

Atividade lipolítica do leite com células somáticas ajustadas para diferentes níveis

[Lipolytic activity of milk with different somatic cells levels]

M.V. Santos¹, C.A.F. Oliveira², L.F.B. Augusto¹, A.A. Aquino¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP - Pirassununga, SP

²Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - USP

Rua Duque de Caxias Norte, 225

13630.090 - Pirassununga, SP

RESUMO

Estimou-se a origem da atividade lipolítica do leite com contagens de células somáticas (CCS) ajustadas para diferentes níveis. A partir de lotes de leite cru com baixa (100.000 cel/ml) e alta (1.000.000 cel/ml) CCS, formaram-se três tratamentos: A) leite com baixa CCS; B) leite com alta CCS; C) leite originalmente com baixa CCS e com adição de células somáticas. O leite foi submetido à pasteurização e armazenado por 21 dias sob refrigeração a 6°C. Durante o período de armazenamento, foram coletadas amostras nos dias 1, 7, 14 e 21 para avaliação da concentração de ácidos graxos livres (AGL). Não foi observado efeito de tratamento sobre a concentração de AGL, durante todo o período de armazenamento e nem em cada dia de coleta isoladamente, cujas médias de AGL, após 21 dias, foram de 0,181; 0,159 e 0,153meq/kg, respectivamente, para os tratamentos A, B e C. Observou-se efeito do tempo de armazenamento sobre a concentração de AGL do leite, independentemente dos tratamentos, com teores de AGL de 0,121meq/kg para o dia 1 e de 0,219 para o dia 21. Pode-se concluir que, independentemente da contagem de células somáticas do leite cru, ocorre aumento da lipólise do leite pasteurizado durante o período de armazenamento. A adição de células somáticas ao leite, originalmente com baixa CCS, não aumentou a taxa de lipólise durante o armazenamento refrigerado.

Palavras-chave: leite, células somáticas, atividade enzimática, lipase

ABSTRACT

The lipolytic activity of milk with different somatic cell counts (SCC) was investigated in samples with low (100,000 cells.ml⁻¹) and high (1,000,000 cells.ml⁻¹) SCC in order to obtain the following treatments: A) low SCC milk; B) high SCC milk; C) low SCC milk with somatic cells added, taken from high SCC milk. All samples were pasteurized and kept refrigerated at 6°C for 21 days. Repeated measures during storage time were performed from pasteurized milk at days 1, 7, 14 and 21 to evaluate free fatty acid (FFA) concentrations. No effect of treatments was observed on milk FFA concentration during storage period, nor during each day of sampling, with FFA averaging 0.181; 0.159 and 0.153meq/kg for treatments A, B and C, respectively. FFA concentration in pasteurized milk increased during the storage period, independently of the milk SCC, as the level of FFA was 0.121 meq/kg on day 1 and 0.219 on day 21. Addition of somatic cells to low somatic cell milk did not increase lipolysis rate of milk during refrigerated storage. It can be concluded that pasteurized milk fat breakdown during refrigerated storage is not related to enzymes from somatic cells.

Keywords: milk, somatic cell enzymatic activity, lipase

Recebido em 31 de janeiro de 2006

Aceito em 19 de abril de 2007

E-mail: mveiga@usp.br

INTRODUÇÃO

O aumento da contagem de células somáticas (CCS) no leite afeta negativamente a sua composição e o tempo de prateleira dos derivados lácteos, causando prejuízos para produtores e indústria de laticínios.

A elevada CCS resulta em diminuição da vida de prateleira do leite pasteurizado, afetando negativamente a sua qualidade sensorial (Santos et al., 2003a; Santos et al., 2003b). Isso ocorre, parcialmente, pela ação das lipases sobre os triacilglicerídeos, resultando no aparecimento de defeitos sensoriais, como a rancidez. O leite com alta CCS, mesmo após a pasteurização, apresenta aumento da atividade lipolítica. Contudo, as causas dessa atividade lipolítica, durante a mastite, não estão esclarecidas, visto que esse aumento poderia ter origem nas próprias células somáticas, do sangue e da lipase lipoprotéica presente no leite.

A lipólise - hidrólise enzimática da gordura do leite - apresenta efeito negativo sobre o sabor conhecido como rancidez ou rancidez hidrolítica (Collins et al., 2003). Quando submetido à agitação ou turbulência em excesso, a membrana dos glóbulos de gordura do leite pode-se romper, permitindo que enzimas lipolíticas, em especial a lipase lipoprotéica (LLP), atuem sobre os triacilglicerídeos, os quais são hidrolisados. Outras possíveis causas de lipólise espontânea no leite são: elevadas concentrações de constituintes do sangue no leite, final da lactação, nutrição inadequada e mastite (Cartier e Chilliard, 1990).

Os neutrófilos e macrófagos são células fagocíticas, cuja função é a fagocitose de bactérias e outros antígenos durante a resposta imune do animal. Essas células apresentam grande variedade de enzimas proteolíticas e lipolíticas, que são liberadas durante o mecanismo de morte intracelular de microrganismos, e podem contribuir de forma significativa para a proteólise e lipólise dos constituintes do leite (Santos et al., 2003a). Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi estimar a origem da atividade lipolítica do leite com células somáticas ajustadas para diferentes níveis.

MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, no qual se consideram as repetições (n=3) como blocos. Utilizou-se um arranjo de tratamentos constituído por: dois níveis de células somáticas (baixa e alta CCS) e pela adição de células somáticas ao leite de baixa CCS. Realizaram-se, ainda, medidas repetidas no tempo, as quais corresponderam às avaliações do leite pasteurizado durante o período de armazenamento (1, 7, 14 e 21 dias).

Para a escolha das vacas do experimento, coletaram-se previamente amostras individuais de leite após a ordenha de todas as vacas de um rebanho leiteiro, as quais foram analisadas quanto à CCS e à composição - gordura, lactose e sólidos totais. A análise da CCS foi realizada por citometria fluxométrica utilizando-se o equipamento Bentley Somacount 500¹, e as análises de composição foram baseadas em metodologia por absorção infravermelha no equipamento Bentley 2000². Entre 40 vacas leiteiras em lactação, selecionaram-se, em média, quatro vacas com baixa CCS e quatro vacas com alta CCS, de forma a manter similares os níveis de gordura e proteína.

O leite cru de cada vaca escolhida foi coletado na ordenha e imediatamente resfriado a 4°C. Partindo-se de lotes de leite cru com baixa (aproximadamente 100.000cel/ml) e alta (aproximadamente 1.000.000cel/ml) CCS, obtiveram-se os seguintes tratamentos: A) leite com baixa CCS; B) leite com alta CCS e C) leite originalmente com baixa CCS, adicionado de células somáticas de origem de leite de alta CCS (>800.000cel/ml) - indica a atividade lipolítica decorrente da adição de células somáticas ao leite.

O leite do tratamento C foi obtido pela adição de células somáticas separadas a partir do leite de alta CCS (tratamento B). Para tanto, o leite cru de alta CCS foi centrifugado em frascos plásticos cônicos de 50ml, a 3500 rotações por minuto², durante 15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, e o *pellet* de células

¹ Bentley Instruments Inc. Chasca, MN, USA

² Centrifuga modelo Excelsa II 206 MP, Fanen, São Paulo, Brasil

formado foi ressuspenso em igual volume de leite cru com baixa CCS.

O leite de todos os tratamentos foi submetido à pasteurização lenta (65°C, 30 minutos), resfriado e armazenado por 21 dias sob refrigeração (6°C). Adicionou-se, em todos os tratamentos, o conservante dicromato de potássio, na concentração final no leite de 0,1mg/kg. Tal procedimento foi realizado para evitar a multiplicação microbiana durante o armazenamento por 21 dias e, dessa forma, impedir a lipólise de origem microbiana.

Coletaram-se amostras de leite cru para realização das análises de composição - proteína bruta, proteína verdadeira, caseína e nitrogênio não-protéico, gordura, lactose e sólidos totais -, CCS. Após a pasteurização, coletaram-se amostras de leite para determinação da concentração de ácidos graxos livres no leite (AGL) nos dias 1, 7, 14 e 21. A mudança na concentração de AGL no leite foi utilizada como medida da lipólise do leite. A concentração de AGL do leite foi determinada utilizando-se o método de sabão de cobre, de acordo com recomendação de Ma et al. (2003), sendo os resultados expressos em meq de AGL/kg de leite.

No 21º dia de armazenamento, coletaram-se amostras de todos os tratamentos para realização de análises microbiológicas, contagem bacteriana total e contagem de coliformes totais e fecais.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e adicionados do fator medidas repetidas, utilizando o pacote estatístico SAS referente aos quatro diferentes tempos de armazenamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias da composição e da CCS do leite cru são apresentadas na Tab. 1. O tratamento A (baixa CCS) apresentou menor CCS que os tratamentos B e C. A adição de células somáticas ao leite no tratamento C foi eficaz em aumentar a CCS, visto que os níveis desse tratamento C foram estatisticamente similares ao do leite de alta CCS. Não se identificou diferença nos teores de proteína bruta, sólidos totais, gordura e ácidos graxos livres entre os tratamentos. A concentração de lactose sofreu efeito significativo da CCS, com o tratamento B apresentando menor teor, 3,9%, que os tratamentos A e C, 4,4 e 4,4%, respectivamente.

Tabela 1. Composição química do leite cru de acordo com a contagem de células somáticas do leite (CCS)¹

Tratamento	Baixa CCS	Alta CCS	Adição de células somáticas	P
CCS (x1000 cel/ml)	126b	1150a	480a	0,002
Proteína bruta (%)	2,917	2,990	2,930	NS
Lactose (%)	4,383a	3,870b	4,360a	0,001
Sólidos totais (%)	11,180	10,567	10,930	NS
Gordura (%)	2,877	3,003	2,663	NS
Ácidos graxos livres (meq/kg)	0,1810	0,1599	0,1537	NS

¹Analisados por absorção infravermelha. NS: não significativo.

Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05).

O tempo de armazenamento do leite teve efeito significativo (P=0,001) sobre a concentração de AGL, conforme Tab. 2, o que possibilitou estimar a seguinte equação de regressão:

Equação 1:

$$AGL = 0,00483(\text{Dia}) + 0,102 \quad (R^2=0,707)$$

Não se observou efeito dos tratamentos sobre a concentração de AGL durante todo o período de armazenamento e nem em cada dia de coleta isoladamente. Quanto ao tempo de armazenamento para o tratamento C, foi identificado efeito do dia, sendo que as maiores concentrações de AGL foram registradas no dia 21 em comparação com os demais.

Atividade lipolítica do leite com células...

Tabela 2. Valores de lipólise (ácidos graxos livres, meq/kg), de acordo com a contagem de células somáticas do leite e do tempo de armazenamento do leite

Tratamentos	Armazenamento (dias)				Média	P
	1	7	14	21		
Baixa CCS	0,135	0,160	0,188	0,239	0,181	NS
Alta CCS	0,116	0,152	0,170	0,201	0,159	0,085
Adição de células somáticas*	0,113b	0,139b	0,142b	0,219a	0,153	0,0006
Média*	0,121b	0,150b	0,166b	0,219a	0,121	0,0001
Desvio padrão	0,025	0,037	0,065	0,074	0,025	
P	NS	NS	NS	NS	NS	

*Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$). NS: não significativo.

A concentração de AGL do leite pasteurizado aumentou durante o período de armazenamento refrigerado, independentemente da CCS. Esse resultado indica que a adição de células ao leite de baixa CCS não apresentou efeito significativo sobre a taxa de lipólise do leite, o que sugere que as enzimas responsáveis pela degradação da gordura não estão necessariamente associadas à presença de células somáticas.

Após a pasteurização do leite, quantidade suficiente de atividade lipolítica pode ser mantida, o que pode induzir a rancidez durante o armazenamento refrigerado do leite (Shipe e Senyk, 1981). Esses autores sugeriram que, para ocorrer a inativação completa da atividade de lipase lipoprotéica (LLP), a pasteurização do leite deveria ser um procedimento mais severo que o normalmente empregado. A LLP é altamente resistente ao tratamento térmico, sendo que, após a pasteurização do leite, esta enzima ainda apresentou 3% de atividade residual e somente foi totalmente inativada à temperatura de 75°C por 15 seg (Andrews et al., 1987).

Segundo Santos et al. (2003a), para o leite com baixa CCS (20.250cel/ml) aos 61 dias de armazenamento, a média de concentração de AGL para as temperaturas de 6°C foi de 0,196meq/kg, o que representou aumento de 70,0% em relação ao dia 1 (0,132meq/kg). De forma semelhante, o leite do tratamento de alta CCS (741.250cel/ml) apresentou, após 61 dias de armazenamento, média de concentração de AGL de 0,355meq/kg para as temperaturas de 6,0°C, o que representa aumento de 176,89% em relação ao dia 1 (0,1284meq/kg). Dessa forma, a taxa de lipólise do leite com alta CCS foi maior que a observada no tratamento com baixa CCS, sendo que esse nível elevado de AGL pode estar

associado ao desenvolvimento de rancidez (Ma et al., 2000).

O leite normal apresenta a LLP como principal enzima lipolítica, responsável pela degradação dos triacilglicerídeos em AGL (Olivecrona et al., 1992). No leite pasteurizado com alta CCS, as lipases de origem das células somáticas podem contribuir de forma significativa para a lipólise durante o armazenamento do leite (Azzara e Dimick, 1985a; Azzara e Dimick, 1985b).

De acordo com Azzara e Dimick (1985a), os macrófagos isolados de amostras de leite da glândula mamária com mastite podem secretar enzimas lipolíticas, as quais atuam rompendo a membrana do glóbulo de gordura, o que resulta em maior contato entre os triacilglicerídeos e a LLP e, conseqüentemente, pode ocorrer maior taxa de lipólise. Quando as concentrações de AGL no leite são superiores a 1,0meq/100g de gordura (Bodyfelt et al., 1988) ou 0,200meq/kg de leite (Santos et al., 2003b), a ocorrência de rancidez pode ser identificada em testes de análise sensorial do leite. A rancidez do leite é considerada um dos principais defeitos sensoriais de qualidade apresentados pelo leite.

O efeito da CCS sobre a ocorrência de alterações organolépticas no leite foi estudado por meio da técnica de degustação em painel realizada por Ma et al., (2000). Esses autores relataram que o leite pasteurizado com alta CCS (849.000cel/ml) apresentou, aos 21 dias de armazenagem, maior ocorrência de rancidez e de sabor amargo quando comparado com leite pasteurizado com baixa CCS (45.000cel/ml). Esses defeitos foram relacionados com maior taxa de lipólise e proteólise do leite com alta CCS, respectivamente. Os resultados obtidos por Ma et al. (2000) sugerem que, quando se utiliza leite

com baixa CCS associado com cuidados durante o manuseio e refrigeração, é possível aumentar a vida de prateleira do leite pasteurizado refrigerado, evitando-se o desenvolvimento de rancidez. Esses mesmos autores relataram que o leite de alta CCS, após a pasteurização, apresentou baixa concentração inicial de AGL, no entanto, a maior taxa de lipólise, durante o período de armazenagem resultou em aumento da concentração de AGL.

CONCLUSÕES

Independentemente da contagem de células somáticas, ocorre aumento da lipólise do leite pasteurizado durante o período de armazenamento. A adição de células somáticas ao leite de baixa CCS não aumenta a taxa de lipólise durante o armazenamento refrigerado. Dessa forma, os resultados sugerem que a degradação da gordura do leite pasteurizado, durante o armazenamento refrigerado, não ocorre pela ação de enzimas associadas às células somáticas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o auxílio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP Proc. 03/08045-1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREWS, A.T.; ANDERSON, M.; GOODENOUGH, P.W. A study of the heat stabilities of a number of indigenous milk enzymes. *J. Dairy Res.* v.54, p.237-246, 1987.
- AZZARA, C.D.; DIMICK, P.S. Lipolytic enzymes activity of macrophages in bovine mammary gland secretions. *J. Dairy Sci.*, v.68, p.1804-1812, 1985a.
- AZZARA, C.D.; DIMICK, P.S. Lipoprotein lipase activity of milk from cows with prolonged subclinical mastitis. *J. Dairy Sci.*, v.68, p.3171-3175, 1985b.
- BODYFELT, F.W.; TOBIAS, J.; TROUT, G.M. *The sensory evaluation of dairy products*. New York: Van Nostrand Reinhold, 1988. p.121-157, 476-477.
- CARTIER, P.; CHILLIARD, Y. Spontaneous lipolysis in bovine milk: combined effects of nine characteristics in native milk. *J. Dairy Sci.*, v.73, p.1178-1186, 1990.
- COLLINS, Y.F.; MCSWEENEY, P.L.H.; WILKINSON, M.G. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *Int. Dairy J.*, v.13, p.841-866, 2003.
- MA, Y.; BARBANO, D.M.; SANTOS, M.V. Effect of CO₂ Addition to raw milk on proteolysis and lipolysis at 4°C. *J. Dairy Sci.*, v.86, p.161-1631, 2003.
- MA, Y.; RYAN, C.; BARBANO, D.M.; GALTON, D.M.; RUDAN, M; e BOOR, K. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. *J. Dairy Sci.*, v.83, p.1-11, 2000.
- OLIVECRONA, T.; VILARO, S.; OLIVECROMA-BENGTSSON, G. Indigenous enzymes in milk, II Lipases. In: FOX, P.F. (Ed.). *Advances in dairy chemistry*. New York: Elsevier. 1992. v.1, p.292-305.
- SANTOS, M.V.; MA, Y.; BARBANO, D.M. Effect of somatic cell count on proteolysis and lipolysis in pasteurized fluid milk during shelf-life storage. *J. Dairy Sci.*, v.86, p.2491-2503, 2003a.
- SANTOS, M.V.; MA, Y.; CAPLAN, Z. et al. Sensory threshold of off-flavors caused by proteolysis and lipolysis in milk. *J. Dairy Sci.*, v.86, p.1601-1607, 2003b.
- SHIPE, W.F.; SENYK, G.F. Effects of processing conditions on lipolysis in milk. *J. Dairy Sci.*, v.64, p.2146-2149, 1981.