

## INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO NA COAGULAÇÃO ENZIMÁTICA DO LEITE

\* Honório Domingos Benedet

### RESUMO

Partindo-se das enzimas coagulantes de leite da *Endothia parasítica* *Mucor miehei*, *Mucor pusillus*, pepsina bovina, pepsina porcina e renina estudou-se a influência da concentração do íon cálcio na velocidade de coagulação do leite a diversos pHs.

A concentração de cálcio iônico 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.

### SUMMARY

Influence of the calcium ion concentration on the rate of milk coagulation by the enzymes of *Endothia parasítica* *Mucor miehei*, *Mucor pusillus*, bovin pepsin, porcine pepsin and renin was studied. Optimal rates were obtained at 58 and 68 mM of  $Ca^{++}$  for the two pepsins and the other enzymes respectively, at pH 5,0 and 35°C.

(\*) Professor do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos - Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Santa Catarina.  
Rodovia SC 404 - Km 3 - Itacorubi - 88.030 - Florianópolis SC.

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 (5).

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 (7). Na indústria costuma-se adicionar cálcio ao leite que vai se transformando em queijo, principalmente se este for pasteurizado; isso porque o aquecimento causa precipitação do cálcio iônico e, portanto, diminuição do poder coagulante da enzima (8). O cálcio no leite bovino foi estimado por Holt e Muir (2), em 3,2 mM com murexide e 2,1 mM por Muldoon e Liska (6), 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.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostras Utilizadas:

As enzimas utilizadas como padrões, ou seja, a enzima coagulante de leite da *Endothia parasítica* foi obtida na Indústria Farmacêutica Pfizer, de Guarulhos, SP. A do *Mucor miehei*, renina e pepsina porcina, obtidas da Companhia Química Sigma, St. Louis MO. Do *Mucor pusillus*, junto a Meito Sanyo Co. LTD. Japão. A pepsina bovina, obtida em estado bruto da CHR Hansen Indústria e Comércio Ltda, Valinhos, SP e purificada no nosso laboratório. As amostras de coalhos comercializados no Brasil foram direta ou indiretamente obtidos junto as indústrias produtivas, localizadas nas regiões centro-sul e sul do país.

### 2.2 Métodos:

Para a determinação do conteúdo total de cálcio no leite em pó desnatado a 10% em água destilada, utilizou-se o procedimento descrito pela Internacional Dairy Federation (3).

O princípio do método baseia-se na dissolução do cálcio<sup>03</sup> 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.

A atividade coagulante foi obtida pelo método de Soxhlet, citado por Iwesaki (4), usando-se como substrato leite em pó desnatado marca Molico, da Companhia Industrial e Comercial Brasileira de Produtos Alimentares - SP.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas tabelas 1 a 6 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 a 50 mM nos pHs utilizados e temperatura de 35°C. Assim, a quantidade total de cálcio onde ocorreu a velocidade máxima de coagulação para todas as enzimas foi a soma do já existente no leite substrato 48 mM, mais o adicionado; isto é, entre 58 e 98 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 acidez enquanto que com as restantes, esse fenômeno ocorreu com 20 a 50 mM.

Já, em pH 5,5 além da pepsina bovina também a enzima do *Mucor pusillus* teve sua velocidade máxima de coagulação com 20 mM de cálcio. Em pH 6,0 todas as enzimas estudadas, com exceção da renina e pepsina porcina 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 entre 20 e 50 mM, com exceção da pepsina porcina que em pH 7,0 foi inativada.

### 4. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados sugerem três conclusões:

- a) O pH entre 6,0 e 6,5 usado na prática não é o que promove máxima velocidade de coagulação do leite para nenhuma das enzimas, como foi apontado por Alais (1).
- b) Somente em pH 6,5 e concentração de 20 a 50 mM de cálcio ocorreu a velocidade máxima de coagulação para



todas as enzimas estudadas.

- c) A quantidade total de cálcio (o existente no leite mais o 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.

**TABELA I** - Influência do Cálcio adicionado e do pH na velocidade de coagulação do leite pela enzima 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	899	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 Na OH, para elevar o pH.

**TABELA 2** - 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 3** - Influência do Cálcio adicionado e do pH na velocidade de coagulação do leite pela enzima coagulante da Endothia parasítica, 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 4** - 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	2968
6,5	36	480	1021	2823	3000	1290	-
7,0	0	0	0	0	-	-	-

**TABELA 5** - 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 6 -** 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	198	140
5,5	200	216	387	282	200	150	125
6,0	55	180	186	150	142	96	107
6,0	4	30	58	122	87	60	-
7,0	0	0	0	40	-	-	-

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALAIS, C. Ciência de la leche; trad. por Antonio Lacasa Godina. México, D.F. Compañía Editorial Continental, 1971, Cap. 6. p-121.
2. 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.
3. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. International Standard: Determination of the calcium content of milk. FIL-IDF 36, 1966.
4. 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.
5. MARTENS, R.; NAUDTS, M. Rennet and substitutes. IDF-Annuel Bulletin, Bruxelles (108):51-63, 1978.
6. MULDOON, P.J.; LISKA, B.J. Comparison of a resin ion-exchange method for determination of ionized calcium in skin milk. J. Dairy Sci. 52(4):460-464, 1969.
7. NEVILLE, M.C.; WATTERS, C.D. Secretion of calcium into milk, Review. J. Dairy Sci. 66(3):371-380, 1983.
8. TESSIER, H.; ROSE, D. Calcium ion concentration in milk. J. Dairy Sci. 41(3):351-359, 1958.