

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e
Ambiente

Corso di laurea in

Scienze e tecnologie alimentari

Il fenomeno della gelificazione del latte UHT

Docente di riferimento

Prof.ssa Gabriella Pasini

Laureando

Giulio Carraro

Matricola n.

1239157

ANNO ACCADEMICO 2023 – 2024

Indice

Riassunto.....	5
Abstract.....	7
1 Il trattamento UHT.....	9
1.1 Le proteine del latte.....	10
1.2 Il trattamento di sterilizzazione.....	14
1.3 Alterazioni chimico-fisiche dovute al trattamento termico.....	16
2 La gelificazione.....	20
2.1 Introduzione al fenomeno.....	20
2.2 Gelificazione enzimatica.....	20
2.2.1 Proteolisi indotta dalla plasmina.....	21
2.2.2 Proteolisi indotta da enzimi batterici.....	25
2.2.3 Confronto delle proteolisi.....	31
2.3 Gelificazione non enzimatica.....	34
3 Fattori influenti e controllo del fenomeno.....	37
3.1 Fattori intrinseci del latte.....	37
3.2 Modalità e severità del trattamento termico.....	39
3.3 Additivi.....	39
3.4 Temperatura di stoccaggio.....	41
4 Conclusioni.....	42
5 Bibliografia.....	45

Riassunto

La richiesta internazionale di latte UHT e di bevande a base di proteine del latte sta crescendo, in quanto le sue caratteristiche ne hanno determinato una grande versatilità d'uso. La possibilità di trasportarlo con facilità e conservarlo senza la necessità di disporre di un refrigeratore lo rendono un prodotto a lunga conservazione microbiologicamente stabile. Nonostante ciò, il latte UHT è affetto da un fenomeno di deterioramento che compare durante la conservazione, la gelificazione. Questo difetto consiste in un aumento di viscosità dell'alimento fino a determinarne una consistenza gelatinosa. Inoltre, altera le caratteristiche organolettiche del prodotto, in quanto il latte diventa amaro. Inizia con dei cambiamenti chimico-fisici irreversibili ed inevitabili che sono diretta conseguenza del trattamento termico, i quali alterano la composizione della micella caseinica e delle proteine solubili; successivamente, l'insorgenza della gelificazione può essere descritta come una conseguenza di due cause differenti che spesso agiscono in sinergia tra loro (proteolisi enzimatica e non enzimatica). Diversi fattori sono in grado di rallentare o accelerare il processo, come la composizione del latte, la sua qualità microbiologica, l'intensità della proteolisi durante la conservazione, fattori stagionali, temperature di conservazione, ecc. In questo elaborato verrà descritto in modo esaustivo il fenomeno, partendo dalle caratteristiche del latte crudo fino alla comparsa e la gestione del difetto durante conservazione inoltrata.

Abstract

International demand for UHT milk and milk protein drinks is growing as its characteristics make it versatile. It is easy to transport, plus the possibility to store it without needing a cooler makes it a microbiologically stable, long-life product. Despite that, UHT milk is affected by a deterioration phenomenon that appears during storage, called age gelation. This defect consists of an increase in the viscosity of the food to a gelatinous consistency. It also alters the organoleptic characteristics of the product, as the milk becomes bitter. It begins with irreversible and inevitable chemical and physical changes which are a direct consequence of heat treatment, which alter the composition of the casein micelle and soluble proteins; subsequently, the onset of gelation can be described because of two different causes that often act in synergy with each other (enzymatic and nonenzymatic proteolysis). Several factors can slow or accelerate the process, such as the composition of milk, its microbiological quality, the intensity of proteolysis during storage, seasonal factors, storage temperatures, etc. This paper will comprehensively describe the phenomenon, starting from the characteristics of raw milk to the occurrence and management of the defect during forward storage.

1 Il trattamento UHT

Il mercato globale del latte UHT sta vivendo un'espansione significativa negli ultimi anni. L'industria si è espansa grazie alla crescente consapevolezza alimentare e alla preferenza per i prodotti igienici e sicuri da parte dei consumatori. Si prevede che il mercato globale manterrà l'attuale tendenza rialzista nei prossimi dieci anni: nel 2023 ha raggiunto un valore di circa 70 miliardi di dollari e si stima che le vendite aumenteranno e raggiungeranno i 119,792 miliardi di dollari entro il 2033. I fattori determinanti sono l'espansione demografica, l'urbanizzazione e l'aumento del reddito disponibile nelle economie emergenti. La convenienza del latte UHT e la sua crescente disponibilità attraverso le piattaforme di vendita al dettaglio online dovrebbero inoltre alimentare l'espansione del mercato (Https 1).

Il latte (da intendersi come latte vaccino) è composto da acqua per l'87% circa; contiene inoltre, in media, il 3,9% di grassi, il 3,4% di proteine e il 4,8% di lattosio. Nel latte per il consumo alimentare diretto, in Italia il contenuto di grasso è standardizzato al livello previsto per le tre tipologie commerciali: latte intero (>3,5%), parzialmente scremato (1,5-1,8%), scremato (<0,5%). I grassi, costituiti per il 98% da trigliceridi, sono presenti nel latte all'interno di globuli di diametro di 0,1-10 µm circondati da una membrana (MFGM, o Milk Fat Globule Membrane). La MFGM è costituita da più strati di fosfolipidi, ma nella sua struttura sono state identificate anche circa 40 proteine diverse. La membrana conferisce al globulo una elevata affinità con la fase acquosa circostante e ne consente una seppur temporanea stabilità in fase di emulsione. Circa il 65% degli acidi grassi contenuti nel latte è costituita da acidi grassi saturi, rappresentati principalmente dall'acido palmitico, miristico e stearico. Caratteristico del latte è anche il contenuto di specifici acidi grassi trans, tra cui soprattutto l'acido linoleico coniugato (o CLA), a 18 atomi di carbonio e con due doppi legami coniugati. La componente glucidica del latte è rappresentata quasi esclusivamente da lattosio, un disaccaride composto da glucosio e galattosio, la cui digestione da parte dell'uomo è vincolata alla presenza della lattasi, l'enzima in grado di idrolizzare il legame tra i due zuccheri rendendoli disponibili per l'assorbimento e il metabolismo. Tra i minerali presenti nel latte, oltre al calcio, vanno segnalati il fosforo, di cui il latte ne rappresenta una buona fonte; il potassio, il magnesio, lo zinco e il selenio. Il latte apporta anche vitamine idrosolubili del gruppo B (B₂ e B₁₂) e vitamine liposolubili in concentrazioni direttamente proporzionali al tenore lipidico (Marangoni *et al.*, 2017).

1.1 Le proteine del latte

Il latte vaccino contiene generalmente 30/35 g/L di proteine, comunemente suddivise in due classi sulla base della solubilità a pH 4,6: la frazione insolubile è costituita da proteine chiamate caseine e rappresenta circa l'80% delle proteine totali; la frazione rimanente è quella solubile, ed è costituita dalle proteine del siero (Fox, 2003b).

Proteine del siero

Questa classe è costituita da un certo numero di proteine presenti in proporzione differente secondo il seguente ordine decrescente: β -lattoglobulina (β -lg), α -lattoalbumina (α -la), sieralbumina, immunoglobuline e peptoni ad alto peso molecolare. A parte i peptoni, le proteine del siero sono suscettibili alla denaturazione termica; ad esempio, nella β -lg la denaturazione porta al dispiegamento della struttura e vengono così esposti i gruppi sulfidrilici (-SH). L'esposizione di questo gruppo rende la proteina reattiva, ovvero capace di formare legami con altre proteine, creando grossi complessi molecolari insolubili.

Caseine

La frazione caseinica, altamente eterogenea, comprende quattro principali proteine: α -s1, α -s2, β e κ -caseine. In quantità nettamente minore sono presenti anche le γ -caseine, che derivano da una parziale proteolisi delle β -caseine. Nel latte queste proteine sono presenti sotto forma di grandi associazioni colloidali, definite micelle caseiniche. Di forma approssimativamente sferica, sono presenti nell'ordine di 10^{14} - 10^{16} particelle per ml di latte. Hanno dimensioni comprese tra i 30 e i 600 nm e con pesi molecolari dell'ordine di 10^8 Da. Quest'ultima caratteristica le rende facilmente separabili dalle proteine del siero mediante ultracentrifugazione. La caseina α -s1 è la più carica, mentre la β -caseina è la più idrofobica. La κ -caseina è l'unica che presenta un legame glicosidico, ovvero è legata con un glucide; il che la rende una molecola anfifilica. Questa caratteristica gioca un molto importante nella formazione della micella (Fox e Brodkorb, 2008). Le micelle contengono al loro interno diversi elementi ma anche altre piccole molecole, come magnesio, sodio, potassio, citrato e particelle di fosfato di calcio colloidale. Queste ultime svolgono all'interno una funzione aggregante e sono perciò definite in inglese *nanoclusters* (nano-aggreganti); esse interagiscono con le estremità di serina-fosfato e con alcuni residui di glutammato nelle caseine α -s1 e α -s2, unendo le due proteine e formando così una struttura reticolare (figura 1.1A).

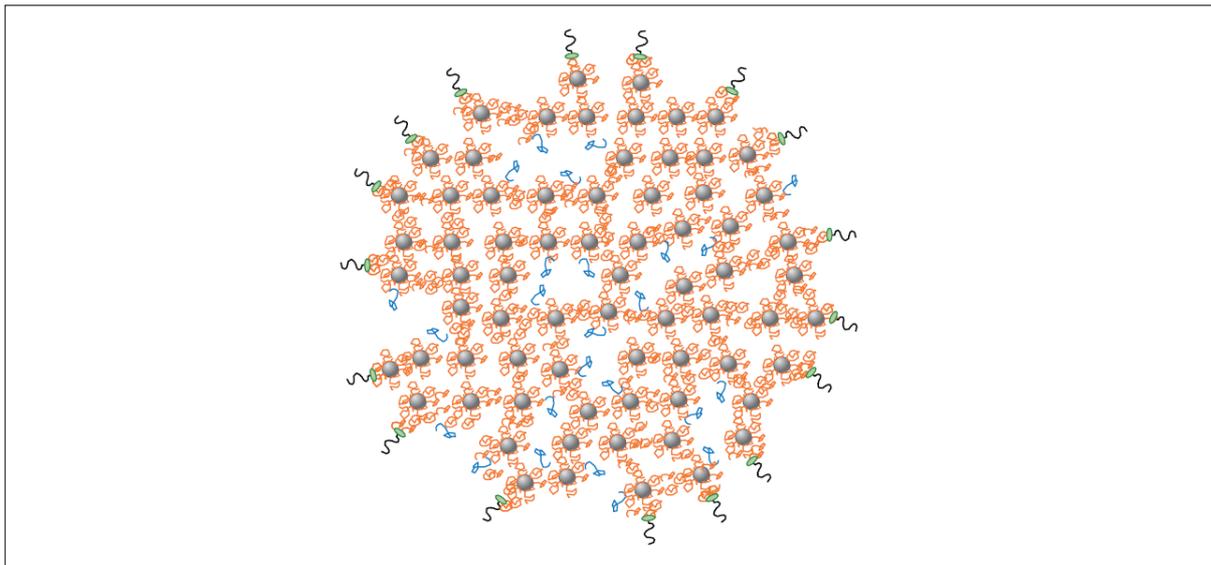


Fig. 1.1A – Rappresentazione schematica di una micella caseinica. Le sfere grigie rappresentano le particelle di calcio colloidale, le α e β caseine sono rappresentate dal colore arancione, mentre le κ -caseine sono le palline verdi poste all'esterno con la parte idrofilica di colore nero. Le parti blu rappresentano alcune β -caseine che si legano a α -caseine (Fonte: Dalgleish e Corredig, 2012).

La micella è stabilizzata e mantenuta sotto forma di sfera grazie alla κ -caseina (la quale si trova sulla superficie), dove la terminazione glicosilata (idrofila) della molecola è posta verso l'esterno dell'aggregazione delimitandone così la superficie. La struttura interna della micella è mantenuta grazie a legami ad idrogeno, interazioni idrofobiche ed elettrostatiche tra le varie caseine e i vari ioni. Il legame del calcio con le regioni cariche delle proteine modula le interazioni idrofobiche e anche i ponti di fosfato di calcio contribuiscono alla stabilità della micella stessa (Holt, 1992).

Enzimi

Nel latte bovino sono presenti almeno 60 enzimi indigeni: circa 20 di questi sono stati caratterizzati, mentre è stata dimostrata la presenza degli altri 40 attraverso la loro attività. Con poche eccezioni (ad esempio, lisozima e lattoperossidasi), gli enzimi naturalmente presenti non hanno alcun effetto benefico sugli attributi nutrizionali o organolettici del latte da un punto di vista merceologico, tanto che la loro inattivazione mediante calore è uno degli obiettivi di molti processi lattiero-caseari. La maggior parte degli enzimi ha una temperatura ottimale per la propria attività tra i 30 e 40 °C, e al di sopra di queste temperature, progressivamente denaturano e perdono la capacità di esplicare la loro funzione. Tra i principali enzimi presenti alcuni hanno maggiore importanza tecnologica rispetto agli altri, citando ad esempio la plasmina, le lipasi,

la fosfatasi alcalina e la lattoperossidasi (Deeth, 2021). La plasmina è la proteinasi indigena predominante nel latte che idrolizza le caseine senza però svolgere funzione sulle proteine del siero. Fa parte di un complesso sistema costituito dal suo precursore inattivo, il plasminogeno, il quale diviene plasmina dopo che degli attivatori enzimatici ne catalizzano la conversione (Huppertz e Kelly, 2009). Come già accennato, la maggior parte degli enzimi presenti nel latte viene inattivata a temperature inferiori di 100 °C; tuttavia esistono enzimi molto termoresistenti che rimangono funzionali a temperature superiori, come per l'appunto la plasmina (o peptidasi esogene termoresistenti sintetizzate da varie specie del genere *Pseudomonas*, ma anche da specie di altri generi, di cui se ne discuterà nel prossimo capitolo). La figura seguente (1.1B) raffigura le curve di inattivazione termica dei principali enzimi nel latte e delle peptidasi secrete dal genere batterico *Pseudomonas*.

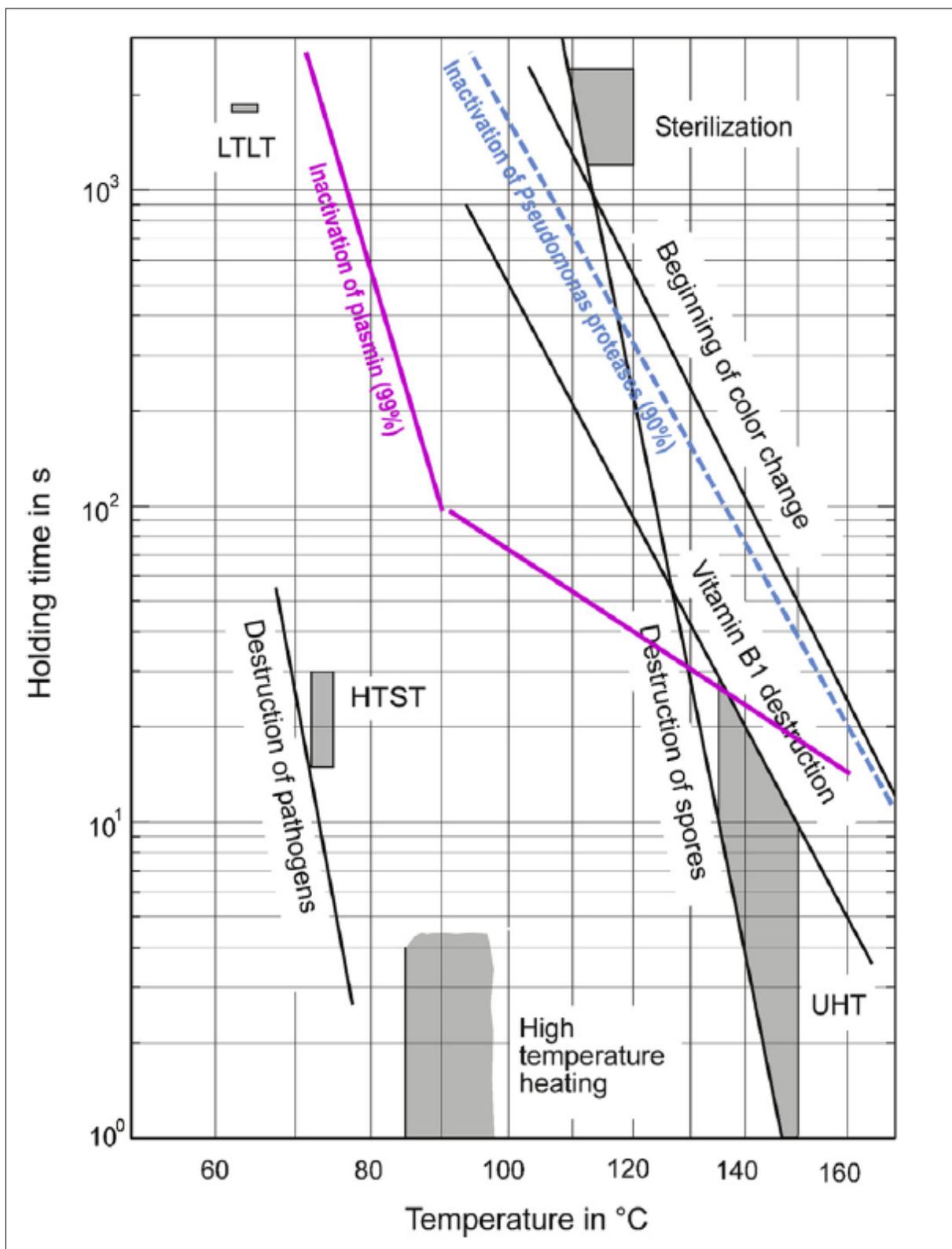


Fig. 1.1B – Varie curve di inattivazione termica nel latte. Il grafico rappresenta, oltre la relazione tempo–temperatura del trattamento termico di sterilizzazione, anche la curva di inattivazione termica della plasmina (riduce la sua attività di circa il 99%) e delle peptidasi del genere *Pseudomonas* (inattivazione del 90%). Le altre curve presenti rappresentano la pastorizzazione, la distruzione delle spore, il cambiamento di colore e la distruzione della vitamina B₁ (Fonte: Graf *et al.*, 2021).

1.2 Il trattamento di sterilizzazione

Per latte a lunga conservazione si intende quella tipologia di latte che si può conservare a temperatura ambiente per oltre tre mesi dalla data di produzione, a differenza del latte pastorizzato che ha una durata molto inferiore, nell'ordine di giorni, e comunque se conservato in frigorifero. Questa lunga *shelf life* è ottenuta tramite un particolare trattamento termico denominato UHT “*Ultra High Temperature*” dove il latte viene sottoposto per pochi secondi ad una temperatura di circa 140 °C. Questo trattamento è seguito da un confezionamento asettico che permette la lunga conservabilità di questo alimento senza aggiunta di conservanti, come richiesto dalla legge (Htpps 2). In realtà può essere conservato fino a 12 mesi, anche se, nella pratica, viene solitamente consumato molto prima. Il processo sfrutta la combinazione tempo/temperatura al fine di raggiungere la sterilità commerciale, che per legge pone come obiettivo la distruzione delle spore di *Clostridium botulinum*. Nonostante questa premessa, il *Clostridium botulinum* si trova raramente nel latte crudo, ma data la sua pericolosità per l'essere umano, è necessario che gli alimenti subiscano un processo volto ad abbassarne drasticamente (12 log) l'incidenza. I batteri sporigeni più comuni presenti nel latte crudo sono invece del genere *Bacillus*, di cui alcune specie, come *B. stearothermophilus* e *B. sporothermodurans*, formano spore altamente resistenti al calore, che non vengono distrutte con un normale processo di sterilizzazione. Questi batteri sono causa di deterioramento, ma non sono patogeni per l'uomo. Il processo UHT prevede le seguenti fasi: preriscaldamento del latte (circa 80–95 °C), mantenimento alla temperatura di preriscaldamento, riscaldamento alla temperatura di sterilizzazione, mantenimento alla temperatura di sterilizzazione, raffreddamento e confezionamento in materiale asettico. I vari step sono pressoché simili in tutte le aziende, a parte la fase di riscaldamento alla temperatura di sterilizzazione, che può avvenire in maniera diretta o indiretta. Nel metodo diretto di riscaldamento il calore viene ceduto mediante vapore, il quale entra direttamente in contatto con il latte riscaldandolo molto velocemente, per poi essere eliminato tramite l'impiego di una pompa a vuoto; in quello indiretto il riscaldamento è più lento, in quanto non avviene grazie al contatto del vapore con l'alimento, ma mediante l'uso di scambiatori di calore a fascio o a piastre. Le due principali differenze nelle caratteristiche riguardano il sapore e la suscettibilità alla gelificazione durante la conservazione. Infatti il latte trattato indirettamente ha un sapore più cotto e può sviluppare aromi più ossidati e/o rancidi; tuttavia, il latte trattato con metodo diretto è più incline alla gelificazione (Lewis e Deeth, 2009). Questo perché, essendo il trasferimento del calore più lento, la durata del riscaldamento dalla temperatura di preriscaldamento a quella di sterilizzazione (comprendendo anche il tempo di

raffreddamento) è più lunga nei sistemi indiretti che in quelli diretti (figura 1.2A). I primi sono più severi (da un punto di vista termico) proprio perché il latte richiede più tempo per raggiungere la temperatura voluta: in questo modo, l'inattivazione delle proteasi è molto più efficiente di quanto non sia con il metodo diretto (vedasi figura 1.1B). Poiché sia la plasmina che le proteasi batteriche (responsabili della gelificazione) hanno una notevole stabilità al calore, la diversa modalità con cui viene effettuato il riscaldamento del latte riveste una notevole importanza per quanto riguarda sia la qualità che la *shelf life* del prodotto finale (Datta e Deeth, 2003). Per descrivere le cinetiche di reazione del processo, sono stati sviluppati alcuni indici di descrizione tempo-temperatura per i batteri e per i componenti del latte. I principali sono B^* e F_0 (batterici) e C^* (chimico). B^* misura l'effetto battericida di un trattamento termico, relativo a una temperatura di 135 °C e con un valore z di 10,5 °C. Un processo con $B^* = 1$ produce una riduzione di 9 log delle spore termofile. Questo valore differisce dall'indice di sterilizzazione commerciale F_0 , dove la temperatura di riferimento è di 121,1 °C e il tempo di trattamento minimo è 180 secondi.

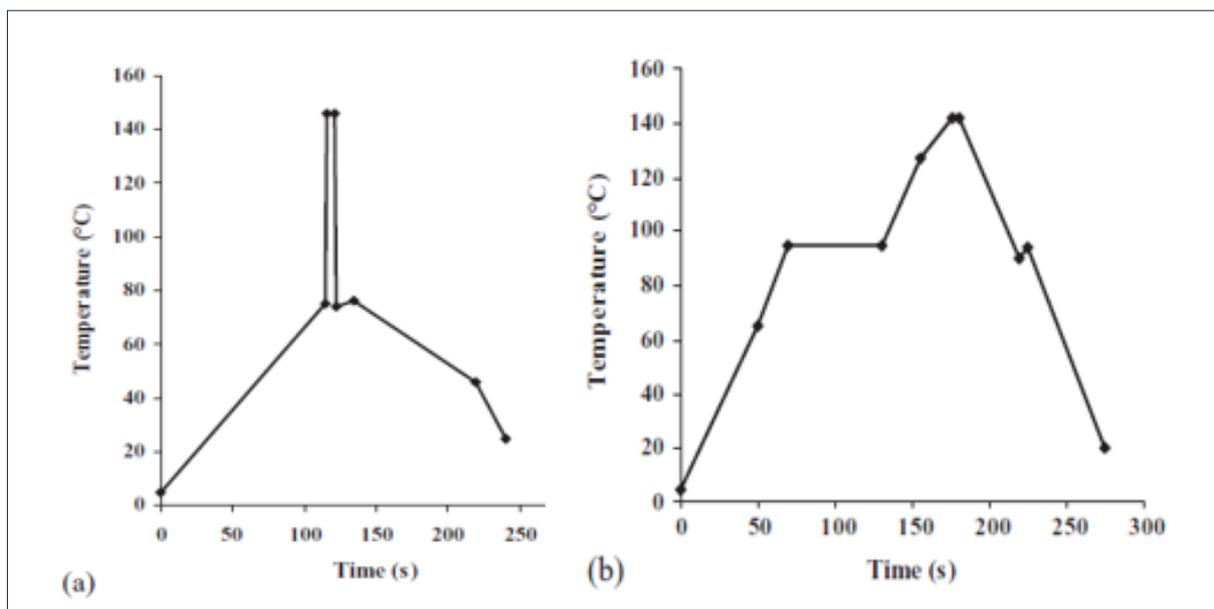


Fig. 1.2A – Profili tempo – temperatura del metodo diretto (a) e indiretto (b) (Fonte: Lewis e Deeth, 2009).

Sebbene una correlazione diretta non sia strettamente corretta, un F_0 di tre minuti corrisponde approssimativamente a un B^* di circa 0,85 minuti. L'indice C^* invece descrive la cinetica di distruzione della vitamina tiamina (B_1) alla temperatura di riferimento 135 °C; un $C^* = 1$ equivale a una perdita di tiamina del 3%. Il processo UHT si può ritenere soddisfacente per quanto riguarda la qualità di conservazione del prodotto quando $B^* > 1$ e $C^* < 1$. Un altro valore,

definito Q_{10} , indica di quante volte la velocità di reazione aumenta se la temperatura del sistema viene aumentata di 10 °C. Il valore Q_{10} per la maggior parte delle reazioni chimiche che avvengono tra i costituenti del latte si aggira tra 2 e 3. Ciò significa che, se la temperatura del sistema viene aumentata di 10 °C, la velocità delle reazioni chimiche raddoppia o triplica (Kessler 1981).

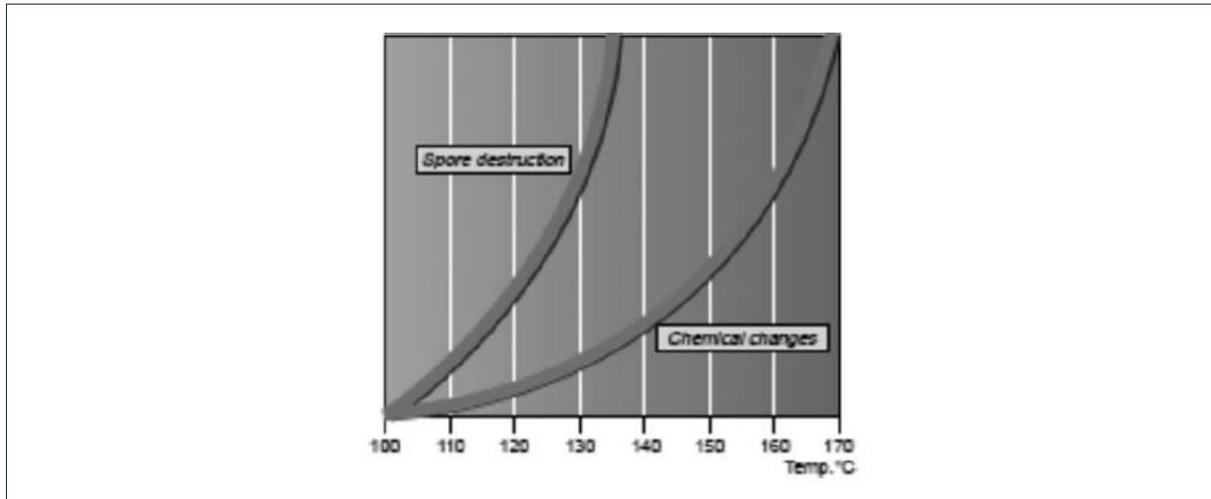


Fig. 1.2B – Curve rappresentanti la velocità di cambiamento (Q_{10}) delle proprietà chimiche e della distruzione delle spore. L'asse delle ordinate corrisponde a Q_{10} , mentre le ascisse corrispondono alla temperatura. Come si può notare, la curva che rappresenta la distruzione delle spore, vede aumentare molto velocemente il valore Q_{10} man mano che si innalza la temperatura; diversamente, l'aumento della velocità delle reazioni chimiche è meno soggetta all'innalzamento della temperatura (Fonte: Gösta, 2003).

1.3 Alterazioni chimico – fisiche dovute al trattamento termico

Siqi Li *et al.*, (2021) hanno riassunto cosa il trattamento UHT determina nel latte. I cambiamenti sostanziali riguardano una minore concentrazione di ioni Ca^{++} liberi, l'aumento della dimensione media delle particelle, la dissociazione delle κ -caseine nel siero e la denaturazione delle proteine del siero di latte. Il trattamento termico comporta sostanzialmente reazioni suddivisibile in due macroaree:

- ❑ La prima comprende l'insieme di reazioni che comportano la denaturazione, la degradazione e l'inattivazione delle proteine del siero di latte, degli enzimi, delle vitamine ed un cambiamento nella struttura stessa della micella caseinica;
- ❑ La seconda comprende l'insieme di reazioni che alterano le proprietà organolettiche quali gusto e colore; vediamo ad esempio l'isomerizzazione del lattosio in lattulosio e la formazione di molte molecole, come HMF (idrossimetilfurfurale, composto derivato

dalla disidratazione di glucidi) e furosina, che non sono presenti nel latte crudo in quanto prodotti riconducibili alle reazioni di Maillard (Morales *et al.*, 2000).

Singh (2004) ha evidenziato come la stabilità del latte (intesa come *shelf life*) sia dipendente dalla sua resistenza al calore: sostenere un trattamento termico elevato senza subire troppe alterazioni è il fattore determinante affinché in conservazione la coagulazione e/o la gelificazione venga evitata o quantomeno ridotta. Ha concluso inoltre che per migliorare la stabilità al calore, in questo caso la resistenza al trattamento UHT, le soluzioni comprendono il preriscaldamento del prodotto, la regolazione del pH e l'aggiunta di fosfati, latticello o fosfolipidi. Il cosiddetto sapore di “cotto” tipico del latte UHT è dovuto ai gruppi sulfidrilici (-SH), che si ossidano da 5 a 10 giorni dopo il trattamento. Il riscaldamento non ha quasi nessun effetto sui sali del latte, con due eccezioni: i carbonati e i fosfati di calcio. La maggior parte del carbonato nel latte è presente sotto forma di CO₂, la quale si perde con il riscaldamento, innalzando di conseguenza il pH del latte. Il fosfato di calcio solubile ha un comportamento particolare, in quanto la sua solubilità diminuisce con l'aumento della temperatura e va precipitando sulle micelle di caseina, con una concomitante diminuzione della concentrazione di ioni calcio e del pH (Solano-Lopez *et al.*, 2005). Le vitamine liposolubili sono minimamente alterate dal calore, mentre le vitamine idrosolubili possono essere parzialmente o totalmente distrutte durante il trattamento, in base alla durata. È stata osservata una riduzione significativa della vitamina B₁ (tiamina), B₂ (riboflavina), B₃ (niacina), B₆, B₁₂ (cobalamina) e folato (forma attiva dell'acido folico) sotto l'influenza di diversi processi di lavorazione del latte, non solo quelli termici. Il trattamento UHT riduce le vitamine del gruppo B del 10%, l'acido folico del 15% e la vitamina C del 25%. Altre fonti suggeriscono che la degradazione delle vitamine idrosolubili B₁ e B₁₂ sono rispettivamente del 30–40% e dell'80–100%. Il valore nutrizionale di proteine, minerali e grassi è influenzato in minima parte dalla sterilizzazione ad alte temperature, ma è correlato per lo più alle temperature di conservazione, al contenuto iniziale di ossigeno e alla scelta del confezionamento. Gli attributi fisici indesiderati associati al latte UHT sono l'imbrunimento, la sedimentazione, la destabilizzazione delle proteine e separazione dei grassi. Le proteine si modificano più di ogni altro componente durante il trattamento termico, contribuendo alla perdita di colore e sapore, alla perdita di valore nutrizionale, nonché di attitudine casearia, oltre che essere responsabili della formazione del fenomeno di gelificazione e di sedimentazione, influenzando perciò la viscosità dell'alimento. Il colore rappresenta fundamentalmente il cambiamento fisico-chimico del prodotto. Tanto maggiore è la quantità di zuccheri riducenti maggiori sono i problemi di imbrunimento, il quale aumenta

con la severità del processo e la temperatura di conservazione (Dunkley e Stevenson 1987). La causa è dovuta alla reazione di Maillard, la cui conseguenza è la formazione di pigmenti di colore marrone, come le melanoidine, ed il conferimento di un sapore di cotto. Il trattamento UHT comporta inoltre l'inattivazione termica di un inibitore della transglutaminasi, un enzima che catalizza la formazione di legami crociati in numerose proteine, ad esempio tra le caseine. In questo modo, poiché non più inibita, la formazione di legami tra le caseine sarà molto più ricorrente, di conseguenza daranno origine a micelle molto più stabili. Con il calore, anche le proteine del siero di latte si denaturano e formano dei complessi fra di loro, con le caseine e con i globuli di grasso, alterando la loro struttura nativa (Bonisch *et al.*, 2004). La quantità di β -lattoglobulina associata alla micella di caseina aumenta proporzionalmente all'aumentare del tempo di riscaldamento; in misura minore, ha comportamento simile anche l' α -lattoglobulina, mentre la β -lattoglobulina comincia a dispiegarsi e a perdere la sua struttura globulare sopra i 55 °C. Questo provoca la rottura dei ponti disolfuro della cistina (amminoacido solforato formato dall'unione due cisteine) e un marcato aumento della reattività dei gruppi tiolici. Un trattamento termico prolungato oltre gli 80 °C porta alla degradazione di tutti i residui di cistina (Elfagm e Wheelock, 1978). Lyster (1964) ha osservato che tutti i gruppi sulfidrilici diventano reattivi dopo il trattamento UHT con un sistema di riscaldamento indiretto. Ad esempio, possono reagire a livello intramolecolare e formare aggregati di β -lattoglobulina, oppure a livello intermolecolare e formare legami disolfuro tra β -lattoglobulina e altre molecole contenenti appunto il gruppo tiolico come la κ -caseina. L' α -lattoalbumina si presume interagisca con la κ -caseina solo in presenza di β -lattoglobulina, poiché lo fa probabilmente unita in un complesso α -lattoalbumina/ β -lattoglobulina (Elfagm e Wheelock, 1978). L'associazione delle proteine del siero con le micelle di caseina è pH dipendente e diminuisce con l'aumentare dello stesso nell'intervallo compreso tra i valori 6,3 – 7,3. La figura 1.3 mostra le immagini TEM (microscopio elettronico a trasmissione) di latte scremato crudo e dello stesso latte scremato UHT. Nel latte scremato crudo (1.3A), le micelle di caseina presentano superficie liscia. Il trattamento UHT del latte ha prodotto micelle di caseina ricoperte da complessi di proteine del siero di latte e κ -caseina, che sporgono dalla superficie delle stesse (1.3B). I complessi proteici si sono formati, come già detto in precedenza, a causa della denaturazione delle proteine del siero indotta dal calore e dall'associazione delle stesse con la κ -caseina. Contemporaneamente, si può riscontrare anche la formazione di aggregati di due o tre micelle. L'aumento della dimensione media delle particelle infatti è dovuto proprio a questo. Nel latte scremato UHT conservato per 6 e 8 mesi (1.3C e 1.3D),

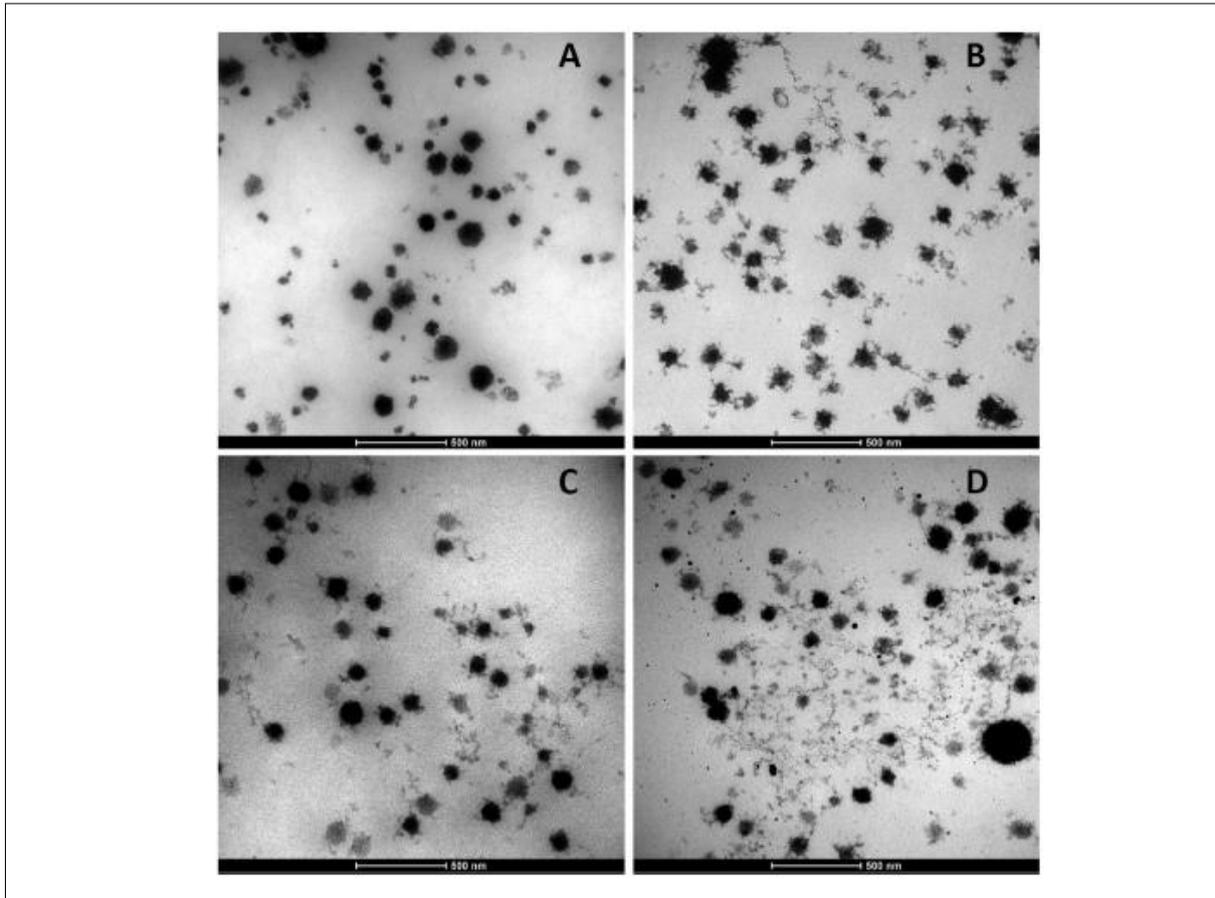


Fig. 1.3 – Immagini TEM di latte scremato crudo (A), latte scremato UHT fresco (B), UHT conservato per 6 mesi (C) e 8 mesi (D) (Fonte: Li *et al.*, 2019).

parte della superficie delle micelle di caseina è diventata più liscia senza appendici sporgenti, poiché nel corso dei primi mesi di conservazione il complesso κ -caseina e β/α -lattoglobuline si dissocia parzialmente dalla micella caseinica e si disperde nella fase sierica. Sono perciò comparse in quest'ultima delle proteine "arricciate" dalla forma ad elica, ma si possono osservare inoltre reti formate da questi "ricci proteici" che alle volte collegano le micelle l'una con l'altra se non interamente dissociati da esse (1.3D) (Li *et al.*, 2019). Alcuni studi hanno appunto appurato la presenza di "filamenti proteici arricciati" nel latte UHT conservato, riscaldato sia direttamente (Malmgren *et al.*, 2017) sia indirettamente (Raynes *et al.*, 2018)

2 La gelificazione

2.1 Introduzione al fenomeno

La domanda di latte UHT e di bevande a base di proteine del latte è in crescita, principalmente perché il latte UHT è microbiologicamente stabile e non richiede conservazione a temperature di refrigerazione. Tuttavia, durante lo stoccaggio si verificano una serie di cambiamenti chimici e fisici che possono ridurre la qualità e limitarne il consumo e/o la durata di conservazione, fino a renderlo non più adatto al consumo. Il cambiamento che avviene durante la conservazione e condiziona di più la *shelf life* del latte UHT è la gelificazione. Questo difetto, che è irreversibile, fa sì che il latte assuma una consistenza gelatinosa. L'alterazione della texture è dovuta alla formazione di una rete proteica tridimensionale tra le varie proteine nel latte, con la rapida formazione di uno strato compatto ed un accumulo eccessivo di grasso nella superficie. È noto che il difetto sia generato almeno da due meccanismi differenti, che possono portare alla stessa conseguenza durante la conservazione. Un meccanismo implica la degradazione delle proteine attraverso enzimi indigeni ed esogeni altamente termostabili contenuti nel latte; l'altro è di natura chimico-fisica e non è causato da proteolisi. Diversi sono i fattori che influenzano la gelificazione chimico-fisica, come ad esempio il carico termico durante la lavorazione (processi UHT diretti rispetto a quelli indiretti) e la composizione del latte. Lo sviluppo di sapori amari e un aumento della viscosità nel latte sono però principalmente dovuti a fenomeni di proteolisi. Questi cambiamenti sono causati o almeno accelerati dall'idrolisi delle κ -caseine durante il trattamento termico, le quali formano aggregati fra loro ma anche con le sieroproteine creando una struttura a rete che causa la gelificazione del latte. Qualsiasi condizione di lavorazione o conservazione che accelera (o ritarda) la formazione del complesso κ -caseina/ β -lattoglobulina accelererà (o ritarderà) il fenomeno di gelificazione (Anema, 2018).

2.2 Gelificazione enzimatica

I trattamenti termici sostenuti per la produzione del latte UHT garantiscono la sterilità del latte; tuttavia, alcune proteinasi sono stabili al calore e non vengono completamente inattivate. Alcune di esse mostrano un'eccezionale resistenza alle alte temperature e sono in grado di sopportare il processo di sterilizzazione, come ad esempio, la plasmina (indigena del latte), o alcuni enzimi prodotti da alcuni batteri psicrotrofi (Anema, 2018). Entrambe causano una

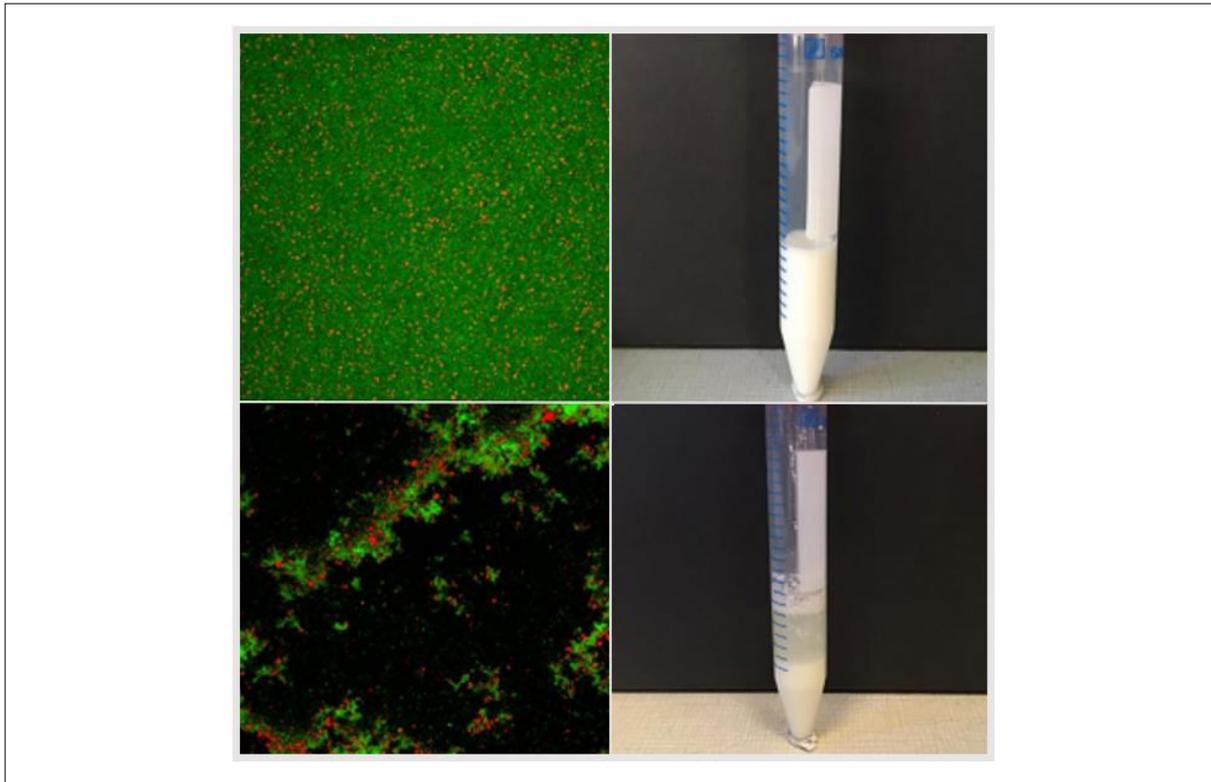


Fig. 2.2 – Raffigurazione di una gelificazione enzimatica dovuta a proteasi batteriche. Le due immagini di sinistra rappresentano il latte osservato al microscopio confocale, mentre a destra lo stesso contenuto in una provetta. Nella parte superiore troviamo due immagini in cui il latte è in forma liquida, nelle due in basso è gelificato. Il nero rappresenta la fase sierica, le proteine sono colorate di verde e il grasso di rosso; come si può osservare, allo stato liquido il latte è descrivibile come un'emulsione. Il lato di ogni immagine misura circa 150 μm (Fonte: D'Incecco *et al.*, 2022).

degradazione delle proteine che può portare all'instabilità e alla gelificazione del latte; nonostante ciò, i due meccanismi di destabilizzazione sono molto diversi. Per questo motivo sono discussi separatamente.

2.2.1 Proteolisi indotta dalla plasmina

Sebbene il latte contenga un gran numero di enzimi indigeni, la maggior parte di questi sono termolabili e/o completamente inattivati durante il processo UHT; pertanto, non hanno alcuna attività proteolitica durante la conservazione (Kelly e Fox, 2006). Quasi tutti gli esempi di attività enzimatica nel latte UHT dovuta a proteinasi indigene sono riconducibili alla presenza di enzimi del “sistema plasmina”. La plasmina è una serin-proteasi con un pH ottimale di circa 7,5 a 35 °C e che fa parte di un complesso sistema, composto non solo da questa serin-proteasi, ma anche dal suo precursore, dai suoi inibitori e dai suoi attivatori. Questo complesso

enzimatico proviene dal plasma sanguigno dell'animale ed entra nel latte attraverso la ghiandola mammaria. Il ruolo della plasmina nel sangue è la rottura dei coaguli, consentendo il normale flusso sanguigno. Nel latte, il livello di plasmina è nettamente inferiore rispetto a quello del suo zimogeno, il plasminogeno. Le concentrazioni nel latte di plasmina (0,14 – 0,73 mg/L) e plasminogeno (0,55 – 3,00 mg/L) variano tra le fasi di lattazione, dove si notano dei livelli più bassi all'inizio e livelli crescenti con il procedere della stessa. Plasmina, plasminogeno e attivatore del plasminogeno sono prevalentemente associati alle micelle di caseina, mentre gli inibitori della plasmina e gli inibitori dell'attivatore della plasmina si trovano nella fase sierica (Ismail e Nielsen, 2010). La plasmina idrolizza i legami peptidici adiacenti ai residui di lisina e arginina (Lys-X e Arg-X) di β , α -s1 e α -s2 caseina, producendo inizialmente una serie di peptidi di γ -caseina, peptoni, peptidi ad alto peso molecolare e successivamente peptidi più piccoli (Crudden *et al.*, 2005a). La κ -caseina è la più resistente tra le proteine della sua stessa famiglia all'idrolisi da parte della plasmina. Le proteine del siero, quali α -lattalbumina e β -lattoglobulina, vanno incontro a glicosilazione durante la conservazione e sono di conseguenza meno soggette all'attività enzimatica, comportando un'idrolizzazione relativamente lenta rispetto alla controparte idrofobica (Anema, 2017; Rauh *et al.*, 2014a). I componenti del sistema plasminico hanno una sensibilità al calore variabile (figura 2.2.1A) ed è interessante far notare che i trattamenti termici più elevati possono indurre una maggiore attività plasminica rispetto a trattamenti termici più bassi (Newstead *et al.*, 2006). È un'affermazione ovviamente controintuitiva, in quanto la denaturazione dovrebbe teoricamente essere direttamente proporzionale al carico termico. Per capire il motivo di tale conseguenza è perciò necessario considerare gli effetti del calore sull'intero sistema enzimatico. L'inibitore dell'attivatore del plasminogeno, così come l'inibitore della plasmina, è termolabile e sono entrambi quasi completamente inattivati dalle condizioni di pastorizzazione, mentre il plasminogeno, il suo attivatore e la plasmina sono termoresistenti. Pertanto, dopo trattamenti termici relativamente blandi, ma sufficienti a fermare l'attività degli inibitori, la conversione dello zimogeno in enzima non sarà ostacolata e perciò l'attività enzimatica sarà maggiore (Ismail e Nielsen, 2010). Alcuni trattamenti termici più severi possono inattivare completamente la plasmina, ma il plasminogeno e attivatori del plasminogeno possono rimanere inalterati in quanto più resistenti. Ad esempio, immediatamente dopo un trattamento di sterilizzazione la presenza della plasmina è essenzialmente pari a zero, ma al momento della conservazione il plasminogeno residuo viene convertito in plasmina la quale eserciterà poi proteolisi. Si può perciò affermare che l'attività proteolitica dovuta a questo enzima indigeno non è completamente scongiurata dalle normali condizioni di pastorizzazione, ma risulta addirittura maggiore. Anche il trattamento di

sterilizzazione con metodo diretto comporta carichi termici non sufficienti ad arrestare l'attività enzimatica e durante la conservazione il latte può subire proteolisi. Tutti i componenti del sistema sono invece inattivati quando il latte viene portato a temperature di sterilizzazione attraverso il metodo indiretto, il più severo dal punto di vista termico (Ismail e Nielsen, 2010; Newstead *et al.*, 2006). Anema (2017) ha dimostrato che campioni di latte scremato UHT (143 °C/3s) ricostituiti a partire da latte scremato in polvere, presentavano attività enzimatica residua. Ciò ha confermato che la plasmina, il plasminogeno e i relativi attivatori sopravvivono alle varie fasi di lavorazione implicate nella produzione di latte scremato in polvere così come alle successive fasi di ricostituzione e di riscaldamento di latte UHT. L'attività enzimatica può essere completamente eliminata con ulteriori trattamenti di preriscaldamento (90 °C/60 o 120s) prima della fase UHT o prolungando la medesima fase. Pertanto, nella produzione commerciale di latte UHT diretto, sia esso preparato a partire da latte fresco o ricostituito da latte in polvere, un significativo preriscaldamento del latte è necessario per garantire la completa inattivazione

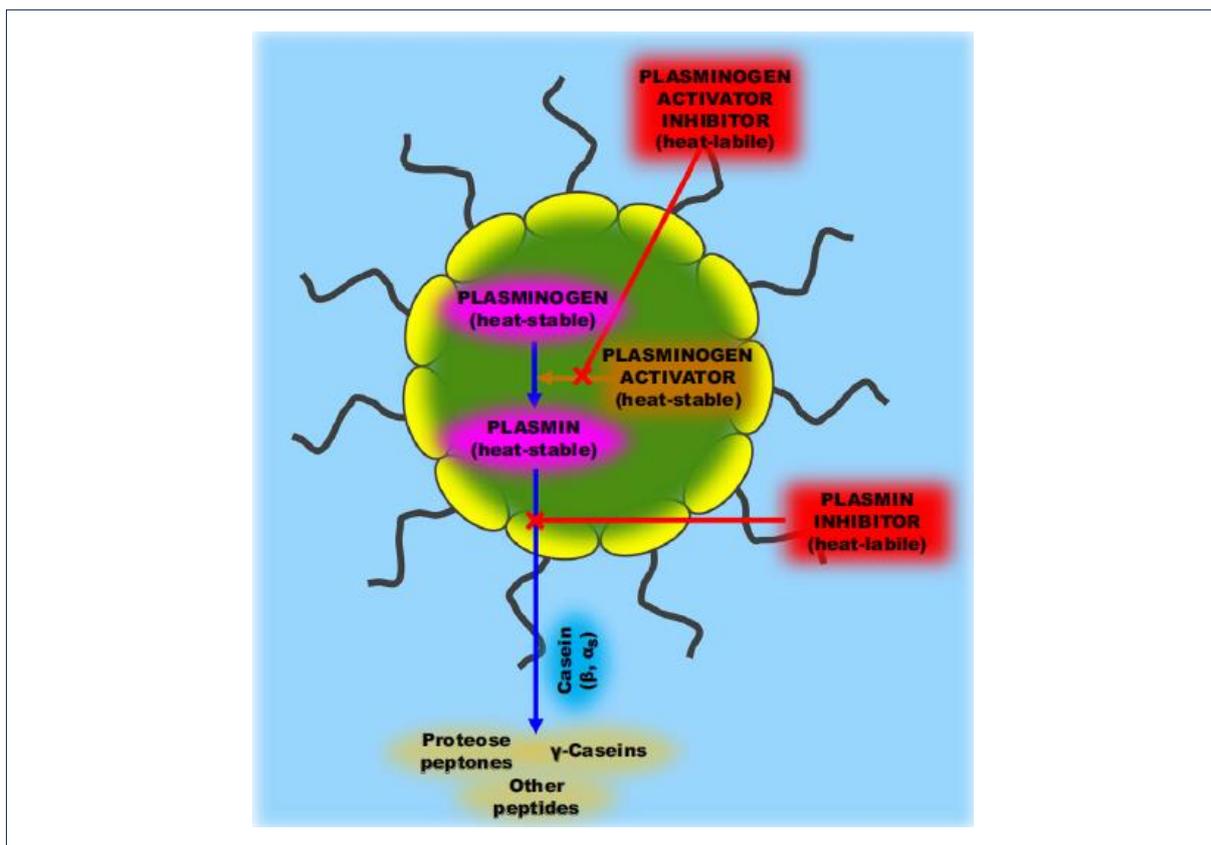


Fig. 2.2.1 – Il sistema plasmina nel latte vaccino. Plasmina, plasminogeno e il suo attivatore sono associati alla micella della caseina, mentre l'inibitore della plasmina e l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno si trovano nel siero del latte. I componenti del sistema enzimatico hanno una diversa resistenza al calore (Fonte: Anema, 2018).

delle proteasi. Quando però l'attività della plasmina è elevata e si verifica una rapida proteolisi, non si osserva gelificazione, ma si nota molto spesso una chiarificazione del latte scremato e una separazione di fase nel latte intero. Solo una bassa attività proteolitica dà luogo a gelificazione durante la conservazione (Crudden *et al.*, 2005b). Zhang *et al.* (2018) hanno proposto un processo a più fasi per spiegare il fenomeno che porta dalla destabilizzazione alla gelificazione del latte da parte della plasmina: inizia con una fase di “penetrazione” in cui la plasmina idrolizza le caseine β , α -s1 e α -2, e conseguentemente penetra all'interno delle micelle. Una volta all'interno, idrolizza parzialmente le regioni che sono parte integrante del mantenimento strutturale, come quelle responsabili delle interazioni idrofobiche e dei ponti di calcio-fosfato. La diminuzione di questi legami ed interazioni con funzione strutturale della micella comporta un allentamento della struttura generale e un conseguente leggero aumento delle dimensioni. Successivamente si verifica una fase di riarrangiamento e di aggregazione in cui i peptidi generati e i frammenti di micelle rimanenti si associano, portando infine alla formazione di un gel. Nei campioni di latte UHT sterilizzato con metodo diretto, durante la conservazione, la plasmina idrolizza la β -caseina in modo preferenziale rispetto alla α -s2 caseina, mentre l'idrolizzazione dell' α -s1 procede ad un ritmo più lento. La κ -caseina viene degradata ancor più lentamente, tanto che sembra essere influenzata in modo significativo dall'attività enzimatica solo a conservazione inoltrata; infatti alcuni studi suggeriscono un'idrolisi minima di questa caseina (Anema, 2017; Rauh *et al.*, 2014a). La maggior parte degli studi evince che al punto di gelificazione le caseine β , α -s1 e α -s2 sono per lo più idrolizzate (valori maggiori del 90%), anche se i risultati fra le ricerche variano. Allo stadio di gelificazione, alcuni suggeriscono un'idrolisi quasi completa della β -caseina e qualche residuo intatto di α -s1 e α -s2; altri studi invece indicano una quasi completa idrolisi anche per quest'ultime. Queste differenze sono probabilmente dovute a diverse condizioni di lavorazione, conservazione, alla frequenza di campionamento e dai metodi analitici. È interessante notare come molti indichino la presenza di alte concentrazioni di complessi di κ -caseina e β -lattoglobulina nella fase sierica al momento della gelificazione, mentre altri indicano come gli aggregati composti da κ -caseina e β -lattoglobulina presenti sulla superficie delle micelle di caseina (in seguito a trattamento termico, come spiegato nel primo capitolo) crescano in lunghezza rimanendo attaccati alla superficie della stessa (Anema, 2017; Newstead *et al.*, 2006; Rauh *et al.*, 2014a). Anche studi condotti da parte di Malmgren *et al.* (2017) suggeriscono che gli aggregati che si formano e si accumulano nella fase sierica durante lo stoccaggio in seguito all'idrolisi da parte della plasmina sono coinvolti nella gelificazione del latte. La formazione del gel dipende anche dalla temperatura durante la conservazione: è più lenta a basse

temperature, mentre è ottimale a circa 20/25 °C ed è rallentata, o addirittura inibita, a temperature superiori a 30 °C. Il fenomeno sembra infatti avvenga solamente quando l'attività enzimatica è ottimale. Deve esserci sufficiente attività ma non deve essere troppo accentuata, in quanto temperature più alte indurrebbero un aumento della velocità di reazione e, di conseguenza, la plasmina esplicherebbe la sua attività troppo vigorosamente non dando tempo a sufficienza alle proteine di riarrangiarsi e formare una struttura a rete. Ecco perché una temperatura di conservazione superiore a 30 °C, stimolando una maggiore attività della plasmina, sia imputata ad una minore probabilità di comparsa del difetto rispetto ad una temperatura inferiore. (Kocak e Zadow, 1985a). Utilizzando il TEM, Malmgren *et al.* (2017) hanno dimostrato la diversità dei cambiamenti strutturali nel latte UHT conservato a diverse temperature. Tutti i campioni sono stati idrolizzati dalla plasmina e un'idrolisi maggiore si è vista correlata a temperature di conservazione più elevate. Il riarrangiamento delle proteine ha portato alla formazione di ricci proteici (aggregati di caseine, di κ -caseina e α/β -lattoglobulina) più lunghi nei campioni conservati a 22 °C, con conseguente gelificazione. Al contrario, a 40 °C non si sono formati ulteriori aggregati e i campioni non hanno gelificato. A dimostrazione del fatto che il latte UHT conservato a temperature più alte ha subito una proteolisi più spinta rispetto a quello conservato a temperatura più bassa. Riassumendo, l'attività enzimatica della plasmina porta a gelificare il latte principalmente perché causa l'idrolisi delle caseine β , α -s1 e α -s2. Quando queste proteine vengono idrolizzate lentamente, le micelle di caseina si destabilizzano, si allentano, e i frammenti delle stesse si aggregano tra loro formando una struttura a rete in grado di inglobare la componente acquosa. Zhang *et al.*, (2018) affermano che la rete una volta formata si mantenga attraverso interazioni idrofobiche e ponti di calcio, con la κ -caseina e le proteine del siero denaturate unite grazie a ponti disolfuro. Il meccanismo proposto è evidenziato nella figura 2.2.3B. Un punto molto importante da sottolineare è che l'idrolisi delle caseine da parte della plasmina produce molti peptidi amari. Uno studio dimostra che dopo 6 settimane circa il 60% ne sia stato idrolizzato e si è notato un sapore amaro. Dopo 10 settimane, circa il 90% delle caseine era idrolizzato e i campioni hanno iniziato a gelificare (Rauh *et al.*, 2014b). Pertanto, il fattore più evidente prima della gelificazione è probabilmente la comparsa di sentori amari.

2.2.2 Proteolisi indotta da enzimi batterici

Gli enzimi che non sono naturalmente presenti nel latte sono detti enzimi esogeni. Fra questi, la maggior parte sono prodotti da batteri presenti nel latte crudo prima della lavorazione.

Sebbene nel latte crudo ci sia una grande quantità di enzimi esogeni, la maggior parte di essi non sono resistenti al calore e vengono inattivati durante la sterilizzazione. Tuttavia, alcune specie di batteri psicrotrofi sono in grado di secernere una proteasi estremamente resistente al calore, nettamente più termoresistente della plasmina, a tal punto da non essere distrutte da questo trattamento termico. Queste proteasi sono molto incidenti in merito al fenomeno della gelificazione in quanto sono le maggiori responsabili nel limitare la durata di conservazione del latte UHT, poiché non vengono inattivate da una normale sterilizzazione, sia di tipo diretta o indiretta. Di fatto, potenzialmente, possono sopportare trattamenti termici fino a 130 °C per alcuni minuti. Nello stesso studio Stoeckel *et al.* (2016) dimostrarono come alcune di queste proteinasi batteriche provenienti da sottospecie del genere *Pseudomonas* avessero valori *D* pari a diversi minuti a temperature comprese tra 70 e 150 °C. In particolare, venne esaminata la cinetica di inattivazione termica di proteasi prodotte da varie specie di *Pseudomonas*, e venne riscontrato un tempo *D* superiore al minuto a temperature maggiori di 140 °C. Pertanto, la concentrazione degli enzimi contenuti all'interno del latte prima del trattamento termico ha

Ceppo	Temperatura (°C)	<i>D</i> (minuti) (°C)	<i>Z</i> (°C)
<i>Pseudomonas</i> MC 60	110-150	1.5 (149)	32.5
<i>P. fluorescens</i> AFT36	70-150	1.2 (130)	31.9
<i>P. fluorescens</i>	130-150	2.2 (140)	28
<i>P. fluorescens</i> AFT21	70-150	2.0 (130)	30.3
<i>P. fluorescens</i> AFT21	70-150	1.3 (130)	29.7
<i>P. tolaasii</i>	80-140	2.6 (140)	34.0
<i>P. fluorescens</i> NCDO2085	107-137	3.0 (127)	31.2
<i>P. panacis</i>	70-90	422 (80)	29.0
<i>P. panacis</i>	70-90	25.6 (80)	63.6
<i>Pseudomonas</i> sp. W15a	120-140	4.8 (130)	25.8
<i>P. proteolytica</i> 691	120-140	4.0 (130)	28.7

Tab. 2.2.2 – Parametri di inattivazione termica nel latte di proteasi secrete da vari ceppi di *Pseudomonas* spp. (Fonte: Stoeckel *et al.*, 2016).

un'influenza dominante sull'intera attività proteolitica successiva rispetto alla severità del trattamento termico stesso. Corradini e Pecchini (1981) confrontarono l'efficacia dei diversi trattamenti di sterilizzazione dimostrando che il latte UHT prodotto con metodo indiretto, per lo stesso motivo citato nel capitolo precedente, a fine trattamento presentasse minor attività enzimatica rispetto allo stesso latte sterilizzato con metodo diretto. Riassumendo, si può affermare che la quantità di batteri psicrotrofi presenti nel latte crudo immediatamente dopo la raccolta statisticamente è relativamente bassa, ma la conservazione in condizioni di

refrigerazione favorisce il loro sviluppo, e di conseguenza, la possibilità di far loro produrre proteasi e lipasi extracellulari termoresistenti (Barach *et al.*, 1976; von Neubeck *et al.*, 2015). È stato accertato che la produzione delle proteinasi avviene nella fase terminale di crescita esponenziale. Poiché i batteri psicrotrofi si sviluppano in modo ottimale a basse temperature, possono sorgere problemi quando il latte crudo viene conservato per lunghi periodi prima del trattamento UHT, poiché queste condizioni favoriscono la formazione degli enzimi. Pertanto, queste proteasi non dovrebbero essere presenti nel latte UHT se questo fosse preparato a partire da latte di buona qualità e processato secondo buone prassi igieniche (Stoeckel *et al.*, 2016). Tuttavia, alcuni studi confermarono la presenza di queste proteinasi in campioni di latte UHT in commercio (Lopez-Fandino *et al.*, 1993), che suggeriscono problemi legati alla qualità del latte crudo utilizzato o di contaminazione dello stesso prima della fase di sterilizzazione. Haryani *et al.* (2003) dimostrarono che non tutti i campioni di latte che presentano elevate quantità di batteri psicrotrofi (10^9 UFC/ml) producono proteasi. Infatti, mentre in alcuni latti crudi conservati che presentavano tale conta batterica psicrotrofa non venne riscontrata alcuna presenza di enzimi proteolitici, altri campioni (di latte diverso ma con una conta batterica uguale) conservati in condizioni analoghe presentavano alti livelli di enzimi proteolitici. Griffiths *et al.* (1981) dimostrarono che la termoresistenza di questi enzimi è specie-dipendente e come i trattamenti termici a bassa temperatura e lungo periodo, progettati per inattivare queste proteasi, potrebbero non essere efficaci per tutti i ceppi e le specie. In un altro studio il latte è stato inoculato con nove ceppi di *Pseudomonas fluorescens* prima del trattamento UHT e della conservazione a 20 °C per 90 giorni. Cinque di questi ceppi testati avevano prodotto enzimi proteolitici stabili al calore, mentre gli altri quattro non avevano prodotto nessun enzima termoresistente (Baglinière *et al.*, 2012). Tra i batteri psicrotrofi presenti nel latte, le specie del genere *Pseudomonas* sono le più studiate e quelle ritenute maggiormente responsabili della produzione di proteasi termoresistenti responsabili della gelificazione. Il genere *Pseudomonas* è il più comune e il più studiato, ma altri generi come *Bacillus* (Machado *et al.*, 2017) e *Serratia* (Baglinière *et al.*, 2017) possono produrre a loro volta enzimi stabili al calore. Le proteinasi prodotte dalle diverse sottospecie di *Pseudomonas* sembrano essere molto simili tra loro. Sono tutte metalloproteasi (proteasi il cui meccanismo catalitico richiede la presenza di ioni metallici come cofattori) comunemente chiamate *AprX*, con un peso molecolare di circa $5 \cdot 10^4$ Da e contenenti uno ione zinco e diversi (da 4 a 8) ioni calcio. Le proteasi *AprX* sono segnalate per avere un ampio range di pH e di temperatura, con valori ottimali a pH neutro o leggermente alcalino e temperature comprese tra 40 °C e 50 °C. Gli studi hanno dimostrato che la proteolisi che avviene nel latte da parte di enzimi *AprX* comporta inizialmente l'idrolisi della κ -caseina

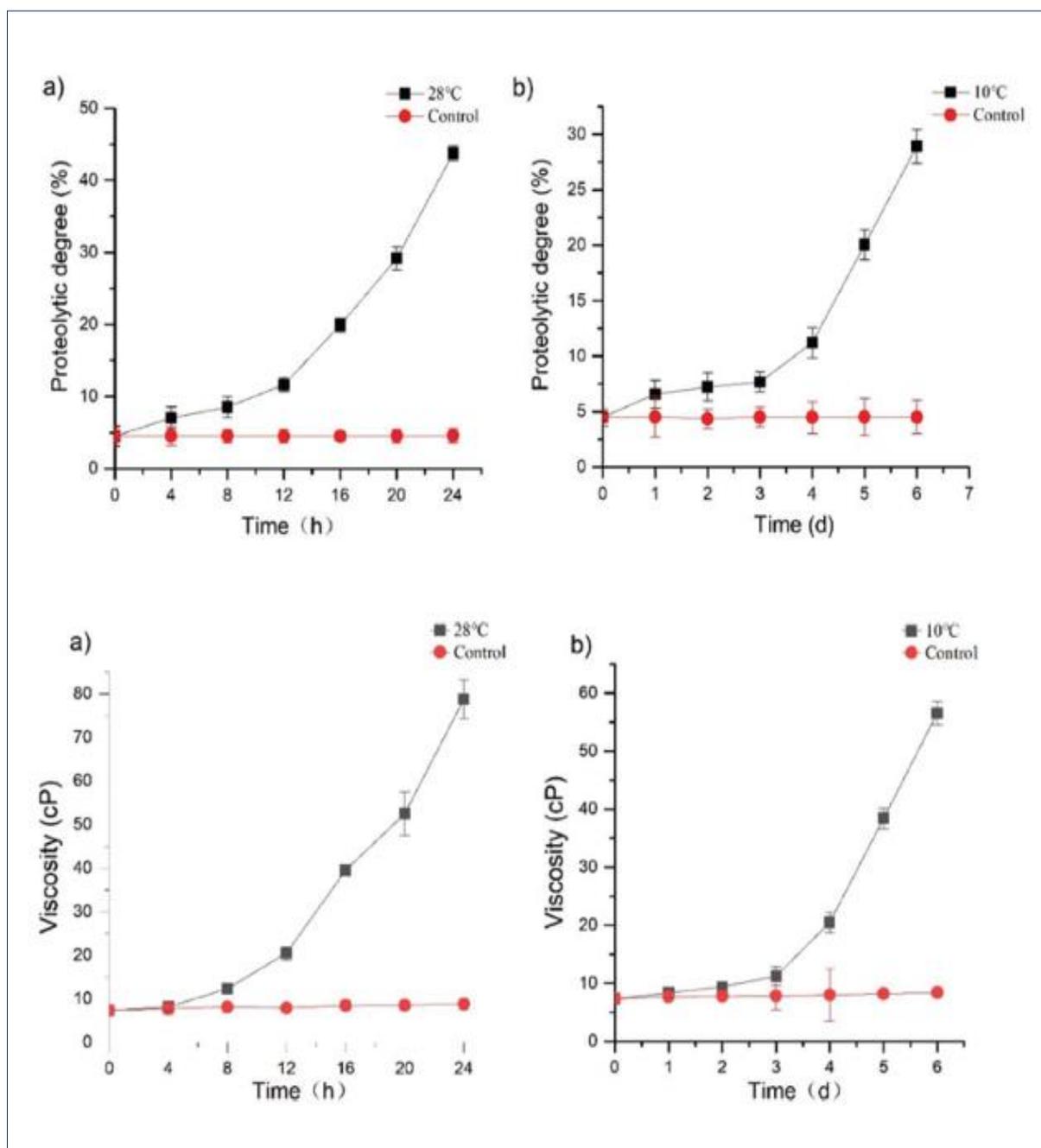


Fig. 2.2.2A (in alto) – Grado di proteolisi nel latte UHT incubato con proteasi secrete da *Bacillus cereus* C58 a 28 °C per 24h (a) e 10 °C per 6 giorni (b) (Fonte: Yang *et al.*, 2021).

Fig. 2.2.2B (in basso) – Viscosità nel latte UHT incubato con proteasi secrete da *Bacillus cereus* C58 a 28 °C per 24h (a) e 10 °C per 6 giorni (b) (Fonte: Yang *et al.*, 2021).

Come si può osservare, la presenza del batterio causa proteolisi nella matrice alimentare; si nota inoltre che l'attività proteolitica, diversa in funzione del tempo e della temperatura, è direttamente proporzionale all'aumento della viscosità del latte UHT. Ciò conferma che la produzione di proteasi di natura batterica inducono la gelificazione.

(il contrario rispetto alla proteolisi indotta da plasmina, dove la κ -caseina è il substrato meno suscettibile ad idrolisi), producendo peptidi simili alla para- κ -caseina e ad un glico-macro-peptide, i quali si osservano anche nella coagulazione presamica durante la preparazione di prodotti caseari, quando la chimosina agisce sulle micelle di caseina. Alcuni studi indicano infatti che l'enzima ha specificità per il legame fenilalanina-metionina della κ -caseina (Datta e Deeth, 2001). Le altre proteine idrofobiche, in particolare la β -caseina, sono state segnalate per non venir idrolizzate alla stessa velocità della κ -caseina. In caso di conservazione prolungata, si verifica un'ulteriore idrolisi che forma peptidi più piccoli derivati da tutte le caseine del latte (Baglinière *et al.*, 2017; Griffiths *et al.*, 1988; Snoeren *et al.*, 1979; Zhang *et al.*, 2018). Nel latte inoculato con ceppi di *Pseudomonas* prima della lavorazione e sottoposto successivamente a conservazione a 20 °C per un massimo di 90 giorni, i peptidi isolati che derivavano dalla β -caseina erano molti di più di quelli derivati dalla κ -caseina. È stato però fatto presente che probabilmente il basso numero di peptidi derivati dalla κ -caseina rispetto a quelli originati dalla β e α -caseine fosse dovuto alla bassa concentrazione di questa proteina rispetto alle altre e che ci fosse anche una maggiore difficoltà nel rilevarla in quanto glicosilata. La quantità di proteine denaturate di fatto non ha nulla a che vedere con il sito preferenziale di attività enzimatica da parte della proteasi *AprX*. Sebbene il numero dei diversi tipi di peptidi provenienti dalla κ -caseina sia basso, questa idrolisi comunque destabilizza le micelle e porta alla gelificazione (Baglinière *et al.*, 2012). Sulla base delle informazioni disponibili, il meccanismo che porta alla gelificazione (visibile alla Figura 2.2.3B) inizia appunto con l'idrolisi della κ -caseina, da cui derivano micelle simili alla para- κ -caseina e un sottoprodotto simile a un glico-macro-peptide (chiamato anche casein-macro-peptide). Il casein-macro-peptide (CMP o GMP) è rilasciato dalla rottura di un ponte tra fenilalanina e metionina nell'idrolisi della κ -caseina; essendo idrofilo, il CMP residua nel siero del latte, mentre l'altra parte della κ -caseina, detta para- κ -caseina, ha affinità con i residui proteici. (Griffiths *et al.*, 1988; Snoeren *et al.*, 1979; Zhang *et al.*, 2018). Contemporaneamente, anche se in modo minore, avviene l'idrolisi delle altre caseine, in particolare della β -caseina. Come nel caso della plasmina, la gelificazione può essere preceduta da un sentore di amarezza nel latte, poiché si formano peptidi amari dall'idrolisi delle caseine (Stoeckel *et al.*, 2016). In un recente studio D'incecco *et al.* (2022) sono stati in grado di mostrare efficacemente i cambiamenti strutturali che avvengono nel latte UHT durante la conservazione dovuti alle proteasi batteriche *AprX* (figura 2.2.2C). I campioni sono stati inoculati con una bassa concentrazione ($1,80 \times 10^3$ UFC/ml) con ceppi di *Pseudomonas fluorescens* RM3, per poi venir monitorati durante l'intero periodo di

incubazione mediante un microscopio confocale; i cambiamenti sono stati osservati grazie all'utilizzo di coloranti fluorescenti specifici, i quali hanno permesso di differenziare il grasso dalle proteine. Quello che si evince dalle immagini non è niente di diverso da quanto argomentato finora; tuttavia, è utile alla comprensione della cinetica di comparsa del fenomeno. Il campione incubato a temperatura ambiente gelifica prima e forma aggregati molto più resistenti e compatti; in entrambi si può osservare la dissociazione della matrice in due fasi ben distinte, a dimostrazione del fatto che la proteolisi di origine batterica generi molta più isteresi di quella indotta dalla plasmina.

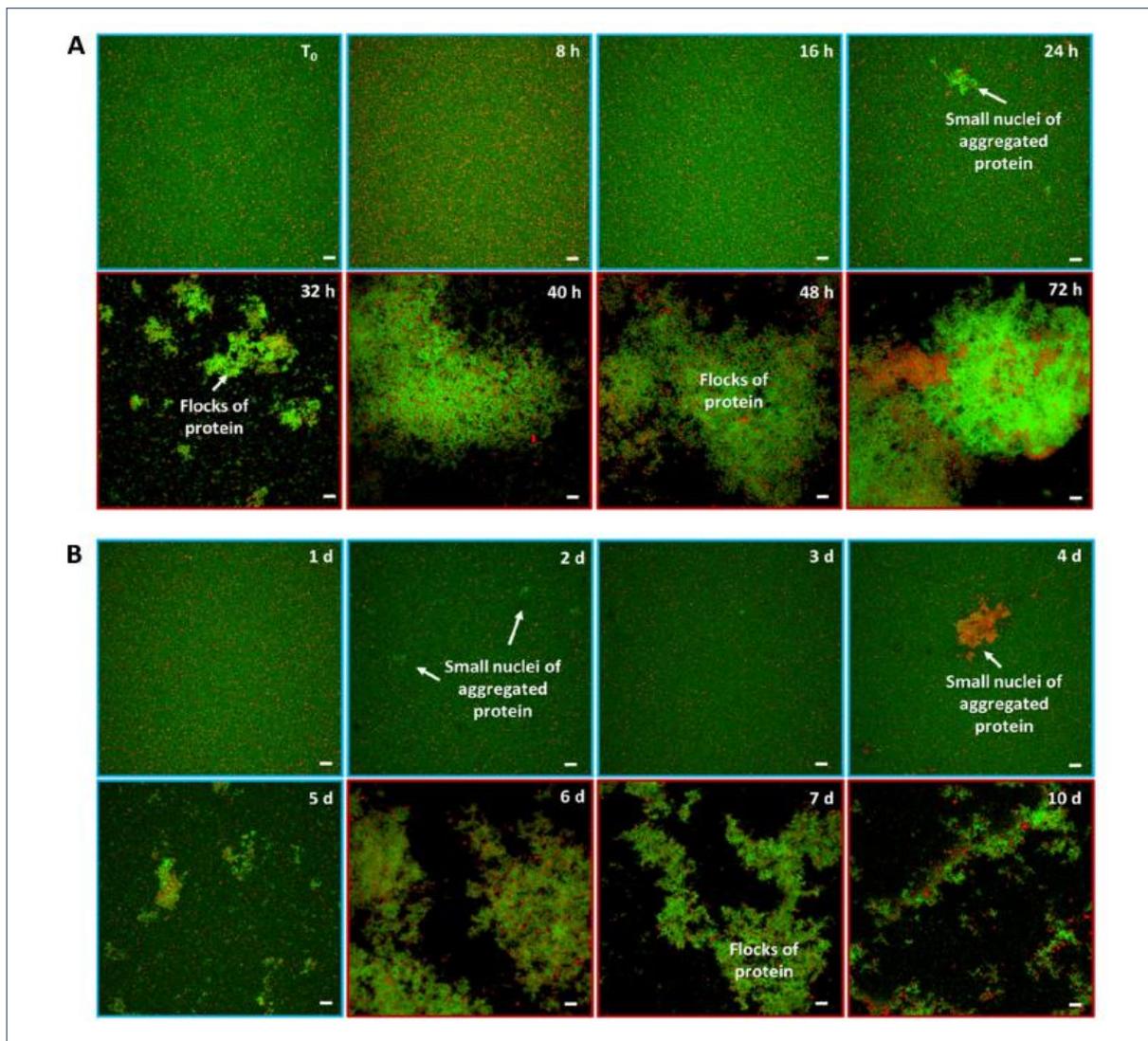


Fig. 2.2.2C – Sequenza di immagini ottenute tramite microscopio confocale dei cambiamenti microstrutturali dovuti a proteasi batteriche osservati nel latte UHT. Le immagini rappresentano rispettivamente due campioni, uno inoculato a 25 °C (A) e uno inoculato a 4 °C (B). Il nero rappresenta la fase sierica, le proteine sono colorate di verde e il grasso di rosso; i riquadri contornati di blu rappresentano latte in forma liquida, quelli contornati di rosso rappresentano campioni gelificati. Le barre in basso indicano 10 μm di lunghezza (Fonte: D’Incecco *et al.*, 2022).

2.2.3 Confronto delle proteolisi

Snoeren *et al.* (1979) hanno riportato che la gelificazione in un latte UHT prodotto a partire da latte crudo di buona qualità è imputata alla plasmina, mentre quella che si sviluppa a partire da latte di scarsa qualità microbiologica è dovuta sia a proteinasi indigene che a proteasi batteriche. Una prima distinzione che permette di distinguere la causa della comparsa del difetto è puramente visiva, e lo si può osservare nella figura 2.2.3A: le proteinasi batteriche (flacone A e B) portano alla formazione di un gel con consistenza omogenea nel campione che si deposita sul fondo, simile a quella di una crema di formaggio densa; la plasmina induce invece una gelificazione più blanda e meno omogenea (visibile nel piatto), la quale dall'aspetto ricorda una cagliata. I gel derivanti dall'idrolisi plasminica sono in genere molto morbidi, mentre quelli prodotti da enzimi esogeni sono più compatti e solidi; infatti spesso sono accompagnati da abbondante sineresi (Zhang *et al.*, 2018). Questo perché i gel causati dalle proteinasi batteriche presentano una rete proteica più compatta e ben formata, la quale contiene al suo interno ancora delle micelle di caseina e aggregati di micelle rispetto ai gel indotti da enzimi indigeni. La plasmina e le proteinasi batteriche hanno affinità diverse per le singole caseine. La plasmina idrolizza i legami peptidici sul lato C-terminale di lisina e arginina. I substrati preferiti dalla plasmina sono la β e le α -s2 caseina, mentre l' α -s1 caseina viene idrolizzata a una velocità inferiore o non viene idrolizzata affatto. La κ -caseina generalmente è considerata abbastanza resistente in quanto la componente glucidica della proteina la rende difficilmente idrolizzabile. La plasmina inoltre non idrolizza le proteine del siero, ma anzi, queste ultime hanno alcuni effetti inibitori sull'attività dell'enzima. Le proteinasi batteriche invece attaccano prevalentemente la κ -caseina generando frammenti simili alla para- κ -caseina; successivamente, segue un'idrolisi estesa e non specifica delle caseine; invece, per quanto riguarda le proteine del siero, gli effetti variano da poco a sostanziali. Grazie agli studi effettuati e ai dati pubblicati, si può concludere che l'ordine di suscettibilità delle caseine all'idrolisi da parte delle proteinasi batteriche è $\kappa > \beta > \alpha$ -s1, mentre per quanto concerne la plasmina è $\beta = \alpha$ -s2 $> \alpha$ -s1 $> \kappa$ (Datta e Deeth, 2001). Poiché la plasmina idrolizza in modo preferenziale la β -caseina che è racchiusa all'interno del nucleo idrofobico della micella, mentre le proteinasi batteriche idrolizzano in primo luogo la κ -caseina che si trova sulla superficie della stessa, l'attività enzimatica da parte della plasmina mina di più l'integrità della struttura micellare rispetto all'idrolisi da parte delle proteasi batteriche. Questo a dimostrazione che l'aspetto delle micelle idrolizzate dalla plasmina appaiono allentate, quasi disintegrate, mentre nel latte idrolizzato dalle proteinasi batteriche le micelle si mantengono per lo più sferiche e compatte.

Sono disponibili numerosi metodi per determinare se è avvenuta **proteolisi** nel latte, come ad esempio l'esame per verificare la presenza di livelli insolitamente elevati di azoto non-caseinico (NCN, corrispondente alle proteine solubili a pH di 4,6) attraverso metodi come l'analisi Kjeldahl. Se non c'è evidenza di proteolisi (non c'è un visibile aumento del livello di NCN o di gruppi amminici disponibili o il livello di proteine rimaste intatte è quello atteso per un campione conservato di latte UHT) allora è probabile che la gelificazione sia dovuta al meccanismo chimico-fisico. L'analisi del NCN o delle ammine

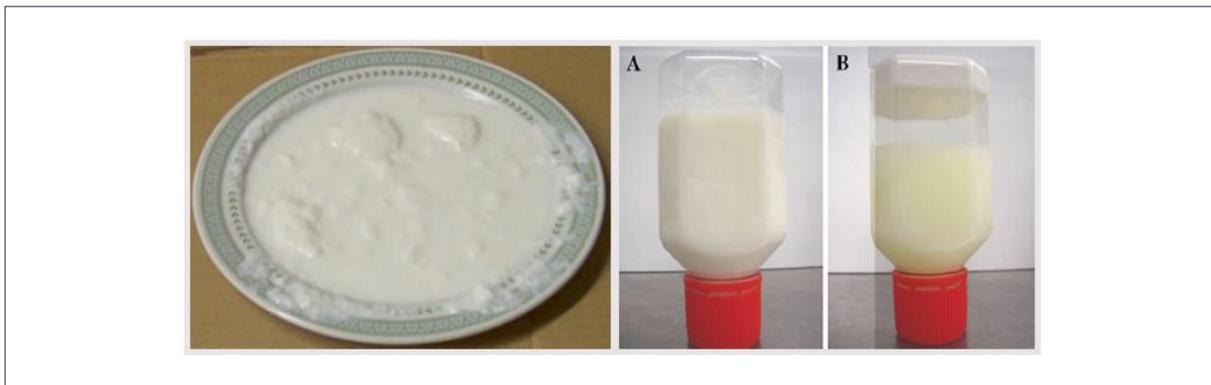


Fig. 2.2.3A – A partire da sinistra: latte UHT gelificato a causa della plasmina (Fonte: Le *et al.*, 2006). Campione di controllo di latte UHT [A] e campione dello stesso latte contenente proteasi termostabili di origine batterica [B] entrambi dopo 90 giorni di conservazione (Fonte: Baglinière *et al.*, 2013).

disponibili indicano solo la presenza o meno di proteolisi, ma non possono fornire informazioni sul tipo di peptidi o sugli enzimi responsabili della proteolisi (Chove *et al.*, 2011; Datta e Deeth, 2003). Più precisa è invece l'analisi diretta delle proteine del latte intatte e dei peptidi derivati utilizzando tecniche di separazione come l'elettroforesi o i metodi HPLC. Questi ultimi potrebbero essere accoppiati con la spettroscopia di massa per ottenere l'identificazione definitiva delle proteine e dei peptidi (AlKhanhal, 2000; Chove *et al.*, 2011; Deeth e Lewis, 2017b). Quando si analizza la proteina intatta con tecniche come l'elettroforesi o l'HPLC, gli enzimi che causano la proteolisi possono essere identificati direttamente esaminando le proteine del latte che sono state idrolizzate e quali bande peptidiche si sono formate. Nello specifico, le diverse azioni della plasmina e/o delle proteinasi batteriche sulle caseine possono essere osservate grazie all'uso di HPLC a fase inversa. A seguito di idrolisi da parte della plasmina si formano dei peptidi con proprietà più idrofobiche, i quali eluiscono nella parte finale del cromatogramma. Diversamente, peptidi derivati da proteinasi batteriche sono meno idrofobici ed eluiscono per lo più nella parte iniziale del cromatogramma.

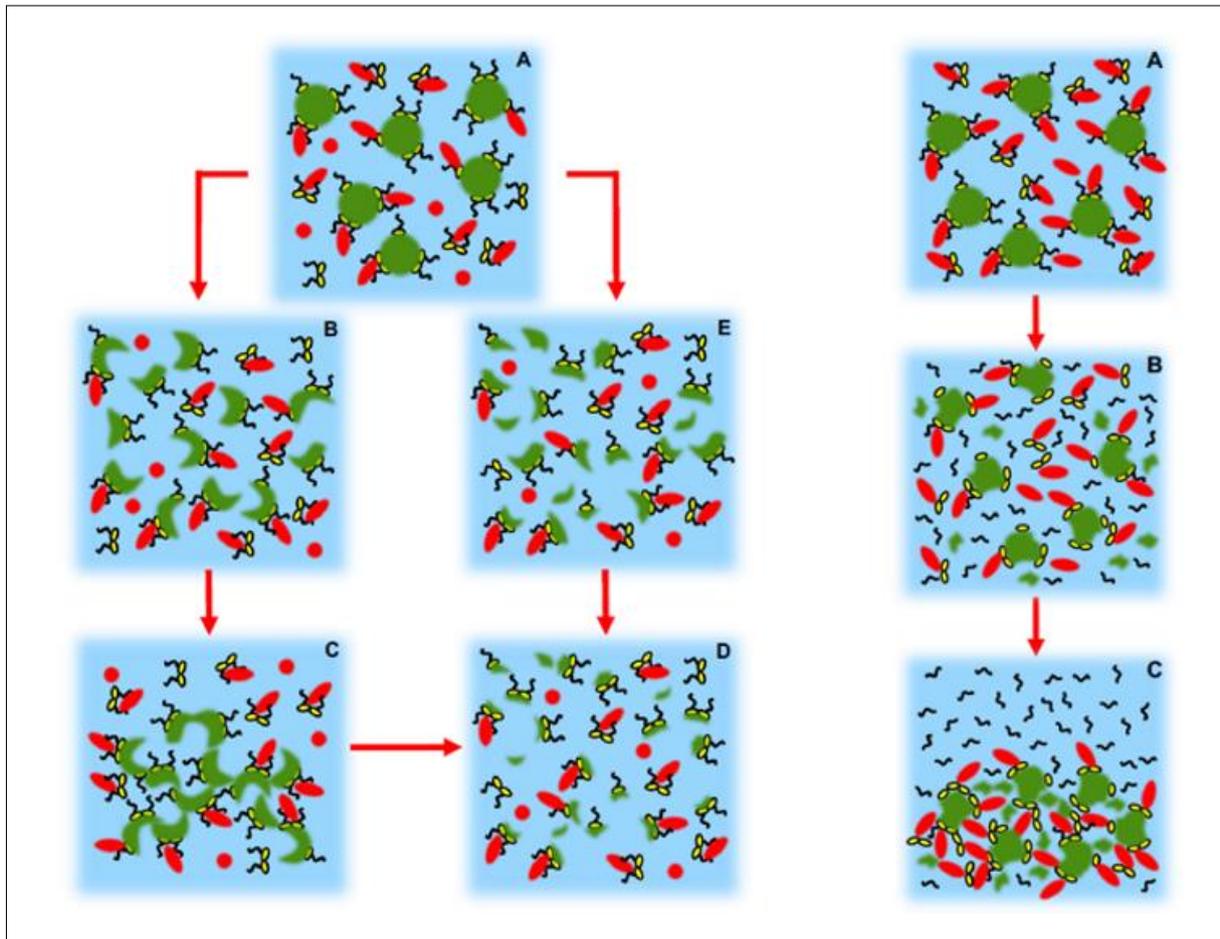


Fig. 2.2.3B – Meccanismi di gelificazione dovuti ad enzimi indigeni (a sinistra) ed esogeni (a destra).

Immagine di sinistra: Meccanismo di gelificazione del latte UHT dovuta alla plasmina. [A]: il latte appena sterilizzato vede proteine del siero non denaturate (cerchi rossi), proteine del siero di latte denaturate (ovali rossi), sia nella fase sierica sia aggregate con la κ - caseina (cerchi gialli con filamenti che rappresentano la frazione idrofilica della caseina, quest'ultima colorata in verde); [B]: la plasmina penetra e idrolizza lentamente le micelle di caseina (β , α -s1 e α -s2-caseine) formando dei frammenti; [C]: I frammenti si riarrangiano attraverso interazioni idrofobiche e ponti di calcio fino a formare un gel; [D]: un' ulteriore idrolisi della caseina rompe il gel, con conseguente chiarificazione del latte; [E]: Un' idrolisi troppo spinta delle micelle di caseina (>30/35 °C) che forma piccoli frammenti, i quali non gelificano ma portano direttamente a chiarificazione del latte (Fonte: Anema, 2018).

Immagine di destra: Meccanismo di gelificazione del latte UHT dovuta a proteasi batteriche. [A]: Si vedono le proteine del siero denaturate (ovali rossi) disperse nella fase sierica da sole o associate con la κ -caseina (cerchi giallo con le code nere), o semplicemente legate alla κ -caseina sulla superficie della micella (cerchi verdi). [B]: Gli enzimi esogeni (*AprX*) idrolizzano la κ -caseina nel siero e sulle micelle formando peptidi simili alla para- κ -caseina sulla superficie della micella e nel siero e glico-macro-peptidi nel siero. Vengono idrolizzate anche alcune β -caseine, e in misura minore l' α -S1/S2 caseina. [C]: Le micelle con para- κ -caseine sulla superficie interagiscono con molecole di para- κ -caseine disperse nella fase sierica e con le proteine del siero denaturate, attraverso legami idrofobici, formano un gel compatto. Dopo la formazione del gel può verificarsi un'ulteriore idrolisi della caseina (Fonte: Anema, 2018).

2.3 Gelificazione non enzimatica

In alcuni casi la gelificazione si verifica in totale assenza di proteolisi delle proteine del latte UHT. Quando avviene, questo tipo di gelificazione è chiamata "fisico-chimica" o "non enzimatica". A differenza di quella indotta dalla proteolisi, la quale di solito si verifica entro i primi mesi di conservazione, la gelificazione chimico-fisica sembra essere più lenta, in quanto per la maggior parte dei campioni la comparsa del fenomeno richiede solitamente più di dodici mesi. (Anema, 2018). Alcuni studi hanno indicato che gli effetti stagionali hanno un ruolo molto importante affinché si verifichi tale tipo di gelificazione; Auldust *et al.* (1996) e Hardham e Auldust (1996) hanno esaminato campioni di latte UHT prodotti a partire da latte d'inizio e di fine lattazione con un basso e un alto numero di cellule somatiche. Si è verificata tra i cinque e i sei mesi di conservazione a 20 °C per il latte di prima lattazione, mentre i campioni di latte di tarda lattazione sono rimasti stabili per tutti i nove mesi. La conta delle cellule somatiche e i livelli iniziali di plasmina/plasminogeno dei campioni di latte prima della lavorazione UHT non hanno influenzato la comparsa del difetto. Poiché non è stato osservato alcun aumento significativo della proteolisi durante la conservazione, si poté concludere che l'attività proteolitica delle proteinasi batteriche e native del latte non furono coinvolte nel processo di gelificazione. I campioni di latte di inizio e fine lattazione avevano composizioni proteiche e minerali nettamente diverse: quello di inizio presentava una concentrazione proteica, di calcio e di sodio inferiore rispetto a quello di tarda lattazione. Ci si sarebbe aspettati che i livelli più bassi di proteine e di calcio diminuissero la tendenza a gelificare, ma si è osservato il contrario. Tuttavia, è il livello di calcio ionico che è importante per la stabilità del latte, il quale per l'appunto dipende maggiormente dal pH e dai livelli di fosfato e citrato della fase sierica che dalla concentrazione totale di calcio e fosfati. (Holt, 1985). I primi studi in merito hanno dimostrato che all'aumentare della concentrazione del latte prima dei trattamenti UHT si accelerava il processo di gelificazione. Ad esempio de Koning e Kaper (1985) riscontrarono che i campioni di latte condensato gelificavano entro poche settimane di conservazione a 30 °C, anche in presenza di inibitori di proteinasi. Analogamente, in uno studio approfondito, Anema (2018) confermò che i campioni di latte gelificano più rapidamente all'aumentare della concentrazione. Sono stati proposti diversi meccanismi per la spiegazione della gelificazione chimico-fisica negli ultimi decenni, anche se nessuno di questi è stato universalmente accettato. Andrews e Cheeseman (1971) ipotizzarono la formazione di aggregati proteici ad alto peso molecolare durante la conservazione. Si pensava che le proteine creassero una sorta di reticolo conseguentemente alla reazione di Maillard e che la gelificazione del latte fosse dovuta alla

formazione, durante la conservazione, di questi grandi aggregati proteici. L'ipotesi era che questi si unissero fra loro intrappolando la fase sierica. Questo meccanismo è improbabile, in quanto diversi studi hanno dimostrato che il livello di zuccheri riducenti, e quindi la propensione del latte alla reazione di Maillard, non ha alcun effetto sulla stabilità di conservazione e sulla gelificazione del latte. Tutt'ora, il modello presentato da Anema (2017) risulta essere il più attendibile. Monitorando durante lo stoccaggio numerose proprietà dei

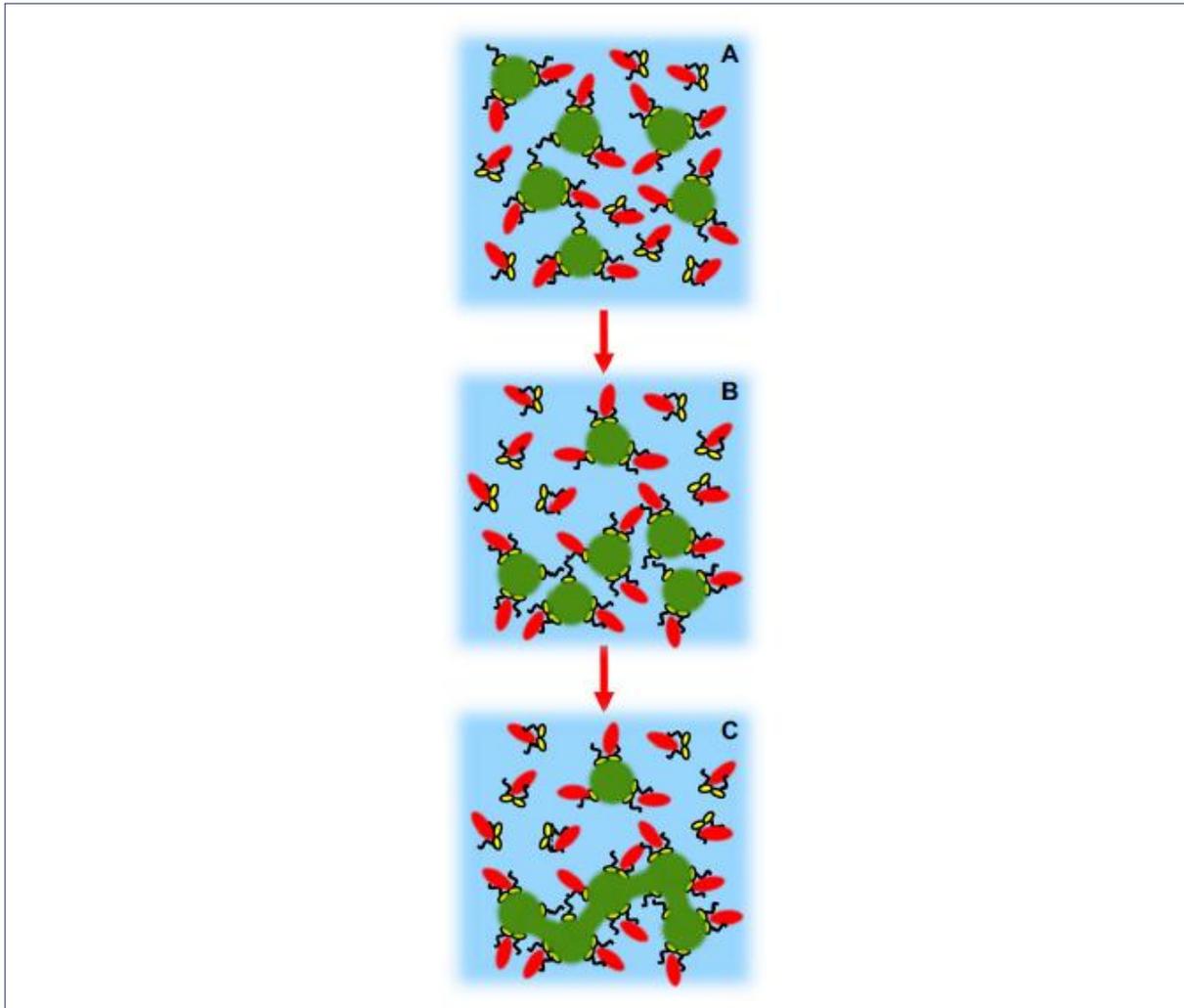


Fig. 2.3 – Gelificazione non enzimatica di latte UHT prodotto con metodo indiretto (Fonte: Anema, 2018). [A]: si vedono nella fase sierica delle proteine del siero denaturate (ovali rossi, molto probabilmente β – lattoglobulina) complessate con κ – caseina libera nel siero (cerchi gialli con code nere); inoltre si vedono anche le stesse proteine del siero denaturate legate alla κ -caseina ancora parte delle micelle di caseina (cerchi verdi). [B]: durante lo stoccaggio, le micelle si impoveriscono di κ – caseina e si depositano lentamente per effetto della gravità. [C]: In caso di conservazione prolungata, l'alta concentrazione di micelle impoverite di κ – caseina, grazie anche ad un leggero aumento del pH, fa sì che queste ultime si aggregino fra loro e formano un gel. I complessi β -lattoglobulina/ κ -caseina rimangono nel siero al momento della gelificazione iniziale ma possono essere intrappolati nel gel durante gelificazione estesa.

campioni (equilibri minerali, pH, proteine della fase sierica etc.) si accorse che nessuna di queste influenzava in qualche modo la tendenza del latte UHT a gelificare o rimanere stabile. L'unico indicatore che dava indicazione certa di gelificazione imminente era la dimensione delle particelle; le micelle di caseina infatti iniziano ad aumentare di diametro circa un mese prima della formazione di un gel visibile ad occhio nudo. In questo studio di Anema (2017) è stato dimostrato che una grande proporzione del complesso β -lattoglobulina/ κ -caseina si trova nella fase sierica subito dopo il trattamento UHT e durante la conservazione il livello nella fase sierica non varia, anche a gelificazione avvenuta. Osservò che nei campioni gelificati, la suddetta fase era composta da micelle di caseina impoverite di κ -caseina; questo suggerì che la gelificazione chimico-fisica non è proporzionale alla quantità di complessi β -lattoglobulina/ κ -caseina, ma piuttosto alle caseine impoverite di κ -caseina. Il trattamento UHT forma micelle impoverite di κ -caseina (in quanto si dissocia); queste sono metastabili, ovvero perdurano in condizione di equilibrio fintanto che non viene fornito al sistema un quantitativo sufficiente di energia che lo porta ad una nuova condizione. Durante la conservazione, le micelle impoverite si concentrano lentamente sul fondo della confezione per sedimentazione gravitazionale; il pH del latte inoltre si abbassa e facilita la lenta aggregazione tra le micelle impoverite di κ -caseina; nell'insieme questi fenomeni portano alla gelificazione. La gelificazione inizia sul fondo del contenitore per via della sedimentazione iniziale, ma progredisce verso l'alto man mano che altre micelle si depositano e si uniscono allo strato gelificato. Quando la gelificazione è estesa, i complessi β -lattoglobulina/ κ -caseina (che comunque ci sono in quanto si formano sia durante il trattamento UHT sia durante lo stoccaggio) rimangono intrappolati all'interno della rete di gel e questo può erroneamente far sembrare che abbiano un ruolo nella gelificazione. In generale, la maggior parte dei campioni di latte UHT non gelifica entro i dodici mesi. Tuttavia, c'è sempre il rischio che alcuni campioni possano farlo prima, ma è difficile isolare le ragioni di questo fenomeno. Potrebbe essere per effetto della stagionalità o a causa di eventi isolati (per esempio, stagioni con grave siccità) e alla fase di lattazione (precoce o tardiva).

3 Fattori influenti e controllo del fenomeno

Dopo i cambiamenti iniziali indotti dal calore, altri se ne verificano lentamente durante la conservazione. La facilità con cui gelifica è determinata come si è visto da più processi che agiscono soli o contemporaneamente. La gelificazione si verifica in latte con diverse caratteristiche e dopo diversi periodi di conservazione. La ragione di questa variabilità è anche dovuta al fatto che ci sono diversi fattori che influenzano la mungitura, le caratteristiche nutrizionali e microbiologiche del latte e ognuno di questi gioca un ruolo decisivo nell'incidenza del fenomeno di gelificazione. Tra questi vale la pena citare: modalità e severità del trattamento termico, differente grado di proteolisi, tipo di proteolisi, qualità microbiologica del latte crudo, temperatura di conservazione del latte UHT, additivi e contenuto di grasso.

3.1 Fattori intrinseci del latte

Qualità microbiologica

Il latte con un'elevata carica microbica prima della lavorazione è ovviamente più suscettibile alla formazione di gel rispetto ad uno che presenta invece una carica microbica totale più bassa, per il motivo che saranno prodotte più proteasi esogene. Lunghi tempi di refrigerazione prima del trattamento di sterilizzazione consentono una maggiore crescita dei microrganismi psicrotrofi e la concomitante concentrazione di enzimi termostabili, in particolare proteinasi e lipasi. Una microfiltrazione prima del trattamento sterilizzante garantisce di ridurre al minimo questo rischio.

Attività plasminica

Nel latte l'attività plasminica aumenta con l'aumentare dell'età della vacca; è stato riscontrato avendo tenuto conto anche della correlazione statistica con la quantità di cellule somatiche, la stagione di mungitura e lo stadio di lattazione; i livelli di plasminogeno invece non sembrano cambiare allo stesso modo. L'attività della plasmina nel latte rimane costante durante la prima lattazione, ma aumenta nel corso del tempo. Di conseguenza, il latte delle vacche più anziane gelifica più velocemente rispetto a quello di vacche giovani (Politis *et al.*, 1989).

Mastiti

Il latte mastitico (cioè, con un elevato numero di cellule somatiche, SC) sottoposto a trattamento UHT è più suscettibile a gelificazione rispetto al latte normale. Ciò è stato attribuito ad attività proteolitica derivante da un elevato livello di plasmina. Auld *et al.* (1996) hanno dimostrato che, durante la conservazione a 20 °C, se la materia prima di partenza presenta alto livello di SC il latte UHT che ne deriva è più soggetto a proteolisi rispetto ad uno a basso contenuto iniziale, anche se tale livello di proteolisi non è necessariamente correlato con la tendenza a gelificare. In ogni caso comunque, i lattici con alta SC vedono insorgere il difetto più velocemente.

Contenuto di grasso

Il latte scremato UHT è più incline a gelificare rispetto al latte intero UHT. Ciò può essere attribuito a una maggiore azione della plasmina e delle proteinasi batteriche nel latte scremato rispetto al latte intero (Lopez-Fandino *et al.*, 1993). Questa differenza è dovuta al fatto che il grasso presente nel latte intero ostacola l'accesso degli enzimi ai loro substrati (Hsu, 1984).

Stagionalità

La variazione stagionale della composizione del latte può influenzare indirettamente il processo di gelificazione. È stato appurato infatti che dal latte estivo si ottiene un UHT più stabile rispetto a quello invernale. In un'indagine australiana, si evince che dal latte munto ad inizio primavera/fine inverno e fine autunno/inizio inverno si riscontrano maggiori difetti di gelificazione rispetto al latte prodotto nei periodi opposti. I risultati ottenuti dai vari studi sono vari ma tutti pongono particolare attenzione alle differenze nella composizione minerale del latte durante le diverse stagioni (Hardham e Auld, 1996).

UFC/ml	Tempo di gelificazione, in giorni
$<8 \cdot 10^6$	>140
$8 \cdot 10^6$	≈ 63
$5 \cdot 10^7$	≈ 12

Tab. 3.1 – Correlazione tra UFC/ml di batteri psicotrofi e tempo di gelificazione (Fonte: Datta e Deeth, 2001).

3.2 Modalità e severità del trattamento termico

La severità dei trattamenti termici durante il preriscaldamento e la sterilizzazione vera e propria è un fattore molto importante per ritardare efficacemente la gelificazione del latte UHT. Soprattutto nei casi in cui questa è avviata da proteolisi catalizzata da plasmina. Un adeguato riscaldamento porta alla denaturazione della maggior parte della β -lattoglobulina e la complessazione delle proteine del siero, in particolare proprio quest'ultima, con la κ -caseina. Questo trattamento inattiva gran parte dell'attività plasminica, ma allo stesso tempo induce un aumento della probabilità di una gelificazione chimico-fisica. Barach *et al.* (1976) provarono che gli enzimi termoresistenti potevano essere inattivati mediante trattamento a media temperatura (~55 °C) per un periodo prolungato (30–60 minuti). L'efficacia di questo trattamento di inattivazione è indipendente dalla concentrazione di proteinasi e non altera in modo significativo l'aroma del latte. Il metodo può essere applicato prima o dopo la sterilizzazione ed è più efficace quando viene eseguito almeno un giorno dopo che il latte ha subito il trattamento UHT. Inizialmente fecero delle prove riscaldando delle soluzioni acquose contenenti appunto le proteasi batteriche precedentemente isolate; riscontrarono che l'attività poteva essere ridotta di una riduzione decimale dopo appena dieci minuti di riscaldamento. L'inattivazione però era più lenta e meno efficace nel latte, per via della viscosità: mostrava infatti una riduzione di solo il 70% circa dopo 60 minuti a 55 °C. Le ragioni per cui il trattamento termico prolungato a 55 °C fosse in grado di ridurre l'attività proteolitica non è stato ancora del tutto chiarito, ma è di comune accordo credere che avvenga un processo di aggregazione fra le proteine del latte e gli enzimi stessi tale da neutralizzarli (Barach *et al.*, 1976; Deeth e Lewis, 2016). Anni dopo, Griffiths *et al.* (1988) dimostrarono che le proteasi prodotte da diverse specie e sottospecie di batteri psicrotrofi avevano stabilità variabile a questo tipo di trattamento termico e che però in alcuni casi l'attività enzimatica rimanesse quasi inalterata.

3.3 Additivi

L'aggiunta di sodio fosfato e sodio citrato accelera la gelificazione, mentre l'aggiunta di polifosfati come l'esametafosfato di sodio la ritarda (Snoeren *et al.*, 1979;). La protezione contro la gelificazione da parte dei polifosfati aumenta proporzionalmente con la lunghezza del polimero e sua la concentrazione all'interno della matrice alimentare. I polifosfati ciclici sono più efficaci dei corrispondenti polimeri lineari. Questo perché sono stabili contro l'idrolisi:

quelli lineari vengono lentamente convertiti in ortofosfato, il quale è capace di accelerare poi la velocità di gelificazione. Sono inoltre incapaci di formare complessi con il Ca^{++} che di sé possiede un'attività anti-gelificante se non complessato ad altre molecole. Kocak e Zadow (1985b) aggiunsero cloruro di calcio (0,05% w/w), sodio esametafosfato (SHMP, 0,1% w/w) e acido etilendiamminotetraacetico (EDTA, 0,3% w/w) a del latte crudo, per poi conservarlo a 2 °C per 120–168 giorni prima di eseguire il trattamento UHT. I lattici con lo 0,3% di EDTA aggiunto hanno gelificato più o meno nello stesso tempo dei campioni di controllo (senza additivi aggiunti). L'aggiunta dello 0,05% di cloruro di calcio o dello 0,1% di SHMP al latte prima del trattamento di sterilizzazione ne ha comportato un notevole aumento della stabilità, senza gelificazione evidente anche dopo 500 giorni a 25 °C. Secondo Kocak e Zadow (1985b) questi additivi agiscono stabilizzando il sistema proteico del latte attraverso l'associazione degli stessi con la caseina, alterando la carica netta delle micelle. L'aggiunta di un basso livello di SHMP faciliterebbe la formazione di legami ionici tra i vari gruppi ionizzati delle micelle. Questo manterrebbe la κ -caseina legata più strettamente alla micella e ne ritarderebbe il suo rilascio, diminuendo la formazione di micelle impoverite di κ -caseina

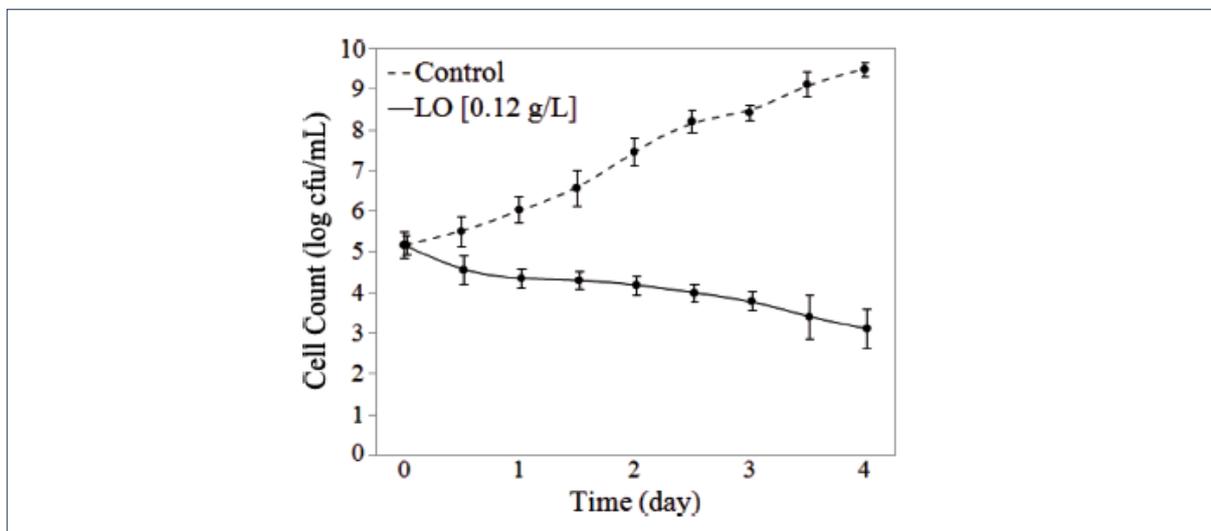


Fig. 3.3 – UFC/ml di *Pseudomonas spp.* in latte UHT trattato con LO durante conservazione a 6 °C (Fonte: Rivera Flores *et al.*, 2021).

(vedasi capitolo 2.3) ritardando di conseguenza la gelificazione durante la conservazione. La lattosio ossidasi (LO), un enzima naturale e disponibile in commercio, produce perossido di idrogeno e acido lattobionico a partire dal lattosio e si è visto come può controllare la crescita batterica nel latte crudo. Rivera Flores *et al.*, (2021) hanno esplorato la capacità della LO di controllare la crescita di *Pseudomonas spp.* che, potenzialmente, può originare gelificazione

nel latte UHT essendo un grande produttore di proteasi termostabili. Nell'esperimento ne hanno inoculato vari ceppi in diversi campioni di latte UHT, aggiungendo allo stesso tempo la LO in proporzione variabile. I risultati hanno mostrato che 0,24 g/L di LO inibiscono la crescita batterica e impediscono la comparsa del difetto di conservazione. I campioni inoculati sia con ceppi batterici che con LO non hanno gelificato fino e oltre sei mesi di conservazione a temperatura ambiente; i campioni inoculati solo con i batteri senza l'aggiunta di LO sono andati incontro a gelificazione dopo appena tre mesi.

3.4 Temperatura di stoccaggio

La temperatura di conservazione influisce in modo significativo sul tempo di gelificazione rispetto agli altri parametri. La figura 3.4 riassume i dati di diversi reports sull'effetto della temperatura di conservazione. In generale, si può dire che la gelificazione si verifica più rapidamente a temperatura ambiente (~25/30 °C) rispetto a temperatura bassa (~4 °C) e alta (~35/40 °C). La conservazione del latte UHT a una temperatura inferiore o superiore all'intervallo ottimale per la gelificazione (25/30 °C) ritarda la comparsa del difetto, come si può vedere nella figura 3.4.

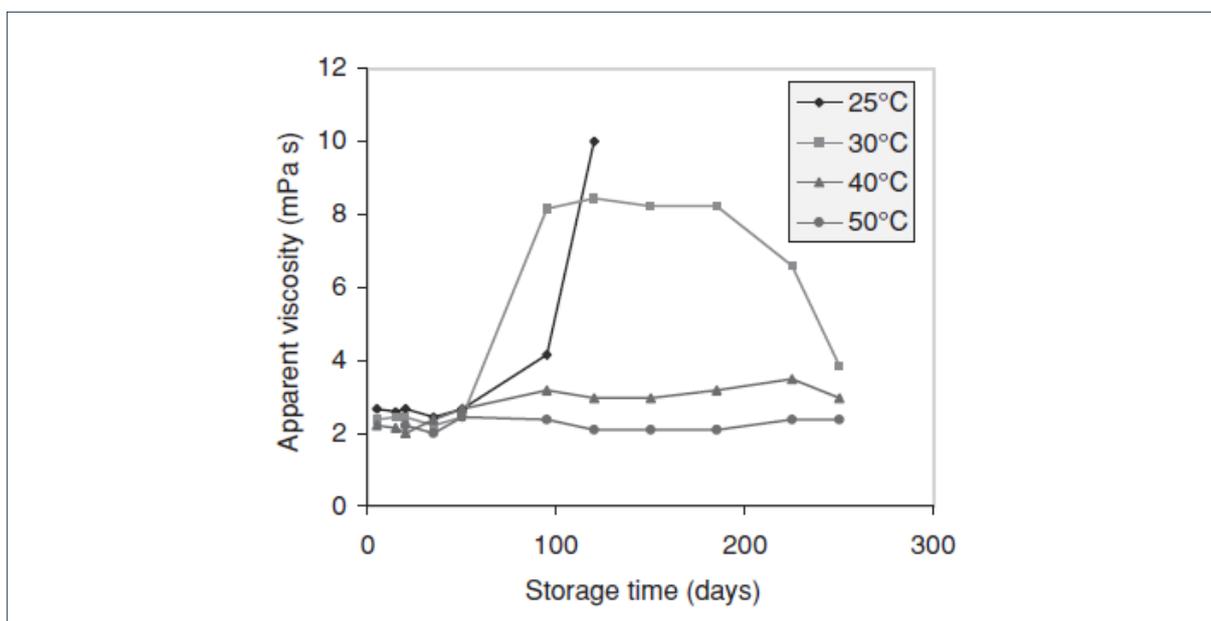


Fig. 3.4 – Aumento di viscosità dovuto a gelificazione durante conservazione a differenti temperature (Fonte: Kocak e Zadov, 1985a).

4 Conclusioni

Il trattamento UHT è una tecnologia di successo e oramai consolidata che viene utilizzata per prolungare la *shelf life* del latte. Tuttavia, può succedere che durante lo stoccaggio le caratteristiche dell'alimento non si mantengano come programmato, a causa di modifiche chimiche e fisiche irreversibili. In questo elaborato è stato discusso il fenomeno che causa queste modifiche nella matrice alimentare, ovvero la gelificazione, dalla sua origine alla spiegazione nel dettaglio dei due meccanismi responsabili. Per poter capire al meglio l'argomento trattato si è voluto introdurre per prima cosa la sterilizzazione UHT, distinguere le due modalità di esecuzione del processo ed approfondire le conseguenze che tale trattamento termico comporta nella latte. Sono state poi viste per prime le due tipologie di gelificazione enzimatica: indotta da enzimi indigeni e poi da enzimi esogeni. I primi sono naturalmente presenti nel latte e la loro presenza è inevitabile, mentre la presenza dei secondi è dovuta molto probabilmente a scorrette prassi igieniche. L'attività plasminica induce gelificazione conseguentemente all'idrolisi delle caseine β , α -s1 e α -s2. Queste proteine vengono idrolizzate lentamente e le micelle di caseina si destabilizzano; i frammenti delle stesse si aggregano poi tra loro formando una struttura a rete in grado di inglobare la componente acquosa. La formazione del gel dovuto a proteasi batteriche è simile ma inizia con l'idrolisi della κ -caseina in para- κ -caseina e glico-macro-peptidi che si riversano nel siero. Anche qui attraverso interazioni idrofobiche avviene poi la formazione di un gel compatto. La cosa interessante è come i due differenti enzimi abbiano come substrato preferito l'uno l'opposto dell'altro. Si è visto come il fenomeno, nonostante sia evitabile mantenendo semplicemente le temperature di conservazione adeguate, sia allo stesso tempo di facile incidenza se non venissero osservati dei requisiti igienici e di processo prima, durante e dopo il trattamento termico. Opportuni studi hanno confermato come i trattamenti termici sterilizzanti possono inattivare quasi completamente (99%) gli enzimi del sistema della plasmina, mentre l'uso di latte di buona qualità e di GMP (Good Manufacturing Practice) durante la produzione e conservazione del latte UHT sia sufficiente a scongiurare la gelificazione dovuta ad enzimi esogeni. In quest'ultimo caso i criteri di igiene di processo sono veramente molto importanti, in quanto una volta verificata la contaminazione batterica ed una conseguente crescita esponenziale, la secrezione di enzimi extracellulari termoresistenti è pressoché certa. Una volta che tali molecole sono presenti nel latte, non possono essere eliminate attraverso la lavorazione od ulteriori accorgimenti in fase produttiva, come ad esempio l'aumento del carico termico; per cui la

minimizzazione della contaminazione a monte della produzione è l'approccio da preferire nonché l'unico possibile. Poiché il latte UHT ha una conservabilità che può superare facilmente l'anno, in questo lungo periodo di tempo avvengono anche processi chimico-fisici (non di natura enzimatica) che inficiano la *shelf life* della matrice alimentare allo stesso modo. La gelificazione può infatti verificarsi anche a causa di riarrangiamenti della struttura molecolare del latte, che comprende per lo più interazioni tra proteine, cambiamento del pH e dei livelli di calcio ionico. Infatti, nonostante fra tutte le tipologie di gelificazione questo meccanismo sia il meno chiaro, è ormai certo che dipende dai livelli di pH e calcio ionico al momento della produzione e da come questi cambiamenti si verificano nel corso della conservazione. Le tipologie di gelificazione di natura enzimatica possono essere definite attraverso l'uso di HPLC a fase inversa, in quanto gli enzimi responsabili della proteolisi possono essere identificati direttamente esaminando i tempi di eluizione. Se invece il difetto è in stato avanzato, un giudizio visivo è sufficiente a determinarne la causa, essendo la gelificazione dovuta a proteasi batteriche molto più compatta e in grado di produrre un'isteresi più evidente. Il difetto si verifica in tipi di latte con diverse caratteristiche e dopo diversi periodi di conservazione. I fattori che hanno capacità di influenzare il processo sono molti e in base alle caratteristiche del latte sono più o meno protagonisti nella comparsa del difetto.

5 Bibliografia

Andrews, A.T., & Cheeseman, G.C. (1971) Properties of aseptically packed UHT milk: Casein modification during storage and studies with model systems. *Journal of Dairy Research*, 38[2], 193–207.

Anema, S.G., & Yuming Li. (2003) Association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk and its effect on casein micelle size. *Journal Dairy Research*, 70, 73–83.

Anema, S.G. (2017) Storage stability and age gelation of reconstituted ultra-high temperature skim milk. *International Dairy Journal*, 75, 56–67.

Anema, S.G. (2018) Age Gelation, Sedimentation, and Creaming in UHT Milk: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 18 (2019).

Auldist, M.J., Coats, S.J., Sutherland, B.J., Hardham, J.F., McDowell, G.H., e Rogers, G.L. (1996) Effect of somatic cell count and stage of lactation on the quality and storage life of ultra-high temperature milk. *Journal of Dairy Research*, 63[3], 377–386.

Baglinière F., Tanguy G., Jardin J., Matéos A., Briard-Bion V., Rousseau F., Robert B., Beaucher E., Gaillard JL., Amiel C., Humbert G., Dary A., Gaucheron F. (2013) Proteolysis of ultra-high temperature-treated casein micelles by AprX enzyme from *Pseudomonas fluorescens* induces their destabilisation. *International Dairy Journal* 31, 55–61.

Baglinière, F., Tanguy, G., Jardin, J., Mateos, A., Briard, V., Rousseau, F., Gaucheron, F. (2012) Quantitative and qualitative variability of the caseinolytic potential of different strains of *Pseudomonas fluorescens*: Implications for the stability of casein micelles of UHT milks during their storage. *Food Chemistry*, 135[4], 2593–2603.

Baglinière, F., Tanguy, G., Salgado, R. L., Jardin, J., Rousseau, F., Robert, B., Gaucheron, F. (2017) Ser2 from *Serratia liquefaciens* L53: A new heat stable protease able to destabilize UHT milk during its storage. *Food Chemistry*, 229, 104–110.

Barach, J.T., Adams, D.M., Speck, M.L. (1976) Low temperature inactivation in milk of heat-resistant proteases from psychrotrophic bacteria. *Journal of Dairy Science*, 59[3], 391–395.

- Bastian, E.D., & Brown, R.J. (1996) Plasmin in milk and dairy products: An update. *International Dairy Journal*, 6[5], 435–457.
- Bastian, E. D., Brown, R. J. and Ernstrom, C. A., (1991) Plasmin activity and milk coagulation, *Journal of Dairy Science*, 74[11], 3677–3685.
- Bonisch, M.P., Lauber, S., Kulozik, U. (2004) Effect of ultra-high-temperature treatment on the enzymatic cross-linking of micellar casein and sodium caseinate by transglutaminase. *Journal of Food Science* 69, 398–404.
- Corradini, C., & Pecchini, G. (1981) Effect on proteinases of different UHT treatments. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 35[3-4], 393–395.
- Crudden, A., Afoufa-Bastien, D., Fox, F., Brisson, G., Kelly, L. (2005a) Effect of hydrolysis of casein by plasmin on the heat stability of milk. *International Dairy Journal*, 15[10], 1017–1025.
- Crudden, A., Patrick, Fox, F., Kelly, L. (2005b) Factors affecting the hydrolytic action of plasmin in milk. *International Dairy Journal*, 15[4], 305–313.
- D’Incecco, P., Rosi, V., Fortina, M.G., Sindaco, M., Ricci, G., Pellegrino L. (2022) Biochemical, microbiological, and structural evaluations to early detect age gelation of milk caused by proteolytic activity of *Pseudomonas fluorescens*, *European Food Research and Technology*, 248, 2097–2107.
- Dalgleish, D., & Corredig, M. (2012) *Annual Review of Food Science and Technology*, 3: 449–67.
- Datta, N. & Deeth, H.C. (2001) Age gelation of UHT milk – a review. Dairy Industry Centre for UHT Processing, School of Land and Food Sciences, University of Queensland, Australia. *Trans iChemE*, vol. 79.
- Datta, N. & Deeth, H.C. (2003) Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. *Lebensmittel–Wissenschaft und Technology*, 36, 173–182.
- Datta, N., Elliott, A.J., Perkins, M.L. & Deeth, H.C. (2002) Ultra-High Temperature (UHT) treatment of milk: comparison of direct and indirect modes of heating. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57, 211–227.

- de Koning, P. J., & Kaper, J. (1985) Effects of some proteinase inhibitors and of the Maillard reaction on the processes of age-thinning and gelation of UHTST-sterilized concentrated casein micelle dispersions. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 39[1], 37–47.
- Deeth, H. C., & Lewis, M. J. (2016) Protein stability in sterilized milk and milk products. In: P. L. H. McSweeney & O. M. J. A., *Advanced dairy chemistry-1B: Proteins: Applied aspects*, 4th ed., 247–286.
- Dunkley W.L., & Stevenson K.E. (1987) Ultra-high-temperature processing and aseptic packaging of dairy products. *Journal Dairy Science*, 70:2, 192–202.
- Elfagm A.A., & Wheelock J.V. (1978) Heat interaction between α -lactalbumin, β -lactoglobulin and casein in bovine milk. *Journal Dairy Science*, 61, 159–63.
- Fox, P.F. & Brodtkorb, A. (2008) The casein micelle: historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal*, 18, 667–684.
- Fox, P.F. (2003) Milk proteins: general and historical aspects. In: *Advanced Dairy Chemistry, Volume 1: Proteins*, 3rd edition, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1–48.
- Gösta B. (2003) *Dairy processing handbook*. Chapter 9, 2nd ed. Lund, Sweden: Tetra Pak Processing Systems, S-221, 86, 227–44.
- Graf, B., Schäfer J., Atamer, Z., Hinrichs, J. (2021) Chapter 12: The Heat Stability of Indigenous and Bacterial Enzymes in Milk. In: Kelly & Larsen, *Agents of Change – Enzymes in Milk and Dairy Products*, 301.
- Griffiths, M.W., Phillips, J.D., & Muir, D.D. (1981) Thermostability of proteases and lipases from a number of species of psychrotrophic bacteria of dairy origin. *Journal of Applied Bacteriology*, 50[2], 289–303.
- Griffiths, M.W., Phillips, J.D., West, I.G., & Muir, D.D. (1988) The effect of extended low-temperature storage of raw milk on the quality of pasteurized and UHT milk. *Food Microbiology (London)*, 5[2], 75–88.
- Hardham, J., & Auldish, M. (1996) The effect of stage of lactation and somatic cell count on the age-gelation of UHT milk. In: *Heat treatments & alternative methods*, International Dairy Federation, 350–353

Haryani, S., Datta, N., Elliott, A.J., & Deeth, H.C. (2003) Production of proteinases by psychrotrophic bacteria in raw milk stored at low temperature. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58[1], 15–20.

Hilton C. Deeth (2021) Heat-induced inactivation of enzymes in milk and dairy products: A review. *International Dairy Journal*, 121.

Holt, C. (1985) The milk salts: Their secretion, concentrations and physical chemistry. In P. F. Fox, *Developments in dairy chemistry* 3, 143–181.

Holt, C. (1992) Structure and stability of bovine casein micelles. *Advances in Protein Chemistry*, 43, 63–151.

Hsu, H.Y., (1984) Methods for Measuring the Activities of Bacterial and Native Proteinases in Milk and a Study of Factors Affecting Milk Protein Hydrolysis, PhD Thesis (Cornell University, USA).

Https 1: <https://www.futuremarketinsights.com/reports/uht-milk-market>

Https 2: <https://www.parmalat.it/prodotti/latte/latte-uht>

Huppertz, T., & Kelly, A.L. (2009) Properties and Constituents of Cow's Milk. In: Adnan Y. Tamime, *Milk Processing and Quality Management*.

Ismail, B., & Nielsen, S.S. (2010) Plasmin protease in milk: Current knowledge and relevance to dairy industry. *Journal of Dairy Science*, 93[11], 4999–5009.

Kelly, A.L., & Fox, P.F. (2006) Indigenous enzymes in milk: A synopsis of future research requirements. *International Dairy Journal*, 16[6], 707–715.

Kelly, A.L., & Larsen L.B. (2021) Agents of Change: Enzymes in Milk and Dairy Products, 276.

Kessler, H.G. (1981) *Food engineering and Dairy technology*.

Kocak, H.R. and Zadow, J.G. (1985b) Controlling age gelation of UHT milk with additives, *Australian Journal of Dairy Technology*, 40[2], 58–64.

Kocak, H. R., & Zadow, J.G. (1985a) Age gelation of UHT whole milk as influenced by storage temperature. *Australian Journal of Dairy Technology*, 40[1], 14–21.

- Le, T.X., Datta, N., Deeth, H.C. (2006) A sensitive method for measuring bacterial proteolysis and proteinase activity in UHT milk. *Food Research International*, 39, 823–830.
- Lewis & Deeth, (2009) Heat Treatment of Milk. In: Adnan Y. Tamime, *Milk Processing and Quality Management*.
- Li, S., Ye, A., Singh, H. (2019) Seasonal variations in composition, properties, and heat-induced changes in bovine milk in a seasonal calving system. *Journal of Dairy Science*, 102, 7747–7759.
- Lopez-Fandino, R., Olano, A., Corzo, N., Ramos, M. (1993) Proteolysis during storage of UHT milk-differences between whole and skim milk. *Journal of Dairy Research*, 60[3], 339–347.
- Lyster, R, L. J. (1964) The free and masked sulphhydryl groups of heated milk powder and a new method for their determination, *J Dairy Res*, 31[1], 41–51.
- Machado, S.G., Baglinière, F., Marchand, S., Van Coillie, E., Vanetti, M.C.D., De Block, J., Heyndrickx, M. (2017) The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 8, 302.
- Malmgren, B., Ardeo, Y., Langton, M., Altskear, A., Bremer, M.G.E.G., Dejmek, P., *et al.* (2017) Changes in proteins, physical stability and structure in directly heated UHT milk during storage at different temperatures. *International Dairy Journal*, 71, 60–75.
- Marangoni, F., Pellegrino, L., Agrimi, U., Verduci, E., Ghiselli, A., Bernabei, R., Calvani, R., Cetin, I., Giampietro, M., Perticone, F., Piretta, L., Giacco, R., La Vecchia, C., Brandi, M.L., Ballardini, D., Banderali, G., Bellentani, S., Canzone, G., Copparoni, R., Cricelli, C., Faggiano, I., Ferrara, N., Flachiv, E., Gonnelli, S., Macca, C., Magni, P., Marelli, G., Marrocco, W., Miniello, V., Origo, C., Pietrantonio, F., Silvestri, P., Stella, R., Strazzullo, P., Troiano, E., Polia, A., (2017) Il latte vaccino: Ruolo nell'alimentazione umana ed effetti sulla salute, *Nutrition foundation of Italy*.
- Morales, F.J., Romero, C., Jimenez-Perez, S. (2000) Characterization of industrial processed milk by analysis of heat-induced changes. *International Journal Food Science Technology*, 35, 193–200.

- Newstead, D.F., Paterson, G., Anema, S.G., Coker, C.J., Wewala, A.R. (2006) Plasmin activity in direct-steam-injection UHT-processed reconstituted milk: Effects of preheat treatment. *International Dairy Journal*, 16[6], 573–579.
- Politis, I., Ng Kwai Hang, K.F., Giroux, R.N. (1989) Environmental factors affecting plasmin activity in milk. *Journal Dairy Science*, 72[7], 1713–1718.
- Rauh, V.M., Johansen, L.B., Ipsen, R., Paulsson, M., Larsen, L. B., & Hammershoj, M. (2014a) Plasmin activity in UHT milk: Relationship between proteolysis, age gelation, and bitterness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(28), 6852–6860.
- Rauh, V.M., Sundgren, A., Bakman, M., Ipsen, R., Paulsson, M., Larsen, L.B., Hammershoj, M. (2014b) Plasmin activity as a possible cause for age gelation in UHT milk produced by direct steam infusion. *International Dairy Journal*, 38[2], 199–207.
- Raynes, J., Vincent, D., Zawadzki, J., Savin, K., Mertens, D., Logan, A. (2018) Investigation of age gelation in UHT milk beverages, 4, article 95.
- Rivera Flores, V.K., DeMarsh, T.A., D. Alcaine, S., (2021) Enzymatic control of *Pseudomonas*. *Journal of Dairy Science* vol. 104 n° 3, 2021, 2758–2772.
- Singh, H. (2004) Heat stability of milk. *International Journal Dairy Technology*, 57, 111–9.
- Siqi, Li, Aiqian, Ye, Singh, H. (2021) Physicochemical changes and age gelation in stored UHT milk: seasonal variations. *International Dairy Journal*, 118.
- Snoeren, T.H.M., van der Spek, C.A., Dekker, R. and Both, P., (1979) Proteolysis during the storage of UHT-sterilized whole milk. I. Experiments with milk heated by the direct system for 4 seconds at 142 °C, *Netherlands Milk Dairy Journal*, 33[1], 31–39.
- Solano–Lopez, C.E., Ji, T., Alvarez, V.B. (2005) Volatile compounds and chemical changes in ultrapasteurized milk packaged in polyethylene terephthalate containers. *Journal Food Science*, 70, 407–12.
- Stoeckel, M., Lidolt, M., Achberger, V., Gluck, C., Krewinkel, M., Stressler, T., Hinrichs, J. (2016) Growth of *Pseudomonas weihenstephanensis*, *Pseudomonas proteolytica* and *Pseudomonas spp.* in raw milk: Impact of residual heat-stable enzyme activity on stability of UHT milk during shelf-life. *International Dairy Journal*, 59, 20–28.

von Neubeck, M., Baur, C., Krewinkel, M., Stoeckel, M., Kranz, B., Stressler, T., Wenning, M. (2015) Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. *International Journal of Food Microbiology*, 211, 57–65.

Zhang, C., Bijl, E., Hettinga, K. (2018) Destabilization of UHT milk by protease AprX from *Pseudomonas fluorescens* and plasmin. *Food Chemistry*, 263, 127–134.