

EFEITO DO pH DE COAGULAÇÃO DO LEITE E DO TIPO DE COALHO SOBRE O RENDIMENTO DE MASSA NA PRODUÇÃO DE QUEIJO

EFFECT OF pH OF MILK CLOTTING AND DIFFERENT COAGULANTS ON YIELD OF MASS IN CHEESE PRODUCTION

VASCONCELOS, Mariana P.¹; ARAÚJO, Kátia G. de L.¹; VERRUMA-BERNARDI, Marta R.²

RESUMO

O coalho de bezerro, constituído principalmente por quimosina, é o coagulante padrão para queijos, mas a alta demanda da indústria e o seu alto custo levaram ao uso de outros coalhos, como o de bovinos adultos e os microbianos. Atualmente, há o coalho genético, que é obtido de microrganismos modificados geneticamente para produzir a quimosina. É relatada maior taxa de proteólise para os coalhos microbianos, o que pode gerar menor rendimento na coagulação e alterações sensoriais em queijos maturados. O objetivo deste trabalho foi estudar a influência de dois níveis de pH (5,7 e 6,5) no rendimento da coagulação do leite com três tipos de coalhos (bezerro, genético e microbiano). O leite pasteurizado teve o pH acertado para 5,7 e 6,5, e foi efetuada a coagulação com os três coalhos. Os coágulos obtidos foram analisados quanto à umidade, rendimento em base úmida, rendimento em base seca, sólidos totais, nitrogênio total e proteína. Os soros foram analisados quanto a umidade, sólidos totais, nitrogênio total e proteína. Os dados foram comparados através de análise de variância. Os parâmetros analisados para os coágulos e para os soros obtidos não apresentaram diferença significativa entre os três coalhos, independentemente do nível de pH avaliado, indicando que não houve diferença no rendimento da coagulação em função do coalho utilizado, em nenhum dos valores de pH estudados.

Palavras-chave: enzimas coagulantes, produção de queijo, rendimento, pH

INTRODUÇÃO

A coagulação do leite é a etapa fundamental para a elaboração de queijos. Para isso, normalmente, faz-se uso de enzimas coagulantes, que, dependendo de sua origem, apresentam composições enzimáticas diferenciadas, tanto em quantidade (proporção das enzimas), quanto em qualidade (tipo de enzima) (NEELAKANTAN et al., 1999). As enzimas utilizadas podem ser oriundas de animais, vegetais e/ou de microrganismos, que podem ser usadas isoladamente ou misturadas entre si. Esta mistura de enzimas pode proporcionar, entre outros efeitos, um ajuste da taxa de proteólise durante a maturação, a um nível desejado (RANI & VERMA, 1995).

O agente coagulante convencional utilizado na produção de queijos é o coalho de bezerro, que é extraído do quarto estômago de bezerras em lactação (YOUSIF et al., 1996). Este coalho é composto pelas enzimas quimosina e pepsina, em proporção de cerca de 85-95% de quimosina para 5-15% de pepsina. A demanda de estômagos de bezerro para a extração de coalho é muito elevada, o que se torna um fator

que dificulta a produção, devido não só ao alto custo, mas também à escassez da matéria-prima (USTUNOL & HICKS, 1990).

Microrganismos como *Rhizomucor miehei*, *R. pusillus*, *Endothia parasitica*, *Aspergillus oryzae* e *Irpex lactics* são extensivamente usados para a produção de proteínases para uso como coagulantes de leite. Os coagulantes microbianos são atualmente utilizados em cerca de 1/3 de toda a produção mundial de queijo (NEELAKANTAN et al., 1999).

Como uma outra alternativa para o coalho de bezerro, surgiu no mercado o chamado "coalho genético", que é constituído de quimosina pura. A sua obtenção foi possível graças a tecnologia do DNA recombinante, que permitiu a clonagem do gene que codifica para a quimosina de bezerro em células de *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactics*, *A. nidulans*, *A. niger* e *Trichoderma reesei* (NEELAKANTAN et al., 1999).

Um importante fator a ser considerado com relação ao coagulante utilizado diz respeito ao seu efeito sobre o rendimento e sobre as características sensoriais do queijo, como sabor e textura, sendo a atividade proteolítica das enzimas quem exerce grande influência nesses fatores. Além da ligação Phe₁₀₅-Met₁₀₆ na κ -caseína, cuja hidrólise determina a coagulação enzimática do leite, outras ligações peptídicas são hidrolisadas a taxas que variam de acordo com a enzima utilizada (atividade proteolítica não específica). As enzimas coagulantes variam amplamente com respeito à atividade proteolítica, e algumas são tão ativas a ponto de não ser possível o seu aproveitamento para a produção de queijos duros. Geralmente, os coalhos microbianos apresentam maiores atividades proteolíticas que os coalhos de bezerro e genético (LIMA et al., 1996).

Alguns autores citam que, em decorrência da proteólise não específica em níveis elevados, pode ocorrer diminuição do rendimento do queijo, bem como alteração em suas propriedades reológicas e sensoriais. A diminuição do rendimento seria reflexo da perda de substâncias nitrogenadas e gordura para o soro. A maior taxa de proteólise seria responsável também pelo desenvolvimento de amargor durante a maturação, além de modificações indesejáveis na textura do queijo (USTUNOL & HICKS, 1990; EMMONS, 1990; LÓPEZ et al., 1997).

LIMA et al. (1996), estudando o comportamento de diferentes preparações enzimáticas durante a coagulação do leite, encontraram um aumento na atividade proteolítica em função do declínio do pH para o coalho microbiano de *R. miehei* e coalho de bezerro, não sendo observado o mesmo

¹ Bacharel em Química. Dra. Profa. da UFF/ Faculdade de Farmácia/ MBO. Rua Mário Viana, 523. Niterói – RJ. CEP 24241-000. E-mail: klima@vm.uff.br

² Nutricionista, Dra. Profa. da UFF/Faculdade de Nutrição / MND – Rua São Paulo, 30. Campus do Velonguinho. CEP 24015-110. Niterói – RJ. E-mail: martauff@uol.com.br

para o coalho genético, cuja atividade proteolítica manteve-se praticamente inalterada na faixa de pH estudada (5,6 a 6,8). Ficou bastante evidente que, na faixa de pH de 5,7 a 6,2, a atividade proteolítica foi bem maior para o coalho microbiano, o que indicou que este coalho deve causar maior perda no rendimento em massa coagulada, em decorrência da proteólise não específica, nestes valores de pH. Em função desta maior taxa de proteólise para o coagulante microbiano em relação aos coalhos de bezerro e genético, é possível que os queijos maturados, cujos valores de pH diminuem durante a maturação, apresentem também características sensoriais distintas, determinadas pelo tipo de enzima utilizada para a coagulação.

De acordo com os dados apresentados anteriormente, o pH parece ter influência no rendimento da coagulação do leite com diferentes tipos de enzimas. Por este motivo o presente trabalho foi realizado, na tentativa de estabelecer a influência de dois níveis de pH sobre o rendimento na coagulação do leite com o coalho de bezerro (CB), coalho genético (CG) e coalho microbiano de *R. miehei* (CM).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados para os experimentos de avaliação do rendimento amostras de coalho de bezerro (CB), coagulante microbiológico (CM) obtido do fungo *Rhizomucor miehei* e coalho genético (CG), derivado de uma cepa de *Aspergillus niger* que foi modificada geneticamente para produzir quimosina de bezerro. Os coalhos foram gentilmente cedidos por uma empresa produtora. Foi usado leite pasteurizado (72° C/15 segundos) tipo B com pH 6,5 (natural) e acidificado a pH 5,7, mediante a adição de solução de ácido cítrico a 10% (m/v). Estes valores de pH foram escolhidos para simular a situação da produção de queijo Minas frescal (coagulação em pH natural) e da produção de queijos com pré-maturação láctica (coagulação em pH de cerca de 5,7).

A força de cada coagulante foi determinada de acordo com SEVERINSEN (1979). Porções de 500 mL de leite tipo B a 35°C, adicionadas de 200 mg L⁻¹ de cloreto de cálcio, foram acrescidas de um volume de uma solução da enzima em questão também 35°C, e verificou-se o tempo necessário para o aparecimento dos primeiros sinais de coágulo nas paredes do recipiente. A força (F) de cada coagulante foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: $F = L \times 2.400/c \times t$, sendo: L o volume de leite utilizado, c a quantidade de coagulante adicionada e t o tempo de coagulação em segundos. Constatou-se que a força (poder coagulante mínimo) do CB, do CG e do CM era, respectivamente, 1:43.414, 1:31.096 e 1:13.483. Esta determinação foi efetuada para estabelecer a quantidade de cada coagulante a ser adicionada para os experimentos de rendimento, de modo que a coagulação ocorresse em 50 minutos. Assim, a adição dos coagulantes aos recipientes foi efetuada em quantidades de enzima que possuíam a mesma atividade coagulante de leite.

Para a avaliação do efeito do pH e do tipo de coalho sobre o rendimento em massa foram produzidos, simultaneamente, doze coágulos (três tipos de enzimas em pH natural e acidificado, cada qual em duplicata), utilizando-se 1.000 mL de leite, acrescidos de quantidades de cada coagulante necessárias para promover a coagulação em 50 minutos. Antes da adição dos coalhos, foram adicionados 200 mg L⁻¹ de cloreto de cálcio ao leite e sua temperatura foi ajustada para 35°C. Após a coagulação, efetuou-se o corte e agitação manual do coágulo e em seguida, elevou-se a

temperatura até 45°C. O coágulo foi deixado em repouso até deposição no fundo do recipiente, foi separado do soro e colocado diretamente em formas para queijo Minas, onde permaneceu por cinco dias sob refrigeração e finalmente foram pesados. Os coágulos e soros obtidos foram armazenados em freezer a -18°C até o momento das análises.

No leite e nos soros obtidos do experimento de avaliação do rendimento, foram analisados nitrogênio total, proteína bruta e sólidos totais, e nos coágulos, além destas análises, foram avaliados também o rendimento em base úmida e o rendimento em base seca.

Os conteúdos de nitrogênio total e proteína bruta foram determinados pelo método de Kjeldahl, segundo A.O.A.C. (1984), utilizando-se o fator 6,38 para a conversão em proteína. A umidade foi determinada segundo a técnica descrita pelo Laboratório Nacional de Referência Animal (L.A.N.A.R.A., 1981). O rendimento úmido foi determinado pelo peso do coágulo obtido a partir do volume de leite utilizado, enquanto que o rendimento em matéria seca foi calculado com base no peso do coágulo e no conteúdo de umidade. Os valores de pH do leite foram medidos seguindo a técnica descrita por L.A.N.A.R.A. (1981). Todas as análises foram efetuadas em triplicata.

Para comparação dos dados de nitrogênio total, proteína bruta, umidade, rendimentos seco e úmido para os diferentes coalhos e valores de pH foi realizada a análise de variância (ANOVA), considerando $p < 0,05$ para ocorrência de diferença significativa. Foram comparadas as médias para cada parâmetro medido dentro de um mesmo valor de pH e entre os valores de pH. As médias com diferença significativa foram comparadas pelo teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na tabela 1 demonstram a composição do leite utilizado nos experimentos de avaliação do rendimento.

Tabela 1- Composição média do leite pasteurizado tipo B utilizado no experimento de avaliação do rendimento.

Componentes	Valores
pH	6,46
Nitrogênio total (g 100 mL ⁻¹)	0,41
Proteína (g 100 mL ⁻¹)	2,64
Extrato seco (g 100 mL ⁻¹)	10,11

Os resultados apresentados na tabela 02 mostram os resultados das análises de umidade, rendimento úmido, rendimento seco, nitrogênio total e proteína para os coágulos obtidos com cada um dos coalhos e nos dois valores de pH estudados. Os resultados das análises de umidade não apresentaram diferença significativa para os coágulos obtidos com diferentes coalhos dentro de um mesmo valor de pH, mas houve diferença significativa para a umidade dos coágulos obtidos em diferentes valores de pH, o que foi devido à maior dessoragem nas massas obtida com o pH mais baixo.

Para o rendimento em base úmida, o mesmo comportamento acima descrito foi obtido no que diz respeito às diferenças entre os coalhos e os valores de pH. Diversos trabalhos publicados (USTUNOL & HICKS, 1990; EMMONS, 1990; LIMA et al., 1996; LOPÉZ et al., 1997) descrevem que a maior atividade proteolítica de coagulantes microbianos pode

proporcionar menor rendimento em massa de coágulo. Entretanto, no presente trabalho, a diferença entre os coágulos dentro de um mesmo valor de pH não foi significativa ($p > 0,05$). Todavia, o rendimento em base úmida não indica exatamente o rendimento em substâncias do leite retidas no coágulo, visto que um alto teor de umidade pode determinar um alto rendimento úmido, não significando que o coágulo contenha uma alta concentração de matéria seca. Mas os valores encontrados para o rendimento em base seca também não apresentaram diferenças significativas quando foram comparados os diferentes tipos de coagulantes num mesmo valor de pH, porém, comparando-se os coalhos em valores de pH distintos, encontrou-se diferença. Este fato se deu, provavelmente, em decorrência da elevação da taxa de proteólise com a redução de pH para os três coagulantes testados.

Ao contrário do previsto, a coagulação em pH 5,7 não promoveu menor rendimento para o CM em relação ao CB e CG. Logo, os presentes resultados não podem ser explicados pela hipótese estabelecida por LIMA et al. (1996), que verificaram alta atividade proteolítica para o CM em pH 5,7, em um substrato modelo (solução de caseína a 1%), em relação ao CG e CM. Apesar de, em substrato modelo, CM apresentar elevada atividade proteolítica em pH 5,7, o rendimento da coagulação não foi estatisticamente menor pelo uso do CM neste pH. Este fato pode ser decorrente, de ações diferenciadas do CM em substrato modelo e no leite, onde, inicialmente, as micelas de caseína estariam intactas. SCOTT (1991) relatou que a protease de *R. miehei* (que constitui o CM usado no presente trabalho) degrada rapidamente a α - e a β -caseína, em soluções modelos, na faixa de pH entre 5,7 e 7,0. No entanto, é possível que neste experimento, inicialmente, a fração mais disponível para a atuação da enzima fosse a κ -caseína, já que, segundo dados da literatura, a micela íntegra

apresenta a α - e a β -caseína dobradas, formando um núcleo, enquanto a κ -caseína forma a camada mais externa, o que mantém a estabilidade da micela (ECK, 1987). No substrato modelo usado no trabalho de LIMA et al. (1996), possivelmente houvesse maior disponibilidade de α - e β -caseínas, e por isso tenha sido detectada maior atividade proteolítica para o CM, o que estaria de acordo com o relato de SCOTT (1991).

Os valores de nitrogênio total e, consequentemente, de proteína total, se apresentaram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) apenas entre os valores de pH estudados, não sendo diferentes estatisticamente entre os coagulantes num mesmo valor de pH, embora, numericamente, tenham sido maiores para o CM no pH 6,5. Provavelmente, estes maiores conteúdos aparentes de nitrogênio e proteína total para o coágulo obtido pelo CM são decorrentes do menor teor de umidade aparente deste coágulo, e não do fato do CM favorecer a retenção de nitrogênio no queijo. ROSSI et al. (1998), num experimento com produção de queijo Minas frescal, encontraram maiores valores absolutos em proteína para os queijos obtidos a partir de CG, seguido, respectivamente, pelo coalho bovino e CM, sem, contudo, que houvesse diferença estatisticamente significativa deste valor entre os coalhos estudados, o que está de acordo com os resultados aqui apresentados. Na Tabela 2 são mostrados, também, os resultados de proteína expressos em base seca. Observa-se que dentro de um mesmo valor de pH, os coalhos não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si ($p > 0,05$).

No soro resultante da coagulação do leite foram realizadas análises de umidade, sólidos totais, nitrogênio total e proteína, para avaliar as perdas ocorridas durante a coagulação. Os resultados são mostrados na Tabela 3.

Tabela 2 - Resultados das análises efetuadas nos coágulos do experimento de avaliação do rendimento (média \pm e.p.).

Análise	pH 6,5			pH 5,7		
	CB	CG	CM	CB	CG	CM
Umidade (g 100g ⁻¹)	64,07 \pm 1,31a	64,49 \pm 0,83a	63,85 \pm 0,94a	39,97 \pm 1,43b	39,71 \pm 0,30b	37,97 \pm 1,14b
Rendimento Úmido (g L ⁻¹ de leite)	134,0 \pm 0,6a	139,2 \pm 1,6a	133,3 \pm 9,4a	72,3 \pm 1,0b	74,1 \pm 1,0b	71,5 \pm 4,1b
Rendimento seco (g L ⁻¹ de leite)	48,1 \pm 1,9a	49,4 \pm 1,7a	48,1 \pm 2,2a	43,4 \pm 0,4b	44,6 \pm 0,3b	44,3 \pm 1,7b
Nitrogênio total* (g 100g ⁻¹)	2,56 \pm 0,06a	2,59 \pm 0,23a	2,83 \pm 0,31a	5,56 \pm 0,47b	5,60 \pm 0,27b	5,49 \pm 0,06b
Proteína* (g 100g ⁻¹)	16,39 \pm 0,40a	16,57 \pm 1,45a	17,82 \pm 1,65a	35,51 \pm 3,00b	35,75 \pm 1,72b	35,03 \pm 0,41b
Proteína** (g 100g ⁻¹)	34,07 \pm 0,83a	33,54 \pm 2,93a	37,05 \pm 3,43a	86,43 \pm 6,91b	80,16 \pm 3,86b	79,07 \pm 0,92b

*: em base úmida; **: em base seca

médias na mesma linha com diferentes letras apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

CB: coalho de bezerro; CG: coalho genético; CM: coalho microbiano.

Tabela 3 - Resultados das análises efetuadas nos soros do experimento de avaliação do rendimento (média \pm e.p.).

Análise	pH 6,46			pH 5,70		
	CB	CG	CM	CB	CG	CM
Umidade (g 100g ⁻¹)	95,28 \pm 0,78 ^a	95,86 \pm 0,13 ^a	95,72 \pm 0,15 ^a	95,90 \pm 0,03 ^a	95,73 \pm 0,08 ^a	95,92 \pm 0,08 ^a
Sólidos totais (g 100g ⁻¹)	4,72 \pm 0,70 ^a	4,13 \pm 0,13 ^a	4,28 \pm 0,15 ^a	4,10 \pm 0,04 ^a	4,27 \pm 0,08 ^a	4,08 \pm 0,08 ^a
Nitrogênio total (g 100g ⁻¹)	0,17 \pm 0,00 ^a	0,17 \pm 0,01 ^{a,b}	0,18 \pm 0,01 ^{a,b}	0,19 \pm 0,01 ^{a,b}	0,18 \pm 0,1 ^{a,b}	0,20 \pm 0,01 ^b
Proteína (g 100g ⁻¹)	1,08 \pm 0,03 ^a	1,11 \pm 0,04 ^{a,b}	1,18 \pm 0,08 ^{a,b}	1,23 \pm 0,02 ^{a,b}	1,16 \pm 0,03 ^{a,b}	1,32 \pm 0,05 ^b

médias na mesma linha com diferentes letras apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

CB: coalho de bezerro; CG: coalho genético; CM: coalho microbiano.

Os valores de umidade dos soros não apresentaram diferença estatisticamente significativa num mesmo valor de pH, nem entre os dois valores de pH, considerando o uso de diferentes coagulantes no experimento. Os sólidos totais tiveram comportamento idêntico ao obtido para os valores de umidade.

Para os valores de nitrogênio total e proteína, houve diferença significativa apenas entre o CB do pH 6,5 e o CM do pH 5,7. Para um mesmo valor de pH, não houve diferença significativa entre os três coalhos. No entanto, como não foi encontrada diferença significativa para nenhum outro parâmetro analisado neste trabalho, é possível que a diferença encontrada para nitrogênio total e proteína tenha sido casual.

Ao contrário da hipótese estabelecida inicialmente, a coagulação do leite em pH 5,70 não causou menor rendimento para o CM em relação a CB e CG. Logo, o CM é de uso viável para a produção de queijos com um curto ou nenhum período de maturação, como o Minas frescal, pois, além do CM não promover alterações no rendimento, possui um preço mais acessível ao produtor. Entretanto, deve-se descrever também o efeito de cada enzima nas características sensoriais de diferentes queijos.

CONCLUSÃO

Os parâmetros analisados para os coágulos e para os soros obtidos não apresentaram diferença significativa entre os três coalhos, independentemente do nível de pH avaliado, indicando que não houve diferença no rendimento da coagulação em função do coalho utilizado, em nenhum dos valores de pH estudados.

ABSTRACT -

Calf rennet, constituted mainly by chymosin, is the standard coagulant for cheese, but the high requirement for industrial use and its high cost led to the use of other coagulants, as those from adult bovines and from microorganisms. Nowadays, there is the genetic coagulant obtained from genetically modified microorganisms that produce chymosin. It has been reported that there is a higher proteolysis level for microbial coagulants which may lead to a lower yield in clotting and to sensorial changes in ripe cheeses. Also, there is a higher increase of proteolytic activity with pH decrease for microbial coagulant than for calf and genetic rennet. The objective of this study was to evaluate the influence of pH on yield of milk coagulation with three kinds of coagulants (calf rennet, genetic and microbial coagulant). The analyzed parameters for curd and whey (moisture, wet yield, dry yield, total solids, total nitrogen and protein) did not differ for the three coagulants, regardless of milk pH.

Key-words: coagulant enzymes, cheese production, yield, pH

REFERÊNCIAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C.). **Official methods of analysis**. 14 ed. Virginia: A.O.A.C., 1984. 1141 p.
- ECK, A. **O queijo**. Lisboa: Editora Europa-America LTDA, 1987. 336 p.
- EMMONS, D.B. Milk clotting enzymes. Estimating cheese yield losses from proteolysis during cheese making. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 8, p. 2016 – 2021. 1990.
- LABORATÓRIO NACIONAL DE REFERÊNCIA ANIMAL (L.A.N.A.R.A.). **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. v II. Métodos físicos e químicos**. Brasília: LANARA, 1981. xvii-1 – xvii-6 p.
- LIMA, K.G.; MAGALHÃES, A.R.; ABREU, A.C. Atividade coagulante de leite e proteolítica de coagulante microbiológico e coalho genético – Influência do pH, temperatura e CaCl₂. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 77, n. 1, p. 11-14. 1996.
- LÓPEZ, M. B.; JORDÁN, M.J.; HELLIN, P.; CASTILLO, M.; LAENCINA, J. Kinetics of k-casein hydrolysis by different rennets and coagulant enzymes in Murciano-Granadina goat milk. **Milchwissenschaft**, v. 52, n.7, p. 370 – 373. 1997.
- NEELAKANTAN, S.; MOHANTY, A.K.; KAUSIHIK, J.K. Production and use of microbial enzymes for dairy processing. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 143 – 148. 1999.
- RANI, M. & VERMA, N.S. Changes in organoleptic quality during ripening of cheese made from cows and soya milk blends, using microbial rennet. **Food Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 369 – 375. 1995.
- ROSSI, D.A.; ABREU, L.R.; FURTADO, M.M.; MOURA, J.C. Utilização do coalho bovino e coagulantes microbiano e genético na composição e rendimento do Queijo Minas Frescal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 53, n. 305, p. 85-92. 1998.
- SCOTT, R. **Fabricación de queso**. 2ª ed. Zaragoza: Editora Acribia. 1991. 520 p.
- SEVERINSEN, G.S. Analytical methods for rennet characterization. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia**, v. 30, n. 2, p. 109-116. 1979.
- USTUNOL, Z.; HICKS, C.L. Effect of calcium addition on yield of cheese manufactured with *Endothia parasitica* protease. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 1, p. 17-25. 1990.
- YOUSIF, B.H.; McMAHON, D.J.; SHAMMET, K.M. Milk clotting enzymes from *Solanum dobium* plant. **International Dairy Journal**, v. 6, n. 6, p. 637 – 644. 1996.