

## ESTUDO DA AÇÃO DA ENZIMA COAGULANTE DO MUCOR MIEHEI SOBRE A K-CASEÍNA TRATADA A DIVERSAS TEMPERATURAS.

Honório Domingos Benedet \*

A k-caseína, após tratamento a diversas temperaturas e incubada com a enzima coagulante do Mucor Miehei, foi submetida a eletroforese em Gel de SDS - poliacrilamida, apresentando diferenças em relação à k-caseína não aquecida, ou seja, observou-se que a não aquecida foi hidrolisada, enquanto a aquecida praticamente nada sofreu, sugerindo que a desnaturação ocorrida inibiu a ação da enzima.

### 1 INTRODUÇÃO

A caseína foi por muito tempo considerada uma proteína pura, porém, a partir dos estudos de Linderström-Lang (2) em 1925 esse conceito teve de ser modificado. As investigações de Mellander (4) em 1939, também demonstraram que a caseína era composta de no mínimo três componentes que designou como  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -caseína, de acordo com a ordem decrescente de suas mobilidades. Waugh e Von Hippel (6) em 1956, descobriram que a micela de caseína era composta de caseinato de cálcio,  $\beta$ -caseína e um complexo de  $\alpha$  e k-caseína, sendo que a k-caseína era o fator mais importante, responsável pela estabilização da micela e da proteína sobre a qual a enzima coagulante atuava imediatamente. 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 coagulos dependem de maneira diferente do pH, temperatura e concentração de cálcio iônico (3). O objetivo deste trabalho foi estudar o comportamento da enzima coagulante de leite do Mucor miehei sobre a k-caseína tratada a diversas temperaturas.

### 2 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 2.1 Materiais

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

2.1.2 Enzima coagulante de leite do Mucor miehei obtida em laboratório.

\* Departamento de ciência e Tecnologia de Alimentos  
Universidade Federal de Santa Catarina.

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Obtenção da enzima do *Mucor miehei*.

Foi obtida por fermentação em meio semi-sólido de farelo de trigo durante 72 horas. Depois da fermentação, a enzima foi extraída em água destilada e posteriormente filtrada. Ao filtrado foi adicionado 0,5 g de cloreto de sódio, mais 70% do volume em álcool etílico sempre com agitação, havendo precipitação da enzima, a qual permaneceu em repouso por 24 horas para completa sedimentação. A maior parte do sobrenadante foi retirada por decantação e o restante, contendo a enzima precipitada, foi centrifugado a 11.140 g durante 10 minutos. Ao sobrenadante recuperado foi adicionado vagarosamente, e com agitação constante, sulfato de amônio até obter-se uma solução a 80% de saturação. Esta solução foi deixada em repouso por 24 horas a temperatura de 4°C e, em seguida, centrifugado a 11.140 g. O precipitado foi dissolvido em 20 ml de água destilada e dialisado contra água destilada durante 72 horas, sendo a água trocada quatro vezes e o dialisado guardado a temperatura de 4°C.

### 2.2.2 Determinação da atividade da enzima.

Foi determinada de acordo com o método de Soxhlet (5), utilizando-se como substrato leite em pó desnatado, em 100 ml de água destilada contendo 0,01M de cloreto de cálcio.

### 2.2.3 Obtenção das caseínas.

2.2.3.1 A caseína ácida foi obtida segundo o método de Hipp et al (1), a partir de um litro de leite fresco, não pasteurizado, desnatado, ao qual foi adicionado HCl 0,1 N até o pH atingir 4,6, havendo a precipitação da caseína. O precipitado obtido após separação do sobrenadante, foi congelado a - 18°C, liofilizado e guardado em geladeira a 4°C.

2.2.3.2 A k-caseína foi obtida de acordo com o método de Yaguchi (8), utilizando-se uma coluna de gel Sephadex G-150 de 2,5 cm x 95 cm de altura e a amostra de caseína ácida eluída com tampão TCU (Tris-citrato 0,005 M, pH 8,5, contendo 6 M de uréia). Foram coletadas 120 frações cuja absorbância foi medida a 280 nm, e o volume contendo a k-caseína foi congelado a - 18°C, liofilizado e guardado em geladeira a 4°C.

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

Utilizou-se o método descrito por Weber e Osborn (7) para a determinação do peso molecular por eletroforese. O aparelho utilizado foi uma fonte estabilizadora da FANEM, modelo 1050, tubos de vidro de 0,5 cm x 8,0 cm e duas cubas de acrílico de 14 x 14 cm de base por 7,0 cm de altura.

### 2.2.5 Preparação das frações de k-caseína e incubação com a enzima coagulante.

Pesou-se 130 mg de k-caseína num Becker de 50 ml, adicionou-se 12 ml de água destilada e agitou-se durante aproximadamente 10 minutos. Em seguida, elevou-se o pH para 11,0, com a adição de NaOH 0,2 N, seguida da adição de HCl 0,2 N para baixar o pH até 6,8 (essa adição foi feita vagarosamente sob agitação constante, mantendo-se, assim, a k-caseína em suspensão aquosa). Obteve-se um volume final de 20 ml, que foram distribuídos em 4 tubos de ensaio. Um dos tubos permaneceu em temperatura ambiente e os outros foram submetidos a temperaturas de 40, 50 e 60°C, respectivamente.

mente, durante 1 hora. Decorrido esse tempo, os quatro tubos foram colocados - em banho-maria a 35°C por 20 minutos para estabilizar a temperatura, quando foi juntado 1,0 ml de solução de enzima do *Mucor miehei* contendo 109 US/ml de atividade em cada tubo, permanecendo em banho-maria por mais 30 minutos. Em seguida, mediu-se as absorbâncias a um comprimento de onda de 660 nm num espectrofotômetro ultra-violeta Perkin-Elmer, Coleman 124 D. Posteriormente, o conteúdo dos tubos foi congelado a -18°C, líquidizado e submetido a eletroforese em dodecyl sulfato de sódio (SDS)/poliacrilamida.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 mostra as bandas eletroforéticas obtidas da k-caseína submetida a temperatura ambiente; 40, 50 e 60°C e posteriormente tratadas com enzima coagulante do *Mucor miehei*.



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

FIGURA 1 - Eletroforese em gel de SDS/poliacrilamida da k-caseína tratada a diversas temperaturas e incubada com enzima do *Mucor miehei*.

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

#### 4 CONCLUSÃO

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

#### Abstract

In the experiment to check the effect of heating upon the k-casein before being treated by the coagulating enzyme from *Mucor miehei*, it was found that, after heating, the hydrolysis did not occur, suggesting that denaturation of k-casein inhibited the enzyme action.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 HIPP, N.J.; GROVES, M.L.; CUSTER, J.H.; McMEEKIN, T.L. Separation of  $\gamma$ -casein. *J.Am.Chem.Soc.*, 72:4928-31, 1950.
- 2 LINDERSTRONG-LANG, K. Studies on casein. II Is the casein a homogeneous substance? *Com rend trav lab Carlsberg Ser. Chem.*, 16(1):48-63, 1925.
- 3 MARTENS, R & NAUDTS, M. Rennet and substitutes. *IDF-Annuel Bulletin*, Bruxelles, (108):51-63, 1978.
- 4 MELLANDER, O. Elektrophoretische untersuchung von casein. *Biochem.Z.*, 300:240-245, 1939.
- 5 STERNBERG, M.Z. Crystalline milk-clotting protease from *Mucor miehei* and some of its properties. *J.Dairy Sci.*, 54(3):159-167, 1971.
- 6 WAUGH, D.F. & VON HIPPEL, H.P. k-casein and the stabilization of micelles. *J.Am.Chem.Soc.*, 78:4576-4582, 1956.
- 7 WEBER, K. & OSBORN, M. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J.Biol.Chem.*, 244(16):4406-4412, 1969.
- 8 YAGUCHI, M.; DAVIES, T.D.; KIM, Y.K. Preparation of k-casein by gel filtration. *J.Dairy Sci.*, 51(4):473-7, 1958.