

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

**Relación entre las Variantes Genéticas de β -Lg con Propiedades de
Composición y Aptitud a la Coagulación, de Leche de Vacas Holstein-
Friesian y Jersey**

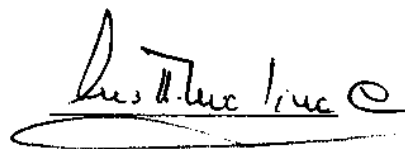
Tesis presentada como parte de
los requisitos para optar al
grado de Licenciado en
Ingeniería en Alimentos.

Karin Ximena Basaul Muñoz

VALDIVIA – CHILE
2003

PROFESOR PATROCINANTE

LUZ HAYDEE MOLINA CARRASCO
Prof. Biología y Química
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

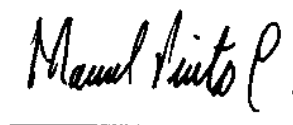
Handwritten signature of Luz Haydee Molina Carrasco, written in black ink and underlined.

PROFESORES INFORMANTES

CARMEN BRITO CONTRERAS
Ingeniero en Alimentos. M. Sc. Food Science
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Handwritten signature of Carmen Brito Contreras, written in black ink and underlined.

MANUEL PINTO COVARRUBIAS
Prof. Química. M. Sc. Science
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Handwritten signature of Manuel Pinto Covarrubias, written in black ink and underlined.

Con Amor a mi esposo e hija, a mis padres y hermana

AGRADECIMIENTOS

A mi esposo e hija los cuales fueron la real motivación para el término de esta etapa de mi vida.

A mi hermana Jenny por su apoyo y ayuda en la elaboración de este trabajo.

A mi profesora patrocinante Sra. Luz Haydée Molina por el apoyo brindado durante toda la realización de este trabajo.

Agradezco además a los Ingeniero Agrónomo, Sres. Augusto Abarzúa y Juan Carlos Colin quienes facilitaron las muestras de leche de las vacas Holstein-Friesian pertenecientes al Fundo Lo Prado y Vista Alegre, respectivamente y a los señores Kart Wellmann y Víctor Vivanco, quienes facilitaron las muestras de leche de las vacas Jersey pertenecientes al Fundo Filudo.

ÍNDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Razas de ganado Jersey y Holstein-Friesian	3
2.1.1	Raza Jersey	4
2.1.2	Raza Holstein-Friesian	4
2.2	Proteínas	5
2.2.1	Punto Isoeléctrico (pI)	6
2.2.2	Proteínas de la leche	7
2.3	Variantes genéticas de las proteínas de la leche de vaca	8
2.3.1	α_{s1} caseína	11
2.3.2	α_{s2} caseína	11
2.3.3	β -caseína	11
2.3.4	κ -caseína	12
2.3.5	α -lactoalbúmina	13
2.3.6	β -lactoglobulina	13
2.4	Importancia de las variantes genéticas de β -lactoglobulina en la composición de leche	14
2.4.1	Aptitud de la leche a la coagulación	15
2.5	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	16
2.6	Electroforesis de isoenfoque de proteínas en geles de poliacrilamida	17
2.7	Electroforesis discontinua	20

3	MATERIAL Y METODO	21
3.1	Material	21
3.1.1	Muestras de leche	21
3.1.2	Estándares de β -lactoglobulina	21
3.1.3	Estándares de puntos isoelectrónicos (PI)	21
3.1.4	Anfolito	22
3.1.5	Reactivos para los geles de los métodos de isoenfoque utilizados en este estudio.	22
3.2	Método	23
3.2.1	Electroforesis de isoenfoque según PEARCE <i>et al.</i> (1972)	24
3.2.2	Electroforesis de isoenfoque según TRIE-COUT y GRIPON (1981)	24
3.2.3	Electroforesis discontinua	24
3.2.4	Determinación de la aptitud de la leche a la coagulación	24
3.2.5	Determinación del contenido de materia grasa. Método de Gerber	24
3.2.6	Determinación del contenido de proteínas y caseínas en la leche mediante el método de amido negro (Pro – Milk)	24
3.2.7	Determinación del contenido de nitrógeno en leche por el método del bloque de digestión Micro Kjeldahl	24
3.2.8	Análisis estadístico	25
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	26
4.1	Contenido de proteína, caseína y materia grasa y aptitud de la leche a la coagulación en las razas Holstein-Friesian y Jersey	26
4.1.1	Proteínas y caseínas	26
4.1.1.1	Contenido de proteínas y caseínas en raza Holstein-Friesian	27
4.1.1.2	Contenido de proteínas y caseínas en raza Jersey	28

4.1.2	Materia grasa	29
4.1.2.1	Contenido de materia grasa en raza Holstein-Friesian	30
4.1.2.2	Contenido de materia grasa en raza Jersey	31
4.1.3	Aptitud de la leche a la coagulación	32
4.1.3.1	Aptitud de la leche a la coagulación en raza Holstein-Friesian	32
4.1.3.2	Aptitud de la leche a la coagulación en raza Jersey	33
4.2	Determinación de las variantes genéticas de β -lactoglobulina por electroforesis	33
4.2.1	Electroforesis de isoenfoque según PEARCE <i>et al.</i> (1972). Método 1	34
4.2.2	Electroforesis de isoenfoque según TRIE - COUT y GRIPON (1981). Método 2	34
4.2.3	Electroforesis discontinua según LOWE <i>et al.</i> (1995). Método 3	35
4.3	Puntos isoeléctricos (PI) y variantes genéticas encontradas en las muestras de leche analizadas en este estudio.	36
4.4	Relación entre las propiedades analizadas en la leche con las variantes genéticas de β -lactoglobulina	36
5	CONCLUSIONES	39
6	RESUMEN-SUMMARY	40
7	BIBLIOGRAFÍA	42

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición promedio y desviación estándar de la leche de diversas razas	3
2	Proteínas de la leche de vaca y algunas de sus propiedades	9
3	Relación entre las variantes genéticas de las proteínas de la leche y algunas propiedades tecnológicas de importancia en la fabricación de queso	10
4	Contenido de proteínas del suero, proteína total, grasa y sólidos totales y su relación con genotipos de β -lactoglobulina	15
5	Estándares de puntos isoeléctricos para la curva de calibración	21
6	Características principales de los métodos aplicados	22
7	Promedios y desviación estándar del contenido de proteínas y caseínas de las muestras de leche en estudio	27
8	Promedios y desviación estándar del contenido de materia grasa de ambas razas en estudio	30
9	Promedios y desviación estándar de la aptitud de la leche a la coagulación de la leche	33
10	Contenido promedio de proteínas, caseínas, materia grasa y aptitud a la coagulación, de leche que presenta variantes genéticas A y B de β -lactoglobulina	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Fórmula general de un anfolito	19
2	Curva de calibración para la identificación de las variantes genéticas	34
3	Electroforesis de isoenfoque aplicada a vacas de raza Holstein-Friesian y Jersey en un rango de pH de 3,5-10	35

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Encuestas utilizadas para la caracterización de las vacas de razas Holstein-Friesian y Jersey	52
2	Técnicas electroforéticas utilizadas en este estudio	57
3	Mediciones de los parámetros analizados en las muestras de leche en vacas de raza Holstein-Friesian y Jersey	59
4	Contenido de proteína y caseína determinado según método Kjeldahl y método Pro-Milk en vacas Holstein-Friesian y Jersey, en cada uno de los muestreos	61
5	Análisis de varianza y test de Tukey entre las vacas de razas en estudio (Holstein-Friesian y Jersey) con respecto al contenido de proteína, caseína, materia grasa y aptitud de la leche a la coagulación	67
6	Análisis de varianza y test de Tukey para la raza Holstein-Friesian, con respecto al contenido de proteína, caseína, materia grasa y aptitud de la leche a la coagulación	69
7	Análisis de varianza y test de Tukey para la raza Jersey, con respecto al contenido de proteína, caseína, materia grasa y aptitud de coagulación de la leche	71
8	Electroforesis de isoenfoque en un rango de pH de 3,5-10 aplicada en vacas individuales de raza Holstein-Friesian y Jersey	73
9	Migración de las muestras en el gel, PI y variantes genéticas encontradas en las muestras de leche analizadas en este estudio	74

1. INTRODUCCIÓN

Para la identificación de las proteínas en distintos productos alimenticios o en purificación de proteínas, se han utilizado distintos métodos electroforéticos, entre los cuales destacan la electroforesis de tipo convencional en geles de poliacrilamida (PAA), en la que la separación de las proteínas se realiza a pH constante, por el tamaño y la carga neta de las partículas. También se puede efectuar con un gradiente de pH y por las diferencias de puntos isoeléctricos de las sustancias a separar, esta técnica es llamada electroforesis de isoenfoque y ha sido utilizada en la identificación de las variantes genéticas de las proteínas de la leche.

La identificación de las proteínas de la leche y sus variantes genéticas resulta de gran utilidad a nivel industrial ya que se han atribuido algunas propiedades tecnológicas y de composición a determinadas proteínas y a sus variantes genéticas, entre las cuales han sido destacadas las variantes genéticas de β -lactoglobulina y de κ -caseína de la leche. Por lo tanto, es de interés disponer de un método que permita la caracterización de las variantes genéticas de β -lactoglobulina en la leche y a la vez relacionarlas con algunas propiedades de la leche.

La hipótesis del presente estudio corresponde a variantes genéticas A o B de β -lactoglobulina tienen cierta influencia en el contenido de materia grasa, proteínas y aptitud de la leche a la coagulación.

El objetivo general del presente estudio es identificar las variantes genéticas de β -lactoglobulina de la leche por electroforesis de isoenfoque y relacionar las variantes con el contenido de proteínas, materia grasa y aptitud de la leche a la coagulación.

Los objetivos específicos son:

- Comparar la electroforesis de isoenfoque con electroforesis discontinua en geles de PAA en la identificación de las variantes A y B de β -Lactoglobulina en muestras de leche de 10 vacas individuales Jersey y Holstein Friesian.
- Determinar el contenido de materia grasa, proteína, caseína y aptitud a la coagulación, en las muestras de leche de vacas de ambas razas.
- Relacionar los parámetros analizados de la leche con las variantes A y B de β -Lactoglobulina.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Razas de ganado Jersey y Holstein–Friesian

Las razas bovinas más utilizadas en Chile son las de doble propósito, especialmente Overo Negro. Sin embargo, cada día van perdiendo mayor importancia debido a su menor producción y calidad de leche, en comparación con las razas lecheras por excelencia como las Holstein–Friesian y la Jersey (LATRILLE, 1999).

En el CUADRO 1, según De Peters y Cant, citados por LATRILLE (1999), se muestra la composición promedio y desviación estándar de la leche de diversas razas.

CUADRO 1. Composición promedio y desviación estándar de la leche de diversas razas.

Raza	Proteína Cruda (%)	Proteína verdadera	Caseína (%)	Grasa (%)
Holstein	3,22±0,45	3,07±0,43	2,53±0,40	3,73±0,32
Jersey	4,22±0,51	4,07±0,49	3,39±0,40	5,42±0,53
Guernsey	3,70±0,55	3,56±0,53	2,88±0,44	4,75±0,44
Ayshire	3,47±0,55	3,30±0,52	2,73±0,43	4,12±0,22
P. Suizo	4,05±0,50	3,84±0,47	3,14±0,42	4,28±0,39
Shorton L.	3,42±0,51	3,17±0,47	2,56±0,40	3,58±0,26

FUENTE: De Peters y Cant , citados por LATRILLE (1999).

En el CUADRO 1 se puede ver que los porcentajes más altos de proteína, caseína y grasa, corresponden a la raza Jersey y la raza Hosltein presenta los valores más bajos en composición, dentro de las razas presentadas.

2.1.1 Raza Jersey. De acuerdo a las investigaciones realizadas por NEIMANN-SORENSEN (1987), la raza Jersey se originó en la pequeña isla Británica de Jersey, en el canal Inglés de la costa de Francia. Esta raza, de acuerdo a lo señalado por el mismo autor, es una de las razas lecheras más antiguas, considerándose incluso como raza pura por casi seis siglos.

GIBSON (1997), señala que las vacas de raza Jersey producen una menor cantidad de leche que la raza Holstein-Friesian, pero con un 20% más de proteína y un 30 a 50% más de grasa. De acuerdo a las investigaciones realizadas por BUTENDIECK (1998), las leches provenientes de la raza Jersey poseen el más alto contenido de proteína y materia grasa comparado con el resto de las razas lecheras. Dentro de la raza Jersey, dependiendo del manejo y clima, se puede encontrar que una vaca adulta puede producir anualmente 6000 kg de leche con 6% de materia grasa y 4,2% de proteína, reportándose las producciones máximas sobre 8000 kg de leche, algunas con 8% de materia grasa y 5% de proteína.

2.1.2 Raza Holstein-Friesian. “El mayor desarrollo histórico de ésta raza ocurrió en Nueva Zelandia con animales de pastoreo y en Estados Unidos y Canadá desarrollándose animales bien adaptados a confinamiento. Los animales de esta raza presentan un color blanco con negro, estructura larga y estilizada, un animal maduro puede llegar a pesar 700 kg” (BRAVO, 1998).

Debido a la incorporación de genética Holstein, se ha producido un significativo incremento, ya sea en el tamaño, como también en el peso de las vacas, los autores BUTENDIECK (1998) y De PETERS y FERGUSON (1992), señalan que las leches provenientes de vacas Holstein tienen contenidos más bajos de proteína y caseína, comparado con las leches de vacas Jersey, los cuales son mucho mayor, siendo esta variación similar para el contenido de grasa para ambas razas, debido a que las producciones de leche son mucho mayor en la raza Holstein-Friesian produciéndose un efecto de dilución.

2.2 Proteínas

Las proteínas son moléculas anfotéricas, las cuales poseen una carga neta positiva, negativa o cero, dependiendo del pH de su medio ambiente. La carga total de una proteína en particular está determinada por sus constituyentes aminoacídicos y grupos prostéticos (GARFIN,1990).

Según SWAISGOOD (1982), la carga molecular neta de una proteína está determinada por el contenido de grupos acídicos tales como grupos carboxílicos de ácidos aspártico, glutámico y menos comunes los grupos fosfatos y sulfatos y además de éstos también determinan ésta carga grupos básicos tales como grupos aminos y guanidino de lisina y arginina. Así, la mayoría de éstas macromoléculas tienen puntos isoeléctricos con un rango de pH de 3 a 11; en una gradiente de pH migrarán a sus puntos isoeléctricos donde ellas se concentran en nítidas bandas.

De acuerdo a lo señalado por CASADO y GARCÍA (1985), existen factores que influyen en la composición de la leche, sobre todo en el contenido de proteína y materia grasa, entre éstos se pueden mencionar la edad y número de partos, número de lactancias, raza y alimentación. El porcentaje de materia grasa y el contenido de proteínas va descendiendo a medida que aumenta la edad del animal (NG-KWAI HANG *et al.*, 1982), además los partos tienen influencia sobre la cantidad de leche que es producida, ya que a medida que aumenta el número de partos la cantidad de leche que es producida sufre un aumento (CASADO y GARCÍA, 1985). De acuerdo a CASADO y GARCÍA (1985) y ALAIS (1985), la concentración de materia grasa y proteínas al inicio de la lactación son máximas y mínimas durante el segundo y tercer mes de lactancia, para enseguida aumentar progresivamente hasta el fin de ésta.

La raza es el factor más importante en los bovinos y también entre razas con respecto a la variación de la composición y producción de leche. La importancia de conocer estas variaciones, es que de esta forma existe la posibilidad de seleccionar los mejores

animales en cuanto a composición dentro de una raza (ROGERS y STEWART, 1982 y CASADO y GARCÍA, 1985).

La alimentación es un factor que tiene que ver con la composición y cantidad de alimento y energía en la ración del animal, lo que influye directamente en la composición y producción de leche. Según lo señalado por De PETERS y CANT (1992), una menor cantidad de forraje, y un aumento del concentrado en la ración, tendría como resultado un aumento en el contenido de proteínas de la leche, esto debido a un aumento del nivel energético en la ración. Aquellas vacas de gran producción lechera, necesitan complementar su alimentación de praderas con la adición de concentrado y ensilajes de pasto para cubrir sus requerimientos nutricionales y no disminuir su calidad y cantidad de leche producida (TESSMAN *et al.*, 1991).

El contenido de materia grasa y la producción de leche se ven aumentados por la incidencia en las vacas de la alimentación de praderas, en las épocas de primavera y verano, pero debido al efecto de dilución que ocurre por la mayor producción de leche, se da finalmente, una disminución del contenido de materia grasa (LATRILLE, 1993).

2.2.1 Punto Isoeléctrico (pI). La carga neta de una proteína es la suma algebraica de todas sus cargas positivas y negativas. Así, de esta forma existe un pH específico para cada proteína cuando la carga neta es cero. Este valor de pH se denomina punto isoelectrico (pI), es una propiedad físicoquímica característica de cada proteína. Si el número de grupos ácidos en una proteína exceden al número de grupos básicos, el pI de aquella proteína será un valor de bajo pH. Si, de otra forma, los grupos básicos sobrepasan a los grupos ácidos, el pI será alto. Las proteínas muestran considerables variaciones en puntos isoelectricos, pero generalmente el rango de pH es de 3 a 10 (GARFIN, 1990).

ANDREWS (1992), señala que el punto isoelectrico es un parámetro importante en la caracterización de una macromolécula y en su mayoría fácilmente determinada por

electroforesis de isoenfoque, debido a que esta técnica posee un a alta resolución en los resultados obtenidos. Además, es importante recordar que los valores de punto isoeléctrico son dependientes de la temperatura, frecuentemente cuando aumenta ésta los valores de punto isoeléctrico disminuyen.

2.2.2 Proteínas de la leche. Las proteínas son las sustancias nitrogenadas que forman la parte más compleja de la leche y el principal factor de variación en el contenido de éstas es la alimentación y características genéticas, representan alrededor de 30 a 35 gramos por litro de leche (ALAIS, 1985; GONZALEZ DE LLANO, 1990 y LATRILLE, 1999).

Se han descrito dos grupos de proteínas, las caseínas isoeléctricas donde se encuentran las caseínas α_{s1} , α_{s2} , β , κ , γ_1 , γ_2 , γ_3 , siendo la fracción nitrogenada más abundante en la leche de vaca, constituyen alrededor del 80% de todas las sustancias nitrogenadas, se diferencian de las otras proteínas de la leche por el hecho de que coagulan bajo la acción del cuajo o a pH próximos al PI (4,6). El segundo grupo son las proteínas del suero o llamadas también seroproteínas, que se clasifican en albúminas, β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina y seroalbúmina, globulinas inmunes y proteosas-peptonas. Las proteosas - peptonas no se desnaturalizan por el calor, pero el resto de las proteínas del suero (80 a 90% del conjunto) precipitan, es decir, se desnaturalizan y pierden su solubilidad al calentar la leche o el suero. Cada una de las proteínas lácteas presenta un comportamiento térmico diferente, sólo existe una excepción que se presenta cuando hay leches ricas en caseínas donde las proteínas del suero quedan entrelazadas en las micelas de caseína, pero cuando ésta misma leche se acidifica a pH 4,6 y las caseínas son precipitadas, las proteínas del suero ya desnaturalizadas lo hacen con ellas (SWAISGOOD, 1982 y ALAIS, 1985).

Las principales proteínas de estos dos grupos exhiben polimorfismo genético y pueden ser detectadas por electroforesis en geles de poliacrilamida, de agarosa y de almidón (SWAISGOOD, 1982; ALAIS 1985; CASADO y GARCÍA, 1985 ; WALSTRA *et al.*, 1999).

2.3 Variantes genéticas de las proteínas de la leche de vaca

BARANYI *et al.* (1997), señalan que las principales proteínas de leche son controladas por genes autosomales que se heredan de acuerdo a las leyes de Mendel. La selección de vacas para una variante específica de proteína de leche es posible y será posible también seleccionar razas de acuerdo a las variantes de sus principales proteínas de leche (NG-KWAI-HANG *et al.*, 1984).

McLEAN *et al.* (1984); MARZIALI y NG-KWAI-HANG (1986b); GONZALEZ DE LLANO (1990) y HORNE *et al.* (1997), señalan que en los últimos años ha aumentado crecientemente el interés por el polimorfismo genético de las proteínas de la leche, porque en diferentes estudios realizados existen evidencias que las variantes genéticas de ciertas caseínas y de algunas proteínas del suero de la leche de vaca afectan la composición de la fracción caseínica, con consecuentes de beneficios en las propiedades tecnológicas, de producción y procesamiento de la leche.

Así, se han llevado a cabo diferentes estudios para determinar las frecuencias de las variantes genéticas de las proteínas de leche en diferentes razas de ganado bovino (MARZIALI y NG-KWAI-HANG, 1986b; JACOB, 1994; BARANYI *et al.*, 1997).

La asociación de los genotipos de proteínas de la leche con composición y propiedades de esta leche puede ser aprovechada comercialmente, usando estos genotipos como un criterio de selección adicional al usado por inseminación artificial. Por ejemplo, aumentar la frecuencia de un genotipo de proteína de leche, asociado con el incremento en la concentración de caseína lo cual conlleva a un aumento del rendimiento en la producción de queso (McLEAN *et al.*, 1984).

En el CUADRO 2 se señalan algunas propiedades de las proteínas de la leche de vaca determinada en leche descremada, según EIGEL *et al.* (1984) y BARANYI *et al.* (1997).

CUADRO 2. Proteínas de la leche de vaca y algunas de sus propiedades.

Proteína	Composición en leche (g/l)	Variantes genéticas	Peso molecular (g/mol)	Punto isoeléctrico
α s ₁ -caseína	12-15	A	22,068	-----
		B	23,614	4,4-4,76
		C	23,542	-----
		D	23,724	-----
		E	23,542	4,2-4,6
α s ₂ -caseína	3-4	A	25,23	-----
		B	-----	-----
		C	-----	-----
		D	-----	-----
β -caseína	9-11	A1	24,023	-----
		A2	23,983	4,8-5,07
		A3	23,974	-----
		B	24,092	-----
		C	23,944	-----
		D	23,944	-----
κ - caseína	2-4	A	19,039	3,7-4,2
		B	19,007	5,45-5,77
β -lactoglobulina	2-4	A	18,363	5,2
		B	18,277	5,4
		C	18,286	5,43
		D	18,276	5,5
		E	18,205	-----
		F	18,243	-----
		G	18,223	5,39
α -lactoglobulina	0,6-1,7	A	14,147	-----
		B	14,175	-----

FUENTE: EIGEL *et al.*, (1984) y BARANYI *et al.*, (1997).

Se han identificado 30 variantes genéticas en las seis fracciones principales de proteínas de la leche de vaca: α_{S1} -Caseína (A, B, C, D, E), α_{S2} -Caseína (A, B, C, D), β - Caseína (A^1 , A^2 , A^3 , B, C, D, E), κ - Caseína (A, B, C, E), α - lactoalbúmina (A, B, C), y β - lactoglobulina (A, B, C, D, E, F, G) (RAMOS y AMIGO, 1996; HORNE *et al.*, 1997).

ALAIS (1985), señala que las variantes genéticas han sido detectadas en las proteínas de leche y se distinguen por mínimas diferencias en la composición aminoacídica. Estas mínimas diferencias son causadas por cambios en la carga eléctrica neta de las proteínas y, por lo tanto, pueden ser identificadas por electroforesis (NG-KWAI-HANG, 1997).

En el CUADRO 3 se presenta algunas propiedades tecnológicas y de composición mejoradas de la leche, de acuerdo a la presencia de determinadas variantes genéticas de las proteínas de la leche.

CUADRO 3. Relación entre las variantes genéticas de las proteínas de la leche y algunas propiedades tecnológicas de importancia en la fabricación de queso.

Propiedades aumentadas	Relación con las variantes genéticas
Contenido de proteína	κ -caseína B
Contenido de caseína	κ -caseína B, β -lactoglobulina B
Número de caseína	β -lactoglobulina B
Contenido de materia grasa	β -lactoglobulina B
Tiempo de coagulación	β -caseína B, κ -caseína B
Firmeza del coágulo	κ -caseína B
Producción de queso	κ -caseína B, β -lactoglobulina B

FUENTE: NG-KWAI-HANG (1997).

Según lo señalado por Aschaffenburg citado por GONZALEZ DE LLANO (1990), las primeras variantes genéticas que fueron reconocidas correspondieron a las de la β -

lactoglobulina y posteriormente se descubrieron las variantes genéticas del resto de las proteínas de la leche de vaca.

2.3.1 α_{s1} caseína. Esta proteína láctea está compuesta por un componente principal y otro menor, ambos con una cadena polipeptídica de 199 residuos de aminoácidos. El componente mayoritario es α_{s1} y contiene 8 residuos fosfato esterificados con serina y el componente menor α_{s0} el cual presenta un residuo de fosfoserina adicional, en la posición 41 (SWAISGOOD, 1982 y GONZALEZ DE LLANO, 1990).

Existen 5 variantes genéticas denominadas A, D, B, C y E de acuerdo a su orden de movilidad electroforética decreciente. La variante genética C de esta proteína se ha relacionado en estudios con una mayor firmeza de la cuajada en leches que contienen esta variante, comparado con las otras variantes de esta proteína (PUHAN y JAKOB, 1993).

2.3.2 α_{s2} caseína. Esta proteína es la más hidrofílica de todas las caseínas, tiene un promedio de hidrofobicidad en el rango de la mayoría de las proteínas globulares (SWAISGOOD, 1982).

En éste grupo se encuentra también otros componentes previamente clasificados como: α_{s6} , α_{s4} y α_{s3} junto con la α_{s2} caseína. Todos éstos poseen una cadena polipeptídica con la misma secuencia de 207 residuos de aminoácidos, pero difieren en los grupos fosfatos presentando 10, 11, 12 y 13 respectivamente (GONZALEZ DE LLANO, 1990). Las variantes genéticas reconocidas de ésta proteína se denominan A, B, C y D (SWAISGOOD, 1982 y GONZALEZ DE LLANO, 1990).

2.3.3 b - caseína. Esta proteína tiene una cadena de 209 residuos de aminoácidos y 5 residuos fosfatos por molécula. Son insolubles a bajas concentraciones de Ca^{+2} a 20°C y

solubles a altas concentraciones y bajas temperaturas, es la más hidrofóbica de todas las caseínas (SWAISGOOD, 1982 y GONZALEZ DE LLANO, 1990).

Existen siete variantes genéticas de ésta proteína, que migran por electroforesis en gel en condiciones ácidas, en el siguiente orden decreciente: $C > B$ y $D > A^1$ y $E > A^2 > A^3$ (GONZALEZ DE LLANO, 1990). La información obtenida de la variante A ha sido mediante electroforesis en gel utilizando un pH ácido. Estas condiciones permiten la resolución de esta variante en tres componentes A^1 , A^2 y A^3 que migran juntas utilizando un pH básico. El alelo A^3 se da con una frecuencia muy baja en las razas Holstein – Friesian y normandas, y es en las únicas razas en las cuales ha sido detectada. El alelo A^2 aparece con una frecuencia muy alta en las razas Guernsey y Zebu y con una muy baja en la raza Ayrshire. La variante B se da con una frecuencia muy baja para la mayoría de las razas y es ésta y la variante C las que tienen importancia, ya que a éstas se les atribuye un menor tiempo de coagulación y altos rendimientos de queso (PUHAN y JAKOB, 1993).

2.3.4 κ - caseína. Es soluble en un amplio rango de concentraciones de calcio, gracias a ella, la micela de caseína se mantiene en solución (GONZALEZ DE LLANO, 1990).

En la κ -caseína, las principales variantes genéticas son la A y B, la secuencia de aminoácidos en la variante B difiere de la A por que tiene isoleucina en lugar de treonina en la posición 136 y alanina en vez de ácido aspártico en la posición 148 de un total de **XXX** aminoácidos (HORNE *et al.*, 1996 y GONZALEZ DE LLANO, 1990). Estas variantes están presentes en todas las razas examinadas, pero el alelo A tiende a predominar en la mayoría de las razas, con excepción de las razas Jersey. La variante A es la que presenta mayor movilidad (GONZALEZ DE LLANO, 1990).

En diferentes estudios se ha demostrado que las leches que contienen κ -caseína AA presentan un mayor tiempo de coagulación y menor firmeza del coágulo, comparado con

leches que contienen κ -caseína BB (HORNE *et al.*, 1996 y BRAUNSCHEWIG y PUHAN 1997).

La mayoría de los estudios han asociado ventajas en la producción de quesos, si está presente κ -caseína BB y también ha coincidido con un alto contenido de caseína y grasa en leche (HORNE y MUIR, 1994 y HORNE *et al.*, 1997).

2.3.5 a - lactoalbúmina. Es una proteína globular muy compacta y la de menor tamaño dentro de las proteínas lácteas, consta de 123 residuos de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos es similar a la de la lisozima, de hecho los residuos del 47 al 123 en la secuencia de la α - lactoalbúmina es idéntica a la de la lisozima y, además, presentan ambas cuatro grupos disulfuro en la molécula. Destaca desde el punto de vista biológico porque participa en la síntesis de la lactosa (SWAISGOOG, 1982 y GONZALEZ DE LLANO, 1990).

Esta proteína presenta dos variantes genéticas, A y B las cuales difieren en una sola sustitución, la posición 10 de la secuencia aminoacídica. Las dos variantes son específicas de la raza Zeta, encontrándose en las razas Europeas únicamente la variante B (GONZALEZ DE LLANO, 1990).

2.3.6 b - lactoglobulina. Es la principal proteína del suero de la leche. Al pH de la leche se encuentra como un dímero de 2 subunidades monoméricas no unidas covalentemente, que contienen 162 residuos de aminoácidos, lo que le da una forma dimérica globular. Posee cinco radicales de cisteína por mol, dos enlaces disulfuro y un grupo tiol. Debido a la fácil purificación de esta proteína se han realizado numerosos estudios físico-químicos y es la proteína láctea más conocida (SWAISGOOG, 1982 y WALSTRA, *et al.*, 1999).

De acuerdo a lo señalado por FOX y McSWEENEY (1998), la leche de cualquier vaca individual contiene β - lactoglobulina A o B o ambas variantes genéticas y la leche es indicada como AA o BB o AB.

Numerosas variantes genéticas de β - lactoglobulina han sido identificadas, pero las más comunes de éstas son las variantes A y B, las cuales tienen algún efecto importante en la composición y aptitud industrial de la leche. El resto de las variantes raramente han sido determinadas. Estas dos variantes difieren en la secuencia de aminoácidos en la posición 64 (Asp. en A \rightarrow Gly. En B) y 118 (Val en A \rightarrow Ala en B) (BRITTAN *et al.*, 1997 y LOWE *et al.*, 1995).

2.4 Importancia de las variantes genéticas de β - lactoglobulina en la composición de la leche.

Existe una relación entre las variantes genéticas de las proteínas de la leche y sus características de composición. La influencia más pronunciada ha sido atribuida a la β - lactoglobulina, mostrando que las leches que poseen β - lactoglobulina AA contienen entre un 10 a 20 % más de β - lactoglobulina que leches que tienen β - lactoglobulina BB. Se ha establecido que la composición de leches de vacas de diferentes genotipos de β - lactoglobulina son marcadamente diferentes. Por ejemplo se ha demostrado que leches recolectadas de vacas que contienen β - lactoglobulina AA tienen un mayor contenido de proteínas de suero, menor contenido de caseínas y de materia grasa que leches de vacas que contienen β - lactoglobulina BB, las cuales están asociadas con un mayor contenido de grasa, proteína, caseína y menor cantidad de proteínas del suero. Diferencias tales como éstas hacen que leches de vacas que contienen β - lactoglobulina BB sean más apropiadas para la fabricación de queso, debido al mayor rendimiento que esto produce (McLEAN *et al.*, 1984; SABOUR *et al.*, 1993; HILL 1993; O'HARA *et al.*, 1993; JACOB, 1994; MANDERSON *et al.*, 1997; LOWE *et al.*, 1995; AULDIST *et al.*, 1997; MAYER *et al.*, 1997 y MACKLE *et al.*, 1999).

Al utilizar solamente leches que contengan la variante B de β - lactoglobulina, aumentará la producción de queso en un 10%, es decir, se obtiene mayor rendimiento, además, se puede mejorar también características de calidad del queso, tales como el cuerpo (AULDIST *et al.*, 1997).

La variante A y B de β - lactoglobulina son predominantes en raza Holstein y Jersey (SABOUR *et al.*, 1993), mientras que la variante C se encuentra en baja frecuencia en ganado Jersey. Además que hay estudios que revelan que leches que contienen ésta variante tienen baja producción de leche, grasa y proteína comparado con las variantes A y B (WINKELMAN, 1997).

En el CUADRO 4 se señala la variación composicional de la leche de vaca relacionada con los genotipos de β - lactoglobulina.

CUADRO 4. Contenido de proteínas del suero, proteína total, grasa y sólidos totales y su relación con genotipos de b-lactoglobulina.

Componentes de la leche	AA (%)	BB (%)
Proteínas del suero	0,640	0,500
Caseínas	2,490	2,660
Proteína total	3,130	3,160
Grasa	4,120	4,620
Sólidos totales	12,46	13,23

FUENTE: HILL (1993).

2.4.1 Aptitud de la leche a la coagulación. Cuando el cuajo es añadido a la leche, las micelas de caseína comienzan a flocular, luego la tasa de floculación aumenta rápidamente y en un determinado momento los flóculos pueden ser detectados a simple vista; así el tiempo de coagulación puede ser medido como el tiempo necesario para que se forme el gel (WALSTRA *et al.*, 1999).

La aptitud de la leche a la coagulación es uno de los factores de importancia en la calidad del queso; lo cual, depende de la composición química de la leche y aspectos de procesamiento, pero también está influenciada por factores genéticos del ganado referido a las variantes genéticas de las proteínas de la leche (STORRY y FORD, 1982).

STORRY y FORD, (1982); STORRY *et al.*, (1982); GRANDINSON *et al.*, (1984) y WALSTRA, *et al.* (1999), señalan que la aptitud de la leche a la coagulación se ve favorecida a medida que aumenta la cantidad de caseína en la leche, esto es lineal tanto para la raza Jersey como también para la raza Holstein. Es decir, el tiempo que se demora en coagular cierta cantidad de litros de leche, disminuye a medida que aumenta el contenido de caseína. Además, de acuerdo a lo señalado por WALSTRA, *et al.*, (1999), es importante señalar, que aquellas leches que presenten una baja aptitud a la coagulación o mayores tiempos de coagulación presentan cuajadas blandas y una sinéresis defectuosa por desuerado incompleto, obteniendo como resultado un producto con propiedades reológicas defectuosas, y con un mayor grado de humedad.

La importancia de las variantes genéticas de β -lactoglobulina en la aptitud de la leche a la coagulación, como se señaló anteriormente es que leches de vacas individuales que presentan la variante B, presentan un mayor contenido de proteínas y caseínas que la variante A, por lo tanto, estas leches presentarían menores tiempos de coagulación (MARZIALI Y NG-KWAI-HANG, 1986a).

2.5 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

La separación de proteínas a pH constante es uno de los métodos mayormente utilizados para la separación e identificación de las proteínas de la leche, el cual se basa en la movilidad de los iones en un campo eléctrico. La migración independiente de las proteínas en una mezcla se debe a su carga y al tamaño de la molécula (ALAIS, 1985).

La electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida y con un medio disociante como la urea, permite excelentes separaciones, ya que otorga un efecto de tamizado molecular (ALAIS, 1985).

2.6 Electroforesis de isoenfoque de proteínas en geles de poliacrilamida

Esta técnica se realiza en un gradiente de pH, y ha sido usada exitosamente en la separación de mezclas de proteínas, en base a diferencias en la carga neta en un gradiente de pH estable, es un método analítico de alta resolución ya que tiene la capacidad de separar macromoléculas que difieren en puntos isoeléctricos por solamente 0.01 unidades de pH (LKB, 1979; PRESTIDGE y HEARN, 1979; GARFIN, 1990 y ANDREWS, 1992).

La electroforesis de isoenfoque es un método electroforético en el cual las moléculas anfotéricas son separadas al migrar a través de un gradiente de pH. Cuando una proteína es colocada en un medio donde varía el pH y además sujeta a un campo eléctrico, ésta inicialmente se moverá hacia el electrodo con la carga opuesta. Durante la migración a través del gradiente de pH, la proteína captará o perderá protones, así la carga neta y movilidad de la proteína disminuirá paulatinamente, hasta llegar al punto en que el gradiente de pH se iguale al punto isoeléctrico de la proteína, punto en el cual se detiene la migración de la proteína. Si la proteína se encuentra en su punto isoeléctrico deberá difundir hacia la región de bajo pH, ésta será protonada y luego será impulsada hacia el cátodo por el campo eléctrico. Si, de otra forma, ésta difunde a un pH más alto que su punto isoeléctrico, la proteína se cargará negativamente y será conducida hacia el ánodo. Así, en este espacio recorrido las proteínas se condensan, concentran o localizan en finas bandas en el gradiente de pH, debido a sus características e individuales valores de punto isoeléctrico (LKB, 1979; GARFIN, 1990).

ANDREWS (1992) y GARFIN (1990), describen la electroforesis de isoenfoque como un mecanismo estacionario con respecto al pH. Las proteínas se aproximan a sus respectivos valores de punto isoeléctrico, a diferentes velocidades, pero permaneciendo relativamente fijo en aquellos valores de pH por períodos prolongados. Este tipo de movimiento en contraste u oposición a la electroforesis convencional, en la cual las proteínas continúan su movimiento a través del medio, hasta que el campo eléctrico es retirado. Sin embargo, en la electroforesis de isoenfoque las proteínas migran a su posición estacionaria en todo el sistema. Este método es diferente a otras electroforesis, el punto de aplicación de las muestras es arbitrario, de hecho la muestra puede ser inicialmente distribuída en todas partes del sistema de separación.

Lo fundamental de la electroforesis de isoenfoque es el establecimiento de una gradiente de pH estable en un campo eléctricos. Esto se puede llevar a cabo, perfectamente con anfolitos transportadores comercialmente disponibles, dichos compuestos son mezclas de moléculas anfotéricas relativamente pequeñas, multicargadas con intervalos estrechos de valores de punto isoeléctricos y alta conductividad. Bajo la influencia de un campo eléctrico, los anfolitos transportadores se reparten en una gradiente suave de pH con un aumento constante del ánodo al cátodo. La pendiente del gradiente de pH está determinada por un intervalo de pH cubierto por la mezcla de anfolitos transportadores y la distancia entre los electrodos (GARFIN, 1990).

Los anfolitos son mezclas complejas de buffer anfotéricos sintéticos que forman una gradiente de pH lineal y estable aplicando campos eléctricos y con intervalos estrechos de valores de punto isoeléctricos y alta conductividad. En general, son mezclas de polímeros (entre 300-1000 Da de tamaño), de ácidos carboxílicos amino alifáticos (ácidos poliamino-policarboxílicos), algunas veces, unos contienen residuos de ácidos sulfónicos y ácidos fosfóricos. Estos se encuentran disponibles en el comercio en un rango de pH de 2,5 a 11 (PRESTIDGE y HEARN, 1979; LKB, 1979; GARFIN, 1990).

Teóricamente el estudio de electroforesis de isoenfoque muestra que una gradiente lineal de alrededor de 1.0 unidad de pH puede ser producida por la electrólisis de un único anfolito, tal como ácido glutámico, histidina o lisina (LKB, 1979).

Según lo descrito por GARFIN (1999), bajo la influencia de un campo eléctrico, los anfolitos transportadores se reparten en una gradiente suave de pH con un aumento constante del ánodo al cátodo. La pendiente del gradiente de pH está determinada por un intervalo de pH cubierto por la mezcla de anfolitos transportadores y la distancia entre los electrodos.

Los rangos de pH de anfolitos disponibles en el mercado se encuentran entre: 2,5-4,0; 3,5-5,0; 3,5-10,0; 4,0-6,0; 5,0-7,0; 5,0-8,0; 6,0-8,0; 7,0-9,0; 8,0-9,5 y 9,0-11,0 (LKB,1979). En la FIGURA 1 se presenta la fórmula general de un anfolito.

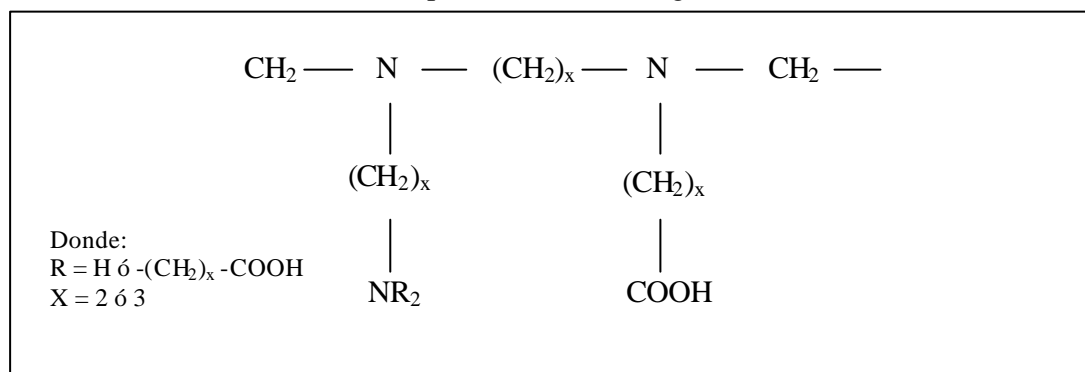


FIGURA 1. Fórmula general de un anfolito.

FUENTE: LKB-Produkter AB (1979).

Puesto que las proteínas también son anfolitos, ellas pueden influenciar el pH durante la separación. Los anfolitos, son las sustancias que crean la gradiente de pH, por lo tanto, deben tener suficiente capacidad buffer para contrarrestar a las proteínas. Algún tipo de influencia se debe a la concentración de proteínas y anfolito (LKB, 1979 y GARFIN, 1990). Las concentraciones de anfolito que deben ser utilizadas en electroforesis de isoenfoque son de alrededor de un 2%, ya que concentraciones menores a un 1% a menudo resultan en una gradiente de pH inestable y si se utilizan concentraciones sobre

el 3%, el anfolito se adhiere a los geles siendo muy difícil removerlos y por lo tanto serán teñidos junto con las bandas de proteínas, causando una interferencia en la identificación de las proteínas (GARFIN, 1990).

Los anfolitos deben también tener una buena y uniforme conductividad, especialmente en sus puntos isoelectricos, además de mantener un flujo de corriente a través del sistema (LKB, 1979).

Algunas propiedades que deben tener los anfolitos de acuerdo a LKB (1979), son:

- Alta capacidad buffer y solubilidad en su punto isoelectrico.
- Buena conductividad y uniforme en su punto isoelectrico.
- Baja absorbancia a los rayos UV.
- Libre de efectos biológicos.
- Fácil separación de la proteína analizada.

2.7 Electroforesis discontinua

Los sistemas discontinuos o multifásicos emplean distintas especies iónicas en el gel y en los reservorios para electrodos. El aparato básico es similar al del sistema continuo, con la única diferencia que la muestra es colocada sobre un gel de poro grande, gel de “stacking” o gel espaciador, el cual es hecho polimerizar sobre el gel de poro pequeño, o gel separador (ANDREWS, 1992).

En este sistema las proteínas son concentradas en zonas o bandas extremadamente estrechas, del orden de los μm durante su migración a través del gel de poro grande, antes de ser separadas durante electroforesis en el gel de poro pequeño (ANDREWS, 1992).

Este método de electroforesis igualmente debe ser realizado con muchas precauciones debido a los cambios que se realizan en la formación del gel, pero también se obtienen buenas resoluciones en la separación de proteínas (EIGEL *et al.*, 1984).

3. MATERIAL Y MÉTODO

3.1 MATERIAL

3.1.1 Muestras de leche. Las muestras de leche de raza Holstein Friesian fueron obtenidas en el fundo Vista Alegre de la Universidad Austral de Chile y las muestras de leche del rebaño Jersey en el fundo Filuco de la Sociedad Agrícola Candal, ubicada en la comuna de Río Bueno (Xª Región) en Enero y Febrero del 2001 respectivamente, el muestreo se realizó de acuerdo a la Norma Chilena 1011/1-(1998). Para ello se seleccionaron 10 vacas considerando el número de partos (2 a 4) y fueron caracterizadas en cuanto a raza, edad, época de lactancia y alimentación. Este muestreo se realizó 3 veces.

3.1.2 Estándares de b-lactoglobulina. Se utilizaron estándares de β -lactoglobulina A: L - 5137 y B: L - 7880, SIGMA para la identificación de proteínas en las muestras de leche.

3.1.3 Estándares de puntos isoeléctricos (pI). Se utilizaron estándares de SIGMA que se presentan en el CUADRO 5.

CUADRO 5. Estándares de puntos isoeléctricos para la curva de calibración.

ESTANDARES	PI
Inmunoglobulina	6,0
Seroalbúmina de bovino	4,8
β -lactoglobulina A de leche bovina	5,3
β -lactoglobulina B de leche bovina	5,4

3.1.4 Anfolito. Para la formación de la gradiente de pH en los métodos de isoenfoque se utilizó anfolito SIGMA con un rango de pH entre 3,5 –10.

3.1.5 Reactivos para los geles de los métodos de isoenfoque utilizados en éste estudio. Se probaron tres metodologías, dos de isoenfoque y una de electroforesis discontinua, las cuales difieren en los reactivos que se utilizan y en las condiciones de corrida.

En el CUADRO 6 se señalan las cantidades y concentraciones de los reactivos utilizados para los geles de las tres metodologías aplicadas para la identificación de variantes genéticas de β -lactoglobulina.

CUADRO 6. Características principales de los métodos aplicados.

Reactivos	Método 1 PEARCE, <i>et al.</i> , 1972	Método 2 TRIE-COUT y GRIPON, 1981	Método 3 LOWE <i>et al.</i> , 1995	
			Gel Separador	Gel Espaciador
Arilamida/ bisacrilamida	40% y 0.6 % en agua	5% y 0.15% en Urea 7M	37,5 : 1 en agua	37,5 : 1 en agua
TEMED	1,2ml (1,75%)	25 μ l	12 μ l	20 μ l
Anfolito	0.6ml	0,5ml	No lleva	No lleva
Persulfato de NH ₄	36mg en 3ml de agua.	11mg	119 μ l (10%)	148 μ l (10%)
Buffer gel	No lleva	No lleva	19,1ml (17,31gr de H ₃ BO ₃ , 900 ml de agua) ajustar pH a 8,5	17,2 ml (17,31 gr de H ₃ BO ₃ , 900 ml de agua) ajustar pH a 6,8.

Continuación de CUADRO 6

Reactivos	Método 1 PEARCE, et al., 1972	Método 2 TRIE-COUT y GRIPON, 1981	Método 3 LOWE et al., 1995
Buffer electrodos	NaOH 0,02 N (cátodo) y H ₂ SO ₄ 0,2 % (ánodo)	NaOH 0,02 N (cátodo) y H ₂ SO ₄ 0,2 % (ánodo)	37,1 gr H ₃ BO ₃ ; 4.8 gr de NaOH : 2000 ml de agua y a pH 8,5 para terminal positivo y negativo
Solución de tinción	Azul de coomasie R- 250, 0,115% p/v en solución de desteñido.	Azul de coomasie R- 250 al 0,2% p/v en H ₂ SO ₄ : KOH:TCA (50:50:5:12).	Azul de coomasie R-250 al 0,05% p/v en isopropanol :ácido acético: agua (25: 10: 65).
Solución de desteñido	Etanol: ác. acético: agua (25: 8: 67).	No se utiliza. Se tiñen sólo las bandas, no el gel completo.	Ácido acético (10%) Isopropanol (10%) (1: 1).
Solución fijadora	Ácido sulfosalicílico 3,46% y TCA 11,5% en agua.	Se fija con solución de tinción.	Se fija con solución de tinción
Solución de almacenamiento	Etanol (10%) con TCA (5%) (1:1)	Agua destilada	No especificado No se utilizó debido a resultados obtenidos.

3.2 METODO

3.2.1 Electroforesis de isoenfoque según PEARCE *et al.* (1972). En esta metodología se utiliza una gradiente de pH en los geles donde se aplica la muestra, esta gradiente se obtiene aplicando corriente en el medio donde se encuentran las muestras, para esto la corrida se realiza con un voltaje constante de 300 Volts por un período de 3 horas, la metodología se describe en el ANEXO 2.

3.2.2 Electroforesis de isoenfoque según TRIE-COUT y GRIPON (1981). Esta metodología se especifica en ANEXO 2.

3.2.3 Electroforesis discontinua. Se aplicó la metodología descrita por LOWE *et al.*, (1995), la cual se describe en el ANEXO 2.

3.2.4 Determinación de la aptitud de la leche¹ a la coagulación. A un volumen de 100 ml de leche sin la adición de CaCl_2 a 35°C, se le agrega solución de cuajo al 1% tomando el tiempo transcurrido desde que se comienza a agregar el cuajo hasta que cae la última gota (UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE y ALAIS, 1985).

3.2.5 Determinación del contenido de Materia Grasa. Método de Gerber. Norma Chilena 1016/1. 1979.

3.2.6 Determinación del contenido de proteínas y caseínas en la leche mediante el método de amido negro (Pro – Milk). Esta determinación fue realizada de acuerdo al método desarrollado por Mc Gann *et al.* Citados por PINTO y HOUBRAKEN (1976).

3.2.7 Determinación del contenido de nitrógeno en leche por el método del bloque de digestión Micro Kjeldahl, FIL-IDF International IDF Standard 20 B: 1993, para la calibración del equipo Pro Milk.

3.2.8 Análisis estadístico. Se aplicó análisis de varianza (ANDEVA) y Test de Tukey a través del programa STATGRAPHICS PLUS 2.0 para determinar las variaciones en proteína, caseína, materia grasa y aptitud a la coagulación en las muestras de leche.

¹UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE, Facultad de Ciencias Agrarias. Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Guía práctica. Determinación del poder coagulante del cuajo (fuerza del cuajo) 2p.

4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Contenido de proteínas, caseínas y materia grasa y aptitud de la leche a la coagulación en las razas Holstein-Friesian y Jersey

A continuación se presentan los resultados obtenidos en los análisis de proteína, caseína, materia grasa y aptitud a la coagulación en las muestras de leche de vacas de las razas en estudio Holstein-Friesian y Jersey. Duplicados con tres repeticiones.

4.1.1 Proteínas y caseínas. En el CUADRO 7 se presentan los valores promedios y desviación estándar del contenido de proteínas y caseínas en las vacas de ambas razas y en el ANEXO 3 y 4 se presentan los resultados de cada muestra de leche analizada.

Se observa que los promedios de proteínas más altos corresponden a la raza Jersey al igual que para los contenidos de caseínas. El análisis de varianza para ambas razas, determinó diferencias en el contenido de proteínas y caseínas en la leche. El valor promedio para el contenido de proteínas para las vacas de raza Jersey es de $4,43 \pm 0,29$ siendo mayor que el promedio obtenido para las vacas de raza Holstein-Friesian el cual es $3,40 \pm 0,35$ (ANEXO 5) y el valor promedio para el contenido de caseínas para las vacas Jersey es de $3,72 \pm 0,33$ y para la raza Holstein-Friesian $2,78 \pm 0,29$. Los resultados obtenidos concuerdan con lo presentados por De PETERS y FERGUSON (1992) y BUTENDIECK (1998), que señalan que leches de vacas de raza Jersey presentan contenidos de proteínas mucho mayor que leches de vacas de raza Holstein y que el resto de las vacas lecheras y en cuanto a los promedios de caseínas se encuentran dentro de los rangos señalados por De Peters y Cant, citados por LATRILLE (1999), los cuales

indican un porcentaje de caseína promedio para la raza Holstein de $2,53 \pm 0,4$ y para la raza Jersey un porcentaje de $3,39 \pm 0,4$.

CUADRO 7 Promedios y desviación estándar del contenido de proteínas y caseínas de las muestras de leche en estudio.

Vaca	Caseínas	Proteínas
*HF Karen	$2,84 \pm 0,08$	$3,58 \pm 0,08$
*HF Odina	$3,29 \pm 0,11$	$3,98 \pm 0,15$
*HF Steamí	$2,66 \pm 0,02$	$3,24 \pm 0,01$
*HF 135	$2,65 \pm 0,06$	$3,20 \pm 0,04$
*HF 177	$2,47 \pm 0,07$	$3,21 \pm 0,08$
Jersey 3963	$3,82 \pm 0,04$	$4,56 \pm 0,04$
Jersey 3971	$4,03 \pm 0,20$	$4,68 \pm 0,15$
Jersey 4027	$4,03 \pm 0,25$	$4,68 \pm 0,20$
Jersey 4051	$3,40 \pm 0,15$	$4,17 \pm 0,17$
Jersey 4052	$3,36 \pm 0,05$	$4,08 \pm 0,04$

* HF: Holstein-Friesian

4.1.1.1 Contenido de proteínas y caseínas en raza Holstein-Friesian. Se puede observar en el CUADRO 7, que en las vacas de raza Holstein-Friesian el contenido de proteínas presenta variaciones entre vacas, ya que los valores presentan un rango entre 3,20% y 3,98%. De PETERS y FERGUSON (1992), señalan que en vacas individuales de una misma raza lechera de un mismo rebaño, se pueden encontrar diferencias con respecto al contenido de proteínas. Esto ocurre de igual forma para el contenido de caseínas, los cuales presentan un rango entre 2,47% y 3,29%. ALAIS (1985), señala que en vacas de una misma raza y sometidas a iguales condiciones de manejo, pueden existir diferencias notables en lo que respecta a la composición general de la leche.

El análisis de varianza determinó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), entre las vacas Holstein-Friesian con respecto al contenido de proteínas y caseínas de las muestras de leche analizadas (ANEXO 6). El test de Tukey, determinó que las vacas Karen y Odina, difieren de las demás vacas las cuales se relacionan en un grupo, observándose que la leche de las vacas que presentan mayor contenido de proteínas y caseínas también presentan una alimentación más completa, con adición de mayor cantidad de concentrado (ANEXO 1), por lo cual, el aporte de energía será mayor incidiendo probablemente sobre el contenido de proteínas, considerando lo señalado por CASADO y GARCÍA (1985), AALTONEN y ANTILA (1987), y De PETERS y CANT (1992), que indican que al proporcionar una alimentación basada en concentrado de cereales y de praderas, es decir, más rica en energía, existiría un aumento en la concentración de proteínas y caseínas en la leche, ya que se estaría proporcionando un gran aporte energético y de materias nitrogenadas, en comparación a la alimentación basada solamente en praderas.

Existe una excepción con la vaca Steami, la cual corresponde al grupo de vacas Steami, 135 y 177 que se relacionan entre sí, ya que ésta tiene la misma edad y alimentación y además tiene menor número de partos que la vaca Karen (ANEXO 1), y sin embargo, presentó un menor contenido de proteínas y caseínas, lo cual se puede atribuir a que esta vaca presentó la variante A de β -lactoglobulina y las vacas Karen y Odina presentaron las variante B de β -lactoglobulina. McLEAN *et al.* (1984); SABOUR *et al.* (1993); HILL (1993); O'HARA *et al.* (1993); JACOB (1994); MANDERSON *et al.* (1997); LOWE *et al.* (1995); AULDIST *et al.* (1997); MAYER *et al.* (1997) y MACKLE *et al.* (1999), señalan que leches de vacas individuales que presentan la variante A de β -lactoglobulina, tienen menores contenidos de proteínas y caseínas que leches que contiene la variante B.

4.1.1.2 Contenido de proteínas y caseínas en raza Jersey. En el CUADRO 7 se observa que el contenido de proteínas y caseínas presenta variaciones entre las vacas, ya

que los valores presentan un rango entre 4,08% y 4,68% y 3,36% y 4,03% respectivamente, lo cual ha sido señalado por De PETERS y FERGUSON (1992).

El análisis de varianza determinó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), con respecto al contenido de proteínas y caseínas entre las vacas de raza Jersey en estudio (ANEXO 7). El test de Tukey, determinó que las vacas 4051 y 4052 difieren de las demás vacas, esta diferencia puede ser atribuible a la presencia de diferentes variantes genéticas en las leches de estas vacas, ya que todas las vacas presentan las mismas características de alimentación, mes de lactancia y número de partos y manejo (ANEXO 1) y, sin embargo, presentaron contenidos de proteínas y caseínas menor y estadísticamente significativos, lo cual se puede atribuir a que éstas presentan la variante genética A de β -lactoglobulina y las vacas 3963, 3971 y 4027 presentan la variante genética B de β -lactoglobulina, (McLEAN *et al.* (1984); SABOUR *et al.* (1993); HILL (1993); O'HARA *et al.* (1993); JACOB (1994); MANDERSON *et al.* (1997); LOWE *et al.* (1995); AULDIST *et al.* (1997); MAYER (1997) y MACKLE *et al.* (1999)).

4.1.2 Materia grasa. En el CUADRO 8 se presentan los valores promedios y la desviación estándar obtenidos para el contenido de materia grasa en las vacas de ambas razas en estudio.

En dicho CUADRO se puede observar, que los promedios de materia grasa más altos siempre corresponden a las vacas de raza Jersey, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre las dos razas en estudio (ANEXO 5).

El valor promedio encontrado de materia grasa en este estudio para la raza Jersey es de $5,42 \pm 0,53$, siendo mayor que el encontrado para la raza Holstein-Friesian, el cual es de $4,04 \pm 0,61$. Estos promedios concuerdan con lo señalado por De PETERS y FERGUSON (1992), citados por LATRILLE (1999), los cuales indican un porcentaje

de materia grasa promedio para la raza Holstein de $3,73 \pm 0,32$ y para la raza Jersey un porcentaje promedio de $5,42 \pm 0,53$.

4.1.2.1 Contenido de materia grasa en raza Holstein-Friesian. En el CUADRO 8 se pueden observar los valores promedios obtenidos para el contenido de materia grasa, en la leche de las vacas Holstein-Friesian, éstas presentan variaciones ya que los valores obtenidos presentan un rango ente 3,42% y 4,83%, con un promedio general de $4,04 \pm 0,12$. Los autores De PETERS y FERGUSON (1992), señalan que en vacas individuales de una misma raza lechera de un mismo rebaño, se pueden encontrar variaciones considerables con respecto al contenido de materia grasa.

CUADRO 8 Promedios y desviación estándar del contenido de materia grasa de ambas razas en estudio.

VACA	PROMEDIO Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR
*HF Karen	$4,67 \pm 0,11$
*HF Odina	$4,83 \pm 0,16$
*HF Steami	$3,67 \pm 0,06$
*HF 135	$3,42 \pm 0,14$
*HF 177	$3,59 \pm 0,11$
Jersey 3963	$5,88 \pm 0,14$
Jersey 3971	$5,70 \pm 0,05$
Jersey 4027	$5,92 \pm 0,07$
Jersey 4051	$4,84 \pm 0,12$
Jersey 4052	$4,75 \pm 0,10$

*HF: Holstein-Friesian

El análisis de varianza determinó diferencias estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en el contenido de materia grasa entre las vacas de raza Holstein-Friesian (ANEXO 6). El

test de Tukey, indicó que las vacas Karen y Odina difieren estadísticamente de las otras tres vacas y paralelamente a la situación del contenido de proteínas se podría asociar esta diferencia a la alimentación, ya que las vacas Karen y Odina presentan una alimentación más completa, con adición de más concentrado (ANEXO 1), lo cual, influiría en el aumento del contenido de materia grasa en la leche (CASADO y GARCÍA, 1985), y también habría que considerar las diferencias en las variantes genéticas presentes en cada una de las muestras de leches ya que las muestras de leches que presentan la variante B de β -lactoglobulina, tienen mayores contenidos de materia grasa.

4.1.2.2 Contenido de materia grasa en raza Jersey. Al igual que en la leche de vacas Holstein-Friesian, la leche de vacas Jersey presenta variaciones entre vacas. Los valores presentan un rango entre 4,75% y 5,92%, encontrándose estos valores dentro de los rangos señalados por los autores De Peters y Cant (1991), citados por LATRILLE, (1993), con un promedio general de $5,42 \pm 0,01$. Además, el análisis de varianza indicó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), entre las vacas Jersey con respecto al contenido de materia grasa (ANEXO 7). El test de Tukey, determinó que las vacas 4051 y 4052 difieren de las demás vacas, esta diferencia puede ser atribuible a las variantes genéticas que presenta cada vaca tal como en el caso del contenido de proteínas y caseínas, ya que las vacas 4051 y 4052 presentan iguales características de alimentación y manejo que el otro grupo de vacas que se relacionan entre sí (ANEXO 1). Sin embargo, presentaron un contenido de materia grasa menor y estadísticamente significativos, lo que se puede atribuir a que las vacas 4051 y 4052 presentan la variante genética A de β -lactoglobulina y las vacas 3963, 3971 y 4027 presentan la variante genética B de β -lactoglobulina. Estudios realizados por los autores McLEAN *et al.* (1984); SABOUR *et al.* (1993); HILL (1993); O'HARA *et al.* (1993); JACOB (1994); MANDERSON *et al.* (1997); LOWE *et al.* (1995); AULDIST *et al.* (1997); MAYER *et al.* (1997) y MACKLE *et al.* (1999), han demostrado que leches recolectadas de vacas que contienen β - lactoglobulina AA tienen un menor contenido de materia grasa, que

vacas que contienen β - lactoglobulina BB, las cuales están asociadas a con un alto contenido de materia grasa.

4.1.3 Aptitud de la leche a la coagulación. En el CUADRO 9 se presentan los valores de la aptitud de la leche a la coagulación en las vacas de ambas razas.

En el CUADRO 9 se observa que los promedios más altos del valor de aptitud de la leche a la coagulación, siempre corresponden a las vacas de raza Jersey, lo cual se debería a que éstas leches presentan los contenidos más altos de caseínas. Del análisis de varianza se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las razas Holstein-Friesian y Jersey con respecto a la aptitud de la leche a la coagulación (ANEXO 5).

El valor promedio de aptitud de la leche a la coagulación encontrado para la raza Jersey es $1: 38.809$ (g/ml de leche) ± 4.544 , siendo mayor que el encontrado para la raza Holstein-Friesian el cual es $1:27.790$ (g/ml de leche) ± 2.048 (ANEXO 5). STORRY y FORD (1982), STORRY *et al.* (1982), GRANDINSON *et al.* (1984), MACHEBOEUF *et al.* (1993) y WALSTRA *et al.* (1999), observaron que la aptitud de coagulación de la leche se ve favorecida, es decir, coagulan más rápido a medida que aumenta la cantidad de caseína en la leche, siendo esto lineal tanto para raza Holstein como también para la Jersey. En el presente estudio, señalado anteriormente, para la raza Jersey se obtuvo un valor promedio mayor (3,73%) en el contenido de caseínas en comparación a la raza Holstein-Friesian (2,78%).

4.1.3.1 Aptitud de la leche a la coagulación en raza Holstein-Friesian. Los valores promedios de la aptitud de la leche a la coagulación para las vacas de raza Holstein-Friesian presentan diferencias entre vacas, los promedios varían entre $1:26.116$ a $1:30.878$ (g/ml de leche). El análisis de varianza determinó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), entre vacas (ANEXO 6). El test de Tukey, determinó que las vacas Karen y Odina, difieren entre sí y de las demás vacas.

CUADRO 9 Promedios y desviación estándar de la aptitud de la leche a la coagulación.

VACA	PROMEDIO Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR
*HF Karen	1 : 29.427 ± 196
*HF Odina	1 : 30.878 ± 338
*HF Steami	1 : 26.240 ± 148
*HF 135	1 : 26.116 ± 94,0
*HF 177	1 : 29.427 ± 69,0
Jersey 3963	1 : 40.318 ± 1.089
Jersey 3971	1 : 43.062 ± 1.091
Jersey 4027	1 : 43.174 ± 1.692
Jersey 4051	1 : 34.817 ± 1.409
Jersey 4052	1 : 32.673 ± 410,0

*HF: Holstein-Friesian

Esta diferencia se puede atribuir a que las vacas Karen y Odina presentan mayores contenidos de caseínas que las otras vacas.

4.1.3.2 Aptitud de la leche a la coagulación en raza Jersey. Se observa en el CUADRO 9 diferencias en los promedios de aptitud de coagulación de la leche, los promedios varían entre 1:32.673 a 1:43.174 (g de cuajo/ml de leche). El análisis de varianza determinó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), entre vacas (ANEXO 7). El test de Tukey, determinó que las vacas 4051 y 4052 difieren de las otras, lo cual se puede atribuir a que las vacas 4051 y 4052 presentaron menor contenido de caseína que las demás vacas.

4.2 Determinación de las variantes genéticas de b-lactoglobulina por electroforesis

En la FIGURA 2 se muestra la curva de calibración hecha para la determinación de las variantes genéticas de β -lg según el PI, esta curva de calibración se elaboró midiendo la migración de los estándares utilizados en las corridas electroforéticas y como sus puntos isoeléctricos son conocidos se graficó en papel logarítmico, punto isoeléctrico (PI) versus migración de los estándares desde el polo positivo.

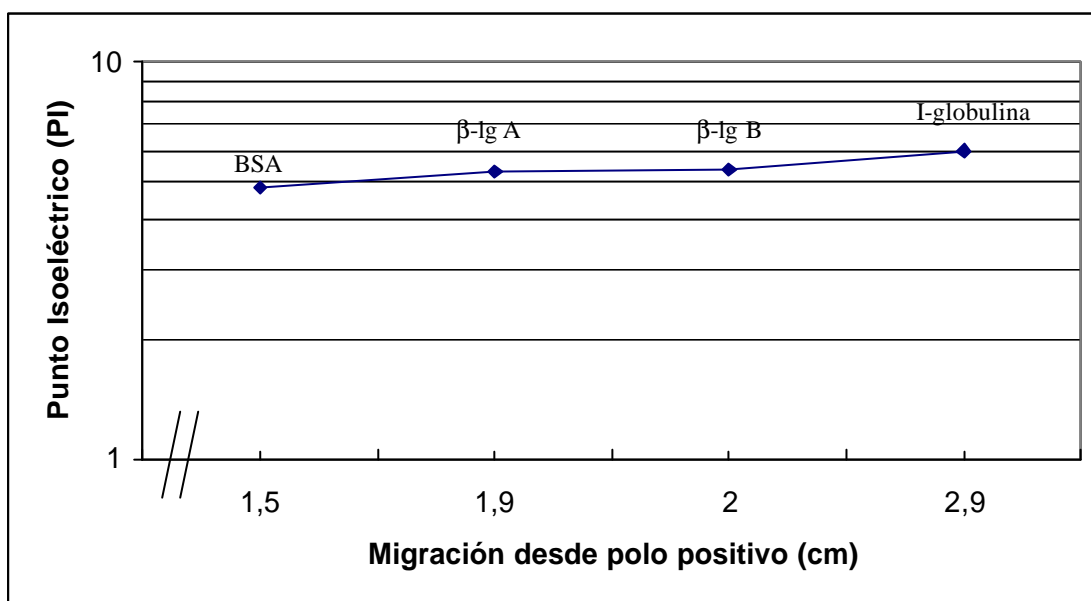


FIGURA 2. Curva de calibración para la identificación de las variantes genéticas.

4.2.1 Electroforesis de isoenfoque según PEARCE *et al.* (1972). Método 1. Con la aplicación de este método se obtuvieron bandas muy difusas y poco nítidas y además siempre en un mismo muestreo sólo en algunos tubos se obtuvieron bandas de proteínas (ANEXO 8), los tubos que no presentaron bandas de proteínas no fueron incorporados en la fotografía por no presentar proteínas.

4.2.2 Electroforesis de isoenfoque según TRIE – COUT y GRIPON (1981). Método 2. A diferencia del método descrito por PEARCE *et al.* (1972), se aplicó una precorrida

y esta técnica fue descrita para muestras de leche. En la FIGURA 3, se presentan los resultados obtenidos con la utilización de ésta técnica de electroforesis de isoenfoque.

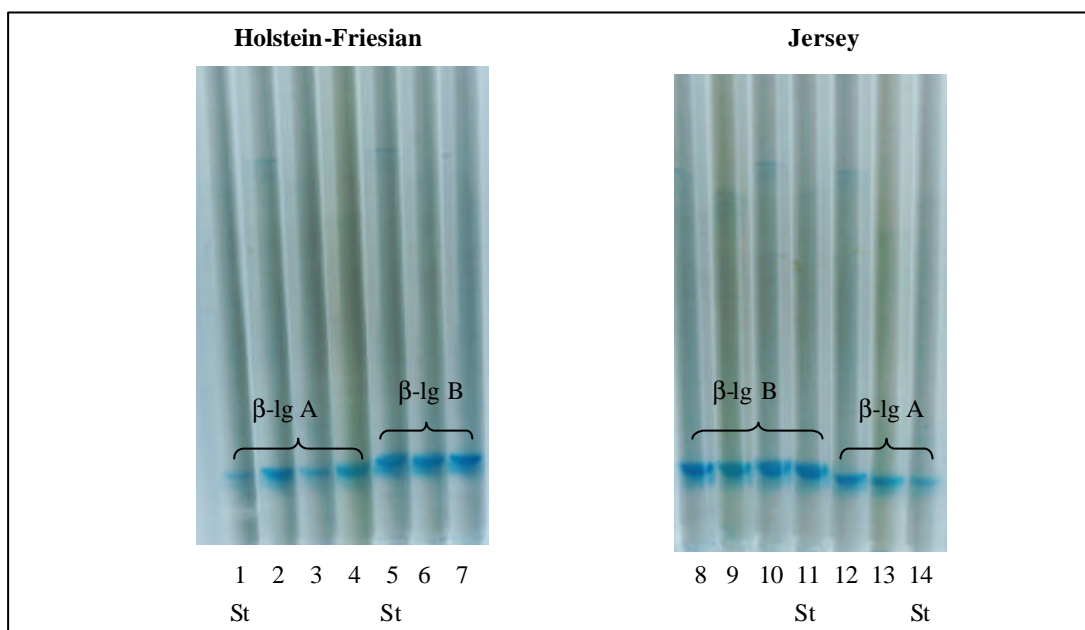


FIGURA 3. Electroforesis de isoenfoque aplicada a vacas de raza Holstein-Friesian y Jersey en un rango de pH de 3,5-10.

En la FIGURA 3 se observan las siguientes muestras, N°1 y N°14 corresponden a estándares de β lg A; N°5 y N°11 corresponden a estándares de β lg B; N°2 vaca Steami (H-F), N°3 vaca 135 (H-F), N°4 vaca 177 (H-F), N°12 vaca 4051 (Jersey) y N°13 vaca 4052 (Jersey) que presentan β lg A y N°6 vaca Karen (H-F), N°7 vaca Odina (H-F), N°8 vaca 3963 (Jersey), N°9 vaca 3971 (Jersey) y N°10 vaca 4027 (Jersey) que presentan β lg B.

4.2.3 Electroforesis discontinua según LOWE *et al.* (1995). Método 3. Al aplicar esta metodología no se obtuvieron resultados, puesto que no se obtuvieron bandas. Se repitió el método en 4 oportunidades, realizándose cambios de cantidad de muestra y también

cambios de voltajes y tiempos de corrida, sin la obtención de bandas de proteínas en los geles.

4.3 Puntos isoeléctricos (PI) y variantes genéticas encontradas en las muestras de leche analizadas en este estudio

BARANYI *et al.* (1997), encontraron los siguientes valores de PI al aplicar electroforesis de isoenfoque a sus muestras de leche, un valor de 5.263 para la variante A de β - lactoglobulina y 5,407 para la variante B y BARANYI *et al.* (1993), encontraron los siguientes valores de PI, 5,3 para la variante A y 5,5 para la variante B de β - lactoglobulina, también aplicando electroforesis de isoenfoque, ambos métodos son diferentes en concentraciones de reactivos y voltajes aplicados en la corrida, a esto se puede deber las diferencias de PI. En este estudio los PI encontrados están dentro de éstos rangos (ANEXO 9), tomando en cuenta que las condiciones de corrida y concentraciones de reactivos usados son también diferentes a los métodos utilizados por los autores antes mencionados.

4.4 Relación entre las propiedades analizadas en la leche con las variantes genéticas de b-lactoglobulina

En las muestras de leche se determinaron las variantes genéticas A y B de β -lactoglobulina aplicando la técnica de electroforesis de isoenfoque, donde se puede observar que existe una relación entre las variantes genéticas presentes en las muestras de cada raza y las características de composición (proteína, caseína y materia grasa) y aptitud de la leche a la coagulación, como se observa en el CUADRO 10.

En el CUADRO 10 se presenta los resultados de proteína, caseína, materia grasa y aptitud de coagulación, relacionados con las variantes genéticas de β -lactoglobulina, en

las muestras las leche de vacas Holstein-Friesian y Jersey, según el método de electroforesis de isoenfoque.

Se observa que en relación a la composición de las leches de vacas de ambas razas, el contenido de proteínas, caseínas y materia grasa de las leches, siempre es más alto en aquellas que presentan la variante genética B de β -lactoglobulina, y los contenidos más bajos corresponden a vacas que presentan la variante A de β -lactoglobulina, estos resultados concordarían con los autores McLEAN *et al.* (1984); SABOUR *et al.* (1993); HILL (1993); O'HARA *et al.* (1993); JACOB (1994); MANDERSON *et al.* (1997); LOWE *et al.* (1995); AULDIST *et al.* (1997); MAYER *et al.* (1997) y MACKLE *et al.* (1999), como se mencionó anteriormente.

CUADRO 10 Contenido promedio de proteínas, caseína, materia grasa y aptitud a la coagulación, de leche que presenta variantes genéticas A y B de β -lactoglobulina.

Raza	Vaca	Variante genética	Proteína (%)	Caseína (%)	Materia Grasa (%)	Aptitud de Coagulación (gr de cuajo/ml de leche)
HF	Karen	B	3,58 ± 0,08	2,84 ± 0,08	4,67 ± 0,11	1: 29.497± 196
HF	Odina	B	3,98 ± 0,15	3,29 ± 0,11	4,83 ± 0,16	1: 30.878± 338
HF	Steami	A	3,24 ± 0,01	2,66 ± 0,02	3,67 ± 0,06	1: 26.240± 148
HF	135	A	3,20 ± 0,04	2,65 ± 0,06	3,42 ± 0,14	1: 26.116± 94
HF	177	A	3,21 ± 0,08	2,47 ± 0,07	3,59 ± 0,11	1: 26.220± 69
Jersey	3963	B	4,56 ± 0,04	3,82 ± 0,04	5,88 ± 0,14	1: 42.318± 1089
Jersey	3071	B	4,68 ± 0,15	4,03 ± 0,02	5,70 ± 0,05	1: 43.062± 1091
Jersey	4027	B	4,68 ± 0,20	4,03 ± 0,25	5,92 ± 0,07	1: 43.175± 1692
Jersey	4051	A	4,17 ± 0,17	3,40 ± 0,15	4,88 ± 0,12	1: 34.817± 1409
Jersey	4052	A	4,08 ± 0,04	3,36 ± 0,05	4,75 ± 0,10	1: 32.673± 410,0

En la aptitud de la leche a la coagulación, se observa que los valores más altos corresponden a vacas que presentan la variante B de β -lactoglobulina y los valores más bajos los presentan las vacas que contienen la variante A de β - lactoglobulina, estos resultados concordarían con los encontrados por MARZIALI Y NG-KWAI-HANG (1986a).

5. CONCLUSIONES

- La electroforesis de isoenfoque según la metodología descrita por TRIE-COUT y GRIPON (1981), separó satisfactoriamente las variantes genéticas A y B de la β -lactoglobulina.
- La metodología de isoenfoque descrita por PEARCE *et al.* (1972) presentó resultados, sin embargo, no se pudo identificar claramente las variantes genéticas A y B de la β -lactoglobulina. En relación al método descrito por LOWE *et al.* (1995), no se obtuvieron resultados.
- Se determinaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de proteína, caseína, materia grasa y aptitud de la leche a la coagulación entre las vacas de raza Holstein-Friesian y Jersey.
- Se observó una tendencia entre una determinada variante genética en las muestras. Así, la leche con la variante B de β -lactoglobulina presenta mejores propiedades de coagulación, por la composición proteica que tiene mayor contenido de caseína y también presenta mayor contenido de materia grasa.

6. RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo identificar las variantes genéticas A y B de β -lactoglobulina en leche de vacas Holstein-Friesian y Jersey, mediante técnicas electroforéticas, para lo cual se muestrearon 5 vacas de cada raza. Las variantes A y B de β -lactoglobulina se determinaron por electroforesis de isoenfoque. A las muestras de leche se les determinó el contenido total de proteínas, caseínas, materia grasa y aptitud de la leche a la coagulación.

Se determinaron diferencias entre las variantes genéticas y las propiedades de composición y aptitud de la leche a la coagulación, presentando un mayor contenido de proteínas, caseínas, materia grasa y mejor aptitud a la coagulación las muestras de leche que presentaron la variante B de β -lactoglobulina, tanto para las vacas Holstein-Friesian y Jersey.

Las leches que presentaron la variante A de β -lactoglobulina presentaron menores contenidos de los parámetros determinados que las leches que presentaron la variante B de β -lactoglobulina, esto ocurrió en igual forma para leches en ambas razas en estudio.

SUMMARY

This work had objective identify genetic variants A and B of β -lactoglobulin in milk cows Holstein-Friesian and Jersey. Identify was found through electrophoretic techniques trough samples five cows the two breeds. Variants A and B of β -lactoglobulin were found for isoelectric focusing.

For milk samples was total content proteins, caseins, fat and milk coagulation aptitude. Differences were found on genetics variants and composition properties and milk coagulation aptitude. This results show that samples with variants B of β -lactoglobulin for Holstein-Friesian and Jersey cows presented a high total contents proteins, caseins, fat and milk coagulation aptitude.

Samples with variants A of β -lactoglobulin presented low contents in all variables estimated for all breeds studies.

7. BIBLIOGRAFÍA

- AALNTONEN, M. y ANTILLA, V. 1987. Milk renneting properties and the genetic variants of proteins. *Milchwissenschaft* 42 (8):490-492.
- ADDEO, F., CHIANESE, L., DI LUCCIA, A., PETRILLI, P., MAURIELLO, R. y ANELLI, G. 1983. Identification of bovine casein variants by gel isoelectric focusing. *Milchwissenschaft*. 38 (10): 586-588.
- ALAIS, CH. 1985. Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera. 2ª Edición. Reverté. Barcelona, 872p.
- ANDREWS, A. 1992. Electrophoresis, theory, techniques and biochemical and clinical applications. 2ª Edición. Clarendon Press. 452p.
- AULDIST, M., MACKLE, T., HILL, J y PROSSER, C. 1997. Effects of plane of nutrition on the composition of milk from cows of different β - lg phenotype. En: Milk protein polymorphism. International Dairy Federation: Proceedings of the IDF Seminar held in Palmerston North. New Zealand: pp. 87-92.
- BARANYI, M., BÓSZÉ, Z., BUCHBERGER, J. y KRAUSE, I. 1997. Genetic polymorphism of milk proteins in Hungarian cattle breeds and PCR amplification of β -Lactoglobulin exon 5 to identify genetic variant J, B y RFLP. En: Milk protein polymorphism. International Dairy Federation: Proceedings of the IDF Seminar held in Palmerston North. New Zealand: pp. 87-92.

- BARANYI, M., BÓSZÉ, Z., BUCHBERGER, J. y KRAUSE, I. 1993. Genetic polymorphism of milk proteins in Hungarian spotted and Hungarian Grey cattle: a possible new genetic variant of β -Lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*. 76:630-636.
- BRAUNSCHWEIG, M. Y PUHAN, H. 1997. Relation between κ -caseína A and B variants versus citrate content of milk quantified by capillar and electrophoresis. En: *Milk protein polymorphism. International Dairy Federation: Proceedings of the IDF Seminar held in Palmerston North. New Zealand* pp. 71-76.
- BRAVO, M. 1998. Efecto de diferentes grados de cruzamiento con el genotipo Holstein Friesian sobre la producción y curva de lactancia en la lechería Punahue. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 120 p.
- BRITTAN, H., MUDFORD, J., NORRIS, G., KITSON, T. y HILL, J. 1997. Labelling the free sulfhydryl group in β -Lactoglobulin A, B y C. En: *Milk protein polymorphism. International Dairy Federation: Proceedings of the IDF Seminar held in Palmerston North. New Zealand*: pp. 200-203.
- BUTENDIECK, N. 1998. Algunas de las razas lecheras más importantes que podrían ser utilizadas en Chile. In: Seminario taller "Tipo de animal para producción de leche bovina en el sur de Chile". Osorno. Diciembre 1998. pp. 11-32.
- CASADO, P. y GARCÍA, J. 1985. La calidad de la leche. La composición de la leche y los factores que la influncian. *Industrias Lácteas Españolas*, 81: 1- 300
- CASANOVA, M. 2001. Identificación de las variantes genéticas de κ -caseína en leche de vacas Holstein-Friesian y Jersey por electroforesis de isoenfoque. Tesis Lic.

Ing. Alimentos. Facultad de Agronomía, Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 102p.

CHILE INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACION. 1979. Determinación del contenido de materia grasa. Método de Gerber. Norma Chilena. 1016/1-1979 4p.

CHILE INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACION. 1998. Leche y productos lácteos. Muestreo Parte I. Leche cruda. Norma Chilena. 1011/1-1998.

De PETERS, E y CANT, P. 1992 Nutricional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk; a review. *Journal of Dairy Science*, 75 (8): 2043-2070.

De PETERS, E. y FERGUSON, J. 1992. Nonprotein nitrogen and protein distribution in the milk of cows. *Journal of Dairy Science*. 75:3192-3209.

EIGEL, W., BUTLER, J., ERNSTROM, C., FARRELL, H., HARWALKAR, V., JENNESS, R. y WHITNEY, R. 1984. Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth revision. *Journal of Dairy Science*. 67 (8): 1599-1623.

FOX, P. y McSWEENEY, P. 1998. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. University College. Cork, Ireland. pp 145-238.

GARFIN, D. 1990. Isoelectric Focusing. In: *Methods in enzymology*. Guide to protein purification pp. 459-477.

GIBSON, J. 1997. Milk composition centre for genetic improvement of Livestock. *Animal and poultry Science*. University of Guelph. 2 p.<
<http://www.aps.uoguelph.ca/cgill/pub/articles/milkcomp.html>> accessed 07 de Enero de 2001.

- GONZALEZ DE LLANO, D. 1990. Polimorfismo genético de las proteínas de la leche de vaca. Alimentación, Equipos y Tecnología. Julio – Agosto: 77 – 81.
- GRANDINSON, A.; FORD, G.; OWEN, A. y MILLARD D. 1984. Chemical composition and coagulating properties of renneted Friesian milk during the transition from winter rations to spring grazing. Journal of Dairy Research. 51: 69-78.
- HILL, J. 1993. The relationship between β -Lactoglobulin phenotypes and milk composition in New Zealand dairy cattle. Journal of Dairy Science 76:281-286.
- HORNE, D.; BANKS, J. y MUIR D. 1997. Genetic polymorphism of bovine κ - casein: Effects on renneting and cheese yield. In: Milk protein polymorphism International Dairy Federation: Proceedings of the IDF Seminar held in Palmerston North. New Zealand: pp. 223-228.
- HORNE, D.; BANKS, J. y MUIR D. 1996. Genetic polymorphism of milk proteins: Understanding the technological effects. Research Reviews 70-78.
- HORNE, D. y MUIR, D. 1994. Genetic polimorphism of casein and rennet coagulation time. Effects of serum phase components. Milchwissenschaft 49 (8):386-388.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. 1993. Milk. Determination of nitrogen content. FIL/IDF 20 B: International Dairy Federation., Brussels, Belgium 12p.
- JACOB, E. 1994. Genetic polymorphism of milk proteins. Bulletin of the IDF 298: pp. 17-27.
- LATRILLE, L. 1999. Calidad de la leche y sistemas de pago. In: Anrique, R.; Latrille, L.; Balocchi, O.; Alomar, D.; Moreira, V.; Smith, R.; Pinochet, D.; Vargas, G.

Competitividad de la producción lechera nacional. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. (2):259 – 316.

LATRILLE, L. 1993. El valor nutritivo de la leche bovina y factores que alteran su composición. En: Producción Animal 1993. L Latrille (ed). Valdivia, Chile. Pp. 27 – 56.

LKB-PRODUKTER. 1979. Isoelectroenfoque. Bromma, Sweden 10p.

LOWE, R.; ANEMA, S.; PATERSON, G. y HILL, J. 1995. Simultaneous separation of the β -Lactoglobulin A, B and C variants using polyacrylamide gel electrophoresis. *Milchwissenschaft* 50 (12): 663-666.

LOWRY, O., ROSEBROUGH, N., FARR, A. y RANDALL, R. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.

MACKLE, T.; BRYANT, A.; PETCH, S.; HILL, J. y AULDIST, M. 1999. Nutritional influences on the composition of milk from cows of different protein phenotypes in New Zealand. *Journal of Dairy Science* 82:172-180.

MACHEBOEUF, D.; COULON, J. y D'HOOR, P. 1993. Effect of breed, protein genetic variants and feeding on cows' milk coagulation properties. *Journal of Dairy Research* 60: 43 –54.

MANDERSON, G.; CREAMER, L. y HARDMAN, M. 1997. Electrophoretic examination of the heat – induced changes in β -Lactoglobulin A, B y C. En: Milk protein polymorphism. International Dairy Federation: Proceedings of the IDF Seminar held in Palmerston North. New Zealand: pp.217-223.

- McLEAN, D.; BRUCE, E. y PONZONI, R. 1984. Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. *Journal of Dairy Research* 51:531-546.
- MARZIALI, A. y NG-KWAI-HANG, K. 1986a. Effects of milk composition and genetic polymorphism on coagulation properties of milk. *Journal of Dairy Science* 69 (7) 1793-1798.
- MARZIALI, A. y NG-KWAI-HANG, K. 1986b. Relationships between milk protein polymorphism and cheese yielding capacity. *Journal of Dairy Science* 69:1193-1201.
- MAYER, H.; ORTNER, M.; TSCHAGER, E. y GINZINGER, W. 1997. Effects of genetic variants of milk proteins on the composition and cheesemaking properties of milk. En: *Milk protein polymorphism. International Dairy Federation: Proceedings of the IDF Seminar held in Palmerston North. New Zealand:pp. 423-424.*
- NEIMANN-SORENSEN, A. 1987. *Dairy Cattle Production*. En: *World Animal Science Gravert. New Zealand: 309 p.*
- NG-KWAI-HANG, K. 1997. A review of the relationship between milk protein polymorphism and milk composition/milk production. En: *Milk protein polymorphism. International Dairy Federation: Proceedings of the IDF Seminar held in Palmerston North. New Zealand: pp. 22 – 37.*
- NG-KWAI-HANG, K.; HAYES, J.; MOXLEY, J. y MONARDES H. 1984. Association of genetic variants of casein and milk serum proteins with milk, fat, and protein by dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 67:835-840.

- NG-KWAI-HANG, K.; HAYES, J.; ROXLEY, J. y MONARDES, H. 1982. Environmental influences on protein content and composition of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 65 (10): 1993-1998.
- O'HARA, H.; MEHRA, R.; OZIMEK, L.; O'FARREL, K.; CONNOLLY, F.; CROSS, T.; HARRINGTON, D. y FITZGERALD, R. 1993. Genetic variants of milk proteins in the more park research herds. In cheese yield and factors affecting its control. *Proceeding of the IDF Seminar held in Cork, Ireland*. Pp. 188-190.
- PEARCE, F.; BANKS, B.; BANTHORPE, D.; BERRY, A.; DAVIES, H y VERNON CH. 1972. The isolation and characterization of nerve-growth factor from the venom of *Vipera russelli*. *Eur. Journal Biochemistry*. 29 (3), 417-425.
- PINTO, M. y HOUBRAKEN, A. 1976. *Métodos de análisis químicos de leche y productos lácteos*. Centro de Capacitación en Lechería. Santiago. Chile. 345 p.
- PRESTIDGE, R. y HEARN, M. 1979. Preparative flatbed electrofocusing in granulated gels with natural pH gradients generated from simple buffer. *Analytical Biochemistry* 97:95-102.
- PUHAN, Z., y JAKOB, E. 1993. Genetic variants of milk proteins an cheese yield. En: *Cheese yield and factors affecting its control*. International Dairy Federation: *Proceedings of the IDF Seminar held in Cork, Ireland*: pp. 111-122
- RAMOS, M. y AMIGO, L. 1996. Polimorfismo genético de las proteínas lácteas y su relación con la calidad. En *III Taller Internacional sobre calidad de la leche*. Universidad Austral de Chile. Valdivia 9-11 de Octubre: 43.

- ROGERS, G. y STEWART, J. 1982. The effect of some nutritional and nonnutritional factors on milk protein concentration and yield. *Journal of Australian Dairy Technology*, 37 (1): 26 – 32.
- SABOUR, M.; LIN, C.; MOCHANDA, S. y LEE, A. 1993. Effects of selection practiced on the frequencies of κ - casein and β - lactoglobulin genotypes in canadian artificial insemination bulls. *Journal of Dairy Science* 76:274-280.
- STORRY, J.; GRANDINSON, A.; MILLARD, D.; OWEN, A. y FORD, G. 1982. Chemical composition and coagulating properties of renneted milks from different breeds and species of ruminant. *Journal of Dairy Research* 50:215-229.
- STORRY, J. y FORD, G. 1982. Some factors affecting the post clotting development of coagulum strength in renneted milk. *Journal of Dairy Research*. 49: 469-477.
- SWAISGOOD, H. 1982. Chemistry of milk protein. Page 1. In: *Developments in dairy chemistry*. Vol.1. P.F . Fox, Elsevier Applied Science Publishers, Ltd., Barking, Essex, England: pp. 1 –59.
- TESSMAN, N.; RADLOFF, H.; KLEINMANS, J.; DHIMAN, R. y SATTER, L. 1991. Milk production response to dietary forrage: grain ratio. *Journal of Dairy Science*, 8 (74): 269-277.
- TRIE-COUT, P. y GRIPON, J. 1981. Electrofocusing and two-dimensional electrophoresis of bovine caseins. *Journal of Dairy Research* 48:303-310.
- WALSTRA, P.; GEURTS, T.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A. y VAN BOEKEL, M.A. 1999. *Dairy Technology. Principles of milk properties and processes*. Marcel Dekker. USA.727 p.

WINKELMAN, A. 1997. Associations of β - lactoglobulin A, B and C variants with production traits in New Zealand dairy cattle. En: Milk protein polymorphism. International Dairy Federation: Proceedings of the IDF Seminar held in Palmerston North. New Zealand: pp. 83-86.

ANEXOS

ANEXO 1

Encuestas utilizadas para la caracterización de las vacas de razas Holstein-Friesian y Jersey

A. Encuestas de vacas Holstein–Friesian

Vaca: Karen

Raza	Holstein
Raza de la madre y del padre	Holstein
Porcentaje de pureza	100%
Edad	9 años
Número de lactancias	6
Número de partos	6
Meses de lactancia	9
Epoca de parto	15 Abril 2000
Producción de leche	Otoño 7000 litros/año
Alimentación	Pradera, alfalfa (20Kg/día) y concentrado (2Kg/día)

Vaca: Odina

Raza	Holstein
Raza de la madre y del padre	Holstein
Porcentaje de pureza	100%
Edad	6 años
Número de lactancias	2
Número de partos	2
Meses de lactancia	9
Epoca de parto	4 de Abril 2000
Producción de leche	Otoño 8000 litros/año
Alimentación	Pradera, alfalfa (20Kg/día) y concentrado (2Kg/día), cosetan 12% proteína.

(Continuación ANEXO 1)

Vaca: Steami

Raza	Holstein
Raza de la madre y del padre	Holstein
Porcentaje de pureza	100%
Edad	6 años
Número de lactancias	5
Número de partos	5
Meses de lactancia	3
Epoca de parto	01 de Diciembre 2000
Producción de leche	Otoño 8000 litros/año
Alimentación	Pradera, alfalfa (20Kg/día) y concentrado (3Kg/día).

Vaca: 135

Raza	Holstein
Raza de la madre y del padre	Holstein
Porcentaje de pureza	70%
Edad	7 Años
Número de lactancias	4
Número de partos	4
Meses de lactancia	10
Epoca de parto	Primavera
Producción de leche	5000 litros/año
Alimentación	Pradera permanente y concentrado (1,5 Kg/día)

(Continuación ANEXO 1)

Vaca: 177

Raza	Holstein
Raza de la madre y del padre	Holstein
Porcentaje de pureza	70
Edad	3 años
Número de lactancias	1
Número de partos	1
Meses de lactancia	10
Epoca de parto	Primavera
Producción de leche	5000 litros/año
Alimentación	Pradera permanente y concentrado (1,5 Kg/día)

B. Encuestas de vacas Jersey**Vaca: 3963**

Raza	Jersey
Raza de la madre y del padre	Jersey
Porcentaje de pureza	100%
Edad	4 años
Número de lactancias	3
Número de partos	3
Meses de lactancia	8
Epoca de parto	07 de Junio 2000
Producción de leche	Otoño 3738 litros/año
Alimentación	Ración simple: concentrado (1kg), cosetan (1/2kg), melasa (1/2kg), soiling alfalfa (1,5kg) y ración doble: concentrado (2kg), cosetan (1/2kg), melasa (1/2kg) y soiling alfalfa (1,5kg).

(Continuación ANEXO 1)

Vaca: 3971

Raza	Jersey
Raza de la madre y del padre	Jersey
Porcentaje de pureza	100%
Edad	4 años
Número de lactancias	3
Número de partos	3
Meses de lactancia	8
Epoca de parto	09 Junio 2000
Producción de leche	Otoño 3748 litros/año
Alimentación	Ración simple: concentrado (1kg), cosetan (1/2kg), melasa (1/2kg), soiling alfalfa (1,5kg) y ración doble: concentrado (2kg), cosetan (1/2kg), melasa (1/2kg) y soiling alfalfa (1,5kg).

Vaca: 4027

Raza	Jersey
Raza de la madre y del padre	Jersey
Porcentaje de pureza	100%
Edad	4 años
Número de lactancias	3
Número de partos	3
Meses de lactancia	8
Epoca de parto	10 junio 2000
Producción de leche	Otoño 3999 litros/año
Alimentación	Ración simple: concentrado (1kg), cosetan (1/2kg), melasa (1/2kg), soiling alfalfa (1,5kg) y ración doble: concentrado (2kg), cosetan (1/2kg), melasa (1/2kg) y soiling alfalfa (1,5kg).

(Continuación ANEXO 1)

Vaca: 4051

Raza	Jersey
Raza de la madre y del padre	Jersey
Porcentaje de pureza	100%
Edad	3,6 años
Número de lactancias	3
Número de partos	3
Meses de lactancia	9
Epoca de parto	27 mayo 2000
Producción de leche	Otoño 3752 litros/año
Alimentación	Ración simple: concentrado (1kg), cosetan (1/2kg), melasa (1/2kg), soiling alfalfa (1,5kg) y ración doble: concentrado (2kg), cosetan (1/2kg), melasa (1/2kg) y soiling alfalfa (1,5kg).

Vaca: 4052

Raza	Jersey
Raza de la madre y del padre	Jersey
Porcentaje de pureza	100%
Edad	4 años
Número de lactancias	3
Número de partos	3
Meses de lactancia	7
Epoca de parto	17 mayo 2000
Producción de leche	Otoño 3403 litros/año
Alimentación	Ración simple: concentrado (1kg), cosetan (1/2kg), melasa (1/2kg), soiling alfalfa (1,5kg) y ración doble: concentrado (2kg), cosetan (1/2kg), melasa (1/2kg) y soiling alfalfa (1,5kg).

ANEXO 2

Técnicas electroforéticas utilizadas en este estudio

1. Electroforesis de isoenfoque según PEARCE *et al.* (1972)

1.1.1 Preparación de la muestra

El suero es preparado ajustando las muestras de leche a pH 4.6 con HCL 1M y luego centrifugando a 13000 revoluciones por minuto por un tiempo total de 5 minutos. El sobrenadante obtenido es diluido con buffer muestra para obtener una concentración de 15 µg de proteína en la muestra, para esta cuantificación de proteínas se aplicó anteriormente a las muestras el método de LOWRY *et al.* (1951), de acuerdo a CASANOVA 2000.

1.1.2 Buffer muestra utilizado

Urea 7M con 0,1% de 2-mercaptoetanol de acuerdo a ADDEO *et al.* (1983).

1.1.2 Preparación de los estándares

Los estándares se preparan disolviendo 1mg de estándar en 1ml de buffer muestra y almacenado en frasco ámbar y mantenidos en congelación.

1.1.3 Corrida del gel

Las condiciones de corrida para éste método es la aplicación de 300 Volts constantes por 180 minutos en refrigeración a aproximadamente 4°C, y utilizando como buffer de corrida NaOH 0.02 N en el reservorio superior (Cátodo) y H₂SO₄ 0.2% en el reservorio inferior (Anodo), éstos últimos también mantenidos antes de su utilización en refrigeración a 4°C.

1.1.4 Tinción y desteñido

Luego de terminada la corrida de electroforesis los geles se sacan de los tubos y se incuban toda la noche en solución fijadora, después de esto se incuban media hora en solución de desteñido, luego se tiñen los geles en baño a 60°C por media hora y se desteñen cambiando la solución de desteñido varias veces hasta obtener bandas nítidas y finalmente se guardan los geles en tubos con solución de guardado.

1.1.5 Identificación de las variantes genéticas

Las variantes genéticas fueron identificadas por comparación con estándares de β -lactoglobulina y con curva de calibración de punto isoeléctrico con puntos isoeléctricos conocidos.

1.2 Electroforesis de isoenfoque según TRIE-COUT y GRIPON (1981)

1.2.1 Corrida del gel

Las condiciones de corrida para éste método es primeramente la aplicación de una precorrida, de 400 Volts por 60 minutos, terminada la precorrida se desconecta el equipo y se procede a aplicar la muestra en los geles y la corrida se realiza a 400 Volts por 2 horas en refrigeración a aproximadamente 4°C en un refrigerador, y utilizando como buffer de corrida NaOH 0.02 N en el reservorio superior (Catodo) y H₂SO₄ 0.2% en el reservorio inferior (Anodo), éstos últimos también mantenidos antes de su utilización en refrigeración a 4°C.

1.2.2 Tinción y desteñido

Los geles se dejan durante 8 horas en la solución de tinción con lo cual se obtienen bandas nítidas y no es necesario desteñir ya que solamente se tiñen las bandas de proteína y no los geles, finalmente se guardan los geles en tubos con agua destilada.

1.3 Electroforesis discontinua según LOWE *et al.* (1995)

1.3.1 Preparación de los estándares

Los estándares fueron preparados disolviendo 0.2 mg de estándar en 1ml de buffer muestra y almacenado en frasco ámbar y mantenidos en congelación.

1.3.2 Corrida del gel

Luego de aplicar las muestras en los geles, la corrida se realiza a 210 Volts por 9 minutos y pasado éste tiempo bajar a 40 Volts y mantenerlos por 3 horas.

1.3.3 Tinción y desteñido

Los geles se dejan por 5 minutos en la solución de tinción y posteriormente son puestos en solución de desteñido por un tiempo de 10 minutos, finalmente los geles son fotografiados.

ANEXO 3

Mediciones de los parámetros analizados en las muestras de leche en vacas de raza Holstein-Friesian y Jersey.

3.1 Mediciones de los parámetros analizados en las muestras de leche de vacas Holstein-Friesian

Vaca	Muestreo	Proteínas %	Caseínas %	Materia grasa %	Aptitud a la coagulación (g de cuajo/ml de leche)
Karen	1	3,50	2,78	4,80	1 : 29.630
Karen	1	3,52	2,79	4,80	1 : 29.703
Karen	2	3,55	2,79	4,65	1 : 29.484
Karen	2	3,55	2,80	4,65	1 : 29.630
Karen	3	3,69	2,95	4,55	1 : 29.340
Karen	3	3,68	2,94	4,55	1 : 29.197
Odina	1	4,09	3,38	5,0	1 : 31.169
Odina	1	4,09	3,35	5,0	1 : 31.414
Odina	2	3,79	3,14	4,65	1 : 30.691
Odina	2	3,78	3,15	4,65	1 : 30.769
Odina	3	4,05	3,34	4,85	1 : 30.691
Odina	3	4,05	3,36	4,85	1 : 30.534
Steami	1	3,25	2,66	3,75	1 : 26.030
Steami	1	3,25	2,66	3,72	1 : 26.087
Steami	2	3,24	2,66	3,65	1 : 26.258
Steami	2	3,22	2,65	3,70	1 : 26.316
Steami	3	3,24	2,63	3,60	1 : 26.374
Steami	3	3,25	2,68	3,60	1 : 26.373
135	1	3,17	2,62	3,55	1 : 26.087
135	1	3,15	2,56	3,55	1 : 26.086
135	2	3,21	2,64	3,25	1 : 26.201
135	2	3,20	2,65	3,25	1 : 26.258
135	3	3,25	2,70	3,45	1 : 26.030
135	3	3,25	2,71	3,45	1 : 26.032
177	1	2,98	2,44	3,70	1 : 26.201
177	1	2,98	2,43	3,75	1 : 26.257
177	2	3,11	2,57	3,50	1 : 26.316
177	2	3,12	2,56	3,50	1 : 26.258
177	3	2,95	2,41	3,52	1 : 26.144
177	3	2,96	2,41	3,57	1 : 26.144

(Continuación ANEXO 3)

3.2 Mediciones de los parámetros analizados en las muestras de leche de vacas Jersey.

Vaca	Muestreo	Proteínas %	Caseínas %	Materia grasa %	Aptitud a la coagulación (g de cuajo/ml de leche) %
3063	1	4,60	3,85	6,00	1: 40.268
3063	1	4,61	3,85	6,00	1: 40.001
3063	2	4,51	3,76	5,90	1: 41.667
3063	2	4,52	3,78	5,95	1: 41.666
3063	3	4,55	3,83	5,70	1: 39.344
3063	3	4,55	3,84	5,72	1: 38.961
3071	1	4,81	4,19	5,68	1: 44.444
3071	1	4,82	4,19	5,65	1: 44.118
3071	2	4,51	3,80	5,75	1: 41.667
3071	2	4,48	3,77	5,78	1: 41.812
3071	3	4,73	4,11	5,68	1: 43.166
3071	3	4,73	4,13	5,68	1: 43.163
4027	1	4,89	4,27	5,90	1: 45.283
4027	1	4,89	4,28	5,93	1: 44.944
4027	2	4,44	3,71	6,00	1: 41.379
4027	2	4,45	3,75	6,00	1: 40.956
4027	3	4,72	4,07	5,85	1: 43.166
4027	3	4,71	4,07	5,85	1: 43.321
4051	1	4,32	3,53	4,75	1: 34.484
4051	1	4,32	3,54	4,75	1: 34.286
4051	2	3,96	3,21	4,80	1: 36.585
4051	2	3,96	3,22	4,75	1: 36.697
4051	3	4,22	3,46	5,00	1: 33.426
4051	3	4,21	3,46	5,00	1: 33.426
4052	1	4,07	3,36	4,80	1: 32.258
4052	1	4,09	3,35	4,80	1: 32.345
4052	2	4,03	3,28	4,60	1: 32.609
4052	2	4,04	3,33	4,65	1: 32.432
4052	3	4,11	3,4	4,85	1: 33.333
4052	3	4,13	3,41	4,80	1: 33.058

ANEXO 4

Contenido de proteína y caseína determinado según método Kjeldahl y método Pro-Milk en vacas Holstein-Friesian y Jersey, en cada uno de los muestreos.

4.1 Contenido de proteínas y caseína determinado según método Kjeldahl y método Pro-Milk en el primer muestreo de vacas Holstein-Friesian.

Muestreo 1										
Vaca	Kjeldhal		Pro-Milk							Dif. entre métodos
	% proteína	% proteína (prom.)	% proteína (Lec. I)	% proteína (prom.)	Lec. II	Lec. II (prom.)	Lec. III	Lec. III (prom.)	% caseína (prom.)	
Karen	3.54 3.59	3.57	3.5 3.52	3.51	3.61 3.6	3.61	4.29 4.29	4.29	2.79	0.06
Odina	4.12 4.17	4.15	4.09 4.09	4.09	4.18 4.16	4.17	4.85 4.86	4.86	3.36	0.06
Steami	3.34 3.3	3.32	3.25 3.25	3.25	3.36 3.36	3.36	3.91 3.91	3.91	2.66	0.07
135	3.23 3.18	3.21	3.17 3.15	3.16	3.3 3.29	3.3	3.81 3.84	3.83	2.59	0.05
177	3.06 3.02	3.04	2.98 2.98	2.98	3.12 3.12	3.12	3.62 3.63	3.63	2.43	0.06

(Continuación ANEXO 4)

4.2 Contenido de proteínas y caseína determinado según método Kjeldahl y método Pro-Milk en el segundo muestreo de vacas Holstein-Friesian.

Muestreo 2										
Vaca	Kjeldhal		Pro-Milk							Dif. entre métodos
	% proteína	% proteína (prom.)	% proteína (Lec. I)	% proteína (prom.)	Lec. II	Lec. II (prom.)	Lec. III	Lec. III (prom.)	% caseína (prom.)	
Karen	3.64	3.62	3.55	3.55	3.64	3.65	4.4	4.4	2.76	0.07
	3.59		3.55		3.65		4.4			
Odina	3.85	3.83	3.79	3.79	3.88	3.88	4.53	4.52	3.11	0.04
	3.81		3.78		3.87		4.50			
Steami	3.27	3.29	3.24	3.23	3.34	3.34	3.88	3.88	2.65	0.06
	3.3		3.22		3.34		3.87			
135	3.25	3.23	3.21	3.21	3.37	3.37	3.90	3.89	2.65	0.02
	3.21		3.2		3.37		3.88			
177	3.19	3.17	3.11	3.12	3.21	3.21	3.71	3.72	2.57	0.05
	3.15		3.12		3.21		3.72			

(Continuación ANEXO 4)

4.3 Contenido de proteínas y caseína determinado según método Kjeldahl y método Pro-Milk en el tercer muestreo de vacas Holstein-Friesian.

Muestreo 3										
Vaca	Kjeldhal		Pro-Milk							Dif. entre métodos
	% proteína	% proteína (prom.)	% proteína (Lec. I)	% proteína (prom.)	Lec. II	Lec. II (prom.)	Lec. III	Lec. III (prom.)	% caseína (prom.)	
Karen	3.75	3.73	3.69	3.69	3.77	3.77	4.47	4.47	2.95	0.04
	3.71		3.68		3.76		4.46			
Odina	4.09	4.12	4.05	4.05	4.13	4.14	4.80	4.80	3.35	0.07
	4.14		4.05		4.14		4.79			
Steami	3.32	3.3	3.24	3.25	3.35	3.35	3.92	3.90	2.66	0.05
	3.28		3.25		3.35		3.88			
135	3.30	3.32	3.25	3.25	3.32	3.33	3.83	3.83	2.71	0.07
	3.33		3.25		3.33		3.83			
177	3.04	3.02	2.95	2.96	3.03	3.04	3.53	3.54	2.42	0.06
	2.99		2.96		3.04		3.55			

(Continuación ANEXO 4)

4.4 Contenido de proteínas y caseína determinado según método Kjeldahl y método Pro-Milk en el primer muestreo de vacas Jersey.

Muestreo 1										
Vaca	Kjeldhal		Pro-Milk							Dif. entre métodos
	% proteína	% proteína (prom.)	% proteína (Lec. I)	% proteína (prom.)	Lec. II	Lec. II (prom.)	Lec. III	Lec. III (prom.)	% caseína (prom.)	
3063	4.64	4.67	4.60	4.61	4.68	4.68	5.39	5.4	3.85	0.06
	4.69		4.61		4.68		5.40			
3071	4.83	4.85	4.81	4.82	4.91	4.91	5.49	5.5	4.19	0.03
	4.87		4.82		4.91		5.50			
4027	4.91	4.93	4.89	4.89	4.92	4.93	5.50	5.5	4.28	0.04
	4.95		4.89		4.93		5.50			
4051	4.36	4.39	4.32	4.32	4.38	4.39	5.13	5.13	3.54	0.07
	4.41		4.32		4.39		5.13			
4052	4.09	4.12	4.07	4.08	4.15	4.15	4.82	4.83	3.36	0.04
	4.14		4.09		4.14		4.84			

(Continuación ANEXO 4)

4.5 Contenido de proteínas y caseína determinado según método Kjeldahl y método Pro-Milk en el segundo muestreo de vacas Jersey.

Muestreo 2										
Vaca	Kjeldhal		Pro-Milk							Dif. entre métodos
	% proteína	% proteína (prom.)	% proteína (Lec. I)	% proteína (prom.)	Lec. II	Lec. II (prom.)	Lec. III	Lec. III (prom.)	% caseína (prom.)	
3063	4.55	4.60	4.51	4.52	4.58	4.58	5.29	5.29	3.77	0.08
	4.60		4.52		4.58		5.28			
3071	4.57	4.56	4.51	4.50	4.55	4.55	5.22	5.22	3.79	0.06
	4.54		4.48		4.54		5.21			
4027	4.54	4.53	4.44	4.45	4.49	4.50	5.18	5.18	3.73	0.08
	4.51		4.45		4.51		5.17			
4051	4.00	4.02	3.96	3.96	4.02	4.02	4.73	4.72	3.22	0.06
	4.04		3.96		4.01		4.71			
4052	4.09	4.11	4.03	4.04	4.18	4.18	4.89	4.87	3.31	0.07
	4.13		4.04		4.18		4.85			

(Continuación ANEXO 4)

4.6 Contenido de proteínas y caseína determinado según método Kjeldahl y método Pro-Milk en el tercer muestreo de vacas Jersey.

Muestreo 3										
Vaca	Kjeldhal		Pro-Milk							Dif. entre métodos
	% proteína	% proteína (prom.)	% proteína (Lec. I)	% proteína (prom.)	Lec. II	Lec. II (prom.)	Lec. III	Lec. III (prom.)	% caseína (prom.)	
3063	4.59	4.61	4.55	4.55	4.65	4.65	5.33	5.33	3.83	0.06
	4.62		4.55		4.65		5.32			
3071	4.83	4.81	4.73	4.73	4.78	4.79	5.36	5.36	4.12	0.08
	4.78		4.73		4.79		5.35			
4027	4.74	4.77	4.72	4.72	4.81	4.81	5.42	5.42	4.07	0.05
	4.79		4.71		4.81		5.41			
4051	4.28	4.26	4.22	4.22	4.28	4.29	5.00	5.00	3.47	0.04
	4.24		4.21		4.29		5.00			
4052	4.19	4.17	4.11	4.12	4.18	4.18	4.85	4.86	3.40	0.05
	4.14		4.13		4.18		4.86			

ANEXO 5

Análisis de varianza y test de Tukey entre las vacas de razas en estudio (Holstein-Friesian y Jersey) con respecto al contenido de proteína, caseína, materia grasa y aptitud de la leche a la coagulación.

5.1 Análisis de varianza para el contenido de proteína en ambas razas.

Fuente	Suma de cuadrados	Grado de libertad	Cuadrado medio	Radio F	Valor P
Entre grupo	15,8723	1	15,8723	150,71	0,0000
Dentro grupo	6,10831	58	0,105316		
Total corregido	21,9806	59			

5.2 Análisis de varianza para el contenido de caseína en ambas razas.

Fuente	Suma de cuadrados	Grado de libertad	Cuadrado medio	Radio F	Valor P
Entre grupo	13,4332	1	13,4332	136,76	0,0000
Dentro grupo	5,69696	58	0,0982235		
Total corregido	19,1302	59			

5.3 Análisis de varianza para el contenido de materia grasa en ambas razas.

Fuente	Suma de cuadrados	Grado de libertad	Cuadrado medio	Radio F	Valor P
Entre grupo	22,6198	1	22,6198	28,26	0,0000
Dentro grupo	46,4192	58	0,800331		
Total corregido	69,039	59			

5.4 Análisis de varianza para la aptitud de coagulación de leche en ambas razas.

Fuente	Suma de cuadrados	Grado de libertad	Cuadrado medio	Radio F	Valor P
Entre grupo	1,869947	1	1,86947	146,94	0,0000
Dentro grupo	7,37892	58	1,27223		
Total corregido	2,60736	59			

(Continuación ANEXO 5)

5.5 Test de Tukey para el contenido de proteínas en ambas razas.

Raza	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
1	30	3,404	X
2	30	4,433	X

Donde 1= Holstein-Friesian y 2= Jersey

5.6 Test de Tukey para el contenido de caseína en ambas razas.

Raza	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
1	30	2,78033	X
2	30	3,72667	X

Donde 1= Holstein-Friesian y 2= Jersey

5.7 Test de Tukey para el contenido de materia grasa en ambas razas.

Raza	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
1	30	4,03533	X
2	30	5,26333	X

Donde 1= Holstein-Friesian y 2= Jersey

5.8 Test de Tukey para aptitud de coagulación de leche en ambas razas.

Raza	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
1	30	27645,1	X
2	30	38808,9	X

Donde 1= Holstein-Friesian y 2= Jersey

ANEXO 6

Análisis de varianza y test de Tukey para la raza Holstein-Friesian con respecto al contenido de proteína, caseína, materia grasa y aptitud de la leche a la coagulación.

6.1 Análisis de varianza para el contenido de proteínas en las vacas de raza Holstein-Friesian.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Radio F	Valor P
Entre Grupo	2,76528	4	0,69132	112,95	0,0000
Dentro Grupo	0,153017	25	0,0061267		
Total corregido	2,9183	29			

6.2 Análisis de varianza para el contenido de caseína en las vacas de raza Holstein-Friesian.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Radio F	Valor P
Entre Grupo	1,82281	4	0,455703	103,30	0,0000
Dentro Grupo	0,110283	25	0,00441133		
Total corregido	1,9331	29			

6.3 Análisis de varianza para el contenido de materia grasa en las vacas de raza Holstein-Friesian.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Radio F	Valor P
Entre Grupo	10,4995	4	2,62489	182,69	0,0000
Dentro Grupo	0,3592	25	0,014369		
Total corregido	10,8587	29			

6.4 Análisis de varianza para la aptitud de coagulación de la leche en las vacas de raza Holstein-Friesian.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Radio F	Valor P
Entre Grupo	1,20732	4	3,01831	800,9	0,0000
Dentro Grupo	942163,0	25	37686,5		
Total corregido	1,21675	29			

(Continuación ANEXO 6)

6.5 Test de Tukey para el contenido de proteínas en las vacas de raza Holstein-Friesian.

Vaca	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
135	6	3,19500	X
177	6	3,20500	X
Steami	6	3,24167	X
Karen	6	3,58167	X
Odina	6	3,95000	X

Donde Karen = 1, Odina = 2, Steami = 3, 135 = 4 y 177 = 5

6.6 Test de Tukey para el contenido de caseína en las vacas de raza Holstein-Friesian.

Vaca	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
135	6	2,64667	X
177	6	2,65000	X
Steami	6	2,65667	X
Karen	6	2,84167	X
Odina	6	3,28667	X

Donde Karen = 1, Odina = 2, Steami = 3, 135 = 4 y 177 = 5

6.7 Test de Tukey para el contenido de materia grasa en las vacas de raza Holstein-Friesian.

Vaca	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
135	6	3,41667	X
177	6	3,59000	XX
Steami	6	3,67000	X
Karen	6	4,66667	X
Odina	6	4,83333	X

Donde Karen = 1, Odina = 2, Steami = 3, 135 = 4 y 177 = 5

6.8 Test de Tukey para la aptitud de coagulación de la leche en las vacas de raza Holstein-Friesian.

Vaca	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
135	6	26115,5	X
177	6	26220,2	X
Steami	6	26239,8	X
Karen	6	29497,3	X
Odina	6	30878,0	X

Donde Karen = 1, Odina = 2, Steami = 3, 135 = 4 y 177 = 5

ANEXO 7

Análisis de varianza y test de Tukey para la raza Jersey con respecto al contenido de proteína, caseína, materia grasa y aptitud de la leche a la coagulación.

7.1 Análisis de varianza para el contenido de proteínas en las vacas de raza Jersey

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Radio F	Valor P
Entre Grupo	2,01949	4	0,504872	27,16	0,0000
Dentro Grupo	0,4647	25	0,018588		
Total corregido	2,48419	29			

7.2 Análisis de varianza para el contenido de caseína en las vacas de raza Jersey.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Radio F	Valor P
Entre Grupo	2,59867	4	0,649667	26,07	0,0000
Dentro Grupo	0,623	25	0,024920		
Total corregido	3,22167	29			

7.3 Análisis de varianza para el contenido de materia grasa en las vacas de raza Jersey.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Radio F	Valor P
Entre Grupo	7,95229	4	1,9880700	195,07	0,0000
Dentro Grupo	0,2547783	25	0,0101167		
Total corregido	8,20707	29			

7.4 Análisis de varianza para la aptitud de coagulación de la leche en las vacas de raza Jersey.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Radio F	Valor P
Entre Grupo	5,85055	4	1,46267	105,06	0,0000
Dentro Grupo	3,48032	25	1,39218		
Total corregido	6,19859	29			

(Continuación ANEXO 7)

7.5 Test de Tukey para el contenido de proteínas en las vacas de raza Jersey.

Vaca	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
4052	6	4,07833	X
4051	6	4,16500	X
3963	6	4,55667	X
3971	6	4,68000	X
4027	6	4,68333	X

Donde 3963 = 6, 3971 = 7, 4027 = 8, 4051 = 9 y 4051 = 10

7.6 Test de Tukey para el contenido de caseína en las vacas de raza Jersey.

Vaca	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
4052	6	3,35500	X
4051	6	3,40333	X
3963	6	3,81833	X
3971	6	4,02500	X
4027	6	4,03167	X

Donde Karen = 1, Odina = 2, Steami = 3, 135 = 4 y 177 = 5

7.7 Test de Tukey para el contenido de materia grasa en las vacas de raza Jersey.

Vaca	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
4052	6	4,75000	X
4051	6	4,84167	X
3963	6	5,70330	X
4027	6	5,87833	X
3971	6	5,92167	X

Donde Karen = 1, Odina = 2, Steami = 3, 135 = 4 y 177 = 5

7.8 Test de Tukey para la aptitud de coagulación de la leche en las vacas de raza Jersey.

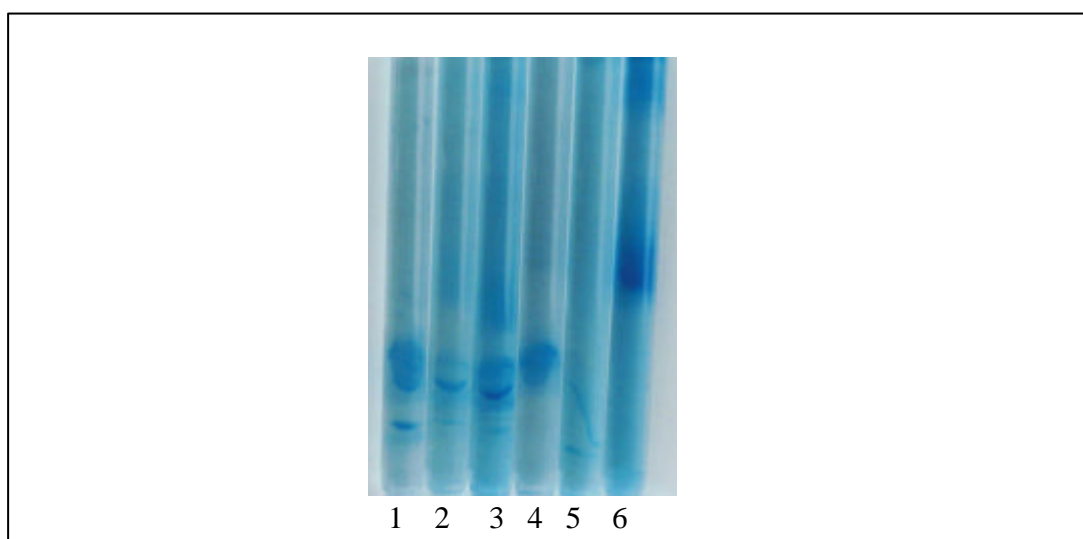
Vaca	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
4052	6	32672,5	X
4051	6	34817,2	X
3963	6	41460,2	X
3971	6	43063,2	X
4027	6	43174,8	X

Donde Karen = 1, Odina = 2, Steami = 3, 135 = 4 y 177 = 5

ANEXO 8

Electroforesis de isoenfoque en un rango de pH de 3,5-10 aplicada en vacas individuales de raza Holstein-Friesian y Jersey.

1 (estándar de blg B); 2 (estándar de blg A); 3, 4 muestras de leche; 5 (inmunoglobulina) y 6 (seroalbúmina de bovino).



ANEXO 9

Migración de las muestras en el gel y PI y variantes genéticas encontradas en las muestras de leche analizadas en este estudio.

Raza	Muestra	Migración desde polo + (cm)	PI (Punto Isoeléctrico)	Variante genética presente
Holstein-Friesian	Karen	2,0	5,4	B
Holstein-Friesian	Odina	2,0	5,4	B
Holstein-Friesian	Steami	1,9	5,3	A
Holstein-Friesian	134	1,9	5,3	A
Holstein-Friesian	177	1,9	5,3	A
Jersey	3963	2,0	5,4	B
Jersey	3971	2,0	5,4	B
Jersey	4027	2,0	5,4	B
Jersey	4051	1,9	5,3	A
Jersey	4052	1,9	5,3	A
-----	β -lactoglobulina A (estándar)	1.9	5.3	-----
-----	β -lactoglobulina B (estándar)	2.0	5.4	-----
-----	Inmunoglobulina	2.9	6.0	-----
-----	Seroalbúmina de bovino	1.5	4.8	-----