

ENZIMAS COAGULANTES OBTIDAS A PARTIR DA Endothia parasitica,  
Mucor miehei E RENINA: DIFERENCIACAO EM GEL DE AGAR-CASEINA

HONÓRIO DOMINGOS BENEDET\*

As enzimas coagulantes de Mucor miehei, Endothia parasitica e renina foram estudadas a fim de determinar se havia ou não diferenças de ação sobre a caseína ácida e suas frações  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $K$ . Através da diferenciação de enzimas coagulantes em meio gel de ágar-caseína, as três apresentaram zonas de difusão bastante diferentes, mostrando, portanto, que suas características físicas são diferentes.

### 1 INTRODUÇÃO

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

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

Este trabalho teve como objetivo estudar a possibilidade de diferenciar as enzimas coagulantes obtidas por fermentação a partir da Endothia parasitica, Mucor miehei e a renina de origem animal, utilizando-se o método do gel de ágar-caseína.

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

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostras utilizadas

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

2.1.2 Enzima da Endothia parasitica, obtida na Indústria Farmacêutica Pfizer em Guarulhos, Estado de São Paulo, já em estado purificado, com o nome de "Sure Curd";

2.1.3 Mucor miehei, que foram obtidos em laboratório;

2.1.4 Leite em pó desnatado, marca Silhoutte, fabricado por Produtos Fleischmann & Royal Ltda.

### 2.2 Reagentes

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

As soluções foram preparadas pelas formas usuais, sendo utilizadas vidrarias normais de laboratório, (tubos de ensaio, provetas, bekers, erlenmeyers, etc).

### 2.3 Equipamentos

2.3.1 Potenciômetro H-5 Horiba.

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

2.3.3 Centrífuga refrigerada Beckman Model J-21 B.

2.3.4 Fotocolorímetro Spectronic 20, Baush & Lomb.

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

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

2.3.7 Agitador, Rotary Shaker.

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

### 2.4 Obtenção de enzimas

#### 2.4.1 Renina

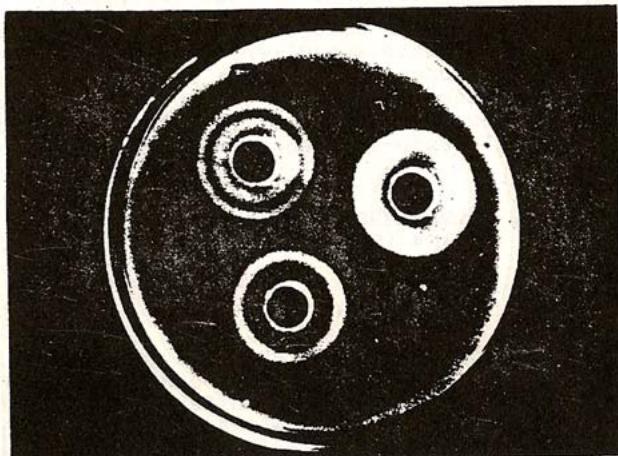
Obtida segundo método descrito por BERRIDGE (1), ou seja, a partir do quarto estômago de bezerros lactentes, lavado em água fria, cortado em pequenos pedaços, colocado num erlenmeyer e pH acertado para 2,0 com HCl. Em seguida, os pedaços foram triturados em liquidificador e a massa resultante deixada em banho-maria a 35°C por 20 minutos. Decorrido este tempo, centrifugou-se a 846 x g por 10 minutos e separou-se o sobrenadante, ao qual foi adicionado 70% do volume em álcool etílico, havendo a precipitação da enzima renina. Essa solução foi deixada em repouso por 24 horas a 4°C para completa sedimentação. A maior parte do sobrenadante foi separada por decantação e a enzima por centrifugação a 11.140 x g por 10 minutos, e seca a temperatura ambiente.

durante 15 minutos, para dissolver cerca de 50%, acertando-se novamente o pH para 6,8 com NaOH 0,2 N. Colocou-se 50 ml de água destilada num erlenmeyer de 250 ml, juntou-se 1 g de ágar submetido à ebulição até dissolução total. Esfriou-se (cerca de 40°C) e adicionou-se o sobrenadante da solução de caseína ácida anteriormente preparada, vagarosamente sob agitação lenta para evitar a formação de espuma. Imediatamente verteu-se cerca de 25 ml desse meio em 4 placas de petri que foram deixadas para solidificar. Após a solidificação, foram feitos três furos em cada placa de cerca de 1 cm de diâmetro, colocando-se duas gotas de enzima do Mucor miehei, Endothia parasitica e renina, contendo 109 US de atividade por ml no primeiro, segundo e terceiro furo de cada placa, respectivamente. A seguir foi adicionada uma gota de toluol em todos os furos das quatro placas sendo as mesmas incubadas a 30°C por 24 horas.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um grama de caseína, após ser tratado, resultou no aparecimento de halos ao redor dos furos onde haviam sido depositadas as enzimas, como se pode observar na Figura 1.

FIGURA 1 - AÇÃO DAS ENZIMAS COAGULANTES EM MEIO GEL DE ÁGAR CASEÍNA



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

O método gel de ágar-caseína, de CHEESEMAN (2) para o ensaio de reninas, tem sido o melhor caminho para revelar a maioria dessas reações fundamentais. A formação do para-caseinato de cálcio pela ação da renina sobre a caseína do meio, resulta na formação de zonas de precipitação devido à difusão das moléculas de enzima no gel. Segundo GANGULI e BHALLERAO (3), parece 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 enzima vegetal e enzima microbiana, revela a diferença básica nos seus modos de ação quando comparadas com renina animal.

#### 4 CONCLUSÃO

No presente experimento, a renina, a enzima de Mucor miehei e a Endothia parasitica, apresentaram zonas de difusão bastante diferentes, mostrando que suas características físicas são distintas.

Através da diferenciação das enzimas coagulantes do Mucor miehei, Endothia parasitica e renina no meio gel de ágar-caseína, concluiu-se que a difusão das moléculas das enzimas é diferente.

#### Abstract

Calf rennin and coagulation enzymes from Mucor miehei and Endothia parasitica were used in tests to compare their actions upon acid casein and its fractions  $\alpha$ ,  $\beta$  and K. The three coagulating enzymes showed distinct diffusion bands in casein-agar gel which indicated that they have different physical properties.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 BERRIDGE, N.J. Purification and assay of rennin. In: COLOWICK, S.P., KAPLAN, N.O. Methods in enzymology. New York : Academic Press, 1975. v. 2.
- 02 CHEESEMAN, G.C. Action of rennet and other proteolytic enzymes on casein in casein-agar gels. J. Dairy Res., v. 30, n. 1, p. 17-22, 1963.
- 03 GANGULI, N.C., BHALLERAO, V.R. Differential of animal, vegetable and microbial rennets on caseins as revealed by casein-agar plate assay method. J. Dairy Sci., v. 48, n. 4, p. 439-443, 1965.
- 04 HIPP, N.J., GROVE, M.L., CUSTER, J.H., MC KEEKIN, T.L. Separation of Y-casein. J. Am. Chem. Soc., v. 72, p. 4928-4931, 1950.
- 05 RICHARDSON, G.H. Differentiation of enzyme coagulants on casein-agar gels. J. Dairy Sci., v. 51, n. 6, p. 940, 1968.

06 STERNBERG, M.Z. Crystalline milk-clotting protease from  
Mucor miehei and some of its properties. J. Dairy Sci.,  
v. 54, n. 3, p. 159-167, 1971.