

# Relação Entre Psicrotróficos e Frações de Caseína do Leite Longa Vida Durante o Armazenamento

## Relationship between Psychrotrophic and Casein Fractions of Long Life Milk during Storage

Andrezza Maria Fernandes<sup>a\*</sup>; Fernanda Bovo<sup>a</sup>; Thais Santos Moretti<sup>a</sup>; Erika Peluque<sup>a</sup>; Roice Eliana Rosim<sup>a</sup>; Carlos Augusto Fernandes de Oliveira<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, SP, Brasil

\*E-mail: andrezzaaf@usp.br

Recebido: 10 de dezembro de 2011; Aceito: 3 de abril de 2012

### Resumo

As bactérias psicrotróficas podem afetar a qualidade de diversos produtos lácteos. A relação entre a contagem de psicrotróficos no leite pasteurizado e as frações de caseína do leite longa vida foi avaliada. O processo ultra alta temperatura foi conduzido de acordo com a seguinte sequência: pasteurização a 72-75 °C por 15 s, pré-aquecimento a 85 °C, esterilização a 142-145 °C por 2 s por injeção direta de vapor ao leite, remoção da água condensada, resfriamento a 70 °C, homogeneização, resfriamento a 20 °C, envase asséptico em embalagens cartonadas de 1L e armazenamento à temperatura ambiente por 120 dias. As contagens de psicrotróficos foram determinadas no leite pasteurizado por contagem padrão em placas. As frações de caseína ( $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ ) foram avaliadas no leite longa vida nos dias 8 e 120 de armazenamento por cromatografia líquida de alta eficiência. Foi observado aumento na quantidade de  $\alpha_{s2}$ -caseína e redução da  $\beta$ -caseína como porcentagem da caseína total ao final do armazenamento ( $P < 0,05$ ). Houve correlação positiva ( $P < 0,05$ ) no dia 120 de armazenamento entre psicrotróficos e a fração  $\kappa$ -caseína.

**Palavras-chave:** Bactérias. Proteólise. Laticínios.

### Abstract

*Psychrotrophic bacteria can affect the quality of several dairy products. The relationship between psychrotrophic counts in pasteurized milk and casein fractions of ultra-high-temperature (UHT) milk was evaluated. The UHT process was performed according to the following sequence: pasteurization at 72-75 °C for 15 s, pre-heating at 85 °C, sterilization at 142-145 °C for 2 s by direct steam injection into milk, removing of the condensed water, cooling to 70 °C, homogenization, cooling to 20 °C, bottling aseptically in 1-L sterile carton boxes and storage at room temperature for 120 days. Psychrotrophic counts were determined in pasteurized milk by standard plate count. Casein fractions ( $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  and  $\kappa$ ) were analyzed in UHT milk on days 8 and 120 by high performance liquid chromatography. It was observed increase in quantity of  $\alpha_{s2}$ -casein and reduction of  $\beta$ -casein as a percentage of total casein at the end of storage period ( $P < 0,05$ ). There was a positive correlation ( $P < 0,05$ ) on day 120 of storage between psychrotrophic and the  $\kappa$ -casein fraction ( $P < 0,05$ ).*

**Keywords:** Bacteria. Proteolysis. Dairy Products.

## 1 Introdução

O leite longa vida é produzido extensivamente em vários países, como França, Espanha, Portugal e Suécia<sup>1</sup>. No Brasil, a produção de leite longa vida representa aproximadamente 74% do total de leite fluido comercializado<sup>2</sup>. Portanto, mudanças nas proteínas do leite são de grande importância para a indústria de laticínios<sup>3</sup>. A proteólise do leite longa vida durante o armazenamento constitui um importante fator que influencia o tempo de prateleira<sup>4</sup> e pode causar precipitação ou gelatinização<sup>5</sup>.

O conhecimento da causa da proteólise facilita ações preventivas ou paliativas para os problemas. Como significado prático, a proteólise causada pela enzima plasmina indica que as condições de processamento ultra-alta temperatura (UAT) estão muito amenas; e a proteólise causada por proteinases bacterianas indica baixa qualidade do leite cru<sup>6</sup>. De fato, as bactérias psicrotróficas predominam em situações em que há deficiência de higiene na ordenha, problemas de

limpeza e sanitização do equipamento de ordenha, quando ocorre resfriamento marginal do leite ou quando o tempo de estocagem é muito longo<sup>7</sup>.

Os processos de pasteurização do leite eliminam a maioria dos microrganismos inicialmente presentes no leite cru. Porém, há a possibilidade de sobrevivência de microrganismos ou de enzimas produzidas por eles no leite pasteurizado, além da possibilidade de recontaminação durante o processamento do leite<sup>8</sup>. As bactérias psicrotróficas podem produzir lipases e proteases que não são destruídas pelos métodos convencionais de pasteurização<sup>9,10</sup>. A produção de enzimas hidrolíticas termorresistentes por bactérias psicrotróficas constitui uma das causas de alterações indesejáveis no leite UAT, como a gelatinização e o desenvolvimento de sabor amargo<sup>11</sup>.

Aproximadamente 80% do nitrogênio total do leite bovino é constituído de caseína. A caseína bovina pode ser classificada em quatro tipos de proteínas com diferentes propriedades:  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - e  $\kappa$ -caseína, respectivamente,

38%, 10%, 34% e 15% do total da caseína<sup>12</sup>. A proteólise das caseínas provocada por diversos fatores ocorre de acordo com diferentes predominâncias<sup>13</sup>. A consequência mais importante das mudanças nas frações de caseína do leite longa vida durante o armazenamento é a desagregação das micelas de caseína, que pode ocasionar a gelatinização do leite<sup>6</sup>. Além disso, a hidrólise da caseína pode ocasionar alterações sensoriais no leite, principalmente sabor amargo devido a peptídeos liberados<sup>14</sup>.

Um estudo avaliando a qualidade do leite cru refrigerado no Brasil revelou que o produto mantido no silo industrial não atendeu ao padrão microbiológico legal e apresentou contagens microbianas significativamente superiores às do leite mantido em tanques individuais ou coletivos, com altas contagens de psicotróficos<sup>15</sup>.

No presente estudo, a relação entre a contagem de bactérias psicotróficas no leite pasteurizado e as frações de caseína do leite longa vida produzido por injeção direta de vapor foi investigada.

## 2 Material e Métodos

Este experimento foi conduzido em um laticínio comercial localizado no Estado de São Paulo, utilizando-se quinze lotes de leite longa vida. O leite cru de mistura foi previamente testado e apresentou resultados negativos para a presença de antibióticos utilizando o teste Charm SL  $\beta$ -lactam test<sup>®</sup> (Charm Sciences Inc, Lawrence, MA, USA). A estabilidade térmica do leite cru foi avaliada misturando-se volumes iguais de leite e solução de etanol 78% (v/v), de acordo com o Instituto Adolfo Lutz<sup>16</sup>.

O leite de mistura foi previamente adicionado de citrato de sódio (0,05 kg·100 kg<sup>-1</sup> leite), pasteurizado a 72-75 °C por 15 s, resfriado e armazenado a 4 °C até o início do processamento ultra alta temperatura em um sistema Tetra Pak (Tetra Pak Ltda., São Paulo, Brasil). O leite pasteurizado foi pré-aquecido a 85 °C e em seguida esterilizado a 142-145 °C por 2 s com injeção direta de vapor. Após remoção parcial da água condensada e resfriamento a 70 °C em câmara de baixa pressão, o leite longa vida foi homogeneizado em um homogeneizador de dois estágios (22-25 MPa), resfriado a aproximadamente 20 °C e envasado assepticamente em embalagens cartonadas estéreis de 1-L. As mesmas condições foram estritamente repetidas em todos os lotes de leite estudados.

Após a pasteurização, foram coletadas, em duplicata, amostras de 500 mL de leite do tanque de equilíbrio. Cada amostra foi composta por cinco amostras individuais de 100 mL coletadas em cinco intervalos de aproximadamente 20 minutos durante a transferência do leite do tanque para o sistema de ultra-alta temperatura. As amostras de leite longa vida foram armazenadas à temperatura ambiente, coletadas e analisadas nos dias 8 e 120 de armazenamento. Os procedimentos para a coleta do leite foram repetidos 15 vezes, portanto, foram

produzidos e analisados 15 lotes de leite longa vida.

A contagem de microrganismos psicotróficos no leite pasteurizado foi realizada de acordo com os procedimentos da American Public Health Association<sup>17</sup>, após incubação a 7 °C por 10 dias.

A concentração das frações de caseína do leite foi determinada no leite cru e no leite longa vida nos dias 8 e 120 após a fabricação, por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE), de acordo com Bobe *et al.*<sup>18</sup>. Resumidamente, alíquotas contendo 500  $\mu$ L de leite foram congeladas a -20 °C. Uma solução com 0,1 M de tampão BisTris (pH 6,8), 6 M de hidrocloreto de guanidina, 5,37 mM de citrato de sódio e 19,5 mM de ditiotreitol (pH 7.0) foi adicionada diretamente às alíquotas congeladas em uma proporção de 1:1 (v:v) a temperatura ambiente. Em seguida, cada amostra foi agitada por 10 s, incubada por 1 hora a temperatura ambiente e centrifugada por 5 min. a 16.000 g em uma microcentrífuga. A camada de gordura foi removida com uma espátula. A amostra solubilizada foi diluída (1:3; v:v) com uma solução contendo 4,5 M de hidrocloreto de guanidina e solvente A, composto de acetonitrila, água e ácido trifluoroacético em proporção de 100:900:1 (v:v:v; pH 2). A concentração de proteínas do leite na solução final foi de aproximadamente 4 mg·mL<sup>-1</sup>. Os extratos finais foram armazenados a 7 °C até a análise cromatográfica, realizada no máximo cinco dias após o preparo.

A separação e a identificação das proteínas foram realizadas em sistema CLAE (Shimadzu, Hong Kong, Japan), equipado com detector UV a 220 nm e uma coluna Jupiter C<sub>18</sub> (4  $\mu$ m; 4,6 x 150 mm) (Phenomenex, Torrance, CA, EUA). As amostras foram filtradas em membrana de PTFE de 0,45  $\mu$ m (Millipore, Billerica, MA, EUA), e 20  $\mu$ L de solução foi injetada no sistema CLAE. A corrida cromatográfica foi realizada a temperatura ambiente usando as seguintes fases móveis: solvente A (acetonitrila : água : ácido trifluoroacético, 100:900:1) e solvente B (acetonitrila : água : ácido trifluoroacético, 900:100:1). O programa de gradiente foi iniciado com 25% de solvente B, gradualmente aumentando a proporção do solvente B imediatamente após a injeção da amostra [34% (4 min), 48% (11 min), 50% (13 min), 10% (17 min)] e retornando às condições iniciais após 2 min. O fluxo foi ajustado para 1,0 mL/min.

A quantificação das frações de caseína ( $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ ) nas amostras foi realizada mensurando-se as áreas dos picos das amostras e plotando contra as curvas de calibração para cada fração. Padrões purificados de  $\alpha_s$ ,  $\beta$  e  $\kappa$  caseína (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) foram diluídos em água destilada e alíquotas de cada solução foram congeladas a -20 °C. Padrões individuais de caseína foram preparados da mesma forma descrita para as amostras de leite, nas seguintes concentrações:  $\alpha_s$ -caseína: 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/mL;  $\beta$ -caseína: 0,375; 0,75; 1,50 e 3,0 mg/mL; e  $\kappa$ -caseína: 0,187; 0,375; 0,75 e 1,50 mg/mL. A proporção entre  $\alpha_{s1}$  e  $\alpha_{s2}$

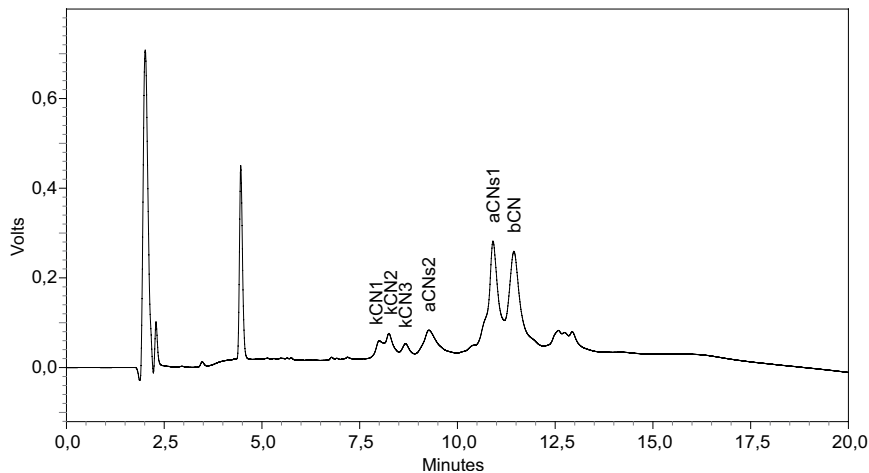
caseína foi assumida como 4:1 (p/p).

Os resultados das concentrações de frações de caseína para o leite cru e leite longa vida nos dias 8 e 120 de armazenamento foram utilizados para determinar o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) entre o log de psicotróficos e os valores de  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseína. As porcentagens das frações de caseína foram comparadas nos dias 8 e 120 de armazenamento do leite

UAT. As significâncias são baseadas em um nível de 0,05 de probabilidade.

### 3 Resultados e Discussão

Os tempos de retenção obtidos para  $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\alpha_{s2}$ -caseína,  $\beta$ -caseína e  $\kappa$ -caseína por CLAE foram 10,9 min, 9,3 min, 11,4 min e 8,3 min, respectivamente (Figura 1).



**Figura 1:** Cromatograma dos padrões de frações de caseína contendo:  $\alpha_{s1}$ -caseína (aCNs1; 3,0 mg/mL),  $\alpha_{s2}$ -caseína (aCNs2; 1,0 mg/mL),  $\beta$ -caseína (BCN; 3,0 mg/mL) e  $\kappa$ -caseína (kCN; 1,5 mg/mL).

A média das contagens de psicotróficos no leite pasteurizado utilizado para produzir os 15 lotes de leite longa vida foi de 3,32 log UFC/mL, com uma variação de 2,0 a 5,3 log UFC/mL.

As médias das frações de caseína, como porcentagem da caseína total, nos dias 8 e 120 de armazenamento do leite longa vida, estão apresentadas na Tabela 1. Nota-se que houve alteração ( $P < 0,05$ ) nas porcentagens das frações  $\alpha_{s2}$ - e  $\beta$ -caseína, com valores maiores e menores, respectivamente, no dia 120 de armazenamento.

**Tabela 1:** Médias das concentrações de frações de caseína no leite longa vida no início e fim do período de armazenamento

Dia de armazenamento	% da caseína total <sup>1</sup>			
	$\alpha_{s1}$ -caseína	$\alpha_{s2}$ -caseína	$\beta$ -caseína	$\kappa$ -caseína
8	38,45 ± 3,25 <sup>a2</sup>	6,42 ± 1,17 <sup>b</sup>	41,54 ± 2,32 <sup>a</sup>	13,59 ± 2,23 <sup>a</sup>
120	36,85 ± 5,74 <sup>a</sup>	8,29 ± 1,77 <sup>a</sup>	38,66 ± 4,39 <sup>b</sup>	16,21 ± 5,07 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Médias ± desvio padrão.

<sup>2</sup> Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ( $P = 0,05$ ).

N = 15.

A Tabela 2 apresenta as correlações entre a contagem de psicotróficos no leite pasteurizado e as concentrações de frações de caseína no leite longa vida. No dia 8 após a fabricação não foram observadas correlações significativas

( $P > 0,05$ ) para nenhuma fração analisada. No entanto, houve correlação significativa no dia 120 de armazenamento para a fração  $\kappa$ -caseína ( $P < 0,05$ ). Esta correlação positiva indica que quanto maior o número de bactérias psicotróficas no leite pasteurizado, maior foi a quantidade de frações  $\kappa$ -caseína encontradas no leite longa vida ao final da vida de prateleira.

**Tabela 2:** Correlações entre a contagem de microrganismos psicotróficos no leite pasteurizado e a concentração de frações de caseína no leite longa vida no início e fim do período de armazenamento

Fração	Dia 8		Dia 120	
	r	P	r	P
$\alpha_{s1}$ -caseína	0,01	0,97	-0,08	0,77
$\alpha_{s2}$ -caseína	0,18	0,53	0,39	0,15
$\beta$ -caseína	0,11	0,70	0,34	0,22
$\kappa$ -caseína	0,21	0,45	0,58	0,02

N = 15.

De acordo com Grieve e Kitchen<sup>13</sup> e Gassem e Frank<sup>19</sup>, há predominância na proteólise ocasionada por proteases, de acordo com a origem. Assim, proteases leucocitárias degradam, em ordem decrescente,  $\alpha_{s1}$ -,  $\beta$ - e  $\kappa$ -caseína; a plasmina degrada primeiramente  $\beta$ -, posteriormente  $\alpha_{s1}$ - e  $\kappa$ -caseína, e as proteases de psicotróficos degradam preferencialmente  $\kappa$ - e  $\beta$ -, depois  $\alpha_{s1}$ -caseína.

A correlação significativa entre a contagem de bactérias

psicrotróficas no leite pasteurizado e a fração k-caseína no leite UAT no dia 120 de armazenamento sugere que a alteração desta fração ao final do período de validade do produto pode ser atribuída à presença no leite destas bactérias ou das enzimas produzidas por elas, enquanto que as alterações nas demais frações de caseína ao longo do armazenamento sugerem a influência de outros fatores, como por exemplo, a presença de plasmina no leite.

Os resultados do presente trabalho corroboram um estudo com leite UAT, no qual se constatou aumento da proteólise no decorrer do armazenamento. Os autores indicam que esta proteólise é provavelmente relacionada à presença de proteases de bactérias psicrotróficas do leite cru, sendo que as contagens de microrganismos psicrotróficos nos leites crus utilizados para a elaboração do leite UAT foram de  $2,0 \times 10^9$  e  $4,4 \times 10^7$  unidades formadoras de colônias (UFC)/mL<sup>4</sup>.

Contrariamente, Nörnberg *et al.*<sup>11</sup> realizaram estudo no qual não houve correlação entre atividade proteolítica e contagens de psicrotróficos, apesar de terem encontrado atividade proteolítica entre 3,3 e 12,3 U/mL em leite com contagens de psicrotróficos de 6,0 a 6,5 log UFC/mL. No entanto, o trabalho citado avaliou leite cru refrigerado.

Uma ampla gama de problemas de qualidade dos produtos lácteos pode estar associada à ação de proteases e lipases de origem microbiana, como alteração de sabor e odor do leite, perda de consistência na formação do coágulo para fabricação de queijo e gelatinização do leite longa vida<sup>7</sup>. A qualidade da matéria-prima utilizada para o processamento de lácteos é fundamental para a obtenção de produtos sem ou com mínimas alterações. O presente trabalho constatou que, mesmo com um severo tratamento térmico, o leite UAT apresentou alterações em uma das frações de caseína ao final do período de validade.

#### 4 Conclusão

Os resultados obtidos permitem confirmar que a relação entre microrganismos psicrotróficos e a degradação da fração k-caseína, já estabelecida por estudos anteriores nos leites cru e pasteurizado, ocorre também no leite longa vida ao final do período de validade, apesar do tratamento térmico mais severo.

#### Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2004/01261-3, pelo apoio financeiro.

#### Referências

1. Sabcic-Europe. European producer and supplier of plastics and chemicals. [acesso em 19 abr 2011]. Disponível em [http://polymers.sabcic-europe.com/cases/\\_en/messageinabottle.htm](http://polymers.sabcic-europe.com/cases/_en/messageinabottle.htm).
2. Associação Brasileira de Leite Longa Vida. 2011. [acesso em 9 set 2011]. Disponível em <http://www.ablv.org.br>.
3. Recio I, Frutos M, Olano A, Ramos M. Protein changes in stored ultra-high-temperature-treated milks studied by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 1996;44:3955-9.
4. Vidal-Martins AMC, Salotti BM, Rossi Junior OD, Penna ALB. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. *Ciência Tecnol Alim* 2005;25:698-704.
5. Prado BM, Sombers SE, Ismail B, Hayes KD. Effect of heat treatment on the activity of inhibitors of plasmin and plasminogen activators in milk. *Int Dairy J* 2006;16:593-9.
6. Datta N, Deeth HC. Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. *Food Sci Technol* 2003;36(2):173-82.
7. Fonseca LFL, Santos MV. Qualidade do leite e controle de mastite, São Paulo: Lemos; 2000.
8. Gomes, MIFV. Alterações na qualidade do leite pasteurizado pela ação de lipase microbiana. Piracicaba: ESALQ; 1988.
9. Zall RR, Chan JH. Heating and storing milk on dairy farms before pasteurization in milk plants. *J Dairy Sci* 1981;64:1540-4.
10. Rossi Júnior OD, Vidal-Martins AMC, Salotti BM, Bürger KP, Cardozo MV, Cortez ALL. Estudo das características microbiológicas do leite UAT ao longo de seu processamento. *Arq Inst Biol* 2006;73:27-32.
11. Nörnberg MFBL, Tondo EC, Brandelli A. Bactérias psicrotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. *Acta Sci Vet* 2009;37:157-63.
12. Fox PF, Guinee TP, Cogan TM, Mcsweeney PLH. Fundamentals of cheese science. New York: Aspen; 2000.
13. Grieve PA, Kitchen BJ. Proteolysis in milk: the significance of proteinases originating from milk leucocytes and a comparison of the action of leukocyte, bacterial and natural milk proteinases on casein. *J Dairy Res* 1985;52:101-12.
14. Lemieux L, Simard RE. Bitter flavour in dairy products. 1. A review of the factors likely to influence its development, mainly in cheese manufacture. *Int Dairy J* 1991;71:599-636.
15. Pinto CLO, Martins ML, Vanetti MCD. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. *Ciênc Tecnol Aliment* 2006;26:645-51.
16. Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo: IAL; 1985.
17. American Public Health Association. Standard methods for the examination of dairy products. Washington: American Public Health Association; 1992.
18. Bobe G, Beitz DC, Freeman AE, Lindberg GL. Separation and quantification of bovine milk proteins by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 1998;46:458-63.
19. Gassem M, Frank JF. Physical properties of yogurt made from milk treated with proteolytic enzymes. *J Dairy Sci* 1991;74:1503-11.