

## **Monitoramento da distribuição do tamanho das partículas do leite integral e desnatado durante os processos de coagulação ácida ou enzimática**

**Monitoring the particle size distribution of whole and skimmed milk during acidic or enzymatic coagulation process**

**Seguimiento de la distribución del tamaño de partículas de la leche entera y desnatada durante los procesos de coagulación ácidos o enzimáticos**

Recebido: 07/12/2021 | Revisado: 11/12/2021 | Aceito: 17/12/2021 | Publicado: 02/01/2022

### **Fernanda Lopes da Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6593-294X>  
Universidade Federal de Viçosa, Brasil  
E-mail: [fernandasilvalope@gmail.com](mailto:fernandasilvalope@gmail.com)

### **Mariana Braga de Oliveira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1794-2198>  
Universidade Federal de Juiz de Fora, Brasil  
E-mail: [tecmarianabraga@gmail.com](mailto:tecmarianabraga@gmail.com)

### **Érica Felipe Mauricio**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7513-8870>  
Universidade Federal de Viçosa, Brasil  
E-mail: [ericafm90@hotmail.com](mailto:ericafm90@hotmail.com)

### **Elisângela Ramieres Gomes**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0010-3945>  
Universidade Federal de Viçosa, Brasil  
E-mail: [elisangelaramieres@yahoo.com.br](mailto:elisangelaramieres@yahoo.com.br)

### **Ítalo Tuler Perrone**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3393-4876>  
Universidade Federal de Juiz de Fora, Brasil  
E-mail: [italotulerperrone@gmail.com](mailto:italotulerperrone@gmail.com)

### **Antônio Fernandes de Carvalho**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3238-936X>  
Universidade Federal de Viçosa, Brasil  
E-mail: [antoniofernandes@ufv.br](mailto:antoniofernandes@ufv.br)

### **Rodrigo Stephani**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0237-8325>  
Universidade Federal de Juiz de Fora, Brasil  
E-mail: [rodrigo.stephani@ufjf.edu.br](mailto:rodrigo.stephani@ufjf.edu.br)

### **Resumo**

O processo de coagulação do leite pode ocorrer, principalmente, por duas vias: coagulação ácida ou enzimática, sendo a característica do gel obtido dependente do tipo de coagulação, do tipo de processamento aplicado e da composição do leite inicial. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as modificações microestruturais do leite integral e desnatado pasteurizados através da análise de distribuição de partículas (LS), mediante coagulações por via ácida, realizada via fermentação pela adição da cultura mista de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; e enzimática, por adição de quimosina microbiana. Durante todo o processo de coagulação, foram retiradas alíquotas de leite de ambas as coagulações até a obtenção dos géis. Os géis obtidos apresentaram diferenças no tempo de coagulação e na distribuição do tamanho das partículas, além disso, os tamanhos das partículas dos géis do leite desnatado apresentaram valores finais em todas as distribuições, maiores que o leite integral, possivelmente relacionados ao fato da caseína, proteína majoritária, estar mais disponível no meio reacional para que ocorra a desestabilização do sistema em ambos os tipos de coagulação. Ao comparar os dois processos de coagulação para a distribuição  $d_{90}$ , os géis da coagulação enzimática apresentaram agregados 12 vezes maiores que os géis da coagulação ácida, isso demonstrando que as forças de interações para a formação dos agregados são muito maiores na coagulação enzimática.

**Palavras-chave:** Tamanho de partículas; Microestrutura; Coagulação do leite; Proteína do leite.

### **Abstract**

The milk coagulation process can occur mainly in two ways: acidic or enzymatic coagulation, the characteristic of the gel obtained being dependent on the type of coagulation, the type of processing applied and the composition of the

initial milk. Therefore, the objective of this work was to evaluate the microstructural modifications of pasteurized whole and skimmed milk through particle distribution analysis (LS), through acidic coagulation, carried out via fermentation by adding a mixed culture of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; and enzymatic, by the addition of microbial chymosin. During the entire coagulation process, milk aliquots were removed from both coagulations until gels were obtained. The gels obtained showed differences in coagulation time and particle size distribution, in addition, the particles sizes of the skimmed milks gels showed final values in all distributions greater than that of whole milk, possibly related to the fact of casein, protein majority, be more available in the reaction medium so that the destabilization of the system occurs in both types of coagulation. When comparing the two coagulation processes for the  $d_{90}$  distribution, the enzymatic coagulation gels showed aggregates 12 times larger than the acid coagulation gels, demonstrating that the interaction forces for the formation of aggregates are much greater in enzymatic coagulation.

**Keywords:** Particle size; Microstructure; Milk-clotting; Milk protein.

### Resumen

El proceso de coagulación de la leche puede ocurrir principalmente de dos formas: coagulación ácida o enzimática, dependiendo la característica del gel obtenido del tipo de coagulación, el tipo de procesamiento aplicado y la composición de la leche inicial. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar las modificaciones microestructurales de la leche pasteurizada entera y desnatada mediante análisis de distribución de partículas (LS), mediante coagulación ácida, realizada vía fermentación mediante la adición de un cultivo mixto de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; y enzimático, mediante la adición de quimosina microbiana. Durante todo el proceso de coagulación, se retiraron alícuotas de leche de ambas coagulaciones hasta la obtención de geles. Los geles obtenidos mostraron diferencias en el tiempo de coagulación y distribución granulométrica, además, los tamaños de partícula de los geles de la leche desnatada mostraron valores finales en todas las distribuciones mayores al de la leche entera, posiblemente relacionado con el hecho de caseína, proteína mayoritaria, estar más disponible en el medio de reacción para que la desestabilización del sistema se produzca en ambos tipos de coagulación. Al comparar los dos procesos de coagulación para la distribución  $d_{90}$ , los geles de coagulación enzimática mostraron agregados 12 veces más grandes que los geles de coagulación ácida, demostrando que las fuerzas de interacción para la formación de agregados son mucho mayores en la coagulación enzimática.

**Palabras clave:** Tamaño de partícula; Microestructura; Coagulación de la leche; Proteína de la leche.

## 1. Introdução

A principal proteína presente no leite é a caseína, representando cerca de 80% do conteúdo proteico, estando presente na forma de micelas de caseína, que possuem um diâmetro médio de 200 nm (Silva et al., 2019). As micelas estão envolvidas diretamente no processo de formação de géis (que é uma etapa determinante na industrialização de lácteos), por ser a primeira etapa da produção de queijos e iogurtes (Lucey, 2002; Leite Júnior et al., 2017). O processo de coagulação pode ser induzido por acidificação, por enzimas coagulantes ou pela combinação de ambos (ácidos e enzimas), sendo o tipo de coagulação determinante nas propriedades dos géis obtidos (Lucey, 2002; Tarapata et al., 2021).

O processo do gel ácido pode ocorrer pela acidificação decorrente das bactérias lácticas que transformam a lactose em ácido láctico ou pela adição de ácidos, tais como o ácido láctico e o ácido cítrico, ou ainda pela adição de glucona- $\delta$ -lactona (GDL) (Lucey et al., 2022). Esse processo provoca alterações significativas na estrutura das micelas de caseína, que ao se aproximarem do pH isoelétrico da caseína levam a formação de um precipitado (Silva et al., 2019). No entanto, esse pH pode ser alterado de acordo com o processo utilizado, temperatura do meio e o tipo de tratamento térmico utilizado. Além disso, o tipo de precipitado formado depende da forma de acidificação do meio, pois se ocorre de forma rápida pela adição de ácido, gera precipitados dispersos, no entanto, quando a acidificação é progressiva através da fermentação láctica ou pela hidrólise de GDL leva a formação de um gel homogêneo e liso (Brulé & Maubois, 2018; Lucey et al., 2022). Nesse tipo de coagulação as ligações intermoleculares formadas são do tipo eletrostáticas e hidrofóbicas, dessa forma, o coágulo formado é mais frágil e possui uma consistência reduzida (Brulé & Maubois, 2018).

Já o processo de coagulação enzimática é promovido pela ação de enzimas coagulantes específicas, e pode ser resumido em três fases, sendo a primeira a hidrólise enzimática, que consiste na proteólise das micelas de caseína através da adição do coagulante; seguida pela agregação das micelas, que ocorre devido a ligação com o cálcio solúvel, e pôr fim a

reticulação ou sinérese, que é a profunda reorganização das micelas de caseína e a formação de fato de um gel (Lucey, 2011; Brulé & Maubois, 2018; Leite Júnior et al., 2017). A enzima coagulante atua sobre a ligação 105-106 da  $\kappa$ -caseína, liberando assim o paracaseinato de cálcio (para- $\kappa$ -CN) e o caseinomacropéptídeo (CMP), sendo que o processo de formação da coalhada ocorre na porção do para- $\kappa$ -CN, formando uma rede tridimensional, com a formação de cadeias moleculares conectadas por meio de interações hidrofóbicas, seguidas pela solidificação através de ligações cruzadas com o cálcio livre (Lucey, 2011; Brulé & Maubois, 2018; Leite Júnior et al., 2017).

Como o processo de coagulação possui uma grande importância econômica para a indústria de lácteos, vários estudos têm sido feitos para entender melhor o que ocorre durante cada uma das etapas desse processo, utilizando técnicas como reologia (Leite Júnior et al., 2017), espectroscopia no infra-vermelho – NIR (Castillo et al., 2003; Leite Júnior et al., 2017; Panikutirra et al., 2019), microscopia eletrônica de varredura (Tarapata et al., 2021), microscopia de força atômica (Freitas et al., 2019), entre outras. No entanto, nenhum estudo foi encontrado utilizando a técnica de análise de partícula por difração a laser (LS). Essa técnica envolve a dispersão de uma amostra em um líquido em constante movimentação, e as partículas presentes na amostra causam uma descontinuidade no fluxo do fluido e assim são detectadas por um laser incidente, e correlacionadas com o tamanho da partícula (Brar & Verma, 2011). Além disso, não há estudos que comparem utilizando uma mesma técnica e o mesmo processo a coagulação do leite desnatado e integral, bem como o uso inicial de um mesmo leite avaliando o processo de coagulação ácida e enzimática.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar as condições de comportamento e distribuição estrutural dos tamanhos de partículas, através do uso do LS, durante a formação do gel nas coagulações ácida e enzimática em leites integral e desnatado.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Materiais

Os materiais utilizados foram leite pasteurizado integral e desnatado (Laticínios Benfica, Minas Gerais, Brasil), cultura láctea liofilizada DELVO®YOG CY 340 0,5U (DSM, São Paulo, Brasil), cloreto de cálcio 40 % m.m<sup>-1</sup> (Macalé, Minas Gerais, Brasil), Quimosina microbiana Ha-La® (Chr Hansen, São Paulo, Brasil).

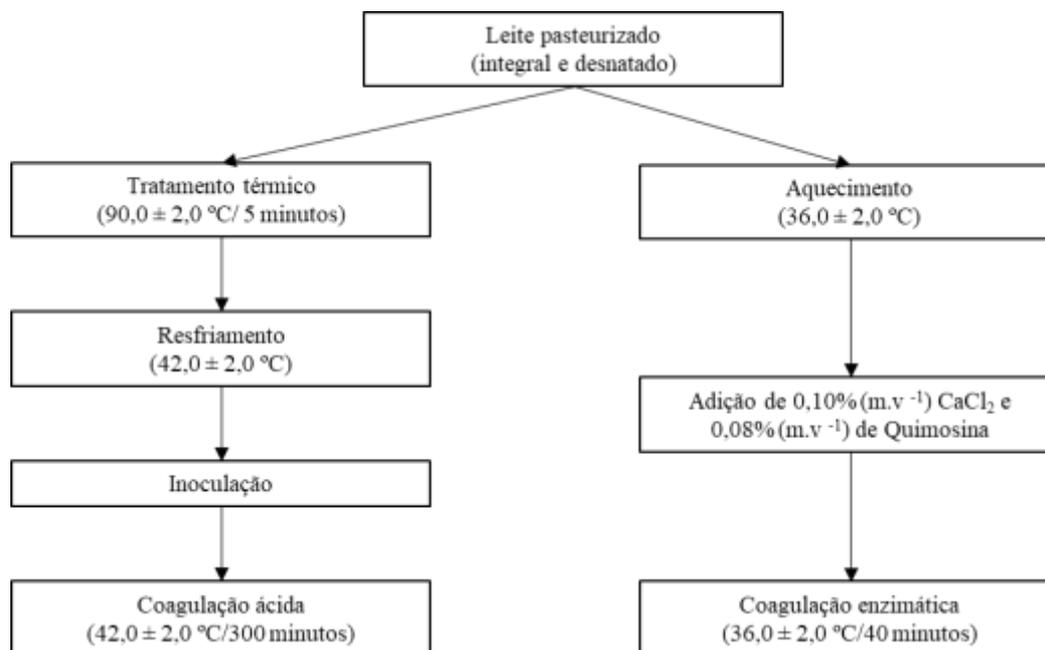
### 2.2 Métodos

#### 2.2.1 Coagulação ácida

A Figura 1 apresenta o fluxograma de produção do gel ácido à esquerda. Foram pesados 500 g de leite pasteurizados e colocados em cubas em banho-maria, para realização do tratamento térmico ( $90,0 \pm 2,0$  °C/ 5 minutos), visando realizar a desnaturação das proteínas globulares e a eliminação dos microrganismos patogênicos. Em seguida, foi realizado o resfriamento à  $42,0 \pm 2,0$  °C, seguido da inoculação da cultura láctea.

A cultura láctea utilizada foi a DELVO®YOG CY 340 0,5 U, que apresenta as cepas de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, e cepas probióticas LAFTI®. A preparação do fermento seguiu conforme as recomendações do fabricante, sendo que para as diluições e preparo foi utilizado leite desnatado esterilizado. A inoculação foi realizada com adição de 0,2 mL do inóculo diluído ao leite a temperatura de  $42,0 \pm 2,0$  °C, temperatura ideal para a atividade da cultura, e essa foi mantida durante todo o processo de fermentação, que foi determinado ao atingir o pH de 4,6 no meio (Tarapata, Lobacz & Zulewska, 2021). Após a inoculação da cultura, a cada 60 minutos foram realizadas medições do pH utilizando-se potenciômetro PG1400 (GEHAKA, São Paulo, Brasil) e amostras do gel em formação foram retiradas para análises de distribuição do tamanho de partículas (LS). O processo de fermentação foi monitorado até 300 minutos. Esse processo foi realizado em triplicata.

**Figura 1.** Delineamento experimental da coagulação ácida (à esquerda) e da coagulação enzimática (à direita) para os leites integral e desnatado.



Fonte: Autores (2021).

### 2.2.2 Coagulação enzimática

A Figura 1 ilustra o delineamento experimental utilizado para a produção dos géis enzimáticos à direita. Da mesma forma, 500 g de leite pasteurizado foram aquecidos em banho-maria até atingir a temperatura de  $36,0 \pm 2,0$  °C. Em seguida, foi adicionado 0,10 % ( $m \cdot v^{-1}$ ) de cloreto de cálcio 40 %  $m \cdot m^{-1}$  e 0,08 % ( $m \cdot v^{-1}$ ) de Quimosina microbiana Ha-La®.

Durante o processo de coagulação o leite foi mantido em banho-maria à uma temperatura de  $36,0 \pm 2,0$  °C, temperatura ótima para a atividade enzimática, por 40 minutos. Esse processo foi realizado em triplicata.

Ao longo da coagulação foram retiradas alíquotas a cada 10 minutos para a realização da análise de tamanho de partícula (LS) e novamente o acompanhamento do pH através do equipamento potenciômetro PG1400 (GEHAKA, São Paulo, Brasil).

### 2.2.3 Análise de tamanho de partículas

As alíquotas retiradas das amostras ao longo dos processos de coagulação foram submetidas à análise de distribuição do tamanho de partícula utilizando o analisador por difração a laser Beckman Coulter LS 13 320 (Beckman Coulter, Miami, FL, EUA) acoplado ao módulo de análise líquida Aqueous liquid module (Beckman Coulter, Miami, FL, EUA). As amostras retiradas foram adicionadas lentamente no reservatório do módulo de análise líquida contendo água a temperatura ambiente ( $23 \pm 2$  °C), visando obter o nível de  $50 \pm 5\%$  nos fotodetectores PIDS (Polarization Intensity Differential Scattering System), conforme indicação do fabricante do equipamento. Os dados foram coletados na região de 0,04 a 2000  $\mu m$  com tempo de coleta estabelecido em 90 segundos. Os resultados foram obtidos utilizando o índice de refração de 1,332 para o meio dispersante (água), 1,47 para os glóbulos de gordura e 1,57 para as micelas de caseínas de acordo com Mimouni et al. (2009) e foram representados pelo percentual de volume ocupado pelas partículas em função do seu tamanho. O software Beckman Coulter versão 5.03 foi aplicado para obtenção dos dados estatísticos (Torres et al., 2017). As leituras foram realizadas em duplicata.

#### 2.2.4 Análise estatística

Os dados obtidos nos experimentos foram analisados no software SPSS 23.0 (SPSS, versão 23, IBM Corp., Armonk, NY, EUA). As diferenças significativas entre os valores médios das medições replicadas em cada ponto de dados foram analisadas por análise de variância (ANOVA) usando o teste de Tukey com um nível de confiança de 95%.

### 3. Resultados e Discussão

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos para o pH e análise de distribuição das partículas durante o processo de coagulação ácida para ambos os leites integral e desnatado e a Tabela 2 mostra os resultados obtidos para a coagulação enzimática. Sendo os parâmetros  $d_{10}$  e  $d_{90}$  os diâmetros de corte da curva de distribuição do tamanho de partículas acumulada em 10 % e 90 %, respectivamente, enquanto o  $d_{50}$  é à mediana da distribuição.

O processo de coagulação ácida é dependente do pH (Brulé & Maubois, 2018), e como pôde-se observar na Tabela 1 a medida em que ocorre a diminuição do pH, ocorre também um aumento dos tamanhos das partículas. Ao avaliar as distribuições dos tamanhos de partículas com o tempo, observa-se que a partir do tempo de 240 minutos ocorre diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para as distribuições  $d_{10}$  e  $d_{50}$  para ambos os leites. Já para a distribuição  $d_{90}$  essa diferença começa a ocorrer em 180 minutos para o leite integral, e se mantem em 240 minutos para o leite desnatado. O tempo de 240 minutos de coagulação foi significativo para a coagulação ácida como pode-se perceber. E como demonstrado em um estudo de Tarapata et al. (2021) esse é o tempo em que as curvas de acidificação começam a se modificar, saindo de um platô e ocorrendo uma redução brusca do pH.

Ao avaliar o pH do leite nesses tempos, é possível observar que para o leite integral a 240 minutos tem-se um pH de 5,23 e para o leite desnatado de 5,20 (na Tabela 1 são apresentados os valores iniciais de pH, destacando que os mesmos não foram padronizados, respeitando os pH presentes nos leites). Portanto, apesar dos valores finais serem próximos ocorre uma variação de pH mais expressiva para o leite desnatado. A coagulação ácida ocorre devido ao abaixamento do pH levando a alterações das micelas de caseína. Inicialmente, ocorre a solubilização do fosfato de cálcio coloidal (FCC) a qual é completada entre os pH 5,1-5,3 (Tuinier & de Kruif, 2002; McMahon & Brown, 1984; van Hooydonk et al., 1986; Walstra, 1990). Paralelamente à solubilização do FCC ocorre a dissociação da micela de caseína, a redução do potencial zeta e a diminuição hidrodinâmica da micela (Banon & Hardy, 1992; Roefs et al., 1985; van Hooydonk et al., 1986; Walstra, 1990). Dessa forma, foi possível verificar que essa parte inicial da coagulação ácida não altera significativamente a estrutura do leite, ocorrendo mudanças significativas ( $p < 0,05$ ) somente ao final do processo. Posteriormente, entre os pH 5,3 a 4,6 ocorre a agregação das partículas de caseína e o aumento do seu diâmetro aparente, que ocorre devido a neutralização de cargas e o aumento da hidrofobicidade, levando a interações atrativas (de Kruif, 1999).

**Tabela 1.** Dados da distribuição do tamanho das partículas e do pH durante a coagulação ácida no leite integral e desnatado (n=3).

Tempo de coagulação (minutos)	d <sub>10</sub> (µm)		d <sub>50</sub> (µm)		d <sub>90</sub> (µm)		pH	
	Integral	Desnatado	Integral	Desnatado	Integral	Desnatado	Integral	Desnatado
0	0,33 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,44 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,03 <sup>a</sup>	5,40 ± 0,18 <sup>a</sup>	2,17 ± 0,09 <sup>a</sup>	6,57 ± 0,21 <sup>a</sup>	6,65 ± 0,23 <sup>a</sup>
60	0,34 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,00 <sup>a</sup>	3,25 ± 0,17 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,02 <sup>a</sup>	5,33 ± 0,03 <sup>a</sup>	3,19 ± 1,53 <sup>a</sup>	6,44 ± 0,07 <sup>a</sup>	6,42 ± 0,04 <sup>ab</sup>
120	0,49 ± 0,77 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,00 <sup>a</sup>	3,48 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,03 <sup>a</sup>	5,17 ± 0,57 <sup>a</sup>	1,76 ± 0,56 <sup>a</sup>	6,35 ± 0,17 <sup>a</sup>	6,32 ± 0,14 <sup>ab</sup>
180	3,56 ± 1,51 <sup>a</sup>	0,59 ± 0,88 <sup>a</sup>	6,69 ± 5,42 <sup>a</sup>	1,21 ± 1,82 <sup>a</sup>	28,58 ± 2,84 <sup>b</sup>	2,15 ± 0,01 <sup>a</sup>	6,02 ± 0,40 <sup>a</sup>	6,03 ± 0,23 <sup>b</sup>
240	9,58 ± 4,37 <sup>b</sup>	13,80 ± 2,80 <sup>b</sup>	34,08 ± 7,99 <sup>b</sup>	31,39 ± 7,65 <sup>b</sup>	54,58 ± 9,08 <sup>c</sup>	55,61 ± 0,90 <sup>b</sup>	5,23 ± 0,40 <sup>b</sup>	5,20 ± 0,37 <sup>c</sup>
300	15,56 ± 1,83 <sup>c</sup>	21,42 ± 2,12 <sup>c</sup>	39,20 ± 2,78 <sup>b</sup>	46,78 ± 1,26 <sup>c</sup>	68,25 ± 4,59 <sup>c</sup>	74,81 ± 2,98 <sup>c</sup>	4,64 ± 0,01 <sup>c</sup>	4,63 ± 0,01 <sup>d</sup>

Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey (p > 0,05). Fonte: Autores (2021).

**Tabela 2.** Dados da distribuição do tamanho das partículas e do pH durante a coagulação enzimática no leite integral e desnatado (n=3).

Tempo de coagulação (minutos)	d <sub>10</sub> (µm)		d <sub>50</sub> (µm)		d <sub>90</sub> (µm)		pH	
	Integral	Desnatado	Integral	Desnatado	Integral	Desnatado	Integral	Desnatado
0	0,30 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,37 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,72 ± 0,98 <sup>a</sup>	5,21 ± 0,04 <sup>a</sup>	3,15 ± 2,47 <sup>a</sup>	6,34 ± 0,10 <sup>b</sup>	6,27 ± 0,06 <sup>b</sup>
10	38,43 ± 28,71 <sup>b</sup>	68,50 ± 18,05 <sup>b</sup>	314,92 ± 155,21 <sup>b</sup>	402,58 ± 175,84 <sup>b</sup>	813,48 ± 338,10 <sup>b</sup>	1124,38 ± 196,51 <sup>b</sup>	6,22 ± 0,05 <sup>ab</sup>	6,16 ± 0,05 <sup>ab</sup>
20	31,04 ± 5,25 <sup>ab</sup>	50,91 ± 8,50 <sup>b</sup>	88,01 ± 12,19 <sup>a</sup>	135,56 ± 43,97 <sup>a</sup>	557,05 ± 244,49 <sup>ab</sup>	683,83 ± 39,82 <sup>b</sup>	6,21 ± 0,05 <sup>ab</sup>	6,16 ± 0,04 <sup>ab</sup>
30	36,87 ± 3,71 <sup>b</sup>	55,50 ± 5,29 <sup>b</sup>	121,06 ± 24,88 <sup>a</sup>	150,47 ± 26,57 <sup>a</sup>	472,08 ± 140,43 <sup>ab</sup>	875,18 ± 200,11 <sup>b</sup>	6,20 ± 0,05 <sup>a</sup>	6,16 ± 0,04 <sup>a</sup>
40	39,26 ± 7,68 <sup>b</sup>	57,32 ± 5,56 <sup>b</sup>	121,30 ± 23,28 <sup>a</sup>	155,43 ± 27,65 <sup>a</sup>	853,82 ± 207,13 <sup>b</sup>	875,68 ± 254,63 <sup>b</sup>	6,19 ± 0,05 <sup>a</sup>	6,15 ± 0,05 <sup>a</sup>

Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey (p > 0,05). Fonte: Autores (2021).

No entanto, é possível observar na Tabela 1, que na faixa de pH entre 6,0-5,2 ocorreram as mudanças mais significativas entre os tamanhos das partículas, sendo essa faixa coincidente também com o tempo entre 180-240 minutos de coagulação. Ao observar a distribuição  $d_{10}$  confirma-se a grande sensibilidade que ocorre nessa faixa, pois os tamanhos das partículas quase triplicam (aumento de 2,69 vezes) para o leite integral e para o leite desnatado a mudança foi mais significativa (23,38 vezes). Pois nessa faixa os tamanhos das partículas passam de  $3,56 \pm 1,51$  para  $9,58 \pm 4,37$  e  $0,59 \pm 0,88$  para  $13,80 \pm 2,80$ , para os leites integral e desnatado, respectivamente. Dessa forma, essa região de pH entre 6,0-5,2 deve ser monitorada pela indústria ao longo do processo de coagulação ácida, visto que as mudanças microestruturais são bem significativas. Inclusive o pH 5,2 é um ponto em que ocorre um aumento da velocidade de acidificação independente da temperatura de incubação trabalhada como demonstrado também pelos autores Tarapata et al. (2021).

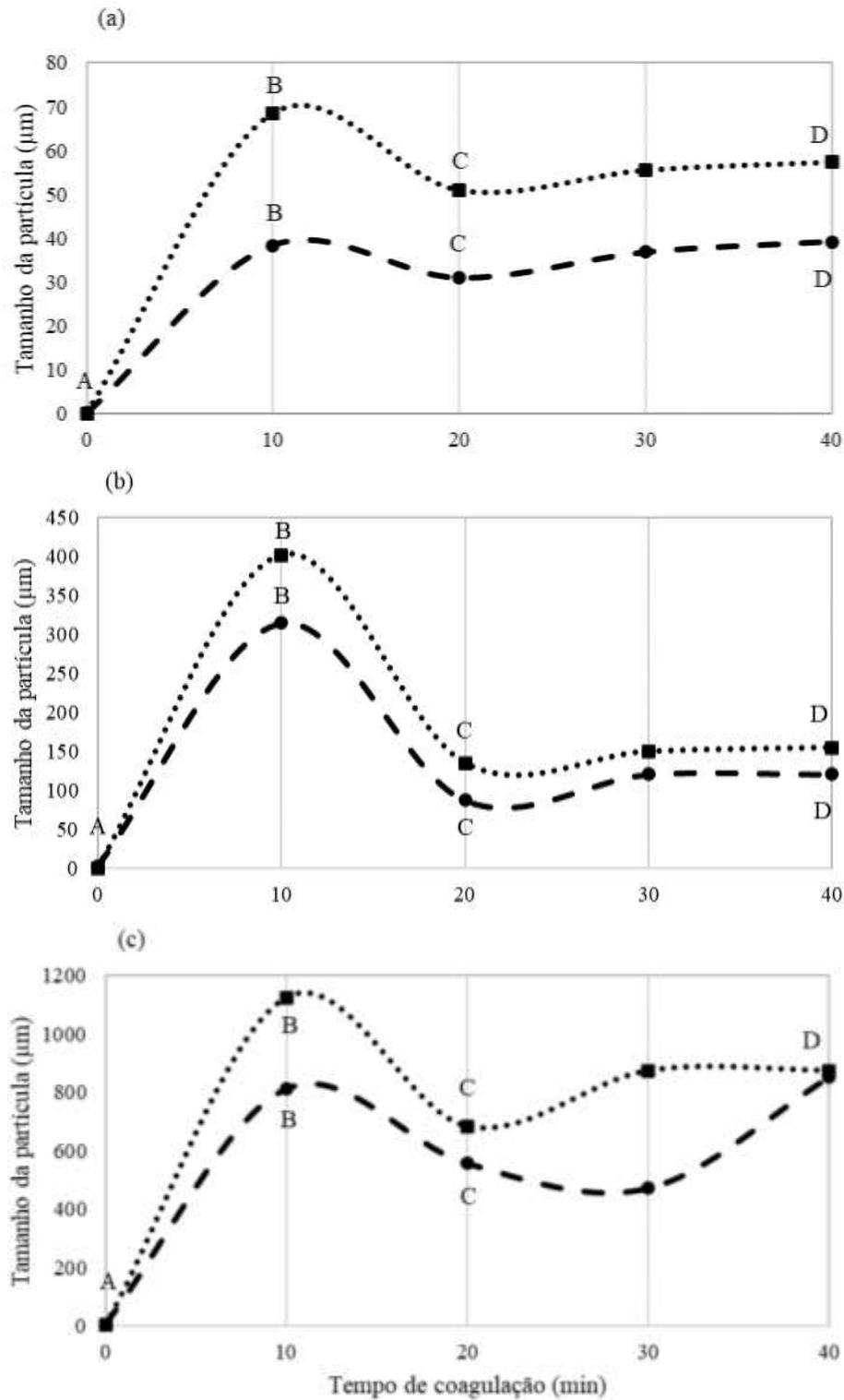
Ao avaliar-se a coagulação enzimática (Tabela 2) nota-se que as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) iniciam-se após 10 minutos de coagulação para ambos os leites. Essa modificação de forma rápida também foi observada em um estudo realizado por Leite Junior et al. (2017) para a análise reológica. No entanto, como demonstrado por esses autores o início do processo de coagulação é dependente da quantidade de proteínas e porcentagem de enzima utilizada (Leite Júnior, Tribst & Cristianini, 2017). O tempo de coagulação enzimática aumenta à medida que diminui a concentração de enzima, isso para uma mesma concentração de proteína, assim os autores identificaram que para um teor de proteína de 3,0% (valor médio da proteína encontrada no leite) os tempos são de 11,47; 16,66 e 25,74 min, considerando uma porcentagem de enzima de 0,07; 0,05 e 0,03 %, respectivamente (Leite Junior et al., 2017). Dessa forma, como foi utilizado uma concentração mais alta de enzima (0,08 %) neste presente estudo, é coerente que o tempo para o início do processo de coagulação seja menor que 11,47 min. E por conseguinte, também se identifica neste estudo modificações no tamanho das partículas em todas as distribuições com apenas 10 minutos.

O processo de coagulação enzimático envolve três etapas, hidrólise, agregação e reticulação (Brulé & Maubois, 2018). E geralmente, estudos que realizam o monitoramento do processo de coagulação, dividem os gráficos em 3 regiões, de forma a destacar cada uma dessas fases. Com isso, foi construído a Figura 2, que consiste nos dados obtidos para ambos os leites em cada uma das distribuições.

Com base na Figura 2, observa-se essas etapas avaliando a formação do gel pela análise de distribuição do tamanho das partículas. O comportamento observado neste estudo, em todas as distribuições, foi similar a análise de espectroscopia do infravermelho próximo (NIR) realizado pelos autores Leite Junior et al. (2017), onde inicialmente temos um aumento brusco (região A-B), seguido por um declínio (região B-C) e novamente um leve aumento (região C-D).

O processo que ocorre entre a região A-B, assim como observado em outros estudos (Leite Junior, Tribst & Cristianini, 2017; Castillo et al., 2003; Lyndgaard et al., 2012) provavelmente se deve ao início do processo de desestabilização da caseína e início da liberação de CMP no meio, caracterizando o início do processo de hidrólise. Em estudo realizado por Dwyer et al. (2005), utilizando análise ultrassônica, os autores sugeriram que nesse momento ocorre uma redução no diâmetro da caseína em torno de 20 nm, no entanto, essa variação não foi observada na análise de LS, assim como os autores Freitas et al. (2019), não observaram essa modificação utilizando técnicas de Microscopia de Força Atômica (AFM) e Espalhamento de luz dinâmico (DLS).

**Figura 2** Distribuição do tamanho das partículas durante a coagulação enzimática no leite integral (---) e desnatado (·····)(n=3). Onde (a) representa a distribuição d<sub>10</sub>, (b) representa a distribuição d<sub>50</sub> e (c) representa a distribuição d<sub>90</sub>.



Fonte: Autores (2021).

A segunda fase do processo de coagulação enzimática, agregação das micelas de caseína, inicia após o ponto C. Onde tem-se a redução entre o ponto B e C, que foi caracterizado por um ombro, que se dá devido a desaceleração do processo de hidrólise, ou seja, redução da liberação de CMP no meio e início da desestabilização estérica e eletrostática das micelas de caseína (Leite Júnior, Tribst & Cristianini, 2017; Nicolau et al., 2015). O processo de redução de liberação de CMP no meio foi observado por Sørensen et al. (2019) em que até os 10 primeiros minutos de adição do coágulo ao leite têm-se uma liberação grande de CMP, partindo de 0,04 e chegando quase a 0,14 o conteúdo relativo de CMP no meio. No entanto, nos próximos 10 minutos essa liberação praticamente não aumenta, e têm-se nos 20 minutos de coagulação um valor um pouco superior a 0,14 de conteúdo relativo de CMP no meio (Sørensen et al., 2019). O ombro formado na distribuição  $d_{50}$  foi superior ao formado nas outras distribuições  $d_{90}$  e  $d_{10}$ , com redução dos tamanhos das partículas entre o ponto B-C de 3,57 e 2,87 vezes; 1,46 e 1,64 vezes; 1,23 e 1,34 vezes, respectivamente para os leites integral e desnatado. A formação do ombro é uma característica observada por alguns autores ao realizarem o acompanhamento do processo de coagulação enzimática utilizando a análise de NIR (Leite Júnior et al., 2017; Arango et al., 2012;) e Turbiscan LAB (Bauland et al., 2020).

A região entre os pontos C-D, representa o processo de agregação das micelas de caseína, e nesse ponto observa-se uma diferença entre o leite integral e desnatado. Pois na distribuição  $d_{90}$  têm-se inicialmente uma pequena redução e depois o aumento para o leite integral, diferente do leite desnatado em que em todas as distribuições observa-se um mesmo comportamento em que se tem um leve aumento entre os pontos C e D da curva. O processo de coagulação enzimática envolve várias etapas e conseqüentemente várias transformações estruturais no leite, que passa da sua forma líquida para a forma de gel, no fim do processo. E ao realizar o acompanhamento desse processo por várias técnicas nota-se que ocorre a redução do potencial zeta, saindo de -26,6 mV para -21 mV (Freitas et al., 2019), os tamanhos das partículas aumentam de 230 nm para 5000 nm (Freitas et al., 2019), o módulo de armazenamento ( $G'$ ) sai de 0 para 14,6 Pa (Leite Júnior et al., 2017). Esses são só alguns dados referentes ao processo de coagulação enzimática, sendo que os mesmos podem variar em relação ao leite utilizado, a metodologia utilizada (como por exemplo, enzima, tempo e temperatura). Por isso a importância de se observar o processo de coagulação enzimática utilizando uma mesma metodologia para o leite integral e desnatado e assim possibilitar a comparação entre os dados obtidos. E com base nos dados obtidos neste estudo, vê-se que a magnitude dos tamanhos das partículas em todas as distribuições foi maior para o leite desnatado em relação ao leite integral. Isso pode ser devido a maior disponibilidade das caseínas nesse tipo de leite, formando interações entre as proteínas mais forte e conseqüentemente, gerando agregados maiores e mais resistentes, visto que ao analisar esses agregados num meio em constante agitação se mantém maior ao final da análise.

Além disso, se comparar os valores finais dos tamanhos das partículas na coagulação ácida e enzimática partindo de um mesmo leite, vê-se que as magnitudes dos tamanhos das partículas foram muito maiores na coagulação enzimática. Analisando a distribuição  $d_{90}$ , por exemplo, têm-se uma magnitude cerca de 12 vezes maior para a coagulação enzimática em relação a ácida para ambos os leites, pois apresenta um tamanho de partícula de 853,82 e 68,25  $\mu\text{m}$  para o leite integral na coagulação enzimática e ácida, respectivamente, e 875,38 e 74,81  $\mu\text{m}$  para o leite desnatado na coagulação enzimática e ácida, respectivamente. Esses dados reforçam mais uma vez que se pode relacionar os tamanhos das partículas com a força de interação que gera os agregados. Pois como já é de conhecimento, as interações formadas na coagulação ácida são do tipo eletrostáticas e hidrofóbicas, gerando agregados mais frágeis (Brulé & Maubois, 2018), e que conseqüentemente se rompem mais facilmente sobre agitação dentro do analisador de partículas. Enquanto que na coagulação enzimática ocorre a formação de cadeias moleculares conectadas por meio de interações hidrofóbicas, seguidas pela solidificação através de ligações

cruzadas com o cálcio livre (Lucey, 2011; Brulé & Maubois, 2018; Leite Júnior et al., 2017), formando conseqüentemente géis mais fortes que não se rompem tão facilmente durante a análise, mantendo o tamanho do agregado.

#### **4. Conclusão**

A análise do tamanho das partículas se mostrou interessante para o monitoramento do processo de coagulação enzimática, com resultados semelhantes a outros obtidos na literatura utilizando outras análises. Com essa análise foi possível observar que os géis obtidos pela coagulação ácida ou enzimática, bem como utilizando o leite integral ou desnatado, apresentaram diferenças no tempo de coagulação e na distribuição do tamanho das partículas. O  $d_{90}$  se mostrou mais eficiente para o monitoramento de ambos os processos de coagulação. Pois apresentou na coagulação ácida para o leite integral um ponto antes o início da agregação, e na coagulação enzimática, nos mostrou diferenças entre o leite integral e desnatado na região C-D da Figura 3. Sendo dessa forma mais significativa para o monitoramento da coagulação, pois nos mostra melhor as diferenças entre os pontos durante o processo, visto que também representa 90 % do volume das partículas presentes no meio.

Para o processo de coagulação ácida foi observada que a região entre o pH 6,0-5,2 é uma região sensível as mudanças microestruturais para ambos os leites, integral e desnatado. Sendo que nessa região se iniciam as mudanças significativas entre as amostras, região referente ao tempo de 180-240 minutos de coagulação. Dessa forma, essa região também deve ser monitorada pelas indústrias de alimentos.

O processo de coagulação enzimática inicia a formação de géis antes de 10 minutos de coagulação, e com os dados obtidos foi possível observar de forma clara as etapas do processo (hidrólise, agregação e reticulação). E assim como outras análises que foram utilizadas para o monitoramento do processo de coagulação observou-se que utilizando a análise de tamanho de partículas também ocorre a formação de um ombro, que caracteriza a redução do processo de hidrólise, e conseqüentemente, redução da liberação de CMP no meio.

Ao comparar os dois processos de coagulação para a distribuição  $d_{90}$ , os géis da coagulação enzimática apresentaram agregados cerca de 12 vezes maiores que os géis da coagulação ácida. Isso demonstrou que as forças de interações para a formação dos agregados são muito maiores na coagulação enzimática, visto que se mantém firme durante a análise em um meio em constante agitação. Da mesma forma, os agregados formados utilizando leite desnatado apresentaram valores finais em todas as distribuições maiores que o leite integral. Possivelmente relacionado ao fato da caseína, proteína majoritária, estar mais disponível no meio reacional para que ocorra a desestabilização do sistema em ambos os tipos de coagulação, formando assim agregados mais fortes e conseqüentemente, maiores.

Ainda que os resultados obtidos no presente estudo se mostrem importantes e promissores no que se refere ao monitoramento da coagulação ácida e enzimática, é importante que pesquisas futuras explorem e se aprofundem mais em relação às forças de interação presentes em cada uma das coagulações, a fim de relacionar de forma analítica o tamanho das partículas maiores para o leite desnatado em comparação ao leite integral. Além disso, correlacionar também esses resultados com medidas práticas utilizadas na indústria de alimentos como o perfil de textura. Por fim, novos estudos também devem dimensionar a representatividade dos resultados aqui obtidos para uma escala industrial.

#### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasília, DF, Brasil, Código financeiro 001), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, DF, Brasil) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Belo Horizonte, MG, Brasil).

## Referências

- Arango, O., Trujillo, A. J. & Castillo, M. (2012). Influence of fat replacement by inulin on rheological properties, kinetics of rennet milk coagulation, and syneresis of milk gels. *Journal of Dairy Science*, 96, 1-13.
- Banon, S. & Hardy, J. (1992). A colloidal approach of milk acidification by glucono-delta-lactone. *Journal of Dairy Science*, 75, 935-941.
- Bauland, J., Famelart, M. H., Bouhallab, S., Jeantet, R., Roustel, S., Faiveley, M. & Croguennec, T. (2020). Addition of calcium and magnesium chlorides as simple means of varying bound and precipitated minerals in casein micelle: Effect on enzymatic coagulation. *Journal of Dairy Science*, 103, 9923-9935.
- Brar, S. K. & Verma, M. (2011). Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30 (1), 4-17.
- Brulé, G. & Maubois, J.-L. (2018). Coagulation du lait. In: Gillis, J. C. & Ayerbe, A. *Le fromage*. (4a ed.), Lavoisier, 116-136.
- Castillo, M. Z., Payne, F. A., Hicks, C. L., Laencina, J. S. & López, M. B. M. (2003). Modelling casein aggregation and curd firming in goats' milk from backscatter of infrared light. *Journal of Dairy Research*, 70, 335-348.
- de Kruijff, C.G. (1999). Casein micelle interactions. *International Dairy Journal*, 9, 183-188.
- Dwyer, C., Donnelly, L. & Buckin, V. (2005). Ultrasonic analysis of rennet-induced pre-gelation and gelation processes in milk. *Journal of Dairy Research*, 72, 303-310.
- Freitas, C. D. T., Silva, M. Z. R., Oliveira, J. P. B., Silva, A. F. B., Ramos, M. V. & Sousa, J. S. (2019). Study of milk coagulation induced by chymosin using atomic force microscopy. *Food Bioscience*, 29, 81-85.
- Leite Júnior, B. R. C., Tribst, A. A. & Cristianini, M. (2017). Comparative study among rheological, near-infrared light backscattering and confocal microscopy methodologies in enzymatic milk coagulation: Impact of different enzyme and protein concentrations. *Food Hydrocolloids*, 62, 73-82.
- Lucey, J.A., Wilbanks, D.J. & Horne, D.S. (2022). Impact of heat treatment of milk on acid gelation. *International Dairy Journal*, 125, 105222.
- Lucey, J. A. (2011). Rennet-Induced coagulation of milk. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 579-584.
- Lucey, J. A. (2002). Formation and physical properties of milk protein gels. *Journal of Dairy Science*, 85 (2), 281-294.
- Lyndgaard, C. B., Engelsen, S. B. & van den Berg, F. W. J. (2012). Real-time modeling of milk coagulation using in-line near infrared spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, 108, 345-352.
- McMahon, D. J. & Brown, R. J. (1984). Enzymic coagulation of casein micelles: A review. *Journal of Dairy Science*, 67, 919-929.
- Mimouni, A., Deeth, H. C., Whittaker, A. K., Gidley, M. J., Bhandari, B. R. (2009). Rehydration process of milk protein concentrate powder monitored by static light scattering. *Food Hydrocolloids*, 23 (7), 1958-1965.
- Nicolau, N., Buffa, M., O'Callaghan, D. J., Guamis, B. & Castillo, M. (2015). Estimation of clotting and cutting times in sheep cheese manufacture using NIR light backscatter. *Dairy Science & Technology*, 95, 495-507.
- Panikuttira, B., Payne, F. A., O'Shea, N., Tobin, J. T., O'Callaghan, D. J. & O'Donnell, C. P. (2019). Investigation of an in-line prototype fluorescence and infrared backscatter sensor to monitor rennet-induced coagulation of skim milk at different protein concentrations. *International Journal of Food Science and Technology*, 1-8.
- Roefs, S. P. F. M., Walstra, P., Dalgleish, D. G. & Horne, D. S. (1985). Preliminary note on the change in casein micelles caused by acidification. *Netherlands Milk Dairy*, 39, 119-122.
- Silva, N. N., Casanova, F., Pinto, M. S., Carvalho, A. F. & Gaucheron, F. (2019). Casein micelles: from the monomers to the supramolecular structure. *Brazilian Journal of Food Technology*, 22, e2018185.
- Sørensen, I., Le, T. T., Larsen, L. B. & Wiking, L. (2019). Rennet coagulation and calcium distribution of raw milk reverse osmosis retentate. *International Dairy Journal*, 95, 71-77.
- Tarapata, J., Lobacz, A. & Zulewska, J. (2021). Physicochemical properties of skim milk gels obtained by combined bacterial fermentation and renneting: Effect of incubation temperature at constant inoculum level. *International Dairy Journal*, 123, 105167.
- Torres, J. K. F., Stephani, R., Tavares, G. M., Carvalho, A. F., Costa, R. G. B., Almeida, C. E. R., Almeida, M. R., Oliveira, L. F. C., Schuck, P. & Perrone, I. T. (2017). Technological aspects of lactose-hydrolyzed milk powder. *Food Research International*, 101, 45-53.
- Tuinier, R. & de Kruijff, C. G. (2002). Stability of casein micelles in milk. *The Journal of Chemical Physics*, 117, 1290.
- van Hooydonk, A. C. M., Hagedoorn, H. G. & Boerrigter, I. J. (1986). The effect of various cations on the renetting of milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 40, 369-390.
- Walstra, P. (1990). On the stability of casein micelles. *Journal of Dairy Science*, 73, 1965-1979.