

Termorresistência de bactéria psicrotrófica produtora de ácido isolada de leite

Rita de Cássia Gonçalves Alfenas

Universidade Federal de Viçosa - Campus Universitário, Viçosa - MG, Brasil

RESUMO. Bactéria psicrotrófica acidificante foi isolada de leite cru, em meio Agar Púrpura de Bromocresol, após incubação a 7°C por 10 dias. Células da cultura, no início da fase estacionária, foram inoculadas em leite em pó, reconstituído a 12% de sólidos totais e esterilizado, resultando em, aproximadamente, 10^8 células por mililitro. Porções de 3 ml do leite inoculado foram transferidas para tubos de borossilicato e submetidos à determinação da resistência das células a 62, 70, 75 e 80°C, pelo método do TDT tubo. As curvas de sobrevivência nas respectivas temperaturas e a curva de morte térmica foram traçadas. A bactéria apresentou um valor de $D_{75^\circ\text{C}}$ de 0,15 minutos e z igual a 8,7°C. A pasteurização pelos sistemas LTLT e HTST promoveram, respectivamente, 5,27 e 0,53 reduções decimais no número de células viáveis da bactéria. Conclui-se que a bactéria isolada neste estudo é destruída apenas pela pasteurização pelo sistema LTLT.

Palavras chave: Bactéria psicrotrófica acidificante, termorresistência, curvas de sobrevivência, curva de morte térmica.

SUMMARY. Thermoresistance of acid producing psychrotrophic bacteria isolated from milk. An acidificant psychrotrophic bacteria was isolated from raw milk from Bromocresol Purple Agar medium, after incubation at 7°C, for 10 days. Cells from the culture, at the beginning of the stationary phase, were inoculated sterilized in powder milk, reconstituted at 12% of total solids, resulting in approximately 10^8 cells per milliliter. Portions of 3 ml of inoculated milk were transferred to borosilicate tubes and were submitted to cells resistance determination at 62, 70, 75 and 80°C, by the TDT tube method. The survival curves at the respective temperatures and the curve of thermal death were drawn. The bacteria presented a $D_{75^\circ\text{C}}$ value of 0.15 minutes and $z = 8,7^\circ\text{C}$. Treatments LTLT and HTST of pasteurization promoted 5,27 and 0,53 decimal reductions in the number of available bacteria cells, respectively. The conclusion of this study was that the isolated bacteria is destroyed only by the treatment LTLT of pasteurization.

Key words: Acidificant psychrotrophic bacteria, thermoresistance, survival curves, curve of thermal death.

INTRODUÇÃO

Com o uso da refrigeração, a vida-de-prateleira do leite é aumentada por reduzir a taxa de multiplicação de organismos mesófilos, como as bactérias do ácido láctico. Entretanto, a estocagem do leite sob refrigeração por longos períodos tem resultado em novos problemas de qualidade, para a indústria de laticínios, relacionados com o crescimento e atividade metabólica dos microorganismos psicrotróficos (1-5). Psicrotróficos gram-negativos dos gêneros *Pseudomonas* (6), *Achromobacter*, *Alcaligenes* e *Enterobacter* são comumente isolados de leite refrigerado (7). Algumas espécies de psicrotróficos são patogênicas, além de poderem reduzir a vida-de-prateleira de produtos refrigerados.

Psicrotróficos patogênicos como *Bacillus cereus* (8,9), *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e *Escherichia coli* O157:H7 são considerados importantes em alimentos, incluindo produtos lácteos, estocados à temperatura de refrigeração industrial, inferior a 4,4°C (10).

Ao crescerem em leite, essas bactérias podem produzir enzimas extracelulares extremamente termoestáveis (11). As lipases (5,12) e proteases (13-19), mesmo em baixas

concentrações, são capazes de degradar gordura e proteína no leite e em produtos lácteos estocados sob refrigeração (20-23) resultando na redução da vida-de-prateleira dos mesmos. As proteases são mais termoestáveis do que as lipases. Ao serem produzidas em leite cru, suportam temperaturas ultra elevadas de esterilização, podendo deteriorar rapidamente o leite, resultando no desenvolvimento de sabor amargo ou de coagulação doce (24, 25).

Os psicrotróficos produtores de ácido são capazes de coagular o leite mantido sob refrigeração. Em estudo realizado por Juven et al., foi observado a coagulação do leite cru, após a inoculação com várias espécies de psicrotróficos pertencentes à família Enterobacteriaceae, e incubação a 7°C por 7 dias (2).

Silva verificou um aumento de, aproximadamente, dois ciclos logarítmicos no número de bactérias acidificantes em leite cru estocado por 72 horas a 5°C (26). Ensaios preliminares têm demonstrado a presença de psicrotróficos produtores de ácido no leite cru, leite pasteurizado tipo "A" e leite pasteurizado com 3% de gordura.

Enquanto nos países europeus e nos Estados Unidos a deterioração do leite ocorre devido a atividade proteolítica e

lipolítica de bactérias psicrotróficas, em outros países como o Brasil a deterioração se dá primeiramente por acidificação, resultando na redução do prazo de validade do leite de consumo. Entre outros fatores, isso se deve à diferença na qualidade microbiológica do leite cru, em número e tipo de bactéria, já que o sistema de pasteurização é basicamente o mesmo. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar o tratamento térmico para a destruição de psicrotróficos acidificantes, visando melhorar a qualidade e aumentar o prazo de validade desse leite de consumo.

MATERIAL E MÉTODOS

A bactéria psicrotrófica acidificante Lc32, utilizada nesse estudo, foi isolada pelo método de "pour plate" em Agar Púrpura de Bromocresol, após incubação a 7°C por 10 dias. Essa bactéria apresentou colônias com halo amarelo maior e também a capacidade de acidificar amostras de leite contendo 10³ células por mililitro e mantidas a 7°C e 25°C mais rápido que as demais bactérias isoladas sob as mesmas condições.

Células da bactéria Lc32, no início da fase estacionária de crescimento, foram inoculadas em 3,0 ml de leite esterilizado reconstituído a 12% contidos em tubos de borossilicato (10 mm de diâmetro interno), com tampa rosqueável de baquelite. Cada tubo foi inoculado com, aproximadamente, 10⁸ células por mililitro de leite, conforme método descrito pela "National Canners Association" (27). O número inicial de células foi determinado, por meio da contagem direta ao microscópio e confirmado por contagem em placas, utilizando meio PCA com incubação a 25°C por 48 horas.

Logo após a incubação, os tubos foram transferidos para banho de gelo. A seguir, os mesmos foram pré-aquecidos em banho a 90°C até atingir as temperaturas dos tratamentos, sendo então transferidos para banhos com temperaturas de 62, 70, 75 e 80°C. Em intervalos de tempo, previamente estabelecidos para cada temperatura de tratamento, uma série de três tubos foi retirada e transferida para banho à temperatura ambiente e, em seguida, para banho de gelo. Os tempos de tratamentos utilizados no experimento foram os seguintes: 15, 25, 35, 45 e 55 minutos a 62°C; 30, 50, 70, 90 e 110 segundos a 70°C; 4, 8, 12, 16 e 20 segundos a 75°C e 2, 5, 8, 11 e 14 segundos a 80°C. Após o resfriamento a temperatura inferior a 10°C, foram feitas diluições adequadas em tampão citrato 1,25%. O número inicial e número de sobreviventes foram determinados por contagem em placas em PCA, após incubação a 25°C por 48 horas.

Foram traçadas as curvas de sobrevivência para cada temperatura. Os dados foram ajustados por meio de regressão linear, segundo a equação $Y = aX + b$, em que Y é igual ao logaritmo decimal do número de sobreviventes e X é o tempo de exposição à temperatura de tratamento. Foram calculados os tempos de redução decimal (D) para cada temperatura. A curva de morte térmica ("Phantom") foi obtida marcando-se em gráfico os valores de D em função das temperaturas de

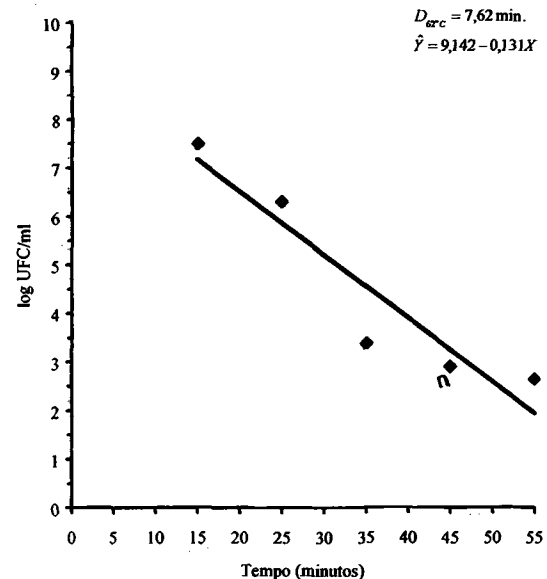
tratamento. Os dados foram ajustados por regressão linear, segundo a equação $Y = aX + b$, em que Y é igual ao log¹⁰ D e X a temperatura de tratamento em °C. O valor de z foi calculado a partir dos dados da curva de morte térmica.

A eficiência da pasteurização do leite pelos sistemas HTST e LTLT foi calculada dividindo-se os tempos de tratamento pelos respectivos valores de D, calculados da curva de morte térmica, em cada temperatura e os resultados expressos em número de reduções decimais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de D, calculados a partir das curvas de sobrevivência (Figuras 1 a 4), indicam que o psicrotrófico acidificante Lc32 é, consistentemente, mais termorresistente que a *Coxiella burnetti*. Enquanto o isolado Lc32 apresenta D_{65,5°C} correspondente a 2,9, o valor equivalente ao D_{65,5°C} para esse patógeno varia de 0,5 a 0,6 (28).

FIGURA 1
Curva de sobrevivência do psicrotrófico acidificante Lc32 em leite a 62°C



O valor z calculado a partir da curva de morte térmica foi de 9,2°C (Figura 5), indicando maior termorresistência do que a *Listeria monocytogenes* F5069, estudada por Donneley e Briggs (1986), que apresentou z de 4,3°C (29). Os dados de D, obtidos a partir da equação dessa curva ($Y = 7,5687 - 0,1085X$) podem ser utilizados como parâmetros de comparação com os valores de D de outras bactérias.

A pasteurização pelos sistemas LTLT e HTST promovem reduções decimais do isolado Lc32 equivalentes a 5,27 e 0,53, respectivamente. O tratamento a 75°C por 15 segundos, muito usado nas indústrias de laticínios do Brasil, resulta em 0,93 redução decimal da bactéria Lc32. Como a eficiência média da pasteurização corresponde a de três a quatro reduções decimais,

em termos de microbiota total do leite, considera-se apenas a pasteurização pelo sistema LTLT como eficiente na destruição do psicrotrófico acidificante Lc32.

FIGURA 2

Curva de sobrevivência do psicrotrófico acidificante Lc32 em leite a 70°C

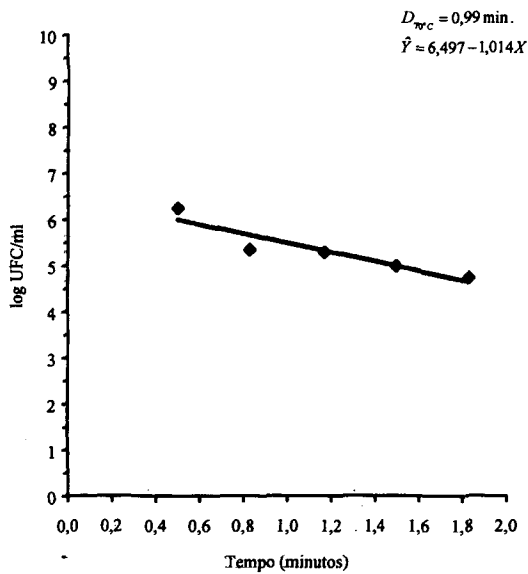


FIGURA 3

Curva de sobrevivência do psicrotrófico acidificante Lc32 em leite a 75°C

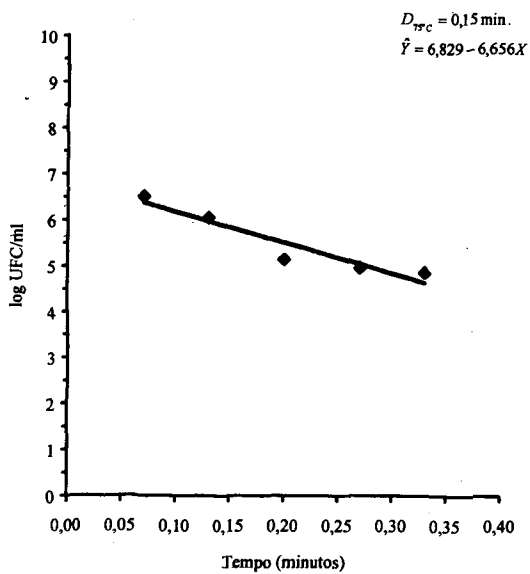


FIGURA 4

Curva de sobrevivência do psicrotrófico acidificante Lc32 em leite a 80°C

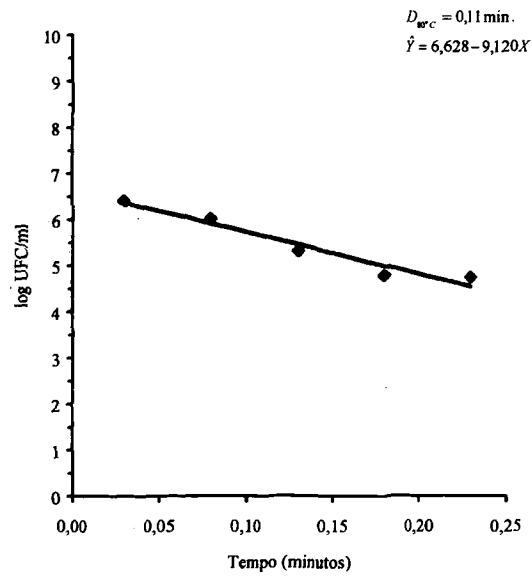
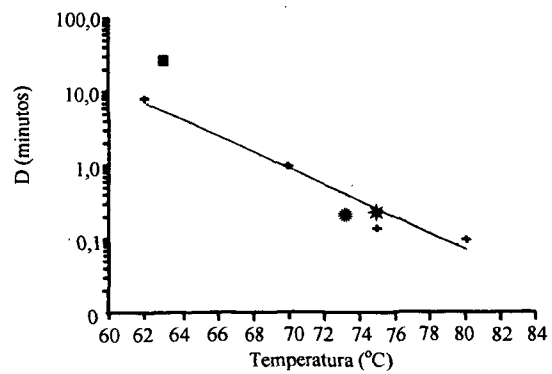


FIGURA 5

Curva de destruição térmica do psicrotrófico acidificante Lc32



Equação: $\hat{Y} = 7,5687 - 0,1085X$

Y = D (minutos)

X = Temperatura (°C)

Z = $\hat{9},2^{\circ}\text{C}$

■ = Pasteurização a 62,8°C/30 min (LTLT)

● = Pasteurização a 72,8°C/15 min (HTST)

* = Pasteurização a 75,0°C/15 min

+ = Dados experimentais

REFERÊNCIAS

1. Cox JM & McRae IC. Growth of psychrotrophic bacteria in raw and UHT-treated goats' milk. *J Appl Bacteriol* 1988;64: 403-7.
2. Juven BJ, Gordin S, Rosenthal I & Laufer A. Changes in refrigerated milk caused by Enterobacteriaceae. *J Dairy Sci* 1981;64: 1781-4.
3. Suarez B & Ferreirós CM. Psychrotrophic flora of raw milk: resistance to several common disinfectants. *J Dairy Sci Res* 1991;58: 127-36.
4. Smiyhwell N & Kailasapathy K. Psychrotrophic bacteria in pasteurised milk: problems with shelf life. *Aust J Dairy Technol.* 1995;50 (1): 28-31.
5. McKay DB, Dieckelmann M & Beacham IR. Degradation of triglycerides by a pseudomonad isolated from milk: The roles of lipase and esterase studied using recombinant strains over-producing, or specifically deficient in these enzymes. *J Appl Bacteriol.* 1995;78 (3): 216-23.
6. Griffiths MW. Thermostability of proteases and lipases of a number of species of psychrotrophic bacteria of dairy origin. *J Bacteriol.* 1981;50:289-303.
7. Robinson RK. Dairy microbiology; The microbiology of milk. London. Applied Science Publishers, 1981. V.1, 163p.
8. Granum PE, Brynestad S & Kramer JM. Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. *Int Food Microbiol.* 1993;17 (4): 269-79.
9. Sutherland AD. Toxin production by *Bacillus cereus* in dairy products. *J Dairy Res.* 1993;60 (4): 569-574.
10. Corlett Junior DA. Refrigerated foods use of hazard analysis and critical control point principles. *Food Technol.* 1989;43: 91-4.
11. Uplacksh VK, Mathur DK & Malik RK. Thermal resistance of partially purified proteinase of *Pseudomonas fluorescens* P-26. *J Appl Bacteriol.* 1994;76 (4): 356-60.
12. Muir DD. The shelf-life of dairy products: 1. Factors influencing raw milk and fresh products. *J Soc Dairy Technol.* 1996;49 (1): 24-32.
13. Plar R, Carretero C, Mor-Mur M & Guamis B. Refrigeration of milk on farms. Phicochemical changes. *Alimentaria.* 1992;29 (238):19-22.
14. Collins SJ, Bester BH & McGill AEL. Influence of psychrotrophic bacterial growth in raw milk on the sensory acceptance of UHT skim milk. *J Food Prot.* 1993;56 (3):418-25.
15. Cox JM. The significance of psychrotrophic pseudomonas in dairy products. *Aust J Dairy Technol.* 1993;48 (2):108-113.
16. Meer RR, Wodburn MJ & Bodyfelt FW. Identification and characterization of heat-resistant psychrotrophic bacteria in Oregon grade A raw milk. *Dairy Food and Environmental Sanitation.* 1993;13 (11): 631-7.
17. Picard C, Plard I, Rongdaux-Gaida D & Collin JC. Detection of proteolysis in raw milk stored at low temperature by an inhibition ELISA. *J Dairy Res.* 1994;61(3): 395-404.
18. Shah NP. Psychrotrophs in milk: a review. *Milchwissenschaft.* 1994;49 (8): 432-7.
19. Stepaniak L, Sorhaug T & Fox PF. Thermal denaturation of bacterial enzymes in milk. *Heat-induced-changes-in-milk.* 1995. Ed. 2, 349-363.
20. West FB. Inactivation of heat resistant proteases in normal ultra-high temperature treatment. *J Dairy Sci.* 1979;61:1078-84.
21. Collins EB. Heat resistant psychrotrophic microorganisms. *J Dairy Sci.* 1981;64:157-60.
22. Cromie S. Psychrotrophs and their enzymes residues in cheese milk. *Aust J Dairy Technol.* 1992;47(2): 96-100.
23. González I, Martín R, García T, Morales P, Sanz B & Hernández PE. A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of *Pseudomonas fluorescens* and related psychrotrophic bacteria in refrigerated milk. *J Appl Bacteriol.* 1993;74 (4): 394-401.
24. Adams DM. Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. *J Dairy Sci.* 1975;58: 828-34.
25. Speck ML & Adams DM. Heat resistant proteolytic enzymes from bacterial sources. *J Dairy Sci.* 1976;59: 786-9.
26. Silva MH. Efeito do resfriamento e estocagem sobre alguns grupos de microorganismos e propriedades físico-químicas do leite. Viçosa, MG: UFV, 1991. 104 p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, 1991.
27. Nacional Canners Association - N.C.A. Laboratory manual for food canners and processors. Connecticut, 1968. V. 1: Microbiology and processing. 336p.
28. Stumbo CR. Thermobacteriology in food processing. 2 ed. New York, Academic Press, 1973, 329p.
29. Donnelly CW & Briggs EH. Psychrotrophic growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* as function of milk composition. *J Food Prot.* 1986;19(2): 994-8.

Recibido: 14-05-1998

Aceptado: 04-11-1998