

Polimorfismo da beta-lactoglobulina não afeta as características físico-químicas e a estabilidade do leite bovino

Bruno Garcia Botaro⁽¹⁾, Ygor Vinícius Real de Lima⁽²⁾, Adriana Augusto Aquino⁽³⁾, Raquel Helena Rocha Fernandes⁽¹⁾, José Fernando Garcia⁽⁴⁾ e Marcos Veiga dos Santos⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade de São Paulo, Fac. de Medicina Veterinária e Zootecnia, Av. Duque de Caxias Norte, 225, CEP 13635-900 Pirassununga, SP. E-mail: bbotaro@usp.br, raquelrf@usp.br, mveiga@usp.br ⁽²⁾Centro Universitário Anhanguera, Fac. de Medicina Veterinária, R. Waldemar Silenci, 340, CEP 13614-370 Leme, SP. E-mail: ygorlima@terra.com.br ⁽³⁾Universidade Federal de Lavras, Fac. de Zootecnia, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras, MG. E-mail: daquino1912@gmail.com ⁽⁴⁾Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal, R. Clóvis Pestana, 793, CEP 16050-680 Araçatuba, SP. E-mail: jfgarcia@terra.com.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do polimorfismo genético da beta-lactoglobulina, da raça e da sazonalidade sobre as características físico-químicas e estabilidade do leite bovino. Foram selecionados 5 rebanhos da raça Holandesa e 6 da Girolando. Amostras de leite e sangue foram coletadas de 660 vacas Holandesas e 293 Girolandos, num total de 953 amostras, obtidas em duas coletas na estação seca e duas na estação chuvosa. As amostras de leite foram submetidas à análise de acidez titulável, pH, crioscopia, e ao teste de estabilidade ao etanol (70, 76, 80 e 84°GL). As amostras de sangue foram submetidas à reação em cadeia de polimerase, para determinação do polimorfismo da beta-lactoglobulina em ambas as raças estudadas. Não houve efeito do polimorfismo da beta-lactoglobulina sobre as características físico-químicas do leite. Observou-se efeito de raça (Holandesa e Girolando, respectivamente) sobre a acidez titulável (16,16 e 17,07°D), e da sazonalidade (estações chuvosa e seca, respectivamente) sobre a crioscopia (-0,5411 e -0,5376°H). Nas condições do estudo, observou-se efeito de raça e sazonalidade sobre a estabilidade do leite, com maior instabilidade do leite de Girolando, durante a estação seca. Não houve efeito do polimorfismo da beta-lactoglobulina sobre essa característica.

Termos para indexação: vaca leiteira, variante genética, propriedades físico-químicas do leite, prova de estabilidade ao etanol.

Beta-lactoglobulin polymorphism does not affect physico-chemical characteristics and milk stability

Abstract – The objective of this study was to evaluate the effect of beta-lactoglobulin polymorphism, breed and seasonality on physico-chemical characteristics and stability of bovine milk. Six Holstein-Zebu (H-Z) and five Holstein dairy herds were selected, of which 660 Holstein and 293 crossbred Holstein-Zebu milk and blood samples were collected, adding up 953 samples, distributed in two collecting periods at rainy and two at dry seasons. Each milk sample was analyzed for titratable acidity, pH, freezing point and milk ethanol stability, at the following ethanol concentrations: 70, 76, 80 and 84°GL. Individual blood samples were submitted to polymerase chain reaction (PCR) for the determination of beta-lactoglobulin polymorphism. No effect of beta-lactoglobulin polymorphism was observed in physico-chemical characteristics of milk, in both studied breed. Breed effect for Holstein and H-Z, respectively, was observed on titratable acidity (16.16 and 17.07°D, while effect of seasonality (for rainy and dry seasons, respectively) was also observed on freezing point (-0.5411 and -0.5376°H). Effects of breed and seasonality on milk stability were observed (Holstein-Zebu milk was less stable on dry season), however, no effect of beta-lactoglobulin on milk stability was observed.

Index terms: dairy cow, genetic variants, milk physico-chemical properties, ethanol stability test.

Introdução

A beta-lactoglobulina representa cerca de 50% da proteína do soro e 12% da proteína total no leite bovino (Fox & McSweeney, 1998), e consiste de uma seqüência de 162 resíduos de aminoácidos com peso

molecular de 18,4 kDa (Kontopidis et al., 2004). Contudo, desde a descoberta dos alelos A e B da beta-lactoglobulina por Aschaffenburg & Drewry (1955), citado por Kontopidis et al. (2004), o polimorfismo genético dessa proteína tem sido foco de investigações, por sua relação com características

de composição e tecnológicas do leite Oner & Elmaci, 2006), já que diferenças entre esses genótipos podem alterar a estrutura primária das proteínas e resultar em alterações das propriedades físico-químicas (Hill et al., 1996).

A expressão dos genes polimórficos da beta-lactoglobulina está relacionada à alterações das características físico-químicas da micela de caseína, e conseqüentemente, às propriedades tecnológicas do leite, já que tal proteína está positivamente associada à estabilização da micela (Robitaille, 1995).

A estabilidade térmica do leite se refere à habilidade do leite bovino de resistir a temperaturas altas de processamento sem apresentar coagulação ou geleificação visíveis. Esta estabilidade pode ser definida como o tempo necessário para o aparecimento de coagulação visível em pH e temperatura definidos (Singh, 2004). Entre os métodos utilizados para avaliar a estabilidade térmica, a prova de resistência ao álcool é a considerada aceitável, para estimar a resistência do leite ao tratamento térmico, e é rotineiramente empregada pelas indústrias de laticínios como teste para aceitação ou rejeição do leite, no momento da recepção na plataforma, ou antes da coleta na fazenda leiteira (Santos & Fonseca, 2006).

O princípio do teste do etanol baseia-se no mecanismo de desestabilização coloidal das micelas de caseína pelo efeito desnaturante do álcool, que pode chegar ao limite crítico em que ocorra a precipitação (O'Connell et al., 2001). Os principais fatores que afetam a coagulação nesse teste são as cargas e as interações entre as micelas e outras proteínas, o pH, as concentrações do álcool utilizadas e a composição do leite (Chavez et al., 2004).

Relatos de maior estabilidade do leite de animais beta-lactoglobulina AA foram feitos por Feagan et al. (1972) e McLean et al. (1987), apesar de tal fato só ter sido evidenciado por Robitaille (1995), quando da associação desse genótipo com a proteína de animais kappa-caseína AA. Paterson et al. (1999) relataram que a combinação entre os genótipos AA, para beta-lactoglobulina, e BB, para kappa-caseína, estava associada à maior estabilidade do leite, apesar de Imafidon et al. (1991) terem observado que animais beta-lactoglobulina BB produziram uma proteína mais termoestável que os outros genótipos, independentemente de qual fosse o genótipo para kappa-caseína. Em razão disso, os efeitos das variantes de beta-lactoglobulina, sobre as características físico-químicas e de estabilidade do leite, ainda não permitem resultados conclusivos. Assim, o presente

estudo teve como objetivo avaliar o efeito do polimorfismo genético da beta-lactoglobulina, em duas raças (Holandesa e Girolando) e duas estações do ano (chuvosa e seca), sobre as características físico-químicas (acidez, pH, crioscopia) e a estabilidade do leite bovino.

Material e Métodos

O presente experimento foi realizado em fazendas leiteiras do Estado de São Paulo, onde foram previamente selecionados 11 rebanhos bovinos leiteiros comerciais, entre os quais cinco da raça Holandesa e seis da Girolando. Foram selecionadas, aleatoriamente, para a coleta de leite e de sangue, 660 vacas da raça Holandesa e 293 da Girolando, num total de 953 amostras obtidas em 2 coletas na estação seca e 2 na estação chuvosa (coleta 1: setembro e outubro de 2003; coleta 2: junho e julho de 2004; coleta 3: novembro e dezembro de 2004 e coleta 4: janeiro e fevereiro de 2005).

Para efeitos de período de coleta de amostras, foi definido como estação chuvosa o período compreendido entre os meses de novembro e abril, e para estação seca, entre maio e outubro. A seleção de vacas para amostragem seguiu os seguintes critérios: ordem de parição (primeira a terceira lactação) e entre 30 e 250 dias em lactação. Para as vacas da raça Girolando, foram selecionados animais com graus de sangue entre 1/2, 3/4 e 3/8 Gir/Holandês. Foram excluídas as vacas com alterações visuais do leite, detectáveis pelo teste de caneca de fundo escuro (mastite clínica), ou que foram submetidas ao tratamento de mastite nas duas semanas anteriores à coleta. Adicionalmente, no momento da coleta, foram registradas as seguintes informações de cada vaca leiteira selecionada: idade, dias em lactação e regime principal de alimentação durante o período de coleta (pasto, pasto com suplementação ou confinado).

As amostras individuais de leite foram coletadas durante a ordenha da manhã, que representou toda a ordenha de cada animal. As coletas foram realizadas a partir do latão, nos sistemas de ordenha balde ao pé, do balão de medição durante a ordenha ou pelo uso de dispositivos de medição por fluxo, e foram armazenadas em tubos de plástico até a realização das análises. As amostras foram mantidas resfriadas, em recipientes térmicos com gelo em escamas, até a realização das análises físico-químicas do leite, em no máximo 6 horas. As características físico-químicas do leite – pH, acidez

titulável (Dornic) e crioscopia – foram analisadas conforme Pereira et al. (2001). A determinação da estabilidade do leite foi realizada pela prova de resistência ao álcool, em que partes iguais de leite (2 mL) e soluções alcoólicas (Davies & White, 1958), foram misturadas e homogeneizadas. Os resultados variaram entre leite coagulado e não coagulado. As graduações alcoólicas utilizadas foram 70, 76, 80 e 84°GL (Davies & White, 1958).

Para a determinação do polimorfismo genético da beta-lactoglobulina, 10 mL de sangue foram colhidos da circulação periférica, em tubo de vidro heparinizado e estéril, de cada animal selecionado, os quais foram congelados a -20°C até a realização das análises. O DNA da amostra de sangue foi extraído segundo o protocolo descrito por Sambrook et al. (1989). As amostras de DNA extraídas foram submetidas à amplificação por PCR (“polymerase chain reaction”), os oligonucleotídeos iniciadores (primers), utilizados para tal amplificação foram sintetizados pela Invitrogen Custom Primers, conforme seqüência descrita por Faria et al. (2000):

5' ACCTGGAGATCCTGCTGCAGAAATG3'

5' CATCGATCTTGAACACCGCAGGGAT3'

Tais primers amplificam uma região de 961 pares de base do éxon II e III, do gene da beta-lactoglobulina bovina. A região amplificada possui as substituições de nucleotídeos responsáveis pela diferenciação das variantes genéticas A e B. Cada reação de amplificação consistiu de tampão para PCR 1X (KCl 500 mM, Tris-Cl pH 8.3 100 mM), 0,1 µL de cada primer (Invitrogen), 2 µL de dNTP0,125 mM, 0,1 µL Taq Polimerase (Cenbiot/RS, PHN/MG), 0,75 µL MgCl₂ (Cenbiot/RS, PHN/MG), 5 µL de DNA e água mili-Q qsp 25 µL. Em todas as reações de amplificação, utilizou-se um controle (sem DNA), para confirmar a ausência de contaminação na execução da análise. As amplificações foram realizadas em termociclador PTC 100-MJ Research. O programa utilizado para amplificação do gene da beta-lactoglobulina segue descrito: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguida por 35 ciclos de 95°C por 1 min, 57°C por 1 min e 72°C por 3 min, com extensão final a 72°C por 5 min, seguida de 4°C por mais 5 min.

Após confirmação da amplificação das amostras, realizou-se a eletroforese em gel de agarose a 2%, em cuba horizontal de acrílico com tampão de corrida TBE 1X a 100 volts por 40 min. O produto da PCR (20 µL) passou, então, pelo processo de RFLP

(restriction fragment length polymorphism), e foi digerido pela enzima de restrição Hph-I (Wilkins & Kuys, 1992). A Hph-I cliva o fragmento amplificado em 741 e 220 pb, relativos ao genótipo AA; e 741, 220, 166 e 54 pb, relativos ao genótipo BB; ou uma combinação dos dois fragmentos, 741, 220, 166 e 54 pb, e identifica os heterozigotos AB. As amostras foram amplificadas, assim como digeridas, em placas próprias para PCR. Assim, a presença de um de animal AB, em cada placa, demonstrava que a reação de digestão do material havia ocorrido, sendo esse o controle do processo de digestão.

Os dados foram submetidos à estatística descritiva (médias aritméticas e erros-padrão da média), e a análise de variância foi realizada pelo método dos quadrados mínimos, com utilização do procedimento PROC GLM do SAS Institute (2001). Para elaboração das análises estatísticas, as vacas foram distribuídas de acordo com o polimorfismo genético da beta-lactoglobulina (AA, BB e AB), raça (Holandesa e Girolando) e sazonalidade da coleta (estações chuvosa e seca). Utilizou-se, para a análise de variância, o modelo matemático em que as variáveis dependentes foram as características físico-químicas do leite (acidez, pH e crioscopia), e os efeitos fixos foram as variáveis independentes: polimorfismo genético da beta-lactoglobulina, raça, sazonalidade da coleta. Neste modelo:

$$FQ_{ilmn} = \mu + Faz_i(Raç)_l + Raç_l + Pol_m + Saz_n + Pol_m * Raç_l + Pol_m * Saz_n + Pol_m * Raç_l * Saz_n + e_{ilmn}$$

em que FQ são as características físico-químicas do leite; μ é a média geral das características; $Faz_i(Raç)_l = [Raç = raça (l = Holandesa e Girolando) aninhado dentro de Faz = fazenda (i = 1 a 11)]$; Pol é o polimorfismo ($m = AA, BB e AB$); Saz é a sazonalidade ($n = estação chuvosa e seca$); e é o erro.

Para a análise estatística da variável estabilidade do leite, os resultados foram classificados em dois grupos (amostras com e sem coagulação), representados com suas respectivas porcentagens. Entre as amostras que apresentaram coagulação, foi realizada a análise estatística descritiva da concentração média de álcool que causou a coagulação, seguida do teste estatístico χ^2 , para verificar os efeitos das variantes genéticas da beta-lactoglobulina, da raça e da sazonalidade sobre a coagulação do leite e a respectiva graduação alcoólica.

Resultados e Discussão

Os resultados do efeito do polimorfismo da beta-lactoglobulina, sobre as características físico-químicas do leite, encontram-se na Tabela 1. Não houve efeito do polimorfismo da beta-lactoglobulina sobre as características físico-químicas em nenhuma das variáveis estudadas. Não se observou efeito significativo das interações entre estação do ano e raça, estação do ano e beta-lactoglobulina, raça e beta-lactoglobulina, nem da interação tripla sobre qualquer das variáveis estudadas. Não são conhecidos relatos na literatura que associem os genes polimórficos da beta-lactoglobulina à acidez titulável, ao pH e à crioscopia do leite. Há, no entanto, de acordo com Hill et al. (1997) e Ng-Kwai-Hang (1998), diferenças na composição dos aminoácidos, expressos pelas variantes genéticas de beta-lactoglobulina, que explicam parcialmente as diferenças estruturais observadas (que variam desde a carga líquida, hidrofobicidade e graus de fosforilação e glicosilação), e que levam, por conseguinte, à alterações no comportamento das proteínas do leite quando do processamento térmico.

Os resultados do efeito da sazonalidade e das raças estudadas, sobre as características físico-químicas do leite, estão apresentados na Tabela 2. Verificou-se efeito ($p = 0,001$) de raça sobre a acidez titulável, com média de 16,162 e 17,077^{°D}, para a raça Holandesa e Girolando, respectivamente, e da estação do ano em que se realizou a coleta sobre a crioscopia do leite ($p = 0,003$), com média

de -0,541 e -0,537^{°H}, para as estações chuvosa e seca, respectivamente, embora se mantivessem dentro da faixa de valores normais (Brasil, 2002). Os valores médios observados obedecem à tendência semelhante àquela verificada por Ponce & Hernández (2001). Os autores associaram a época seca com a menor disponibilidade e qualidade dos alimentos fornecidos aos animais, o que limita o fornecimento de energia ao tecido epitelial mamário e afeta a secreção láctea, ao diminuir a acidez titulável e incrementar o pH (>6,75).

Lindmark-Mansson et al. (2003) ao avaliar a composição do leite de 9 produtores de leite, geograficamente dispersos na Suécia, durante um ano, observaram efeito da sazonalidade ($p < 0,001$) sobre o pH (6,68 e 6,73) e crioscopia (-0,534 e -0,523^{°C}), no verão e inverno, respectivamente. Schukken et al. (1992), ao descrever a tendência da variação do ponto crioscópico do leite de aproximadamente 10.000 fazendas no Canadá, verificaram efeito significativo da sazonalidade sobre esse parâmetro. Os autores observaram ponto crioscópico médio maior durante o verão (junho e julho), e menor no inverno (dezembro e janeiro).

Martins et al. (2006) ao avaliar a variação da produção e a qualidade do leite produzido na bacia leiteira de Pelotas, RS, em diferentes meses do ano, verificaram diferenças ($p < 0,05$) nos valores de crioscopia e acidez entre os meses avaliados. Durante os meses mais quentes, os autores observaram valores médios de acidez titulável que variaram de 16 a 17,5^{°D}, e de crioscopia, de -0,536 a -0,544^{°H}.

De acordo com Santos & Fonseca (2006), logo após sua obtenção, o leite apresenta reação ligeiramente ácida, devido a alguns de seus componentes. Essa acidez, chamada de natural ou aparente, é causada pela albumina (1^{°D}), pelos citratos (1^{°D}), pelo dióxido de carbono (1^{°D}), pelas caseínas (5 a 6^{°D}) e pelos fosfatos (5^{°D}). Quanto à probabilidade de efeito da beta-

Tabela 1. Efeito do polimorfismo genético de beta-lactoglobulina sobre as características físico-químicas do leite.

Variável	Polimorfismo da beta-lactoglobulina						P
	N	AA	N	AB	N	BB	
Acidez titulável (°D)	248	16,331	283	16,551	389	16,442	0,741
pH	224	6,785	276	6,772	374	6,778	0,208
Crioscopia (°H)	233	-0,540	275	-0,539	367	-0,540	0,376

Tabela 2. Efeitos da sazonalidade e das raças estudadas sobre as características físico-químicas do leite.

Fator	Acidez titulável (°D)			pH			Crioscopia (°H)		
	N	Média	EPM	N	Média	EPM	N	Média	EPM
Estação									
Chuvosa	343	16,621	0,104	338	6,765	0,005	323	-0,541**	0,0004
Seca	577	16,341	0,085	536	6,798	0,005	552	-0,537**	0,0003
Raça									
Holandesa	635	16,162**	0,079	581	6,789	0,004	597	-0,540	0,0003
Girolando	285	17,077**	0,113	293	6,756	0,006	278	-0,539	0,0010

** $p < 0,01$.

lactoglobulina, raça e sazonalidade, sobre a estabilidade do leite, observou-se efeito da raça e estação do ano, mas não do polimorfismo genético da beta-lactoglobulina sobre tal característica.

A distribuição das amostras de leite que apresentaram ou não instabilidade, em relação ao polimorfismo genético da beta-lactoglobulina, está apresentada na Tabela 3. Entre as 953 amostras de leite avaliadas, 30,75% apresentaram instabilidade frente à prova de álcool, das quais 72 amostras provinham de animais com genótipo AA para beta-lactoglobulina, 106 de animais da variante AB, enquanto que 115 amostras pertenciam ao genótipo BB. A análise estatística pelo teste do χ^2 não identificou diferença significativa entre a frequência de amostras instáveis e estáveis quanto aos genótipos estudados ($p = 0,093$).

Os efeitos do polimorfismo da beta-lactoglobulina sobre a estabilidade do leite, distribuídos em função da graduação alcoólica do teste de estabilidade ao etanol, utilizada entre as amostras que apresentaram instabilidade, estão apresentados na Tabela 4.

Neste trabalho, observou-se efeito significativo ($p < 0,01$) do polimorfismo da beta-lactoglobulina sobre a estabilidade do leite apenas na graduação alcoólica de 70°GL. As médias de graduação alcoólica que ocasionaram coagulação, nas amostras de leite dos genótipos AA, AB e BB, são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$) e foram, respectivamente, 80,5, 79 e 78,4°GL. Os resultados obtidos são similares aos observados por Feagan et al. (1972), que ao estudar os efeitos das

variantes genéticas de beta-lactoglobulina, sobre a estabilidade térmica do leite, verificaram que o tempo de coagulação seguiu a tendência AA>AB>BB. Contudo, diferem dos resultados obtidos por Imafidon et al. (1991), que observaram que o genótipo BB da beta-lactoglobulina estava associado à maior estabilidade do que os outros genótipos.

Singh (2004) descreveu que, apesar da evidente diferença de comportamento do leite quando do aquecimento, observada entre os genótipos AA, AB e BB, ainda não está claro se o efeito está na dependência da proporção da proteína beta-lactoglobulina, já que, segundo o autor, a quantidade desse componente é maior em genótipos AA, ou na reatividade térmica das diferentes variantes genéticas.

Observou-se efeito ($p < 0,001$) da raça sobre a estabilidade do leite, pois, entre as 654 amostras de raça Holandesa avaliadas, 76,15% (498 amostras) apresentaram-se estáveis quanto à prova do álcool, enquanto 23,85% (156 amostras) apresentaram instabilidade. Entre as amostras de leite de animais Girolando, 54,18% (162 amostras) foram mais estáveis, enquanto 45,82% (137 amostras) coagularam sob alguma das graduações alcoólicas, adotadas para a prova de estabilidade do leite, conforme Tabela 5.

O leite de vacas Holandesas apresentou maior porcentagem de amostras não coaguladas, o que indica maior estabilidade do leite dessa raça. Os resultados obtidos, referentes aos efeitos da raça sobre a estabilidade do leite quanto à prova do álcool, estão apresentados na Tabela 6.

Verificou-se que houve diferença ($p < 0,01$) entre a estabilidade do leite proveniente de animais das raças Holandesa e Girolando, nas graduações alcoólicas de 70, 76, 80°GL. Entre as amostras coaguladas, o leite de vacas Holandesas sofre coagulação, em média, sob maior graduação alcoólica (79,98°GL) que o leite das Girolando (78,23°GL).

Tabela 3. Distribuição das amostras de leite, instáveis e estáveis, em relação ao polimorfismo genético de beta-lactoglobulina.

Genótipo	Instável	Estável	Total
AA	72 (28,45%)	181 (71,55%)	253
AB	106 (35,57%)	192 (64,43%)	298
BB	115 (28,61%)	287 (71,39%)	402
Total	293 (30,75%)	660 (69,35%)	953

$\chi^2 = 4,74$ ($p = 0,093$).

Tabela 4. Efeito do polimorfismo genético da beta-lactoglobulina sobre o número de amostras instáveis à prova do álcool, nas graduações alcoólicas 70, 76, 80 e 84°GL.

Genótipo beta-Lg	Graduação alcoólica				Total
	70°GL	76°GL	80°GL	84°GL	
AA	3	17	18	34	72
AB	19	20	26	41	106
BB	24	21	33	37	115
Total	46	58	77	112	293
χ^2	10,0**	0,904 ^{ns}	0,493 ^{ns}	4,367 ^{ns}	4,74 ^{ns}

^{ns}Não-significativo. ** $p < 0,01$.

Tabela 5. Distribuição das amostras, instáveis e estáveis, em relação às raças estudadas e a estação do ano em que se realizaram as coletas.

Fator	Instável	Estável	Total	χ^2
Raça				
Holandesa	156 (23,85%)	498 (76,16%)	654	46,499 (p<0,001)
Girolando	137 (45,82%)	162 (54,18%)	299	
Total	293 (30,74%)	660 (69,25%)	953	
Estação				
Chuva	90 (25,86%)	258 (74,14%)	348	6,13 (p=0,013)
Seca	203 (33,55%)	402 (66,45%)	605	
Total	293 (30,75%)	660 (69,25%)	953	

Tabela 6. Efeito da raça e da sazonalidade sobre a estabilidade do leite quanto à prova do álcool nas graduações alcoólicas 70, 76, 80 e 84°GL.

Fator	Graduação alcoólica				Total
	70°GL	76°GL	80°GL	84°GL	
Raça					
Holandesa	19	24	42	71	156
Girolando	27	34	35	41	137
Total	46	58	77	112	293
χ^2	16,75**	21,29**	7,71**	1,61 ^{ns}	46,49
Estação					
Chuva	15	16	27	32	137
Seca	31	42	50	80	156
Total	46	58	77	112	293
χ^2	0,318 ^{ns}	2,12 ^{ns}	0,076 ^{ns}	3,45 ^{ns}	6,13

^{ns}Não-significativo. **p<0,01.

A distribuição das amostras de leite que apresentaram ou não instabilidade, em relação à estação do ano, está apresentada na Tabela 5, em que se verifica que, entre as 605 amostras de leite avaliadas na estação seca, 33,55% (203 amostras) apresentaram coagulação, enquanto 66,45% (402 amostras) não apresentaram instabilidade nesse mesmo período, independentemente do teor de álcool utilizado para a realização da prova. Na estação de chuvas, das 348 amostras analisadas, 74,14% não apresentaram coagulação em qualquer solução alcoólica adotada, enquanto 25,86% se mostraram menos estáveis.

Houve diferença (p = 0,013) da sazonalidade sobre a estabilidade do leite, e observou-se maior estabilidade na estação chuvosa; porém, entre as amostras coaguladas, nas diferentes graduações alcoólicas adotadas (Tabela 6), não foram observadas diferenças estatísticas entre as duas estações analisadas. Tal fato se evidencia pela similaridade entre as médias alcoólicas, sob as quais as amostras instáveis coagularam (79,04°GL, na estação chuvosa, e 79,22°GL na seca).

Conclusões

1. As características físico-químicas de acidez, pH e crioscopia do leite não sofrem influência do polimorfismo

genético da beta-lactoglobulina, em vacas da raça Holandesa e Girolando.

2. A acidez titulável é maior para a raça Girolando; a crioscopia é maior na estação chuvosa.

3. A estabilidade do leite não é influenciada pelo polimorfismo genético da beta-lactoglobulina, contudo o leite apresenta maior estabilidade na raça Holandesa e durante a estação chuvosa.

Agradecimentos

À Fapesp, pelo auxílio financeiro; a José Franchini Garcia Moreno e à Lucinéia Mestieri, pelo auxílio técnico.

Referências

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. In: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. **Diário Oficial da União**, 20 set. 2002. Seção 1, p.13.
- CHAVEZ, M.S.; NEGRI, L.M.; TAVERNA, M.A.; CUATRIN, A. Bovine milk parameters affecting the ethanol stability. **Journal of Dairy Research**, v.71, p.201-206, 2004.
- DAVIES, D.T.; WHITE, J.C.D. The relation between the chemical composition of milk and the stability of the caseinate complex. 2. Coagulation by ethanol. **Journal of Dairy Research**, v.25, p.256-266, 1958.
- FARIA, F.J.C.; GUIMARÃES, S.E.F.; MOURÃO, G.B.; LIMA, R.M.G.; PINHEIRO, L.E.L. Polymorphism analysis of beta-lactoglobulin gene on Nellore cows and effects on weaning weight of the calves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, p.261-265, 2000.
- FEAGAN, J.T.; BAILEY, L.F.; HEHIR, A.F.; McLEAN, D.M.; ELLIS, N.J.S. Coagulation of milk proteins. 1. Effect of genetic variants of milk proteins on rennet coagulation and heat stability of normal milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.27, p.129-134, 1972.
- FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. **Dairy chemistry and biochemistry**. London: Blackie Academic & Professional, 1998. 478p.
- HILL, J.P.; BOLAND, M.J.; CREAMER, L.K.; ANEMA, S.G.; OTTER, D.E.; PATERSON, G.R.; LOWE, R.; MOTION, R.L.;

- THRESHER, W.C. Effect of the bovine beta-lactoglobulin phenotype on the properties of beta-lactoglobulin, milk composition and dairy products. In: PARRIS, N. (Ed.). **Macromolecular interactions in food technology**. Washington: American Chemical Society, 1996. v.650, p.281-294.
- HILL, J.P.; THRESHER, W.C.; BOLAND, M.J.; CREAMER, L.K.; ANEMA, S.G.; MANDERSON, G.; OTTER, D.E.; PATERSON, G.R.; LOWE, R.; BURR, R.G.; MOTION, R.L.; WINKELMAN, A.; WICKHAM, B. The polymorphism of the milk protein beta-lactoglobulin: a review. In: WELCH, R.A.S.; BURNS, D.J.W.; DAVIS, S.R.; POPAY, A.I.; PROSSER, C.G. (Ed.). **Milk composition, production and biotechnology**. Wallingford: CAB International, 1997. p.173-202.
- IMAFIDON, G.I.; NG-KWAI-HANG, K.F.; HARWALKAR, V.R.; MA, C.Y. Effect of genetic polymorphism on the thermal stability of beta-lactoglobulin and kappa-casein mixture. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.1791-1802, 1991.
- KONTOPIDIS, G.; HOLT, C.; SAWYER, L. Invited review: beta-lactoglobulin: binding properties, structure and function. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.785-796, 2004.
- LINDMARK-MANSSON, H.; FONDEN, R.; PETTERSSON, H. Composition of Swedish dairy milk. **International Dairy Journal**, v.13, p.409-425, 2003.
- MARTINS, P.R.G.; SILVA, C.A.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M.E.R.; STUMPF, W.; ZANELA, M.B. Produção e qualidade do leite na bacia leiteira de Pelotas-RS em diferentes meses do ano. **Ciência Rural**, v.36, p.209-214, 2006.
- McLEAN, D.M.; GRAHAM, E.R.B.; PONZONI, R.W.; McKENZIE, H.A. Effects of milk protein genetic variants and composition on heat-stability of milk. **Journal of Dairy Research**, v.54, p.219-235, 1987.
- NG-KWAI-HANG, K.F. Genetic polymorphism of milk proteins: relationships with production traits, milk composition and technological properties. **Canadian Journal of Animal Science**, v.78, p.131-147, 1998.
- O'CONNELL, J.E.; KELLY, A.L.; FOX, P.F.; DE KRUIF, K.G. Mechanism for the ethanol-dependent heat-induced dissociation of casein micelles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.4424-4428, 2001.
- ONER, Y.; ELMACI, C. Milk protein polymorphisms in Holstein cattle. **International Journal of Dairy Technology**, v.59, p.180-182, 2006.
- PATERSON, G.R.; MacGIBBON, A.K.H.; HILL, J.P. Influence of kappa-casein and beta-lactoglobulin phenotype on the heat stability of milk. **International Dairy Journal**, v.9, p.375-376, 1999.
- PEREIRA, D.B.C.P.; SILVA, P.H.F.; COSTA JUNIOR, L.C.G.; OLIVEIRA, L.L. **Físico-química do leite e derivados: métodos analíticos**. Juiz de Fora: Epamig, 2001. 234p.
- PONCE, P.C.; HERNÁNDEZ, R. Propriedades físico-químicas do leite e sua associação com transtornos metabólicos e alterações na glândula mamária. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; DÜRR, J.W.; FONTANELI, R.S. (Ed.). **Uso do leite para monitorar a nutrição e metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre: UFRGS, 2001. p.58-68.
- RACHAGANI, S.; GUPTA, I.D.; GUPTA, N.; GUPTA, S. Genotyping of beta-lactoglobulin gene by PCR-RFLP in Sahiwal and Tharparkar cattle breeds. **BMC Genetics**, v.7, 2006. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2156/7/31>>. Acesso em: 9 maio 2007.
- ROBITAILLE, G. Influence of kappa-casein and beta-lactoglobulin genetic variation on the heat stability of milk. **Journal of Dairy Research**, v.62, p.593-600, 1995.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3v.
- SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para o controle da mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: Manole, 2006. 314p.
- SAS INSTITUTE (Cary, Estados Unidos). **SAS user's guide for windows: statistics**. Version 8.02. Cary, 2001. Não paginado.
- SCHUKKEN, Y.H.; FULTON, C.D.; LESLIE, K.E. Freezing-point of bulk milk in Ontario - an observational study. **Journal of Food Protection**, v.55, p.995-998, 1992.
- SINGH, H. Heat stability of milk. **International Journal of Dairy Technology**, v.57, p.111-119, 2004.
- WILKINS, R.J.; KUYS, Y.M. Rapid beta-lactoglobulin genotyping of cattle using the polymerase chain reaction. **Animal Genetics**, v.23, p.175-178, 1992.

Recebido em 16 de janeiro de 2007 e aprovado em 20 de abril de 2007