

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

Parcer

Este exemplar corresponde a edição final da tese defendida por Honório Domingos Benedet e aprovada pela Comissão Examinadora em 29.11.85.
Campinas, 29 de novembro de 1985.

Jaime Mat
Presidente da Banca

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO ENZIMÁTICA DOS
COALHOS COMERCIAIS BRASILEIROS

Honório Domingos Benedet

Orientador

Prof. Dr. Jaime Amaya Farfan

02/85

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

CAMPINAS

1985

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
BIBLIOTECA CENTRAL

À minha esposa Sônia e aos meus filhos Daniel e Leandro, pela compreensão, estímulo e amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. *Jaime Amaya Farfan*, pela sua valiosa e dedicada orientação na preparação deste trabalho.

À Profª Dra. *Iracema de Oliveira Moraes*, Diretora da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas.

Ao Prof. Dr. *V. C. Sgarbieri*, pelo uso do coletor de frações.

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

À Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela licença concedida.

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

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

À Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação (ABIA), pela colaboração nas cópias deste trabalho.

Í N D I C E

	Pág.
RESUMO	xii
SUMMARY	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Métodos de isolamento e identificação de enzimas coagulantes em coalhos	3
2.1.1. Identificação de coalhos pelo método de difusão em gel de ágar-caseína	3
2.1.2. Separação dos coalhos pelo método de difusão em gel de ágar-amido	5
2.1.3. Identificação de enzimas coagulantes por eletroforese	6
2.1.4. Separação e diferenciação de enzimas coagulantes por cromatografia em papel e coluna	9
2.1.5. Diferenciação dos coalhos por filtração em gel	11
2.1.6. Identificação imunológica das enzimas do coalho	13
2.1.7. Diferenciação de coalhos pela sua atividade proteolítica	15
2.1.8. Determinação quantitativa de enzimas coagulantes componentes de coalhos por variação do pH e concentração de uréia	17
2.1.9. Identificação de enzimas pela inibição da atividade de coagulante	21
2.1.10. Identificação de enzimas coagulantes pela inibição da lipase microbiana	21
2.1.11. Outros métodos de identificação de enzimas coagulantes	21

3.	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1.	Material	24
3.1.1.	Amostras utilizadas	24
3.1.2.	Reagentes	24
3.1.3.	Equipamentos	24
3.2.	Métodos	25
3.2.1.	Obtenção das enzimas	25
3.2.2.	Fracionamento dos coalhos comerciais	25
3.2.3.	Preparo da coluna de gel Sephadex	26
3.2.4.	Determinação da atividade coagulante dos coalhos e enzimas	26
3.2.5.	Diferenciação das enzimas coagulantes em meio gel de ágar-caseína	27
3.2.6.	Eletroforese em gel de poliacrilamida, das enzimas coagulantes componentes dos coalhos	27
3.2.7.	Determinação da atividade proteolítica dos coalhos e enzimas coagulantes utilizadas como padrões	28
3.2.8.	Determinação do conteúdo total de cálcio no leite	28
3.2.9.	Inativação das enzimas coagulantes pelo cloro ativo	28
3.2.10.	Análise dos aminoácidos do soro de leite coagulado com várias enzimas coagulantes	30
3.2.11.	Análise microbiológica dos coalhos comerciais	31
3.2.12.	Determinação da proteína total dos coalhos comerciais amostrados	31
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1.	pH dos coalhos amostrados	32
4.2.	Determinação da proteína total dos coalhos amostrados	32

4.3.	Determinação da qualidade bacteriológica dos coalhos comerciais amostrados	35
4.4.	Determinação da atividade coagulante dos coalhos amostrados	37
4.5.	Determinação da atividade proteolítica dos coalhos amostrados	38
4.6.	Perfil dos aminoácidos livres presentes nos soros de leite desnatado após coagulação com as enzimas estudadas	42
4.7.	Influência da concentração de cálcio na coagulação enzimática do leite	49
4.8.	Influência do cloro ativo na atividade coagulante das enzimas padrão e coalhos comerciais O e Q	51
4.9.	Diferenciação das enzimas coagulantes em meio gel de ágar-caseína	58
4.10.	Filtração em gel Sephadex G-100 dos coalhos comerciais amostrados	67
4.11.	Eletroforese normal das frações dos padrões e coalhos comerciais com atividade coagulante	80
5.	CONCLUSÕES	86
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
7.	ANEXO	103

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
TABELA 1 - Valores de pH dos coalhos comerciais amostrados para este estudo	33
TABELA 2 - Proteína total dos coalhos comerciais amostrados	34
TABELA 3 - Análise microbiológica dos coalhos comerciais amostrados	36
TABELA 4 - Atividade coagulante dos coalhos comerciais em unidades Soxhlet	39
TABELA 5 - Atividades proteolítica em mg de tripsina, das enzimas padrão em função do pH da reação de coagulação	43
TABELA 6 - Atividade proteolítica em mg de tripsina, dos coalhos comerciais usando caseína como substrato	44
TABELA 7 - Perfil dos aminoácidos livres presentes nos soros de leite desnatado após coagulação, com as enzimas estudadas	48
TABELA 8 - Influência do cálcio adicionado e do pH na velocidade de coagulação do leite pela enzima coagulante do <i>Mucor miehei</i> , expressa em unidades Soxhlet	52

TABELA 9	- Influência do cálcio adicionado e do pH na velocidade de coagulação do leite pela enzima coagulante do <i>Mucor pusillus</i> , expressa em unidades Soxhlet	53
TABELA 10	- Influência do cálcio adicionado e do pH na velocidade de coagulação do leite pela enzima coagulante da <i>Endothia parasitica</i> , expressa em unidades Soxhlet	54
TABELA 11	- Influência do cálcio adicionado e do pH na velocidade de coagulação do leite pela pepsina porcina, expressa em unidades Soxhlet	55
TABELA 12	- Influência do cálcio adicionado e do pH na velocidade de coagulação do leite pela pepsina bovina, expressa em unidades Soxhlet	56
TABELA 13	- Influência do cálcio adicionado e do pH na velocidade de coagulação do leite pela renina, expressa em unidades Soxhlet	57
TABELA 14	- Influência da concentração de cloro ativo na velocidade coagulante da enzima do <i>Mucor miehei</i> , expressa em unidades Soxhlet	59
TABELA 15	- Influência da concentração de cloro ativo na velocidade coagulante da enzima do <i>Mucor pusillus</i> , expressa em unidades Soxhlet	60
TABELA 16	- Influência da concentração de cloro ativo na velocidade coagulante da enzima da <i>Endothia parasitica</i> , expressa em unidades Soxhlet	61
TABELA 17	- Influência da concentração de cloro ativo na velocidade coagulante da pepsina porcina,	

expressa em unidades Soxhlet	62
TABELA 18 - Influência da concentração de cloro ativo na velocidade coagulante da pepsina bovina, expressa em unidades Soxhlet	63
TABELA 19 - Influência da concentração de cloro ativo na velocidade coagulante da renina, expressa em unidades Soxhlet	64
TABELA 20 - Influência da concentração de cloro ativo na velocidade coagulante do coalho comercial Q, expressa em unidades Soxhlet	65
TABELA 21 - Influência da concentração de cloro ativo na velocidade coagulante do coalho comercial O, expressa em unidades Soxhlet	66

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1 - Curva da tripsina pelo método de Kunitz	29
FIGURA 2 - Ação das enzimas coagulantes utilizadas como padrão em meio gel de ágar-caseína	68
FIGURA 3 - Ação dos coalhos comerciais amostrados A, B, C, D e E em meio gel de ágar-caseína	69
FIGURA 4 - Ação dos coalhos comerciais amostrados F, G, H, I e J em meio gel de ágar-caseína	70
FIGURA 5 - Ação dos coalhos comerciais amostrados L, M e N em meio gel de ágar-caseína	71
FIGURA 6 - Ação dos coalhos comerciais amostrados O, P e Q em gel de ágar-caseína	72
FIGURA 7 - Cromatografia da renina em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante	74
FIGURA 8 - Cromatografia da pepsina porcina em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante	75
FIGURA 9 - Cromatografia da pepsina bovina em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante	76
FIGURA 10 - Cromatografia da enzima do <i>Mucor miehei</i> em Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante	77
FIGURA 11 - Cromatografia da enzima do <i>Mucor pusillus</i> em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante	78

- FIGURA 12 - Cromatografia da enzima da *Endothia parasitica* em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante 79
- FIGURA 13 - Cromatografia do coalho comercial O em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante 81
- FIGURA 14 - Eletroforese em gel normal de poliacrilamida, pH 7,0, das enzimas coagulantes usadas como padrão. 84
- FIGURA 15 - Eletroforese em gel normal de poliacrilamida da fração Sephadex dos coalhos comerciais A, B, C, D, E, e F, que mostrou atividade coagulante 85
- FIGURA 16 - Eletroforese em gel normal de poliacrilamida da fração Sephadex dos coalhos comerciais G, H, I, J, L e M, que mostrou atividade coagulante 86
- FIGURA 17 - Eletroforese em gel normal de poliacrilamida da fração Sephadex dos coalhos comerciais N, O, P e Q, que mostrou atividade coagulante 87

RESUMO

Dezesseis coalhos comerciais, obtidos nas regiões centro sul e sul do Brasil, foram estudados, objetivando caracterizar os mesmos em termos das enzimas coagulantes neles contidas.

Perfis de aminoácidos livres nos soros resultantes da ação das diferentes enzimas (renina, pepsina bovina, pepsina porcina e dos fungos *Endothia parasitica*, *Mucor miehei* e *Mucor pusillus*) em leite desnatado mostraram diferenças quantitativas entre os mesmos. Não houve, porém, relação clara entre as atividades proteolíticas das enzimas e o nível de aminoácidos liberados. Todavia, foi observado que a enzima da *Endothia parasitica* liberou seis vezes mais fenilalanina que o encontrado no soro após precipitação ácida, enquanto que a enzima do *Mucor pusillus* promoveu a liberação de quantidade considerável de carnosina.

A aplicação do método de difusão de enzimas coagulantes em gel de ágar-caseína, capaz de distinguir entre si os seis tipos de enzimas, revelou que a maioria dos coalhos amostrados possui atividade de pepsina bovina. O único coalho rotulado como sendo de vitelo apresentou a difusão característica da renina.

As frações dos coalhos comerciais com atividade coagulante, obtidas por filtração em gel Sephadex G-100, foram submetidas a eletroforese em gel normal de poliacrilamida e as bandas resultantes comparadas com as dos padrões. Todas as fra-

ções apresentaram uma banda principal, cuja mobilidade e aspecto coincidiram com as da pepsina bovina, menos uma, que exibiu duas bandas, uma intensa, comparada à da renina, e outra tênue, com mobilidade semelhante à da pepsina bovina.

Partindo das enzimas coagulantes cromatograficamente homogêneas, estudou-se a influência da concentração do íon cálcio na velocidade de coagulação. A concentração de cálcio que forneceu a velocidade máxima de coagulação foi 58 e 68 mM para as duas pepsinas e para as outras enzimas, respectivamente, a pH 5,0 e 35°C.

Estudou-se também o comportamento das enzimas frente ao cloro ativo. As experiências mostraram que todas sofreram inativação quando a concentração atingiu 100 ppm. No caso da renina, o efeito foi notável, sendo esta enzima completamente inativada com apenas 10 ppm de cloro ativo.

SUMMARY

Sixteen commercial rennets sampled in Brazil's middle southern and southern regions were characterized in terms of their constituting enzymes.

Free amino acid profiles of the wheys resulting from the action of the enzymes rennin, bovine pepsin, porcine pepsin, and these of the fungi *Endothia parasitica*, *Mucor miehei* and *Mucor pusillus* on defatted milk revealed that quantitative differences associated with the type of enzyme used are likely to occur. No clear relationship was found, however, between the proteolytic activity of each enzyme and the level of free amino acids released. On the other hand, it was observed that the *Endothia parasitica*'s enzyme liberated six times more phenylalanine and that of *Mucor pusillus* enzyme liberated considerably more carnosine than found in the acid-produced whey.

Testing all the enzyme standards and the rennet samples by the method of diffusion in agar-casein gel it was possible to distinguish among the six different enzymes and to ascertain that all but one of the rennets were of the bovine pepsin type. The only exception, a rennet labeled as being from calf origin, showed, upon analysis, the typical pattern of rennin.

The rennets were fractionated in Sephadex G-100 columns and the fractions with coagulating activity were compared by normal polyacrylamide-gel electrophoresis (PAGE) with the standard enzymes. Such fractions showed one main band which coincided with that of bovine pepsin for all the rennets, except for one which had the same mobility of rennin: the rennet of

calf origin. This latter rennet exhibited a PAGE pattern which also suggested the presence of minor amounts of bovine pepsin.

Influence of the calcium ion concentration on the rate of coagulation was studied on the chromatographically homogeneous coagulating enzymes. Optimal rates were obtained at 58 and 68 mM of Ca^{++} for the the two pepsins and the other enzymes, respectively, at pH 5,0 and 35°C.

The effect of active chlorine on the enzyme activity was also studied. The results showed that all enzymes underwent inactivation when the active chlorine concentration reached 100 ppm. Rennin was particularly sensitive an enzyme to this type of treatment since it was completely inactivated with 10 ppm of chlorine.

1. INTRODUÇÃO

A produção industrial, bem como a manufatura de queijos em pequena escala, foi baseada, durante muitos anos, principalmente no uso de coalho de origem animal, sendo o coalho de vitelo o que melhor convinha para essa finalidade. Diminuições temporárias de coalho de vitelo tem havido em vários países, mas uma diminuição crônica tem ocorrido nos últimos tempos. Os fatores que mais concorreram para essa diminuição foram o aumento da procura de carne bovina que, por sua vez, tem causado redução no rebanho de bezerros alimentados para a produção de carne de vitelo e estômagos, maior produção de leite por vaca, através do prolongamento do período de lactação, que tem causado relativo declínio no número de bezerros.

A diminuição do suprimento, flutuação dos preços além dos níveis normais e a variação da qualidade dos coalhos originários de estômagos de vitelo, fizeram com que os produtores, a fim de assegurarem a quantidade necessária de matéria prima, utilizassem estômagos de bovinos adultos. Disso resultou que a composição enzimática do coalho comum foi sendo gradualmente alterada, ou seja, o teor de renina reduzido e o de pepsina aumentado correspondentemente. Além disso, sucitou esforços para se descobrir substitutos alternativos e, assim, ao lado dos coagulantes de origem animal, surgiram aqueles provenientes de microrganismos capazes de produzir enzimas com propriedades coagulantes análogas. Por conseguinte, disso tudo resulta um quadro onde há várias possibilidades para a composição de um coalho.

Como se sabe, a mais óbvia função do coalho é a conver-

são do leite líquido em um gel. Todavia, certa proporção de coalho é normalmente incorporada à coalhada, e quase sempre, resiste desde o processamento até o final da cura. Esse coalho residual contribui para a proteólise no queijo durante a maturação.

As enzimas variam na sua atividade e especificidade, no caminho e no tipo de proteólise. Assim, o desenvolvimento da textura, odor e sabor dos queijos, são em grande parte dependentes do coalho utilizado.

O conhecimento da composição enzimática dos coalhos comerciais brasileiros ganhou importância a partir de 1976, quando iniciou-se a produção de queijos nobres, devido principalmente a proibição da entrada de queijos estrangeiros no país, pelo Ministério da Fazenda, por considerá-los produtos supérfluos. Portanto, resolvemos fazer este estudo, que visa principalmente o conhecimento da composição enzimática dos coalhos comerciais brasileiros, já que pouco se conhece a respeito, e também determinar outros parâmetros, dentre eles a qualidade e atividade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Métodos de isolamento e identificação de enzimas coagulantes em coalhos

2.1.1. Identificação de coalhos pelo método de difusão em gel de ágar-caseína

Uma modificação do método da difusão em gel de ágar-caseína de Cheeseman (18) foi usado por Ganguli e Bhalezao (28) para distinguir os coalhos de origem animal dos de origem microbiana. O método é baseado no aparecimento de duas ou mais zonas de precipitação e rápida mobilidade no caso do coalho de vitelo, ao passo que no caso dos coalhos microbianos aparecem duas zonas de precipitação densa e pequena mobilidade.

Koning e colaboradores (48) e Retter e Shilt (94) testaram esse método com diferentes tipos de coalho e confirmaram as observações de Ganguli e Bhalerao. Ficou demonstrado porém que o método não é viável para misturas de coalho de vitelo e microbiano.

Atualmente, o uso de coalhos isolados de estômagos de bovinos adultos está aumentando. Resultados variados tem sido mencionados por Martens (55) com respeito a aplicação do método da difusão em gel de ágar-caseína a soluções de coalhos comerciais.

Foi também observado por Koning (45) que uma segunda banda de precipitação perto do centro, aparecia para muitos coalhos isolados desses estômagos velhos. Todavia, ele demonstrou que essa zona de precipitação ao redor do centro não é causada pela pepsina, e sua verdadeira origem não é conhecida até o pre-

sente momento.

Lawrence e Sanderson (50), que usaram o método da difusão em gel de ágar-caseína para estimar quantitativamente os coalhos, mostraram que o número de zonas brancas de precipitação dependiam da temperatura, da concentração de cálcio e pH do meio. A partir dessas observações concluíram que o método não é universalmente aplicável para se fazer a diferenciação entre os coalhos de origem animal dos de origem microbiana. No entanto, parece que essa opinião é até certo ponto questionável. Se os experimentos são feitos usando-se amostras controle de coalho de vitelo e em condições controladas, o número e a distância das zonas de precipitação a partir do centro darão um claro padrão, a partir do qual a diferenciação entre coalho de vitelo e microbiano, não misturados, se torna muito fácil.

Recentemente Richardson (81) investigou novamente o uso do método de difusão em gel de ágar-caseína a pH 6,85. Em 24 horas, o coalho de vitelo produziu zonas de precipitação primária e secundária, separadas por uma zona ampla e clara.

Coagulantes isolados da *Endothia parasítica* e do *Mucor pusillus* Lindt produziram zonas únicas de intensidade variável próximo ao centro da placa de gel. Houve indicação de que menos de 1% de qualquer coalho microbiano em mistura com renina, ou mistura de renina pepsina a 50% poderão ser detectados a partir da forma da zona secundária. O aparecimento de uma pequena zona primária de diâmetro reduzido no caso da pepsina porcina foi parcialmente explicada pelo alto pH do meio (84 e 96) que inativa o enzima.

Esta inativação foi usada por Richardson e Chaudhari (83) no seu método para detecção de coalho de bovino adulto em

mistura com coalho de vitelo. Esses autores mostraram que quando o teste da difusão em gel de ágar-caseína é aplicado a pH 9,0 ao invés de pH 6,85, não aparecem zonas de precipitação no caso da renina e pepsina porcina. A presença de pepsina bovina em mistura com renina poderá ser detectada a uma concentração inferior a 1%, pelo aparecimento de uma zona clara. Esta zona clara tem origem na presença de uma protease no coalho de bovino adulto que ainda é ativa a pH 9,0. Esse método tornou possível fazer-se a diferenciação entre coalhos de estômagos de vitelo daqueles de estômagos de bovinos adultos. Todavia, é bom lembrar que a atividade proteolítica a pH 9,0, dos coalhos obtidos de bovinos adultos não depende propriamente da pepsina, mas da presença de uma protease de características diferentes daquela da pepsina porcina e renina.

A conclusão a que se pode chegar é que o método de difusão em gel de ágar-caseína a pH 9,0 é viável apenas para a estimativa qualitativa da pepsina bovina em coalho de vitelo.

2.1.2. Separação dos coalhos pelo método de difusão em gel de ágar-amido

Koning e colaboradores (48) desenvolveram um método de separação de coalhos em dois grupos, levando em conta a presença de amilase como acompanhante dos mesmos. Usando-se o método da difusão em gel de ágar-amido, podemos demonstrar a presença ou ausência de amilase nos coalhos, dividindo-os em amilase positiva e amilase negativa. Coalhos substitutos isolados do *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* Lindt, *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* demonstraram ser amilase positiva, enquanto que o coalho de vitelo, pepsina porcina, e coalho isolado da *Endothia para-*

sitica deram amilase negativa.

Misturas de coalho de vitelo com preparações de coalhos com amilase positiva podem ser identificadas combinando-se a eletroforese em papel a pH 6,8 e localizando-se a atividade amilásica depois da eletroforese, mergulhando-se as tiras de papel numa solução de amido. Quando em mistura com coalhos de amilase negativa, são diferenciados determinando-se a estabilidade ao armazenamento a pH 6,95. Identificação adicional pode ser obtida por eletroforese em papel a pH 6,8.

2.1.3. Identificação de enzimas coagulantes por eletroforese

A separação da pepsina porcina em mistura com coalho de vitelo por microeletroforese foi descrita por Simonart e Kwang (93). Esses autores mostraram que os melhores resultados foram obtidos com eletroforese a pH 6,3.

Resultados análogos foram obtidos em mistura de pepsina porcina e coalho de vitelo, pela aplicação de eletroforese livre e em papel a pH 6,8. Somando-se a isso, uma boa separação entre renina e pepsina foi obtida pelo uso de eletroforese em gel de amido a pH 2,0. A esse pH, é possível ainda detectar a atividade das bandas separadas cobrindo-se o gel com uma fina camada de ágar-caseína. Além disso, essa técnica permite a separação satisfatória entre renina, pepsina porcina e pepsina bovina (48).

A técnica da eletroforese foi também usada por Alais e Novak (3) na identificação de coalho isolado da *Endothia parasitica*, comparando-a com coalho de vitelo. Nas investigações foram usados acetato de celulose, papel Whatman nº 1, gel de

ágar e gel de poliacrilamida, sendo que a melhor separação ocorreu em acetato de celulose a pH 8,6. Uma das desvantagens desse alto pH é que a amostra de coalho em estudo perde a atividade. A aplicação da eletroforese em gel de amido foi mencionada também por Ritter e Schilt (84). Ainda que uma boa separação tenha sido obtida no estudo com quimosina, renina e pepsina, a clara identificação das bandas ofereceu alguns problemas devidos a atividade não poder ser propriamente testada.

Também Edwards e Kosikowski (24) comprovaram a utilidade da eletroforese em gel de poliacrilamida quando a usaram para determinar o tipo de coagulante utilizado na fabricação de queijo. Comprovaram também que o método é potencialmente utilizável para identificar substitutos da renina.

A eletroforese em gel de amido e poliacrilamida foi empregada num grande número de investigações com a finalidade de estudar a ação proteolítica de enzimas coagulantes na pasta de queijo, na caseína e suas frações α , β e K (27 e 61). O resultado das investigações mostrou que as bandas eletroforéticas dos produtos resultantes da proteólise diferiam muito entre as diversas enzimas estudadas, tendo essas investigações, levado ao conhecimento de mais informações concernentes à especificidade proteolítica das enzimas durante a cura do queijo.

Em estudos feitos para testar a homogeneidade de zimo-gênios gástricos bovinos purificados, Antonini e Dumas (8) também usaram a eletroforese em gel de amido e gelose.

Shovers e Fossum (90) desenvolveram um sistema de eletroforese em gel de poliacrilamida para separar misturas de coagulantes comerciais de leite, onde as bandas das amostras eram tornadas visíveis cobrindo-se o gel com uma fina camada de

leite. As áreas do gel onde existia atividade coagulante apresentavam zonas de leite coagulado que eram facilmente observáveis. O sistema é bastante sensível para separar até 5% de coagulante em mistura com outros coagulantes de leite.

Antonini e Cisneros (7) também separaram renina e pepsina II em mistura no suco gástrico e em coalho comercial por eletroforese em gel de ágar. Após eluição, a atividade das soluções enzimáticas foi medida pelo tempo de coagulação em solução de k-caseína, e os resultados expressos pela proporção R da renina para a pepsina. A precisão de R foi de 5%. A reprodutibilidade determinada com solução de pepsina foi de 3%.

Perufo e colaboradores (76) usaram a técnica da eletroforese em SDS-PAGE para identificar enzimas coagulantes de leite de origem animal e microbiana puras ou em mistura. As proteínas termolábeis do *Mucor miehei* e do *Mucor pusillus* exibiram apenas duas bandas. A banda com menor mobilidade e mais proeminente foi claramente distinguida em padrões obtidos de misturas com 0,5% (em base protéica) de proteinase do *Mucor miehei* e 99,5% de enzimas coagulantes de origem animal. Segundo os autores, essa técnica pode ser usada como procedimento rotineiro para se conhecer a composição enzimática de coagulantes comerciais.

Panari e Fossa (73) separaram a pepsina bovina presente no produto comercial mediante o uso da eletroforese em gel de ágar, usando tampão citrato pH 5,6. Obtiveram duas frações, uma contendo renina e pepsina I, que possuem mobilidade pequena, e outra contendo pepsina II que é o componente maior da pepsina. Esse método consiste de dois processos fundamentais: extração das frações do ágar, utilizando-se uma solução de soroalbumina,

e determinação instrumental da atividade coagulante dos extratos filtrados. O método requer certo trabalho manual, porém se presta bem para análises de rotina e sua reproducibilidade é satisfatória.

Uma outra técnica, a focalização isoelétrica, utilizando gradiente de tampão Ampholine em pH 3,0 a 10,0 foi usada por Koning e colaboradores (47), para identificar renina, pepsina bovina e porcina e proteases microbianas isoladas do *Mucor pusillus* Lindt, *Mucor miehei* e *Endothia parasitica*. Segundo o autor, as pepsinas bovina e porcina, com pH isoelétrico abaixo de 1,0 foram caracterizadas pela presença de bandas pequenas; enquanto que as outras enzimas foram identificadas pela determinação dos pHs característicos em gradiente de pH 3,0 a 7,0, usando-se beta-lactoglobulina AB e Ovalbumina A₁ e A₂ como padrões internos.

Molinari (63) também vem usando satisfatoriamente a técnica da focalização isoelétrica há vários anos. Ele acha que o método é simples embora aparentemente não o seja, e o único capaz de separar, reconhecer e possivelmente quantificar, numa única análise qualquer coagulante incógnito, seja ele um produto puro ou mistura de vários produtos.

2.1.4. Separação e diferenciação de enzimas coagulantes por cromatografia em papel e coluna

Com a finalidade de separar pepsina porcina em mistura com renina Simonart e Kwang (93) fizeram uso da cromatografia em papel. Segundo eles, os melhores resultados foram obtidos a pH 4.1.

O'Leary e Fox (71) empregaram o método da cromatografia em DEAE-celulose em tampão de piperazina 0,02 M e pH 5,3, para fracionar coalhos comerciais contendo uma ou várias enzimas em dois grupos: No primeiro grupo (pico A) ficaram a renina, *Mucor pusillus* e *Mucor miehei*, eluídas a 0,2 M de cloreto de sódio e no segundo grupo (pico B) pepsina bovina e pepsina porcina eluídas a 0,4 M de cloreto de sódio.

Também Garnot e colaboradores (30) usaram a cromatografia em DEAE-celulose para analisar quantitativamente a renina e pepsina em extrato de estômagos de pré-ruminantes, com a finalidade de determinar a influência das proteínas da dieta no conteúdo das enzimas citadas.

Coalhos obtidos de estômagos fistulados de bois e búfalos, além de coalho comercial da Hansen, foram analisados por Angelo (5), utilizando cromatografia em DEAE-celulose e cromatografia em gel de poliacrilamida. O coalho da Hansen foi fracionado em 10 componentes e o dos estômagos fistulados de bois e búfalos em 9, usando tampão fosfato pH 7,0 e gradiente linear de cloreto de sódio.

Islan e colaboradores (41) isolaram e purificaram uma protease obtida do *Bacillus cereus*, fazendo uso da cromatografia em coluna de DEAE-celulose e DEAE-Sephadex como parte da metodologia utilizada.

Utilizando como parte do procedimento a cromatografia em coluna de Sepharose 4B-poly-L-lisina, Patrick e colaboradores (74) conseguiram isolar e caracterizar a pepsina de origem caprina a partir de homogenados aquosos de estômago.

Com a finalidade de separar e quantificar a renina e

pepsina II a partir de misturas, Garnot e colaboradores (29) descreveram um método utilizando cromatografia em coluna de DEAE-celulose equilibrada em tampão de piperazina a pH 5,3. A eluição das enzimas ocorreu em gradiente linear de cloreto de sódio, sendo que a renina foi eluída na primeira fração e a pepsina II na segunda. Esse método foi usado para determinar a composição enzimática de vários coalhos comerciais e sucos gástricos coletados de estômagos fistulados de animais.

O método de Garnot (29) usado para a determinação da composição enzimática dos coalhos, foi modificado por Corradini (20) no que se refere às condições de eluição, que não mais é feita em gradiente de concentração, mas sim utilizando-se duas alíquotas de 100 mL de cloreto de sódio 0,25 e 0,5 M, respectivamente. Esse método foi adotado como rotineiro pelo autor, por ter sido constatado que com ele se obtinham resultados comparáveis àqueles obtidos com o método de Northrop e colaboradores, que era usado anteriormente.

Utilizando cromatografia em coluna de gel Sephadex G-75 e também de Carboxibenzoxi-D-fenilalanil-trietileno-tetramina - Sepharose-4B, Richardson (80) conseguiu purificar a protease extracelular produzida pela *Pseudomonas fluorescens*.

Laxer (51), usou principalmente a cromatografia em coluna de DEAE-celulose para purificar uma enzima termofílica que ocorre no meio de cultura de *Actinomicetos*.

2.1.5. Diferenciação dos coalhos por filtração em gel

Fracionamento de preparações enzimáticas por filtração em gel foi aplicado por Ritter e Schilt (84). O diagrama de e-

luição dos coalhos de origem animal mostrou considerável similaridade. No entanto, os coalhos de origem microbiana mostraram seu próprio diagrama característico. Tendo em conta esses resultados é possível concluir que a técnica da filtração em gel é apenas parcialmente conveniente para a diferenciação entre coalhos de origem animal e microbianos.

A filtração em gel Sephadex G-100 foi utilizada por Backri e Ashworth (11) para purificar quimosina a partir de coalhos comerciais. Da filtração resultaram quatro picos de absorção na faixa de 278 nm. Os picos 1 e 2 foram os que apresentaram componentes com maior absorção nesse comprimento de onda, enquanto que a coagulação do leite se restringiu ao pico 2, como mais uma evidência de componente ativo.

Cinco amostras de coalhos comerciais, coalho preparado no laboratório e coalho da Hansen 50/50, todos líquidos, foram fracionados em gel Sephadex G-100 por Naguib e colaboradores (68). O coalho da Hansen 50/50 forneceu três picos com atividade coagulante, e o preparado no laboratório deu quatro picos, enquanto que as amostras comerciais de coalho resultaram num número de picos que variava de três a seis. Em todos os casos, os picos com atividade coagulante eram precedidos por um ou dois picos de alto peso molecular sem atividade proteolítica.

Patrick e colaboradores (74) também usaram a filtração em gel Sephadex G-100 como parte da metodologia utilizada por eles para isolar e caracterizar a pepsina de origem caprina, a partir de homogenados de estômagos.

2.1.6. Identificação imunológica das enzimas do coalho

A aplicação de técnicas imunológicas é outro caminho para a identificação dos substitutos do coalho de vitelo. No trabalho de Iwasaki e colaboradores (42) a presença de coalho isolado do *Mucor pusillus* Lindt foi especificamente demonstrada por essa técnica. Renina, pepsina e proteases ácidas do *Aspergillus oryzae* e filtrados de cultura de algumas cepas de *Mucor* e *Rhizopus* não reagiram com o antissoro, demonstrando assim a especificidade do método.

Trabalho similar foi feito por Elliot e Emmons (25), obtendo sucesso em preparar antissoro contra renina e coalhos substitutos isolados do *Mucor pusillus* Lindt e *Endothia parasitica*. Observaram também que a pepsina porcina é um antígeno fraco. Essa técnica é de tal especificidade que além de identificar os diferentes tipos de enzimas no coalho, identifica-as também nos queijos com elas produzidos.

Rothe e colaboradores (86) produziram anticorpos mono-específicos contra a renina e pepsina bovina A em coalhos e usaram-nos para medir quantitativamente essas enzimas por imuno-eletroforese ascendente. A pepsina bovina A foi identificada e medida quantitativamente em imuno-eletroforese cruzada, usando uma preparação de anticorpos poliespecíficos. O conteúdo de pepsina bovina A e renina foram também determinados por outros métodos e os resultados obtidos estavam em boa concordância. A vantagem dos métodos imunológicos é a identificação e quantificação direta e simultânea das enzimas. Os mesmos autores (87) usaram ainda o método de imuno-eletroforese ascendente para identificar e quantificar quimosina e pepsina A e B em 40 amostras de coalhos comerciais, usando anticorpos monoespecíficos contra

as três enzimas citadas.

Continuando os estudos, Resmini e colaboradores (79) concluíram que em se usando antissoros específicos, as técnicas imunológicas da dupla imunodifusão e imunodifusão radial permitem resolver quase todos os problemas relativos ao controle da atividade dos coagulantes de leite. Comparando-a com outras técnicas, a imunodifusão apresenta muitas vantagens como a absoluta especificidade, elevada sensibilidade e acuidade quantitativa, boa rapidez de resposta e notável simplicidade de execução. Inconveniente maior reside obviamente na disponibilidade comercial dos antissoros.

Harboe (33) e Johnk (43) também usaram a imunoeletroforese para analisar enzimas coagulantes em coalhos comerciais. Pelos resultados obtidos, acharam-no bastante conveniente, pois forneceu uma detecção qualitativa e uma estimação percentual da atividade para todas as enzimas presentes na amostra.

Collin e colaboradores (19) usaram antissoros monoespecíficos para identificar enzimas coagulantes eventualmente adicionadas a renina ou a coalhos bovinos, usando a técnica da imunodifusão dupla. A faixa de sensibilidade expressa em atividade coagulante foi de 1%. Segundo eles, esse método qualitativo veio complementar o procedimento quantitativo proposto recentemente para determinar a quimosina e pepsina bovina A em coalhos comerciais bovinos.

Uma combinação dos métodos imunoquímicos e de difusão foi usada por Matheson (58) para determinar especificamente a presença de quimosina em queijos, na presença de outras enzimas coagulantes com especificidade similar. A atividade da quimosi-

na se mostrou constante durante a maturação dos queijos Camembert e Cheddar; ausente em queijo suíço e fracamente detectável em queijo mozzarella.

Mais recentemente, Rampilli e Mucchetti (77) testaram a imunoeletroforese em forma de foquete (RIE) em oito misturas de enzimas com atividades coagulantes conhecidas. Os resultados mostraram que a quimosina e as proteases do *Mucor miehei* e *pusillus* apresentaram atividade inferior à real, enquanto que a pepsina bovina e, especialmente a pepsina porcina mostraram atividade acima da real.

2.1.7. Diferenciação de coalhos pela sua atividade proteolítica

Durante a ação do coalho na caseína do leite três diferentes fases podem ser observadas. Uma proteólise limitada da k-caseína tem lugar na fase primária da ação do coalho. Esta é seguida pela fase secundária, na qual o leite é gradualmente coagulado. Durante o curso da fase terciária ocorre uma decomposição inespecífica da caseína. Foi demonstrado também que muitos substitutos do coalho de vitelo, de origem microbiana, mostram um aumento da atividade proteolítica durante a fase terciária do ataque dessas enzimas sobre a caseína (84). Essa observação foi usada por Behnke e colaboradores (13) como um indicador para a diferenciação entre enzimas de origem animal e microbiana. O mesmo autor usou também o quociente entre a atividade coagulante específica do coalho a pH 6,5 e a atividade proteolítica específica do mesmo coalho a pH 5,5, como valor característico para a diferenciação das preparações enzimáticas. O valor desse quociente variou de 5.800 a 8.200 para o coalho de vitelo e pepsina e de 5 a 95 para as outras enzimas.

Há algum tempo atrás a ação proteolítica de algumas enzimas coagulantes foram comparadas em caseína e no queijo, por Mickelsen e Fish (62). Para esse propósito, enzimas coagulantes isoladas da *Endothia parasítica* e do *Mucor pusillus* Lindt foram comparadas com a renina e pepsina porcina. As enzimas de origem fúngica mostraram uma atividade proteolítica bem maior do que a renina ou pepsina em caseína e suas frações alfa e beta, bem como em queijo fresco. Não houve aumento significativo no nitrogênio não protéico pela ação da renina ou pepsina sobre a alfa e beta-caseína.

Embora a determinação da atividade proteolítica de um novo tipo de coalho seja muito importante para avaliar sua boa qualidade na produção de queijo, esse método é de pouco valor para a distinção entre coalhos de origem animal e microbiológica.

Para a produção de queijo, tanto os coalhos de origem microbiana como os de origem animal devem ter baixa atividade proteolítica. Isto significa, que para um bom coalho substituto o método de identificação baseado na sua atividade proteolítica deverá ser de baixa sensibilidade.

O hexapeptídeo HLe-Ser-Phe(NO₂)NLe-Ala-OMet foi proposta por Raymond (78) como referência para a determinação da atividade proteolítica da renina. Esse peptídeo, que é prontamente hidrolizado pela enzima, contém uma prova espectroscópica Phe(NO₂), que facilita a determinação rotineira da atividade da enzima.

Um grande número de investigações tem sido feitas para estudar a ação proteolítica de coalhos na pasta do queijo, na caseína e suas frações alfa, beta e kapa por meio de eletrofo-

rese em gel de poliacrilamida e gel de amido. Os resultados das investigações mostram que as bandas eletroforéticas dos produtos da proteólise diferem consideravelmente entre os coalhos de várias origens (61, 62 e 95). Embora essas investigações tenham levado principalmente a obter mais informações concernentes a especificidade proteolítica das enzimas durante a cura do queijo, esse método não deixa dúvidas em ser de alguma ajuda na identificação de amostras de coalhos desconhecidos.

2.1.8. Determinação quantitativa de enzimas coagulantes componentes de coalhos por variação do pH e concentração de uréia

Das investigações de Malpress (54) e de Turner e colaboradores (100), sabe-se que a taxa de inativação da renina a pHs acima de 7,0 é bem menor do que a da pepsina. Este princípio, foi usado por Shovers e Kornowski (91) num método bastante acurado e simples que descreveram para medir a atividade da renina em mistura com pepsina porcina. O método é baseado na inativação irreversível e quantitativa que a pepsina sofre a pH 7,3. Nessas condições suaves de alcalinidade, a renina é apenas ligeiramente afetada. Renina padrão serve como controle para corrigir esse efeito. O método é muito simples, porque envolve apenas o ensaio de coagulação do leite. Esse procedimento provou ser útil para controlar a composição percentual de renina em mistura com pepsina na hora da fabricação e durante o armazenamento de coalhos.

Koning e colaboradores (48) conseguiram estimar a quantidade de enzima de *Endothia parasitica* em mistura com renina

por incubação a pH 2,0 ao invés de pH 6,95. No entanto, para a inativação da protease da *Endothia parasitica* a pH 2,0, muito mais tempo foi necessário do que para a inativação da pepsina porcina a pH 6,95. A estabilidade da renina a baixos pHs é suficiente para permitir estimativa bastante real do conteúdo da protease.

Algumas discrepâncias nos resultados obtidos por esse método foram observadas por Emmons (26) quando a quantidade de pepsina for estimada numa só amostra de coalho incubado a diferentes valores de pH. Dependendo do pH usado, diferentes quantidades de pepsina porcina eram encontradas. Provavelmente, a causa desse fato é que a renina, como a pepsina bovina são também levemente inativadas se o pH for elevado a valores maiores que 7,0.

Thomasow (98) obteve bons resultados, quando investigou a inativação da pepsina porcina a pH 6,95, de acordo com o método de Koning e colaboradores (4). Durante essas investigações ele observou que é muito importante reajustar a solução de coalho a pH 5,7 depois da incubação a pH 6,95, antes de proceder-se à reação de coagulação. Se isso for omitido, um aumento na atividade do coalho de vitelo é observada.

Alais (2) estudou a inativação da pepsina porcina a pH 6,95 e 7,3 e, concluiu que a inativação a pH 7,3 de acordo com Shovers e Kormowski é realmente a preferida. Todavia, tendo em mente as observações referidas anteriormente que em valores de pH maiores que 7,0 parte da pepsina bovina e ou renina se presente pode ser inativada, é questionável se o pH 7,3 é realmente o mais aconselhável.

Uma modificação do método de Anson e Mirsky (6) para a

determinação de pepsina foi desenvolvida por Linklater (53), onde fez uso da hidrólise da hemoglobina a pH 1,8. Usando essa técnica, Emmons (26) comunicou que achou quantidades de pepsina porcina acima de 14% em coalhos comerciais. Como a técnica de Linklater foi desenvolvida para determinar quantidades de pepsina porcina em mistura com renina, Emmons previne que os valores observados devem ser considerados com extremo cuidado, se referidos a misturas de coalhos contendo pepsina bovina.

Como mais e mais estômagos de animais adultos são usados para a obtenção de coalho, a quantidade de pepsina bovina no coalho de vitelo tende a aumentar. Há algum tempo atrás, Douillard (23) publicou um método pelo qual a quantidade de pepsina bovina pode ser determinada, tendo como base a extensão da sua inativação na presença de uréia. A esse respeito, deve também ser mencionado o trabalho de Cheeseman (27) que estudou a inativação da renina e pepsina a pH 5,4 em concentração 4,6 e 6,0 M de uréia. A esse pH, a renina é totalmente inativada na presença de uréia em aproximadamente uma hora. Apenas um pequeno decréscimo na atividade foi observado no caso da pepsina, tanto na presença de concentração 4,6 ou 6,0 M de uréia.

Mulvihill e Fox (66) em estudo que fizeram, também concluíram que pepsina bovina e pepsina porcina são bastante estáveis em solução 5,0 M de uréia e pH entre 2,0 e 2,5 e 30°C de temperatura. Já, a quimosina e as proteases do *Mucor miehei* e *Mucor pusillus* Lindt foram rapidamente desnaturadas nessas condições. Essas diferenças foram usadas pelos pesquisadores como base para um ensaio quantitativo das enzimas individuais em coalhos.

Shovers e colaboradores (93), descreveram um procedimen-

to para medir a atividade coagulante da renina, pepsina bovina ou enzima coagulante de origem microbiana em mistura com pepsina porcina. A atividade coagulante total da mistura foi determinada em leite em pó reconstituído a pH 6,3. Uma amostra da mistura foi incubada a pH 7,3 e a temperatura de 30°C. A reação foi parada pela diluição com uma solução de acetato a pH 6,3 e então feito o ensaio para detectar a atividade coagulante residual, usando-se o substrato de Berridge. O tratamento a pH 7,3 destruiu completamente a atividade coagulante da pepsina porcina, enquanto que a atividade coagulante da renina, pepsina bovina e enzimas microbianas não foram afetadas nessas condições.

Lin e Dinensen (52) conseguiram separar e determinar quantitativamente as enzimas renina, pepsina bovina, pepsina porcina e as proteases do *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* Lindt e *Endothia parasitica*, pela inativação seletiva controlada de uma ou mais enzimas por combinações diferentes de pH, tempo e temperatura. Cada uma das cinco enzimas foi determinada quantitativamente em misturas desconhecidas. A enzima do *Mucor Miehei* foi a única que resistiu por uma hora à temperatura de 60°C. O conteúdo de enzima de *Mucor miehei* e *Mucor pusillus*, quando combinadas, foi calculado a partir da enzima que resistiu ao tratamento de 50°C por duas horas. A pepsina porcina foi destruída seletivamente a pH 7,1 e 25°C por cinco horas. A proporção entre renina e pepsina bovina foi calculada a partir da medida dos tempos de coagulação em dois leites diferentes. A precisão para cada enzima em misturas conhecidas foi de 1% da quantidade de sua força. Segundo os pesquisadores, o método é simples e de confiança.

2.1.9. Identificação de enzimas pela inibição da atividade coagulante

O uso de inibidores específicos para a identificação dos diversos tipos de enzimas está ainda sendo investigado. O problema é que os inibidores conhecidos não são específicos para um só tipo de enzima. O assunto foi discutido por Stepanov e colaboradores (95) em seu estudo da inativação da pepsina e renina por inibidores corados. A separação dos diversos tipos de enzimas parece possível, como foi demonstrado por Murao e colaboradores (67). Esses pesquisadores observaram que um novo inibidor de pepsina (S-P₁) isolado do *Streptomyces* EF-44-201 inibiu a ação da pepsina e da protease do *Mucor miehei* mas não a atividade da tripsina, papaína e ficina.

2.1.10. Identificação de enzimas coagulantes pela inibição da lipase microbiana

Uma outra maneira de fazer-se a distinção entre coalhos de origem animal e microbiana foi descrita por Brandl (14). Esse autor usou a habilidade dos diferentes tipos de coalhos em inibir a lipase estafilocócica. Foi observado que a atividade da lipase foi inibida pelas enzimas proteolíticas microbianas, mas não pelo coalho de vitelo. A ação da protease da *Endothia parasitica* pareceu-se com a do coalho de vitelo, no entanto, a referida protease causou inibição da lipase na faixa de pH entre 5,5 e 8,1.

2.1.11. Outros métodos de identificação de enzimas coagulantes

Um método para determinar a quimosina e a pepsina bovina

A em extratos comerciais de estômagos bovinos, baseado no uso do hexapeptídeo sintético Leu-Ser-Phe(NO₂)-NLeu-Ala-Leu-OMet como substrato de referência, foi citado por Martin e colaboradores (57). A quimosina e pepsina A foram separadas cromatograficamente a partir de extratos, e suas atividades coagulantes medidas utilizando-se leite em pó reconstituído, padronizado em ambos os casos, e as enzimas padronizadas também em relação ao hexapeptídeo. Foi estudado o efeito do pH na diferença de absorbância entre o hexapeptídeo e o tripeptídeo Leu-Ser-Phe(NO₂) resultante da hidrólise. Achou-se que o pH ótimo para determinar a atividade da solução de referência foi 4,7. Preparações de quimosina e pepsina A foram ensaiadas com o hexapeptídeo para definir a relação entre a atividade proteolítica e a quantidade de enzima ativa. A pH 4,7 e 30°C, 1,0 mg de quimosina e 1,0 mg de pepsina bovina A hidrolizaram 100 e 2.700 micromoles do peptídeo, respectivamente. As atividades dessas preparações foram ensaiadas em leite em pó reconstituído, para padronizá-las e definir a relação entre o tempo de coagulação e a quantidade de enzima ativa. A quimosina teve o dobro da atividade coagulante específica da pepsina bovina A. Para atividades coagulantes iguais, a pepsina bovina A foi 55 vezes mais ativa do que a quimosina na hidrólise do hexapeptídeo a pH 5,7.

O hexapeptídeo mencionado anteriormente foi proposto também por Raymond (78) como substrato de referência para a determinação da atividade proteolítica da renina. Esse peptídeo, que é prontamente hidrolizado pela enzima, contém uma prova espectroscópica Phe(NO₂), que facilita a determinação rotineira da atividade da enzima.

Salesse e Garnier (88) também usaram peptídios sintéti-

cos para determinar a quimosina e pepsina contidas em misturas, usando a diferença de especificidade das duas enzimas sobre o substrato I e II.

Enzimas coagulantes do *Mucor miehei* e *Endothia parasitica* foram purificadas por Kobayaski (44) usando aminohexil-Agarose em coluna de afinidade, incluindo vários derivados peptatínicos. O número de carbonos nos grupos N-acetil peptatínicos afetou enormemente o grau de purificação da enzima do *Mucor miehei*, porém não afetou a enzima da *Endothia parasitica*.

Um outro método bastante sensível para medir a atividade da protease da *Endothia parasitica*, baseado na ativação do tripsinogênio, foi desenvolvido por Whitaker (102). A ativação do tripsinogênio é conseguida a pH 4,0 e 30°C, usando-se 3,0 mg/mL de tripsinogênio bovino e 1,25 microg/mL de protease da *Endothia parasitica* pura em solução 0,4 M de formato de sódio e 3,0 M de solução tampão KCl. A intervalos de 1, 2, 3, 4, 5 e 7 minutos as quantidades de tripsina formada eram determinadas em 0,5 M de tris- 0,1 M de tampão CaCl₂ a pH 8,0 e 30°C por 10 minutos. Os solúveis em ácido tricloracético foram determinados a 280 nm. A atividade enzimática foi determinada a partir da medida inicial de ativação do tripsinogênio.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Amostras utilizadas

- a) Enzima coagulante de leite da *Endothia parasitica*, obtida na Indústria Farmacêutica Pfizer em Guarulhos, São Paulo, com o nome de "Sure Curd".
- b) Enzima coagulante de leite do *Mucor miehei*, renina e pepsina porcina, obtidas da Companhia Química Sigma, St. Louis MO, USA.
- c) Enzima coagulante de leite do *Mucor pusillus*, obtida da Meito Sangyo Co; LTD, Japão.
- d) Pepsina bovina, obtida em estado bruto da CHR Hansen Indústria e Comércio Ltda., Valinhos, SP e purificada no nosso laboratório.
- e) As amostras de coalhos comercializados no Brasil foram obtidas junto às indústrias produtoras e no comércio.

3.1.2. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram do grau analítico, preferivelmente da marca Merck, Baker, Sigma, Ecibra, Reagen e Carlo Erba.

O Sephadex utilizado foi da Pharmacia, Upsala, Suécia.

3.1.3. Equipamentos

Potenciômetro H-5 Horiba

Liofilizador New Brunswick Scientific, Co. Inc. Model XB

60-50.

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

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

Centrífuga refrigerada Beckman Model J-21 B.

Espectrofotômetro UV Perkin-Elmer, Coleman 124 D.

Coletor automático de frações LKB-Bromma 7000 Ultrarac.

Analizador de aminoácidos Beckman 119 CL.

Outros equipamentos de uso comum em laboratório como balança analítica, estufa, dessecador, etc.

3.2. Métodos

3.2.1. Obtenção das enzimas

Todas as enzimas utilizadas como padrão foram obtidas em estado purificado, com exceção da pepsina bovina que foi purificada no nosso laboratório, pela passagem de 10 mL da solução bruta, diluída 1:3 em tampão fosfato pH 5,7, através de coluna de gel Sephadex G-100, de acordo com o método de Yaguchi (103), com fluxo de 0,3 mL por minuto. A leitura das frações coletadas foi feita em espectrofotômetro UV em comprimento de onda de 280 nm. O pico de proteína que continha atividade coagulante foi detectado pelo método de Soxhlet, citado em (42), separado, congelado a -18°C e liofilizado.

3.2.2. Fracionamento dos coalhos comerciais

Os coalhos líquidos foram diluídos na proporção de 1:3

com tampão fosfato, pH 5,7, enquanto que 400 mg dos coalhos em pó foram dissolvidos em 10 mL do mesmo tampão. A separação das enzimas realizou-se passando 10 mL da solução dos coalhos através de coluna de gel Sephadex G-100, com fluxo de 0,3 mL por minuto e posterior leitura das frações coletadas em espectrofotômetro UV, no comprimento de onda de 280 nm. A identificação dos picos de proteína com atividade coagulante de leite foi feita pelo método de Soxhlet, citado por Iwasaki (42). A identificação das enzimas componentes do coalho foi feita utilizando-se o método do ágar-caseína de Richardson(82) e eletroforese em gel de poliacrilamida de Weber e Osborn (101) modificado.

3.2.3. Preparo da coluna de gel Sephadex

A coluna foi preparada de acordo com o método de Yaguchi (103), embebendo-se Sephadex G-100, livre de partículas finas em água destilada e equilibrado com tampão fosfato pH 5,7. O gel já equilibrado foi empacotado numa coluna de vidro à temperatura ambiente, para fornecer uma coluna de gel de 75 cm de altura por 2,5 cm de diâmetro.

3.2.4. Determinação da atividade coagulante dos coalhos e enzimas

A atividade coagulante foi determinada pelo método de Soxhlet, citado por Iwasaki (42), usando-se como substrato 10 g de leite em pó desnatado, marca Molico da (Companhia Industrial e Comercial Brasileira de Produtos Alimentares - SP) dissolvido em 100 mL de água destilada

contendo 0,01 M de cloreto de cálcio. Procedeu-se, colocando 5 mL do substrato num tubo de ensaio, equilibrando-o 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 de substrato procedeu-se da mesma maneira, adicionando-se porém água destilada em lugar da solução enzimática. O cálculo foi feito utilizando-se a fórmula seguinte:

$$\text{Unidade Soxhlet (U.S.)} = \frac{\text{mL de substrato}}{\text{Enzima (em mg)}} \times \frac{2400}{\text{Tempo (em seg)}}$$

3.2.5. Diferenciação das enzimas coagulantes em meio gel de ágar-caseína

Para a diferenciação, utilizou-se o método descrito por Richardson (71). A comparação foi feita contra enzimas padrões, sendo que as soluções enzimáticas dos coalhos e padrões continham 200 US/mL.

3.2.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida, das enzimas coagulantes componentes dos coalhos

Utilizou-se o método descrito por Weber e Osborn (88) com modificação. O aparelho usado para a eletroforese consistiu de uma fonte estabilizadora da Fanem, modelo 1050, tubos de vidro de 0,5 cm x 8,0 cm, duas cubas de acrílico de 14 x 14 cm de base com 7 cm de altura, cada qual com um eletrodo na posição central. A modificação do método constou da não adição do dodecil sulfato de sódio.

3.2.7. Determinação da atividade proteolítica dos coalhos e enzimas coagulantes utilizadas como padrões

Utilizou-se para essa determinação a metodologia citada por Kunitz (43), empregando-se como substrato caseína de "Harmmastein" a 1% em tampão fosfato 0,1 M a diversos pHs. Para obtenção da curva padrão (Figura 1), usou-se tripsina cristalina dissolvida em ácido clorídrico 0,0025 M.

3.2.8. Determinação do conteúdo total de cálcio no leite

Seguiu-se o procedimento descrito pela International Dairy Federation (35). O princípio do método baseia-se na dissolução do cálcio total e precipitação das proteínas com ácido tricloracético. O cálcio contido no filtrado é precipitado como oxalato de cálcio, separado por centrifugação e titulado com permanganato de potássio.

3.2.9. Inativação das enzimas coagulantes pelo cloro ativo

Procedimento: Fazer soluções de hipoclorito de sódio que contenha as concentrações de cloro ativo desejadas. Diluir as enzimas a serem tratadas em água destilada e medir a atividade coagulante pelo método de Soxhlet, citado por Iwasaki (42). Colocar em tubo de ensaio 2,0 mL da solução enzimática a ser estudada e adicionar 2,0 mL de solução de hipoclorito de sódio que contenha a concentração de cloro ativo desejada (notar que a solução de cloro ativo deve ser sempre o dobro, pois a mesma se diluirá à metade quando juntada a solução enzimática). Mar-

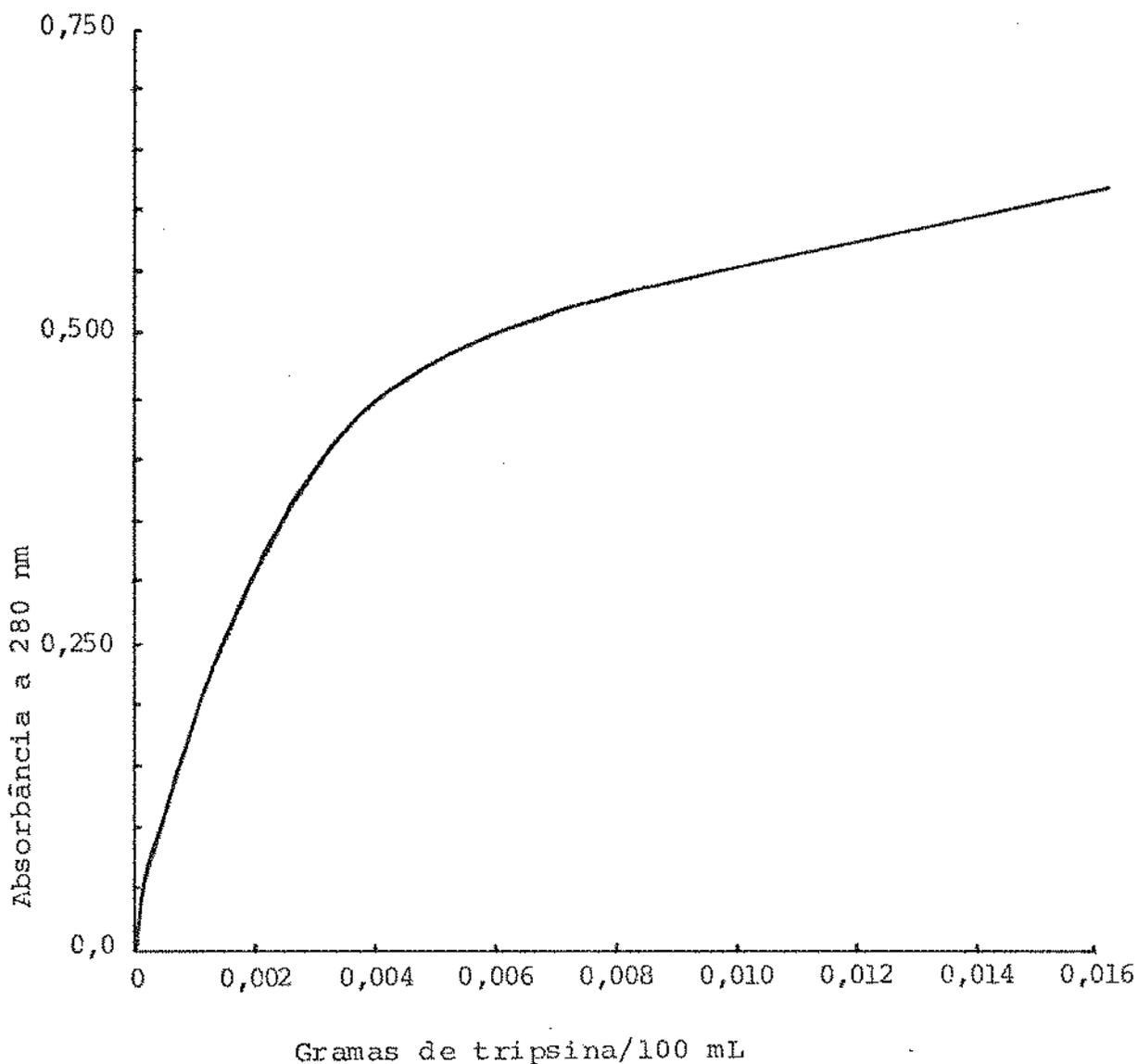


FIGURA 1 - Curva da tripsina pelo método de Kunitz.

A absorvância a 280 nm é devida aos aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina e triptofano contidos em peptídeos solúveis liberados da proteína substrato pela enzima tripsina, que servem como indicadores do grau de hidrólise.

car o tempo com cronômetro, agitar e após 5, 10 e 20 minutos medir a atividade coagulante pelo método já descrito. Calcular o percentual de inativação pela fórmula seguinte:

$$\text{Porcentagem de inativação} = B/A.100$$

onde,

A = Atividade enzimática antes da adição da solução de cloro ativo.

B = Atividade enzimática depois da adição do cloro ativo.

3.2.10. Análise dos aminoácidos do soro de leite coagulado com várias enzimas coagulantes

As enzimas utilizadas foram a renina, pepsina bovina, pepsina porcina, proteases do *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* Lindt e *Endothia parasitica*, todas em estado purificado. O soro para esse experimento foi obtido pela coagulação de 6 porções de 200 mL de leite desnatado, a temperatura de 35°C, após adição de 200US de enzima. Depois de uma hora da adição da solução enzimática, o soro foi separado por centrifugação e a enzima inativada com mercaptoetanol. As proteínas ainda presentes no soro foram precipitadas com ácido sulfosalicílico e separadas por centrifugação. 2 mL do sobrenadante obtido foi misturado a 1,0 mL de solução tampão citrato pH 2.2, e filtrado em filtro millipore de 0,22 µm de porosidade. 100 µl do filtrado foi injetado no analisador automático de aminoácidos e, os cromatogramas resultantes comparados com um padrão.

3.2.11. Análise microbiológica dos coalhos comerciais

Foram realizadas as seguintes análises microbiológicas: Contagem total de microrganismos, coliformes totais, fungos e leveduras e halófilos, por métodos usuais recomendados por Speck (94).

3.2.12. Determinação da proteína total dos coalhos comerciais amostrados

A determinação da proteína total foi feita utilizando o método do micro-kejeldahl citado pela Association of Official Agricultural Chemists (A.O.A.C.) (10).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. PH dos coalhos amostrados

O pH ótimo de atuação das proteinases ácidas situa-se na faixa de 1,0 a 5,0, dependendo naturalmente da enzima e do substrato (1 e 36). Muitas são caracterizadas pela instabilidade a pH alcalino, propriedade essa importante quando se considera sua viabilidade como coagulante para a fabricação de queijo (32).

Todavia, o pH de maior estabilidade da capacidade proteolítica situa-se acima de 4,8. Observando-se então a Tabela 1, verificamos que para todos os coalhos amostrados o mesmo situou-se entre 4,7 e 6,0, o que é perfeitamente justificável.

4.2. Determinação da proteína total dos coalhos amostrados

No que se refere ao teor de proteína total dos coalhos, praticamente não há referências, a não ser Gorreta (28), que estabelece o limite de 8% de proteína total para os coalhos líquidos. Consultando a Tabela 2, vemos que a maioria dos coalhos líquidos estão de acordo com o referido limite, com exceção da amostra G e I que estão em torno de 12,6%. No caso dos coalhos sólidos, sobre os quais não foi encontrada literatura, o teor de proteína total variou consideravelmente, como é ilustrado pelos coalhos D e P, com 5,7 e 85% de proteína, respectivamente. A maior uniformidade das concentrações protéicas dos coalhos líquidos frente aos sólidos pode ser devida ao fato da concentração protéica no líquido ser dada em relação ao solvente que

TABELA 1 - Valores de pH dos Coalhos Comerciais amostrados para este estudo.

ESTADO FÍSICO	A M O S T R A S															
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	L	M	N	O	P	Q
Líquidos	5,7	6,0	5,7	4,7	5,5	4,9	5,0	5,7								4,7
Sólidos (*)	4,9	5,4	5,1	4,8	4,9								5,0	5,0		

(*) 2g do pó foram suspensos em 100 ml de água destilada.

TABELA 2 - Proteína total dos Coalhos comerciais amostrados.

ESTADO FÍSICO	A M O S T R A S															
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	L	M	N	O	P	Q
Líquidos	3,8	3,7	3,6	12,6	12,7	7,6	6,9	3,1	5,3							
Sólidos	17,4	5,7	15,3	64,1	54,4	75,5	85,5									

está em excesso. Entretanto, no sólido, os outros componentes (sais, proteínas não enzimáticas etc.) têm influência no teor protéico.

4.3. Determinação da qualidade bacteriológica dos coalhos comerciais amostrados

De acordo com as "Normas higiênico-sanitárias e tecnológicas para coalhos e coagulantes", incluídas na portaria número 002 de 24/03/1980, citada por Gorreta (31), são sugeridos os seguintes limites bacteriológicos para os coalhos líquidos e sólidos. Para os líquidos, contagem total 2×10^3 microrganismos/mL; coliformes 0,0 microrganismos/mL; halófilos 1×10^2 microrganismos/mL; fungos e leveduras 0,0 microrganismos/mL. Para os coalhos sólidos: Contagem total 2×10^4 microrganismos/g; coliformes 0,0 microrganismos/g; halófilos 1×10^3 microrganismos/g; fungos e leveduras 0,0 microrganismos/g. No que concerne as preparações comerciais de coalhos de origem animal como a renina e pepsina, devemos considerar que quando os extratos são obtidos por maceração de órgãos não é raro observar contaminações microbianas as mais variadas. De maneira geral, a qualidade bacteriológica dos coalhos comercializados no Brasil está próxima dos limites aceitáveis. Pelos resultados da Tabela 3 observamos que os coalhos sólidos B e H acusaram contagens de 30 e 20 células de fungos e leveduras. Em termos de halófilos, os coalhos A, B, C, F e H estão acima dos limites estabelecidos. Com respeito à contagem total, apenas o coalho H excedeu o padrão de 3×10^4 microrganismos/g. Resumindo, apenas os coalhos B e H excede-

TABELA 3 - Análise microbiológica dos coalhos comerciais amostrados.

Estado Físico	Amostras	Contagem total (microrg/g)	Coliformes totais (microrg/g)	Fungos e Lev. (microrg/g)	Halófilos (microrg/g)
Líquido	A	ausente	ausente	ausente	$1,3 \times 10^3$
Líquido	C	$3,0 \times 10^2$	ausente	ausente	$2,5 \times 10^3$
Líquido	E	$2,5 \times 10^3$	ausente	ausente	$3,0 \times 10$
Líquido	G	ausente	ausente	ausente	$1,0 \times 10$
Líquido	I	$6,4 \times 10^2$	ausente	ausente	$2,0 \times 10$
Líquido	L	ausente	ausente	ausente	$1,0 \times 10$
Líquido	M	$6,0 \times 10$	ausente	ausente	ausente
Líquido	N	$1,4 \times 10^2$	ausente	ausente	ausente
Líquido	Q	ausente	ausente	ausente	ausente
Sólido	B	$1,1 \times 10^4$	ausente	$3,0 \times 10$	$3,5 \times 10^3$
Sólido	D	$3,7 \times 10^2$	ausente	ausente	$2,0 \times 10^2$
Sólido	F	$1,1 \times 10^2$	ausente	ausente	$1,3 \times 10^3$
Sólido	H	$5,0 \times 10^4$	ausente	$2,0 \times 10$	$1,3 \times 10^3$
Sólido	J	$9,6 \times 10^3$	ausente	ausente	$3,0 \times 10^2$
Sólido	O	$5,2 \times 10^3$	ausente	ausente	$1,0 \times 10$
Sólido	P	$3,5 \times 10^3$	ausente	ausente	$1,0 \times 10$

ram o limite permitido para os três grupos de microrganismos.

4.4. Determinação da atividade coagulante dos coalhos amostrados

O queijeiro precisa conhecer acuradamente a atividade coagulante do coalho. Além disso, a natureza das enzimas que contribuem para a atividade coagulante tem um papel importante na qualidade final do queijo. Como podemos ver na Tabela 4, colunas a e b, a atividade coagulante declarada dos coalhos amostrados não coincide com os valores encontrados. Segundo Cunha e colaboradores (21), não existe nenhuma unidade internacionalmente aceita para se avaliar a atividade coagulante. Gorreta (31) também menciona aspectos que limitam a exatidão dessa determinação, como por exemplo o estabelecimento de padrões, determinação do ponto final da coagulação, etc. Ainda, segundo o mesmo autor, métodos como os de Soxhlet, Berridge, Marschal, viscosimétrico de Brookfield, Visco-Tester, e mais de outros 20 que são utilizados, esbarram na falta de um leite substrato de composição padronizada. Isso já explica ao menos parte da discrepância entre os valores encontrados, pois, provavelmente as indústrias utilizam métodos de determinação diferentes, aproveitando como substrato o tipo de leite que mais lhes convenha.

As mesmas amostras de coalhos comerciais usadas para determinar a atividade coagulante inicial, foram armazenadas em geladeira a temperatura entre 0 e 5°C com a finalidade de verificarmos a perda de atividade durante 12 e 18 meses de armazenamento. Transportando-nos a Tabela 4, colunas d

e f, encontramos a perda percentual de atividade das amostras de coalho durante os períodos de armazenamento mencionados.

Observando a coluna d notamos que a diminuição de atividade coagulante em 12 meses foi bastante significativa. Entre os coalhos líquidos, os que mais perderam atividade foram o A, C, Q e M, entre 27,6 a 37,2% e, E, G, I, L e N entre 12,6 e 18,2%.

Ainda na mesma coluna, vemos que também os coalhos sólidos tiveram sua atividade coagulante bastante diminuída, porém, não tanto quanto a dos líquidos ou seja: entre 7,3 a 12,9% para as amostras J e O e 16,6 a 18,2% para as amostras B, H e P. O coalho sólido D foi exceção cuja a perda de atividade superou a de todos os outros, 39,9%. Da mesma maneira, se olharmos a coluna f veremos que a atividade coagulante dos coalhos líquidos E, G, I, L, N e A, C, M, Q em 18 meses diminuiu 19 a 27,4% e 41,4 a 55,8% respectivamente. Para os coalhos sólidos B, F, H, J, P a perda variou entre 19,3 a 31,8% com exceção do O e D que apresentaram a mínima e máxima perda de atividade, ou seja, 11 e 60%, respectivamente.

O que se observou também foi que os coalhos líquidos tem tendência a perder mais rapidamente a atividade do que os coalhos sólidos.

4.5. Determinação da atividade proteolítica dos coalhos amostrados

O principal problema com todos os substitutos do coalho de vitelo tem sido que os queijos começam a maturar diferen-

TABELA 4 - Atividade coagulante dos coalhos comerciais em unidades Soxhlet.

Estado físico	coalho	a	b	c	d	e	f
Líquido	A	10	10,0	6,3	37,2	4,4	55,8
Líquido	C	10	10,4	6,6	36,6	4,7	55,0
Líquido	E	10	15,5	12,8	17,7	11,4	26,5
Líquido	G	10	14,5	12,1	16,6	10,9	25,0
Líquido	I	10	22,8	19,4	16,6	17,1	25,0
Líquido	L	10	12,3	10,7	12,6	10,0	19,0
Líquido	M	10	10,2	7,3	27,6	6,0	41,4
Líquido	N	3	7,0	5,7	18,2	5,1	27,4
Líquido	Q	10	30,0	20,0	33,2	15,0	50,0
Sólido	B	80	71,4	57,1	20,0	50,0	29,8
Sólido	D	80	71,2	42,7	39,9	28,5	60,0
Sólido	F	40	66,6	55,5	16,6	50,0	25,0
Sólido	H	100	125,3	103,1	17,7	92,0	26,6
Sólido	J	40	124,0	108,0	12,9	100,0	19,3
Sólido	O	40	122,5	113,0	7,3	109,0	11,0
Sólido	P	40	117,3	92,5	21,1	80,0	31,8

a - Atividade declarada x 10^{-3}

b - Atividade encontrada x 10^{-3}

c - Atividade encontrada após 12 meses x 10^{-3}

d - Perda de atividade após 12 meses, em percentagem

e - Atividade encontrada após 18 meses x 10^{-3}

f - Perda de atividade após 18 meses, em percentagem

temente daqueles produzidos com o mesmo, e apresentam defeitos de textura, aroma e sabor. Em muitos casos, esses defeitos tem sido atribuídos a grande atividade proteolítica em relação a atividade coagulante de leite da enzima, relação essa bem maior do que a apresentada pelo coalho de vitelo. Assim, resolvemos fazer esse estudo, com o intuito de termos uma idéia da grandeza da atividade proteolítica tanto dos coalhos comerciais amostrados, como das enzimas padrões.

Nas Tabelas 5 e 6 estão apresentados os valores da atividade proteolítica das enzimas padrões e dos coalhos amostrados, respectivamente. Como podemos observar, a atividade dos coalhos e dos padrões aumenta em níveis maiores ou menores. Com exceção dos coalhos E e I (Tabela 6), os produtos líquidos mostraram aumento significativo da atividade com a diminuição do pH de 7,6 a 5,5. Os aumentos, que oscilaram entre aproximadamente 1,8 e 4 vezes a atividade inicial, podem ser atribuídos ao comportamento variável das outras enzimas que fazem parte de cada extrato. Para a mesma faixa de pH, foi interessante observar que os coalhos em estado sólido mostraram aumentos de atividade que variavam de 3 a 14 vezes a inicial. Os resultados aqui obtidos estão de acordo com Tam e colaboradores (96), ou seja, que a atividade proteolítica de enzimas coagulantes decresce com o aumento de pH.

Comparando os coalhos comerciais amostrados com a renina padrão em pH 5,5, observamos que as amostras líquidas M, N e Q e sólidas B, H e J apresentaram atividades proteolíticas altíssimas, que variaram de 30 a 85 vezes a da renina.

As amostras restantes também mostraram atividades muito significativas, que foram de 3,5 a 16 vezes maiores que a da renina. Já, quando comparamos também em pH 5,5, a atividade proteolítica do coalho comercial O, tido como sendo de vitelo, com a dos demais coalhos, verificamos que apenas 6 deles apresentaram variações expressivas ou seja, de 1,8 a 5,3 vezes mais atividade proteolítica do que a amostra O. Segundo Koning (46), todas as enzimas proteolíticas conhecidas podem ser usadas para coagular o leite: todavia para fabricar queijo, existem restrições porque, além de uma boa coagulação do leite, a enzima deve ter uma fraca ação proteolítica durante a cura do queijo.

A atividade proteolítica das enzimas coagulantes da *Endothia parasítica* e *Mucor pusillus* foi comparada com as da renina e pepsina por Michelson e colaboradores (62), onde afirmaram que as enzimas fúngicas possuem maior atividade do que as de origem animal. Porém, os resultados por nós encontrados (Tabela 6) não corroboram essa afirmativa uma vez que a pepsina bovina, na maioria dos pHs utilizados, apresentou maior atividade proteolítica que a enzima do *Mucor pusillus* e, em pH 7,0 foi também maior do que a apresentada pela enzima da *Endothia parasítica*. Com relação as duas enzimas fúngicas a que teve maior atividade proteolítica, foi a enzima da *Endothia parasítica* confirmando os resultados encontrados por Tam e colaboradores (96).

Considerando-se que para a obtenção dos perfis de atividade foi necessário padronizar antes as atividades coagulantes, as atividades proteolíticas das enzimas padrões foram, em geral, menores do que as dos coalhos ou extratos comerciais. De fato, os coalhos M, N e H, de atividade proteo-

lítica máxima, são produtos de fábricas pouco conhecidas. Por outro lado, os coalhos A a F, que exibiram atividades proteolíticas geralmente menores, foram provenientes de fábricas maiores, sugerindo que estas últimas utilizam processos de extração mais sofisticados que resultam em extratos de maior pureza.

4.6. Perfil dos aminoácidos livres presentes nos soros de leite desnatado após coagulação com as enzimas estudadas

Foi considerado de interesse conhecer o perfil de aminoácidos liberados no soro do leite, quando o mesmo é coagulado com as enzimas, renina, pepsina bovina, pepsina porcina e as proteases do *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* e *Endothia parasitica*, objetivando encontrar diferenças que talvez refletissem diversos modos de ação das enzimas. Para tanto, seis amostras de leite desnatado tipo B foram coaguladas com as seis enzimas e os soros analisados na sua composição em aminoácidos livres. O soro resultante da precipitação isoelétrica da caseína do leite desnatado foi também analisado para comparação. Em geral, a tendência no nível dos aminoácidos livres, foi de aumentar com a coagulação enzimática, em relação à coagulação ácida, como aparece ilustrado pelo ácido α -amino adípico, tirosina, fenilalanina, ácido γ -aminobutírico, etanolamina e outros (Tabela 7).

Com respeito aos aminoácidos livres encontrados no soro do leite desnatado, podemos notar grande liberação de alguns aminoácidos por certas enzimas. Por exemplo, coagulação com a enzima da *Endothia parasitica* resultou em seis vezes mais fenilalanina, em relação ao nível inicial no soro. A enzima do *Mucor pusillus*, por sua vez, pareceu liberar concentrações consideráveis de carnosina, um aminoáci-

TABELA 5 - Atividade proteolítica, em mg de tripsina, das enzimas padrão em função do pH da reação de coagulação.

Estado físico	enzima	pH				
		7,6	7,0	6,5	6,0	5,5
Sólido	MM	0,7	0,7	0,7	1,4	1,3
Sólido	MP	0,3	1,1	0,7	1,6	0,9
Sólido	EP	0,3	1,3	2,6	2,5	5,8
Sólido	PP	0,0	0,0	0,2	1,8	2,3
Sólido	PB	1,4	1,0	2,4	4,4	5,0
Sólido	RR	0,0	0,0	0,2	0,2	0,4

MM - Enzima coagulante do *Mucor miehei*

MP - Enzima coagulante do *Mucor pusillus*

EP - Enzima coagulante da *Endothia parasitica*

PP - Pepsina porcina

PB - Pepsina bovina

RR - Renina

(*) Resultados em unidades de tripsina obtidos a partir de quantidade de enzima padronizada para 200 US de atividade coagulante.

(**) A atividade proteolítica, em mg de tripsina, das enzimas padrão e coalhos comerciais amostrados (Tabelas 5 e 6 respectivamente) foram obtidos da Figura 1, item 3.2.7.

TABELA 6 - Atividade proteolítica, em mg de tripsina, dos coelhos comerciais usando caseína como substrato (43)

Estado físico	Coelho	pH				
		7,6	7,0	6,5	6,0	5,5
Líquido	A	1,1	1,4	1,9	2,4	3,7
Líquido	C	0,9	1,5	2,0	1,9	3,8
Líquido	E	2,1	1,0	3,4	3,0	3,0
Líquido	G	0,0	2,0	2,5	3,3	3,5
Líquido	I	1,9	1,4	1,6	2,0	1,7
Líquido	L	2,6	3,5	3,8	3,6	4,2
Líquido	M	13,5	17,8	23,0	31,0	31,0
Líquido	N	17,0	18,5	21,2	31,0	31,5
Líquido	Q	8,7	11,5	18,0	20,4	22,5
Sólido	B	3,2	3,5	4,5	7,5	13,5
Sólido	D	0,1	0,1	0,3	0,9	1,4
Sólido	F	0,6	0,4	0,5	1,4	1,8
Sólido	H	8,6	15,5	17,5	22,0	34,0
Sólido	J	2,5	3,5	4,7	8,8	12,0
Sólido	O	0,6	0,7	0,8	1,8	6,4
Sólido	P	1,1	1,3	1,5	1,4	4,0

(*) Resultados em unidades de tripsina obtidos a partir de quantidade de coelho padronizado para 200 US de atividade coagulante.

do caracteristicamente liberado por essa enzima e não pelas demais. De igual modo foi essa enzima que também liberou altos níveis de ácido glutâmico e valina, ao contrário da enzima da *Endothia parasítica*, que foi a que mostrou maior atividade proteolítica das seis (Tabela 6). Em relação às outras enzimas, a da *Endothia parasítica* liberou maiores quantidades de fenilalanina, como já foi observado, de etanolamina e citrulina.

Fazendo-se um cálculo do percentual de liberação de aminoácidos entre a enzima do *Mucor pusillus* Lindt e as outras, notamos que a mesma liberou 40 a 80% mais ácido aspártico, hidroxilisina, ácido glutâmico, glicina e alanina e, 180 a 760% mais valina, lisina e histidina do que as outras enzimas. O que nos pareceu bastante interessante e, até certo ponto característico dessa enzima foi a liberação de enorme quantidade de 3 M-histidina e carnosina, enquanto que esses aminoácidos não apareceram nos soros obtidos com as outras enzimas estudadas.

Outro detalhe também interessante foi que todas as outras enzimas estudadas liberaram cistina e amônia e, no soro obtido com a enzima do *Mucor pusillus* não apareceram esses compostos.

O percentual de liberação de aminoácidos pela renina em relação às outras enzimas foi cerca de 100% mais P-serina e 180 a 450% menos ácido α -A-adípico e prolina. Já, no caso da pepsina porcina não houve liberação de ácido α -A-adípico e alanina, enquanto que o percentual de liberação de taurina em relação as outras foi 70% menor.

Também a enzima da *Endothia parasítica* teve como característica a liberação de alta quantidade de alguns aminoáci-

dos. Quando comparada com as outras enzimas estudadas observou-se que ela liberou cerca de 380 a 700% e 340 a 400% mais fenilalanina e etanolamina.

Dentre as enzimas de origem microbiana, a da *Endothia parasítica* foi a única a liberar citrulina; já as de origem animal, com exceção da pepsina porcina, também a liberaram, porém em percentuais bem mais baixos.

A variação do percentual de liberação de aminoácidos entre as enzimas restantes foi muito pequena não denotando nenhuma característica particular para qualquer delas.

O que se observou foi que a pepsina porcina, renina e enzimas do *Mucor pusillus* e *Endothia parasítica* apresentaram percentuais de liberação de alguns aminoácidos bastante altos em relação as enzimas restantes, e ausências características de outros.

Os quocientes obtidos quando relacionamos a soma dos aminoácidos básicos liberados por cada enzima estudada, e a soma dos liberados no soro obtido por coagulação ácida, variaram entre 1,28 e 1,60, com exceção da enzima do *Mucor pusillus* onde o mesmo foi cerca de 3,1. Esse quociente bastante elevado, nos indicou que essa enzima promoveu a liberação de maior quantidade de aminoácidos básicos que as outras estudadas.

A mesma situação ocorreu quando, relacionamos as somas dos aminoácidos neutros e ácidos liberados por cada enzima e liberados no soro ácido, onde os quocientes obtidos variaram de 1,22 a 1,26 e 0,9 a 1,04 respectivamente, para todas as enzimas estudadas, com exceção da enzima do *Mucor*

pusillus, que apresentou quocientes de 1,84 e 1,73 para os aminoácidos neutros e ácidos respectivamente, denotando que também essas duas classes são liberadas por essa enzima em quantidades bem mais elevadas do que pelas restantes. Pelo que se viu, parece ser bastante característico da enzima do *Mucor pusillus* a liberação de quantidades maiores das três classes de aminoácidos já referidas.

Com referência aos quocientes obtidos entre a soma dos aminoácidos hidroxilados liberados pelas enzimas em estudo e no soro obtido por coagulação ácida, verificamos que os mesmos se situaram na faixa de 1,17 a 1,70 para a maioria das enzimas, com exceção da renina e pepsina bovina, onde resultaram quocientes bem mais altos que para as demais ou seja, 2,67 e 2,25 respectivamente. Esses quocientes altos mostram certa característica dessas enzimas de origem bovina, em liberar grande quantidade de aminoácidos hidroxilados.

Comparando as enzimas de origem animal com as de origem fúngica, observou-se que as primeiras promoveram maior liberação de GABA do que as segundas. Hidroxilisina que apareceu no soro ácido, também foi detectado em todos os soros enzimáticos, mas em maior concentração nos soros de renina e pepsina bovina.

Pelo estudo dos dados da Tabela 7, foi possível perceber certos efeitos causados por cada enzima no perfil de aminoácidos livres dos soros. Pode-se perceber ainda que cada uma delas tem algumas peculiaridades características que possivelmente poderão, se estudadas com mais profundidade, se-

TABELA 7 - Perfil dos aminoácidos livres presentes nos soros de leite desnatado após coagulação, com as enzimas estudadas. Para comparação, apresenta-se também o perfil do soro obtido por precipitação ácida da caseína (A). Valores em micromole de aminoácido por 100 mL de soro. RR, PB, PP, EP, MM e MP estão definidos na Tabela 6.

Soro de leite desengordurado							
Aminoácidos	A	RR	PB	PP	EP	MM	MP
P-serina	1395	5020	2500	2120	1870	2080	1580
Taurina	15340	15340	20470	5580	18750	16740	14950
P-etanolamina	13540	13120	8020	11660	11660	10000	9470
Ác. aspártico	4370	4860	5200	5120	5100	4980	8020
Hidroxiprolina	4760	3520	4950	3520	3040	5230	8280
Treonina	1350	1780	1660	1470	1660	1350	1590
Serina	2630	2630	2250	3150	3150	2350	2520
Asparagina	-	-	-	-	-	-	-
Ác. glutâmico	46220	52730	51250	48870	49760	52610	87350
Ác. α -A-adípico	-	580	2590	-	1190	1050	2010
Prolina	4950	1350	4650	5550	4120	4950	5550
Glicina	17340	21930	21420	23720	20400	23120	31020
Alanina	4780	7600	6920	-	7600	5860	10620
Citrulina	-	830	930	-	1560	-	-
Ác. α -A-butírico	-	-	-	-	-	-	-
Valina	1620	1780	2660	2500	2850	2300	15320
Cistina	6790	5550	6480	6170	3340	3470	-
Metionina	480	480	770	640	810	640	610
Cistationina	-	-	-	-	-	-	-
Isoleucina	1000	1210	1640	1420	1420	1420	1210
Leucina	1100	1680	2060	1680	1680	1280	1660
Tirosina	640	1080	1470	1280	1280	1020	990
Fenilalanina	750	680	1270	1100	4930	1020	1190
GABA	-	15620	15620	12500	7950	9940	9370
Etanolamina	-	-	1240	1060	4250	1060	1150
Amônia	17890	21080	21080	21240	19480	20600	-
Hidroxilisina	4640	19280	15490	8630	9710	9750	5740
Ornitina	2350	1170	1640	1460	1640	1460	3290
Lisina	3110	2150	5760	3230	5420	4030	380
l-M-histidina	1400	3140	3770	1880	1500	1780	2350
Histidina	790	1520	1180	590	960	640	4310
Carnosina	-	-	-	-	-	-	80760
Arginina	3460	2770	500	3610	3610	2200	1240
3-M-histidina	-	-	-	-	-	-	1420

rem utilizadas como método de identificação do tipo de enzima coagulante.

4.7. Influência da concentração de cálcio na coagulação enzimática do leite

A determinação da atividade coagulante é usualmente baseada na coagulação do leite em circunstâncias condicionadas, usando-se um coalho padrão. Já é também conhecido que mudanças na composição e características do leite como pH, concentração de cálcio e temperatura afetam profundamente a velocidade de coagulação. Além disso, os coalhos dependem de maneira diferente do pH, temperatura e concentração de cálcio iônico (56).

O cálcio existe no leite sob três formas: livre ou iônico, complexado com ânions inorgânicos, como o fosfato e o citrato, e ligado à caseína. As duas primeiras formas são caracterizadas como cálcio solúvel, porque o cálcio complexado com a caseína pode ser separado por ultracentrifugação (69). Na indústria costuma-se adicionar cálcio ao leite que vai se transformado em queijo, principalmente se este for pasteurizado; isso porque o aquecimento causa precipitação do cálcio iônico e, portanto, diminuição do poder coagulante da enzima (97). O cálcio no leite bovino foi estimado por Holt e Muir (39), em 3,2 mM com murexide e 2,1 mM por Muldoon e Liska (65), utilizando dois métodos: Resina trocadora de ânions e eletrodo sensível ao cálcio. Foi de nosso interesse estudar o comportamento das seis enzimas padrões frente diversas concentrações de íon cálcio e em vários valores de pH. Começamos por determinar

a quantidade de cálcio no leite em pó reconstituído a ser utilizado nos testes, que foi de 48 mM. Nas tabelas 8 a 13 mostramos os valores de atividade coagulante em unidades Soxhlet, onde podemos observar que para todas as enzimas testadas a velocidade máxima de coagulação ocorreu com concentração de cálcio entre 10 e 20 mM nos pHs utilizados e temperatura de 35°C. Assim sendo, a quantidade total de cálcio onde ocorreu a velocidade máxima de coagulação para todas as enzimas foi a soma do já existente no leite mais o adicionado; isto é, entre 58 e 68 mM para todas as enzimas, nas condições descritas. Nota-se também nas Tabelas já referidas que em pH 5,0 somente as pepsinas tiveram sua velocidade máxima de coagulação com 10 mM de cálcio, enquanto que com as restantes esse fenômeno ocorreu com 20 mM. Já, em pH 5,5. Além das pepsinas também a enzima do *Mucor pusillus* teve sua velocidade máxima de coagulação com 10 mM de cálcio. Em pH 6,0, todas as enzimas estudadas, com exceção da renina tiveram sua velocidade máxima de coagulação na concentração de 20 mM de cálcio. Somente em pH 6,5 e 7,0 ocorreu a velocidade máxima de coagulação para todas as enzimas na concentração de cálcio igual a 20 mM, com exceção da pepsina bovina que em pH 7,0 foi inativada.

Os resultados encontrados sugerem quatro conclusões, a saber: 1) O pH entre 6,0 e 6,5 usado na prática não é o que promove máxima velocidade para nenhuma das enzimas, como foi apontado por Alais (1); 2) Somente em pH 6,5 e concentração de 20 mM de cálcio ocorreu a velocidade máxima de coagulação para todas as enzimas estudadas; 3) A quantidade total de cálcio (o existente no

leite, e 2,27 mM adicionado) usado na prática para coagular o leite a ser transformado em queijo, está bem abaixo daquela necessária para que ocorra a velocidade máxima de coagulação; 4) Não existe suficiente diferença no comportamento entre enzimas para se pensar em usar a velocidade de coagulação como teste confirmatório do tipo de enzima que constitui um coalho. Como consequência, os coalhos não foram submetidos ao estudo do efeito de concentração de íons cálcio e pH.

4.8. Influência do cloro ativo na atividade coagulante das enzimas padrão e coalhos comerciais O e Q

Na maioria das indústrias queijeiras do Brasil é norma diluir o coalho em água antes de misturá-lo ao leite a ser coagulado. É imperativo que a água a ser misturada seja de boa qualidade microbiológica, livre de bactérias e contaminação por fagos. Os procedimentos normais de tratamento da água envolvem a cloração, e esses tratamentos deixam a água com quantidades residuais de cloro ativo. Segundo Pearce (75), esse cloro ativo residual pode reagir e inativar a enzima renina. O mesmo autor, em experimentos que fez usando várias concentrações de cloro ativo para diluir a renina, concluiu que a destruição da atividade coagulante era rápida a 20°C e essencialmente completa depois de 5 minutos da diluição com água clorada.

O efeito do cloro ativo nas outras enzimas aqui usadas não é conhecido e foi, portanto, incluído neste estudo. Como pode ser observado nas Tabelas 14, 15, 16, 17, 18 e 19, os dados aqui obtidos mostram que todas as enzimas foram ser-

TABELA 8 - Influência do cálcio adicionado e do pH na velocidade de coagulação do leite pela enzima coagulante do *Mucor miehei*, expressa em unidades Soxhlet.

pH	Concentração de cloreto de cálcio (moles/L)						
	0,001	0,005	0,01	0,02	0,05	0,07	0,1
5,0	-	-	1333	1846	889	615	400
5,5	432	840	1091	1000	774	571	343
6,0	152	374	522	615	545	470	320
6,5	10	94	188	286	414	421	-
7,0	0	0	0	110	-	-	-

(-) Houve precipitação espontânea das proteínas do leite quando se acrescentou HCl, para baixar, e NaOH, para elevar o pH.

TABELA 9 - Influência do cálcio adicionado e do pH na velocidade de coagulação do leite pela enzima coagulante do *Mucor pusillus*, expressa em unidades Soxhlet.

pH	Concentração de cloreto de cálcio (moles/L)						
	0,001	0,005	0,01	0,02	0,05	0,07	0,1
5,0	-	-	2400	3428	1714	1000	667
5,5	795	1380	1846	1846	1263	923	631
6,0	86	738	800	1000	923	667	400
6,5	7	59	184	387	300	348	-
7,0	0	0	0	88	-	-	-

TABELA 10 - Influência do cálcio adicionado e do pH na velocidade de coagulação do leite pela enzima coagulante da *Endothia parasitica*, expressa em unidades Soxhlet.

pH	Concentração de cloreto de cálcio (moles/L)						
	0,001	0,005	0,01	0,02	0,05	0,07	0,1
5,0	-	-	3429	8000	2182	1846	1263
5,5	1312	2381	2667	2182	2000	1600	1263
6,0	600	1333	1714	1846	1846	1500	1000
6,5	145	290	436	1043	827	615	-
7,0	19	63	127	304	-	-	-

TABELA 11 - Influência do cálcio adicionado e do pH na velocidade de coagulação do leite pela pepsina porcina, expressa em unidades Soxhlet.

pH	Concentração de cloreto de cálcio (moles/L)						
	0,001	0,005	0,01	0,02	0,05	0,07	0,1
5,0	-	-	10909	10000	7272	3243	3809
5,5	1714	4000	5217	6857	7272	4285	1263
6,0	857	1714	3809	5853	6315	3000	2068
6,5	36	480	1021	2823	3000	1290	-
7,0	0	0	0	0	-	-	-

TABELA 12 - Influência do cálcio adicionado e do pH na velocidade de coagulação do leite pela pepsina bovina, expressa em unidades Soxhlet.

pH	Concentração de cloreto de cálcio (moles/L)						
	0,001	0,005	0,01	0,02	0,05	0,07	0,1
5,0	-	-	60000	48000	30000	21818	15000
5,5	7253	15000	26667	34258	26667	15000	4444
6,0	2373	7059	14117	21818	20000	13333	3000
6,5	322	1154	1304	6667	9600	4444	-
7,0	0	0	0	912	-	-	-

TABELA 13 - Influência do cálcio adicionado e do pH na velocidade de coagulação do leite pela renina, expressa em unidades Soxhlet.

pH	Concentração de cloreto de cálcio (moles/L)						
	0,001	0,005	0,01	0,02	0,05	0,07	0,1
5,0	-	-	522	545	320	189	140
5,5	200	216	387	282	200	150	125
6,0	55	180	186	150	142	96	107
6,5	4	30	58	122	87	60	-
7,0	0	0	0	40	-	-	-

do inativadas com o aumento da concentração de cloro ativo. A inativação da renina foi notável, confirmando o achado de Pearce (75). O grau de inativação desta enzima, porém, não foi tão elevado a 1,0 ppm de cloro como relatado pelo autor, mas talvez tenha sido devido às diferenças nas condições experimentais. As enzimas fúngicas foram, em geral, mais insensíveis ao cloro. Em particular, a enzima da *Endothia parasítica* que começou a mostrar inativação com 20 ppm, enquanto que as outras de origem fúngica já foram sensíveis em 5 ppm de cloro, sendo que a pepsina porcina mostrou maior resistência do que a bovina. Esse efeito também foi estudado em dois coalhos comerciais. A amostra Q, representando as outras, com exceção da O, teve comportamento bastante semelhante ao da pepsina bovina, como podemos observar comparando as Tabelas 18 e 20. Houve, porém, uma diminuição considerável do percentual de inativação em relação à pepsina bovina quando a concentração de cloro atingiu 100 ppm. A amostra O, rotulada como sendo coalho de vitelo, afastou-se bastante do padrão seguido pela renina, como podemos notar comparando as tabelas 19 e 21. Esse comportamento se deve, provavelmente, à pequena quantidade de pepsina bovina contida nesse coalho. Como vemos, é possível pensar-se no uso do cloro ativo para se ter uma estimativa da proporção de renina numa mistura enzimática.

4.9. Diferenciação das enzimas coagulantes em meio gel de ágar-caseína

O método do gel de ágar-caseína de Cheeseman (18), para o

TABELA 14 - Influência da concentração de cloro ativo na velocidade coagulante da enzima do *Mucor miehei*, expressa em unidade Soxhlet.

Conc. de cloro em ppm	Tempo em minutos			% de inativação após 20 minutos
	5	10	20	
0	186	186	186	0,0
1	186	186	186	0,0
2	186	186	186	0,0
3	186	186	186	0,0
5	186	186	186	3,0
10	186	172	167	10,1
20	172	162	157	15,7
40	93	89	88	52,8
100	77	77	73	60,9

TABELA 15 - Influência da concentração de cloro ativo na velocidade coagulante da enzima do *Mucor pusillus*, expressa em unidades Soxhlet.

Conc. de cloro em ppm	tempo em minutos			% de inativação após 20 minutos
	5	10	20	
0	184	184	184	0,0
1	184	184	184	0,0
2	184	184	184	0,0
3	184	184	184	0,0
5	184	184	177	3,7
10	184	177	171	7,0
20	165	159	145	21,0
40	106	104	102	44,0
100	64	61	58	68,4

TABELA 16 - Influência da concentração de cloro ativo na velocidade coagulante da enzima da *Endothia parasitica*, expressa em unidades Soxhlet.

Conc. de cloro de ppm	tempo em minutos			% de inativação após 20 minutos
	5	10	20	
0	436	436	436	0,0
1	436	436	436	0,0
2	436	436	436	0,0
3	436	436	436	0,0
5	436	436	436	0,0
10	436	436	436	0,0
20	436	400	369	15,0
40	343	343	300	31,2
100	228	218	200	54,1

TABELA 17 - Influência da concentração de cloro ativo na velocidade coagulante da pepsina porcina, expressa em unidades Soxhlet.

Conc. de cloro em ppm	tempo em minutos			% de inativação após 20 minutos
	5	10	20	
0	3428	3428	3428	0,0
1	3428	3428	3428	0,0
2	3428	3428	3428	0,0
3	3428	3428	3428	0,0
5	3428	3428	3428	0,0
10	3428	3428	3000	12,0
20	3000	3000	2667	22,2
40	2667	2667	2400	30,0
100	1714	1500	1500	56,2

TABELA 18 - Influência da concentração de cloro ativo na velocidade coagulante da pepsina bovina, expressa em unidades Soxhlet.

Conc. de cloro em ppm	tempo em minutos			% de inativação após 20 minutos
	5	10	20	
0	1000	1000	1000	0,0
1	1000	1000	1000	0,0
2	1000	1000	1000	0,0
3	1000	1000	923	7,7
5	1000	1000	889	11,1
10	1000	889	857	14,3
20	1000	889	800	20,0
40	774	750	706	29,4
100	316	300	228	77,2

TABELA 19 - Influência da concentração de cloro ativo na velocidade coagulante da renina, expressa em unidades Soxhlet.

Conc. de cloro em ppm	tempo em minutos			% de inativação após 20 minutos
	5	10	20	
0	307	307	307	0,0
1	206	193	173	43,6
2	173	169	164	46,6
3	72	48	41	86,6
5	17	16	14	95,5
10	0	0	0	100,0
20	0	0	0	100,0
40	0	0	0	100,0
100	0	0	0	100,0

TABELA 20 - Influência da concentração de cloro ativo na velocidade coagulante do coalho comercial Q, expressa em unidades Soxhlet.

Conc. de cloro em ppm	tempo em minutos			% de inativação após 20 minutos
	5	10	20	
0	666	666	666	0,0
1	666	666	666	0,0
2	666	666	631	5,3
3	666	631	615	7,7
5	666	631	600	10,0
10	600	585	585	12,2
20	585	571	571	14,3
40	510	480	400	33,4
100	338	307	289	56,7

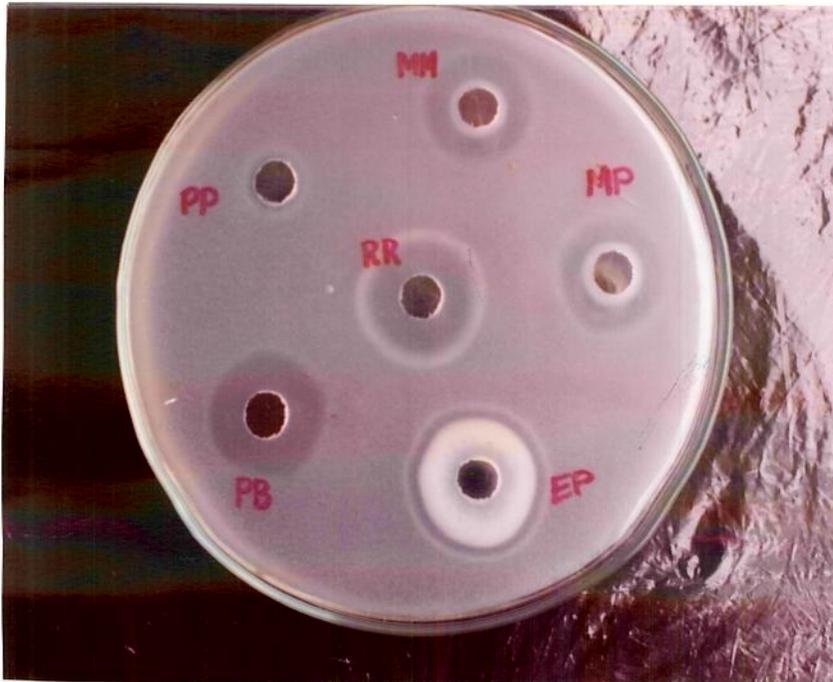
TABELA 21 - Influência da concentração de cloro ativo na velocidade coagulante do coalho comercial O, expressa em unidades Soxhlet.

Conc. de cloro em ppm	tempo em minutos			% de inativação após 20 minutos
	5	10	20	
0	2000	2000	2000	0,0
1	1714	1600	1411	29,5
2	1500	1411	1411	29,5
3	1500	1411	1411	29,5
5	1411	1411	1333	33,4
10	1043	1043	1000	50,0
20	1090	1000	923	53,9
40	363	352	324	83,8
100	252	237	210	89,5

ensaio de reninas, tem sido o melhor caminho para revelar a maioria dessas reações fundamentais. A formação do paracaseinato de cálcio pela ação da renina sobre a caseína do meio resulta na formação de zonas de precipitação, na medida em que as moléculas da enzima se difundem através do gel. Segundo Ganguli e Bhalerao (28), é certo que tanto a natureza da enzima como o tipo de caseína têm influência na formação das zonas de precipitação. A aparência das zonas de precipitação em gel de ágar-caseína com enzimas microbianas revela a diferença básica nos seus modos de ação, quando comparadas com as enzimas de origem animal. Em nosso experimento, a renina, pepsina bovina, pepsina porcina, as enzimas do *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* e *Endothia parasítica* apresentaram zonas de difusão bastante diferentes, como podemos observar na Figura 2, mostrando que suas características físicas são diferentes. Comparando as Figuras 3 a 5 com a Figura 2, notamos que as zonas de difusão dos coalhos comerciais se assemelham com o tipo de difusão apresentada pela pepsina bovina (PB). Já na Figura 6, apenas as amostras P e Q se pareceram com a pepsina bovina, enquanto que a amostra O apresentou a forma de precipitação característica da renina (RR, Figura 2). Cabe salientar aqui que o coalho é o único rotulado como "de vitelo".

4.10. Filtração em gel Sephadex G-100 dos coalhos comerciais amostrados

Como procedimento de purificação, a filtração em gel Sephadex é preferível à cromatografia em DEA-Celulose (34,



- MM - Ação da enzima do *Mucor miehei*
- MP - Ação da enzima do *Mucor pusillus*
- EP - Ação da enzima da *Endothia parasitica*
- PP - Ação da pepsina porcina
- PB - Ação da pepsina bovina
- RR - Ação da renina gástrica

FIGURA 2 - Ação das enzimas coagulantes utilizadas como padrão em meio gel de ágar-caseína. Observe-se que cada enzima possui auréolas ou zonas de precipitação características que permitem a sua identificação, sendo as enzimas da espécie *Mucor* são bastante semelhantes.

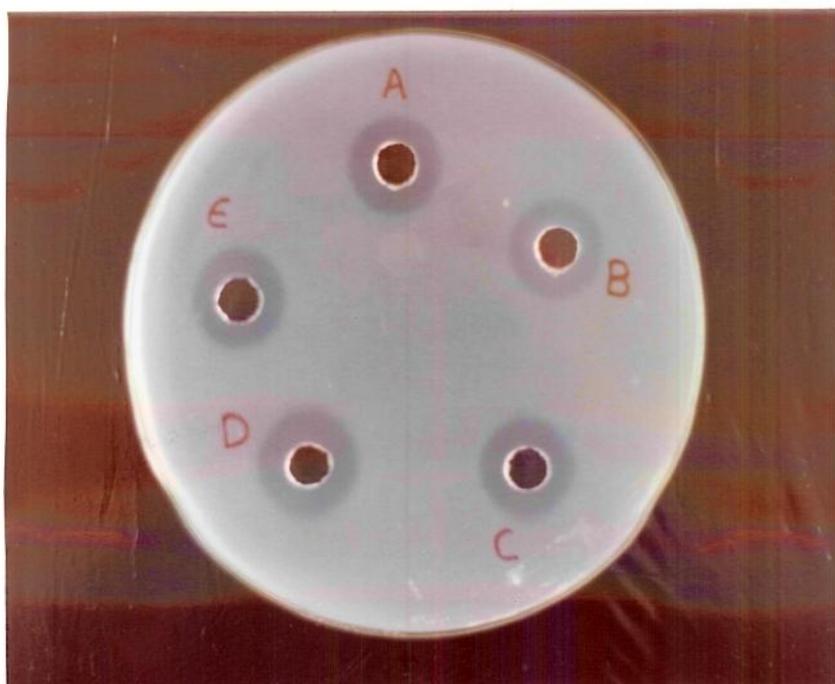


FIGURA 3 - Ação dos coalhos comerciais amostrados A, B, C, D e E em meio gel de ágar-caseína.

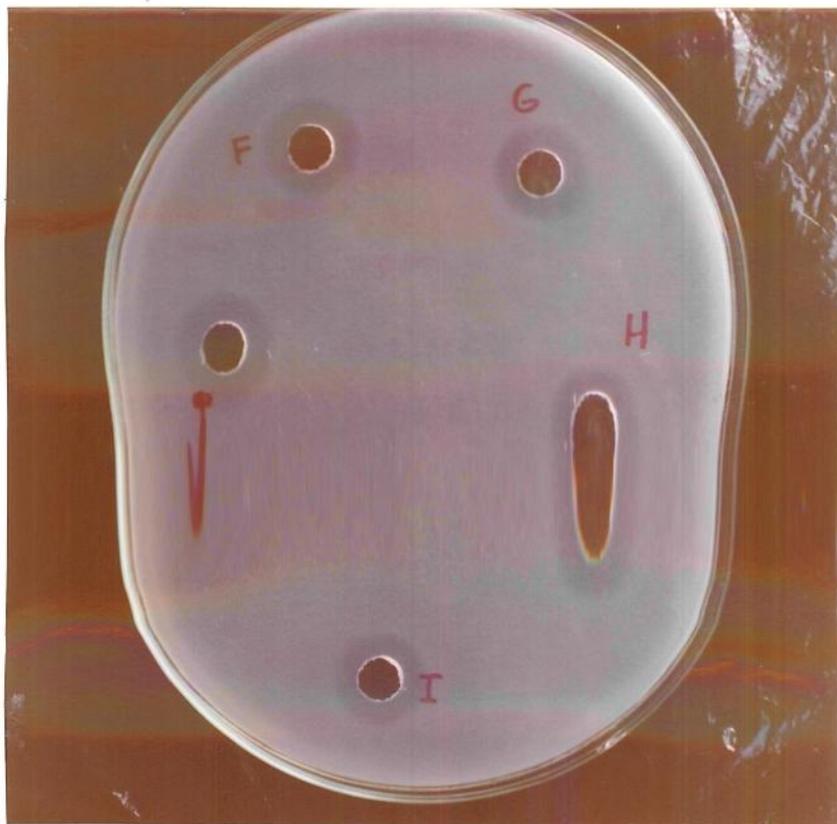


FIGURA 4 - Ação dos coalhos comerciais amostrados F, G, H, I e J em meio gel de ágar-caseína.

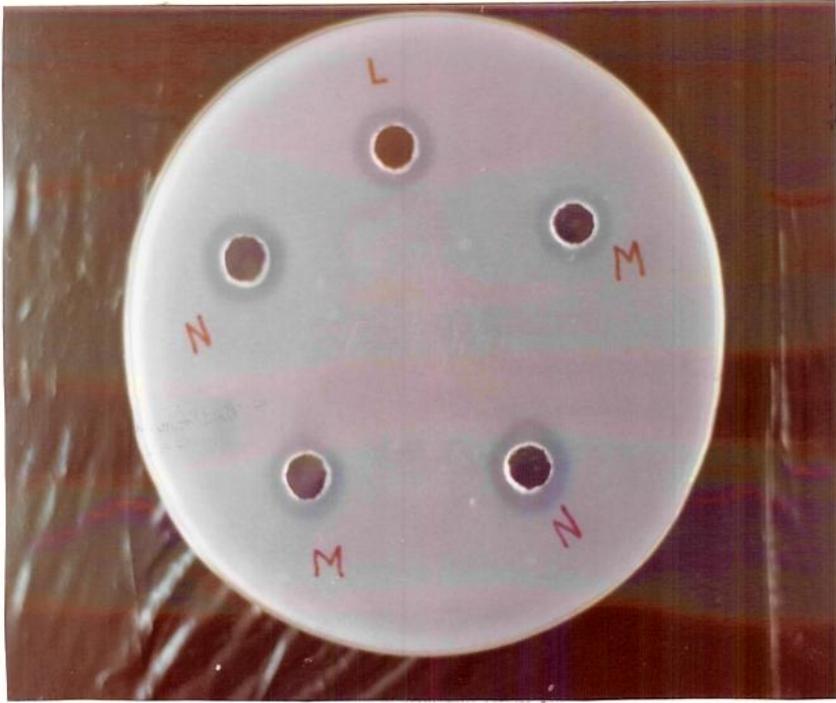


FIGURA 5 - Ação dos coalhos comerciais amostrados L, M e N em meio gel de ágar-caseína.



FIGURA 6 - Ação dos coalhos comerciais amostrados O, P e Q em gel de ágar-caseína. O coalho O mostrou as zonas de precipitação típicas da renina. Esse foi o único coalho rotulado como sendo coalho de vitelo.

35 e 60), ou precipitação por etanol (59, 70 e 104). Além disso, a coluna de filtração pode ser usada várias vezes sem reempacotamento (103). Assim sendo, resolvemos usar esse tipo de procedimento, empregando uma coluna de gel Sephadex G-100. Nas Figuras 7 a 28 (ver anexo), aparecem os perfis de eluição tanto das enzimas padrão como dos coalhos, cada perfil constando de uma curva de absorbância protéica a 280 nm e outra de atividade coagulante. Podemos notar em algumas Figuras que o pico de proteína com atividade coagulante não aparece claramente destacado na curva de absorção ultravioleta, mais provavelmente devido à diluição proporcionada pelas outras proteínas contaminantes. Em relação às enzimas padrão, a renina (Figura 7) e a pepsina porcina (Figura 8) mostraram perfis de absorção ultravioleta e atividade coagulante simples, bem definidas e coincidentes na sua maior parte. Já a pepsina bovina (Figura 9) purificada no laboratório apresentou quatro picos principais de absorção ultravioleta, sendo um deles com atividade coagulante. As enzimas padrão de origem fúngica (Figuras 10, 11 e 12) se encontravam em situação de pureza semelhante à nossa preparação de pepsina bovina; isto é, foram vários os picos protéicos que não possuíam atividade coagulante. Os perfis das amostras (ver anexo, Figuras 13 a 28), em geral, apresentaram perfis tanto ou mais complexos que o da pepsina bovina (Figura 9), sendo que houve semelhança qualitativa entre o perfil da pepsina bovina e os perfis das amostras A, B, C, E, F, P e Q (ver anexo, Figuras 13, 14, 15, 17, 18, 27 e 28, respectivamente). A proporção entre os quatro picos protéicos, porém, foi variável entre os diversos coalhos.

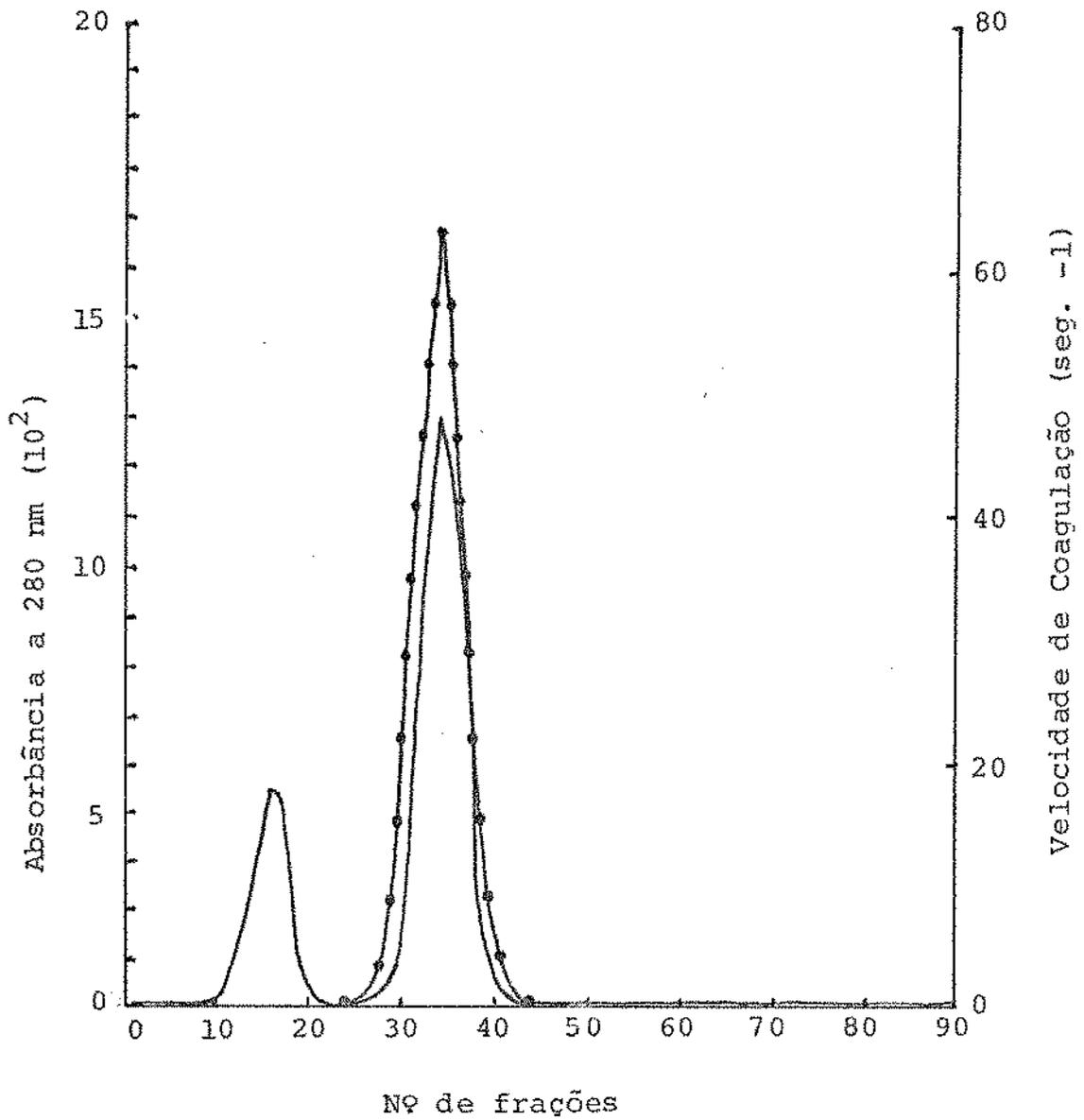


FIGURA 7 - Cromatografia da renina em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante.

— Absorbância a 280 nm.

●—● Velocidade de coagulação.

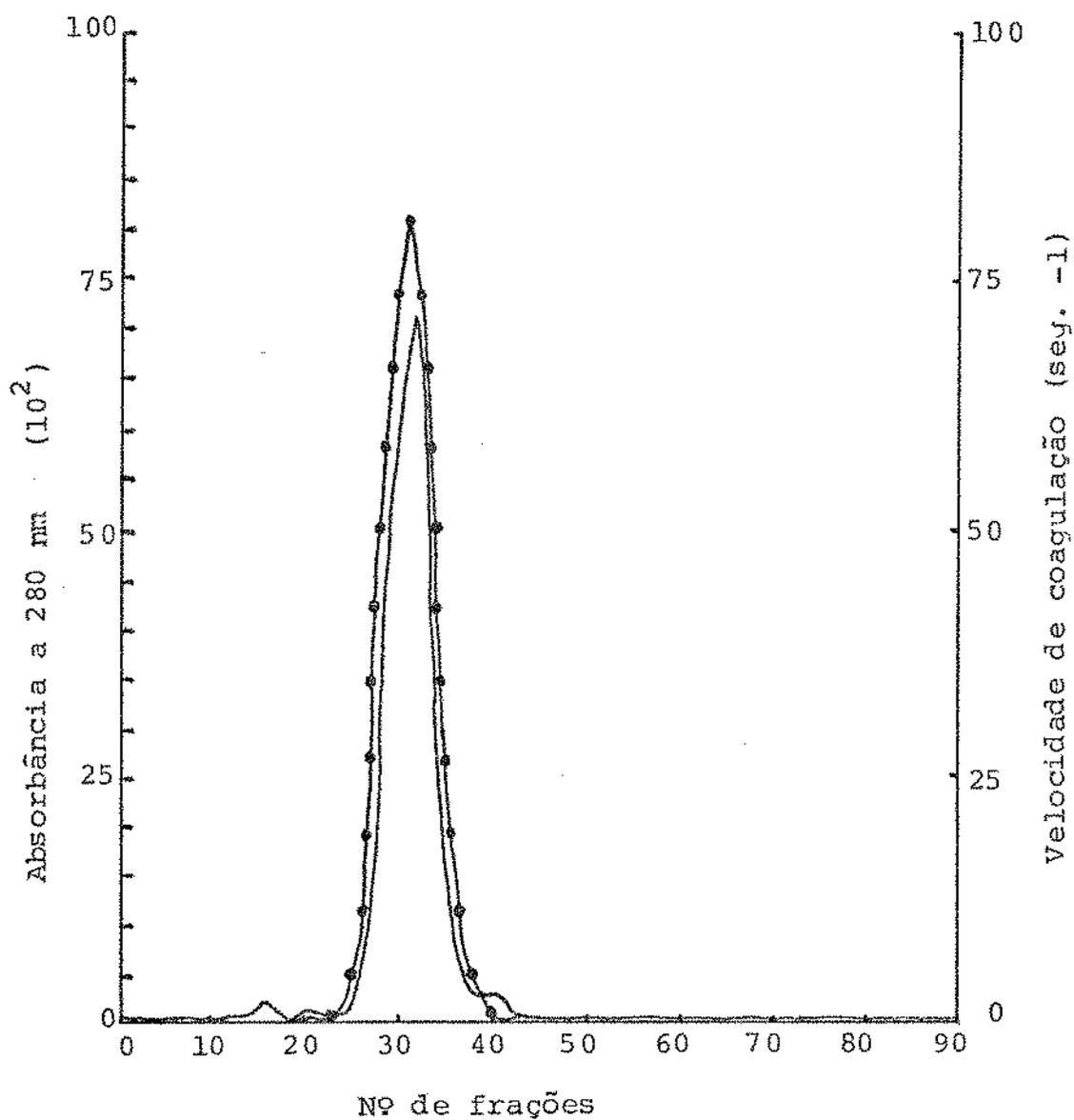


FIGURA 8 - Cromatografia da pepsina porcina em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante.

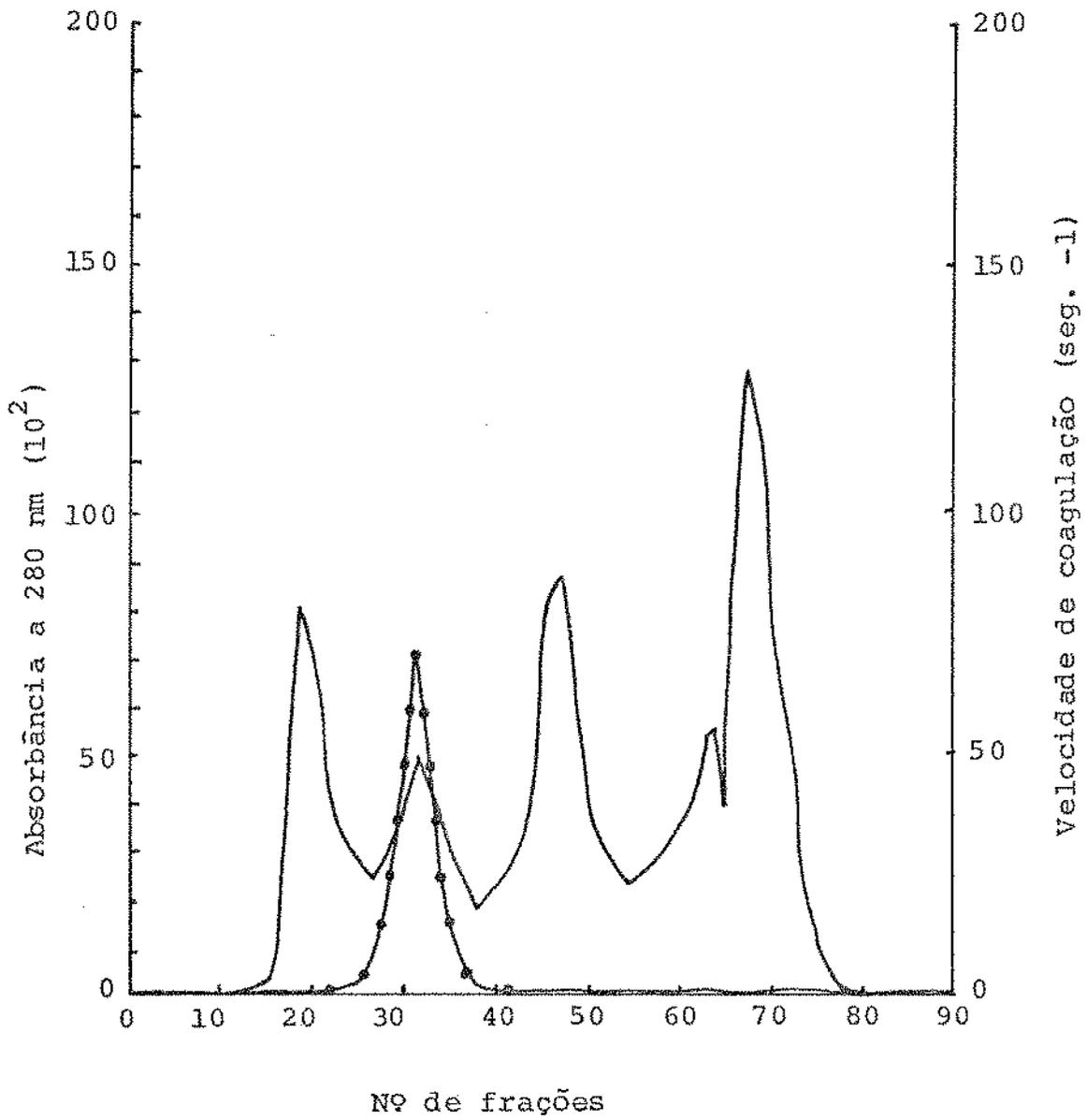


FIGURA 9 - Cromatografia da pepsina bovina em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante.

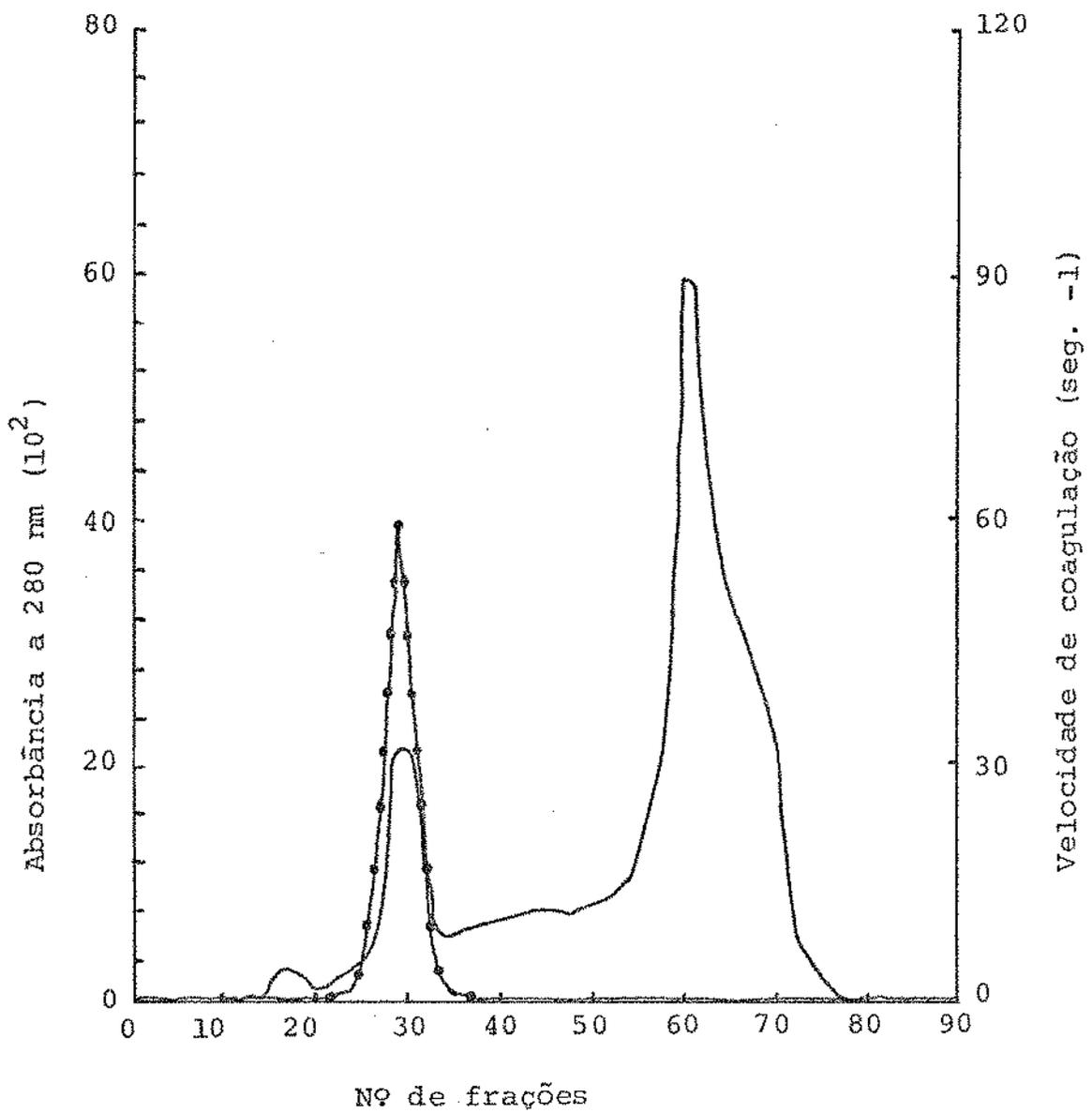


FIGURA 10 - Cromatografia da enzima do *Mucor miehei* em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante.

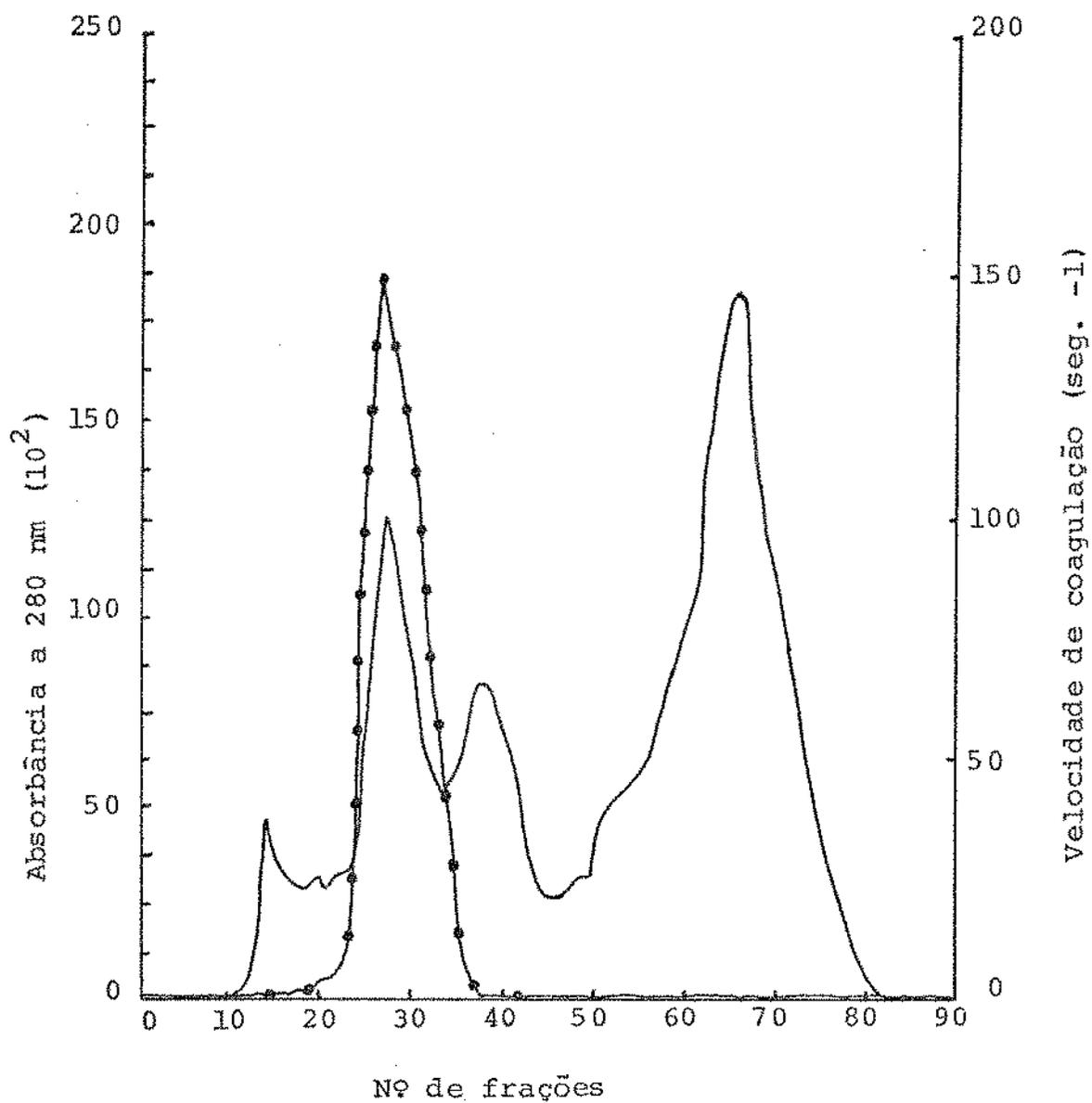


FIGURA 11 - Cromatografia da enzima do *Mucor pusillus* em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante.

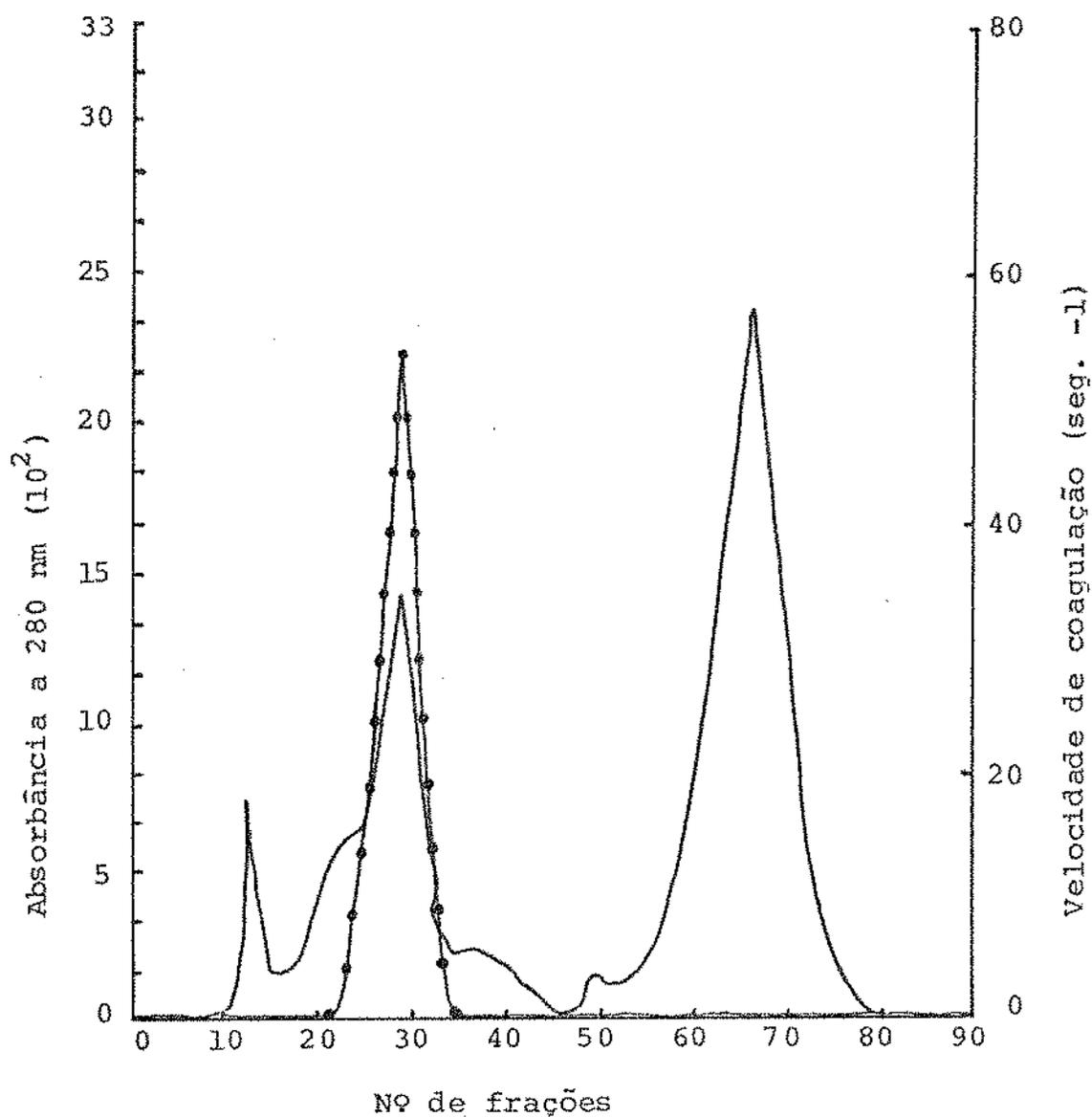


FIGURA 12 - Cromatografia da enzima da *Endothia parasitica* em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante.

Por sua vez, o coalho O (Figura 13) apresentou uma variante do perfil da pepsina bovina entre o primeiro e o segundo pico de eluição. Observando-se os volumes de eluição das diversas enzimas, podemos notar que não houve suficiente diferença entre elas para decidir qual o tipo de coalho utilizado em cada produto. Assim, a renina eluiu a 165 mL. As duas pepsinas e as enzimas fúngicas, todas entre 150 e 155 mL. Por outro lado, nas amostras dos coalhos G a N, que apresentaram perfil de eluição alterado, o volume de eluição da proteína com atividade variou entre 200 e 215 mL. Nas restantes, com perfil de eluição normal o volume de eluição variou de 160 a 175 mL. Não foi possível também estabelecer qualquer relação entre o tipo de perfil e o estado físico ou a atividade proteolítica do produto. Sabe-se apenas que, exetutando-se os coalhos H e J, os coalhos com perfil de eluição alterado eram da forma líquida. A causa da alteração desses perfis não é conhecida; porém o aparente deslocamento dos picos de alto peso para a região de menor peso molecular sugeriu possível degradação autolítica anterior ou durante o processo de obtenção dos coalhos em questão. Mesmo o deslocamento e alargamento dos picos de atividade é indicativo de algum tipo de proteólise das enzimas coagulantes.

4.11. Eletroforese normal das frações dos padrões e coalhos comerciais com atividade coagulante

Em geral, pode ser observado nas Figuras 14 a 17 que as frações da filtração em coluna de Sephadex com atividade

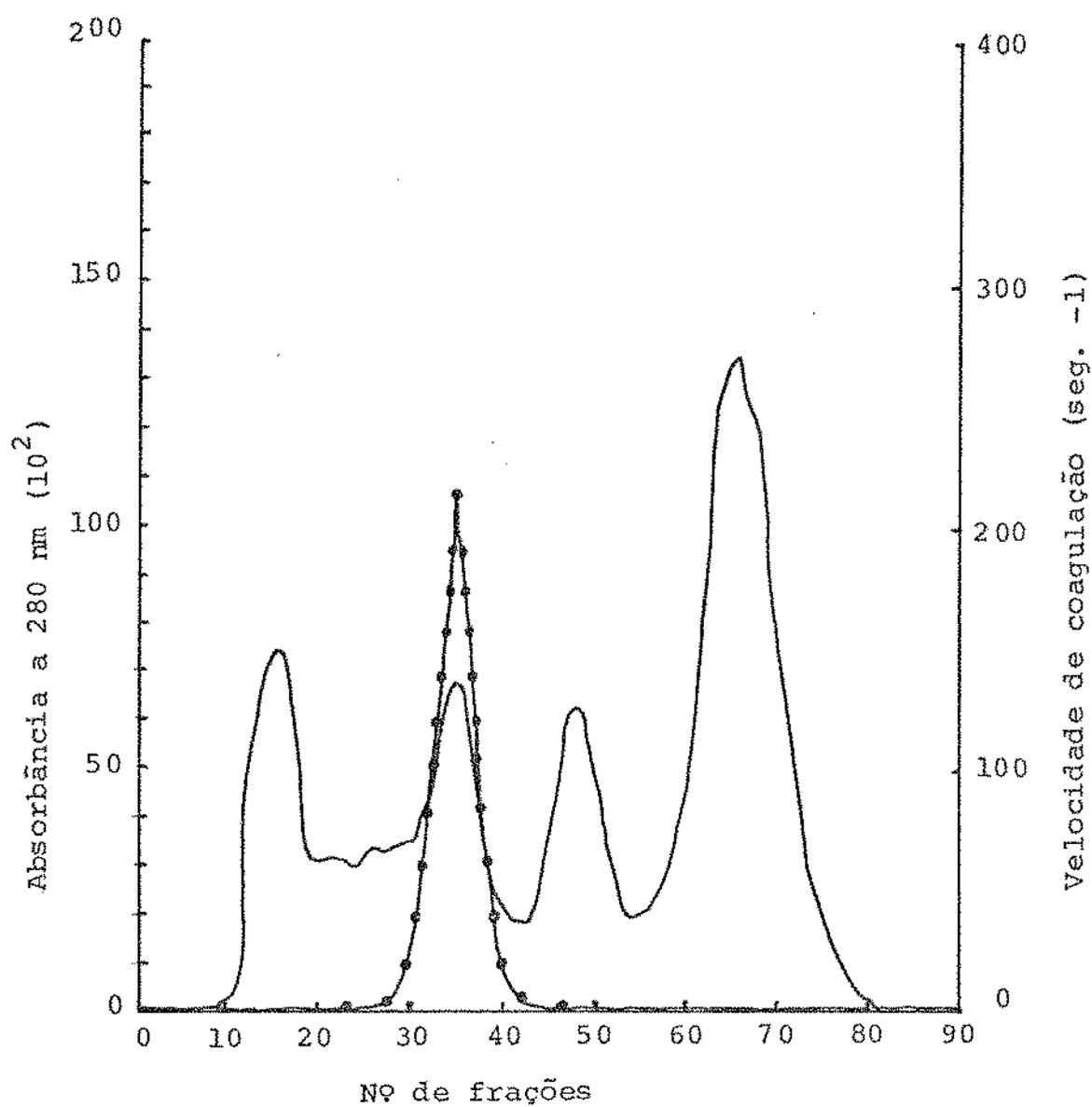
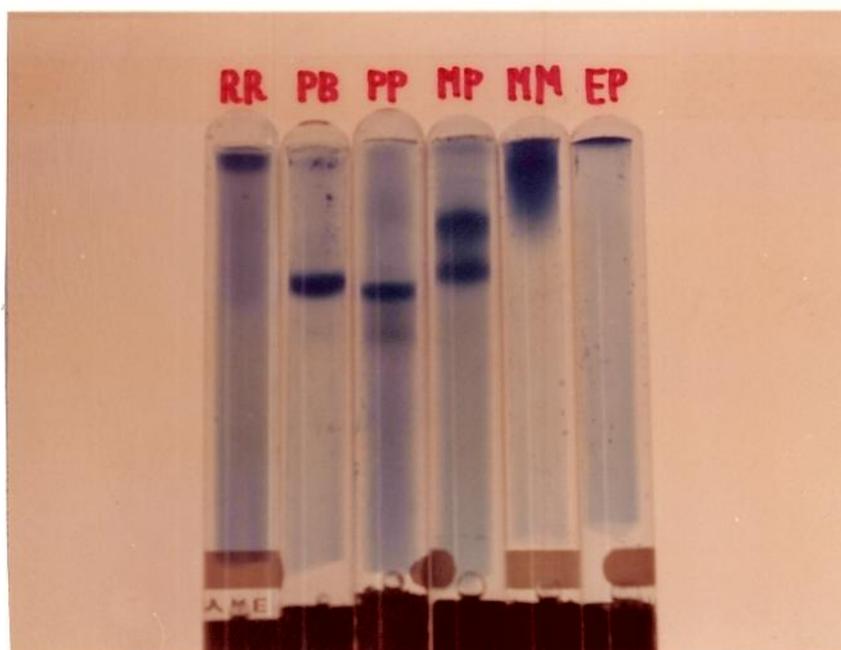


FIGURA 13 - Cromatografia do coelho comercial O em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante.

coagulante mostraram uma banda eletroforética principal, indicando assim a relativa homogeneidade da fração proteica, o que é corroborado por Shehata e colaboradores (89), que também fizeram uso desse procedimento para examinar a homogeneidade das frações obtidas por filtração em gel Sephadex G-100. Segundo Koning (48), a técnica da eletroforese permite a separação satisfatória entre renina, pepsina bovina e pepsina porcina. Essa técnica foi usada também por Alais e Novak (3) para distinguir a enzima produzida pelo fungo *Endothia parasitica*, da renina. Edwards e colaboradores (24) provaram que as bandas obtidas em gel de poliacrilamida, de queijos Cheddar fabricados com renina e enzimas coagulantes fúngicas são úteis na determinação do tipo de coagulante usado na fabricação do queijo. Isto é, na distinção e separação da renina e seus substitutos.

Como podemos observar na Figura 14, as bandas eletroforéticas obtidas das enzimas padrão tem mobilidades diferentes no gel. Comparando as bandas produzidas por 15 dos 16 coalhos comerciais, com exceção do coalho O, (Figuras 15 a 17) com a banda fornecida pela pepsina bovina, vemos que há coincidência nas mobilidades, sugerindo que os mesmos têm como enzima coagulante a pepsina bovina, enquanto que a banda fornecida pela amostra de coalho O tem mobilidade semelhante a da renina. Como o abate de bovinos segundo informação dada pelo Serviço Especial de Produção Animal da Delegacia Federal da Agricultura MA/SC é em média de quatro anos e meio, é de se esperar que haja elevada concentração de pepsina nessas amostras, uma vez que

em estômagos de bovinos com mais de dois anos de idade há apenas traços de renina (4).



- MM - Enzima do *Mucor miehei*
 MP - Enzima do *Mucor pusillus*
 EP - Enzima da *Endothia parasitica*
 PP - Pepsina porcina
 PB - Pepsina bovina
 RR - Renina gástrica

FIGURA 14 - Eletroforese em gel normal de poliacrilamida, pH 7,0, das enzimas coagulantes usadas como padrão. Pela mobilidade observam-se diferenças substanciais entre a maioria das enzimas, especialmente entre as de origem fúngica e animal. Enquanto que as enzimas do gênero *Mucor* mostraram grande diferença entre si, as pepsinas mostraram relativa similaridade.

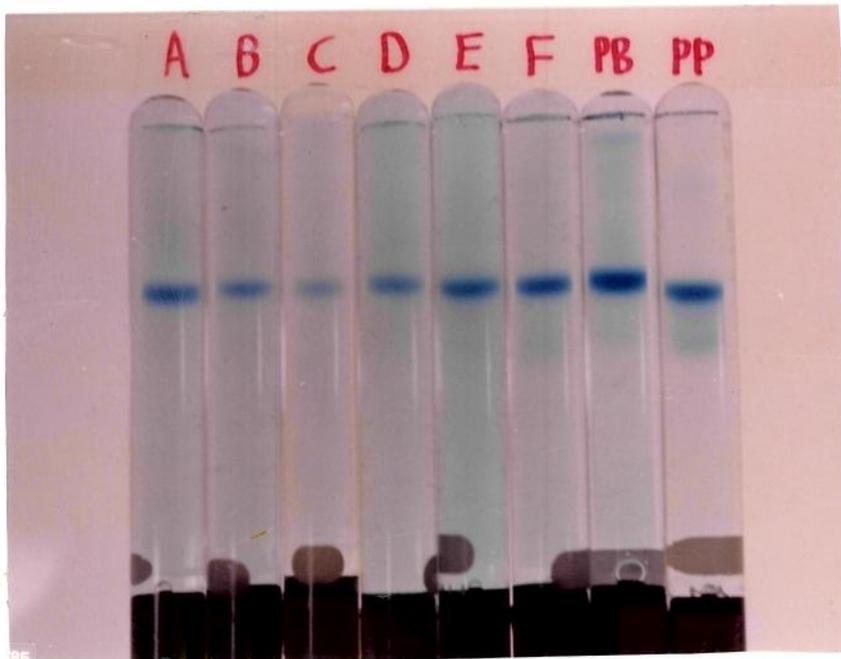


FIGURA 15 - Eletroforese em gel normal de poliacrilamida da fração Sephadex dos coalhos comerciais A, B, C, D, E e F, que mostrou atividade coagulante. Observe-se a diferença, ainda que pequena, entre a mobilidade da pepsina porcina (PP) e a das amostras de coalho.

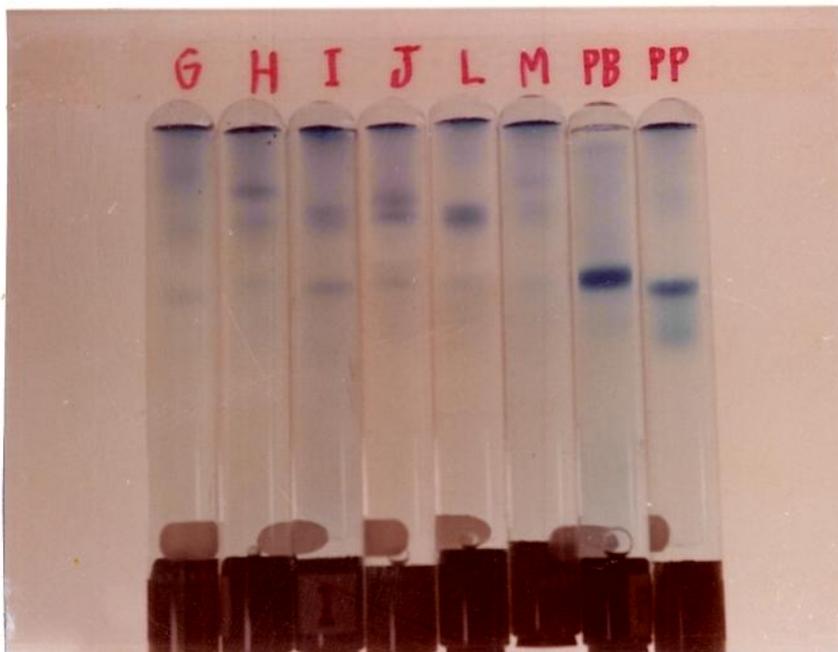


FIGURA 16 - Eletroforese em gel normal de poliacrilamida da fração Sephadex dos coalhos comerciais G, H, I, J, L e M, que mostrou atividade coagulante. Comentário igual ao da Figura 29. Observa-se-ã, também, que as bandas tênues são devidas à provável degradação dos produtos comerciais.

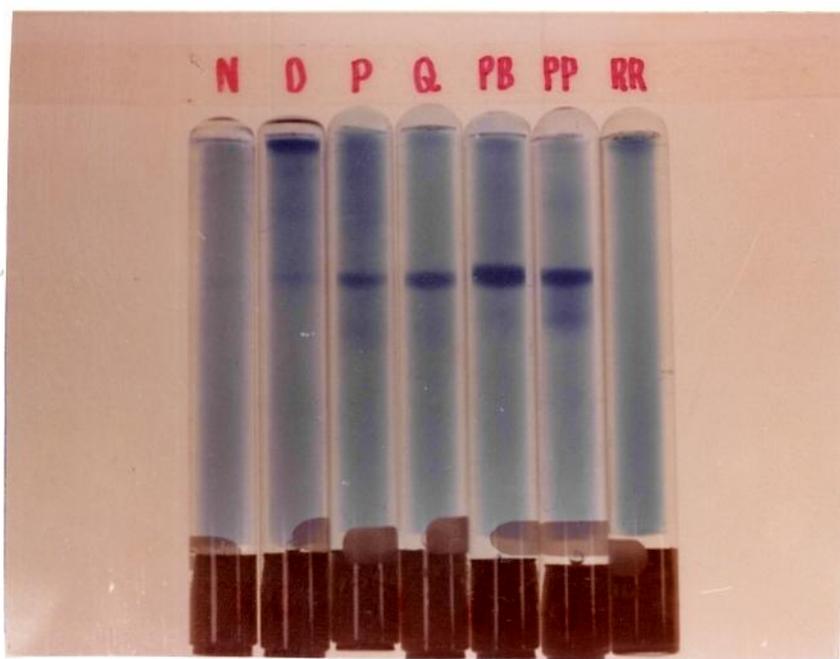


FIGURA 17 - Eletroforese em gel normal de poliacrilamida da fração Sephadex dos coalhos comerciais N, O, P e Q, que mostrou atividade coagulante. Eletroforeticamente, o coalho O demonstra consistir principalmente de renina, sendo que traços de pepsina bovina são também perceptíveis. A qualidade dos coalhos P e Q foi boa, como nos coalhos A a F.

5. CONCLUSÕES: A avaliação laboratorial dos dezesseis coalhos comerciais levou às seguintes conclusões.

1. O pH dos coalhos comerciais amostrados está dentro da faixa de maior estabilidade proteolítica.
2. A qualidade bacteriológica de 88% dos coalhos analisados está dentro de limites aceitáveis.
3. A atividade coagulante declarada dos coalhos foi geralmente igual ou inferior à encontrada, havendo ainda grande variação de atividade entre eles.
4. As enzimas coagulantes padrões da *Endothia parasitica* e renina foram as que apresentaram maior e menor atividade proteolítica nas condições utilizadas, respectivamente. A atividade proteolítica dos coalhos comerciais variou bastante, provavelmente como resultado da contaminação com outras enzimas proteolíticas.
5. As concentrações de cálcio que promoveram velocidade máxima de coagulação para todas as enzimas estudadas está entre 58 e 68 mM, nas condições de temperatura e pH utilizadas. No pH 6,5, normalmente usado para coagular enzimaticamente o leite nas indústrias queijeiras, a velocidade máxima de coagulação para todas as enzimas ocorreu com concentração de 68 mM de cálcio.
6. A concentração total de cálcio (existente no leite mais o adicionado) normalmente usado na prática de fabricação de queijos, está bem abaixo daquela necessária para que ocorra a velocidade máxima de coagulação.

7. Todas as enzimas testadas foram afetadas pelo cloro ativo. Todavia, somente concentrações de cloro acima de 100 ppm inativaram as enzimas coagulantes do *Mucor miehei*, *Mucor pusillus*, *Endothia parasitica*, pepsina porcina e pepsina bovina, enquanto que a renina foi completamente inativada com 10 ppm. Esse efeito foi facilmente detectado nas enzimas cromatograficamente homogêneas, sendo que o mesmo foi observado também com os coalhos brutos, porém, com percentual de inativação um pouco menor.
8. Com a combinação dos métodos de difusão em gel de ágar-caseína, filtração em gel Sephadex G-100 e eletroforese em gel de poliacrilamida, foi possível identificar as enzimas coagulantes contidas nos coalhos comerciais estudados. Por outro lado, com qualquer um dos métodos isoladamente não foi possível fazer-se essa identificação.
9. Os coalhos estudados, que representaram os comercialmente disponíveis no mercado brasileiro, tem como principal enzima coagulante a pepsina bovina. Um dos coalhos, porém, apresentou como agente coagulante principalmente renina com traços de pepsina bovina.

6. 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, p.121.
2. ALAIS, C. Apud KONING, P.J. Identification of rennet substitutes. IDF - Annuel Bulletin, Bruxelles (83):1-15, 1972.
3. ALAIS, C.; NOVAK, G. Étude d'un enzyme coagulant microbien dérivé de *Endothia parasitica*. Le Lait. 48(477):393-418, 1968.
4. ANDRÉN, A.; BJORCK, L.; CLAEISSON, O. Levels of chymosin and pepsin in bovine abomasal mucosa. Neth. Milk Dairy J. 35(3/4):365-366, 1981.
5. ANGELO, I.A. An appraisal of rennets from fistulated cow and buffalo calves and goat kid and Hansen rennet through chromatography and electrophoresis. Milchwissenschaft. 36(3):147-149, 1981.
6. ANSON, M.L.; MISKY, A.E. Apud KONING, P.J. Identification of rennet substitutes. IDF - Annuel Bulletin, Bruxelles (83):1-15, 1972.
7. ANTONINI, J.; CISNEROS, F. Dosage de la présure et la pepsine dans le jus gastriques bovins. Biochimie. 55:221-226, 1973.
8. ANTONINI, J.; DUMAS, R. Isolement, purification et propriétés de deux zymogènes gastriques bovins. Propriétés des proteases correspondantes. Biochimie 53:321-329, 1971.

9. ARIMA, K.; IWASAKI, S.; TAMURA, G. Milk-clotting Enzyme from microorganisms. Part I. Screening test and the identification of potent fungus. Agric. Biol. Chem. 31 (5):540-545, 1967.

10. ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Official methods of analysis. 9th ed. Washington, DC. AOAC. 1960.

11. BAKRI, M.; ASHWORTH, U.S. Purification of chymosin (rennin). J. Dairy Sci. 56(5):623, 1973.

12. BARABÁS, J. The influence of combined action of heating temperature, active acidity and of CaCl₂ supplements on milk on protein coagulation. Milchwissenschaft 36(2):98-99, 1981.

13. BEHNKE, U. Apud KONING, P.J. Identification of rennet substitutes. IDF - Annual Bulletin, Bruxelles (83):1-15, 1972.

14. BRANDL, E. Apud KONING, P.J. Identification of rennet substitutes. IDF - Annual Bulletin, Bruxelles (83):1-15, 1972.

15. CARINI, S.; TEDESCO, R. Applicazione del método cromatográfico all'analisi dei cagli. Scienza e Técnica Lattiero-Casearia 30(1):32-40, 1979.

16. CASTLE, A.V.; WHEELLOCK, J.V. Purification of rennin. J. Dairy Res. 38:69-71, 1971.

17. CHEESEMAN, G.C. Denaturation of rennin; effect on activity and molecular configuration. Nature 205:1011-1012, 1965.

18. CHEESEMAN, G.C. Action of rennet and other proteolytic enzymes on casein in casein-agar gels. *J. Dairy Res.* 30 (1):17-22, 1963.
19. COLLIN, J.C.; RETTA, G.M.; MARTIN, P. Immunological identification of milk-clotting enzymes. *J. Dairy Res.* 49 (2):221-230, 1982.
20. CORRADINI, G. Gli attuali indirizzi per la valutazione dei coagulanti del latte. *Scienza e Técnica Lattiero-Casearia* 30(1):9-31, 1979.
21. CUNHA, B.C.A.; VITOLLO, M.; VAZ, A.J. Testes comparativos de atividade de renina e coalhos microbianos. *Indústria Alimentar* 10:36-42, 1977.
22. DI GREGORIO, F.; SISTO, R.; MORISI, F. Método di determinazione seletiva della chimasi nei cagli. *Scienza e Técnica Lattiero-Casearia* 30(2):122-127, 1979.
23. DOUILLARD, R. Inactivation par l'urée de la présure et des pepsines bovines; application possible a leur dosage en mélange. *Biochimie* 53:447-455, 1971.
24. EDWARDS, J.L.; KOSIKOWSKI, F.V. Electrophoretic proteolytic patterns in cheddar cheese by rennet and fungal rennets: Their significance to international classification of cheese varieties. *J. Dairy Sci.* 52(10):1575-1678, 1969.
25. ELLIOT, J.A.; EMMONS, D.B. Rennin detection in cheese with the passive indirect hemagglutination test. *Can. Inst. of Food Techn. J.* 4(1):16-18, 1971.

26. EMMONS, D.B. Apud KONING, P.J. Identification of rennet substitutes. IDF - Annuel Bulletin, Bruxelles (83):1-15, 1972.
27. FOX, P.F. Influence of temperature and pH on the proteolytic activity of rennet extrat. J. Dairy Sci. 52(8):1214-1218, 1969.
28. GANGULI, N.C.; BHALERAO, V.R. Differential action of animal, vegetable and microbial rennets on casein as revealed by casein-agar plate assay method. J. Dairy Sci. 48(4):438-444, 1965.
29. GARNOT, P.; THAPON, J.L.; MATHIEU, C.M.; MAUBOIS, J.L.; DUMAS, B.R. Determination of rennin and bovine pepsins in commercial rennets and abomasal juices. J. Dairy Sci. 55(12):1641-1650, 1972.
30. GARNOT, P.; VALLES, J.L.; THAPON, R.; TOULLEC, R.; TOMASSONE; DUMAS, B.R. Influence of dietary protein on rennin and pepsin content of pré-ruminant calf well. J. Dairy Res. 41(1):19-23, 1974.
31. GORRETA, L.J. Coalhos e coagulantes. Revista do Instituto Cândido Tostes, 17-21, Jul/Ago. 1980.
32. GREEN, M.L. Apud GREEN, M.L. Review of the progress of dairy science: milk coagulants. J. Dairy Res. 44:159-188, 1977.
33. HARBOE, M.K. Analysis of milk-clotting enzymes in commercial rennets. Neth. Milk Dairy J. 35:367-369, 1981.
34. HILL, R.D. The preparation of k-casein. J. Dairy Res. 30:

101-107, 1963.

35. 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.
36. HOFMANN, T. Apud GREEN, M.L. Review of the progress of dairy science: milk coagulants. *J. Dairy Res.* 44:159-188, 1977.
37. HOLMES, D.G.; DUERSCH, J.W.; ERNSTROM, C.A. Distribution of milk-clotting enzymes between curd and whey and their survival during cheddar cheese making. *J. Dairy Sci.* 60 (6):862-869, 1977.
38. HOLMES, D.G.; ERNSTROM, C.A. Low concentration assay of milk-clotting enzymes. *J. Dairy Sci.* 56(5):623, 1973.
39. HOLT, C.; MUIR, D.D. Inorganic constituents of milk: I. Correlation of soluble calcium with citrate in bovine milk. *J. Dairy Res.* 46(3):433-439, 1979.
40. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. International Standard: Determination of the calcium content of milk. FIL-IDF 36, 1966.
41. ISLAN, M.A.; BLANSHARD, J.M.V. Purification and properties of an extracellular proteolytic enzyme from *Bacillus cereus*. *J. Dairy Res.* 40(3):427-440, 1973.
42. IWASAKI, S.; YASUI, T.; TAMURA, G.; ARIMA, K. Milk-clotting enzyme from microorganisms Part IV. Immunological studies on enzyme properties. *Agr. Biol. Chem.* 31(12):1427-1433, 1967.

43. JOHNK, P. The CHL system for coagulant analysis. *Scienza e Técnica Lattiero-Casearia* 30(1):55-59, 1979.
44. KOBAYASHI, H.; KUSAKABE, I.; MURAKAMI, K. Rapid isolation on microbial milk-clotting enzymes by N-acetyl or N-isobutyryl pepstatin-aminohexylagarose. *Analytical Biochemistry*. 122(2):308-312, 1982.
45. KONING, P.J. Apud KONING, P.J. Identification of rennet substitutes. *IDF - Annual Bulletin, Bruxelles* (83):1-15, 1972.
46. KONING, P.J. Rennets and its substitutes. *IDF - Annual Bulletin, Bruxelles* (126):11-15, 1980.
47. KONING, P.J.; BRAAISMA, J. Th.M. Identification of different types of rennet by means of isoelectric focusing. *Neth. Milk Dairy J.* 27:386-378, 1973.
48. KONING, P.J.; VAN ROOYEN, P.J.; KOK. Characterization of mixtures of calf rennet and rennets substitutes. *Neth. Milk Dairy J.* 23:55, 1969.
49. KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *J. Gen. Physiol.* 30:291-314, 1947.
50. LAWRENCE, R.G.; SANDERSON, W.B. A micro-method for the qualitative estimation of rennets and other proteolytic enzymes. *J. Dairy Res.* 36:21-29, 1969.
51. LAXER, S.; PINSKI, A.; BARTOOV, B. Further purification and characterization of a thermophilic rennet. *Biotechnol. and Bioengineering* 23(11):2483-2492, 1981.
52. LIM, R.S.; DINENSEN, N. Determination of individual enzyme

- content in commercial milk coagulating enzyme blends. J. Dairy Sci. 56(5):623, 1973.
53. LINKLATER, P.M. Apud KONING, P.J. Identification of rennet substitutes. IDF - Annuel Bulletin, Bruxelles (83):1-15, 1972.
54. MALPRESS, F.H. Apud KONING, P.J. Identification of rennet substitutes. IDF - Annuel Bulletin, Bruxelles (83):1-15, 1972.
55. MARTENS, R. Apud KONING, P.J. Identification of rennet substitutes. IDF - Annuel Bulletin, Bruxelles (83):1-15, 1972.
56. MARTENS, R.; NAUDTS, M. Rennet and substitutes. IDF - Annuel Bulletin, Bruxelles (108):51-63, 1978.
57. MARTIN, P.; COLLIN, J.C.; GARNOT, P.; DUMAS, B.R.; MOCQUOT, G. Evaluation of bovine rennets in terms of absolute concentrations of chymosin and pepsin A. J. Dairy Res. 48(3):447-456, 1981.
58. MATHENSON, A.R. The immunochemical determination of chymosin activity in cheese. N.Z.J. Dairy Sci. Technol. 15:33-41, 1981.
59. Mc KENZIE, H.A.; WAKE, R.G. An improved method for the isolation of k-casein. Biochem. Biophys. Acta. 47:240-242, 1961.
60. MELACHOURIS, N. Discontinuous gel electrophoresis of whey proteins, casein and clotting-enzymes. J. Dairy Sci. 52(4):456-459, 1969.

61. MELACHOURIS, N.; TUCKEY, S.L. Properties of a milk-clotting microbial enzyme. *J. Dairy Sci.* 51(5):650-655, 1968.
62. MICKELSEN, R.; FISH, N.L. Comparing proteolytic action of milk-clotting enzymes on casein and cheese. *J. Dairy Sci.* 53(6):704-710, 1970.
63. MOLINARI, G. Riconoscimento dei coagulanti il latte per focalizzazione isoeletrica. *Scienza e Técnica Lattiero-Casearia* 30(2):117-121, 1979.
64. MOOR, C.V. Milk ultracentrifugal opalescent layer. I. Composition as influenced by heat, temperature and pH. *J. Dairy Sci.* 56(5):544-552, 1973.
65. MULDOON, P.J.; LISKA, B.J. Comparison of a resin ion-exchange method for determination of ionized calcium in skim milk. *J. Dairy Sci.* 52(4):460-464, 1969.
66. MULVIHILL, D.M.; FOX, P.F. Seletive denaturation of milk coagulants in 5M-urea. *J. Dairy Res.* 44(2):319-324, 1977.
67. MURAO, S.; SHUEO, S. Apud KONING, P.J. Identification of rennet substitutes. *IDF - Annuel Bulletin Bruxelles* (83): 1-15, 1972.
68. NAGUIB, M.M.; ISMAIL, A.A.; EL-ARIAN, A.F.; EL-SHENAWY, M. A.; NAGUIB, K. Comparative study on the fractionation of Egyptian commercial liquid rennet on Sephadex G-100. *Dairy Sci. Abs.* 42(8):623, 1980.
69. NEVILLE, M.C.; WATERS, C.D. Secretion of calcium into milk: Review. *J. Dairy Sci.* 66(3):371-380, 1983.

70. NOBLE, Jr., R.W.; WAUGH, F.D. Casein micelles formation and structure. *J. Am. Chem. Soc.* 87(10):2236-2255, 1965.
71. O'LEARY, P.A.; FOX, P.F. A method for the quantitative analysis of the enzyme complement of commercial rennets. *J. Dairy Res.* 41(3):381-387, 1974.
72. O'LEARY, P.A.; FOX, P.F. A procedure for the isolation of gastric enzymes. *J. Dairy Res.* 42(3):445-451, 1975.
73. PANARI, G.; FOSSA, E. L'analisi dei cagli nel comprensório del Parmigiano Reggiano. *Scienza e Técnica Lattiero-Casearia* 30(1):51-54, 1979.
74. PATRICK, F.; FOX, F.; WHITAKER, J.R. Isolation and characterization of sheep pepsin. *Biochem. J.* 161:389-398, 1977.
75. PEARSE, K.N. The inactivation of rennet by chlorinated water. *N.Z.J. Dairy Sci. Technol.* 13:127-128, 1978.
76. PERUFO, A.D.B.; PALLAVICINI, C.; TEALDO, E.; ZAMORANI, A. Identification of milk coagulants by electrophoresis in sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gels. *Milchwissenschaft* 39(3):153-155, 1984.
77. RAMPILLI, M.; MUCCHETTI, G. Analisis of milk-clotting enzymes. III. Use of rocket immunoelectrophoresis for evaluation of especific clotting activities in enzyme mixtures. *Dairy Sci. Abs.* 45(9):687, 1983.
78. RAYMOND, M.N.; BRICAS, E.; SALESSE, R.; GARNIER, J.; GARNOT, P.; DUMAS, B.R. A proteolytic unit for chymosin (rennin) activity based on a reference syntetic peptide. *J. Dairy*

Sci. 56(4):419-422, 1973.

79. RESMINI, P.P.; CANTAGALLI, P.; PIAZZI, S.E.; SORDI, S.; BRAG-
CIALI, A. Metodi immunochimici per la valutazione della
genuinità dei coagulanti il latte: Acquisizione e pros-
pective. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* 30(1):17-
31, 1979.
80. RICHARDSON, G.H. The purification and characterization of
a heat-stable protease from *Pseudomonas fluorescens* B52.
N.Z.J. Dairy Sci. Technol. 16:195-207, 1981.
81. RICHARDSON, G.H. Differentiation of enzyme coagulants on
casein-agar gels. *J. Dairy Sci.* 53(10):1373-1376, 1970.
82. RICHARDSON, G.H. Differentiation of enzyme coagulants on
casein-agar gels. *J. Dairy Sci.* 51(6):940, 1968.
83. RICHARDSON, G.H.; CHAUDHARI, R.V. Differences between calf
and adult bovine rennet. *J. Dairy Sci.* 53(19):1367-1372,
1970.
84. RITTER, W.; SCHILT, P. Apud KONING, P.J. Identification of
rennet substitutes. *IDF - Annual Bulletin, Bruxelles*
(83):1-15, 1972.
85. ROSE, D. Variation in the heat stability and composition
of milk from individual cows during lactation. *J. Dairy*
Sci. 44(3):430-441, 1961.
86. ROTHE, G.A.L.; AXELSEN, N.H.; JOHNK, P.; FOLTMANN, B. Immu-
nochemical, chromatographic and milk-clotting activity
measurements for quantification of milk-clotting enzymes
in bovine rennets. *J. Dairy Res.* 43(1):85-95, 1976.

87. ROTHE, G.A.L.; HARBOE, M.K.; MARTINY, S.C. Quantification of milk-clotting enzymes in 40 commercial bovine rennets, comparing rocket immunoelectrophoresis with an activity ratio assay. *J. Dairy Res.* 44(1):73-77, 1977.
88. SALESSE, R.; GARNIER, J. Synthetic peptides for chymosin and pepsin assays: pH effect and pepsin independent determination in mixtures. *J. Dairy Sci.* 59(7):1215-1221, 1976.
89. SHEHATA, A.S.; ISMAIL, A.A.; HEGAZI, A.; HAMDY, A.M. Fractionation of commercial rennet enzymes on Sephadex G-100. *Milchwissenschaft* 33(11):693-695, 1978.
90. SHOVERS, J.; FOSSUN, G.; NEAL, A. Procedure for electrophoretic separation and visualization of milk-clotting enzymes in milk coagulants. *J. Dairy Sci.* 55(11):1532-1534, 1972.
91. SHOVERS, J.; KORNOWSKI, R. Differential assay for mixtures of rennet and pepsin. *J. Dairy Sci.* 51(6):937-938, 1968.
92. SHOVERS, J.; KORNOWSKI, R.; FOSSUN, G. Differential assay for milk coagulants in mixtures with porcine pepsin. *J. Dairy Sci.* 56(8):994-997, 1973.
93. SIMONART, P.; KWANS, Y.C. Apud KONING, P.J. Identification of rennet substitutes. *IDF - Annual Bulletin, Bruxelles* (83):1-15, 1972.
94. SPECK, M.L. Compendium of methods for the examination of foods. American Public Health Association (APHA) 8th ed. Washington, DC. 1976.

95. STEPANOV, V.M.; LOBAREVA, L.S.; ARIMA, K. Coloured inhibitors of pepsin. *Biochem. Biophys. Acta.* 151:719-721, 1968.
96. TAN, J.J.; WHITAKER, J.R. Rates and extents of hydrolysis of several caseins by pepsin, rennin, *Endothia parasitica* *Mucor pusillus* protease. *J. Dairy Sci.* 55(11):1523-1531, 1972.
97. TESSIER, H.; ROSE, D. Calcium ion concentration in milk. *J. Dairy Sci.* 41(3):351-359, 1958.
98. THOMASOW, J. Apud KONING, P.J. Identification of rennet substitutes. *IDF - Annuel Bulletin, Bruxelles* (83):1-15, 1972.
99. TOLKACHEV, A.N.; LEBEDEV, A.B. Diffusion of rennet preparation in casein-agar gel. *Dairy Sci. Abs.* 42(6):433, 1980.
100. TURNER, M.D.; MILLER, B.S.L.L.; SEGAL, H.L. Apud KONING, P.J. Identification of rennet substitutes. *IDF - Annuel Bulletin, Bruxelles* (83):1-15, 1972.
101. WEBER, L.; OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244(16):4406-4412, 1969.
102. WHITAKER, J.R. Activity assay for *Endothia parasitica* protease using trypsinogen as substrate. *J. Dairy Sci.* 55(6):719-725, 1972.
103. YAGUCHY, M.; DAVIES, T.D.; KIM, Y.K. Preparation of k-casein by gel filtration. *J. Dairy Sci.* 51(4):473-477,

1958.

104. 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.

7. A N E X O

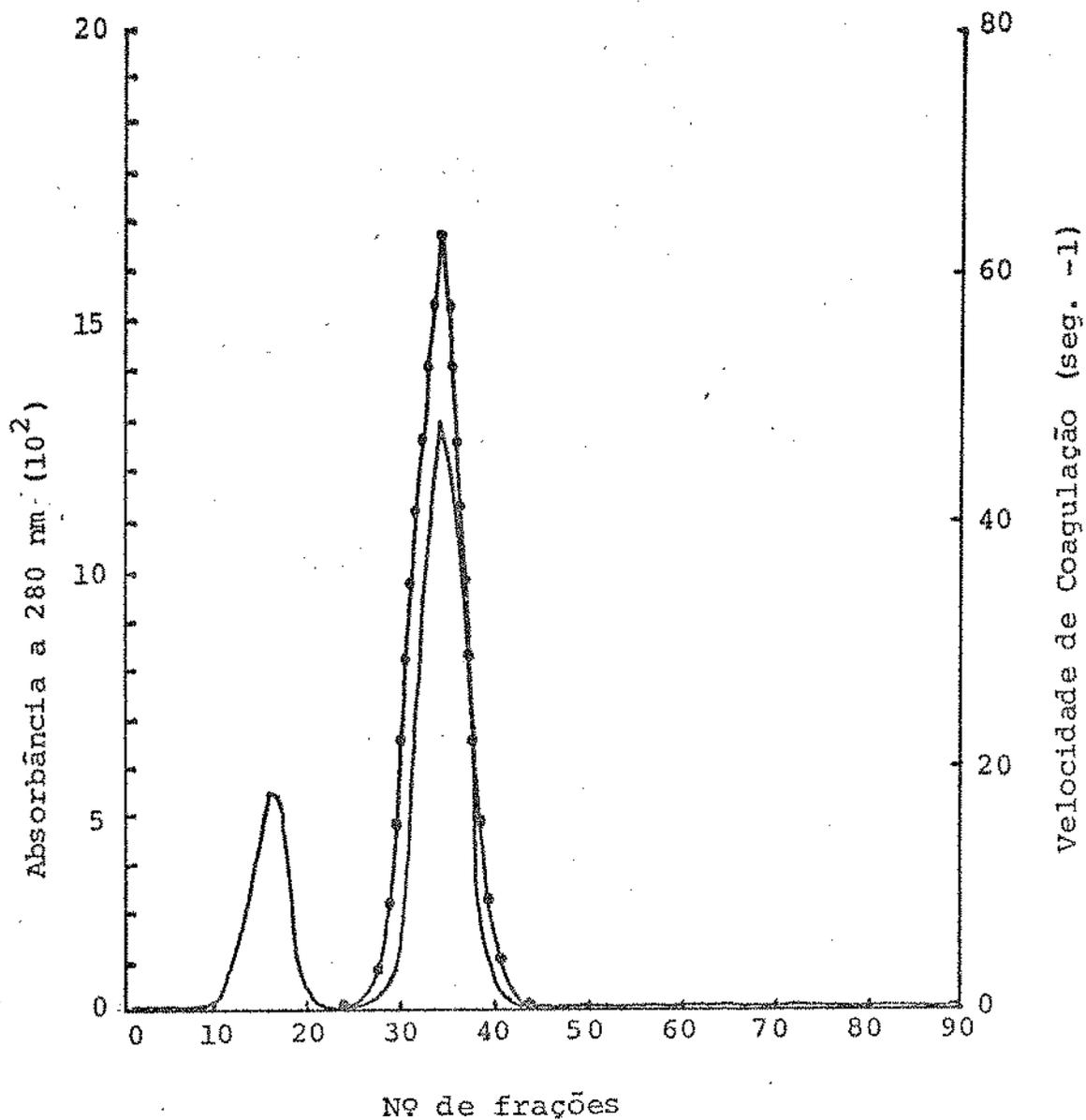


FIGURA 7 - Cromatografia da renina em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante.

— Absorbância a 280 nm.
 ●—● Velocidade de coagulação.

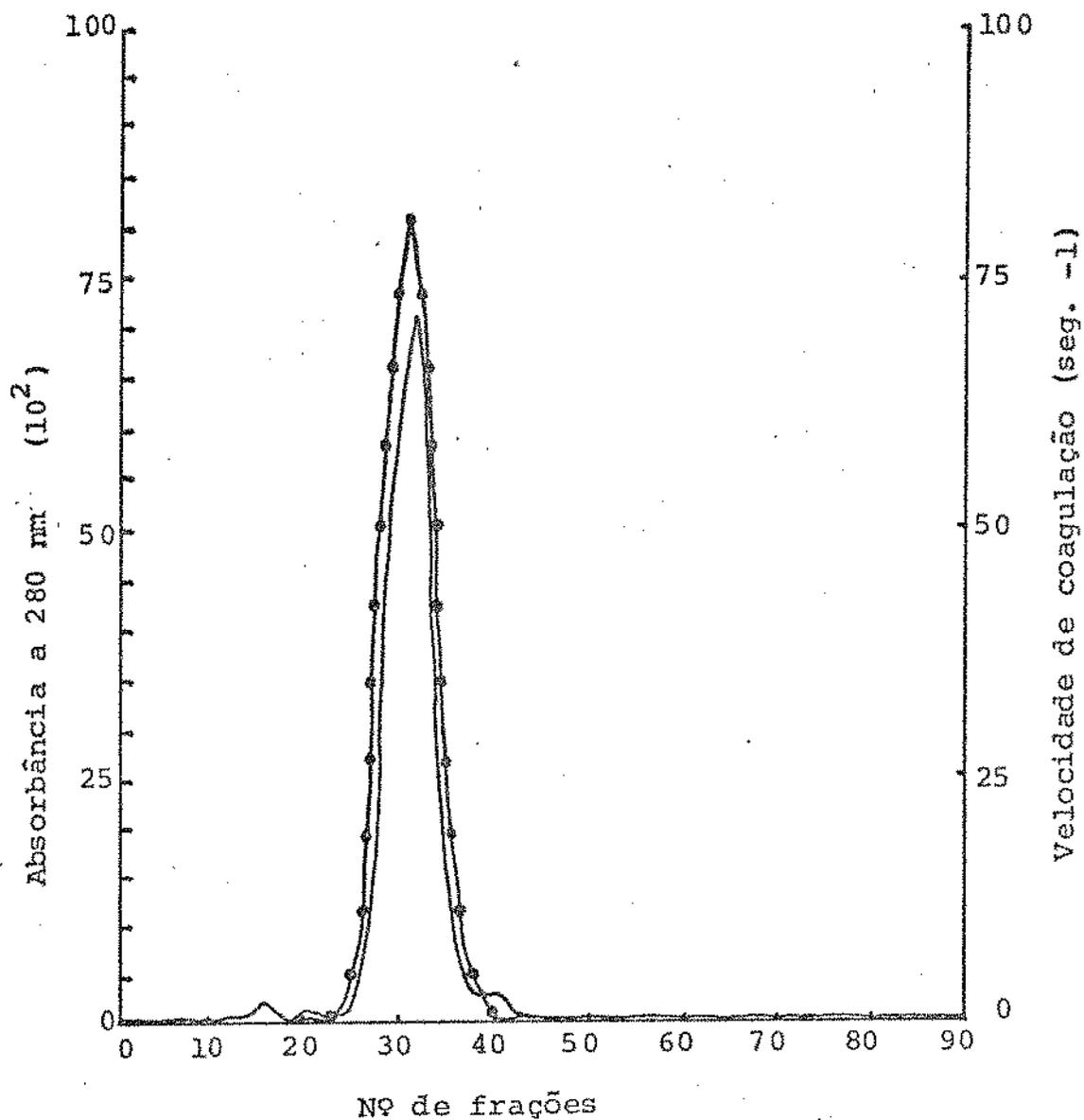


FIGURA 8 - Cromatografia da pepsina porcina em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante.

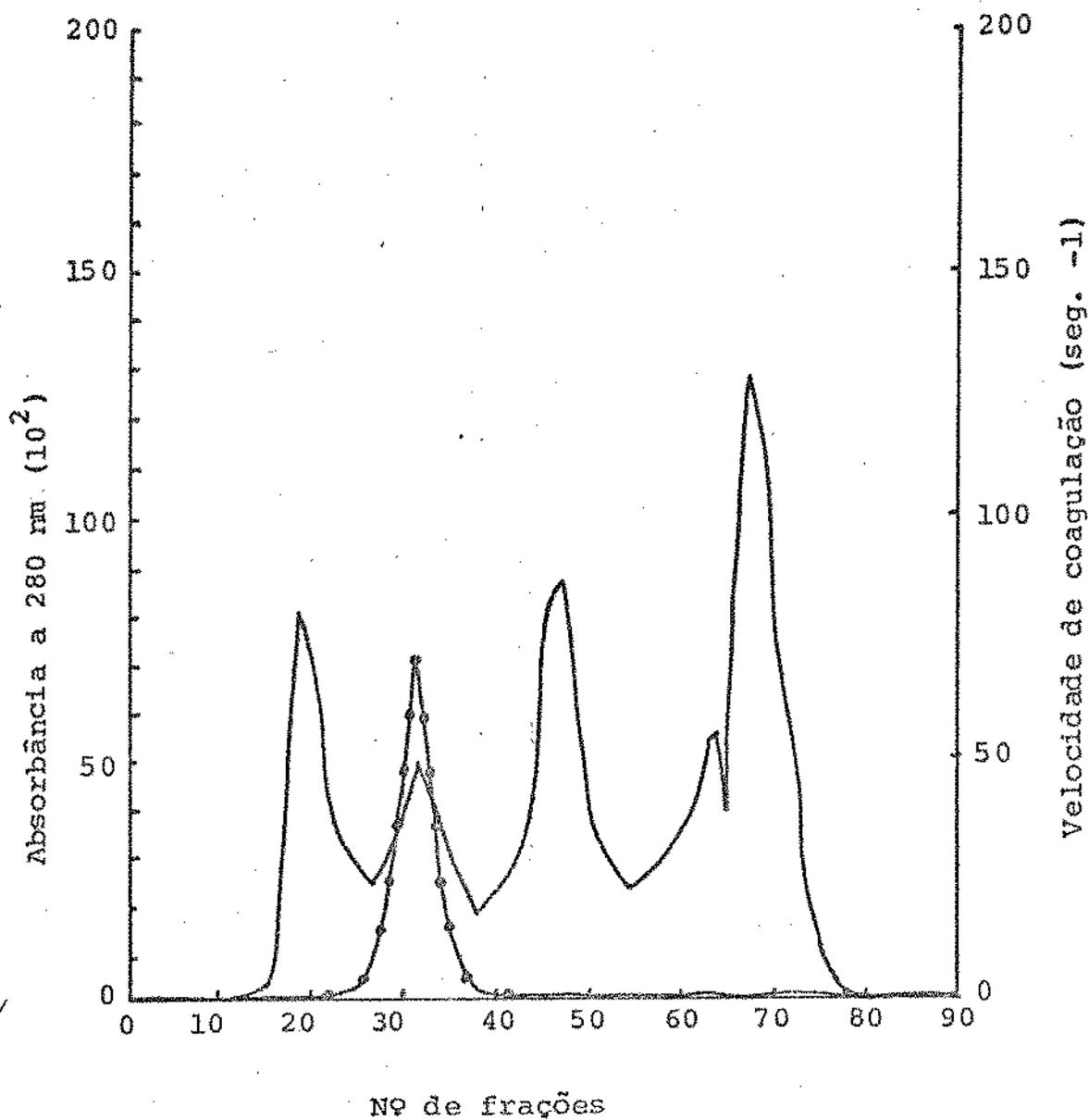


FIGURA 9 - Cromatografia da pepsina bovina em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante.

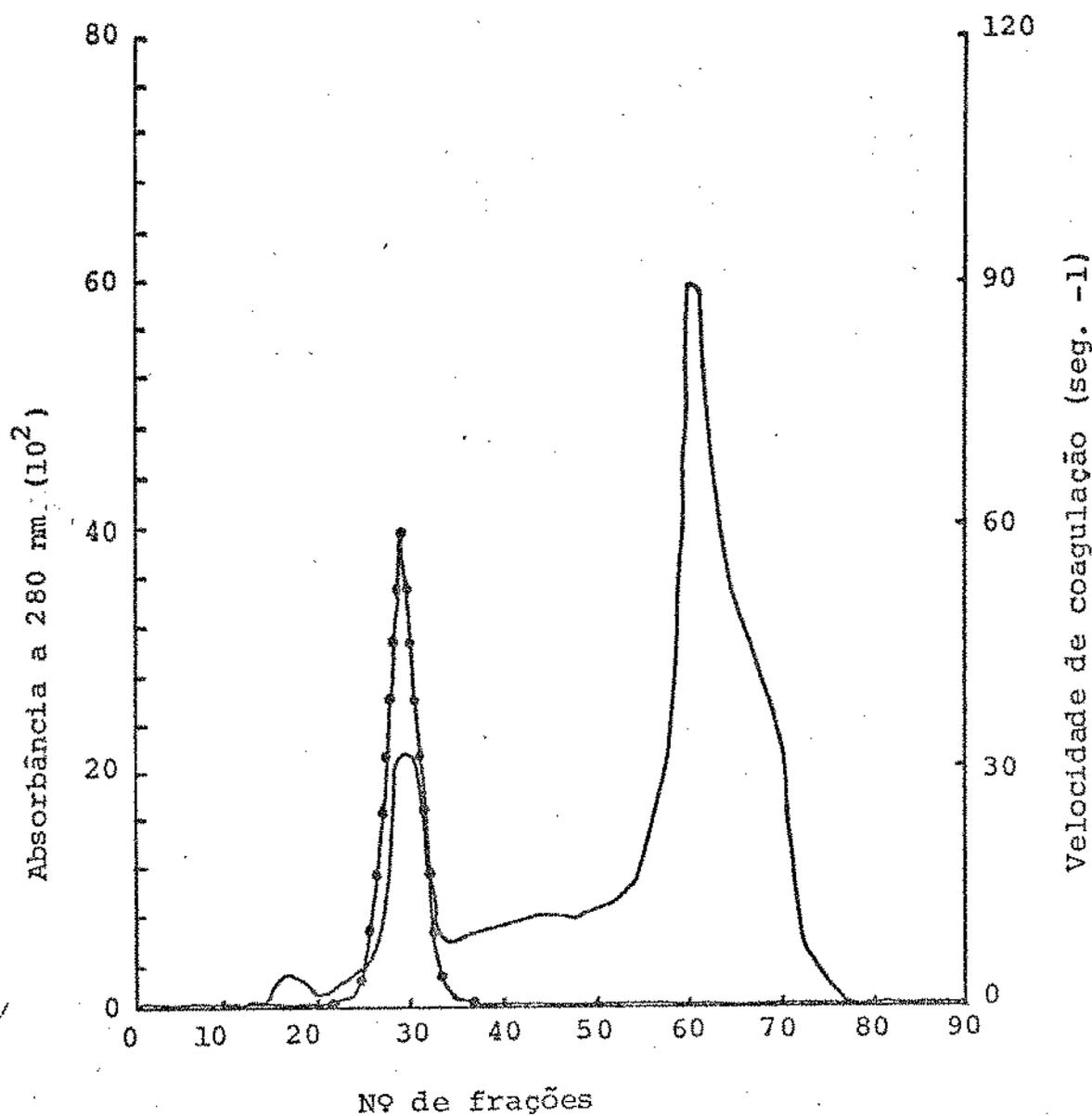


FIGURA 10 - Cromatografia da enzima do *Mucor miehei* em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante.

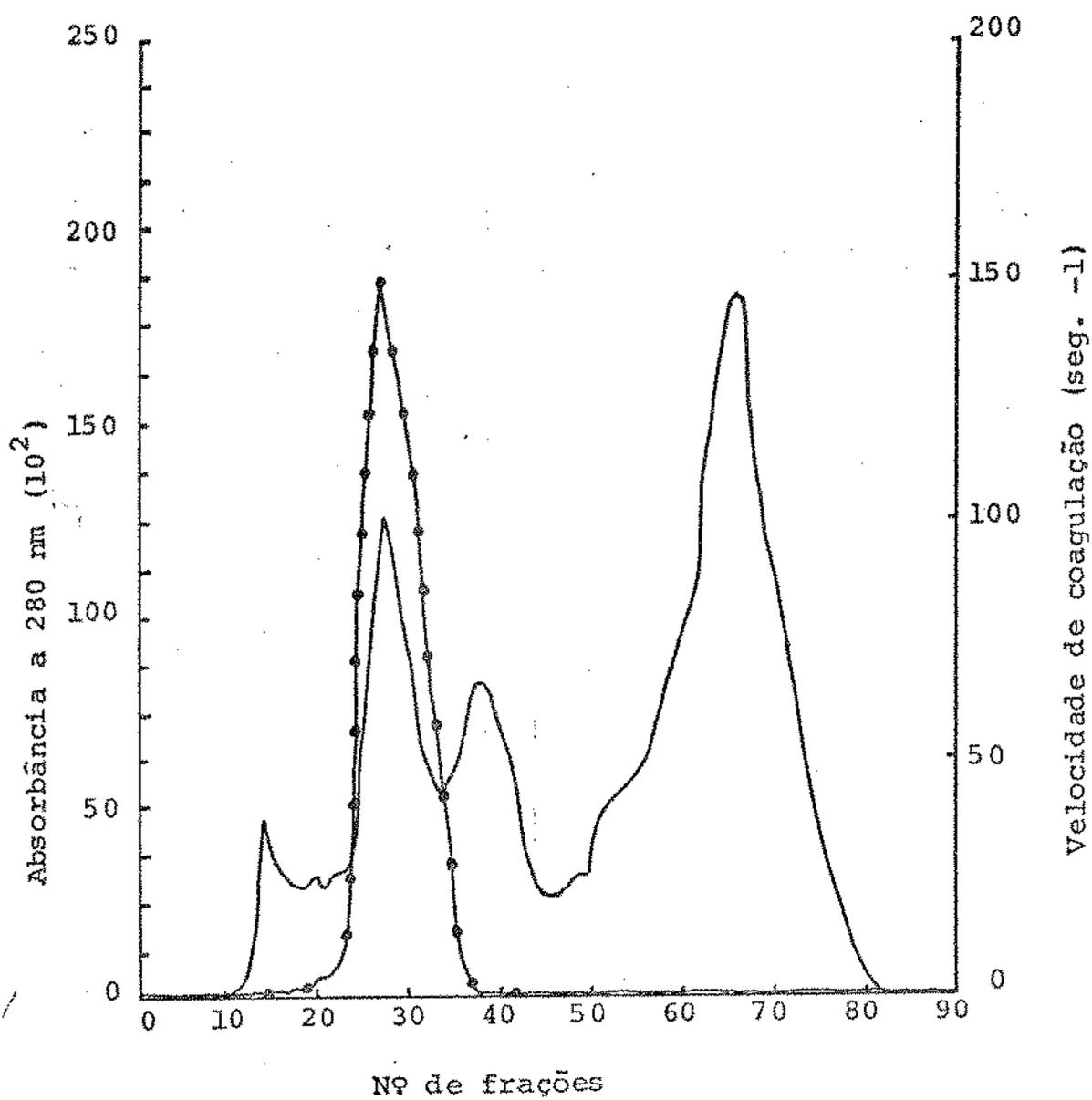


FIGURA 11 - Cromatografia da enzima do *Mucor pusillus* em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante.

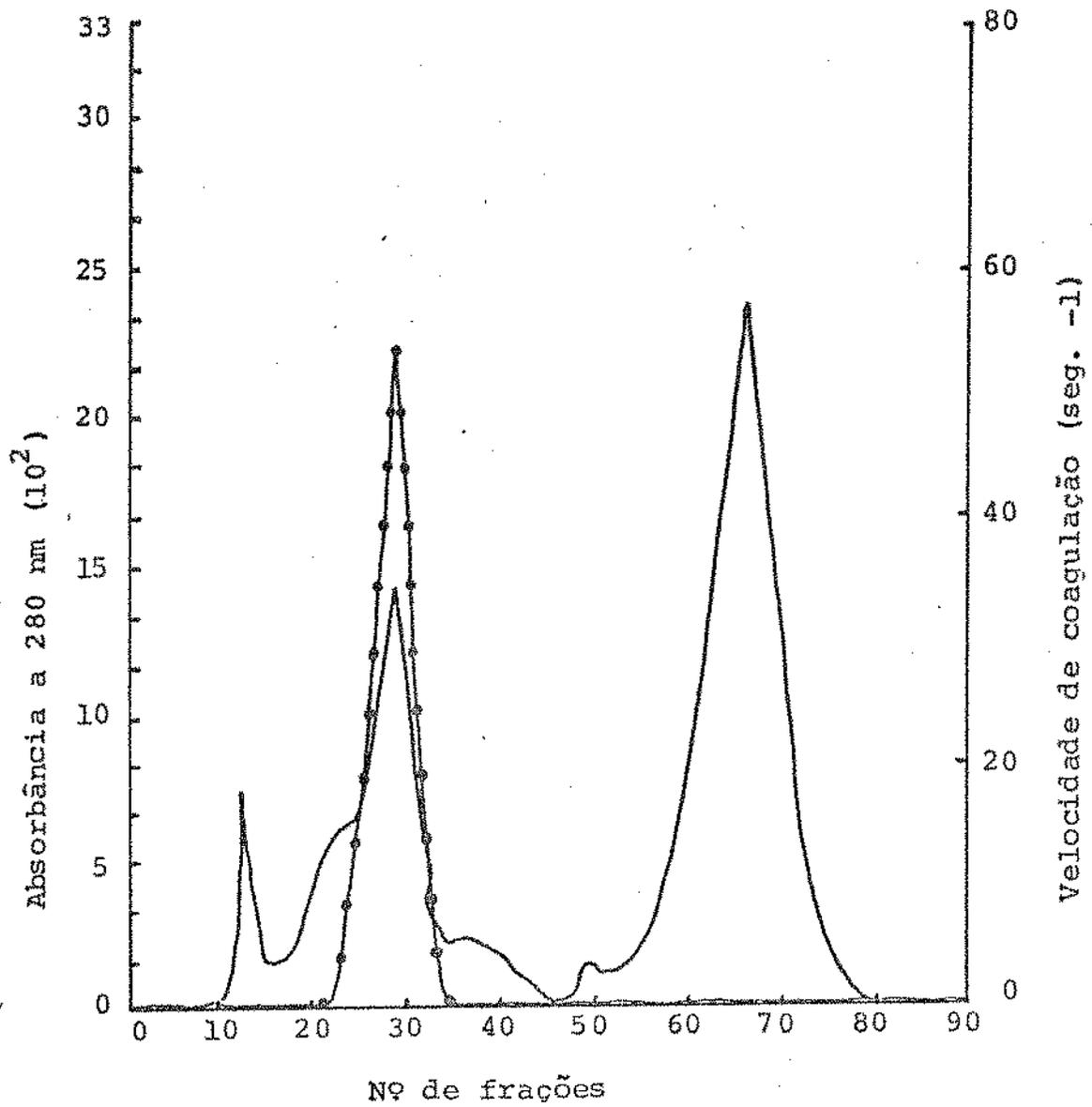


FIGURA 12 - Cromatografia da enzima da *Endothia parasitica* em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante.

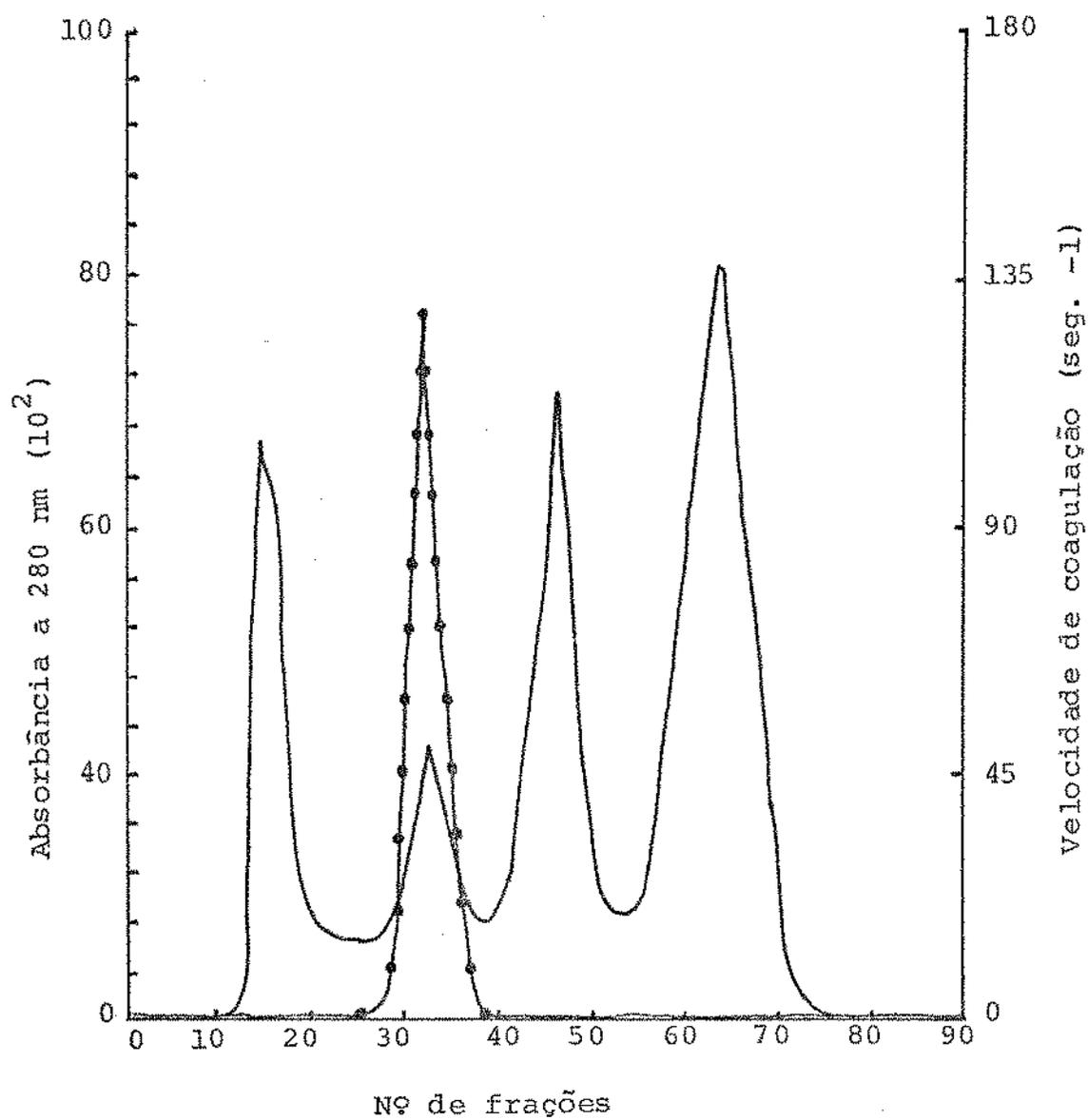


FIGURA 13 - Cromatografia do coalho comercial A em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante.

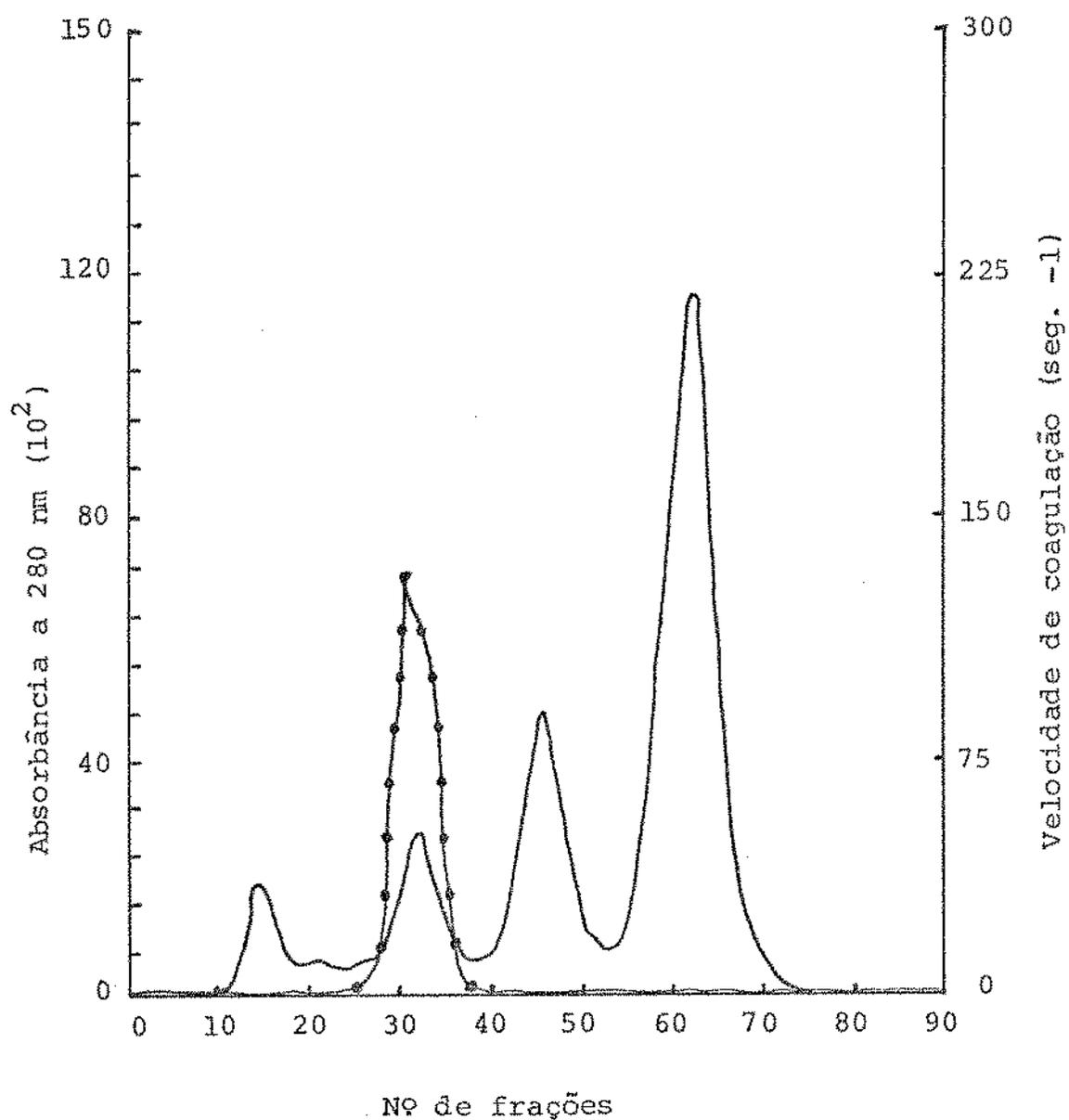


FIGURA 14 - Cromatografia do coalho comercial B em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante.

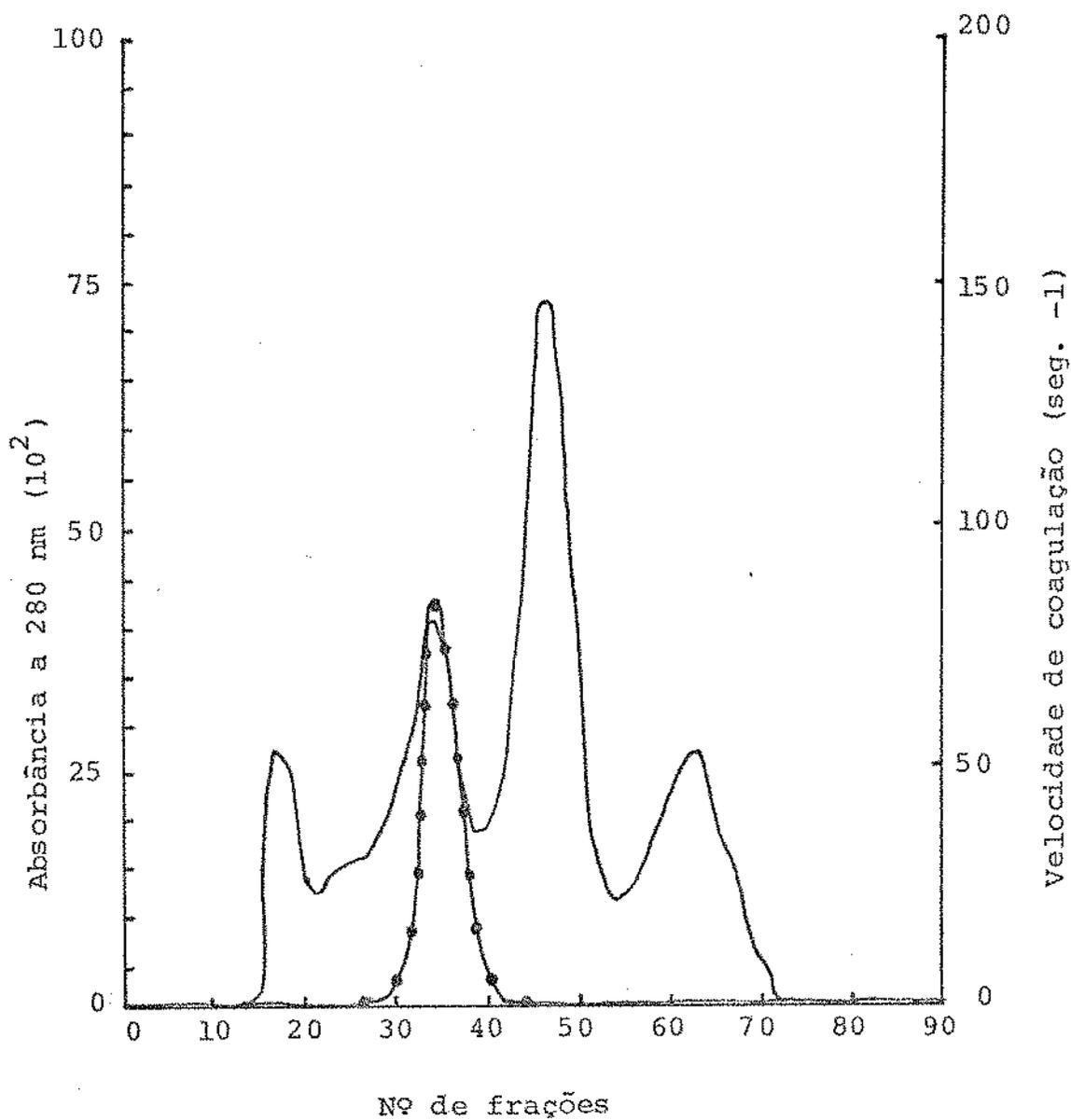


FIGURA 15 - Cromatografia do coelho comercial C em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante.

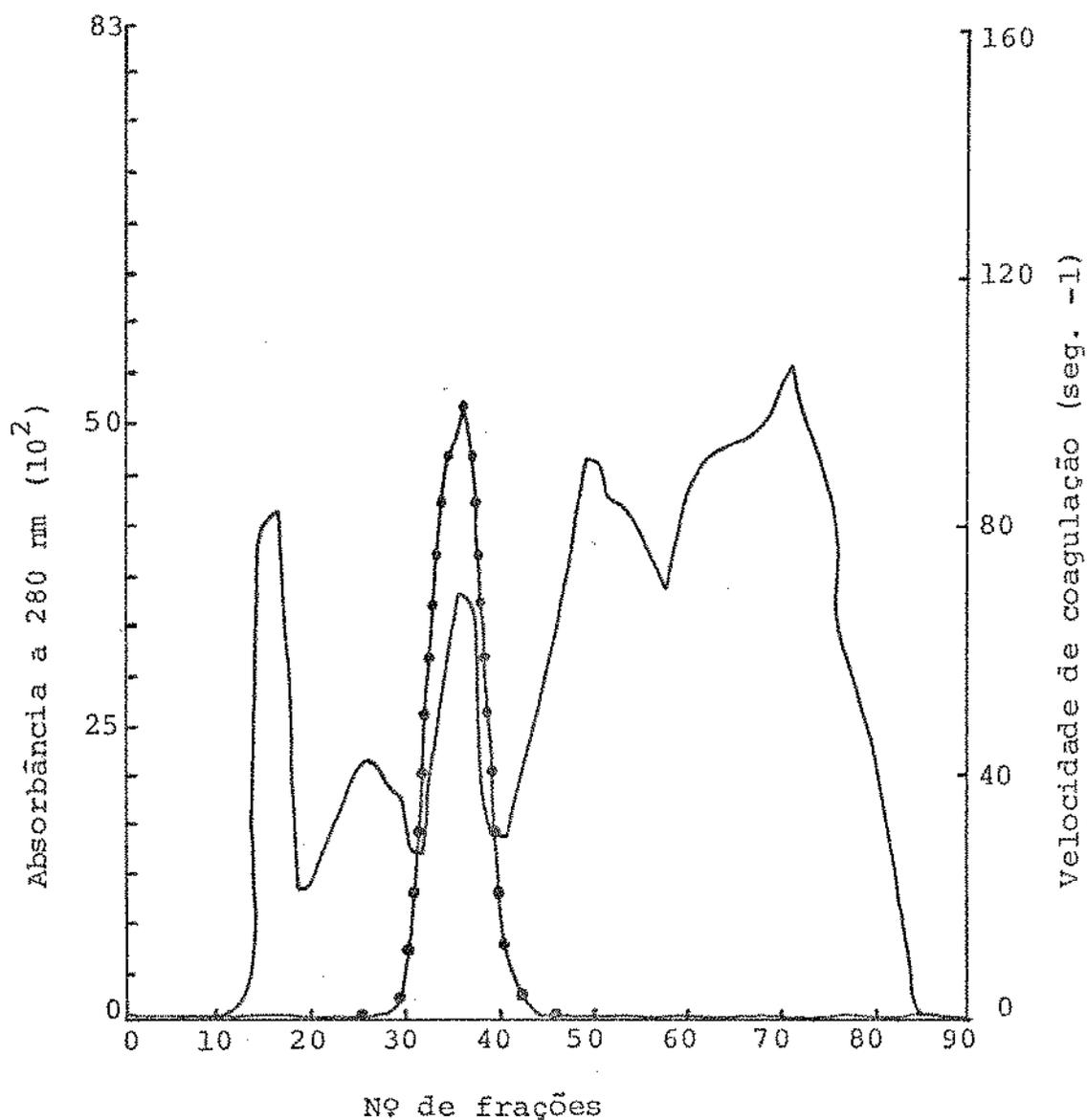


FIGURA 16 - Cromatografia do coalho comercial D em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante.

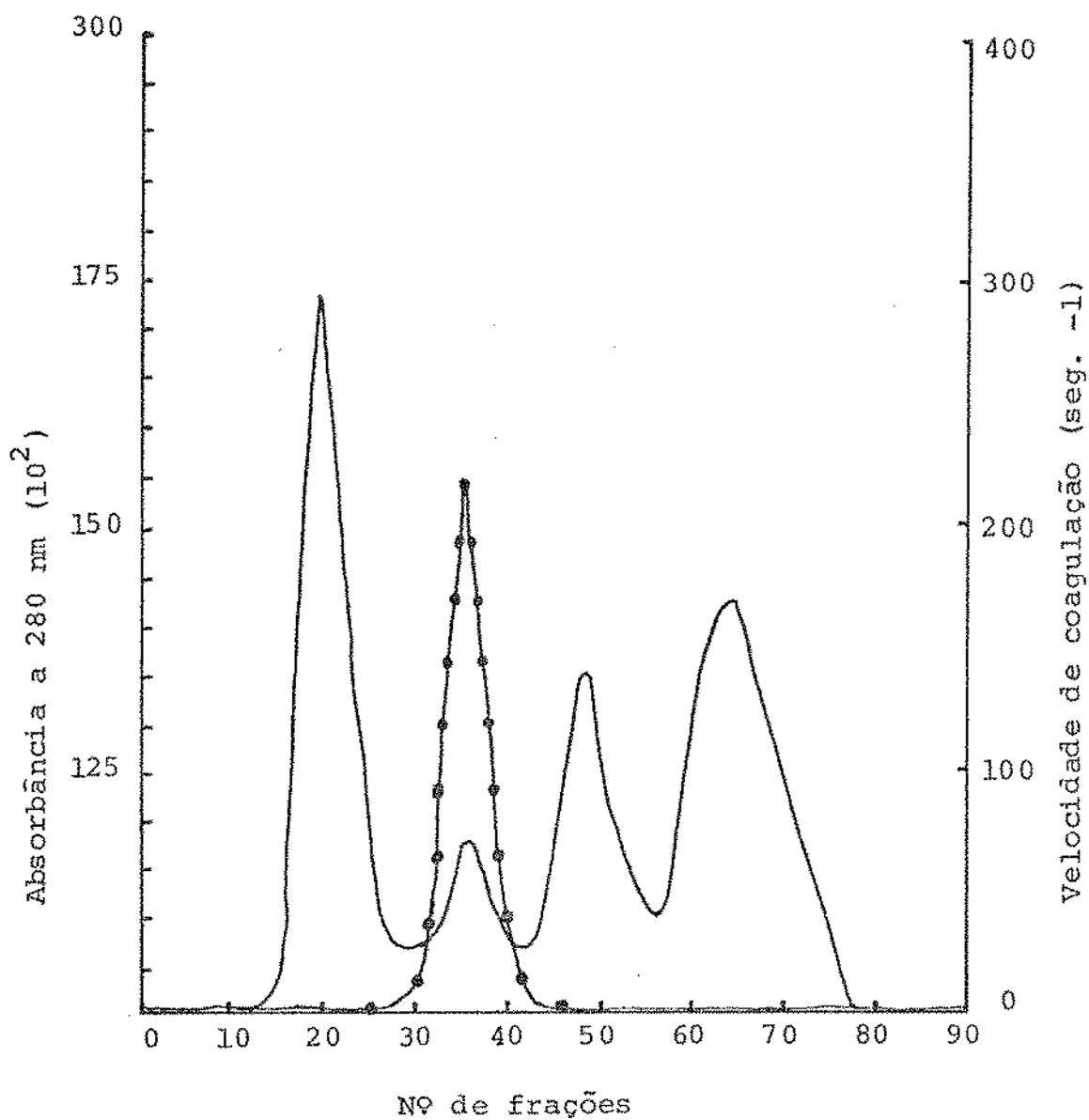


FIGURA 17 - Cromatografia do coelho comercial E em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante.

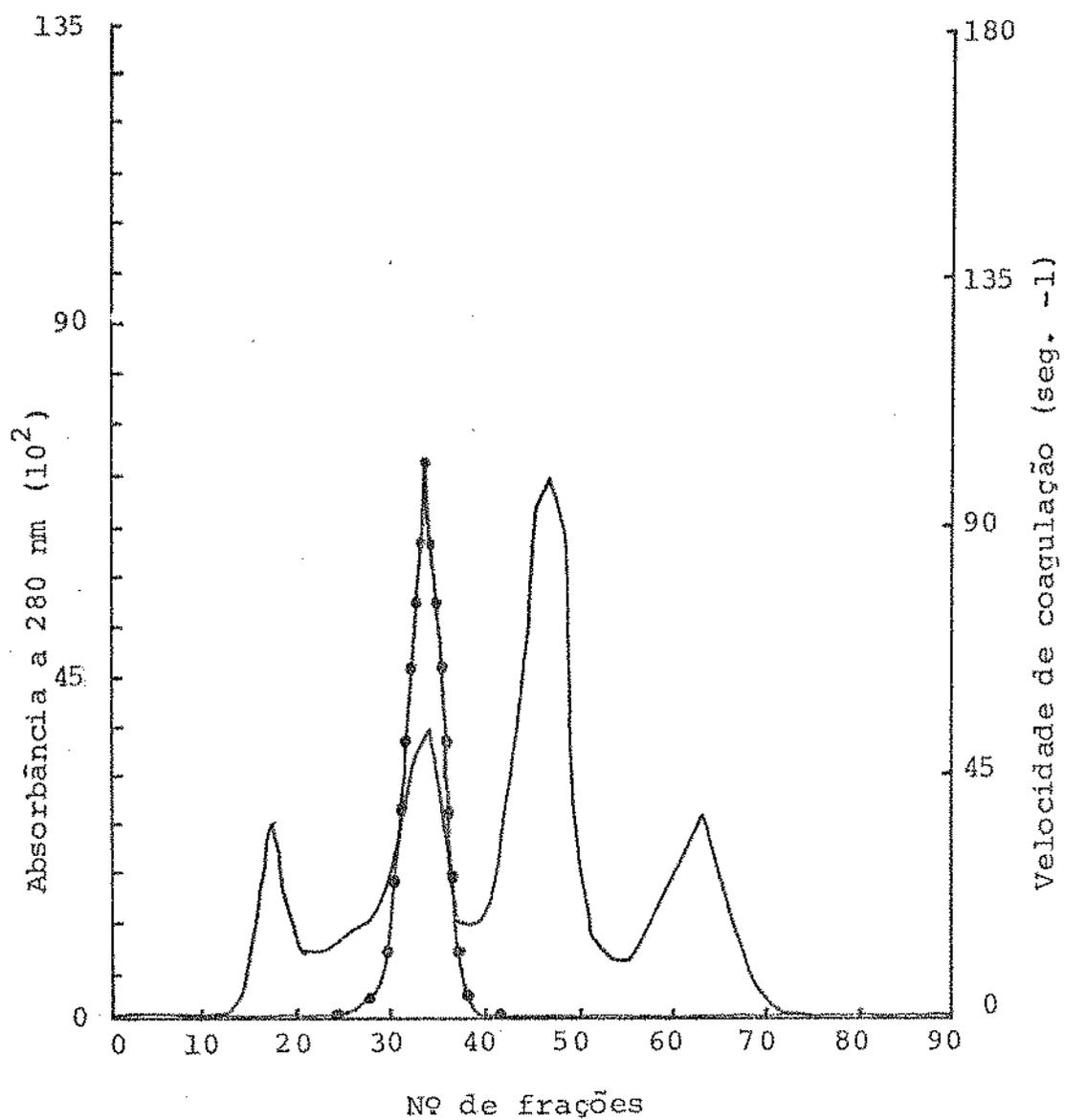


FIGURA 18 - Cromatografia do coelho comercial F em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante.

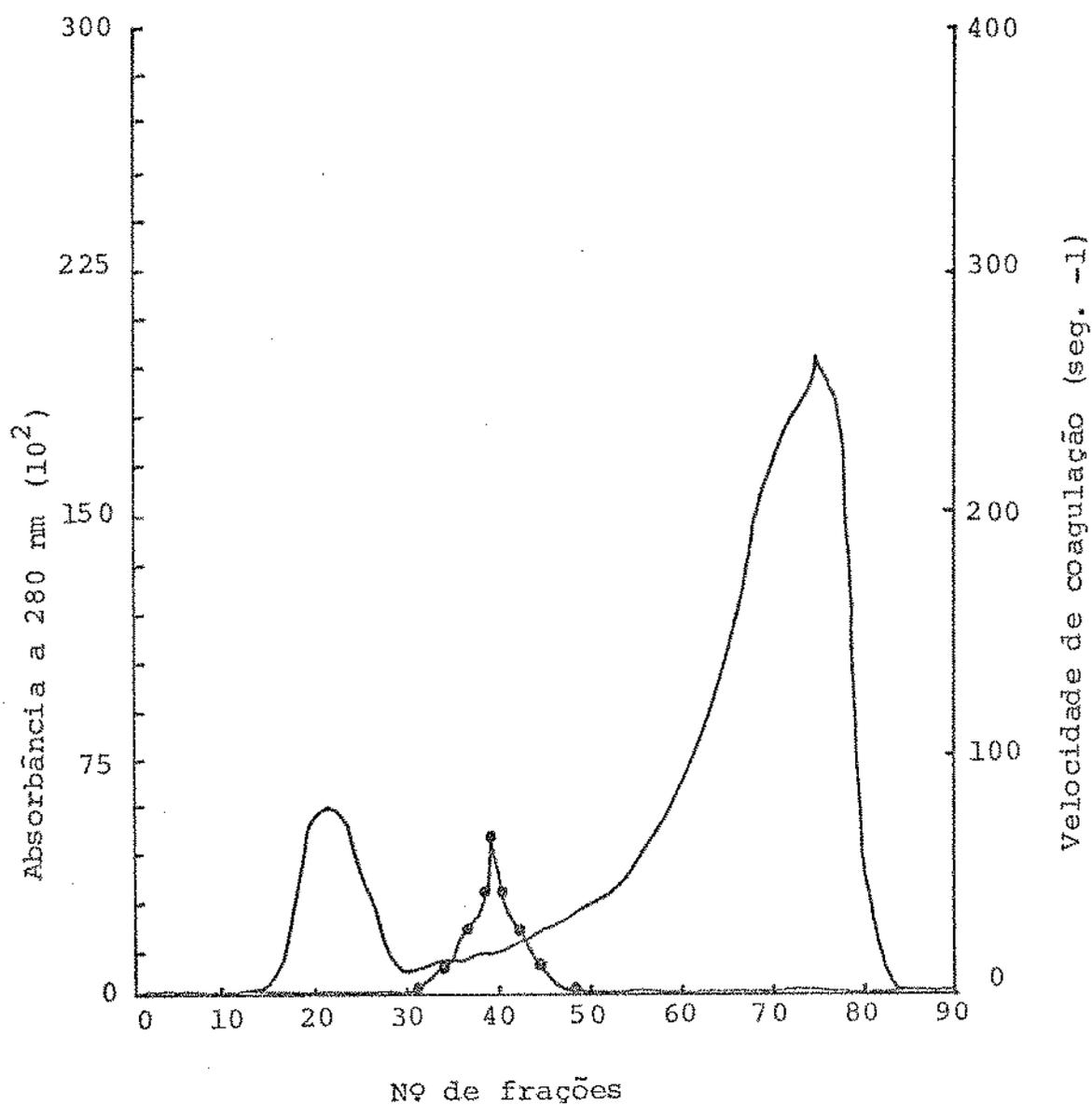


FIGURA 19 - Cromatografia do coelho comercial G em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante.

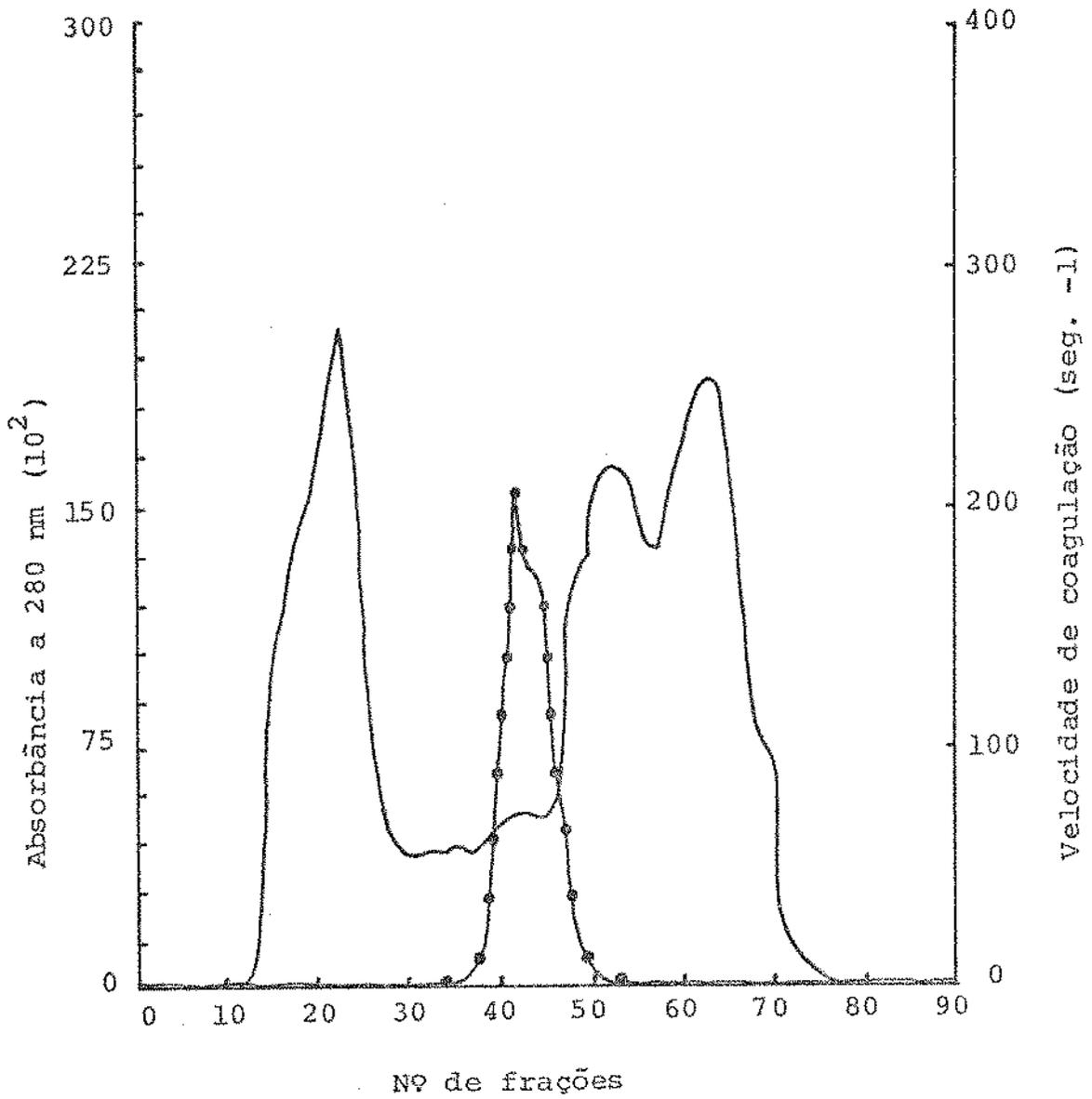


FIGURA 20 - Cromatografia do coalho comercial H em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante.

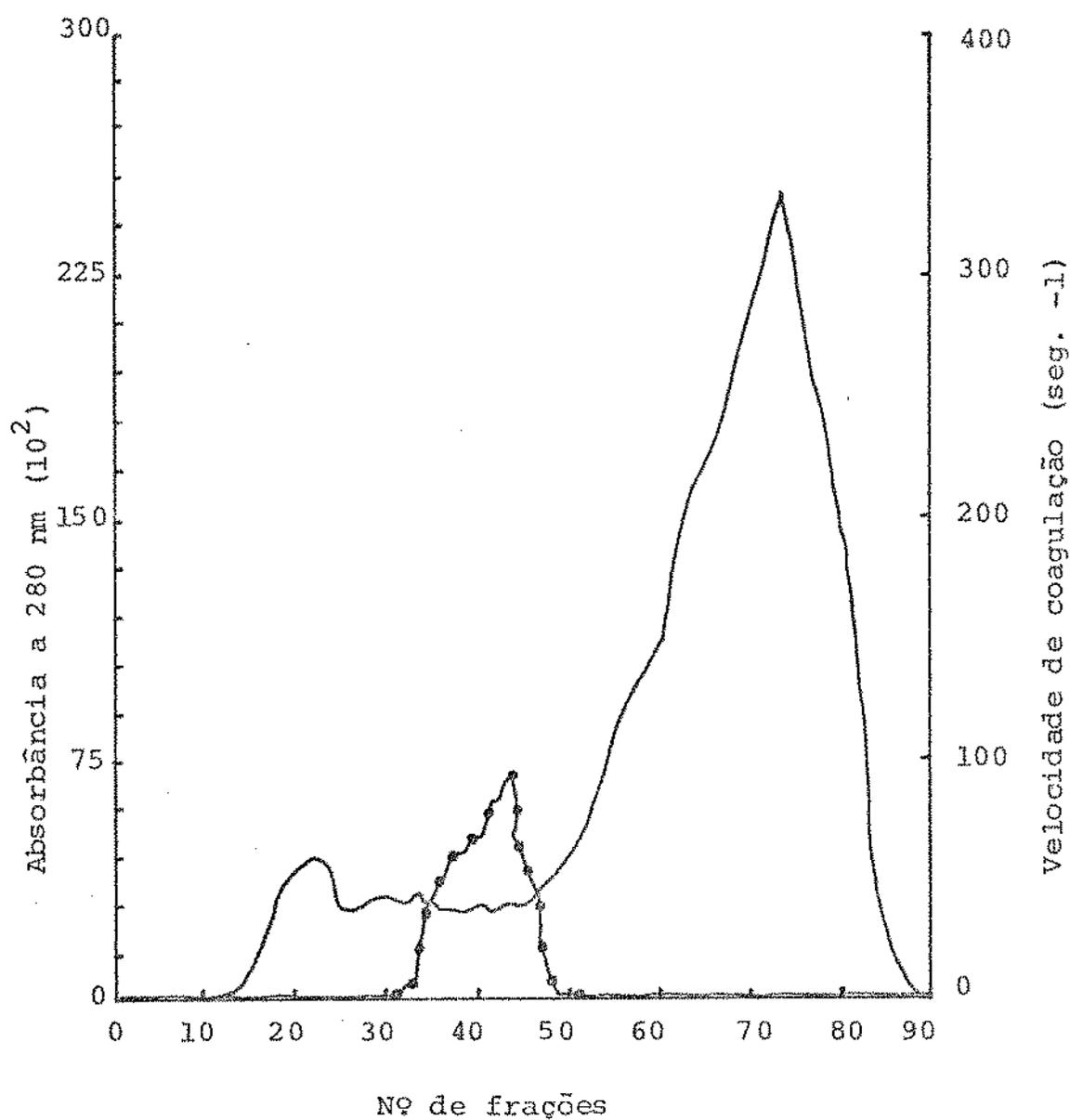


FIGURA 21 - Cromatografia do coalho comercial I em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante.

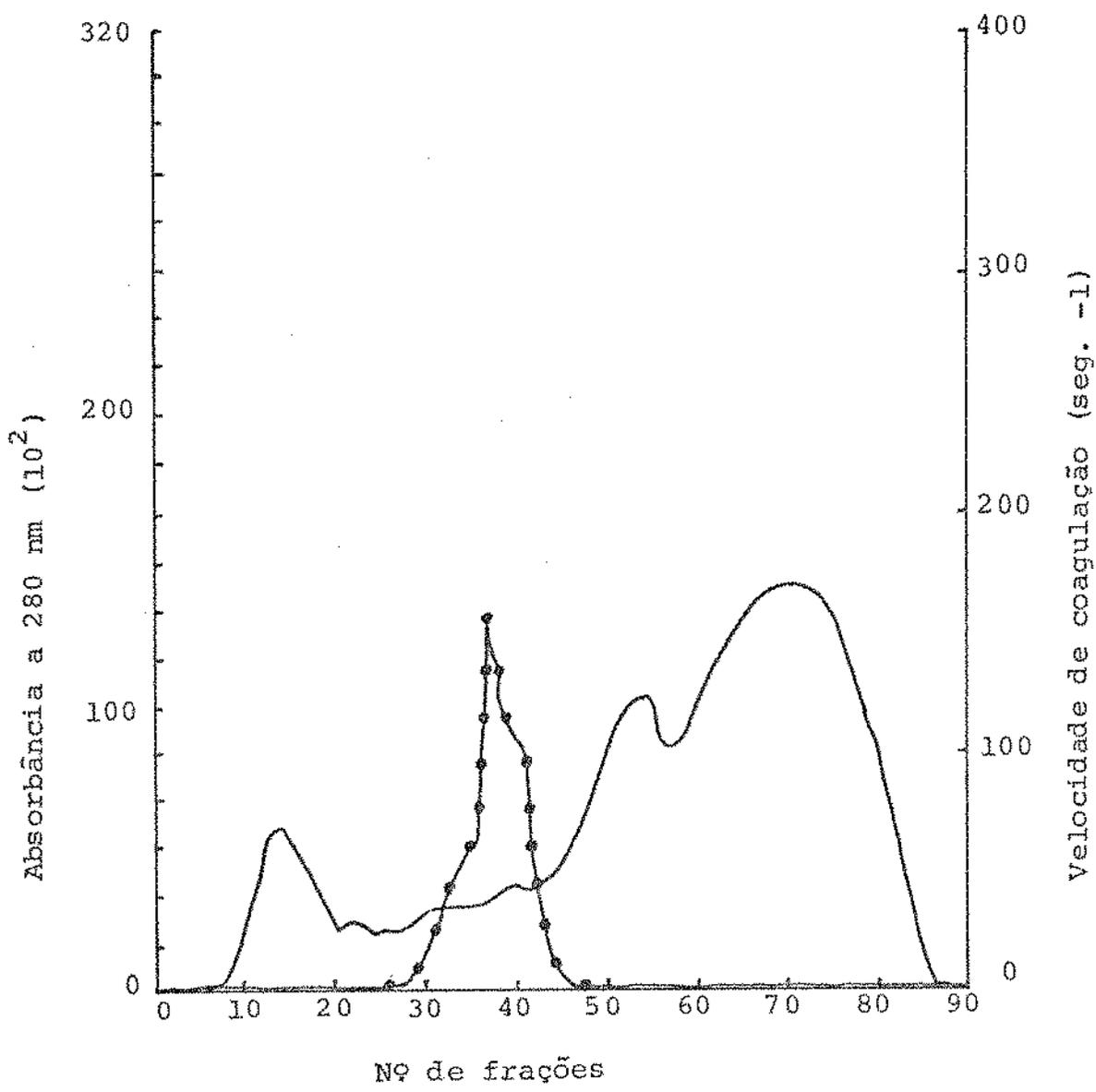


FIGURA 22 - Cromatografia do coelho comercial J em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante.

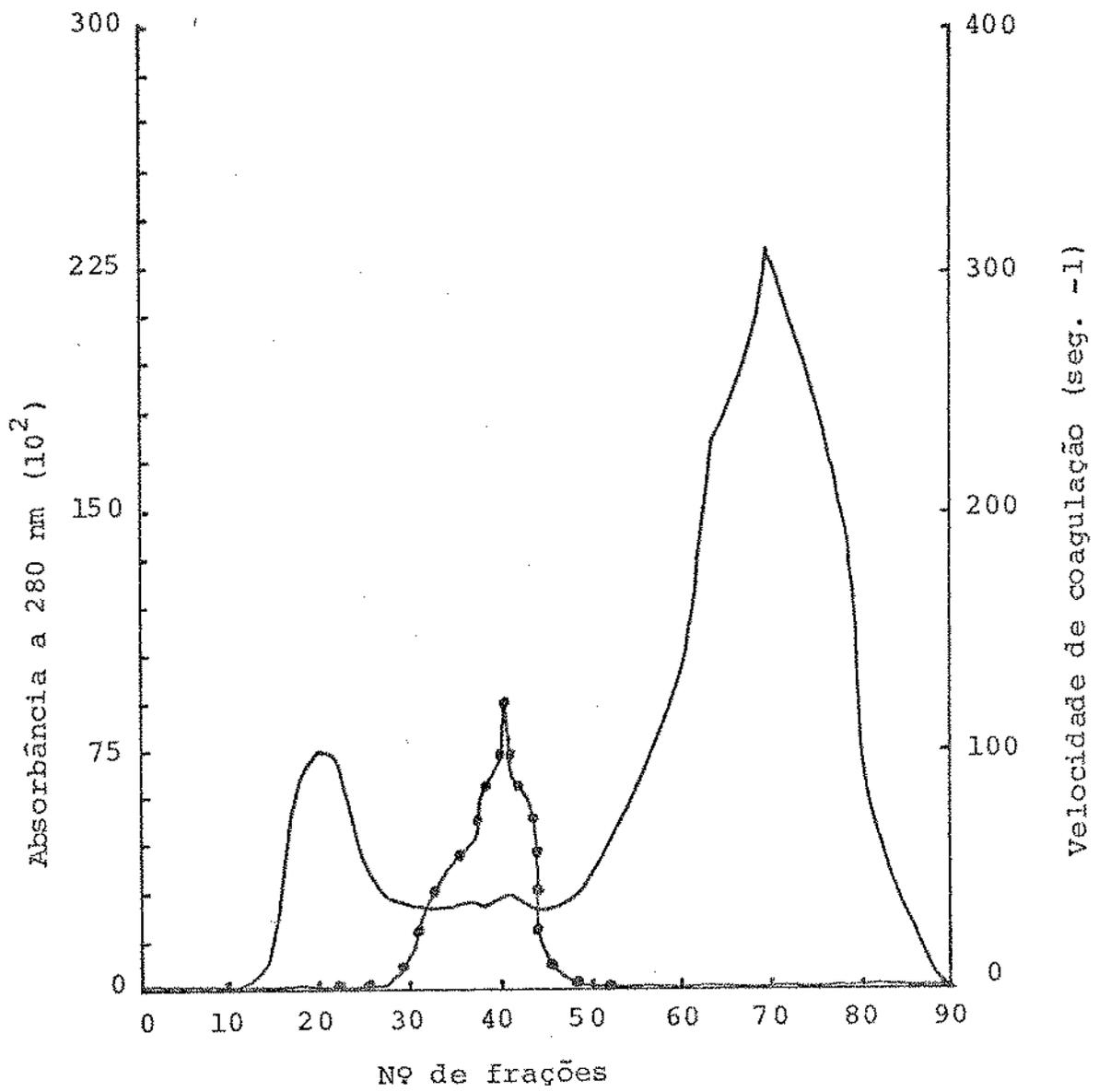


FIGURA 23 - Cromatografia do coelho comercial L em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante.

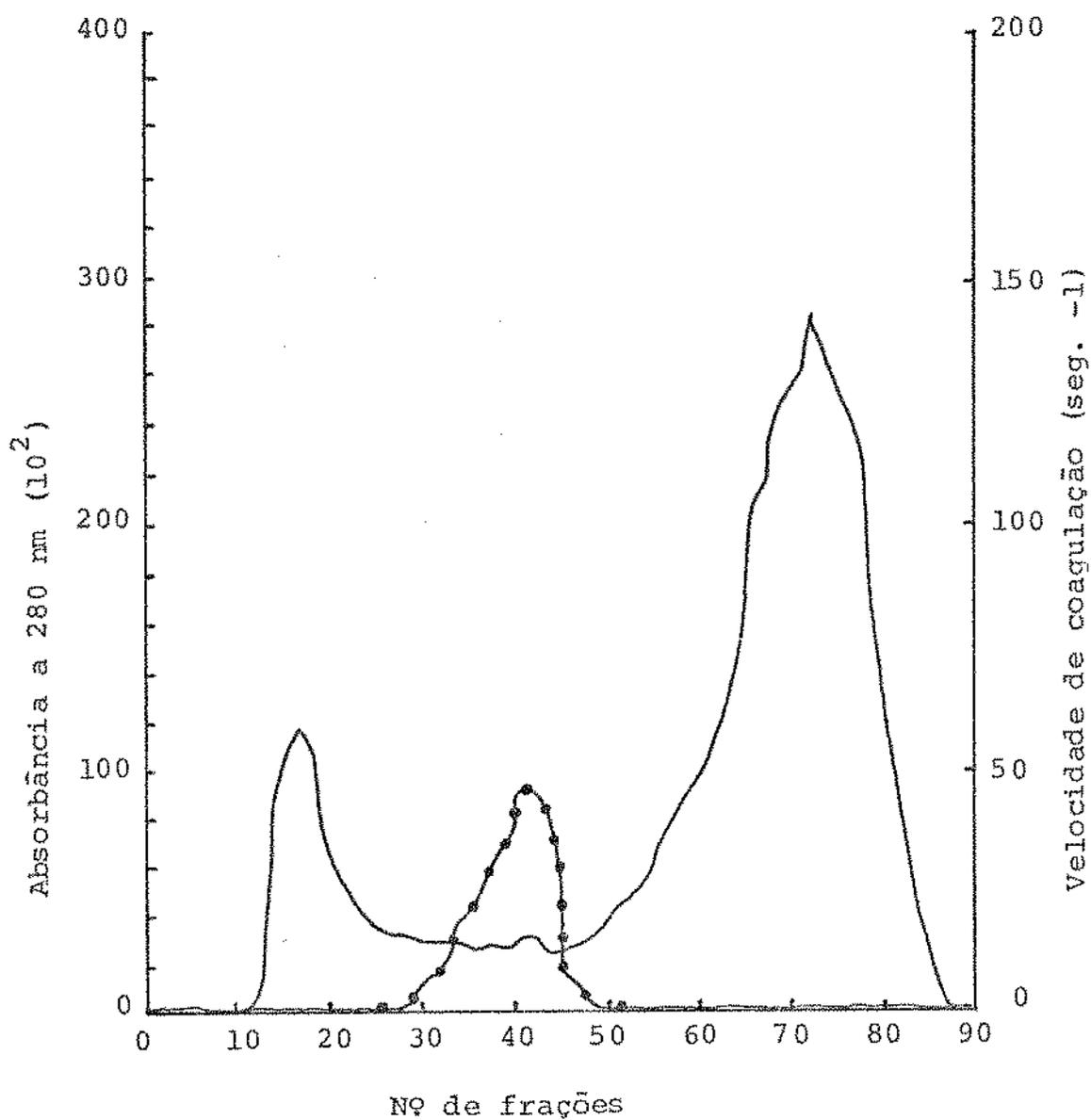


FIGURA 24 - Cromatografia do coalho comercial M em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante.

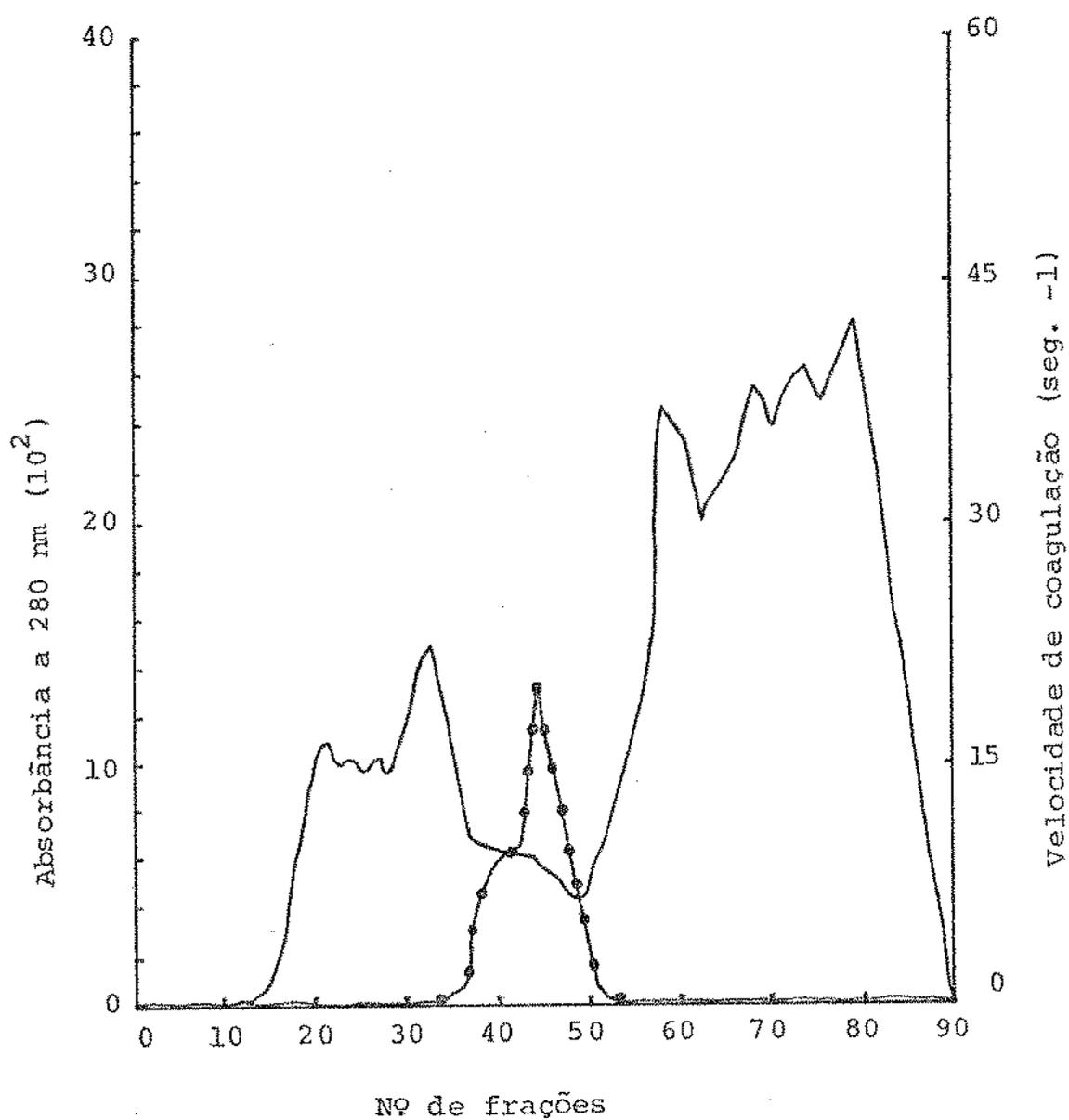


FIGURA 25 - Cromatografia do coelho comercial N em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante.

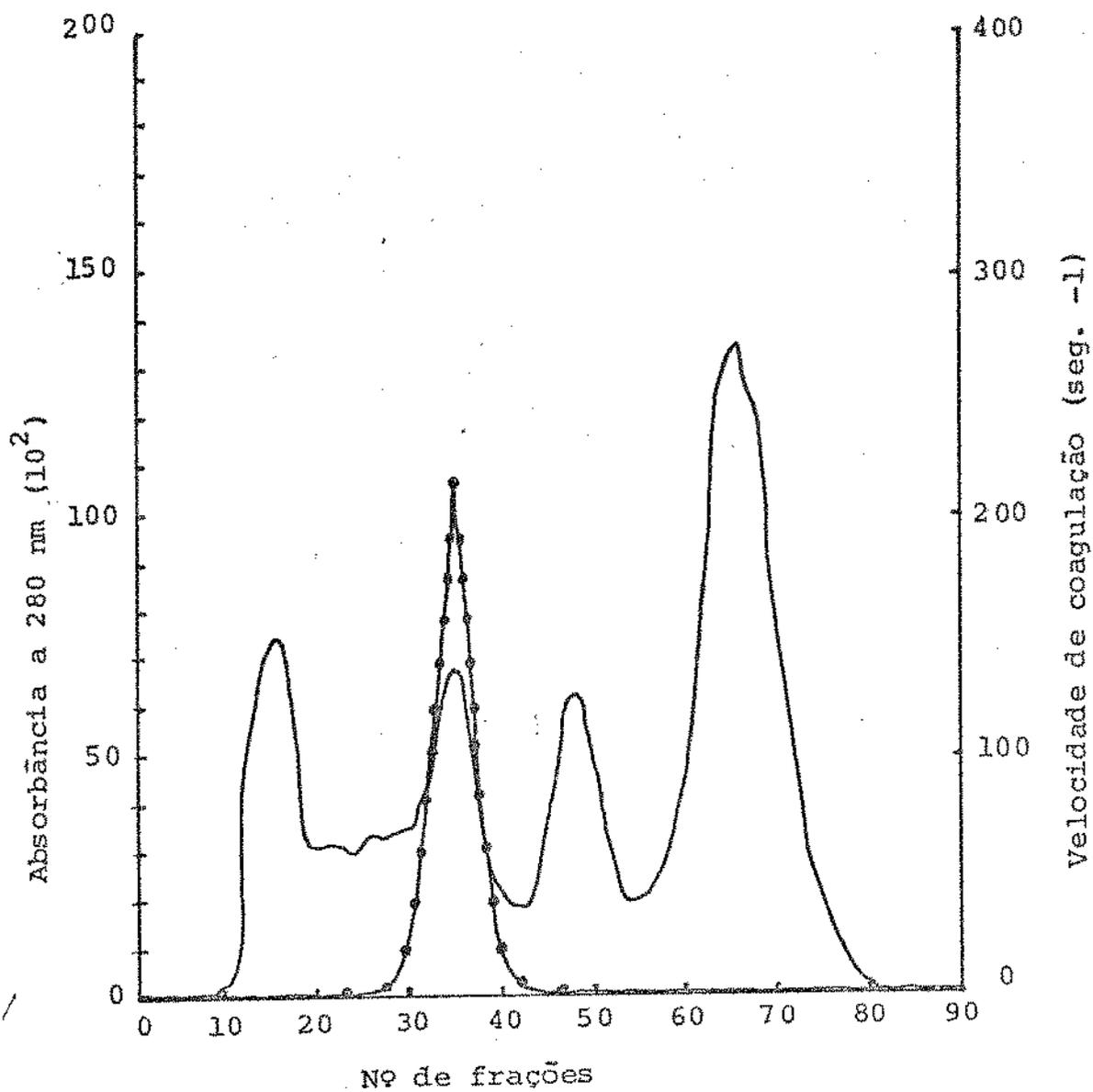


FIGURA 26 - Cromatografia do coelho comercial O em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante.

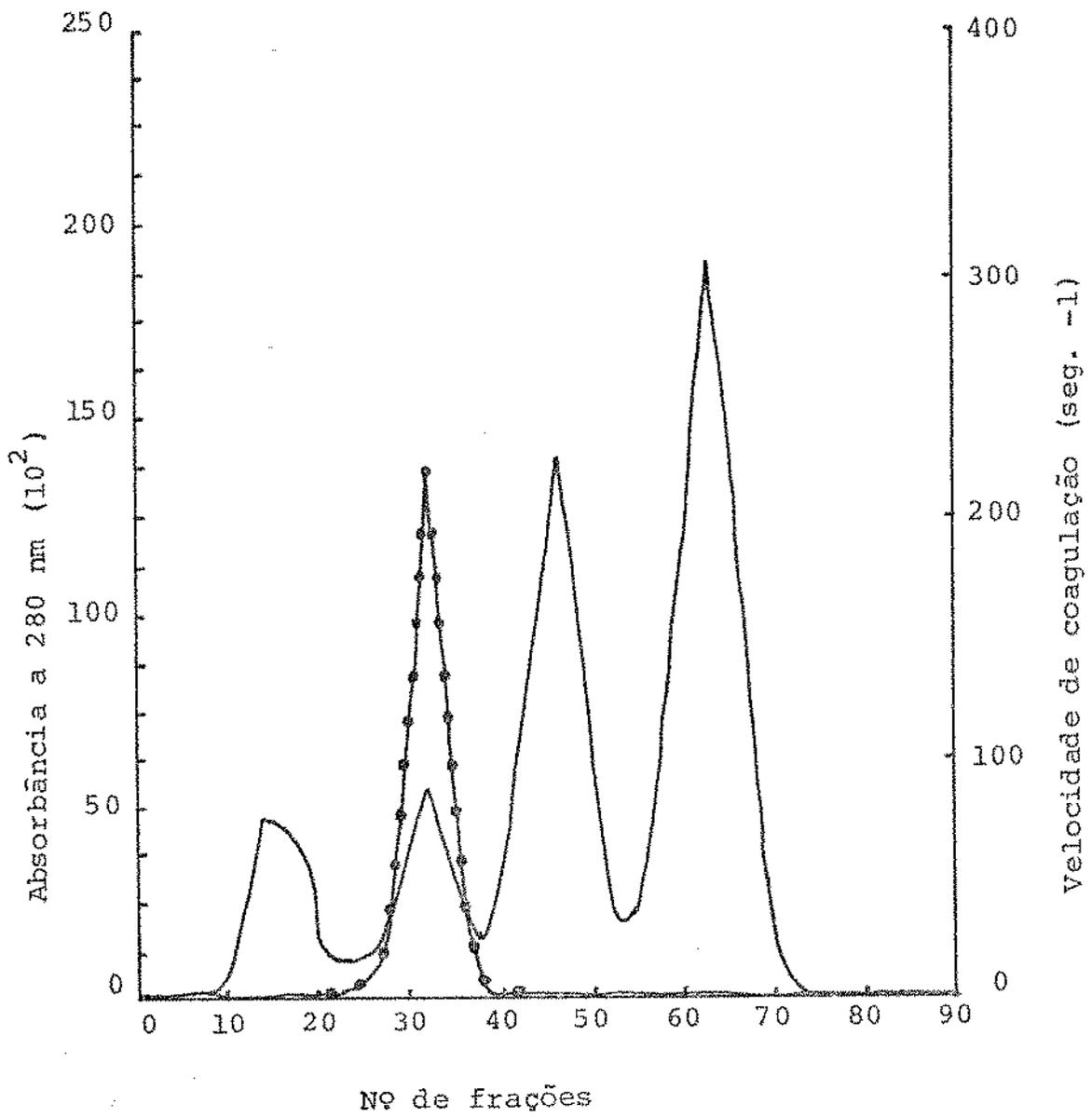


FIGURA 27 - Cromatografia do coalho comercial P em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante.

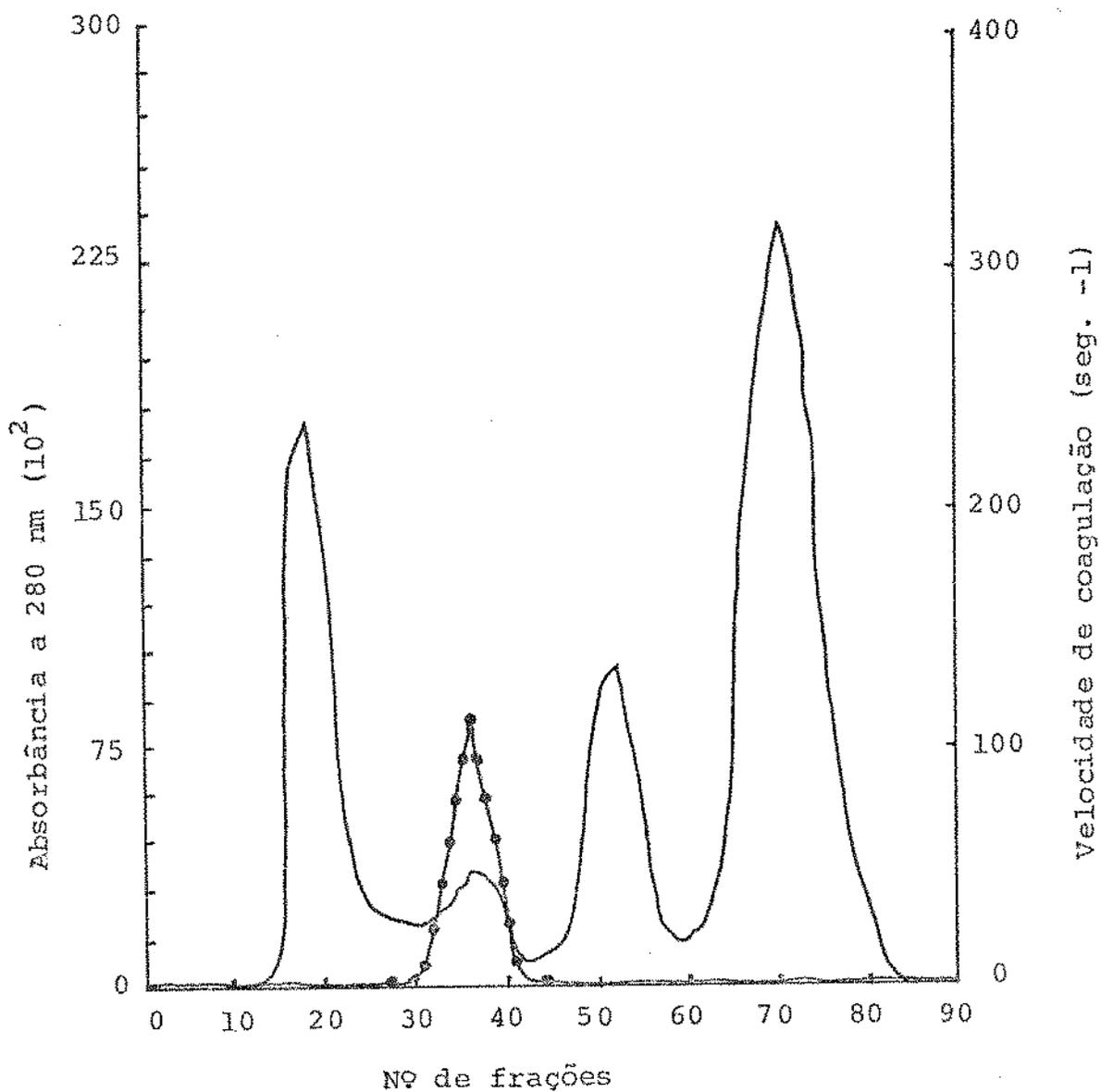


FIGURA 28 - Cromatografia do coalho comercial Q em gel Sephadex G-100 e localização do pico de proteína com atividade coagulante.