of action of crystalline rennin on casein and its components. J. Dairy Sci. 51(7):1013-1017, 1968.
12. EL SHIBINI, S. & ABD EL SALAM, M.H. Action of milk clotting enzymes on α s-caseins from buffalo's and cow's milk. J. Dairy Sci. 60(10):1519-1521, 1977.
13. GANGULI, N.C. & BHALERAO, V.R. Differential of animal, vegetable and microbial rennets on caseins as revealed by casein-agar plate assay method. J.Dairy Sci. 48(4):439-443, 1965.
14. GUERRA, M.J. & PARK, Y.K. Extraction of sesame seed protein and determination of its molecular weight by sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis. J. Am. Oil Chem. Soc. 52(3):73-75, 1975.
15. GIRDHAR, B.K. & HANSEN, P.M.T. Production of K-casein concentrate from commercial casein. J. Food Sci. 43:397-406, 1978.
16. GREEN, M.R. & PASTEWKA, J.V. Molecular weight of three milk casein by sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel

- electrophoresis and k-like characteristics of a fourth casein. *J.Dairy Sci.* 59(9):1738-1745, 1976.
17. HAGEMEYER, K.; FAWWAL, I. & WHITAKER, J.R. Purification of protease from the fungus *Endothia parasitica*. *J.Dairy Sci.* 51(12):1917-1922, 1968.
 18. HANSEN, P.M.T. Stabilization of α s casein by carrageenan. *J.Dairy Sci.* 51(2):192-195, 1969.
 19. HILL, R.D. The preparation of K-casein. *J.Dairy Res.* 30:101-107, 1963.
 20. HILL, R.D. & HANSEN, R.R. The effect of preparative conditions on the composition of the K-casein complex. *J. Dairy Res.* 30:375-382, 1963.
 21. HIPP, N.J.; GROVES, M.L.; CUSTER, J.H. & Mc MEEKIN, T.L. Separation of γ -casein. *J.Am.Chem.Soc.* 72:4928-4931, 1950.
 22. HIPP, N.J.; GROVES, M.L.; CUSTER, J.H. & Mc MEEKIN, T.L. Separation of α -, β - and γ -casein. *J. Dairy Sci.* 35(3):272-281, 1952.
 23. ILANY, J. & NETZER, A. Milk clotting activity of proteolytic enzymes. *J. Dairy Sci.* 52(1):43-47, 1969.
 24. KOTTS, C. & JENNESS, R. Isolation of K-casein-like proteins from milks of various species. *J. Dairy Sci.* 59(5): :816-822, 1976.
 25. LARSON, M.K. & WHITAKER, J.R. *Endothia parasitica* protease. parameters affecting stability of the rennin-like enzyme.

- J. Dairy Sci. 53(3):253-261, 1970.
26. LAWRENCE, R.C. & CREAMER, L.K. The action of calf rennet and other proteolytic enzymes on K-casein. J. Dairy Res. 36(1):11-20, 1969.
27. LEDFORD, R.A. & CHEN, J.H. Degradation of casein fractions by rennet extract. J. Dairy Sci. 51(5):792-794, 1968.
28. LINDERSTRONG-LANG, K. Studies on casein. II. Is casein a homogeneous substance? Comt. rend. trav. lab. Carlsberg Ser. Chim. 16(1):48-63, 1925.
29. MARIER, J.R.; TESSIER, H. & DYSON, R. Sialic acid as an index of the K-casein content of bovine skimmilk. J. Dairy Sci. 46(5):373-379, 1963.
30. Mc KENZIE, H.A. & WAKE, R.G. An improved method for the isolation of K-casein. Biochem. Biophys. Acta 47:240-242, 1961.
31. MELACHOURIS, N. Discontinuous gel electrophoresis of whey proteins casein and clotting enzymes. J. Dairy Sci. 52(4):456-459, 1969.
32. MELACHOURIS, N. & TUKEY, S.L. Properties of a milk-clotting microbial enzyme. J. Dairy Sci. 51(5):650-655, 1968.
33. MELLANDER, O. Elektrophoretische untersuchung von casein. Biochem. Z, 300:240-245, 1939.
34. MICKELSEN, R. & FISH, N.L. Comparing proteolytic action of milk-clotting enzymes on caseins and cheese. J. Dairy Sci. 53(6):704-709, 1970.

35. MORR, C.V. Comparison of protein preparation procedures and starch versus polyacrilamide gel electrophoresis for examining casein degradation products in cheese. *J. Dairy Sci.* 54(3):339-343, 1971.
36. MULLIN, W.J. & WOLFE, F.H. Disc gel electrophoresis of casein treated with proteolytic and glycolytic enzymes. *J. Dairy Sci.* 57(1):9, 1974.
37. NEELIN, J.M. Variants of K-casein revealed by improved starch gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.* 47(5):506-509, 1964.
38. NEELIN, J.M.; ROSE, D. & TESSIER, H. Starch gel electrophoresis of various fractions of casein. *J. Dairy Sci.* 59(5):153-158, 1976.
39. NOBLE Jr., R.W. & WAUGH, F.D. Casein micelles. Formation and structure. *J. Am: Chem. Soc.* 87(10):2236-2255, 1965.
40. ORNSTEIN, L. Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121(2):321-346, 1964.
41. PETERSON, R.F. & KÖPFLER, F.C. Detection of new types of β -casein by polyacrylamide gel electrophoresis at acid pH: A proposed nomenclature. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 22(4):388-392, 1966.
42. PURKAYASTHA, R. & DYSON, R. Location of the carbohydrate-containing fraction of K-casein after gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.* 48(11):1419-1422, 1965.

43. RICHARDSON, G.H. Differentiation of enzyme coagulants on casein-agar gels. J. Dairy Sci. 51(6):940, 1968.
44. RICHARDSON, G.H. & CHAUDHARI, R.V. Differences between calf and adult bovine rennet. J. Dairy Sci. 53(10):1367-1372, 1970.
45. ROSE, D.; DAVIES, D.T. & YAGUCHI, M. Quantitative determination of the major components of casein mixtures by column chromatography on DEAE-cellulose. J. Dairy Sci. 52(1):8-11, 1969.
46. SHAPIRO, A.L.; VINUELA, E. & MAIZEL Jr., J.V. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrilamide gels. Biochem. Biophys. Res. Comm. 28(5):815-820, 1967.
47. SHOUVERS, J. & FOSSUM, G. Procedure for electrophoretic separation and visualization of milk-clotting enzymes in milk coagulants. J. Dairy Sci. 55(11):1532-1534, 1972.
48. STERNBERG, M.Z. Crystalline milk-clotting protease from *Mucormiehei* and some of its properties. J. Dairy Sci. 54(3):159-167, 1971.
49. TAM, J.J. & WHITAKER, J.R. Rates and extents of hydrolysis of several caseins by pepsin, rennin, *Endothia parasitica* protease and *Mucor pusillus* protease. J. Dairy Sci. 55(11):1523-1531, 1972.
50. TESSIER, H. & ROSE, D. Calcium ion concentration in milk. J. Dairy Sci. 41(3):351-359, 1958.

51. TROP, M. & PINSKI, A. *Mucor pusillus* rennin as a synergist to calf rennet. J. Dairy Sci. 54(1):5-7, 1971.
52. WARNER, R.C. Separation of α and β -casein. J. Am. Chem. Soc. 66:1725-1731, 1944.
53. WARREN, L. The thiobarbituric acid assay of sialic acid. J. Biol. Chem. 234(8):1971-1975, 1959.
54. WAUGH, D.F. & VON HIPPEL, H.P. K-casein and the stabilization of casein micelles. J. Am. Chem. Soc. 78:4576-4582, 1956.
55. WEBER, K. & OSBORN, M. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244(16):4406-4412, 1969.
56. YAGUCHI, M; DAVIES, T.D. & KIM, Y.K. Preparation of K-casein by gel filtration. J. Dairy Sci. 51(4):473-477, 1958.
57. YAGUCHI, M. & TARASSUK, N.P. Gel filtration of acid casein and skimmilk on Sephadex. J. Dairy Sci. 50(12):1985-1989, 1967.
58. ZITTLE, C.A. Influence of heat on K-casein. J. Dairy Sci. 52(1):12-20, 1969.
59. ZITTLE, C.A. Procedure for isolation of K-casein by use of sulfuric acid. J. Dairy Sci. 45(5):650, 1962.
60. ZITTLE, C.A. Stabilization of calcium sensitive α s-casein by K-casein: Effect of chymotrypsin and heat on K-casein.

- J. Dairy Sci. 44(11):2101-2103, 1961.
61. ZITTLE, C.A. & CUSTER, J.H. Purification and some of the properties of α s-casein and K-casein. J. Dairy Sci. 46(11):1183-1188, 1963.
62. ZITTLE, C.A. & WALTER, M. Stabilization of β -casein by K-casein against precipitation by calcium chloride. J. Dairy Sci. 46(11):1188-1192, 1963.
63. ZITTLE, C.A.; CERBULIS, J.; PEPPER, L. & DELLA MONICA, E.S. Preparation of calcium sensitive α -casein. J. Dairy Sci. 42(12):1897-1903, 1959.

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA AÇÃO DAS ENZIMAS COAGULANTES SOBRE
A CASEÍNA ÁCIDA E SUAS FRAÇÕES α , β E κ .

CORREÇÕES

- (1). A enzima renina deste trabalho refere-se a renina (Rennet enzyme) do quarto estômago de ruminantes jovens.
- (2). Página - iii - linha 1 tem-se: coagulating enzyme
leia-se: milk coagulating enzyme .
- (3). Página 19, ítem 3.1 letra c tem-se: Mucor miehei e renina que foram obtidas em laboratório.
leia-se: Enzima coagulante do Mucor miehei e renina (Rennet enzyme) foram obtidas em nosso laboratório.
- (4). Página 23, a unidade Soxhlet da fórmula é definida como a atividade da enzima que coagula 1.0ml de substrato (leite) em 40 minutos, para as condições descritas.