

Avaliação da influência do cloreto de cálcio na atividade coagulante e proteásica de *Penicillium* sp SIS 23



Resumo:

A coagulação enzimática do leite é o principal método empregado para a produção de queijos, neste processo, a presença do íon cálcio é essencial, pois este atua neutralizando os resíduos proteicos e permitindo a formação do coágulo. Tendo em vista este aspecto, tem-se como objetivo avaliar o efeito da concentração de cloreto de cálcio na atividade da protease e consequente coagulação do leite. Na concentração de 0,01 M de cloreto de cálcio houve a máxima atividade proteásica, enquanto a maior atividade coagulante ocorreu em 0,04 M. De modo a indicar que nesta última concentração, obtém-se a maior atividade específica da protease e sua melhor atuação coagulante, indicando que o leite deve possuir esta concentração de cloreto de cálcio para obtenção do maior rendimento da coagulação.

Abstract:

The enzymatic coagulation of milk is the main method used for producing cheese, in this process, the presence of calcium ions is essential because this protein acts by neutralizing the waste and allowing clot formation. Considering this aspect, one has to evaluate the effect of calcium chloride concentration in protease activity and consequent coagulation of milk. The concentration of 0.01M calcium chloride was the maximum protease activity, while the greater coagulant activity was 0.04 M. In order to indicate that this final concentration, yields the highest specific activity of the protease and its best coagulant activity, indicating that milk must possess this concentration of calcium chloride to obtain the highest yield of coagulation.

Allan Henrique Felix Melo¹;
Matheus Henrique Gouveia
Gomes¹;
Rodrigo Lira Oliveira¹;
Osmar Soares Silva²;
Tatiana Souza Porto³

¹ Graduando em Engenharia de Alimentos. - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Bom Pastor, s/n, Boa Vista, Garanhuns PE, CEP. 55292-270.

² Professora do curso de Engenharia de Alimentos - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Bom Pastor, s/n, Boa Vista, Garanhuns PE, CEP. 55292-270. Email: portots@yahoo.com.br

Contato principal:

Tatiana Souza Porto³



Palavras chave: Biotecnologia, Coalhos microbianos, Tecnologia de alimentos

Keywords: Biotechnology, Microbial rennet, food technology



INTRODUÇÃO

As proteases compõem um grupo de enzimas da classe das hidrolases que quebram as ligações peptídicas de proteínas e seus resíduos, as mesmas possuem grande aplicação em diversas áreas industriais que percorre desde à indústria de detergentes até a produção de alimentos. Na indústria de alimentos, as proteases vêm sendo utilizadas como melhoradores de farinha na panificação e no amaciamento de carnes, mas é no setor lácteo que sua aplicabilidade vem apresentando destaque com a produção de queijos (MONTEIRO et al, 2009).

Na produção de queijos, a etapa de coagulação é essencial, tendo em vista que nesta ocorre a precipitação das proteínas que formam a massa proteica. A coagulação pode ocorrer pela inserção de ácidos que desestabilizam as proteínas, causando sua precipitação ou pelo método enzimático, o qual é o mais tradicional, sendo inicialmente utilizadas enzimas (renina) retiradas do quarto estômago de bezerros em lactação (FOX et al, 2000).

Atualmente, pesquisas demonstram a viabilidade de proteases vegetais e microbianas como coagulantes do leite (coalhos), substituindo a renina animal (SILVA et al., 2013). Entretanto, as enzimas vegetais são limitadas, pois sua extração depende da sazonalidade climática e da disponibilidade de solo para produção vegetal, enquanto as microbianas podem ser produzidas indefinidamente por meio de métodos fermentativos adequados, os quais produzem grandes volumes de enzimas em qualquer época do ano.

Para a coagulação com bons rendimentos o leite deve apresentar uma composição adequada. Proteínas estáveis são fundamentais, contudo um micronutriente (cálcio) é fator limitante da ação enzimática. O cálcio é um componente natural do leite, essencial a dieta humana, sendo umas das causas do alto consumo de produtos lácteos para a sua obtenção, mas também ele tem importância tecnológica definitiva. Após a hidrólise das proteínas, peptídeos negativos são formados, sendo necessário a ação do íon cálcio (Ca^{2+}) na neutralização destes resíduos, de modo a possibilitar a sua agregação e formação do coágulo (YEGIN et al, 2011).

Neste sentido, o presente trabalho tem o objetivo de avaliar a influência da concentração de cloreto de cálcio na atividade proteásica e coagulante do leite de proteases produzidas por *Penicillium* sp. SIS 23.

MATERIAL E MÉTODOS

a) Micro-organismo

Foi utilizado o fungo filamentoso *Penicillium* sp. pertencente à coleção UCP, isolados da Caatinga, da Universidade Católica de Pernambuco.

b) Produção de proteases por fermentação submersa

Foi utilizado o meio de cultura, MS-2 descrito por Porto et al, (1996). A constituição do meio para 100mL de água destilada foi de: 50mL de filtrado de soja (6% p/v), NH_4Cl (0,1% p/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,06% p/v), glicose (0,5% p/v), K_2HPO_4 (0,435 %p/v) e 1 mL de solução mineral (100mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 100mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 100mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e água destilada q.s.p. 100mL). A fermentação ocorreu por 72 horas.

c) Atividade proteásica

A atividade proteásica foi determinada pelo método de Ginther, (1979). A mistura de reação foi composta de 0,15mL de extrato enzimático e 0,25mL de Azocaseína 1%, incubados por 1 hora a 25°C. Após este período, a reação foi interrompida com adição de 1mL de TCA 10% (p/v). As amostras foram centrifugadas a 8.000 x g por 20 minutos, e 0,8 mL do sobrenadante foi adicionado a 0,2mL de NaOH 1,8N. Uma unidade de atividade da protease foi definida como sendo a quantidade de enzima requerida para produzir uma variação de absorbância igual a 0,1 em 1 hora, a 420nm, sendo expressa em U/mL.

d) Atividade coagulante do leite

Para a atividade coagulante do leite utilizou-se o método de Arima et al., (1968), utilizando 1,0 mL de solução de leite em pó desnatado a 12% (p/v) como substrato, contendo 1,0 mM de CaCl_2 . A solução foi pré-aquecida durante 10 minutos em banho maria a 37°C, seguida da adição de 100 μL do extrato enzimático, iniciando o tempo de contagem para o surgimento dos primeiros coágulos de leite. A determinação de uma unidade coagulante do leite por mililitro (U/ml) foi dada por $\text{UC} = 400 \cdot t^{-1}$, onde t é o tempo necessário para a formação dos primeiros grumos de coagulação no leite.

e) Influência da concentração de cloreto de cálcio na atividade proteásica e coagulante do leite.

O efeito da concentração de CaCl_2 na coagulação do leite foi determinado como descrito no item 2.4, porém utilizando concentrações crescentes de cloreto de cálcio (0; 0,01; 0,03; 0,04; 0,07; 0,09; 0,1; 0,4; 0,7 e 1 M). O efeito sobre a atividade proteásica foi determinado

conforme descrito no item 2.3, entretanto o extrato enzimático foi diluído, na proporção 1:2, em concentrações crescentes de CaCl_2 .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade proteásica mensura a atividade não específica da protease, expressando sua capacidade de hidrolisar as proteínas e seus resíduos. A Figura 1, apresenta a influência da concentração de cálcio nesta atividade. A protease apresentou atividade sem a presença de cálcio no meio, entretanto, percebeu-se uma ativação máxima na concentração de 0,01 M e posteriormente uma tendência de declínio, porém sempre superior ao valor da atividade sem cloreto de cálcio.

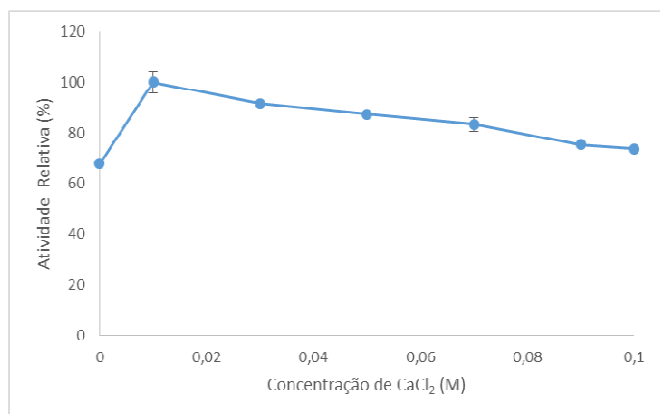


Figura 1. Efeito da concentração de CaCl_2 sobre a atividade proteásica.

Na Figura 2, foi observada atividade máxima na concentração de 0,04 M de CaCl_2 . Comportamento similar ao da atividade obtida, (ascensão seguida de declínio), foram observados nos trabalhos de ARIMA *et al*, (1970) e EL-BENDAR *et al*, (2007). Na análise de MERHEB-DINI *et al*, (2009) foi observada maior atividade também na concentração de 0,04 M, corroborando com o resultado obtido neste trabalho.

De um modo geral, a presença de cálcio no leite é essencial na coagulação enzimática, o mesmo atua neutralizando os resíduos de caseína hidrolisados pela protease, possibilitando que estes se agregem e formem o coágulo. Entretanto, em concentrações elevadas, o cálcio provoca o aumento da força iônica devido a saturação dos resíduos negativos, inibindo a atividade (MERHEB-DINI *et al*, 2009).

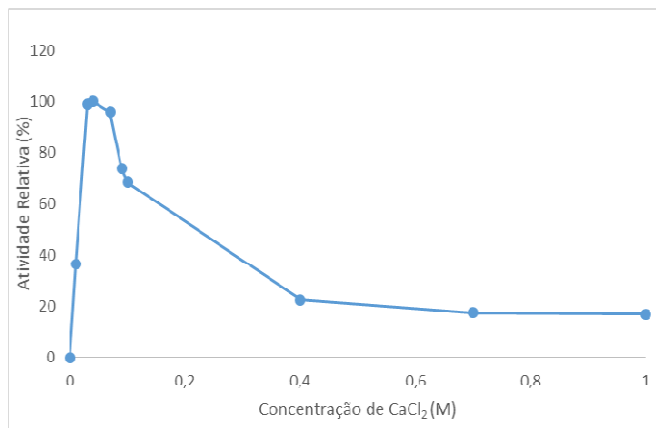


Figura 2. Efeito da concentração de CaCl_2 na atividade coagulante do leite.

CONCLUSÕES

O cloreto de cálcio não é estritamente necessário para a atividade proteásica de *Penicillium sp*. SIS 23, mas a presença deste sal atua como um ativador, favorecendo o aumento da atividade até a concentração de 0,01 M com tendência posterior de decaimento. Para a atividade coagulante, a presença do cálcio é essencial, sendo favorecida à medida que a concentração aumenta, tendo pico máximo em 0,04 M de cloreto de cálcio. Deste modo, é neste valor de concentração que o leite deve se encontrar para o melhor rendimento na coagulação.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelo financiamento do projeto

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARIMA, K.; YU, J.; IWASAKI, S. Milk-Clotting Enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. **The Acidic Proteases**, v. 546, n. 1967, p. 446–459, 1968.
- ARIMA, K.; YU, J.; IWASAKI, S. Milk Clotting Enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. In: Pearlmann G., Lorand L., editors. **Methods in Enzymology**, v.19, p. 446-459, 1970.
- EL-BENDARY, M. A., MOHARAM, M. E., & ALI, T. H. (2007). **Purification and Characterization of milk clotting enzymes produced by *Bacillus sphaericus***. Journal of Applied Sciences Research, 8, 695–699.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland. 2000. 544 p.

GINTHER, C. L. **Sporulation and the- Production of Serine Protease and Cephamycin C by Streptomyces lactamdurans**. v. 15, n. 4, p. 522–526, 1979.

MERHEB-DINI, C. et al. (a) Biochemical and Functional Characterization of a Metalloprotease from the Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 9210-9217, 2009.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N.; **Aplicações industriais da biotecnologia enzimática**. Revista Processos Químicos, p. 9-23. jan./jun., 2009.

PORTO, A. L. F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; LIMA FILHO, J. L. Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing on soy bean flour medium **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 1996.

SILVA, A.C. et al. Potential of quixaba (*Sideroxylon obtusifolium*) latex as a milk-clotting agent. **Food Science and Technology**, v.33, p.494-499, 2013.

YEGIN, S. et al. Aspartic proteinases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 4, p. 949-960, Feb 2011.