

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**RELAÇÃO ENTRE POLIMORFISMO DE CASEÍNAS,
COMPOSIÇÃO, PROPRIEDADES DO LEITE DE
ANIMAIS HOLANDÊS X ZEBU E INDICADORES
TECNOLÓGICOS DE QUEIJO**

Denise Ribeiro de Freitas

Belo Horizonte
2015

Denise Ribeiro de Freitas

**RELAÇÃO ENTRE POLIMORFISMO DE CASEÍNAS,
COMPOSIÇÃO, PROPRIEDADES DO LEITE DE
ANIMAIS HOLANDÊS X ZEBU E INDICADORES
TECNOLÓGICOS DE QUEIJO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutora em Ciência Animal.

Área de concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal

Orientadora:

Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira

Belo Horizonte
2015

FOLHA DE APROVAÇÃO

DENISE RIBEIRO DE FREITAS

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em 06 de março de 2015, pela banca constituída pelos membros:

Prof^a. Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira
Presidente - Orientadora

Prof. Almir Vieira Silva
Universidade Federal do Oeste da Bahia

Dr. Humberto de Mello Brandão
EMBRAPA

Prof^a. Cláudia Freire
Universidade Federal de Minas Gerais - Escola de Veterinária

Prof. Marcelo Rezende de Souza
Universidade Federal de Minas Gerais - Escola de Veterinária

Prof^a. Maria Raquel Santos Carvalho
Universidade Federal de Minas Gerais - ICB

AGRADECIMENTOS

A Deus e a todos os anjos visíveis e invisíveis enviados por ele.

À minha família que soube compreender a minha ausência e me ensinou a lutar sem medo de fracassar.

À Professora Mônica pela orientação, confiança e exemplo de profissionalismo.

Ao eterno Professor Marcelo Santoro que foi fundamental no delineamento desse trabalho. Pessoa de poucas palavras, mas disposta a ajudar a todos que os buscavam. Deixou muitas saudades.

Ao Professor Leorges pela co-orientação, pelas sugestões e críticas.

A Professora Raquel do Laboratório de Genética Humana e Médica do ICB, assim como todos os integrantes desse laboratório, especialmente ao Pablo, a Fernanda e a Aninha.

Ao Jamil, amigo e técnico do Laboratório de Físico Química e Enzimologia de Proteínas do ICB, por toda a troca de experiência profissional e pessoal. Nossas conversas, seus conselhos foram essenciais durante o período do doutorado. Você é um exemplo de profissional que tenho como espelho.

À todos os companheiros do Laboratório de Físico Química e Enzimologia de Proteínas do ICB me acolheram, e foram mais do que colegas de trabalho, foram minha família. Muito obrigada, Anderson, Tatá, Lilica, Jaque, Elândia, Alana, Paulo, Ricardo, Denise Sandy, Nicole, Jaque.

À Profa. Mônica e ao Diêgo do Laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Farmácia.

Aos amigos e companheiros Fernando, Cristiane e Dalila por toda a troca de experiência e apoio durante o doutorado. A minha gratidão a todos não tem tamanho. Fernando, obrigada por tudo, mas principalmente por ter me encorajado a fazer o que eu pensei que não seria capaz. Seu entusiasmo na pesquisa contagia.

À Viviana, Renata e Mateus que me ajudaram na execução do trabalho. Obrigada Viviana por todos os finais de semana que você foi me ajudar.

Ao Professor Paolo e a pesquisadora Valentina Bonffati da Università degli Studi di Padova que me receberam muito bem durante o Doutorado Sanduíche na Itália.

Ao Prof. Almir que foi meu orientador desde o período de Iniciação Científica na graduação. Obrigada por todas as oportunidades que me proporcionou. Minha eterna gratidão pelos conselhos durante todos esses anos.

A todos os funcionários e professores do Laboratório de Qualidade do Leite da UFMG e do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal (DTIPOA).

À Soraia, ao Prof. Marcos Xavier e ao Prof. João Paulo pelo apoio nas análises estatísticas.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e à Fapemig pelo financiamento do projeto.

À República das Gordinhas da Lancheira, Bruna, Fabíola e Samara, e as amigas lindas Patrícia e Neriene por todos os bons momentos compartilhados. Obrigada por terem sido a minha família em Belo Horizonte.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	9
OBJETIVOS	10
OBJETIVO GERAL	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
CAPÍTULO 1. EFEITO DO GRUPO GENÉTICO SOBRE O TAMANHO DAS MICELAS DE CASEÍNA DO LEITE DE ANIMAIS HOLANDÊS X ZEBU	11
RESUMO	12
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
2.1 <i>Coleta e preparação das amostras</i>	13
2.2 <i>Determinação da composição físico-química e CCS</i>	13
2.3 <i>Determinação do tamanho médio das micelas de caseína do leite</i>	14
2.4 <i>Análises estatísticas</i>	14
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4. CONCLUSÕES	17
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
CAPÍTULO 2. TAMANHO DAS MICELAS DE CASEÍNA: ASSOCIAÇÃO COM A COMPOSIÇÃO PROTEICA E EFEITO SOBRE A PRODUÇÃO DE MATÉRIA SECA DE QUEIJO PRODUZIDO EM ESCALA REDUZIDA	19
RESUMO	20
ABSTRACT	20
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.1 <i>Coleta e preparação das amostras</i>	21
2.2 <i>Determinação da composição físico-química, CCS, CBT e pH do leite</i>	22
2.3 <i>Determinação da composição protéica do leite</i>	22
2.4 <i>Determinação do tamanho médio das micelas de caseína do leite</i>	22
2.5 <i>Determinação da firmeza do coágulo de produção de matéria seca de queijo</i>	23
2.6 <i>Análises estatísticas</i>	23
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
3.1 <i>Estatística descritiva</i>	24
3.2 <i>Fatores que influenciam o tamanho médio das micelas de caseína</i>	24
3.3 <i>Influência do tamanho das micelas de caseína sobre a firmeza do coágulo e produção de massa seca de queijo</i>	27
4. CONCLUSÕES	29
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
CAPÍTULO 3. EFEITOS DO GRUPO GENÉTICO, CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E POLIMORFISMOS DE CSN1S1, CSN3, LGB SOBRE AS FRAÇÕES PROTEICAS DO LEITE DE ANIMAIS HOLANDÊS X ZEBU	32

RESUMO	33
ABSTRACT	33
1. INTRODUÇÃO.....	34
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2.1 Animais, coleta e preparação das amostras.....	34
2.2 Determinação da composição físico-química e CCS.....	35
2.3 Determinação da composição protéica do leite	35
2.4 Polimorfismos genéticos.....	36
2.5 Definições das variáveis	37
2.6 Análises estatísticas.....	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
3.1 Efeitos do grupo genético e contagem de células somáticas sobre a composição do leite	38
3.2 Frequências dos genótipos e alelos.....	40
3.3 Efeitos dos genótipos de BLG, CNS3 e CSNIS1 sobre a composição do leite.....	41
4. CONCLUSÕES	44
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53

RESUMO

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de investigar os fatores que afetam a composição proteica e o tamanho das micelas de caseína do leite de animais mestiços em amostras individuais e de tanque de animais mestiços. Foram realizados três trabalhos distintos, que foram divididos em capítulos. O objetivo do primeiro capítulo foi avaliar o efeito de diferentes cruzamentos Holandês x Gir sobre o tamanho das micelas de caseína. Foram selecionadas 200 vacas leiteiras de diferentes cruzamentos (1/2; 9/16; 5/8; 3/4; 7/8 e 15/16). Mediante um modelo de regressão linear múltipla, verificou-se que os animais com menor proporção da raça Holandesa apresentaram menores micelas de caseína, sugerindo que esses animais poderiam produzir leite com características desejáveis à produção de derivados lácteos. No segundo capítulo foi investigada a associação do tamanho das micelas de caseína com a composição proteica do leite, assim como o efeito do tamanho das micelas de caseína sobre a produção de massa seca de queijo e firmeza da coalhada. Foram coletadas 140 amostras de leite de tanque de diferentes fazendas localizadas na mesma região. Verificou-se que menores micelas de caseína foram associadas positivamente com o conteúdo de κ -caseína e β -lactoglobulina, e negativamente com o conteúdo de α_{s1} -caseína. Em adição, menores micelas foram associadas positivamente com a produção de massa seca de queijo. Esses resultados sugeriram que menores micelas, associadas ao maior teor de caseína, maiores proporções de κ -caseína, teor de gordura e lactose contribuem para a otimização da produção de massa seca de queijo. No terceiro capítulo foram investigadas a associação dos genótipos de *LGB*, *CNS3* e *CSN1S1*, cruzamento e CCS sobre a composição e produção dos constituintes e frações proteicas do leite. Foram selecionados 82 animais, com os graus de sangue 1/2, 9/16 e 3/4. Verificou-se que o sistema de produção com animais com graus de sangue 1/2 e 9/16 com elevada CCS apresentou efeito negativo sobre os conteúdos de proteína, caseína e sobre as frações proteicas. Em adição, os genótipos de *LGB* apresentaram efeito marcante sobre a produção de constituintes do leite e das frações proteicas. Os genótipos de *CNS3* apresentaram efeito sobre o conteúdo de κ -caseína e os genótipos de *CSN1S1* sobre o conteúdo de α_{s1} -caseína. Esses resultados demonstraram que é possível alterar a composição das frações proteicas do leite pelo aumento de determinados alelos dos genes *LGB*, *CNS3* e *CSN1S1*.

Palavras-chave: caseínas, micelas de caseína, polimorfismo das proteínas, queijo

ABSTRACT

The aim of this thesis was to investigate the factors that affect the milk protein composition and the casein micelles size in samples of bulk milk and milk from individual cows. This thesis was divided in three chapters. The aim of the first chapter was to analyze the effect of different crossbreeding of 200 cows Holstein x Zebu on casein micelle size. Traits were analyzed by using a linear model including the fixed effects of crossbreeding, somatic cells count and solids non fat. Crossbreeding was associated with casein micelles size. Animals 1/2 and 9/16 exhibited smaller casein micelle size. This result suggests that animals with lower proportion of Holstein race would produce milk with favorable cheese making properties. The aim of the second chapter was to explore the association between milk protein content and casein micelles size, and the effect of casein micelles size upon gel strength and cheese dry mass yield, using a laboratory reduced scale cheese production. A total of 140 bulk tank raw milk samples were collected at dairy farms. Traits were analyzed by using two linear models including only fixed effects. Smaller micelles were associated with the higher amounts of κ -casein (κ -CN) and β -lactoglobulin (β -LG), and the lower α_s -casein (α_s -CN) content. Factors potentially linked to micellar dissociation, such as high urea content and lower pH were associated with micelles size. The casein micellar size, (without α_s -CN and κ -CN effect), did not affect cheese gel strength, but smaller micelles of casein together with higher fat, lactose, casein and κ -CN content exhibited favorable effect on dry matter cheese yield. Overall, the present study provided new insights into importance casein micelle size in to optimize the cheese making process. The aim of the third chapter was to investigate the effects exerted by genetic groups, somatic cell count and *CSN1S1* (α_{s1} -CN), *CSN3* (κ -CN), *LGB* (β -LG) polymorphisms on milk composition and production of constituents, particularly of protein fractions of milk samples production for animals from different crossbreeding between Holstein and Zebu. Content of the major protein fractions was measured by reversed phase HPLC in individual milk samples of 82 cows. Traits were analyzed by using a linear model including only fixed effects. The genetic groups was divided in G1 (animals 1/2 and 9/16 Holstein x Zebu) and G2 (animals 3/4 Holstein x Zebu) and each genetic group was categorized in high or low CCS. The linear model included days in milk, genes polymorphisms and genetic groups associated with CCS. Effects of genetic groups and CCS affected milk composition, particularly the protein composition. Milk produced by cows from G1 group with lower CCS exhibited higher α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN, α -LA e β -LG, casein total content. *LGB BB* polymorphism was associated with increased fat, protein, casein, lactose, total solids, α_{s2} -CN e α -LA production, and decreased β -LG content. *CNS3 BB* and *AB* exhibited increased κ -CN content, and *CSN1S1 CC* and *BC* exhibited positively effect on α_{s1} -CN concentration.

Keywords: casein, casein micelles, protein polymorphisms, cheese

INTRODUÇÃO GERAL

A proporção de leite produzido no Brasil que é processada em derivados lácteos vem aumentando nos últimos anos. O mercado brasileiro de queijos tem avançado de forma consistente e chamado à atenção de empresas estrangeiras, que veem oportunidades de crescimento no país. A composição e algumas características do leite são primordiais para a produção de queijos e conseqüentemente, para o rendimento econômico da indústria laticinista. Além do maior conteúdo de componentes como gordura, caseína total e κ -caseína, o diâmetro das micelas de caseína também é apontado como um potencial indicador da qualidade do leite destinado a indústria de produção de queijos. Portanto, hipotetiza-se que o leite com maior conteúdo de gordura, caseína e κ -caseína, associados a menores micelas, pode ser mais adequado ao beneficiamento de queijos. Nesse sentido, além de investigar essa hipótese, é necessário identificar as fontes de variação que podem ser manejadas de modo a fim de produzir leite com essas características desejáveis.

Vários fatores são apontados como fonte de variação da composição protéica e do tamanho das micelas de caseína. Entre eles citam-se a raça dos animais e os polimorfismos das proteínas do leite. A presença da κ -caseína B associada a menores micelas já foi reportado. No Brasil, a maior parte do leite que é destinado à indústria laticinista advém de animais mestiços, provenientes de diferentes cruzamentos entre animais taurinos e zebuínos, pois são animais que apresentam maior desempenho e capacidade de adaptação ao clima tropical. Até onde se sabe, não existem estudos acerca da variação do tamanho das micelas de caseína e da composição protéica do leite proveniente dos animais mestiços criados no país. Diante da escassez de informações importantes para determinação de indicadores para seleção de animais para a produção de leite no país, este estudo foi desenvolvido.

OBJETIVOS

Objetivo geral

- Identificar fatores que afetam a composição proteica e o tamanho das micelas de caseína do leite de amostras individuais de animais Holandês x Zebu e de tanques refrigeradores.

Objetivos específicos

- Estudar o efeito de diferentes cruzamentos de animais Holandês x Zebu sobre o tamanho das micelas de caseína (Capítulo 1).
- Estudar a associação do diâmetro das micelas de caseína com a composição protéica do leite, e seu efeito sobre a produção de massa seca de queijo e firmeza do coágulo em amostras de leite de tanque (Capítulo 2).
- Estudar o efeito do polimorfismo dos genes *BLG*, *CSN3*, *CSN1SI*, grupo genético e contagem de células somáticas sobre a composição proteica do leite (Capítulo 3).

CAPÍTULO 1

EFEITO DO GRUPO GENÉTICO SOBRE O TAMANHO DAS MICELAS DE CASEÍNA DO LEITE DE ANIMAIS HOLANDÊS X ZEBU

RESUMO

O objetivo desse estudo foi investigar a relação do diâmetro médio das micelas de caseína do leite de 200 vacas leiteiras mestiças, com diferentes proporções de sangue da raça Holandesa, composição do leite (proteína, gordura, lactose, extrato seco desengordurado, nitrogênio ureico do leite), contagem de células somáticas, idade, estágio de lactação e produção de leite. A mensuração do diâmetro médio das micelas de caseínas foi realizada através da espectroscopia de correlação de fóton (PCS). A análise de regressão múltipla foi utilizada para estudar a relação entre as variáveis. Diferenças no tamanho das micelas de caseína foram observadas entre as amostras de leite dos animais com diferentes graus de sangue Holandês, contagem de células somáticas e extrato seco desengordurado, o que indica que a estrutura das micelas de caseína é influenciada por fatores genéticos, pela saúde da glândula mamária e a composição do leite.

Palavras-Chave: Células somáticas, extrato seco desengordurado, micelas de caseína, proteína.

ABSTRACT

The objective of this work was to investigate the correlation of milk casein micelles diameter from Holstein and Zebu crossbreds with milk composition (protein, fat, lactose, total and nonfat solids and milk urea nitrogen-MUN), somatic cell count (SCC), age, lactation stage and production. Average casein micelles diameters of milk samples obtained from 200 cows were measured using Photon Correlation Spectroscopy (PCS) and multiple regression analysis was used to find relationship between variables. Casein micelle diameter, SCC, and nonfat solids were different between animals with different Holstein crossbreed ratio, which suggests influence of genetic factors, mammary gland health and milk composition. Overall, results indicate the potential use of casein micelle diameter as a tool to select animals to produce milk more suitable to cheese production.

Keywords: Milk urea nitrogen, nonfat solids, protein, somatic cell count

1. INTRODUÇÃO

A proporção de leite produzida no Brasil que é utilizada para o processamento de derivados lácteos aumentou nos últimos anos (USDA, 2014). A composição do leite é crucial para o processamento e qualidade desses produtos (Lucey e Singh 1997) e conseqüentemente, para o desempenho econômico da indústria laticinista. Entre os componentes do leite de maior importância industrial estão as caseínas. Existem quatro tipos, α_1 -CN, α_2 -CN, β -CN, e κ -CN. No leite, as caseínas, juntamente com o fosfato de cálcio formam agregados de milhares de moléculas de proteínas individuais, com diâmetro médio de 150 a 200 nm (de Kruif, 1998), denominados micelas de caseína. Nos últimos anos, muita atenção tem sido dada às micelas de caseína, pois sua estrutura é essencial para o processamento do leite em produtos gelificados, tais como queijos e iogurtes (Dalglish e Corredig 2012), e sua estabilidade durante o aquecimento, congelamento e secagem (de Kruif, 1998).

Estudos preliminares demonstraram que o diâmetro médio das micelas de caseína apresenta variação entre animais e pode estar associado à composição do leite, genética, dieta e raça dos animais (de Kruif e Huppertz 2012; Devold et al. 2000). Glantz et al. (2010) sugeriram que a seleção de animais para menor diâmetro médio de micela de caseína pode melhorar as propriedades de coagulação do leite, com isso produzir matéria-prima mais adequada à produção de queijo, pois micelas de caseína menores são mais compactas e apresentam maior proporção de κ -caseína (Devold et al., 2000), o que permite a formação de uma coalhada mais firme no processo inicial da produção de queijo (Ford e Grandison, 1986).

No Brasil, a utilização de animais de raças europeias especializadas para a produção de leite, não tem alcançado êxito econômico em razão, principalmente, dos elevados custos de produção. A utilização de animais mestiços, produtos do cruzamento de raças zebuínas com raças europeias, particularmente da raça Gir com a raça Holandesa, é prática bastante difundida no país, por apresentar significativa heterose para muitas características economicamente importantes, além de serem animais que apresentam maior capacidade de adaptação ao clima tropical, quando comparado a animais de raças europeias puras (Madalena, 2002).

Considerando que no Brasil uma grande parcela da produção de leite provém de animais mestiços, o presente estudo objetivou investigar a distribuição do diâmetro médio das micelas de caseínas e sua relação com diferentes cruzamentos, composição do leite, contagem de células somáticas, idade, estágio de lactação e produção de leite.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e preparação das amostras

Foram selecionadas 200 vacas mestiças, produtos do cruzamento da raça Gir e da raça Holandesa, provenientes de cinco fazendas que tinham animais com os seguintes graus de sangue Holandês: 1/2; 9/16; 5/8; 3/4; 7/8 e 15/16, na quantidade de 41, 21, 31, 29, 51 e 27, respectivamente. Todas as fazendas estão localizadas no Estado de Minas Gerais e são cadastradas no Programa de Gerenciamento de Rebanhos Leiteiros do LabUFMG. Todas as amostras de leite foram coletadas no período de março a abril do ano de 2013.

2.2 Determinação da composição físico-química e CCS

O teor de gordura, proteína total, lactose, sólidos totais, extrato seco desengordurado, nitrogênio urêico e contagem de células somáticas foi mensurado pelo equipamento CombiScope FTIR 400[®] (Delta Instruments; Drachten, Holanda) que combina o princípio de Transformada de Fourier no infravermelho médio e citometria de fluxo, respectivamente. A contagem de células somáticas foi normalizada da seguinte forma $CCSn = \text{Log}_2 = (\text{CCS}/100) + 3$.

2.3 Determinação do tamanho médio das micelas de caseína do leite

A mensuração do tamanho médio das micelas de caseínas das amostras de leite de cada foi realizada de acordo com Devold et al.(2000) através da espectroscopia de correlação de fótons (PCS). Previamente à análise, as amostras de leite foram desnatadas através de centrifugação a 2000 x g durante 30 min a temperatura de 5°C, e em seguida a camada de gordura foi removida com uma espátula. O equipamento utilizado foi o Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) equipado com um laser hélio-neônio (632.8 nm). O instrumento foi operado no modo unimodal e as mensurações foram realizadas com um ângulo de dispersão de 90°, temperatura de 25°C. O leite desnatado foi diluído a 1:1000 com um simulado de ultrafiltrado de leite (Jeness& Koops, 1962) para obter satisfatória concentração requerida para a taxa de contagem (fótons por segundo) especificado pelo fabricante. Para evitar a interferência de partículas estranhas durante a análise, o SMUF foi filtrado em um filtro de 0,22 µm.

2.4 Análises estatísticas

A análise estatística dos dados foi realizada com o programa estatístico STATA versão 12 (Stata Corp., College Station, Texas, USA) usando um modelo de regressão múltipla. As variáveis examinadas foram primeiramente analisadas individualmente mediante um modelo de regressão simples. As variáveis com *P* valor menor ou igual a 0,20 foram selecionadas para serem testadas para compor o modelo de regressão múltipla, em que variáveis com $P \leq 0,05$ foram consideradas no modelo final.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média e desvio padrão do diâmetro das micelas de caseína foram 170,22±21,18 nm, enquanto que a amplitude foi de 121,8 a 235,6 nm. A distribuição da frequência do tamanho médio das micelas de caseína está apresentada na Figura 1.

O modelo de regressão foi ajustado mediante as seguintes variáveis exploratórias ($P \leq 0,20$): cruzamento, idade do animal, dias em lactação, produção de leite, escore da contagem de células somáticas (ECS), teor de gordura, proteína, lactose, sólidos desengordurados e nitrogênio ureico do leite (NUL), eleitas para serem testadas na análise de regressão múltipla (Tabela 1). Todas essas variáveis apresentaram $P \leq 0,05$, entretanto para compor o modelo de regressão múltipla, apenas três variáveis foram estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$): cruzamento, CCS e sólidos desengordurados (Tabela 2), demonstrando que essas três variáveis apresentam efeito aditivo, dessa forma menores micelas de caseína foram observadas em amostras de leite proveniente de animais 1/2 e 9/16, com elevada CCS e sólidos desengordurados.

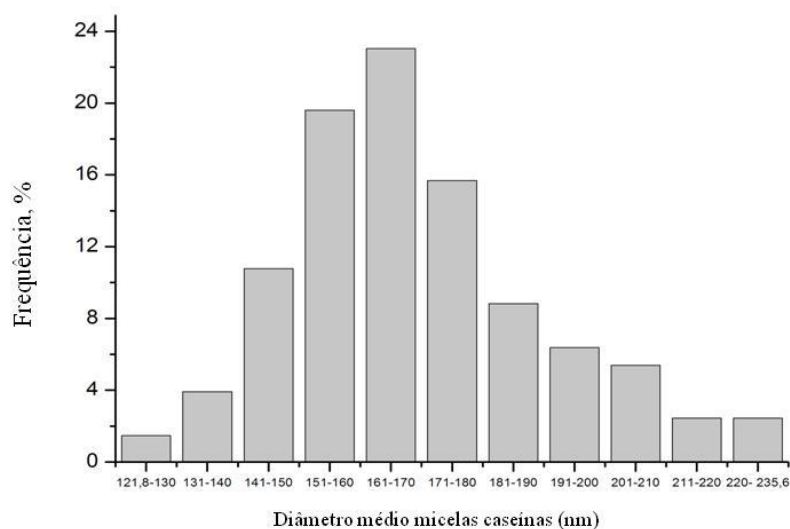


Figura 1. Distribuição de frequência do tamanho médio das micelas de caseína

Tabela 1. Variáveis eleitas para serem testadas no modelo final de regressão múltipla ($P \leq 0,20$)

Variáveis	Coefficiente	Erro padrão	<i>P</i> -valor	R^2 ajustado
Holandês x Gir ½	-7,96	5,32	<0,001	0,17
Holandês x Gir 9/16	-0,72	20,07	<0,001	0,17
Holandês x Gir 5/8	21,02	4,72	<0,001	0,17
Holandês x Gir ¾	11,40	4,81	<0,001	0,17
Holandês x Gir 7/8	13,92	4,16	<0,001	0,17
Holandês x Gir 15/16	20,84	4,97	<0,001	0,17
Idade	-1,35	0,60	0,024	0,02
Produção de leite	0,73	0,21	0,001	0,05
Escore de células somáticas	-1,40	0,44	0,002	0,04
Gordura	-3,97	1,53	0,010	0,02
Proteína	-14,99	4,86	0,002	0,04
Sólidos desengordurados	-7,04	3,10	0,024	0,02
Nitrogênio ureico do leite	0,91	0,32	0,005	0,03

Tabela 2. Modelo final ($P \leq 0,05$) das variáveis associadas com o diâmetro médio das micelas de caseína em 200 vacas mestiças, através de análise multivariada (R^2 ajustado=0,12)

Variáveis	Coefficiente	Erro padrão	<i>P</i> -valor
Cruzamento Holandês x Gir	0,270	0,08	0,001
Contagem de células somáticas	-1,396	0,43	0,001
Sólidos desengordurados	-6,549	3,04	0,033

O diâmetro médio das micelas de caseína apresentou uma ampla variação de tamanho. Foram observados valores de diâmetro entre 121,8 e 235,6 nm. A amplitude observada nesse estudo corrobora com os achados de Horne e Dalgleish (1985) que observaram variação no tamanho das micelas de caseína de 100 a 300 nm, aproxima-se da amplitude de 150 a 200 nm, citada por

De Kruif (1998), e da variação de 150 a 225 nm observada por Devold et al. (2000). Todas as amostras de leite analisadas pelos trabalhos citados foram provenientes de animais de raças europeias.

Na análise de regressão múltipla, o coeficiente positivo para grau de sangue Holandês sugere que o diâmetro médio das micelas de caseína foi maior para os animais com maior proporção da raça Holandesa no cruzamento (5/8, 3/4, 7/8, 15/16). O fator genético é um dos fatores que influenciam o tamanho das micelas de caseína. Os genótipos BC e CC de α_{s1} -CN e BB de κ -CN foram associados com a presença de menores micelas no leite (Devold et al., 2000; Bijl et al., 2014). Em adição, menores micelas foram associadas com maior taxa de glicosilação da κ -CN (Bijl et al., 2014), que são modificações pós-traducionais que podem ser influenciadas por fatores dietéticos (Lavialle e Chanut, 2008), ou diferenças no metabolismo da glicose na glândula mamária. Diante disso, é necessário que sejam estudados os fatores que podem induzir a formação de menores micelas no leite produzido por animais com maior proporção da raça Gir no cruzamento.

Não foram encontrados trabalhos com animais mestiços proveniente do cruzamento de animais de raças zebuínas com animais de raças europeias, particularmente o cruzamento da raça Gir com a Holandesa, acerca da estrutura e composição das micelas de caseína do leite. Desse modo, trabalhos futuros devem ser conduzidos para melhor compreensão da relação dos diferentes cruzamentos com o diâmetro médio das micelas de caseína, com o intuito de encontrar marcadores que possam ser utilizados para selecionar animais com características desejáveis a indústria laticinista.

O sinal negativo dos coeficientes do ECCS e ESD indica relação inversa entre essas duas variáveis e o diâmetro médio das micelas de caseína. Sabe-se, que a elevação da celularidade no leite deve-se principalmente à infiltração de leucócitos do sangue para o leite decorrente do processo inflamatório na glândula mamária. Neste contexto, ocorre aumento da atividade proteolítica de enzimas endógenas e exógenas do leite (Roux et al., 2003).

A plasmina é a enzima endógena mais comumente encontrada em leite com elevada CCS (Donnelly e Barry, 1983). Entre as enzimas exógenas provenientes das células somáticas, estão a catepsina G, catepsina D, catepsina B, elastase e colagenase (Owen e Campbell, 1999). Estudos prévios demonstraram que essas enzimas presentes em maior concentração no leite com elevada CCS desencadeiam a hidrólise das caseínas. A plasmina hidrolisa preferencialmente α_{s1} -, α_{s2} - e β -caseína (Bastian e Brown, 1996), enquanto a catepsina G é uma serino protease que cliva apenas a α_{s1} - e β -caseína (Considine et al., 2002), e a catepsina D é uma protease aspártica que hidrolisa α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ - caseína, porém apresenta mais susceptibilidade a hidrólise de α_{s1} -do que a β -caseína (McSweeney et al., 1995).

Trabalhos conduzidos por Senyk et al. (1985) e Verdi et al. (1987) demonstraram que ocorre hidrólise das caseínas em amostras de leite com elevada CCS. Por conseguinte, Moslehishad e Ezzatpanah (2010) verificaram que o diâmetro das micelas de caseína reduziu em amostras de leite com mais de 200.000 células/mL. Nesse contexto, pode-se inferir que a hidrólise das caseínas, ocasionada pelas proteases presentes no leite em maior concentração quando existe inflamação da glândula mamária, ocasionou mudanças na estrutura das micelas de caseína, verificadas nesse trabalho a partir da redução do diâmetro das mesmas.

A relação significativa com o ESD indica que o diâmetro médio das micelas é afetado pela composição do leite. Na análise de regressão múltipla não foi possível identificar individualmente os componentes do leite que apresentaram relação com a variável estudada. Não obstante, na análise de regressão univariada (Tabela 1), verificou-se que o diâmetro das micelas tem associação significativa com o teor de proteína ($P=0.002$), gordura ($P=0.01$) e nitrogênio ureico do leite ($P=0.005$). Possivelmente, essas variáveis interagem com as outras variáveis estudadas, por isso não apresentam efeito significativo para serem exploradas no modelo de regressão múltipla. Desse modo, a partir das duas análises, pode-se sugerir que o teor de proteína foi o componente individual do leite que mais afetou o diâmetro médio das micelas de caseína, o que difere do resultado observado por (Glantz et al., 2010) que não observaram correlação entre o teor de proteína bruta do leite e o diâmetro médio de micelas de caseína.

Diante da possibilidade do diâmetro médio das micelas de caseína ser um indicador tecnológico, e permitir a seleção de animais que produzam leite mais adequado a produção de queijo, é necessário que mais trabalhos sejam conduzidos com o leite de animais mestiços, com o intuito de identificar mais parâmetros que estejam relacionados com o processo de produção de derivados lácteos e o diâmetro médio das micelas de caseína.

4. CONCLUSÕES

Micelas de caseína menores foram verificadas em animais com menor grau de sangue da raça Holandesa e maior CCS, o que indica que a estrutura das micelas de caseína pode ser influenciada por fatores genéticos, pela saúde da glândula mamária e a composição do leite.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASTIAN, E. D.; BROWN, R. J. Plasmin in milk and dairy products: an update. *Int. Dairy J.*, v. 6, n. 5, p. 435-457, 1996.

BIJL, E et al. Factors influencing casein micelle size in milk of individual cows: genetic variants and glycosylation of κ -casein. *Int. Dairy J.*, v. 34, n. 1, p. 135-141, 2014.

Dabdoub, S.M.; Shook, G.E. Phenotypic relations among milk yield, somatic cell count and clinical mastitis. *J. Dairy Sci.*, v. 67 (Supp.1), p. 163-164, 1984

DALGLEISH, D. G.; CORREDIG, M. The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, v. 3, p. 449-467, 2012.

DE KRUIF, C. G. Supra-aggregates of casein micelles as a prelude to coagulation. *J. Dairy Sci.*, v. 81, n. 11, p. 3019-3028, 1998.

DE KRUIF, C. G.; HUPPERTZ, T. Casein micelles: size distribution in milks from individual cows. *J. Agric. Food Chem.* v. 60, n. 18, p. 4649-4655, 2012.

DEVOLD, T. G et al. Size of native and heated casein micelles, content of protein and minerals in milk from Norwegian Red Cattle—Effect of milk protein polymorphism and different feeding regimes. *Int. Dairy J.* v. 10, n. 5, p. 313-323, 2000.

- DONNELLY, W. J.; BARRY, J. G. Casein compositional studies. III. Changes in Irish milk for manufacturing and role of milk proteinase. *J. Dairy Res.* v. 50, n. 04, p. 433-441, 1983.
- FORD, G. D.; GRANDISON, A. S. Effect of size of casein micelles on coagulation properties of skim milk. *J. Dairy Res.*, v. 53, n. 01, p. 129-133, 1986.
- GLANTZ, M et al. Importance of casein micelle size and milk composition for milk gelation. *J. Dairy Sci.*, v. 93, n. 4, p. 1444-1451, 2010.
- HORNE, D. S.; DALGLEISH, D. G. A photon correlation spectroscopy study of size distributions of casein micelle suspensions. *European Biophysics Journal*, v. 11, n. 4, p. 249-258, 1985.
- Jenness, R.; Koops, J. Preparation and properties of a salt solution which simulates milk ultrafiltrate. *Milk Dairy Journal*, v. 15, p.64, 1962.
- LAVIALLE, F.; CHANAT, E. Lipid-deprived diet perturbs O-glycosylation of secretory proteins in rat mammary epithelial cells. *Animal*, v.2, n.4, p. 491-499, 2008.
- LE ROUX, Y; LAURENT, F; MOUSSAOUI, F. Polymorphonuclear proteolytic activity and milk composition change. *Vet. Res.*, v. 34, n. 5, p. 629-645, 2003.
- LUCEY, J. A.; SINGH, H. Formation and physical properties of acid milk gels: a review. *Food Res. Int.*, v. 30, n. 7, p. 529-542, 1997.
- Madalena, F.E. Animals that Produce Dairy Foods | Bos indicus Breeds and Bos indicus × Bos taurus Crosses. In: Encyclopedia of Dairy Sciences, 2002, (Academic Press, San Diego), 300-309, 2002.
- MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F.; OLSON, N. F. Proteolysis of bovine caseins by cathepsin D: preliminary observations and comparison with chymosin. *Int. Dairy J.* v. 5, n. 4, p. 321-336, 1995.
- MOSLEHISHAD, M.; EZZATPANAH, H. Transmission electron microscopy study of casein micelle in raw milk with different somatic cell count levels. *International Journal of Food Properties*, v. 13, n. 3, p. 546-552, 2010.
- OWEN, C. A.; CAMPBELL, E. J. The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 65, n. 2, p. 137-150, 1999.
- SENYK, G. F.; BARBANO, D. M.; SHIPE, W. F. Proteolysis in milk associated with increasing somatic cell counts. *J. Dairy Sci.*, v. 68, n. 9, p. 2189-2194, 1985.
- United States Department of Agriculture, 2013. Brazil Dairy and Products Annual. In: U.F.A. Service (ed), 2013, (United States Department of Agriculture, United States),
- VERDI, R. Joseph et al. Variability in true protein, casein, nonprotein nitrogen, and proteolysis in high and low somatic cell milks. *J. Dairy Sci.*, v. 70, n. 2, p. 230-242, 1987.

CAPÍTULO 2

TAMANHO DAS MICELAS DE CASEÍNA: ASSOCIAÇÃO COM A COMPOSIÇÃO PROTEICA E EFEITO SOBRE A PRODUÇÃO DE MATÉRIA SECA DE QUEIJO PRODUZIDO EM ESCALA REDUZIDA

RESUMO

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de investigar a associação da composição proteica do leite com o tamanho das micelas de caseína (TMCN), e o efeito do TMCN sobre a firmeza do coágulo e da produção de massa seca de queijo produzido em escala reduzida. Foram coletadas 140 amostras de leite cru de diferentes fazendas. O tamanho médio das micelas de caseína foi determinado através da espectroscopia de correlação de fótons (PCS). Menores micelas de caseína foram associadas com maior conteúdo de κ -CN e β -LG, e menor conteúdo de α_{s1} -CN + α_{s2} -CN. Fatores que podem propiciar dissociação das micelas de caseína, como o maior teor de ureia e menor pH também apresentaram associação com o TMCN. O tamanho das micelas de caseína sem o efeito da α_{s1} -CN + α_{s2} -CN e κ -CN não apresentou efeito sobre a firmeza do coágulo, porém apresentou efeito significativo sobre a produção de massa seca de queijo.

Palavras-chave: α_s -caseína, α -Lactalbumina, β -caseína, β -Lactoglobulina, κ -caseína

ABSTRACT

This study intend to explore the association between milk protein content and casein micelles size, and the effect of casein micelles size upon gel strength and cheese dry mass yield, using a laboratory reduced scale cheese production. A total of 140 bulk tank raw milk samples were collected at dairy farms. Traits were analyzed by using two linear models including only fixed effects. Smaller micelles were associated with the higher amounts of κ -casein (κ -CN) and β -lactoglobulin (β -LG), and the lower α_s -casein (α_s -CN) content. Factors potentially linked to micellar dissociation, such as high urea content and lower pH were associated with micelles size. The casein micellar size, (without α_s -CN and κ -CN effect), did not affect cheese gel strength, but smaller micelles of casein together with higher fat, lactose, casein and κ -CN content exhibited favorable effect on dry matter cheese yield. Overall, the present study provided new insights into importance casein micelle size in to optimize the cheese making process.

Keywords: α_s -casein, α -Lactalbumin, β -casein, β -Lactoglobulin, κ -casein

1. INTRODUÇÃO

As caseínas (CN) apresentam influência marcante sobre a produção e características reológicas de diversas variedades de queijo (Lucey e Kelly, 1994). No leite, as caseínas (α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN, k-CN) associadas ao fosfato de cálcio inorgânico formam milhares de agregados de proteínas, com diâmetro médio variando entre 150 a 200 nm, comumente denominados micelas de caseína (De Kruif, 1998). Apesar de existirem diversos estudos sobre as micelas de caseína, sua detalhada estrutura ainda não é totalmente conhecida. Sabe-se que são partículas esféricas, polidispersas, com a superfície formada predominantemente pela k-CN, e o interior pelas demais caseínas. Essa organização é essencial do ponto de vista tecnológico, pois promove a estabilidade das micelas. A camada micelar formada pela k-CN promove repulsão estérica e eletrostática entre as micelas e previne a agregação. Por outro lado, quando essa camada é rompida pela ação de enzimas ou outros fatores, ocorre a agregação que é essencial no processo de produção de diversas variedades de queijos (Dalglish e Corredig, 2012).

Estudos têm sugerido que o tamanho das micelas de CN pode influenciar as propriedades de coagulação do leite, tais como a firmeza do coágulo no processo inicial da produção de queijo. Amostras de leite com menores micelas de CN podem formar coágulos mais firmes devido, em parte, ao aumento da velocidade de hidrólise da κ -CN por ação enzimática, associado à maior taxa de κ -CN glicosilada, e a maior agregação entre as micelas de caseína ao formar a matriz do gel de para-caseína (Dziuba e Minkiewicz, 1996; Walsh et al., 1998).

Do ponto de vista bioquímico, a produção de queijo é um processo complexo, e influenciado por diversos fatores, tais como o teor de gordura, composição proteica, contagem bacteriana e contagem de células somáticas do leite (Lucey e Kelly, 1994). Do mesmo modo, vários fatores em comum são apontados como fonte de variação do tamanho das micelas de caseína (Devold et al., 2000; Bijl et al., 2014). Considerando que a produção de queijo em escala reduzida é um melhor indicador do rendimento da produção real de queijo, quando comparado a mensuração da firmeza do coágulo (Bonfatti et al. 2014; Cipolat-Gotet et al., 2014), e não existem estudos que avaliaram a influência do tamanho das micelas de caseína em associação com outros componentes do leite determinantes do rendimento da produção de queijo, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de inicialmente investigar quais as frações proteicas apresentam efeito sobre o tamanho das micelas de caseína, por conseguinte estudar os fatores comuns no mesmo modelo de regressão linear, tendo como variável independente o rendimento da produção de queijo e na firmeza do coágulo

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e preparação das amostras

As amostras de leite cru foram coletadas de 140 fazendas localizadas na cidade de Ponte Nova, Minas Gerais, Brasil. Todas as amostras foram coletadas do tanque refrigerador de cada fazenda. Foram coletados 150 mL de leite de cada fazenda. As amostras para determinação da contagem bacteriana total foram adicionadas de conservante azidiol (azida sódica e cloranfenicol), enquanto as amostras para o restante das análises (proteína total, caseína total, α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN, k-CN, β -LG, α -LA, gordura, lactose, sólidos totais, sólidos desengordurados e nitrogênio ureico, tamanho micelas de caseína, determinação da firmeza do coágulo e produção de massa seca de queijo) foram adicionadas do conservante bronopol (2-

bromo-2-nitropane-1,3-diol). Logo após a coleta, as amostras foram refrigeradas a 4°C e mantidas nessa temperatura até o momento das análises. Para determinação das frações proteicas, uma alíquota de 2 mL de cada amostra foi desnatada, em seguida liofilizada e mantida a temperatura de -80°C até o momento da análise.

2.2 Determinação da composição físico-química, CCS, CBT e pH do leite

O teor de gordura, proteína total, caseína, lactose, sólidos totais, extrato seco desengordurado, nitrogênio urêico e contagem de células somáticas foi mensurado pelo equipamento CombiScope FTIR 400® (Delta Instruments; Drachten, Holanda) que combina o princípio de Transformada de Fourier no infravermelho médio e citometria de fluxo, respectivamente. A contagem bacteriana total foi realizada pelo equipamento Bactocount IBC 150 (Bentley Instruments®) que utiliza o princípio de citometria de fluxo. As análises para determinação da composição do leite foram realizadas segundo IDF (2000) e a contagem de células somáticas segundo IDF (1995). O pH do leite foi mensurado com um ph metro digital (Digimed, DM22).

2.3 Determinação da composição protéica do leite

A mensuração das principais proteínas do leite (α_{s1} -CN+ α_{s2} -CN, β -CN, κ -CN CN, α -LA, β -LG) foi realizada através do perfil eletroforético, de acordo metodologia descrita por Verdi et al. (1987) com algumas modificações. Uma alíquota de 2 mL de cada amostra de leite coletada foi desnatada por centrifugação a 2.000 g por 30 min a 5°C, posteriormente liofilizadas. Foi utilizada uma cuba de eletroforese vertical 20 x 20 cm (Prolab). A SDS-PAGE foi realizada com géis de concentração de 5% em 0,5 M de tampão Tris-HCl, pH 6,8, e géis de separação com gradiente de 12 a 20% em 1,5 M de tampão Tris-HCl, pH 8,8 com 10% de SDS. As amostras (2 mg mL⁻¹) foram dissolvidas em 200µl de tampão Tris-HCl, pH 6,8, com 10% de SDS, 5% de β -mercaptoetanol, 5% de glicerol e azul de bromofenol, em seguida foram aquecidas a 100° C durante 3 minutos, e 4 µL foram depositadas no gel. A corrida eletroforética foi realizada por quatro horas, a 120 V. A identificação de cada proteína foi realizada com uma amostra padrão contendo as cinco proteínas purificadas de interesse, fornecidas pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Após a corrida, as proteínas foram fixadas no de gel com 12% com ácido trifluoroacético (TCA) durante 30 minutos, em seguidas coradas com 0,1% de azul de Comassie R250, dissolvido em uma mistura de 50% de etanol e 2% de etanol, durante uma noite. A descoloração foi realizada durante uma noite, com uma solução de 30% de etanol e 7,5% de ácido acético. Os géis foram foto documentados e processados por análise de imagens (software ImageJ, versão 1.48) para quantificar a densidade óptica de cada fração proteica, visualizada através de gráficos, como demonstrado na Figura 1 (Anexo). As bandas das proteínas α -CN, β -CN e κ -CN ficaram próximas, por isso optou-se realizar a deconvolução dos picos referentes a essas proteínas. As coordenadas x e y dos gráficos foram exportados e analisados por outro programa OriginPro (versão 8.6).

A porcentagem de cada fração proteica foi calculada considerando a soma das áreas dos picos de α -CN, β -CN, κ -CN, α -LA e β -LG como 100%. A composição relativa das caseínas foi convertida a concentração utilizando o teor de caseína mensurado pelo método de FTIR.

2.4 Determinação do tamanho médio das micelas de caseína do leite

A mensuração do tamanho médio das micelas de caseínas das amostras de leite de cada foi realizada de acordo com Devold et al.(2000) através da espectroscopia de correlação de fótons (PCS). Previamente à análise, as amostras de leite foram desnatadas através de centrifugação a 2000 x g durante 30 min a temperatura de 5°C, e em seguida a camada de gordura foi removida com uma espátula. O equipamento utilizado foi o Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) equipado com um laser hélio-neônio (632.8 nm). O instrumento foi operado no modo unimodal e as mensurações foram realizadas com um ângulo de dispersão de 90°, temperatura de 25°C. O leite desnatado foi diluído a 1:1000 com um simulado de ultrafiltrado de leite (Jeness e Koops, 1962) para obter satisfatória concentração requerida para a taxa de contagem (fótons por segundo) especificado pelo fabricante. Para evitar a interferência de partículas estranhas durante a análise, o SMUF foi filtrado em um filtro de 0,22 µm.

2.5 Determinação da firmeza do coágulo de produção de matéria seca de queijo

A mensuração da produção de massa seca de queijo e a firmeza do coágulo após 30 minutos de adição do coalho foram realizadas pelo método de escala reduzida. Foi pesado 25 gramas de cada amostra de leite cru, em Beckers de 50 mm de diâmetro, em seguida foi adicionado 300µl de ácido acético diluído para reduzir o pH do leite. Os Beckers foram agitados durante 20 segundos e mantidos em banho-maria a 35°C durante 10 minutos. Após este período, foram adicionados, a cada amostra, 230 µL de coalho diluído. Em seguida, cada Becker foi agitado novamente durante 20 segundos, e mantido imerso em banho-maria a 35°C durante 30 minutos. Após esse período, a firmeza do coágulo formado, foi determinada utilizando o texturômetro universal *Texture Analyser* TA-XT2 (Texture Technologies Corp. Scarsdale, NY). Uma probe cilíndrica de 13 mm de diâmetro (TA-10), foi penetrada no coágulo a 1 mm por segundo, a força em g foi mensurada a 4 mm. Logo em seguida cada amostra foi cortada verticalmente em quatro pedaços iguais, e transferida para um tubo de centrífuga de 50 mL. A simulação da dessoragem foi realizada por centrifugação a 1.100 g durante 30 minutos, a 10°C. O soro expelido foi separado da massa e pesado. A massa foi transferida para pratos de metal, e mantida em estufa a 100°C ± 2°C durante 4 horas. Após esse período, os pratos foram retirados da estufa, mantidos no dessecador até atingir a temperatura ambiente e então pesados. A produção de massa seca de queijo (PMSQ) foi determinada em valor de porcentagem, mediante a seguinte equação: PMSQ = (peso da massa seca * 100/ peso do leite cru utilizado). Essa metodologia foi adaptada de Hekken e Holsinger (2000) e Melilli et al. (2002).

2.6 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software Statistical Analysis System (SAS, versão 9.2). O método de correlação de Pearson foi utilizado para estabelecer o grau de associação entre o tamanho médio das micelas de CN e parâmetros de interesse. O efeito da composição proteica do leite sobre o tamanho médio das micelas de CN foi estimado usando um modelo de regressão linear, tendo como variáveis independentes as seguintes proteínas: α_{s1} -CN+ α_{s2} -CN, β -CN, κ -CN, α -LA, β -LG. As caseínas foram incluídas no modelo como valor de concentração (g/L) e as proteínas do soro como valor de porcentagem. Todas as proteínas foram divididas em 5 classes da seguinte maneira: classe 1 (conteúdo < \bar{x} - 0,5DP), classe 2 (\bar{x} - 0,5DP ≤ conteúdo < \bar{x} - 0,25DP), classe 3 (\bar{x} - 0,25DP ≤ conteúdo < \bar{x} + 0,25DP), classe 4 (\bar{x} + 0,25DP ≤ conteúdo < \bar{x} + 0,5DP), classe 5 (conteúdo < \bar{x} + 0,5DP). Apesar de existir relação de causa e efeito entre o tamanho médio das micelas de CN, o teor de nitrogênio ureico e pH do leite, essas

variáveis não foram incluídas no modelo para evitar o efeito de multicolinearidade, pois apresentaram alta correlação com o teor de κ -CN do leite.

Para estimar o efeito do tamanho das micelas de CN sobre a firmeza do coágulo e produção de massa seca de queijo também foi utilizado o método de regressão linear, tendo como variáveis independentes o teor de gordura, lactose, caseína total, % α_{s1} -CN+ α_{s2} -CN, % β -CN, % κ -CN, diâmetro médio das micelas de CN sem o efeito da α_{s1} -CN+ α_{s2} -CN e κ -CN. Para isso, ao invés de utilizar os valores originais do tamanho médio das micelas de CN, utilizou-se o resíduo estimado mediante um modelo de regressão linear, tendo como variável dependente o tamanho médio das micelas de CN, e independentes a % de α_{s1} -CN+ α_{s2} -CN e % κ -CN. Ressalta-se que o resíduo estimado não apresentou correlação significativa com as demais variáveis inseridas no modelo. Todas as variáveis foram incluídas no modelo de forma contínua. O teor de caseína total foi incluso no modelo juntamente com suas frações, com o intuito de investigar possíveis efeitos isolados de cada caseína, sem considerar o efeito quantitativo, o qual já é conhecido ter efeito sobre a produção de massa seca de queijo. A contagem de células somáticas e contagem bacteriana total não foram incluídas no modelo, pois não apresentaram valor significativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estatística descritiva

A estatística descritiva das variáveis investigadas é reportada na Tabela 1.

3.2 Fatores que influenciam o tamanho médio das micelas de caseína

Para estudar a associação do TMCN com a composição e outros parâmetros de qualidade do leite foi mensurado o coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis estudadas. Na Tabela 2 estão expostos os resultados mais relevantes para esse estudo. Verificou-se que a variação no TMCN tem associação significativa com teor de proteína, caseína, relação caseína: proteína, uréia, pH, α_{s1} -CN + α_{s2} -CN, κ -CN, β -LG e α -LA do leite. As associações mais fortes foram verificadas com o teor de uréia (-0,40), α_{s1} -CN + α_{s2} -CN (0,46) e κ -CN (-0,52). Além disso, foi verificada associação significativa entre o teor de κ -CN, ureia e pH. O pH do leite correlacionado positivamente com o TMCN, implica que a acidez pode ocasionar redução das micelas de caseína. Resultado similar foi verificado por Glantz et al. (2010). Em contraste, a relação negativa entre uréia e TMCN sugere que o aumento do teor de uréia no leite pode proporcionar redução do TMCN. Holt (2008) demonstrou que a adição de uréia no leite afetou as interações hidrofóbicas entre as caseínas e induziu a dissociação micelar, enquanto Ye e Harte (2015) demonstraram que a redução do pH do leite afetou a superfície micelar formada pela κ -CN e promoveu a migração de fosfato de cálcio coloidal para a fase soro. Em vista disso, variações no pH e no teor de ureia podem afetar a estabilidade das micelas sem promover a agregação, mas induzindo a dissociação micelar, dando origem a submicelas com características muito similares às micelas originais, ou as caseínas podem ser solubilizadas na fase soro. Essa fragmentação é facilitada pela ausência de uma rígida conformação terciária tridimensional das micelas de caseína (Walstra, 1990).

Tabela 1. Estatística descritiva do tamanho médio das micelas de caseína (média, desvio padrão-DP, mínimo e máximo), composição físico-química, firmeza do coágulo e produção de matéria seca de queijo produzido com o leite de 140 diferentes fazendas

Variáveis	Média	DP	Mínimo	Máximo
Tamanho médio das micelas de caseína (nm)	183,16	11,53	157,80	208,40
Composição, CCS, CBT, pH				
Gordura, %	3,57	0,43	2,46	4,66
Proteína, %	3,23	0,17	2,96	3,65
Caseína, %	2,50	0,14	2,27	2,85
Caseína: proteína, %	77,41	0,91	75,16	79,06
Lactose, %	4,44	0,13	4,06	4,69
Uréia, mg/dL	22,35	10,83	7,50	54,10
CCS ¹ ,	5,23	1,07	1,49	7,41
CBT, log ₁₀	6,54	1,94	2,08	9,45
pH	6,67	0,16	6,31	7,22
Conteúdo das frações proteicas², g/L				
α_{s1} -CN + α_{s2} -CN	15,79	1,81	12,83	20,61
β -CN	6,23	1,14	3,97	8,90
k-CN	2,98	0,90	1,24	4,61
Composição relativa das proteínas mensuradas por eletroforese, %				
α_{s1} -CN + α_{s2} -CN	53,91	6,41	40,64	68,50
β -CN	21,30	3,99	12,95	31,66
k-CN	10,10	2,89	4,47	15,27
β -LG	10,36	3,62	4,48	20,83
α -LA	4,33	1,39	2,01	7,86
Indicadores tecnológicos				
Firmeza do coágulo ³ , g	10,11	1,79	6,70	13,50
Produção de matéria seca de queijo, %	7,22	0,84	5,35	9,67

¹CCS = $\log_2(\text{SCC} / 10^3) + 3$; ²Calculado com base na % total de caseína total no leite mensurado pelo método FTIR; ³Mensurada na profundidade de 4mm.

Tabela 2. Coeficientes de correlação de Pearson entre o tamanho médio das micelas de caseína (TMCN), perfil protéico e outros parâmetros de qualidade do leite

Variáveis	Coefficiente de correlação	P-valor
TMCN/ Gordura, %	0,12	0,167
TMCN/ Proteína, %	0,23	0,007
TMCN / Caseína, %	0,17	0,047
TMCN/ Caseína: proteína,%	-0,22	0,011
TMCN/ Lactose, %	-0,14	0,104
TMCN/ Uréia, mg/dL	-0,40	<0,001
TMCN/ CCS ¹ , cells/mL	0,02	0,742
TMCN/ CBT, log ₁₀ cfu/mL	-0,03	0,690
TMCN/ pH	0,21	0,011
TMCN/ α_{s1} -CN + α_{s2} -CN	0,46	<0,001
TMCN/ β -CN	-0,11	0,198
TMCN/ κ -CN	-0,52	<0,001
TMCN/ β -LG	-0,37	<0,001
TMCN/ α -LA	-0,17	0,046
κ -CN / Uréia, mg/dL	0,62	<0,001
κ -CN / pH	-0,31	<0,001
Ureia / pH	-0,22	0,011

¹CCS = $\log_2(\text{SCC} / 10^3) + 3$

A estimativa do efeito da composição proteica do leite sobre o tamanho das micelas de CN, dada pelo LSMEANS de cada classe analisada está exposto na Figura 1. O tamanho das micelas de CN não foi afetado pela variação do teor de β -CN e α -LA, entretanto menores micelas foram observadas em amostras de leite com menor teor de α_s -CN e maior teor de κ -CN e β -LG. Amostras de leite incluídas na primeira classe de α_s -CN (<14,9 g/L) apresentaram tamanhos de micelas com média de $179,62 \pm 1,91$ nm, enquanto em amostras da última classe de α_s -CN (>16,69 g/L), a média foi de $188,04 \pm 2,07$ nm. A relação observada entre α_s -CN e tamanho de micelas de CN não está de acordo com Dagleish e Law (1989) e Bijl et al.(2014). As micelas de CN são estruturas dinâmicas, podendo ser fragmentadas e reorganizadas em submicelas ou determinadas caseínas podem ser perdidas e serem solubilizadas na fase soro (Liu e Guo, 2008). Existem evidências de que ocorreu dissociação micelar em nosso estudo, em virtude da variação do pH e teor de ureia. Portanto, essa reorganização micelar ou a perda de caseínas possivelmente pode ter influenciado a proporção de α_s -CN na organização das micelas de CN.

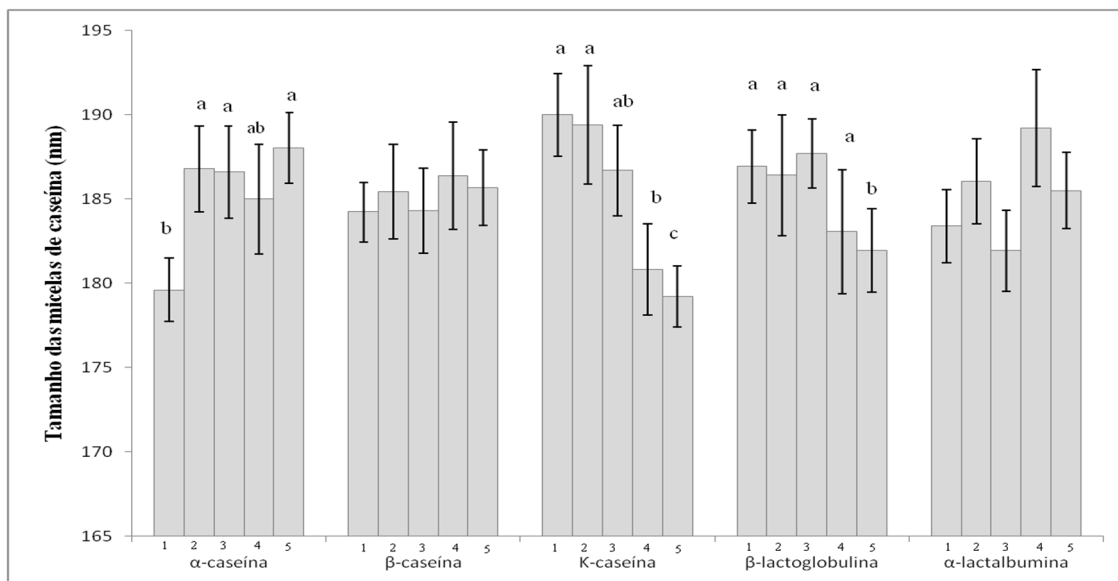


Figura 1. Estimativa do efeito da composição proteica do leite sobre o tamanho médio das micelas de CN. Cada proteína foi classificada da seguinte maneira: classe 1 (conteúdo $< \bar{x} - 0,5DP$), classe 2 ($\bar{x} - 0,5DP \leq \text{conteúdo} < \bar{x} - 0,25DP$), classe 3 ($\bar{x} - 0,25DP \leq \text{conteúdo} < \bar{x} + 0,25DP$), classe 4 ($\bar{x} + 0,25DP \leq \text{conteúdo} < \bar{x} + 0,5DP$), classe 5 (conteúdo $< \bar{x} + 0,5DP$). Médias com letras diferentes diferem estatisticamente ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste (colocar).

O efeito do teor de κ -CN sobre o tamanho das micelas de CN concorda com os resultados obtidos por Dalgleish et al. (1989), Donnelly e McGann (1984) e Dalgleish (2011). Amostras inseridas na primeira classe ($< 2,53$ g/L de κ -CN) e última classe ($> 3,43$ g/L de κ -CN) apresentaram média de tamanho de micelas de CN de $189,89 \pm 2,43$ e $179,19 \pm 1,82$ nm, respectivamente. A camada superficial da κ -CN, particularmente a κ -CN glicosilada que é a principal responsável pela repulsão estérica e eletrostática entre as micelas, parece ser o principal fator de variação do tamanho das micelas de CN. Leite produzido por animais homocigotos para variante B da κ -CN apresenta maior proporção de κ -CN glicosilada e menores micelas do que o leite de animais que possuem a variante A (Dalgleish, 2012; Bijl et al., 2014). O mecanismo que proporciona a associação do teor de β -LG e tamanho de micelas de CN não é conhecido. A β -LG não compõe as micelas, exceto quando sofrem desnaturação e podem complexar com a κ -CN. No entanto, não houve fatores que pudessem causar a desnaturação da β -LG. Apesar de Devold et al. (2000) terem observado variação significativa entre o tamanho médio das micelas de CN e a porcentagem de proteína do soro, Bijl et al. (2014) que especificaram a concentração de β -LG e α -LA, não verificaram associação significativa entre β -LG e o tamanho das micelas de CN.

3.3 Influência do tamanho das micelas de caseína sobre a firmeza do coágulo e produção de massa seca de queijo

O efeito do tamanho das micelas de caseína sobre a firmeza do coágulo e produção de massa seca de queijo foi estimado usando um modelo de regressão linear que considerou como variáveis independentes, o tamanho das micelas de CN sem o efeito de α_{s1} -CN + α_{s2} -CN e κ -CN, o teor de gordura, lactose, caseína total e fracionada. Os resultados estão expostos na Tabela 3. O tamanho da micela de CN não afetou a firmeza do coágulo. Por outro lado, quando

esse efeito foi estimado a partir dos valores absolutos do tamanho das micelas (resultados não mostrados), amostras de leite com menores micelas foram associadas com maior firmeza do coágulo, sugerindo que o teor de κ -CN possui efeito sobre a variação da firmeza do coágulo após 30 minutos da adição do coalho. Esses resultados corroboram com os achados de Bonfatti et al. (2011). Uma possível explicação para esse efeito é que o leite com maior conteúdo de κ -CN apresenta menor tempo de coagulação, o que permite mais tempo para o coágulo se estruturar e exibir maior firmeza (Wedholm et al., 2006).

Associação positiva entre o conteúdo de κ -CN e a força da coalhada foi reportado por Wedholm et al. (2006) e Bonfatti et al. (2010). Em nosso estudo, o coeficiente de correlação de Pearson entre essas duas variáveis foi 0,35 ($P < 0,001$), indicando que a associação entre menores micelas de caseína e maior força da coalhada pode ser parcialmente explicada pela maior quantidade de κ -CN nessas amostras. Dziuba e Minkiewicz (1996) reportaram que o alto grau de glicosilação da κ -CN associado com menores micelas e maior número de micelas hidrofóbicas favorece a firmeza da coalhada em razão do aumento da taxa de hidrólise da κ -CN mediante a ação da enzima quimosina, o que favorece uma maior agregação entre as micelas de caseína durante o processo de coagulação, formando, conseqüentemente, “blocos” de agregados de para-caseína mais consistente, com poros com menores diâmetros. Nesse sentido, pode-se inferir que menores micelas de caseína apresentam maior área superficial, o que favorece a maior taxa de agregação entre as micelas, com isso contribuindo para a formação de uma coalhada mais compacta e com probabilidade de maior retenção de nutrientes.

O tamanho das micelas de CN desprovido de associação com a α_{s1} -CN + α_{s2} -CN e κ -CN apresentou efeito sobre a produção de massa seca de queijo. Esse resultado sugere que o maior teor de κ -CN associado a menores micelas, independente da relação causa e efeito entre essas variáveis, podem proporcionar benefícios a estrutura do coágulo. Walsh et al. (1998) verificaram que amostras de leite provenientes de animais homozigotos B para o gene da κ -CN foram associadas com menores micelas de CN e produziram queijos com menores poros, sugerindo que micelas mais compactas tendem a formar mais ligações entre as partículas no processo de formação do coágulo. No mesmo sentido, Zhao et al. (2014) induziram a redução do tamanho das micelas de CN através da ultrasonificação, e observaram que a estrutura do coágulo apresentou poros menores e mais uniformes, o que pode contribuir para maior retenção dos constituintes do leite na massa de queijo, e conseqüentemente, otimizar a produção de massa seca de queijo (Hallén et al., 2010). Em vista do efeito favorável das menores micelas de caseína sobre a produção de massa seca de queijo, é necessário que mais estudos sejam conduzidos com o intuito de compreender melhor o mecanismo que propicia com que as amostras de leite com menores micelas sejam mais adequadas à produção de queijo, além de estudar melhor os fatores genéticos e a herdabilidade, com o intuito de tornar essa característica um indicador da seleção de bovinos leiteiros.

Tabela 3. Coeficientes de regressão e erro padrão (EP) do efeito da composição do leite e tamanho das micelas de caseína (TMCN) sobre a firmeza do coágulo e produção de massa seca de queijo (o coeficiente é expresso em unidades do desvio padrão de cada variável)

Variáveis independentes	Firmeza do coágulo			Produção de massa seca de queijo		
	Coefficiente	EP	P-Valor	Coefficiente	EP	P-Valor
Gordura, %	-0,15	0,44	0,149	0,53	0,13	<0,001
Lactose, %	-0,05	1,26	0,547	0,25	0,37	<0,001
Caseína, %	0,25	1,29	0,014	0,17	0,38	0,006
α_{s1} -CN + α_{s2} -CN, %	-0,07	0,04	0,576	-0,07	0,01	0,501
β -CN, %	-0,04	0,05	0,735	-0,05	0,01	0,680
κ -CN, %	0,24	0,08	0,065	0,61	0,02	<0,001
TMCN Resíduo ¹ , nm	0,12	0,02	0,320	-0,14	0,00	0,015

¹ O resíduo do TMCN foi utilizado para evitar multicolinearidade

4. CONCLUSÕES

O tamanho médio das micelas de caseína é influenciado pela composição proteica do leite, particularmente pela concentração de κ -CN no leite. Menores micelas foram associadas com maior produção de massa seca de queijo, sem apresentar efeito sobre a firmeza do coágulo. Em vista da possibilidade de contribuir para a otimização da produção de queijo, o efeito da variação das micelas de CN deve ser mais bem investigada no que se refere à sua relação com a κ -CN e a capacidade de otimizar a produção de massa seca de queijo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIJL, E et al. Factors influencing casein micelle size in milk of individual cows: genetic variants and glycosylation of κ -casein. *J. Dairy Res.*, v. 34, n. 1, p. 135-141, 2014.
- BONFATTI, V. et al. Effects of β -K-casein (*CSN2-CSN3*) haplotypes, β -lactoglobulin (*BLG*) genotypes, and detailed protein composition on coagulation properties of individual milk of Simmental cows. *J. Dairy Res.*, v. 93, n. 8, p. 3809-3817, 2010.
- BONFATTI, V. et al. Genetic analysis of detailed milk protein composition and coagulation properties in Simmental cattle. *J. Dairy Res.*, v. 94, n. 10, p. 5183-5193, 2011.
- BONFATTI, V.; CHIAROT, G.; CARNIER, P. Glycosylation of κ -casein: Genetic and nongenetic variation and effects on rennet coagulation properties of milk. *J. Dairy Res.*, v. 97, n. 4, p. 1961-1969, 2014.
- CHEN, B; LEWIS, M. J.; GRANDISON, A. S. Effect of seasonal variation on the composition and properties of raw milk destined for processing in the UK. *Food Chem.*, v. 158, p. 216-223, 2014.
- CIPOLAT-GOTET, C. et al. Factors affecting variation of different measures of cheese yield and milk nutrient recovery from an individual model cheese-manufacturing process. *J. Dairy Res.*, v. 96, n. 12, p. 7952-7965, 2013.

- DALGLEISH, D. G.; HORNE, D. S.; LAW, A. J. R. Size-related differences in bovine casein micelles. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, v. 991, n. 3, p. 383-387, 1989.
- DALGLEISH, D. G. On the structural models of bovine casein micelles—review and possible improvements. *Soft Matter*, v. 7, n. 6, p. 2265-2272, 2011.
- DALGLEISH, D. G.; CORREDIG, M. The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, v. 3, p. 449-467, 2012.
- DE KRUIF, C. G. Supra-aggregates of casein micelles as a prelude to coagulation. *J. Dairy Res.*, v. 81, n. 11, p. 3019-3028, 1998.
- DEVOLD, T. G. Size of native and heated casein micelles, content of protein and minerals in milk from Norwegian Red Cattle—Effect of milk protein polymorphism and different feeding regimes. *J. Dairy Res.*, v. 10, n. 5, p. 313-323, 2000.
- DONNELLY, W. J. et al. A comprehensive study of the relationship between size and protein composition in natural bovine casein micelles. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.*, v. 789, n. 2, p. 136-143, 1984.
- DZIUBA, J; MINKIEWICZ, P. Influence of glycosylation on micelle-stabilizing ability and biological properties of C-terminal fragments of cow's κ -casein. *J. Dairy Res.*, v. 6, n. 11, p. 1017-1044, 1996.
- GLANTZ, M et al. Importance of casein micelle size and milk composition for milk gelation. *J. Dairy Res.*, v. 93, n. 4, p. 1444-1451, 2010.
- HALLÉN, E et al. Casein retention in curd and loss of casein into whey at chymosin-induced coagulation of milk. *J. Dairy Res.*, v. 77, n. 01, p. 71-76, 2010.
- HOLT, C. Structure and stability of bovine casein micelles. *Adv. Protein Chem.*, v. 43, p. 63-151, 1992.
- IDF. *International IDF standart 148A:1995: Milk – Enumeration of somatic cell*. Bruxelles, 1995 (a), 8 f.
- IDF. *International IDF standart 141C:2000: Whole milk – determination of milk fat, protein and lactose content. Guidance on the operation of mid-infrared instruments*. Bruxelles, 2000, 15 f.
- LIU, Y; GUO, R. pH-dependent structures and properties of casein micelles. *Biophys. Chem.*, v. 136, n. 2, p. 67-73, 2008.
- LUCEY, J; KELLY, J. Cheese yield. *Int. J. Dairy Technol.*, v. 47, n. 1, p. 1-14, 1994.
- MELILLI, C. et al. An empirical method for prediction of cheese yield. *J. Dairy Res.*, v. 85, n. 10, p. 2699-2704, 2002.

VERDI, R. J et al. Variability in true protein, casein, nonprotein nitrogen, and proteolysis in high and low somatic cell milks. *J. Dairy Res.*, v. 70, n. 2, p. 230-242, 1987.

WALSH, C. D. et al. Influence of kappa-casein genetic variant on rennet gel microstructure, cheddar cheesemaking properties and casein micelle size. *J. Dairy Res.*, v.8, n.8, p. 707-714, 1998.

WALSTRA, P. On the stability of casein micelles. *J. Dairy Res.*, v. 73, n. 8, p. 1965-1979, 1990.

WEDHOLM, A et al. Effect of protein composition on the cheese-making properties of milk from individual dairy cows. *J. Dairy Res.*, v. 89, n. 9, p. 3296-3305, 2006.

Ye, R. e Harte, F. Casein maps: Effect of ethanol, pH, temperature, and CaCl₂ on the particle size of reconstituted casein micelles. *J. Dairy Res.*, v. 96, n.2, p. 799–805, 2013

ZHAO, L et al. Effect of ultrasound pretreatment on rennet-induced coagulation properties of goat's milk. *Food Chem.*, v. 165, p. 167-174, 2014.

CAPÍTULO 3

EFEITOS DO GRUPO GENÉTICO, CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E POLIMORFISMOS DE *CSN1S1*, *CSN3*, *LGB* SOBRE AS FRAÇÕES PROTEICAS DO LEITE DE ANIMAIS HOLANDÊS X ZEBU

RESUMO

O objetivo desse estudo foi investigar os efeitos dos grupos genéticos, contagem de células somáticas (CCS) e polimorfismos de *CSN1S1* (α_{s1} -CN), *CSN3* (κ -CN), *LGB* (β -LG) sobre a composição e produção dos constituintes do leite, particularmente as frações proteicas de amostras de leite produzido por 81 animais de diferentes cruzamentos entre Holandês e Zebu. O conteúdo das principais proteínas do leite foi mensurado por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR), enquanto que o polimorfismo dos genes *CSN1S1*, *CSN3* e *LGB* foi determinado usando o método PCR-RFLP. Os efeitos de cada fonte de variação investigada foram analisados usando um modelo de regressão linear. Os grupos genéticos foram divididos em G1 (animais 1/2 e 9/16 Holandês x Zebu) e G2 (animais 3/4 Holandês x Zebu), subdivididos, em seguida, em animais com CCS alta e baixa. Sendo assim, o modelo de regressão incluiu estágio de lactação, polimorfismos dos genes e grupos genéticos associados com a CCS. Efeitos dos grupos genéticos e CCS afetaram a composição do leite, particularmente o teor de proteína. Amostras de leite produzido por animais do grupo G1 e com menor CCS apresentaram maior conteúdo de α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN, α -LA e β -LG, e conseqüentemente, maior conteúdo de caseína total. O genótipo *LGB* BB apresentou associação positiva com a produção de gordura, proteína, caseína, lactose e sólidos totais, α_{s2} -CN e α -LA. Por outro lado, afetou negativamente o conteúdo de β -LG. Os genótipos *CSN3* BB e AB apresentaram maior conteúdo de κ -CN, e os genótipos CC e BC de *CSN1S1* apresentaram efeito favorável sobre a concentração de α_{s1} -CN. Portanto, a CCS associada ao grupo genético, juntamente com a frequência de determinados genótipos, afetaram a composição do leite, particularmente a concentração das frações proteicas do leite.

Palavras-chave: marcadores moleculares, α_{s1} -caseína, β -lactoglobulina, κ -caseína

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects exerted by genetic groups, somatic cell count and CSN1S1 (α_{s1} -CN), CSN3 (κ -CN), LGB (β -LG) polymorphisms on milk composition and production of constituents, particularly of protein fractions of milk samples production for animals from different crossbreeding between Holstein and Zebu. Content of the major protein fractions was measured by reversed phase HPLC in individual milk samples of 81 cows. Traits were analyzed by using a linear model including only fixed effects. The genetic groups was divided in G1 (animals 1/2 and 9/16 Holstein x Zebu) and G2 (animals 3/4 Holstein x Zebu) and each genetic group was categorized in high or low CCS. The linear model included days in milk, genes polymorphisms and genetic groups associated with CCS. Effects of genetic groups and CCS affected milk composition, particularly the protein composition. Milk produced by cows from G1 group with lower CCS exhibited higher α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN, α -LA e β -LG, casein total content. LGB BB polymorphism was associated with increased fat, protein, casein, lactose, total solids, α_{s2} -CN e α -LA production, and decreased β -LG content. CSN3 BB and AB exhibited increased κ -CN content, and CSN1S1 CC and BC exhibited positively effect on α_{s1} -CN concentration.

Keywords: molecular markers, α_{s1} -casein, β -lactoglobulin, κ -casein

1. INTRODUÇÃO

O conteúdo e a proporção dos constituintes do leite influenciam aspectos nutricionais e tecnológicos. Algumas proteínas, por exemplo, exercem efeito sobre as propriedades de coagulação do leite, tais como o tempo de coagulação e firmeza da coalhada, produção e qualidade de queijo (Wedholm et al., 2006; Bonfatti et al., 2014), e disponibilidade de peptídeos bioativos que apresentam implicações para a saúde humana (Tauzin et al., 2002). Nesse sentido, o crescente interesse dos consumidores e da indústria laticinista tem impulsionado o desenvolvimento de estudos sobre as fontes de variação da composição do leite produzido nos mais diversos sistemas de produção em todo o mundo, com o intuito de desenvolver ferramentas para alcançar a composição do leite desejada.

De modo geral, a composição do leite é afetada por fatores genéticos e não genéticos, tais como raça (De Marchi et al., 2008), estação do ano, número de partos, estágio de lactação, alimentação dos animais, saúde da glândula mamária e polimorfismos genéticos das proteínas do leite (Chen et al., 2014; Ng-Kwai-Hang., 1987).

Estudos têm sido conduzidos para identificar os efeitos de polimorfismos nos genes que codificam as proteínas do leite (Walsh et al., 1998; Bonfatti et al., 2010; Huang et al., 2012), com o intuito de encontrar marcadores que possam ser utilizados em programas de seleção genética para melhoria da composição do leite, particularmente da composição proteica. De modo geral, os polimorfismos dentro dos genes das principais proteínas do leite têm sido associados significativamente com a composição do leite. Os resultados mais consistentes que têm sido replicados em várias populações e estudos referem-se aos efeitos do gene *CSN3*, que codifica a κ -caseína. Associações do alelo B de *CSN3* com maior conteúdo de caseína total e κ -caseína, menor teor de proteínas do soro, menores micelas de caseína e melhores propriedades de coagulação do leite têm sido reportadas (Ng-Kwai-Hang et al., 1987; Walsh et al., 1998; Bonfatti et al. 2010; Bijl et al. 2014). Em vista disso, o aumento da frequência do alelo B do gene *CSN3* tem sido considerado favorável em rebanho de bovinos leiteiros, particularmente os que produzem matéria-prima para a produção de derivados lácteos.

Em países de clima tropical, uma grande parcela da produção de leite que é destinada ao processamento de derivados lácteos advém de animais mestiços, produtos do cruzamento de raças zebuínas com raças europeias. No Brasil, comumente são utilizados diferentes cruzamentos entre a raça Holandesa, Gir e Guzerá. São animais que apresentam significativa heterose para muitas características economicamente importantes, maior desempenho produtivo e capacidade de adaptação ao clima tropical (Madalena, 2002; Fonseca et al., 2009). Entretanto, apesar dessa população de animais ser economicamente relevante para a indústria laticinista do país, os estudos investigando a variação da composição do leite, particularmente dos polimorfismos genéticos em detrimento das frações das proteínas do leite são escassos. Nesse sentido, este trabalho foi conduzido com o objetivo de investigar a associação da composição e produção dos constituintes do leite, e das frações proteicas com o grupo genético, CCS e polimorfismos de *CSN1S1*, *CNS3* e *LGB*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais, coleta e preparação das amostras

Amostras de leite e de sangue foram coletadas de 81 animais mestiços, sendo 33 animais 1/2 Holandês x Gir, 3 animais 1/2 Holandês x Guzerá, 23 animais 3/4 Holandês x Gir, 5 animais 3/4 Holandês x Guzerá e 17 animais 9/16 Holandês x Gir. Os animais pertencem a dois rebanhos da Fazenda Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) – MG, Brasil. Os animais 1/2 e 9/16 permanecem em rebanho separado dos animais 3/4, devido à diferença no manejo da ordenha. Os animais com menor proporção da raça Holandesa são ordenhados com a presença do bezerro. Todas as vacas, independente de sistema, alimentam-se basicamente de pastagens e recebem concentrado no momento da ordenha.

As amostras compostas de leite foram proporcionalmente coletadas nas duas ordenhas diárias. Amostras de leite para determinação da composição proteica por CLAE-FR foram congeladas a -20°C após a coleta. Para determinação da composição físico-química e CCS foram preservadas com o conservante bronopol (2-bromo-2-nitropane-1,3-diol) e mantidas refrigeradas a 4°C até o momento da análise. As amostras de sangue foram coletadas em tubos BD Vacutainer® com EDTA, em seguida aliqüotadas e mantidas congeladas a -20°C até a extração do DNA.

2.2 Determinação da composição físico-química e CCS

O teor de gordura, proteína total, caseína, lactose, sólidos totais, nitrogênio ureico e contagem de células somáticas foi mensurado pelo equipamento CombiScope FTIR 400® (Delta Instruments; Drachten, Holanda) que combina o princípio de Transformada de Fourier no infravermelho médio (EIV) e citometria de fluxo, respectivamente.

2.3 Determinação da composição protéica do leite

Os conteúdos das principais proteínas do leite, α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN, κ -CN, α -LA, β -LGA e β -LG B, foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-RP), segundo metodologia descrita por Bobe et al. (1998), com algumas modificações. Aliqüotas contendo 200 μ L de leite foram congeladas a -20°C. Uma solução com 0,1 M de tampão BisTris (pH 6,8), 6 M de hidrocloreto de guanidina, 5,37 mM de citrato de sódio e 19,5 mM de ditiotreitol (pH 7,0) foi adicionada diretamente às aliqüotas congeladas em uma proporção de 1:1 (v/v) em temperatura ambiente. Em seguida, cada amostra foi agitada por 10 segundos, incubada por 1 hora em temperatura ambiente e centrifugada por 5 minutos, a 16.000 g em uma microcentrífuga. A camada de gordura foi removida como uma espátula. A amostra solubilizada foi diluída (1:3; v/v) com uma solução contendo 4,5 M de hidrocloreto de guanidina e solvente A, composto de acetonitrila, água e ácido trifluoroacético em proporção de 100:900:1 (v/v/v; pH 2). A concentração de proteínas do leite na solução final foi de aproximadamente 4 mg/ mL.

Para identificação e quantificação das proteínas do leite, utilizou-se um padrão com as proteínas: α_s -CN (C-6780; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) β -CN (C-6905; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), κ -CN (C-0406; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), α -LA (L-5385; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e β -LG A (L-7880; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), β -LG B (L-8005; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Como não existem as caseínas α_{s1} e α_{s2} purificadas separadamente, considerou-se que elas encontravam-se na proporção de 4:1 (p/p) no padrão de α_s -caseína, como proposto por Bobe et al. (1998). As concentrações do padrão preparado foram de 1,5 mg/mL de κ -CN; 4,0 mg/mL de α_s -CN; 3,0 mg/mL de β -CN, 0,5 mg/mL de α -LA e 1,0 mg/mL de β -LG. A concentração final do padrão diluído foi de 1,25

mg/mL, enquanto a concentração de proteína no padrão original foi de 10 mg/mL. Todas as amostras de leite e os padrões foram filtradas em membrana de PTFE de 0,45 µm (Milipore, Billerica, MA, EUA), e 20 µL de solução foram injetados no sistema CLAE.

A corrida cromatográfica foi realizada em temperatura de 30°C, usando as seguintes fases móveis: solvente A (acetonitrila: água: ácido trifluoroacético, 100:900:1) e solvente B (acetonitrila: água: ácido trifluoroacético, 900:100:1). O programa de gradiente foi iniciado com 27% de solvente B. Um gradiente foi gerado imediatamente após a injeção da amostra através do aumento da proporção de solvente B a 2,5%/min (2 min), 0,47%/min (34,9 min), e 0,45%/min (4min) e então retornou linearmente para as condições iniciais em 2,1 min. Antes da injeção da próxima amostra, a coluna foi reequilibrada com as condições iniciais durante 9 minutos. O fluxo foi ajustado para 1,0 mL/min. O tempo de corrida foi de 52 min. A quantificação das proteínas nas amostras de leite foi realizada mensurando-se as áreas dos picos de cada proteína de cada amostra, e plotando contra as curvas de calibração para cada fração.

Foi utilizado para as análises, Cromatógrafo líquido com duas bombas de alta pressão, com injetor Rheodine ® de 20µL, coluna C18 Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, tamanho da partícula 5 µm).

2.4 Polimorfismos genéticos

O DNA foi extraído de sangue periférico usando proteinase K e precipitação salina, segundo protocolo descrito por Miller et al., (1988) e Sambroock e Russel, (2001).

***CSN1S1* (α_{s1} -caseína)**

Para a genotipagem do polimorfismo do gene *CSN1S1* foi utilizado o conjunto de *primers* para a técnica de tetra-primer ARMS-PCR desenvolvida pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Genética Médica e Humana do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Cada reação de amplificação foi realizada em 25 µL de volume final de Tris-Cl pH 8,4 10mM, KCl 50 mM; 0,1% Triton X-100; 1,75 mM; MgCl₂ 1,75 mM, dNTP 0,2 mM, DMSO 8%, 1 U Taq DNA Polimerase, 100 ng DNA genômico, 5 pMol *primers* internos e externos. O programa utilizado para amplificação do gene segue descrito: desnaturação inicial 94°C por 5 min seguida por 30 ciclos de 94°C por 1 min, 54°C por 1 min e 72°C por 5 min com extensão final a 72°C por 5 min.

***CSN3* (κ -caseína)**

Para genotipagem do polimorfismo Thr136Ile e Ala148Asp no gene *CSN3* foi utilizado um conjunto de *primers* para a execução da técnica de Tetra-primer ARMS-PCR desenvolvidos por Fonseca et al.(2013) nas mesmas condições de padronização.

***LGB* (β -Lactoglobulina)**

Para a genotipagem do polimorfismo no gene *LGB* foi realizada uma PCR-RFLP utilizando a enzima HaeIII. Cada reação de amplificação foi realizada em 25 µL de volume final de Tris-Cl pH 8,4 10mM, KCl 50 mM; 0,1% Triton X-100; 1,75 mM; MgCl₂ 1,75 mM, dNTP 0,2 mM,

DMSO 8%, 1 U Taq DNA Polimerase, 200 ng DNA genômico, 10 pMol de *primers*. O programa de amplificação do gene *LGB* segue descrito: desnaturação inicial a 94°C por 5 min seguida por 30 ciclos de 94°C por 1 min, 62°C por 1 min e 72°C por 1 min com extensão final de 72°C por 5 min. Após confirmação da amplificação das amostras, fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 8%. O produto da PCR passou então pelo processo de RFLP (restriction fragment length polymorphism), sendo digerido pela enzima da restrição Hae III nas seguintes condições: volume final de 15µL onde, 2,5µL de águamili-Q®, 1,5µL de tampão (10X NEBuffer), 1µL de HaeIII (10 U) e 10µL do produto de PCR (Medrano e Corcodova, 1990).

Todos os produtos de PCR e digestão foram submetidos a eletroforese em gel de acrilamida 8%, corados com nitrato de prata (Sambrook e Russell, 2001).

2.5 Definições das variáveis

Para as proteínas quantificadas por RP-CLAE, a caseína total (g/L) foi computada como a soma de α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN, κ -CN. Proteína do soro total (g/L) foi calculada como a soma do conteúdo de α -LA e β -LG. O teor de proteína total (g/L) foi calculado como a soma do teor de caseína e proteína do soro. A composição proteica, ou seja, conteúdo relativo das frações proteicas) foi computado como a porcentagem de α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN, κ -CN em relação a caseína total, e a porcentagem de α -LA e β -LG em relação ao conteúdo de proteínas do soro. A relação caseína: proteína foi calculada da seguinte maneira = (caseína/proteína) x 100. O cálculo das produções diárias (Kg/d) de gordura, proteína, caseína, lactose e sólidos totais mensurados por EIV foram com base na produção de leite do dia da coleta e a porcentagem de cada constituinte. A normalização dos valores da contagem de células somáticas foi realizada da seguinte forma: CCS= \log_2 (CCS / 100) +3 (Shook, 1993).

Tabela 1. Sequência dos *primers* utilizados.

<i>Primers</i>	Sequência (5'→3')	Tm°	%GC	Ref.
<i>CSN3</i> Interno Forward	CACTGTAGCTACTCTAGAGGA	62	47,6	1
<i>CSN3</i> Interno Reverse	CTCTCAATAACTTCTGGAGGAG	64	45,4	
<i>CSN3</i> Externo Forward	TCATTTTATGGCCATTCCACCAAAG	68	41,6	
<i>CSN3</i> Externo Reverse	CCATTTTCGCTTCTCTGTAACAGA	70	45,8	
<i>CSN1S1</i> Interno Forward	CCATTTCTGTATAATGAGGCA	62	40,9	2
<i>CSN1S1</i> Interno Reverse	GGAGAGTTTACAACAAAGACGC	64	45,4	
<i>CSN1S1</i> Externo Forward	TGCATGTTCTCATAATAACCATAAATC	70	29,62	
<i>CSN1S1</i> Externo Reverse	CTGGGAAGAAGCAGCAAGCTGG	70	59,0	
<i>LGB</i> Forward	TGTGCTGGACAGCGACTACAAAAAG	74	48,0	3
<i>LGB</i> Reverse	GCTCCCGTATATGACCACCCTCT	72	56,52	

Nota: As bases sublinhadas são referentes aos mismatches obrigatórios nos *primers* internos dos sistemas Tetra-Primer ARMS. ¹Fonseca et al. (2013); ²Densenvolvido *In House*; ³Medrano e Cordova (1990).

2.6 Análises estatísticas

Os efeitos dos grupos genéticos, CCS e polimorfismos de *BLG*, *CNS3*, *CSN1S1* foram estimados usando um modelo de regressão linear com o procedimento PROC GLM do programa estatístico SAS (Versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC). O modelo utilizado foi:

$$y_{ijklm} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \delta_l + \epsilon_m + \epsilon_{ijklm} \quad (1)$$

Onde y_{ijklm} são todos os constituintes do leite avaliados; α_i é o efeito fixo de dias pós-parto em i classes ($i = 1: \leq 90$ dias pós-parto, $i = 2: 90-180$ dias pós-parto, $i = 3: \geq 180$ dias pós-parto); β_j é o efeito fixo da associação da proporção da raça Holandesa com CCS em j classes ($j = 1: \text{animais } 1/2 \text{ e } 9/16 \text{ Holandês x Zebu e CCS, } \log \leq 2,33$, $j = 2: \text{animais } 1/2 \text{ e } 9/16 \text{ Holandês x Zebu e CCS, } \log > 2,33$, $j = 3: \text{animais } 3/4 \text{ Holandês x Zebu e CCS, } \log \leq 5,39$, $j = 4: \text{animais } 3/4 \text{ Holandês x Zebu e CCS, } \log > 5,39$); γ_k = efeito fixo dos genótipos de *BLG* em κ classes ($\gamma = 1: AA$, $\gamma = 2: AB$, $\gamma = 3: BB$); δ_l = efeito fixo dos genótipos de CSN3 em l classes ($l = 1: AA$, $l = 2: AB$ e BB); ϵ_m = efeito fixo dos genótipos de CSN1S1 em m classes ($m = 1: BB$, $m = 2: BC$ e CC); ϵ_{ijklm} = erro aleatório com distribuição normal.

Uma nova variável foi criada a partir da associação da proporção da raça Holandesa e CCS devido à forte correlação entre esses dois efeitos. A nova variável formada foi dividida em quatro categorias: G1 x CC1 (animais 1/2 e 9/16 Holandês x Zebu e CCS em $\log \leq 2,33$); G1 x CCS2 (animais 1/2 e 9/16 Holandês x Zebu e CCS em $\log > 2,33$); G2 x CCS1 (animais 3/4 Holandês x Zebu e CCS em $\log \leq 5,39$) e G2 x CCS2 (animais 3/4 Holandês x Zebu e CCS em $\log > 5,39$). O efeito do grupo genético sobre a composição do leite foi calculado pela diferença entre a média dos grupos formados por G1 e G2, enquanto que o efeito da CCS foi calculado como a diferença entre G1 x CCS1 e G2 x CCS2. Essa diferença foi calculada pelo procedimento ESTIMATE do SAS. As estimativas dos efeitos dos genótipos e da variável da %Holandês associada a CCS foram apresentados como médias ajustadas (LSMEANS) e, posteriormente comparadas entre si pelo procedimento PDIF do SAS.

Os valores de CCS alta e baixa para cada grupo genético (G1 e G2) foram escolhidos de acordo com a CCS observada em cada grupo, de modo que o grupo G1 que apresentou menor CCS, apresentou ponto de corte menor do que o grupo G2. Além disso, o ponto de corte foi escolhido de modo que a frequência de animais dos grupos genéticos com CCS alta e baixa não fosse menor do que 10 animais dentro de cada categoria das variáveis inclusas no modelo, de modo a evitar aumento do erro padrão em virtude do favorecimento de uma das categorias avaliadas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Média, desvio padrão, mínimo e máximo das variáveis estudadas estão expostos na Tabela 1. A média da produção de leite foi $10,69 \pm 3,51$ Kg/d, variando de 3,0 a 21,40 Kg/d. As variações do teor de gordura, proteína, lactose e sólidos totais estão de acordo com Botaro et al. (2009), que também avaliaram a composição do leite individual de animais mestiços, Holandês x Zebu. Os estudos acerca da variação da composição proteica do leite de animais mestiços, particularmente com as raças Holandesa, Gir e Guzerá são praticamente nulos. Por isso, não é possível comparar os resultados desse estudo com outros trabalhos científicos similares. Entretanto, considerando-se a composição proteica do leite de outras raças, manejadas sobre condições diversas, a variação da composição proteica encontrada no presente estudo está de acordo com os valores observados por Bonfatti et al. (2010). Na média, α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN e k -CN representaram 26,14; 21,57; 42,87 e 9,67% da caseína total, respectivamente, enquanto que α -LA e β -LG representaram 22,86% e 77,14%, respectivamente.

3.1 Efeitos do grupo genético e contagem de células somáticas sobre a composição do leite

Os grupos formados para estudar o efeito do grupo genético apresentaram forte correlação com a CCS, ou seja, o grupo G1 (animais 1/2 e 9/16 Holandês x Zebu) apresentou menor CCS do que o grupo G2 (animais 3/4 Holandês x Zebu). Como a CCS afeta a composição do leite, foi criada uma nova variável com quatro categorias, nas quais os animais de cada grupo (G1 e G2) foram categorizados de acordo com a CCS (alta ou baixa). Dessa forma, incluíram-se ambas as variáveis no modelo, minimizando a possibilidade de multicolinearidade. Posteriormente tentou-se desmembrar os efeitos individuais de cada uma das variáveis, considerando a diferença das médias dos grupos G1 e G2 como o efeito do grupo genético, enquanto que o efeito da CCS foi considerado como a diferença do grupo G1 com menor CCS e o grupo G2 com maior CCS. As médias ajustadas (LSMEANS) da nova variável, assim como as diferenças consideradas como o efeito do grupo genético e da CCS sobre a composição e produção dos constituintes do leite estão apresentadas na Tabela 3.

Os efeitos do grupo genético e CCS sobre o teor e produção de gordura foram significativos. Entretanto, também houve diferença entre os animais do grupo G1 classificados em baixa ou alta CCS, o que sugere que nesse estudo, que a CCS apresentou o principal efeito sobre o teor de produção de gordura. Amostras de leite com elevada CCS (5,39 – 9,07) apresentaram em média 1,10% a mais de gordura do que as amostras com baixa CCS (-3,64 – 2,33), o que correspondeu ao aumento médio de 0,17 Kg/d de produção de gordura ao dia. Os resultados reportados na literatura acerca da associação da CCS com o teor de gordura do leite são inconsistentes. Associação positiva entre CCS e o teor de gordura foi observado por Dos Reis et al. (2013), enquanto que Schukken et al. (1992) e Auldist et al. (1995) demonstraram redução do teor de gordura com o aumento da CCS, e Schukken et al. (1992) não observaram associação significativa entre essas duas variáveis. Considerando que a CCS pode ser um indicador da presença de infecção na glândula mamária, esperava-se decréscimo na concentração de gordura em amostras de leite com elevada CCS, devido, em parte, à redução da capacidade de síntese e secreção de gordura na glândula mamária (Auldist e Hubble, 1998). Os resultados inconsistentes podem ser explicados, em parte, pela diferença dos patógenos envolvidos durante o processo infeccioso. Entre as bactérias patogênicas causadoras da mastite, algumas induzem mudanças marcantes na composição do leite, enquanto outras causam variações não tão significativas. Dos Reis et al. (2013) verificaram que *Staphylococcus aureus* não afetou o teor de gordura do leite, enquanto que efeitos negativos foram observados na presença de *Corynebacterium* spp e *Streptococcus* ssp.

Algumas mudanças na composição do leite decorrente da variação da CCS são mais marcantes; o teor de lactose geralmente é reduzido em decorrência da elevada CCS devido à redução da síntese dos constituintes do leite (Le Maréchal et al., 2011). No presente estudo, estimou-se redução média de cerca de 0,60% de lactose com a elevação da CCS acima de 527×10^3 células/mL. Não foi observado efeito sobre a produção diária de lactose. Diferenças dentro do grupo G1 e G2 foram observadas, assim como similaridade entre os grupos, sugerindo que independente de sistema de produção e tipo de cruzamento, a CCS foi a principal fonte de variação sobre a concentração de lactose no leite.

O conteúdo de proteína e caseína (mensurados pelos métodos EIV e RP-CLAE) e proteínas do soro foram afetados pelo grupo genético e CCS. Amostras de leite proveniente do sistema de produção com animais com graus de sangue 1/2 e 9/16, que apresentaram em média menor CCS, tiveram maior concentração de proteína, caseína e proteínas do soro. Até onde se sabe, não existem estudos científicos publicados que sugiram a superioridade da concentração desses constituintes no leite de animais com os graus de sangue 1/2 e 9/16 em comparação animais 3/4.

Botaro et al. (2009) não encontraram diferença na composição média do leite de animais Girolando 5/8 e animais puros da raça Holandesa. Em vista disso, mais trabalhos devem ser conduzidos para investigar o potencial dos diversos cruzamentos de animais mestiços, Holandês x Zebu, particularmente com as raças Gir e Guzerá, sobre a composição do leite.

Amostras de leite com elevada CCS apresentaram redução média de 0,31 e 0,23% de proteína e caseína, respectivamente. Decréscimo que mensurado em g/L correspondeu a 8,91 para proteína e 7,23 para caseína. As proteínas do soro também foram afetadas negativamente pelo aumento da CCS, diferença média de 1,27 g/L entre amostras com maior e menor CCS foi observada. Associação negativa entre proteína total e caseína também foi observado por Verdi et al. (1987), Auld et al. (1995) e Coulona et al. (2002). Dois mecanismos podem explicar a redução do conteúdo das proteínas no leite com elevada CCS, redução da síntese de proteínas nas células epiteliais da glândula mamária e proteólise das caseínas (Le Roux, Laurent e Moussaoui, 2003). Altos níveis de CCS podem estar associados com o aumento da concentração e atividade de proteases no leite, particularmente a plasmina (Auld et al., 1995), e proteases de origem dos leucócitos (neutrófilos e macrófagos), tais como a elastase e catépsina G (Kelly et al, 2000), de tal modo, que a redução nos níveis de proteína pode corresponder a degradação.

Efeitos marcantes sobre as frações proteicas, com exceção da κ -CN foram observados. Amostras de leite provenientes do sistema de produção dos animais com graus de sangue 1/2 e 9/16 apresentaram, em média, maior conteúdo de α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN, α -LA e β -LG. A CCS teve efeito negativo sobre as frações proteicas. Amostras de leite com elevada CCS apresentaram redução de 2,62 g/L de α_{s1} -CN, 1,95 g/L de α_{s2} -CN, 2,63 g/L de β -CN, 0,41 g/L de α -LA e 1,26 g/L de β -LG. Esses resultados estão de acordo com Le Maréchal et al. (2011) que em uma extensa revisão bibliográfica verificaram resultados consistentes acerca da redução das frações proteicas, com exceção da κ -CN, em que ainda são encontrados resultados inconsistentes. A plasmina, uma das principais proteases encontradas em leite de animais com elevada CCS, induzida pela presença de mastite, hidrolisa principalmente α_{s1} -CN, α_{s2} -CN e β -CN, enquanto que a κ -CN e as proteínas do soro são normalmente resistentes à hidrólise (Verdi et al., 1987; Hogarth et al., 2004). Como α -LA e β -LG são sintetizadas na glândula mamária, a redução dessas proteínas na presença de infecção da glândula ocorre, em virtude da redução da síntese dessas proteínas. Além disso, a intensidade da variação pode ser alterada de acordo com o patógeno causador da mastite. Proteínas do soro foram afetadas negativamente quando a glândula mamária foi infectada por *Streptococcus dysgalactiae* ou *E. coli*.

3.2 Frequências dos genótipos e alelos

As frequências dos genótipos e dos alelos dos genes da *BLG*, *CSN3* e *CSN1S1* são apresentadas na Tabela 2. Independente do grupo, o alelo A do gene *CSN3* obteve maior frequência. A frequência dos genótipos em ordem decrescente foi AA>AB>BB. Estes resultados estão de acordo com as frequências fenotípicas apresentadas por Botaro et al. (2008) que avaliaram animais puros da raça Holandesa e Girolando. Para o gene *BLG*, independente do grupo, o genótipo AB foi o mais frequente, entretanto a frequência alélica do alelo B foi maior no grupo G1. Trabalho conduzido por Botaro et al. (2009) demonstrou que animais puros da raça Holandesa tendem a apresentar o alelo A com mais frequência dos que os animais F1 Holandês x Gir. A frequência dos genótipos do gene *CSN1S1* para o grupo G1 foi BC>BB>CC, enquanto que para o grupo G2 foi BB>BC>CC. O alelo B predominou em ambos os grupos.

Até onde se sabe, não existem trabalhos publicados sobre a frequência alélicas para CSN1S1 para animais mestiços, provenientes do cruzamento da raça Holandesa com Gir ou Guzerá. Cerca de oito variantes genéticas já foram reportadas para α_{s1} -CN,. Entretanto os alelos mais comuns são A, B e C, sendo que B é predominantes em *Bos taurus*, e a variante C em *Bos indicus* (Farrell et al., 2004). Em animais da raça Holandesa o alelo B apresenta maior frequência do que o C (Ng-Kwai-Hang et al., 1984; Boettcher et al., 2004). O grupo G1, com maior proporção de *Bos indicus* no cruzamento tendeu a apresentar menor frequência do alelo B (0,610) quando comparado ao grupo G2 (0,813) que apresentam maior proporção de *Bos taurus* no cruzamento.

Tabela 3. Frequência dos genótipos e alelos dos *locus* de *LGB* (β -LG), *CSN3* (κ -CN) e *CSN1S1* (α_{s1} -CN) de acordo com o grupo G1 (animais 1/2 e 9/16), e grupo G2 (animais 3/4)

Frequência dos genótipos									
Grupo	<i>LGB</i>			<i>CSN3</i>			<i>CSN1S1</i>		
	AA	AB	BB	AA	AB	BB	BB	BC	CC
G1	0,213	0,497	0,289	0,599	0,350	0,051	0,372	0,476	0,152
G2	0,386	0,471	0,144	0,476	0,428	0,096	0,661	0,306	0,035
G1 + G2	0,268	0,499	0,232	0,554	0,381	0,066	0,457	0,438	0,105
Frequência dos alelos									
Grupo	<i>LGB</i>		<i>CSN3</i>		<i>CSN1S1</i>				
	A	B	A	B	B	C			
G1	0,462	0,538	0,774	0,226	0,610	0,390			
G2	0,621	0,379	0,690	0,310	0,813	0,188			
G1 + G2	0,518	0,482	0,744	0,256	0,676	0,324			

3.3 Efeitos dos genótipos de *BLG*, *CNS3* e *CSN1S1* sobre a composição do leite

Estimativa dos efeitos exercidos pelos polimorfismos dos genes *BLG*, *CNS3* e *CSN1S1* sobre a composição do leite estão apresentados nas Tabelas 3 e 4. Todos os valores foram apresentados como médias ajustadas (lsmeans) com seus respectivos erros padrão.

BLG locus: Os genótipos de *BLG* não afetaram os teores de gordura, proteína, caseína, lactose e sólidos totais mensurada pelo método de EIV. Entretanto esses mesmos constituintes quando calculados como produção diária apresentaram variação significativa. Animais com genótipos BB produziram maior quantidade diária de gordura do que os animais AA (média de 0,10 Kg/d a mais de gordura). No entanto, não houve diferença entre AA e AB, assim como BB e AB, sugerindo possível dominância do alelo B. Embora efeitos positivos dos genótipos BB e AB também foram observados por Tsiaras et al. (2005), entretanto outros estudos não observaram associação significativa entre genótipos de *BLG* e produção de gordura (McLean et al. 2009; Lundén et al. 1997; Heck et al. 2009).

Efeito positivo do genótipo BB foi verificado na produção diária de proteína, caseína, lactose e sólidos totais. Não houve diferença entre os genótipos AA e AB. Animais BB produziram média diária de 0,07 Kg de proteína, 0,06 Kg de caseína, 0,14 Kg de lactose e 0,31 Kg de sólidos totais a mais do que os animais AA. Tendência positiva do genótipo BB sobre a produção de proteína

foi observada por Bonfatti et al. (2010). No entanto, Tsiaras et al. (2005) e Heck et al. (2009) não encontraram associação significativa dos genótipos de *BLG* com a produção dos constituintes mencionados, e Ikonen et al. (1999) reportaram efeito favorável do genótipo AA sobre a produção de proteína. A inconsistência dos resultados entre os estudos pode ser atribuída, em parte, a diferenças nas raças e sistemas de produção da população de animais investigados (Bonfatti et al., 2010).

Os genótipos de *BLG* também apresentaram associação significativa com o conteúdo de caseína e proteínas do soro. Animais BB produziram diferença média superior de 3,12 g/L do que os animais AA, enquanto as proteínas do soro reduziram em média 1,77 g/L entre esses dois genótipos. Como consequência do aumento do teor de caseína e a redução das proteínas do soro, o conteúdo de proteína total não apresentou diferença significativa, entretanto houve diferença na relação caseína: proteína, que foi afeta em ordem crescente pelos seguintes genótipos: BB>AB>AA. Esses resultados concordam com os resultados reportados por Braunschweig et al. (2000). Hallén et al. (2008) verificaram associação negativa entre *BLG* B e proteína, enquanto que Bobe et al. (1999) não encontraram efeito dos genótipos de *BLG* sobre as mesmas variáveis investigadas.

Entre as frações proteicas houve diferença significativa no conteúdo de α_{s2} -CN, α -LA e β -LG. Animais BB apresentaram maior conteúdo de α_{s2} -CN e α -LA, e menor conteúdo de β -LG. Entretanto, verifica-se que com exceção do conteúdo de k-CN todas as caseínas apresentaram uma tendência em aumentar em amostras de leite de animais BB. Estudos realizados por Ng-Kwai-Hang et al. (1987), reportaram efeito positivo do genótipo BB com maior conteúdo de α_s -CN e α -LA, menor conteúdo de β -LG, enquanto Heck et al. (2009) e Bonfatti et al. (2010) observaram associação positiva do genótipo BB com todas as frações de caseína e α -LA, enquanto a β -LG apresentou efeito crescente de acordo com os seguintes genótipos AA>AB>BB.

Estudos prévios (Wagner et al., 1994; Lum et al. 1997) atribuíram o forte efeito do genótipo *BLG* sobre o conteúdo de β -LG e a diferenças na expressão causada pelo polimorfismo na região promotora do gene, que é fisicamente ligado ao polimorfismo AB na *BLG*. Diferenças na estabilidade do mRNA derivado o alelo A e B (Heck et al., 2009) também tem sido sugerido para explicar a variação do conteúdo de β -LG entre os genótipos de *BLG*. Heck et al. 2009 reportaram que os genótipos de *BLG* são responsáveis por 90% da variação genética de β -LG, e 2 - 10% da variação genética de outras caseínas. Do mesmo modo, Bobe et al. (1999) concluiu que o genótipo *BLG* regula quase que exclusivamente a concentração de β -LG no leite (Aleandri et al., 1990).

Na Tabela 2, verifica-se que os animais do grupo G1, no qual foram agrupados os animais 1/2 e 9/16 Holandês x Zebu tendem a apresentar maior frequência do alelo B do que os animais do Grupo 2, no qual foram inseridos os animais 3/4 Holandês: Zebu. Baseado nos resultados do presente estudo pode-se sugerir que o cruzamento de animais da raça Holandesa com animais Zebus, particularmente da raça Gir, pode aumentar a frequência do alelo B na população, com isso contribuir para melhorar o conteúdo de caseína e produção dos diferentes constituintes do leite. Entretanto, ressalta-se que o número de animais nesse estudo foi limitado, por isso é importante que mais trabalhos sejam desenvolvidos, em particular com os animais que já participam de programas de seleção de melhoramento genético e são considerados referências para a produção de leite nacional.

CNS3 locus: Os efeitos dos genótipos de *CNS3* sobre as propriedades de coagulação do leite, produção de queijo, composição e produção dos constituintes do leite vem sendo estudados largamente em populações de bovinos leiteiros de diversas raças em todo o mundo. Resultados inconsistentes são verificados entre os trabalhos (Braunschweig et al., 2000; Ikonen et al., 2001; Boettcher et al., 2004). Entretanto associação positiva de *CNS3* B com o conteúdo de κ -CN tem sido reportada na grande maioria dos estudos (McLean et al., 1984; Ng-Kwai-Hang et al., 1987; Ikonen et al., 1999; Heck et al., 2009; Bonfatti et al., 2010). Da mesma maneira, nesse estudo, efeito favorável do alelo B sobre o conteúdo de κ -CN foi observado. Animais com o genótipo *CNS3* BB + AB produziram leite com média de $3,55 \pm 0,15$ g/L de κ -CN, enquanto que os com genótipo AA apresentaram 3,04 g/L. Não foram observados efeitos dos genótipos de *CNS3* sobre as outras variáveis avaliadas. Resultado similar foi observado por Mclean et al. (1984).

Resultados favoráveis do aumento da concentração de κ -CN, com concomitante redução das micelas de caseína sobre a melhoria das propriedades da coagulação do leite e produção de queijo têm sido reportados (Marziali e Ng-Kwai-Hang, 1986; Niki et al., 1994; Walsh et al., 1998; Wedholm et al., 2006; Bonfatti et al., 2014). Nesse sentido, os resultados desse estudo corroboram com os achados reportados na literatura, enfatizando a utilização do gene *CNS3* como marcador molecular para a seleção de animais que produzam leite com melhores características para a produção de queijo.

Analisando a frequência dos alelos A e B do gene *CNS3*, não foram verificadas diferenças entre os grupos G1 e G2. Como a frequência do gene A é maior em animais da raça Gir, Guzerá e Holandesa, é possível que os cruzamentos entre essas raças não proporcione o aumento da frequência do alelo B na população.

CSN1S1 locus: O número de estudos sobre o efeito dos genótipos de *CSN1S1* que codifica α_{s1} -CN ainda não é tão extenso como os estudos avaliando *BLG* e *CNS3*. O genótipo *CSN1S1* BB foi correlacionado com maior produção de leite e proteína (Ng-Kwai-Hang et al., 1984; Aleandri et al., 1990). Entretanto, o mesmo genótipo foi associado com baixa concentração de proteína no leite (Ng-Kwai-Hang et al., 1986). Mclean et al. (1984) observaram efeitos dos genótipos de *CSN1S1* sobre o conteúdo de α_{s1} -CN (BC>BB) e κ -CN (B>BC). Com exceção do efeito sobre o conteúdo de κ -CN, os resultados reportados por esses autores concordam com os achados desse estudo. Animais com os genótipos CC e BC apresentaram média de $9,32 \pm 0,35$ g/L de α_{s1} -CN, enquanto que BB produziram $8,76 \pm 0,32$ g/L. Comparação das propriedades das variantes B e C mostrou que α_{s1} -CN C apresenta maior capacidade de associação (Schmidt, 1970), o que sugere que queijos produzidos com maior proporção dessa variante forma uma coalhada mais resistente (Sadler et al., 1968). Entretanto, parece que aumentar a proporção de α_{s1} -CN não conduz a benefícios marcantes sobre a produção de queijo. De acordo com Bonfatti et al. (2011), o aumento do conteúdo e proporção relativa de β -CN e κ -CN sobre o teor de caseína total e a redução do conteúdo de proporção de α_{s1} -CN e α_{s2} -CN, e o pH do leite através da seleção genética dos animais exercem favorável efeito sobre as propriedades de coagulação do leite.

Os animais do grupo G1 tenderam a apresentar maior frequência do alelo C do que os animais do grupo G2. Considerando as frequências gênicas com tendências diferenciadas entre os dois grupos, concomitante aos maiores conteúdos de α_{s1} -CN reportados na Tabela 3 para o grupo G1, pode-sugerir que os efeitos observados no sistema de produção dos animais com menor proporção da raça Holandesa no cruzamento pode ser explicado por fatores genéticos e ambientais.

4. CONCLUSÕES

Os resultados verificados nesse estudo indicam que os genótipos de *CSN1S1*, *CNS3* e *LGB*, e *CCS* desempenham um papel importante sobre a variação da composição e produção de vários constituintes do leite e das frações proteicas.

O efeito marcante dos genótipos de *LGB* sobre a composição e produção de vários constituintes do leite, em adição aos efeitos dos genótipos de *CNS3* sobre o conteúdo de κ -CN, e *CSN1S1* sobre o conteúdo de α_{s1} -CN, sugerem que o aumento da frequência de determinados genótipos pode ser uma maneira efetiva de alterar a composição do leite, particularmente a composição proteica.

Tabela 2. Estatística descritiva (média, desvio padrão - DP, mínimo e máximo) da composição e produção dos constituintes do leite de 82 animais Holandês x Zebu

Variáveis	Média	DP	Mínimo	Máximo
Produção de leite, Kg/d	10,69	3,51	3,00	21,40
Produção dos componentes do leite, Kg/dia				
Gordura	0,35	0,14	0,13	0,91
Proteína	0,34	0,11	0,10	0,74
Caseína	0,25	0,09	0,07	0,56
Lactose	0,49	0,16	0,12	0,84
Sólidos totais	1,26	0,39	0,29	2,48
Componentes mensurados por EIV				
Gordura, g/100g	3,29	1,00	1,64	6,14
Proteína, g/100g	3,18	0,34	2,40	4,10
Caseína, g/100g	2,41	0,27	1,77	3,19
Lactose, g/100g	4,55	0,40	2,74	5,09
Sólidos totais, g/100g	11,95	1,19	8,26	16,18
Caseína: proteína, %	75,74	1,03	73,75	77,89
Nitrogênio ureico, mg/dL	4,57	2,98	0,50	14,30
CCS ¹	3,43	2,78	-3,64	9,08
Proteínas mensuradas por RP- CLAE				
Proteína, g/L	41,15	5,91	27,93	56,03
Caseína, g/L	35,74	5,20	25,22	51,34
Proteínas do soro, g/L	5,41	1,46	1,33	8,56
Caseína: proteína, %	86,89	2,92	80,93	95,56
Conteúdo das frações proteicas, g/L				
α_{s1} -CN	9,29	2,09	5,04	14,08
α_{s2} -CN	7,55	1,72	4,65	12,12
β -CN	15,32	2,47	8,60	21,20
k-CN	3,41	0,84	1,63	5,58
α -LA	1,17	0,26	0,46	1,85
β -LG A	3,49	1,51	0,62	6,67
β -LG B	CN po1,29	1,29	0,96	4,89
β -LG total	4,24	1,40	0,87	7,09
Composição proteica, %				
α_{s1} -CN, % caseína total	26,14	4,12	17,42	33,33
α_{s2} -CN, % caseína total	21,57	4,63	12,91	30,92
β -CN, % caseína total	42,87	3,39	30,32	54,51
k-CN, % caseína total	9,67	2,59	5,00	19,02
α -LA, % proteínas do soro	22,86	6,83	12,34	39,47
β -LG A, % proteínas do soro	77,14	6,83	60,53	87,66

¹CCS = $\log_2(\text{CCS} / 10^3) + 3$ (Shook, 1993).

Tabela 4. Médias ajustadas/lsmeans (\pm EP) da composição do leite de acordo com o grupo genético e CCS

Variáveis	Grupo genético x CCS				Diferenças	
	G1 x CCS1 ¹ (n=25)	G1 x CCS2 ² (n=27)	G2 x CCS1 ³ (n=15)	G2 x CCS2 ⁴ (n=13)	Grupo genético ⁵	CCS, log ⁶
Gordura, g/100g	2,59 \pm 0,19 ^b	3,14 \pm 0,16 ^a	3,77 \pm 0,24 ^a	3,69 \pm 0,26 ^a	- 0,87 \pm 0,22 ^{**}	-1,10 \pm 0,32 ^{**}
Proteína, g/100g	3,21 \pm 0,06 ^a	3,26 \pm 0,05 ^a	2,90 \pm 0,08 ^b	2,90 \pm 0,09 ^b	0,34 \pm 0,07 ^{**}	0,31 \pm 0,11 ^{**}
Caseína, g/100g	2,43 \pm 0,05 ^a	2,48 \pm 0,04 ^a	2,20 \pm 0,06 ^b	2,19 \pm 0,07 ^b	0,26 \pm 0,06 ^{**}	0,23 \pm 0,09 ^{**}
Lactose, g/100g	4,82 \pm 0,07 ^a	4,53 \pm 0,06 ^b	4,54 \pm 0,09 ^b	4,22 \pm 0,10 ^c	0,29 \pm 0,08 ^{**}	0,60 \pm 0,12 ^{**}
Sólidos totais, g/100g	11,47 \pm 0,24	11,86 \pm 0,20	12,19 \pm 0,31	11,81 \pm 0,34	-0,30 \pm 0,28	-0,33 \pm 0,41
Caseína: Proteína, %	75,45 \pm 0,20	75,91 \pm 0,18	75,70 \pm 0,25	75,49 \pm 0,28	0,08 \pm 0,23	-0,04 \pm 0,35
Uréia, mg/dl	5,19 \pm 0,65	4,23 \pm 0,57	4,06 \pm 0,85	4,83 \pm 0,92	0,26 \pm 0,76	0,35 \pm 1,13
Gordura, Kg/dia	0,28 \pm 0,02 ^b	0,32 \pm 0,02 ^{ab}	0,39 \pm 0,03 ^a	0,46 \pm 0,04 ^a	-0,12 \pm 0,0 ^{**}	-0,17 \pm 0,04 ^{**}
Proteína, Kg/dia	0,35 \pm 0,02	0,33 \pm 0,02	0,31 \pm 0,02	0,36 \pm 0,03	0,01 \pm 0,02	-0,01 \pm 0,03
Caseína, Kg/dia	0,26 \pm 0,02	0,24 \pm 0,02	0,24 \pm 0,02	0,28 \pm 0,03	-0,01 \pm 0,02	-0,02 \pm 0,03
Lactose, Kg/dia	0,53 \pm 0,03	0,46 \pm 0,03	0,49 \pm 0,04	0,53 \pm 0,04	-0,01 \pm 0,03	0,01 \pm 0,05
Sólidos totais, Kg/dia	1,28 \pm 0,07 ^{ab}	1,22 \pm 0,06 ^b	1,30 \pm 0,10 ^{ab}	1,48 \pm 0,10 ^a	-0,14 \pm 0,09	-0,20 \pm 0,13
Proteínas mensuradas por RP-CLAE						
Proteína, g/L	43,96 \pm 1,12 ^a	42,63 \pm 0,98 ^a	39,03 \pm 1,46 ^b	35,05 \pm 1,59 ^b	6,25 \pm 1,3 ^{**}	8,91 \pm 1,95 ^{**}
Caseína, g/L	38,15 \pm 0,98 ^a	37,04 \pm 0,85 ^a	34,34 \pm 1,27 ^b	30,91 \pm 1,38 ^b	4,96 \pm 1,14 ^{**}	7,23 \pm 1,69 ^{**}
Proteínas do soro, g/L	5,81 \pm 0,28 ^a	5,59 \pm 0,24 ^a	4,69 \pm 0,36 ^b	4,15 \pm 0,39 ^b	1,28 \pm 0,32 ^{**}	1,27 \pm 0,48 ^{**}
Caseína: proteína, %	86,74 \pm 0,52	86,88 \pm 0,46	87,88 \pm 0,68	88,13 \pm 0,74	-1,14 \pm 0,61	-1,38 \pm 0,91
Conteúdo das frações proteicas, g/L						
α_{s1} -CN	10,15 \pm 0,42 ^a	9,60 \pm 0,37 ^a	8,87 \pm 0,55 ^{ab}	7,53 \pm 0,60 ^b	1,67 \pm 0,49 ^{**}	2,62 \pm 0,73 ^{**}
α_{s2} -CN	8,80 \pm 0,47 ^a	8,09 \pm 0,41 ^{ab}	7,37 \pm 0,61 ^{ab}	6,84 \pm 0,66 ^b	1,33 \pm 0,55 [*]	1,95 \pm 0,81 [*]
β -CN	15,92 \pm 0,52 ^a	15,96 \pm 0,45 ^a	14,82 \pm 0,67 ^{ab}	13,28 \pm 0,73 ^b	1,89 \pm 0,60 ^{**}	2,63 \pm 0,90 ^{**}
k-CN	3,26 \pm 0,18	3,38 \pm 0,16	3,28 \pm 0,23	3,24 \pm 0,25	0,06 \pm 0,21	0,01 \pm 0,31
α -LA	1,33 \pm 0,04 ^a	1,28 \pm 0,04 ^a	0,99 \pm 0,05 ^b	0,92 \pm 0,06 ^b	0,35 \pm 0,05 ^{**}	0,41 \pm 0,07 ^{**}
β -LG total	4,48 \pm 0,27 ^a	4,30 \pm 0,23 ^a	3,70 \pm 0,35 ^{ab}	3,22 \pm 0,38 ^b	0,93 \pm 0,31 ^{**}	1,26 \pm 0,47 ^{**}
Composição proteica, %						
α_{s1} -CN	26,76 \pm 0,88	25,92 \pm 0,77	25,68 \pm 1,14	24,19 \pm 1,25	1,40 \pm 1,03	2,56 \pm 1,53
α_{s2} -CN	22,75 \pm 1,04	21,79 \pm 0,91	21,27 \pm 1,35	22,10 \pm 1,48	0,58 \pm 1,21	0,65 \pm 1,80
β -CN	41,81 \pm 0,81	42,96 \pm 0,71	43,40 \pm 1,06	43,06 \pm 1,15	1,89 \pm 0,60	2,63 \pm 0,90
k-CN	8,67 \pm 0,49 ^b	9,31 \pm 0,43 ^{ab}	9,63 \pm 0,63 ^{ab}	10,63 \pm 0,69 ^a	-1,14 \pm 0,57 [*]	-1,95 \pm 0,85 [*]
α -LA	24,52 \pm 1,24	24,15 \pm 1,08	22,03 \pm 1,62	23,24 \pm 1,76	1,69 \pm 1,45	1,27 \pm 2,16
β -LG	75,47 \pm 1,24	75,84 \pm 1,08	77,96 \pm 1,61	76,95 \pm 1,76	-1,69 \pm 1,45	-1,27 \pm 2,16

¹G1 x CCS1 = Animais do grupo G1 (50-57% Holandês) com baixa CCS, log (\leq 2,33); ²G1 x CCS2 = Animais do grupo G1 com alta CCS, log ($>$ 2,33); ³G2 x CCS1 = Animais do grupo G2 (75% Holandês) com baixa CCS, log (\leq 5,39); ⁴G2 x CCS2 = Animais do grupo G2 com alta CCS, log ($>$ 5,39); ⁵Diferença entre a média de G1 x CCS1 e G1 x CCS2 contra G2 x CCS1 e G2 x CCS2; ⁶Diferença entre a média de G1 x CCS1 contra G2 x CCS2; α_{s1} -CN %, α_{s2} -CN%, β -CN% e k-CN% foram mensurados como porcentagem da caseína total; α -LA e β -LG foram mensurados como porcentagem do teor de proteínas do soro total; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Tabela 5. Efeito dos genótipos de *BLG* (β -LG), *CSN3* (κ -CN) e *CSN1S1* (α_{s1} -CN) sobre a composição do leite

Variáveis	<i>BLG</i>			<i>CSN3</i>		<i>CSN1S1</i>	
	AA (n = 24)	BB (n = 21)	AB (n = 37)	AA (n = 46)	BB e AB (n = 36)	BB (n = 34)	CC e BC (n = 40)
Produção de leite, Kg/dia	10,06 ± 0,64 ^b	12,82 ± 0,75 ^a	10,70 ± 0,50 ^b	11,53 ± 0,48	10,85 ± 0,55	11,15 ± 0,49	11,24 ± 0,54
Gordura, g/100g	3,16 ± 0,19	3,35 ± 0,22	3,40 ± 0,15	3,18 ± 0,14	3,42 ± 0,16	3,43 ± 0,14	3,17 ± 0,16
Proteína, g/100g	3,12 ± 0,06	3,00 ± 0,07	3,10 ± 0,05	3,08 ± 0,05	3,07 ± 0,05	3,11 ± 0,05	3,03 ± 0,05
Caseína, g/100g	2,35 ± 0,05	2,28 ± 0,06	2,35 ± 0,04	2,33 ± 0,04	2,33 ± 0,04	2,36 ± 0,04	2,30 ± 0,04
Lactose, g/100g	4,58 ± 0,07	4,50 ± 0,08	4,52 ± 0,05	4,58 ± 0,05	4,49 ± 0,06	4,53 ± 0,05	4,53 ± 0,06
Sólidos totais, g/100g	11,78 ± 0,24	11,77 ± 0,28	11,96 ± 0,19	11,75 ± 0,18	11,93 ± 0,21	12,02 ± 0,18	11,66 ± 0,20
Caseína: Proteína, %	75,10 ± 0,20 ^b	75,10 ± 0,20 ^a	75,90 ± 0,16 ^b	75,57 ± 0,15	75,71 ± 0,17	75,72 ± 0,15	75,56 ± 0,17
Uréia, mg/dl	3,29 ± 0,65 ^b	5,78 ± 0,75 ^a	4,67 ± 0,51 ^a	4,34 ± 0,49	4,82 ± 0,56	5,00 ± 0,50	4,17 ± 0,55
Gordura, Kg/dia	0,32 ± 0,03 ^b	0,42 ± 0,03 ^a	0,37 ± 0,02 ^{ab}	0,36 ± 0,02	0,37 ± 0,02	0,38 ± 0,02	0,35 ± 0,02
Proteína, Kg/dia	0,31 ± 0,02 ^b	0,38 ± 0,02 ^a	0,33 ± 0,01 ^b	0,35 ± 0,01	0,33 ± 0,02	0,34 ± 0,01	0,34 ± 0,02
Caseína, Kg/dia	0,23 ± 0,02 ^b	0,29 ± 0,02 ^a	0,23 ± 0,01 ^b	0,26 ± 0,01	0,24 ± 0,02	0,25 ± 0,01	0,25 ± 0,01
Lactose, Kg/dia	0,46 ± 0,03 ^b	0,58 ± 0,03 ^a	0,48 ± 0,02 ^b	0,53 ± 0,02	0,49 ± 0,03	0,50 ± 0,02	0,51 ± 0,03
Sólidos totais, Kg/dia	1,18 ± 0,07 ^b	1,49 ± 0,09 ^a	1,28 ± 0,06 ^b	1,34 ± 0,06	1,29 ± 0,06	1,33 ± 0,06	1,30 ± 0,06
Proteínas mensuradas por RP- CLAE							
Proteína, g/L	39,51 ± 1,12	40,86 ± 1,30	40,16 ± 0,88	39,67 ± 0,84	40,67 ± 0,96	39,79 ± 0,86	40,56 ± 0,94
Caseína, g/L	33,67 ± 0,97 ^b	36,79 ± 1,13 ^a	34,87 ± 0,76 ^b	34,51 ± 0,73	35,72 ± 0,84	34,60 ± 0,75	35,62 ± 0,82
Proteínas do soro, g/L	5,83 ± 0,27 ^a	4,06 ± 0,32 ^b	5,29 ± 0,21 ^b	5,17 ± 0,20	4,96 ± 0,23	5,19 ± 0,21	4,94 ± 0,23
Caseína: proteína, %	85,32 ± 0,52 ^c	89,98 ± 0,60 ^a	86,85 ± 0,41 ^b	87,01 ± 0,39	87,76 ± 0,45	86,97 ± 0,40	87,80 ± 0,44
Conteúdo das frações proteicas, g/L							
α_{s1} -CN	9,10 ± 0,41	9,22 ± 0,49	8,80 ± 0,33	9,07 ± 0,31	9,01 ± 0,36	8,76 ± 0,32 ^b	9,32 ± 0,35 ^a
α_{s2} -CN	6,57 ± 0,47 ^b	8,93 ± 0,54 ^a	7,84 ± 0,37 ^a	7,36 ± 0,35	8,20 ± 0,40	7,47 ± 0,36	8,09 ± 0,40
β -CN	14,54 ± 0,52	15,63 ± 0,60	14,81 ± 0,41	15,03 ± 0,39	14,96 ± 0,44	15,01 ± 0,40	14,98 ± 0,44
k-CN	3,46 ± 0,18	3,01 ± 0,21	3,41 ± 0,14 ^b	3,04 ± 0,13 ^a	3,55 ± 0,15 ^b	3,36 ± 0,14	3,23 ± 0,15
α -LA	1,10 ± 0,04 ^b	1,23 ± 0,05 ^a	1,07 ± 0,03 ^b	1,13 ± 0,03	1,13 ± 0,04	1,16 ± 0,03	1,10 ± 0,03
β -LG total	4,73 ± 0,27 ^a	2,84 ± 0,31 ^b	4,22 ± 0,21 ^a	4,04 ± 0,20	3,82 ± 0,23	4,03 ± 0,20	3,83 ± 0,23
Composição proteica, %							
α_{s1} -CN	26,96 ± 0,87	24,91 ± 1,02	25,06 ± 0,69	26,11 ± 0,66	25,18 ± 0,75	25,26 ± 0,67	26,02 ± 0,74
α_{s2} -CN	19,37 ± 1,03 ^b	24,06 ± 1,20 ^a	22,51 ± 0,81 ^a	21,39 ± 0,77	22,56 ± 0,89	21,51 ± 0,79	22,44 ± 0,87
β -CN	43,27 ± 0,81	42,62 ± 0,94	42,54 ± 0,63	43,60 ± 0,61	42,03 ± 0,70	43,30 ± 0,62	42,33 ± 0,68
k-CN	10,40 ± 0,48	8,41 ± 0,56	9,89 ± 0,38	8,90 ± 0,36	10,23 ± 0,42	9,92 ± 0,37	9,21 ± 0,41
α -LA	19,27 ± 1,24 ^b	30,20 ± 1,44 ^a	21,00 ± 0,97 ^b	23,14 ± 0,93	23,84 ± 1,07	23,64 ± 0,95	23,33 ± 1,04
β -LG	80,73 ± 1,24 ^a	69,80 ± 1,44 ^b	79,00 ± 0,97 ^a	76,86 ± 0,93	76,16 ± 1,07	76,36 ± 0,95	76,67 ± 1,04

α_{s1} -CN %, α_{s2} -CN%, β -CN% e k-CN% foram mensurados como porcentagem da caseína total; α -LA e β -LG foram mensurados como porcentagem do teor de proteínas do soro total.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEANDRI, R. et al. The Effects of Milk Protein Polymorphisms on Milk Components and Cheese-Producing Ability. *J. Dairy Sci.*, v. 73, n. 2, p. 241–255, 1990.
- AULDIST, M. J. et al. Changes in the composition of milk from healthy and mastitic dairy cows during the lactation cycle. *Aust. J. Exp. Agric.*, v. 35, n. 4, p. 427–436.
- AULDIST, M. J.; HUBBLE, I. B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. *Aust. J. dairy Technol.*, v. 53, n. 1, p. 28–36.
- BIJL, E. et al. Factors influencing casein micelle size in milk of individual cows: Genetic variants and glycosylation of κ -casein. *Int. Dairy J.*, v. 34, n. 1, p. 135–141.
- BOBE, G. et al. Separation and Quantification of Bovine Milk Proteins by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, v. 46, n. 2, p. 458–463.
- BOBE, G et al. Effect of milk protein genotypes on milk protein composition and its genetic parameter estimates. *J. Dairy Sci.*, v. 82, n. 12, p. 2797–804, 1999.
- BOETTCHER, P. J et al. Effects of casein haplotypes on milk production traits in Italian Holstein and Brown Swiss cattle. *J. Dairy Sci.*, v. 87, n.12, p. 4311–7, 2004.
- BONFATTI, V et al. Genetic analysis of detailed milk protein composition and coagulation properties in Simmental cattle. *J. Dairy Sci.*, v. 94, n.10, p. 5183–93, 2011.
- BONFATTI, V.; CHIAROT, G.; CARNIER, P. Glycosylation of κ -casein: Genetic and nongenetic variation and effects on rennet coagulation properties of milk. *J. Dairy Sci.*, v. 97, n.4, p. 1961–1969, 2014.
- BONFATTI, V et al. Effects of β - κ -casein (CSN2-CSN3) haplotypes, β -lactoglobulin (*BLG*) genotypes, and detailed protein composition on coagulation properties of individual milk of Simmental cows. *J. Dairy Sci.*, v. 93, n. 8, p. 3809–3817, 2010.
- BONFATTI, V et al. Variation in milk coagulation properties does not affect cheese yield and composition of model cheese. *Int. Dairy J.*, v. 39, n. 1, p. 139–145, 2014.
- BOTARO, B. G. et al. Effect of beta-lactoglobulin polymorphism and seasonality on bovine milk composition. *J. Dairy Res.*, v. 75, n. 02, p. 176–181, 2009.
- BRAUNSCHWEIG, M. et al. Associations between casein haplotypes and milk production traits of Swiss Brown cattle. *J. Dairy Sci.*, v. 83, n. 6, p. 1387–95.
- CHEN, B., LEWIS, M. J.; GRANDISON, A. S. Effect of seasonal variation on the composition and properties of raw milk destined for processing in the UK. *Food Chem.*, v. 158, v. 0, p. 216–223, 2014.
- CIPOLAT-GOTET, C. et al. Factors affecting variation of different measures of cheese yield and milk nutrient recovery from an individual model cheese-manufacturing process. *J. Dairy Sci.*, v. 96, n. 12, p. 7952–7965, 2014.

- COULONA, J.-B. et al. Effect of mastitis and related-germ on milk yield and composition during naturally-occurring udder infections in dairy cows. *Anim. Res.*, v. 51, n. 05, p. 383–393, 2002.
- DALGLEISH, D. G. On the structural models of bovine casein micelles-review and possible improvements. *Soft Matter*, v. 7, n. 6, p. 2265–2272, 2011.
- DALGLEISH, D. G.; CORREDIG, M. The Structure of the Casein Micelle of Milk and Its Changes During Processing. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, v. 3, n. 1, p. 449–467, 2012.
- DALGLEISH, D. G., HORNE, D. S.; LAW, A. J. R. Size-related differences in bovine casein micelles. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, v. 991, n. 3, p. 383–387, 1989.
- DE KRUIF, C. G. Supra-aggregates of Casein Micelles as a Prelude to Coagulation. *J. Dairy Sci*, v. 81, n. 11, p. 3019–3028, 1998.
- DE MARCHI, M. et al. Effect of Holstein Friesian and Brown Swiss Breeds on Quality of Milk and Cheese. *J. Dairy Sci*, v. 91, n. 10, p. 4092–4102, 2008.
- DEVOLD, T. G. et al. Size of native and heated casein micelles, content of protein and minerals in milk from Norwegian Red Cattle—effect of milk protein polymorphism and different feeding regimes. *Int. Dairy J.*, v. 10, n. 5-6, p. 313–323, 2000.
- DONNELLY, W. J. et al. A comprehensive study of the relationship between size and protein composition in natural bovine casein micelles. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.*, v. 789, n. 2, p. 136–143, 1984.
- DZIUBA, J.; MINKIEWICZ, P. Influence of glycosylation on micelle-stabilizing ability and biological properties of C-terminal fragments of cow's κ -casein. *Int. Dairy J.*, v.6, n. 11, p. 1017–1044, 1996
- FARRELL, H. M. et al. Nomenclature of the proteins of cows' milk--sixth revision. *J. Dairy Sci*, v. 87, n. 6, p. 1641–74, 2004.
- FONSECA, I. et al. Expression profile of genes associated with mastitis in dairy cattle. *Genet. Mol. Biol.*, v. 32, n. 4, p. 776–81, 2009.
- FONSECA, P. A. S. et al. A new tetra-primer ARMS-PCR for genotyping bovine kappa-casein polymorphisms. *Genetics and Molecular*, v. 12, n. 4, p. 6526-6526, 2013.
- GLANTZ, M. et al. Importance of casein micelle size and milk composition for milk gelation. *J. Dairy Sci*, v. 93, n. 4, p. 1444–51, 2010.
- HALLÉN, E. et al. Casein retention in curd and loss of casein into whey at chymosin-induced coagulation of milk. *J. Dairy Res.*, v. 77, n. 01, p. 71–76, 2010.
- HALLÉN, E. et al. Effect of β -casein, κ -casein and β -lactoglobulin genotypes on concentration of milk protein variants. *J. Anim. Breed. Genet.*, v. 125, n. 2, p. 119–129, 2008.

- HECK, J. M. L. et al. Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. *J. Dairy Sci*, v. 92, n. 3, p. 1192–202, 2009.
- HEKKEN, D. L.; HOLSINGER, V. H. Use of cold microfiltration to produce unique β -casein enriched milk gels. *Lait*, v. 80, n. 1, p. 69–76, 2000.
- HOGARTH, C. J. et al. Differential protein composition of bovine whey: A comparison of whey from healthy animals and from those with clinical mastitis. *Proteomics*, v. 4, n. 7, p. 2094–2100, 2004.
- HOLT, C. Casein Micelle Substructure and Calcium Phosphate Interactions Studied by Sephacryl Column Chromatography. *J. Dairy Sci*, v. 81, n. 11, p. 2994–3003, 2008.
- HUANG, W. et al. Association between milk protein gene variants and protein composition traits in dairy cattle. *J. Dairy Sci*, v. 95, n. 1, p. 440–449, 2012.
- IKONEN, T. et al. Associations between casein haplotypes and first lactation milk production traits in Finnish Ayrshire cows. *J. Dairy Sci*, v. 84, n. 2, p. 507–14, 2001.
- IKONEN, T., OJALA, M.; RUOTTINEN, O. Associations between milk protein polymorphism and first lactation milk production traits in Finnish Ayrshire cows. *J. Dairy Sci*, v. 82, n. 5, p. 1026–33, 1999.
- JENNESS, R.; KOOPS, J. Preparation and Properties of a Salt Solution which Simulates Milk Ultrafiltrate. *Netherland Milk and Dairy Science*, v. 16, n. 1, p. 153–164, 1962.
- KELLY, A. L. et al. Correlation between bovine milk somatic cell count and polymorphonuclear leukocyte level for samples of bulk milk and milk from individual cows. *J. Dairy Sci*, v. 83, n. 2, p. 300–4, 2000.
- LE MARÉCHAL, C. et al. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products—a review. *Dairy Sci. Technol*, v. 91, n. 3, p. 247–282, 2011.
- LIU, Y.; GUO, R. pH-dependent structures and properties of casein micelles. *Biophysical Chemistry*, v. 136, n. 2–3, 67–73, 2008.
- LUCEY, J.; KELLY, J. Cheese yield. *Int. Dairy J.*, v. 47, n. 1, p. 1–14, 1994.
- LUM, L. S., DOVC, P.; MEDRANO, J. F. Polymorphisms of bovine beta-lactoglobulin promoter and differences in the binding affinity of activator protein-2 transcription factor. *J. Dairy Sci*, v. 80, n. 7, p. 1389–97, 1997.
- LUNDÉN, A., NILSON, M.; JANSON, L. Marked effect of beta-lactoglobulin polymorphism on the ratio of casein to total protein in milk. *J. Dairy Sci*, v. 80, n. 11, p. 2996–3005, 1997.
- MALEK DOS REIS, C. B. et al. Effect of somatic cell count and mastitis pathogens on milk composition in Gyr cows. *BMC Vet. Res.*, v. 9, n.1, p. 67, 2013.

- MARZIALI, A. S.; NG-KWAI, K. F. Effects of Milk Composition and Genetic Polymorphism on Coagulation Properties of Milk. *J. Dairy Sci*, v. 69, n. 7, p. 1793–1798, 1986.
- MCLEAN, D. M. et al. Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. *J. Dairy Res.*, v. 51, n. 04, p. 531, 1984.
- MEDRANO, J. F.; CORDOVA, E. A. Polymerase chain reaction amplification of bovine b-lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis. *Animal Biotechnol.* v.1, p.73-77.
- MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*, v.16, n. 3, p. 1215-1988.
- MELILLI, C. et al. An Empirical Method for Prediction of Cheese Yield1. *J. Dairy Sci.*, v.85, n. 10, p. 2699–2704, 2002.
- NG-KWAI-HANG, K. F. et al. Association of genetic variants of casein and milk serum proteins with milk, fat, and protein production by dairy cattle. *J. Dairy Sci*, v.67, n. 4, p. 835–40, 1984.
- NG-KWAI-HANG, K. F. et al. Variation in Milk Protein Concentrations Associated with Genetic Polymorphism and Environmental Factors. *J. Dairy Sci*, v. 70, n. 3, p.563–570, 1986.
- NIKI, R. et al. Rheological study on the rennet-induced gelation of casein micelles with different sizes. *Polym. Gels Networks*, v. 2, n.2, p. 105–118, 1994.
- ROUX, Y. LE, LAURENT, F.; MOUSSAOUI, F. Polymorphonuclear proteolytic activity and milk composition change. *Vet. Res.*, v. 34, n. 5, p. 629–645, 2003.
- SADLER, A. M. et al. Acid Production and Curd Toughness in Milks of Different α 1-Casein Types. *J. Dairy Sci*, v. 51, n. 1, p. 28–30, 1968.
- SANTOS, M. V. Effect of the kappa-casein gene polymorphism, breed and seasonality on physicochemical characteristics, composition and stability of bovine milk. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 38, n. 12, p. 2447–2454, 2009.
- SCHMIDT, D. G. Differences between the association of the genetic variants B, C and D of α 1-casein. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct.*, v. 221, n. 1, p. 140–142, 1970.
- SCHUKKEN, Y. H. et al. Ontario Bulk Milk Somatic Cell Count Reduction Program. 1. Impact on Somatic Cell Counts and Milk Quality. *J. Dairy Sci*, v. 75, n.12, p. 3352–3358, 1992.
- SHOOK, G. E. Genetic improvement of mastitis through selection on somatic cell count. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, v. 9, n. 3, p. 563–581, 1993.

- TAUZIN, J., MICLO, L.; GAILLARD, J. L. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine α S2-casein. *FEBS Letters*, v. 531, n. 2, p. 369–374, 2002.
- TSIARAS, A. M. et al. Effect of kappa-casein and beta-lactoglobulin loci on milk production traits and reproductive performance of Holstein cows. *J. Dairy Sci*, v.88, n. 1, p. 327–34, 2005.
- VERDI, R. J. et al. Variability in True Protein, Casein, Nonprotein Nitrogen, and Proteolysis in High and Low Somatic Cell Milks. *J. Dairy Sci*, v. 70, n. 2, p. 230–242, 1987a.
- VERDI, R. J. et al. Variability in true protein, casein, nonprotein nitrogen, and proteolysis in high and low somatic cell milks. *J. Dairy Sci*, v. 70, n. 2, p. 230–42, 1987b.
- WAGNER, V. A., SCHILD, T. A.; GELDERMANN, H. DNA variants within the 5'-flanking region of milk-protein-encoding genes II. The β -lactoglobulin-encoding gene. *Theor. Appl. Genet.*, v. 89, n.1, p. 121–126, 1994.
- WALSH, C. D. et al. Influence of kappa-casein genetic variant on rennet gel microstructure, cheddar cheesemaking properties and casein micelle size. *Int. Dairy J.*, v.8, n. 8, p. 707 – 714, 1998.
- WALSTRA, P. On the Stability of Casein Micelles1. *J. Dairy Sci*, v. 73, n. 8, p. 1965–1979, 1990.
- WEDHOLM, A. et al. Effect of Protein Composition on the Cheese-Making Properties of Milk from Individual Dairy Cows. *J. Dairy Sci*, v.89, n. 9, p. 3296–3305, 2006.
- YE, R.; HARTE, F. Casein maps: Effect of ethanol, pH, temperature, and CaCl₂ on the particle size of reconstituted casein micelles. *J. Dairy Sci*, v. 96, n. 2, p. 799–805, 2015.
- ZHAO, L. et al. Effect of ultrasound pretreatment on rennet-induced coagulation properties of goat's milk. *Food Chem.*, v. 165, n. 0, p. 167–174, 2014.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados do presente estudo, pode-se concluir que:

- Animais mestiços 1/2 e 9/16 Holandês x Gir tenderam a produzir leite com menores micelas de caseínas quando comparado aos animais com maior proporção da raça Holandesa no cruzamento.
- Menores micelas de caseína são associadas positivamente com o teor de κ -caseína e negativamente com α_s -caseína.
- A presença de menores micelas de caseína desprovido do efeito de κ -caseína e α_s -caseína, associado ao efeito de maior conteúdo de gordura, caseína total, lactose e κ -caseína apresentou efeito favorável sobre o rendimento da produção de queijo em escala reduzida.
- O sistema de produção dos animais mestiços 1/2 e 9/16 Holandês x Zebu caracterizado por menor CCS quando comparado ao sistema de produção de animais mestiços 3/4 apresentou maior conteúdo das frações proteicas, exceto para o teor de κ -caseína.
- O genótipo *LGB* BB apresentou efeito favorável sobre a produção e teor de vários constituintes do leite, além dos efeitos favoráveis sobre frações proteicas.
- Os genótipos *CSN3* AB e BB apresentaram efeito favorável sobre o conteúdo de κ -caseína.
- Os genótipos *CSN1S1* BC e CC apresentaram efeito favorável sobre o conteúdo de α_{s1} -caseína.
- A frequência dos genótipos de *CSN3* e *CSN1S1* não sugerem diferenças entre os animais mestiços 1/2, 9/16 e 3/4 Holandês x Zebu. Entretanto os animais agrupados com menor proporção da raça Holandesa no cruzamento (1/2 e 9/16) tendem a apresentar mais frequência do alelo B do gene *LGB* do que os animais 3/4.