



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

Facultad de Ciencias Agrarias
Escuela de Ingeniería en Alimentos

Efecto de las Variantes Genéticas A y B de κ -Caseína y β -lactoglobulina sobre las Propiedades de Coagulación de la Leche

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

Tatiana Annabell Benavides Castro

Valdivia Chile 2003

PROFESOR PATROCINANTE

Sra. Luz Haydée Molina C.

Prof. Biología y Química

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

PROFESORES INFORMANTES

Sra. Carmen Brito C.

Ingeniero en Alimentos, M. Sc. Food Science

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Sr. Bernardo Carrilo L.

Ingeniero Agrónomo, M. Cs. e Ing. en Alimentos

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

*A mis Padres y hermanas, y
a mi país Ecuador....*

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer de todo corazón y en forma muy especial a mis padres, **Raúl y Myriam**, por su amor, apoyo y toda la confianza que siempre me brindaron cuando más lo necesité.

A mi Profesora Patrocinante, **Sra. Luz Haydée Molina**, por su gran ayuda para poder realizar este trabajo.

Al Prof. Bernardo Carrillo, por su apoyo durante toda mi carrera universitaria.

A mi amiga **Andrea**, por su amistad y por darme toda esa energía positiva para seguir adelante.

A mis compañeras y amigas, **Yeissy, Natalia y Catherine**, sin duda, el mejor grupo de estudio y carrete que pude encontrar en la universidad.

Finalmente, quisiera agradecer, al Sr. Juan Carlos Colin, por su colaboración en este trabajo de tesis y al Proyecto DID S2002-76, por el financiamiento de la misma.

ÍNDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	3
2.1	Composición de la leche	3
2.2	Factores que afectan la producción y composición de la leche	4
2.2.1	Factores genéticos	4
2.2.2	Factores fisiológicos	5
2.2.3	Factores sanitarios	6
2.2.4	Factores ambientales	7
2.3	Proteínas de la leche	10
2.3.1	Caseínas	10
2.3.2	Proteínas del suero	11
2.4	Coagulación de la leche	12
2.4.1	Influencia de algunos factores sobre la coagulación enzimática de la leche	13
2.5	Polimorfismo genético de las proteínas lácteas	15
2.5.1	κ -caseína	18
2.5.2	β -lactoglobulina	19
2.6	Polimorfismo genético de las proteínas lácteas y su relación con las propiedades de coagulación de la leche	20
3	MATERIAL Y MÉTODO	28
3.1	Materiales	28
3.1.1	Obtención de muestras	28

3.1.2	Muestreo	28
3.1.3	Diseño experimental	29
3.1.4	Análisis de las muestras	29
3.2	Metodología	29
3.3	Análisis estadístico	33
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	34
4.1	Identificación de las variantes genéticas A y B de κ -caseína	34
4.2	Identificación de las variantes genéticas A y B de β -lactoglobulina	36
4.3	Efecto de las variantes genéticas A y B de κ -caseína y β -lactoglobulina sobre las propiedades de coagulación de la leche	40
4.3.1	Efecto del mes de muestreo y las variantes genéticas de κ -CN y β -lg sobre la aptitud a la coagulación de la leche	41
4.3.2	Efecto del mes de muestreo y las variantes genéticas de κ -CN y β -lg sobre la firmeza del gel	48
4.3.3	Efecto del mes de muestreo y las variantes genéticas de κ -CN y β -lg sobre la sinéresis de la cuajada	54
5	CONCLUSIONES	60
6	RESUMEN - SUMMARY	61
7	BIBLIOGRAFÍA	63
	ANEXOS	75

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Principales componentes de la leche bovina	3
2	Porcentaje promedio de proteína en leche de diversas razas	4
3	Variantes genéticas de las principales proteínas lácteas	17
4	Sustitución de aminoácidos de las variantes genéticas de κ -CN	18
5	Frecuencia génica de κ -caseína en distintas razas lecheras	19
6	Sustitución de aminoácidos de las variantes de β -Lg	19
7	Frecuencia génica de las variantes más comunes de β -lactoglobulina según la raza	20
8	Diseño experimental	29
9	Variantes genéticas obtenidas en las muestras de κ -caseína	35
10	Variantes genéticas obtenidas en las muestras de β -Lg	37
11	Proporción de la expresión de las variantes A y B de β -Lg en muestras de leche de vacas Frisón Negro	40
12	Efecto del mes de muestreo, fenotipo de β -lactoglobulina y variantes de κ -caseína, sobre la aptitud a la coagulación de la leche	42
13	Interacción entre los fenotipos de β -Lg y las variantes de κ -CN, para la aptitud a la coagulación de la leche	48
14	Efecto del mes de muestreo, fenotipo de β -lactoglobulina y variantes de κ -caseína, sobre la firmeza del gel	49

15	Interacción entre los fenotipos de β -Lg y variantes de κ -CN, para la firmeza del gel	53
16	Efecto del mes de muestreo, fenotipo de β -lactoglobulina y variantes de κ -caseína, sobre la sinéresis de la cuajada	55
17	Interacción entre los fenotipos de β -Lg y variantes de κ -CN, para la sinéresis de la cuajada	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Electroforesis de isoenfoque de κ -caseína en leche de vacas Frisón Negro	36
2	Electroforesis de isoenfoque de β -lactoglobulina en leche de vacas Frisón Negro	38
3	Densitogramas de las variantes A y B de β -Lg en las muestras de leche de vacas Frisón Negro	39
4	Efecto del fenotipo de β -lactoglobulina sobre la aptitud a la coagulación de la leche	44
5	Efecto del fenotipo de β -lactoglobulina sobre la firmeza del gel	51
6	Efecto del fenotipo de β -lactoglobulina sobre la sinéresis de la cuajada	57

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Caracterización de las vacas seleccionadas para el estudio	76
2	Encuesta sobre información de vacas en estudio	77
3	Preparación de muestras para electroforesis de isoenfoque	78
4	Curva de calibración para la determinación de proteínas de acuerdo al método descrito por LOWRY <i>et al.</i> (1951)	79
5	Electroforesis de isoenfoque	81
6	Volumen de muestra de las preparaciones proteicas utilizado en cada electroforesis	82
7	Distancia de migración de las muestras de κ -CN para la identificación de las variantes genéticas	84
8	Distancia de migración de las muestras de β -lactoglobulina para la identificación de las variantes genéticas	85
9	Análisis de varianza de las propiedades de coagulación de la leche	86
10	Cálculo de la repetibilidad de los métodos de aptitud a la coagulación, firmeza del gel y sinéresis de la cuajada	90
11	Coeficientes de correlación determinados para las variables en estudio	92
12	Comparación de promedios de pH	93
13	Promedio ponderado de las propiedades de coagulación de la leche	95
14	Resultados de los análisis realizados a las muestras de leche	97

1. INTRODUCCIÓN

La producción de leche en Chile se ha caracterizado por un incremento sostenido en los últimos años, estimándose que cerca del 50% de la producción de leche de la IX y X regiones se utiliza para la elaboración de quesos y leche en polvo. Por lo tanto, existe interés tanto de la industria láctea como de los productores lecheros en el estudio de los sólidos de la leche, principalmente la fracción proteica.

El mejoramiento de la calidad de la leche y sus propiedades de elaboración es una meta que desde hace muchos años encaran diferentes grupos de investigadores, de esta forma, han asociado las variantes genéticas de las proteínas con las características de composición y propiedades tecnológicas de la leche, particularmente con la fabricación de queso.

La aptitud de la leche para coagular durante el proceso de elaboración del queso es un parámetro fundamental para el rendimiento y calidad del producto final. Por lo tanto, para la industria es deseable utilizar como materia prima leche con favorables propiedades de coagulación (menor tiempo de coagulación, mayor firmeza y buen drenaje del suero), las cuales han sido atribuidas a una u otra de las variantes A y B de κ -caseína y β -lactoglobulina.

Se plantea como hipótesis del presente estudio, que la variante B de κ -caseína y β -lactoglobulina tendría influencias favorables sobre las propiedades de coagulación de la leche.

El objetivo general de la investigación fue relacionar las variantes genéticas A y B de κ -caseína y β -lactoglobulina de vacas individuales Frisón Negro, con las propiedades de coagulación de la leche.

Los objetivos específicos de este estudio fueron:

- Identificar por electroforesis de isoenfoque las variantes genéticas de κ -caseína y β -lactoglobulina en muestras de leche de 10 vacas Frisón Negro.
- Analizar las propiedades de coagulación (aptitud a la coagulación, firmeza del gel y sinéresis de la cuajada) y pH de la leche.
- Evaluar el efecto del mes de muestreo y la presencia de las variantes genéticas A y B de κ -caseína y β -lactoglobulina sobre las propiedades de coagulación de la leche.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Composición de la leche

Una de las propiedades fundamentales de la leche, es ser una mezcla compleja tanto física como química de lípidos, proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales; en la que se distinguen tres fases: emulsión de la materia grasa bajo forma globular, suspensión de la caseína ligada a las sales minerales y solución que forma el medio continuo (ALAIS, 1985; PRIMO, 1997).

La cantidad de sólidos totales varía entre razas pero fluctúa entre 12 – 15%; así la leche contiene entre un 85 y un 88% de agua (LATRILLE, 1999). En el CUADRO 1 se presenta los principales componentes de la leche de vaca.

CUADRO 1. Principales componentes de la leche bovina.

Componentes	%
Agua	87,1
Lactosa	4,9
Materia grasa	3,6
Proteínas	3,5
Minerales	0,9

FUENTE: ALAIS (1985)

La leche bovina contiene una serie de proteínas, entre ellas se encuentran las caseínas, que representan cerca del 80% de la proteína total, y es la proteína de mayor importancia para la industria lechera. El 20% restante corresponde a las proteínas del suero, que se caracterizan principalmente por su alto valor nutritivo (FENEMMA, 1993).

2.2 Factores que afectan la producción y composición de la leche

La producción y composición de la leche de vaca puede tener diversas variaciones, debido a la influencia de algunos factores. Estos pueden enmarcarse dentro de dos grandes grupos (Mahieu citado por CASADO y GARCIA, 1985).

- Factores ligados al animal (genéticos, fisiológicos y sanitarios)
- Factores ambientales (alimentación, ordeño, clima y época de parto)

La materia grasa es el componente que presenta mayor variación, aunque las proteínas, lactosa y sales minerales también varían pero en menor proporción (ALAIS, 1985; CASADO y GARCIA, 1985).

2.2.1 Factores genéticos. De acuerdo a lo expuesto por ALAIS (1985) y CASADO y GARCIA (1985), dentro de cada especie bovina, el factor principal de variación es la raza, encontrándose diferencias marcadas en la composición de la leche. Así por ejemplo, en relación al contenido de Nitrógeno, se ha determinado que vacas Holstein Friesian tienen menor contenido de proteína cruda, de proteína total y de caseína en comparación a la leche de vacas Jersey (De PETERS y FERGUSON, 1992). En el CUADRO 2 se presenta el porcentaje promedio de proteína cruda, verdadera y caseína en leche de diferentes razas.

CUADRO 2. Porcentaje promedio de proteína en leche de diversas razas.

Raza	PC ¹ (%)	PV ¹ (%)	Caseína (%)
Holstein	3,22 ± 0,45	3,07 ± 0,43	2,53 ± 0,40
Jersey	4,22 ± 0,51	4,07 ± 0,49	3,39 ± 0,40
Guernsey	3,70 ± 0,55	3,56 ± 0,53	2,88 ± 0,44
Ayrshire	3,47 ± 0,50	3,30 ± 0,52	2,73 ± 0,43

¹ PC: Proteína cruda ; PV: Proteína verdadera
FUENTE: De PETERS y FERGUSON (1992)

Según LATRILLE (1993), la fuente más importante de variación en el contenido de proteína verdadera de la leche es la genética, existiendo diferencias importantes entre razas y dentro de una raza. Esto concuerda con lo señalado por varios autores, quienes dicen que entre vacas individuales de una misma raza, existen variaciones importantes en el contenido de proteína de la leche, independiente de las condiciones del medio. Además, estas variaciones son mucho mayores que entre diferentes razas lecheras (ALAIS, 1985; CASADO y GARCIA, 1985; De VEER, 1990; De PETERS y FERGUSON, 1992).

2.2.2 Factores fisiológicos. Entre los factores fisiológicos que afectan la composición y producción de la leche se encuentran: la etapa de lactancia, número de partos y gestación.

a) Etapa de lactancia

En el curso de la lactación la concentración de materia grasa y proteína evolucionan en sentido inverso a la lactosa (CASADO y GARCIA, 1985). Las concentraciones de grasa y proteína son máximas al inicio de la lactación y mínimas durante el segundo y tercer mes de lactancia, para luego aumentar hasta el final de ésta. Por otra parte la curva de la lactosa sigue la misma tendencia que la curva de producción de leche, la cual aumenta en forma paulatina hasta el segundo mes de lactancia, luego se mantiene constante y disminuye progresivamente hasta el final de la lactación (ALAIS, 1985; CASADO y GARCIA, 1985; LAWRENCE, 1991; LATRILLE, 1993).

b) Edad y número de partos

La producción de leche aumenta con la edad del animal, sin embargo el contenido de proteína disminuye. El efecto del número de partos es más significativo sobre la producción de leche que sobre la composición, así el máximo volumen de producción se alcanza entre el tercer y quinto parto, disminuyendo luego paulatinamente (CASADO y GARCIA, 1985).

El contenido de caseína en la leche disminuye con el número de partos, aunque el contenido total de proteína cruda puede no cambiar debido al aumento de las proteínas del suero. Generalmente, se considera que el contenido de proteína total y de caseína son más altos, para una vaca en su primera lactación. (DePETERS y FERGUSON, 1992).

d) Gestación

La gestación afecta la composición de la leche en forma indirecta por acelerar el fin de la lactación (CASADO y GARCIA,1985; COVINGTON,1993). De esta forma, según CASADO y GARCIA (1985), el extracto seco magro aumenta en las vacas lactantes a partir del cuarto mes de gestación, sin embargo según Coulon y Perechon citado por LATRILLE (1999), tanto la concentración de grasa como proteína aumenta, pero a partir del quinto mes de gestación.

2.2.3 Factores sanitarios. La principal enfermedad que afecta la ubre de la vaca es la mastitis. Esta enfermedad infecciosa, a diferencia de otras, no se puede erradicar, y está presente en mayor o menor grado en todos los rebaños lecheros, produciendo cuantiosas pérdidas económicas, especialmente por menor producción de leche. La mastitis también afecta la calidad composicional e higiénica de la leche, disminuyendo su valor nutritivo y alterando los procesos de industrialización de la leche y subproductos (GRANDISON, 1986; KRUIZE, 1998).

La gran mayoría de los casos de mastitis son de origen microbiano y el nivel de infección depende del grado de exposición de los pezones a los patógenos mamarios. Para reducir los riesgos de infección es necesario realizar una buena rutina de ordeño, extremando las medidas de higiene, básicamente lavado de ubres y pezones previo a la ordeña y desinfección de pezones post-ordeño, junto con la terapia de secado y la eliminación de animales con infecciones crónicas (KRUIZE, 1998).

En general, con la mastitis se modifica cada uno de los componentes de la leche, de forma que los sólidos totales y sólidos no grasos, la materia grasa y la lactosa disminuyen, mientras que en las sales minerales se produce un aumento en sodio y cloruros y una disminución en potasio, calcio y fósforo. Sin embargo, el contenido total de proteínas no sufre cambios apreciables, debido a que el incremento en las proteínas del suero, especialmente seroalbúmina e inmunoglobulinas son suficientes para compensar el descenso en caseína (CASADO y GARCIA, 1985; LAWRENCE, 1991).

Esta disminución en el extracto seco de la leche, da lugar a una pérdida considerable de rendimiento en prácticamente todos los productos lácteos, incluido el queso, pues aunque el contenido en proteínas totales se mantiene invariable, disminuye el contenido en caseína y grasa (CASADO y GARCIA, 1985). Además, durante la fabricación de queso con leche mastítica, aumenta el tiempo de coagulación, disminuye la tensión de la cuajada y aumenta la retención del suero, lo cual a su vez conduce a la pérdida de rendimiento y calidad del queso (GRANDISON, 1986; LAWRENCE, 1991). Según CASADO y GARCIA (1985), el incremento en el tiempo de coagulación y reducción de la firmeza del gel, puede ser debido al aumento del pH y disminución de la actividad del calcio iónico, además de una posible solubilización de las caseínas.

2.2.4 Factores ambientales. Entre los factores ambientales que afectan la composición de la leche, se encuentran: la alimentación, el clima, el ordeño y época de parto (CASADO y GARCIA, 1985; COVINGTON, 1993).

a) Alimentación

Para la síntesis de la leche, la vaca utiliza como principal fuente los nutrientes provenientes de la alimentación, cuyas variaciones en cantidad y calidad pueden afectar tanto la composición como la producción de leche (CASADO y

GARCIA, 1985).

Según lo señalado por LATRILLE (1999), el efecto de la alimentación sobre el contenido de proteína de la leche es, en términos relativos, menor que el efecto de la genética. Entre los principales factores de la alimentación que pueden afectar el contenido de proteína en la leche se encuentran los aportes de energía y de proteína degradables en el rumen, los cuales determinan la cantidad de proteína de origen microbiano que llega al intestino; y por otro lado la cantidad de proteína de origen dietético que no es degradada en el rumen pero es digerible en el intestino.

La energía es el nutriente más importante en la alimentación del animal, ya que influye directamente sobre la materia grasa, proteína y producción de leche. Una subalimentación, lo cual significa un 70% o menos de la ingesta de la energía requerida en la dieta, será la causante de una disminución en la concentración de proteína. Esto debido por una parte a que se limita la síntesis microbiana en el rumen y por otro lado, parte de los aminoácidos alimentarios son utilizados como aporte energético, disminuyendo de esta forma aún más los precursores de la proteína en la glándula mamaria (CASADO y GARCIA, 1985; LATRILLE, 1993). Por consiguiente, la energía en la dieta influye en forma directa sobre el contenido de proteína láctea, aumentando su contenido cuando las raciones son ricas en ésta (De PETERS y FERGUSON, 1992). En la práctica, generalmente una deficiencia energética de la ración base, se corrige con un mayor nivel de concentrado en la ración (LAWRENCE, 1991; LATRILLE, 1993).

CASADO y GARCIA (1985), señalan que la salida al pasto de los animales en la primavera, después de una alimentación a base de ensilajes en invierno, provoca un aumento de la proteína láctea por el mayor aporte energético de la pradera.

Por otra parte, según De PETERS y CANT (1992), una menor proporción de forraje frente a un aumento del concentrado en la ración (35:65), provocaría un incremento en el contenido proteico de la leche, pero disminuiría el contenido graso. Sin embargo, las dietas que consisten solamente en forraje (98%) producen leches con menor contenido de proteína, esto debido a que el consumo de energía es mucho menor (TESSMANN *et al.*, 1991).

b) Clima

La temperatura es probablemente una de las causas de las variaciones estacionales (ALAIS, 1985). Se ha observado, que el contenido de proteína en la leche tiende a aumentar en el invierno y bajar en el verano, por una parte debido a las diferencias en temperaturas y por otra a los programas de alimentación (ALAIS, 1985; CASADO y GARCIA, 1985; LAWRENCE, 1991; COVINGTON, 1993).

c) Ordeño

El ordeño es otro factor que influye sobre la composición de la leche en un momento determinado, pero no en la cantidad total de cada componente producido, de esta forma al comienzo de la ordeña, la leche es más rica en proteínas, lactosa y sales minerales, pero más pobre en grasa, y al final ocurre el efecto contrario (ALAIS, 1985; KRUIZE, 1998).

d) Época de parto

Durante los partos de primavera-verano, la máxima producción de leche se ve afectada por temperaturas elevadas y mala calidad de alimentos, provocando un efecto depresor sobre el contenido de grasa y proteína. Sin embargo, en los partos de otoño-invierno, donde el contenido de grasa y proteína es superior, las vacas podrán alcanzar la máxima producción con la ayuda de una buena alimentación (CASADO y GARCIA, 1985).

2.3 Proteínas de la leche

“Las proteínas son macromoléculas asimilables a heteropolímeros, las cuales se encuentran reunidas por un único enlace peptídico, en encadenamiento no ramificados, unidades representadas por 20 α -aminoácidos” (ALAIS, 1985).

Según ALAIS (1985), las proteínas constituyen la parte más compleja de la leche. Cerca del 95% del nitrógeno total es proteico, lo que supone unos 35 g. de proteína por kg. de leche (AMIOT, 1991; GONZALEZ de LLANO, 1990; WALSTRA *et al.*, 1999).

Las proteínas de la leche pueden dividirse en dos grupos principales: las caseínas, que en su conjunto constituyen aproximadamente el 80% de la proteína total y que incluyen diversas formas (α_{S1} , α_{S2} , β y κ caseínas), y las proteínas del suero que representan el 20% restante (β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina e inmonoglobulinas) (ALAIS, 1985; FENNEMA, 1993).

2.3.1 Caseínas. Son proteínas fosforiladas en algún grado y se encuentran en su estado normal bajo forma de fosfocaseinato cálcico en micelas estabilizadas (AMIOT, 1991; PRIMO, 1997).

Las micelas constituyen un complejo proteico altamente hidratado, que tienen forma de pequeñas partículas esféricas de 30 a 300 nm de diámetro. Se encuentran estabilizadas por puentes hidrófobos, de hidrógeno, iónicos y de calcio (AMIOT, 1991; WALSTRA *et al.*, 1999).

Su importancia en la industria radica principalmente en que determinan la estabilidad física de algunos productos lácteos durante el tratamiento térmico y concentración. Además su comportamiento es esencial en las primeras etapas de la fabricación de queso (WALSTRA *et al.*, 1999).

Las caseínas coagulan por la acción de las proteasas y por acidificación a su punto isoeléctrico pH 4,6, por esta razón se la conoce también como proteína insoluble de la leche, se caracterizan además por ser muy estables al calor (ALAIS, 1985; AMIOT, 1991; PRIMO, 1997).

Se distinguen 5 tipos de caseínas: α_{S1} -, α_{S2} -, β -, κ - y γ -caseína, que representan el 36%, 10%, 34%, 13% y 7%, respectivamente (ALAIS, 1985). Estas proteínas presentan heterogeneidad debido a algunos factores tales como: sustituciones de aminoácidos mostrado por todos los grupos; variaciones en el grado de fosforilación en el caso de las α_{S1} - y α_{S2} -caseínas; y también variaciones en el grado de glicosilación de la κ -caseína (AMIOT, 1991).

La κ -caseína (κ -CN) juega un papel esencial en la estabilización de las micelas de caseínas en presencia de calcio. Esta propiedad se debe a su estructura anfifílica. La proporción de κ -caseína varía inversamente al tamaño de las micelas, por lo tanto constituye un factor limitante del mismo. Además esta proteína, es el sustrato específico de la quimosina (cuajo) durante la primera fase de la coagulación de la leche (ALAIS, 1985; BELITZ y GROSCH, 1997).

2.3.2 Proteínas del suero. Son proteínas termosensibles y se desnaturalizan por el calor a temperaturas superiores a los tratamientos de pasteurización, perdiendo de esta manera su solubilidad (AMIOT, 1991). La inestabilidad térmica se debe en parte a la ausencia de fósforo, bajo contenido en prolina y alto contenido en cisteína, cistina y metionina (GONZALEZ DE LLANO, 1990). Cuantitativamente representan el 17% de las proteínas totales y están formadas por β -lactoglobulina, seroalbúmina, α -lactoalbúmina, inmunoglobulinas, proteosas-peptonas (ALAIS, 1985).

La β -lactoglobulina (β -Lg), es la proteína más importante del suero (50%), la

cual durante el calentamiento forma un complejo con la κ -caseína mediante un puente disulfuro, siendo este complejo más estable que sus componentes separados (ALAIS, 1985).

2.4 Coagulación de la leche

Este fenómeno se produce por la desestabilización de la solución coloidal de caseína que origina la aglomeración de las micelas libres y la formación de un gel en el que quedan atrapado el resto de los componentes de la leche (ALAIS, 1985; AMIOT, 1991).

Existen diferentes métodos de coagulación, entre ellos se pueden mencionar la coagulación ácida y la enzimática, sin embargo en la industria quesera el método más utilizado es la coagulación mixta (AMIOT, 1991). Durante la coagulación enzimática de la leche se distinguen las siguientes fases:

- Fase enzimática o “reacción primaria”: el cuajo o quimosina actúa hidrolizando la κ -caseína, a nivel del enlace fenilalanina-metionina que ocupan las posiciones 105 y 106 de la molécula respectivamente. Esta hidrólisis da lugar a la formación de dos fragmentos, la para- κ -caseína (1-105) fuertemente hidrofóbica y el glicomacropéptido (106-169) rico en residuos aminoacídicos ácidos y polares.
- Fase de coagulación o fase “secundaria”: las micelas se combinan entre sí con la ayuda de fosfato cálcico, dando lugar a la formación de un gel o coágulo que engloba la grasa, lactosa, sales y agua.
- Fase terciaria: se inicia una vez que se ha producido el cuajado de la leche, y consiste en una acción proteolítica de la caseína α y β . Finalmente, ocurre la sinéresis del coágulo, que consiste en la retracción

del coágulo con expulsión del suero (ALAIS, 1985; SCOTT, 1991; AMIOT, 1991).

2.4.1 Influencia de algunos factores sobre la coagulación enzimática de la leche. Durante la fabricación de queso, la coagulación es una etapa fundamental que determina las propiedades de la cuajada y las principales características del queso (ALAIS, 1985). Según GRANDISON (1986) y PUHAN y JAKOB (1993), las propiedades de coagulación de la leche más relevantes durante la elaboración de queso son: el tiempo de coagulación, la firmeza y la sinéresis de la cuajada. Los factores que afectan estas propiedades son:

a) Concentración de enzima:

El tiempo de coagulación es inversamente proporcional a la concentración de cuajo utilizado, es decir, a medida que aumenta la concentración disminuye el tiempo de cuajado (WALSTRA *et al.*, 1999). Según STORRY y FORD (1982b), la firmeza de la cuajada aumenta con la concentración de enzima, pero los cambios son más pequeños comparado con los efectos de la caseína, calcio, pH y temperatura de la leche.

b) Temperatura de la leche:

La temperatura juega un papel importante en la coagulación de la leche. Con temperaturas inferiores a 20°C y superiores a 50°C, el cuajo muestra muy poca actividad y sobre 65°C no se produce la coagulación (SCOTT, 1991). Expresado en términos relativos, si se considera 1,0 el tiempo de coagulación a una temperatura de 40-42°C, a 30°C será del orden de 1,4 y a 50°C de 2,3 (AMIOT, 1991).

La firmeza de la cuajada aumenta a medida que aumenta la temperatura, así, las temperaturas entre 21-27°C dan lugar a cuajadas blandas y gelatinosas. A 30°C éstas son más firmes y no se desmenuzan en pequeñas partículas al

cortarlas, mientras que a 33-36°C suelen producirse cuajadas firmes y gomosas que desueran lentamente (SCOTT, 1991).

c) Calentamiento previo de la leche:

Tiene relación con la aplicación de pasteurización en quesería. Un alto tratamiento térmico de la leche incrementa el tiempo de coagulación y el coágulo obtenido es menos firme (FOX y McSWEENEY, 1998; WALSTRA, 2000). Esto se debe en parte a la reducción de la forma ionizada del calcio y de la forma soluble de los fosfatos y citratos, además de la formación de un complejo entre κ -caseína y β -lactoglobulina (ALAIS, 1985; FOX y McSWEENEY, 1998).

En el curso del calentamiento, la β -lactoglobulina forma un complejo con la κ -caseína, el cual es menos sensible a la acción del cuajo que la κ -caseína original, de esta manera se prolonga el tiempo de coagulación y da lugar a cuajadas más blandas que desueran más lentamente (SCOTT, 1991).

La sinéresis también es influenciada por la temperatura de incubación del coágulo cortado, así al incrementar la temperatura se aumenta la expulsión del suero (CALVO y BALCONES, 2000).

d) Contenido de caseína:

Leches más ricas en caseína cuajan más fácilmente, es decir, su tiempo de coagulación es menor y el coágulo obtenido es más firme (WALSTRA *et al.*, 1999; WALSTRA; 2000). Se han determinado correlaciones altamente significativas (0,73-0,90) entre la firmeza del gel y el contenido total de caseína, observándose que a medida que la leche presenta mayor contenido de caseína la cuajada obtenida es más firme (STORRY *et al.*, 1982; GRANDISON *et al.*, 1984a; GRANDISON *et al.*, 1984b).

e) Sales de Ca^{++} :

La presencia de sales de calcio en forma de iones libres, afecta solamente la fase secundaria o de coagulación. Cuando el contenido en calcio en la leche es anormalmente bajo, la coagulación es lenta y se obtiene una cuajada muy blanda (AMIOT, 1991; WALSTRA, 2000). Durante la fabricación de queso, para corregir este defecto se añade a la leche cloruro cálcico hasta cierto límite, ya que dosis elevadas provocan aumento en el tiempo de coagulación y producen cuajadas blandas, debido a que las fuerzas iónicas de las proteínas del suero aumentan, causando además la retención de suero en la cuajada (MARSHALL, 1982; STORRY y FORD, 1982b).

f) pH:

En un medio alcalino, el cuajo se inactiva y la leche no coagula. Por el contrario un descenso del pH provoca una reducción del tiempo de coagulación y un aumento en la firmeza del gel (STORRY y FORD, 1982b). Esto debido a que la acidez reduce la carga eléctrica de la caseína facilitando de esta forma la acción del cuajo (AMIOT, 1991; FOX y McSWEENEY, 1998).

Si la leche ha sido acidificada antes de la coagulación, la sinéresis es más rápida, posiblemente porque la carga micelar es reducida, por la repulsión electrostática entre las micelas (CALVO y BALCONES, 2000).

2.5 Polimorfismo genético de las proteínas lácteas

El término polimorfismo proteico es utilizado para indicar las múltiples formas que una determinada proteína puede presentar en los líquidos y tejidos biológicos. Cuando este polimorfismo obedece a causas hereditarias se denomina polimorfismo genético. El término variante se usa para indicar diferente forma de proteína ligeramente modificada en su estructura primaria. Si la variante tiene origen hereditario se denomina variante genética y el

conjunto de variantes de una proteína constituye el denominado polimorfismo de esta proteína (ESCODA *et al.*, 1981).

Según ALAIS (1985), las variantes genéticas de una proteína se diferencian por la sustitución de unos pocos aminoácidos en el interior de las cadenas peptídicas, aunque también puede haber una delección, es decir, falta un resto en una cadena.

Las diferentes variantes genéticas de las proteínas lácteas son controladas por genes autosómicos, los cuales son transmitidos desde los padres a la descendencia en forma mendeliana (MEDRANO y SHARROW, 1989; Aschffenburg citado por GONZALEZ de LLANO, 1990). Los bovinos heredan de cada progenitor un alelo A o B, conformándose así los genotipos homocigóticos AA o BB, y el genotipo heterocigótico AB (Medrano citado por FELMER y BUTENDIECK, 1998).

Desde hace algunas décadas hay evidencia que el comportamiento tecnológico de la leche, particularmente en la elaboración de queso, está influenciada por características hereditarias de las vacas. Sin embargo, aunque numerosos estudios demostraron que el comportamiento tecnológico de la leche está relacionado con la composición, por ejemplo contenido de proteína y sales, esto no podría explicar enteramente las diferencias en las propiedades tecnológicas de leche de vacas individuales y razas. La detección del polimorfismo genético de las proteínas lácteas ofrece nuevas explicaciones sobre este tema. Se ha demostrado la influencia que tienen las variantes genéticas de las principales proteínas lácteas sobre la composición y propiedades tecnológicas de la leche (PUHAN y JAKOB, 1993).

El polimorfismo de la β -lactoglobulina fue el primero en ser estudiado, y posteriormente los componentes genéticos del resto de las proteínas lácteas

(α_{S1} , α_{S2} , β , y κ -caseínas, y α -lactoalbúmina) (GONZALEZ de LLANO, 1990).

En el CUADRO 3 se presenta las variantes genéticas existentes en las principales proteínas de la leche.

CUADRO 3. Variantes genéticas de las principales proteínas lácteas.

Proteína	Variante
α_{S1} -CN	A, B, C, D, E
α_{S2} -CN	A, B, C, D
β -CN	A ¹ , A ² , A ³ , B, C, D, E
κ -CN	A, B
β -lactoglobulina	A, B, C, D, E, F, G
α -lactoalbúmina	A, B

FUENTE: EIGEL *et al.* (1984)

Las diferencias en la carga neta de la molécula de las proteínas, permiten la separación y detección de las variantes por electroforesis (MEDRANO y SHARROW, 1989; NG-KWAI-HANG, 1997). Así, se han realizado separaciones en geles de almidón, agarosa o poliacrilamida, sin embargo, en los últimos años se han obtenido mejores resultados mediante electroforesis de isoenfoque (GONZALEZ de LLANO, 1990). El polimorfismo bioquímico se detecta en forma de bandas con diferente movilidad electroforética, constituyendo este su fenotipo (UFFO *et al.*, 2000)

Estas variantes no aparecen al azar, ni con la misma frecuencia, mientras que unas son universales, otras son exclusivamente de alguna raza (GONZALEZ de LLANO, 1990). Por ejemplo, la variante A de κ -caseína es predominante en la raza Holstein y Ayrshires, mientras la variante B predomina en la raza Jersey.

De las variantes genéticas de β -caseínas, la variante A es la más frecuente entre estas razas lecheras (MEDRANO y SHARROW, 1989).

2.5.1 κ -caseína. Se han identificado 4 variantes genéticas de κ -CN (A, B, C, E) (HORNE *et al.*, 1997). Sin embargo las variantes mas comunes son la A y B, que se diferencian por la sustitución de treonina por isoleucina en la posición 136, y el residuo ácido aspártico por alanina en la posición 148 (EIGEL *et al.*, 1984; HORNE *et al.*, 1996; FELMER y BUTENDIECK, 1998).

En el CUADRO 4 se presenta las sustituciones de aminoácidos de las variantes de κ -caseína.

CUADRO 4. Sustitución de aminoácidos de las variantes genéticas de κ -CN.

Variante κ -caseína	Posición				
	81	97	136	148	155
A			Thr	Asp	Ser
B	Asp	Arg	Ile	Ala	
C	Asn	His			
E					Gly

FUENTE: CREAMER y HARRIS (1997)

La variante A de la κ -caseína tiende a predominar en la mayoría de las razas bovinas, con excepción de la Jersey (EIGEL *et al.*, 1984; GONZALEZ de LLANO, 1990).

En el CUADRO 5 se presenta la frecuencia génica de κ -CN en algunas razas lecheras. Como puede observarse en este cuadro, poblaciones de razas similares (Frisón Negro y Holstein) ubicadas distantes unas de otras no se diferencian en la frecuencia génica de κ -caseína, presentando una mayor

frecuencia del alelo A. Sin embargo, la raza Jersey difiere de las otras y presenta mayor frecuencia del alelo B de esta proteína.

CUADRO 5. Frecuencia génica de κ -caseína en distintas razas lecheras.

Raza	Frecuencia génica de κ -CN	
	A	B
Holstein (USA) ¹	0,89	0,11
Frisón Negro Danés ¹	0,85	0,15
Frisión Negro Chileno ¹	0,82	0,18
Jersey (USA) ²	0,12	0,88

FUENTE: ¹ FELMER y BUTENDIECK (1998); ² GONZALEZ de LLANO (1990)

2.5.2 β -lactoglobulina. Debido a la fácil purificación de esta proteína se han realizado numerosos estudios físico-químicos y es la proteína láctea mejor conocida (GONZALEZ de LLANO, 1990).

Se han descrito 7 variantes genéticas de β -lactoglobulina (A, B, C, D, E, F y G), aunque sólo las variantes A y B son las más comunes, y se diferencian en la composición de los aminoácidos 64 y 118 (EIGEL *et al.*, 1984; RODELLAR *et al.*, 1992; CREAMER y HARRIS, 1997), lo cual se observa en el CUADRO 6.

CUADRO 6. Sustitución de aminoácidos de las variantes de β -Lg.

Variante β -lg	Posiciones							
	45	50	59	64	78	118	129	158
A				Asp		Val		
B	Glu	Pro	Gln	Gly	Ile	Ala	Asp	Glu
C			His					
D	Gln							

E								Gly
F		Ser					Tyr	Gly
G					Met			Gly

FUENTE: EIGEL *et al.* (1984).

Las variantes A y B de β -lactoglobulina son predominantes en raza Holstein (SABOUR *et al.*, 1993). En el CUADRO 7 se presenta la frecuencia génica de los polimorfismos más comunes de β -lactoglobulina según la raza.

Según se observa en el cuadro, las variantes A y B de β -lactoglobulina tienen similar frecuencia en la raza Holstein, sin embargo, para la raza Jersey y Guernsey predomina la variante B de esta proteína.

CUADRO 7. Frecuencia génica de las variantes más comunes de β -lactoglobulina según la raza.

Raza	Frecuencia génica de β -lg	
	A	B
Holstein (USA)	0,50	0,50
Holstein (Australia)	0,51	0,49
Guernsey (USA)	0,38	0,62
Jersey (USA)	0,36	0,64

FUENTE: GONZALEZ de LLANO (1990)

2.6 Polimorfismo genético de las proteínas lácteas y su relación con las propiedades de coagulación de la leche

Desde el descubrimiento de las variantes genéticas en 1955 se han realizado numerosos trabajos con el fin de relacionar el polimorfismo de las proteínas con la producción, composición y propiedades tecnológicas de la leche (GONZALEZ de LLANO, 1990; HORNE *et al.*, 1996). Como consecuencia, las variantes

genéticas han recibido gran interés dentro de la industria láctea, en particular, por la asociación bien confirmada con las propiedades de elaboración de quesos (JAKOB, 1994).

No hay conclusiones definitivas del efecto del polimorfismo sobre la producción de leche. Así, algunos estudios (McLEAN *et al.*, 1984; NG-KWAI-HANG *et al.*, 1990), no encontraron diferencias en la producción de leche con diferentes fenotipos de β -lactoglobulina y κ -caseína. Por el contrario, para la misma raza lechera, otros indicaron una mayor producción de leche asociada al fenotipo AA de β -lactoglobulina (NG-KWAI-HANG *et al.*, 1986; ALEANDRI *et al.*, 1990) y el fenotipo AB de κ -caseína (NG-KWAI-HANG *et al.*, 1986).

La mayoría de las investigaciones han reportado la asociación entre el polimorfismo de las proteínas con los dos principales componentes de la leche, grasa y proteína, los cuales tienen relevancia económica (NG-KWAI-HANG, 1997). Según, NG-KWAI-HANG *et al.* (1986), queda demostrado que además de los factores ambientales ya conocidos, la composición de la leche también puede ser influenciada por las variantes genéticas de las proteínas lácteas.

Algunas investigaciones concuerdan que la variante B de κ -caseína está asociada con mayor contenido de grasa, proteína total y caseína (NG-KWAI-HANG *et al.*, 1986; ALEANDRI *et al.*, 1990; VAN DEN BERG, 1993; NG-KWAI-HANG, 1997). En un estudio más tarde y con otra población de vacas Holstein, el mismo grupo de autores (NG-KWAI-HANG *et al.*, 1990), reportó mayor contenido de grasa asociado con la variante A de esta proteína. Por otra parte, McLEAN *et al.* (1984), señalan que no existe relación entre las variantes de κ -CN y contenido de grasa y proteína en la leche.

El fenotipo BB de κ -caseína fue asociado con más alto porcentaje de proteína, caseína y más bajo porcentaje de proteína del suero, lo que resulta en un número más alto de caseína. Los valores para estos cuatro componentes fueron respectivamente: 3,44%, 2,75%, 0,69 y 80,06 para κ -caseína BB, comparado con 3,37%, 2,65%, 0,71 y 78,91 para κ -caseína AA (VAN DEN BERG, 1993).

La composición de la leche también puede variar de acuerdo al fenotipo de β -lactoglobulina. Un estudio en Nueva Zelanda presentó que leche recolectada de vacas con fenotipo AA de β -lactoglobulina tuvieron 28% más de proteína del suero, 7% menos de caseína, 11% menos de grasa y 6% menos de sólidos totales, que leche de vacas con fenotipo BB de β -lactoglobulina (HILL, 1993). Estos resultados de mayor concentración de caseína y menor concentración de proteína del suero en leche de vacas con fenotipo BB, fueron consistentes con estudios previos (McLEAN *et al.*, 1984; MARZIALI y NG-KWAI-HANG, 1986b; ALEANDRI *et al.*, 1990). Por tal motivo, la leche con fenotipo BB de β -lactoglobulina es deseable para la elaboración de quesos porque aumenta el rendimiento (McLEAN *et al.*, 1984; NG-KWAI-HANG *et al.*, 1986; ALEANDRI *et al.*, 1990; SABOUR *et al.*, 1993; JAKOB y PUHAN, 1995; BOLAND y HILL, 2001).

Al respecto, se han informado mayores rendimientos en quesos Parmesano, Svecia y Cheddar, hechos con leches que contienen la variante B de β -lactoglobulina. Este incremento se debe a la asociación de β -lactoglobulina B con mayor número de caseína y contenido de grasa (FITZGERALD y HILL, 1997).

Según NG-KWAI-HANG (1997), el contenido de caseína más bajo asociado con la variante A de β -lactoglobulina, es debido a bajas concentraciones de α -, β -, y κ -caseína. Además, los niveles más altos de proteína del suero en la leche

con β -lg A, puede ser explicado por una mayor síntesis de β -lactoglobulina en las vacas con variante A.

Las propiedades más importantes de la leche para la elaboración de quesos son el tiempo de coagulación, firmeza y sinéresis de la cuajada, las cuales influyen directamente en el rendimiento, por esta razón, desde el punto de vista económico estos parámetros son relevantes para la industria láctea (GRANDISON, 1986; MACHEBOEUF *et al.*, 1993; PUHAN y JAKOB, 1993).

Estas propiedades son influenciadas por la composición de la leche, así, cualquier factor genético o ambiental que afecta la composición podría esperarse también que afecte las propiedades de procesamiento de la leche tales como el tiempo de coagulación y la firmeza de la cuajada (MARZIALLI y NG-KWAI-HANG, 1986a).

Según GRANDISON (1986), es interesante destacar que los diferentes fenotipos de β -lactoglobulina están asociados a las propiedades de coagulación de la leche durante la elaboración de quesos, aunque esta proteína del suero puede no intervenir en la formación de la cuajada. La explicación probablemente se debe al mayor contenido de caseína y grasa asociado con ciertas variantes de esta proteína (LAWRENCE, 1993).

La variante B de κ -caseína está relacionada con propiedades favorables de coagulación, como un menor tiempo de coagulación y la formación de una cuajada más firme, y además con mayor rendimiento comparado con la variante A (SCHAAR, 1984; RAHALI y MENARD, 1991; HORNE *et al.*, 1996; JAKOB y PUHAN, 1995; LODES *et al.*, 1996; FITZGERALD y HILL, 1997).

Estas propiedades de coagulación favorables con la variante B de κ -caseína, han sido asociadas con niveles más altos de caseína (SCHAAR, 1984), mayor

contenido de calcio y mayor número de caseína (MARZIALI y NG-KWAI-HANG, 1986b; VAN DEN BERG, 1993), mayor contenido de κ -caseína (AALTONEN y ANTILA, 1987) y con tamaño de micelas más pequeñas (LODES *et al.*, 1996) Así, también se ha relacionado con mayor proporción de κ -CN como porcentaje de caseína total, por lo tanto, las micelas de caseína son más pequeñas en promedio y éstas requieren menos acción del cuajo que las micelas grandes para permitir la coagulación (JAKOB y PUHAN, 1995; HORNE *et al.*, 1996; HORNE *et al.*, 1997; McLEAN *et al.*, 1984).

Las diferencias en las cargas eléctricas entre las variantes de κ -CN también influyen en la interacción entre las micelas de caseína. Así, las variantes genéticas de caseína con menos cargas negativas (κ -CN B), son asociadas con reducidos tiempos de coagulación e incremento en la firmeza de la cuajada, en comparación con las variantes más cargadas (κ -CN A) (SCHAAR, 1984).

El tamaño de las micelas de caseína está relacionado con las propiedades de coagulación de la leche, especialmente con la firmeza del coágulo. De acuerdo a algunas investigaciones, leche con micelas pequeñas coagula más rápido y el coágulo formado es más firme (GRANDISON, 1986; PUHAN y JAKOB, 1993). Además, se ha comprobado que leches con κ -caseína B contienen un 40% más de micelas pequeñas, comparado con leches que presentan κ -caseína A. Entonces, esto quizás explicaría la razón por qué leches que contienen κ -caseína B presentan mejores propiedades de coagulación (PUHAN y JAKOB, 1993). Este coágulo más denso retiene una mayor proporción de sólidos en la cuajada, y por lo tanto se tiene como resultado el incremento en el rendimiento final del queso (JAKOB y PUHAN, 1995).

La variante B de β -Lg también ha sido asociada con cuajadas más firmes (Sherbon *et al.* citado por ALEANDRI, 1990; LODS *et al.*, 1996). Según

SCHAAR (1984), el mayor contenido de caseína en la leche con variante B, da como resultado tiempos de coagulación más cortos y cuajadas más firmes al momento del corte en el proceso de elaboración de quesos. Además, está bien documentado que el contenido de caseína influye positivamente en la firmeza de la cuajada (STORRY *et al.*, 1982; GRANDISON *et al.*, 1984a; GRANDISON *et al.*, 1984b; MARZIALLI y NG-KWAI-HANG, 1986a).

Sin embargo, un estudio realizado en vacas Holstein determinó que el fenotipo AA de β -lactoglobulina está asociado con menor tiempo de coagulación y la formación de una cuajada más firme, comparado con la leche de fenotipo AB y BB (MARZIALLI y NG-KWAI-HANG, 1986a). Al respecto, IKONEN *et al.*, 1999, determinaron un tiempo de coagulación mas corto en leche de vacas Friesian de fenotipo AA de β -lactoglobulina, pero la firmeza de la cuajada no fue afectada.

Sin embargo, AALTONEN y ANTILA (1987), determinaron que las variantes de β -lactoglobulina no tuvieron ningún efecto sobre las propiedades de coagulación de la leche, y tampoco sobre el contenido de proteína y caseína, en leche de vacas Friesian.

La sinéresis es importante durante la elaboración de quesos, porque la cantidad de suero expulsado influye directamente en el contenido de humedad final del queso (CALVO y BALCONES, 2000). Se han publicado sólo unos pocos estudios sobre la sinéresis de la cuajada realizada con diferentes variantes de proteínas lácteas. PUHAN y JAKOB (1993), indicaron que el drenaje del suero con la variante B de κ -caseína fue más intenso, lo que es favorable para la elaboración de quesos como el Parmesano, Gouda y Svecia, que son quesos con bajo contenido de humedad.

La sinéresis está directamente relacionada con el contenido de grasa en la leche, así cuando el contenido de grasa es alto, el número de lugares dentro de

la red que son ocupados por los glóbulos grasos aumenta, dejando que el suero drene más fácilmente (STORRY *et al.*, 1982; GRANDISON, 1986; CALVO y BALCONES, 2000)

PUHAN y JAKOB (1993), observaron que los quesos elaborados con leche de κ -caseína B perdieron cerca del 15% de peso dentro de las primeras 24 horas comparado con el queso de leche con κ -caseína A, lo que indica una sinéresis más intensa en la cuajada con κ -CN BB. Por su parte VAN DEN BERG (1993) y JAKOB (1994), concuerdan que en la elaboración de queso Gouda el contenido de humedad fue levemente más bajo con κ -CN B, indicando mayor expulsión del suero de la cuajada.

Sin embargo, según SCHAAR (1985), quien investigó la influencia de las variantes de κ -caseína sobre la elaboración del queso Svecia, no encontró diferencia significativa en el contenido de humedad entre los quesos elaborados con κ -caseína A y B, debido a que este tipo de queso es elaborado a una temperatura de cocción más baja (41°C) comparado con otros quesos como el Parmesano, cuya temperatura de cocción es 55°C y presenta una sinéresis más intensa. Su estudio concluyó que el efecto de las variantes de κ -caseína sobre la sinéresis se observa principalmente en quesos elaborados con temperaturas más altas de cocción, como el Parmesano, porque la temperatura tiene una directa relación con la expulsión del suero.

MACHEBOEUF *et al.*, (1993), observaron menor drenaje del suero en leche con κ -caseína B, y lo asociaron a la más baja proporción de grasa: proteína de esta leche, debido a que la retención de agua en la cuajada incrementa cuando esta proporción decrece.

McLEAN y SCHAAR (1989), determinaron la influencia de las variantes A y B de κ -caseína y β -lactoglobulina sobre la sinéresis de la cuajada, y concluyeron que leches con variante B de κ -CN y β -Lg presentaron mayor y menor drenaje del suero, respectivamente.

Las propiedades de coagulación de la leche, consideradas fundamentales en la elaboración de queso, se relacionan entre ellas, y es así como aquellas leches que poseen una baja aptitud de coagulación presentarán cuajadas blandas y sinéresis defectuosa por desuerado incompleto, dando origen a un producto con propiedades químicas desfavorables, como por ejemplo mayor grado de humedad en el queso (WALSTRA *et al.*, 1999).

Con respecto a la fabricación de quesos, se ha observado mayores rendimientos en quesos Parmesano, Suecia (SCHAAR, 1985), Cheddar (MARZIALI y NG-KWAI-HANG, 1986b) y Camembert (RAHALI y MENARD, 1991), desde un 1 al 10%, asociado con la variante B de κ -caseína. Este incremento en el rendimiento ha sido relacionado al mayor contenido de caseína (JAKOB, 1994), mayor retención de grasa en la cuajada, y menos grasa y finos en el suero, con esta variante (FITZGERALD y HILL, 1997).

La mayoría de estos estudios ha asociado las ventajas en el rendimiento de queso elaborado a partir de leche con variante B de κ -caseína, con un mayor contenido de grasa y caseína. Sin embargo, HORNE *et al.* (1996), elaboraron queso Cheddar a escala piloto, para comparar el rendimiento del producto utilizando como materia prima leches con variante A y B de κ -CN, durante una lactación completa. Los resultados indicaron, que independiente de la composición de la leche (concentración de caseína y grasa), se observaron propiedades superiores de coagulación con variante B de κ -CN, lo que se

tradijo en mayor eficiencia en el proceso y mayor rendimiento, que en el queso fabricado a partir de leche con variante A.

3. MATERIAL Y MÉTODO

3.1 Materiales

3.1.1 Obtención de muestras. Se utilizaron muestras de leche obtenidas de 10 vacas individuales que conforman un rebaño de bovinos de la raza Frisón Negro chileno, pertenecientes al Fundo Santa Rosa de la Universidad Austral de Chile, provincia de Valdivia.

Las muestras se obtuvieron de acuerdo a la Norma Chilena NCh 1011/1 (CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACION, 1998) y se recolectaron durante la ordeña de la mañana.

3.1.2 Muestreo. Las vacas seleccionadas para el muestreo de leche eran de parto otoño-invierno, de primera lactancia y se encontraban en el 6^{to} mes de lactación al comienzo del experimento. Los animales fueron alimentados durante la primavera, con una dieta homogénea basada en pradera permanente, concentrado, y sales minerales (ANEXO 1). Además, al momento de la obtención de las muestras se aplicó una encuesta que se presenta en el ANEXO 2.

Se realizaron cuatro muestreos durante los meses de septiembre, octubre, noviembre y diciembre del año 2001, que corresponden a la estación de primavera. A su vez, cada muestreo se dividió en dos sub-muestreos de 5 vacas elegidas al azar, con la finalidad de realizar todos los análisis a las muestras de leche dentro de las primeras 24 horas posteriores al muestreo, y también se analizó la leche mezclada proporcionalmente de cada sub-muestreo.

3.1.3 Diseño experimental. El diseño experimental utilizado incluyó como factores de variación el mes de muestreo, las variantes de κ -caseína y β -lactoglobulina, para medir su efecto sobre las propiedades de coagulación de la leche (CUADRO 8).

CUADRO 8. Diseño experimental.

Muestras	Factores		Respuesta	
	Muestreo	Variantes de Proteínas		
1	Septiembre Octubre Noviembre Diciembre	κ -caseína	Aptitud a la coagulación Firmeza del Gel Sinéresis de la cuajada.	
2				A
3				B
4				
5				
6				
7	Diciembre	β -lactoglobulina	Aptitud a la coagulación Firmeza del Gel Sinéresis de la cuajada.	
8				A
9				B
10				

3.1.4 Análisis de las muestras. Las muestras de leche fueron analizadas en el Laboratorio de Química del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL) de la Universidad Austral de Chile. Los análisis de las muestras de leche se realizaron en duplicado.

3.2 Metodología

- a) Determinación del tiempo de coagulación. El tiempo de coagulación se determinó por el método de Berridge, según IDF-FIL (1987). Esta técnica consiste en mezclar cantidades conocidas de solución enzimática

y sustrato, a temperatura constante, y luego medir el tiempo requerido hasta visualizar el punto final de floculación.

El tiempo requerido por la solución diluída de enzima para producir la floculación del sustrato fue de 7,23 min.

En este estudio se utilizó como enzima coagulante, un cuajo en polvo HA-LA Laboratorio Christian Hansen, con una fuerza de 1:20.000 (g cuajo / mL leche).

- b) Determinación de pH. Se realizó la medición a todas las muestras de leche, según NCh 1671 (CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACION, 1979).
- c) Preparación de las muestras para electroforesis. Las muestras de κ -caseína se prepararon a partir de leche de vacas individuales, según la metodología descrita por McKENZIE y WAKE (1961) (ANEXO 3). La preparación de las muestras se realizó hasta la separación de las caseínas sensibles al ión calcio precipitadas por calentamiento a 35°C.

La preparación de las muestras para β -lactoglobulina se realizó por medio de precipitación ácida, de acuerdo al método desarrollado por LOWE *et al.* (1995) (ANEXO 3).

Una vez preparadas las muestras, se determinó el contenido de proteína en el extracto de κ -caseína y β -lactoglobulina, con la ayuda de una curva de calibración de acuerdo al método descrito por LOWRY *et al.* (1951) (ANEXO 4).

- d) Electroforesis de Isoenfoque. La identificación de las variantes genéticas se realizó por electroforesis de isoenfoque, según la metodología

descrita por PEARCE *et al.* (1972) y ADDEO *et al.* (1983) modificada por CASANOVA (2001) (ANEXO 5).

En la preparación del gel, la modificación de CASANOVA (2001) consistió en la utilización de persulfato de amonio (0,37%) en lugar de riboflavina (0,004%). Durante la pre-corrída de los geles se aumentó el tiempo en 30 min al aplicar 400 V, y en la corrída se aumentó en 1 hora. Tanto la pre-corrída como la corrída de los geles, se realizaron desde el cátodo al ánodo bajo condiciones de refrigeración. Además se utilizó un anfólito con distinto gradiente de pH (3,5 –10) y en la corrída se aplicó un voltaje diferente.

Los estándares comerciales utilizados fueron: κ -CN (Sigma C-0406), β -Lg A (Sigma L-5137) y β -Lg B (Sigma L-7880). Además, se utilizaron dos estándares de κ -CN purificados por CASANOVA (2001), que corresponden a vacas Jersey (4052-2 y 3971-1).

La cantidad de muestra utilizada en todas las corrídas de electroforesis fue de 10 μ g, y el volumen de muestra agregado varió dependiendo del contenido de proteína en las muestras (ANEXO 6). Una vez realizada la electroforesis, se midió la distancia que migró la proteína (κ -CN y β -Lg) desde el ánodo al cátodo, para de esta forma poder identificar las variantes genéticas.

Las bandas previamente teñidas fueron cuantificadas por densitometría a 590 nm, utilizando el equipo Pye Unicam modelo SP8-100. La proporción de la expresión de las variantes A y B de las proteínas, se determinaron a través del cálculo del área de los picos dibujados por el densitómetro.

- e) Determinación de la aptitud a la coagulación. Para determinar la aptitud a la coagulación de la leche, se utilizó el método de fuerza del cuajo, según ALAIS (1985), modificado por CORTEZ (2001), sin la adición de CaCl_2 . Esta prueba consiste en temperar 100 mL de leche a 35°C, luego agregar 4 mL de una solución de cuajo al 1% (cuajo en polvo HA-LA Lab. Christian Hansen), y finalmente tomar el tiempo transcurrido hasta que cae la última gota.

- f) Determinación de la firmeza del gel. Para determinar la firmeza del gel de las muestras de leche se utilizó el equipo INSTRON 1011, de acuerdo al método desarrollado por STORRY y FORD (1982a) y modificado por CORTEZ (2001), que consistió en medir la firmeza de la cuajada a 2 cm de profundidad, utilizando un transductor de baja capacidad (500 N), un penetrómetro de 1,5 cm de diámetro y una velocidad de 2 mm / min.

El método consiste en temperar 100 mL de leche a 35°C, y luego adicionar 2mL de una solución de cuajo al 2% (cuajo en polvo HA-LA Lab. Christian Hansen). Posteriormente, mantener la muestra en baño María (35°C) por 30 minutos y luego realizar la medición en el equipo Instron, previamente calibrado.

- g) Medición cuantitativa de la sinéresis. Esta determinación se realizó según MARSHALL (1982), y consistió en adicionar 1 mL de solución de cuajo al 1% (cuajo en polvo HA-LA Lab. Christian Hansen) a 50 mL de leche temperados a 35°C en baño María. Luego de 30 min se cortó la cuajada en forma de cruz con la ayuda de una espátula delgada. Después de 15 minutos, se midió cuantitativamente el volumen de suero desprendido de la cuajada, por medio de una probeta.

3.3 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron estadísticamente a través de análisis de varianza multifactorial (ANDEVA) con un 95% de confianza, utilizando el software Statgraphics Plus 2.0, con el objetivo de establecer si los factores: mes de muestreo, variantes de κ -caseína y β -lactoglobulina tienen influencia sobre las propiedades de coagulación de la leche estudiadas. Cuando estos factores resultaron significativos, se aplicó la prueba de Tukey 95% para la comparación de los promedios.

También se determinaron correlaciones entre los parámetros medidos: aptitud a la coagulación, firmeza del gel, sinéresis de la cuajada y pH de la leche.

Además, se calculó la repetibilidad de los métodos utilizados para determinación de la aptitud a la coagulación, firmeza del gel y sinéresis de la cuajada, de acuerdo a la siguiente expresión (IDF-FIL, 1985):

$$Sr = \left(\frac{1}{2 \cdot q} \right) \cdot \sum w_i^2 \Big)^{1/2}$$
$$r = (2 \sqrt{2}) \cdot Sr = 2,8 \cdot Sr$$

donde:

Sr : desviación estándar de la repetibilidad

q : número de muestras

r : repetibilidad

4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Identificación de las variantes genéticas A y B de κ -caseína

Según ADDEO *et al.* (1983), y de acuerdo a los resultados obtenidos por CASANOVA (2001), se consideró que la variante A de κ -CN es la proteína que migra en primer lugar por tener un pI (7,1) levemente más ácido que la variante B, la cual corresponde a la proteína que migra después con un pI (7,3).

En el CUADRO 9 se presenta el rango de migración medido desde el ánodo, de las variantes de κ -caseína obtenidas en las 10 muestras de leche de vacas individuales. Este rango de migración de las proteínas para cada muestra, representa un promedio de los cuatro muestreos. En el ANEXO 7 se presentan los resultados de todas las mediciones.

Los estándares de la κ -CN A en las diferentes corridas migraron a una distancia desde el ánodo entre 25,1 a 33,8 mm, y los estándares de κ -CN B entre un rango de 30,1 a 34,9 mm. Para el cálculo de los rangos de migración de las muestras y los estándares, no se consideró el muestreo 2, puesto que el frente iónico no fue observado en ninguno de los geles, probablemente debido a que se dio un mayor tiempo de corrida en esa electroforesis, pero en el ANEXO 7 se presentan los resultados de esta determinación.

Las diferencias de migración obtenidas tanto en los estándares como en las muestras, se debe principalmente a las variaciones de voltaje o a la fuerza iónica que se pueden producir en la electroforesis, ya que esto influye directamente en la movilidad de las proteínas (HAMES, 1998).

CUADRO 9. Variantes genéticas obtenidas en las muestras de κ -caseína.

Vaca	Rango de migración¹ desde el ánodo (mm)	Variante de κ-CN
636	[28,7 – 34,9]	B
596	[29,1 – 35,3]	B
642	[29,5 – 34,6]	B
546	[29,7 – 34,2]	B
591	[29,7 – 34,5]	B
633	[30,0 – 34,9]	B
639	[30,1 – 36,0]	B
644	[33,1 – 35,2]	B
579	[28,3 – 33,5]	A
560	[27,4 – 33,1]	A

¹ Rango promedio de los cuatro muestreos

En las muestras semipurificadas de κ -CN no se obtuvo la presencia de las variantes A y B en conjunto, solamente se observó una banda por muestra, esto debido probablemente a que las muestras de κ -caseína no se encontraban totalmente purificadas, a diferencia del estudio de CASANOVA (2001).

En la FIGURA 1 se presenta los resultados del análisis de electroforesis con las muestras semipurificadas de κ -caseína.

Debido a que solamente se observó la presencia de una sola variante de κ -caseína en todas las muestras de leche, no se realizó el análisis de densitometría. Además, es importante destacar, que de las 10 vacas

estudiadas solamente 2 presentaron la variante A de κ -CN, y 8 la variante B de esta proteína.

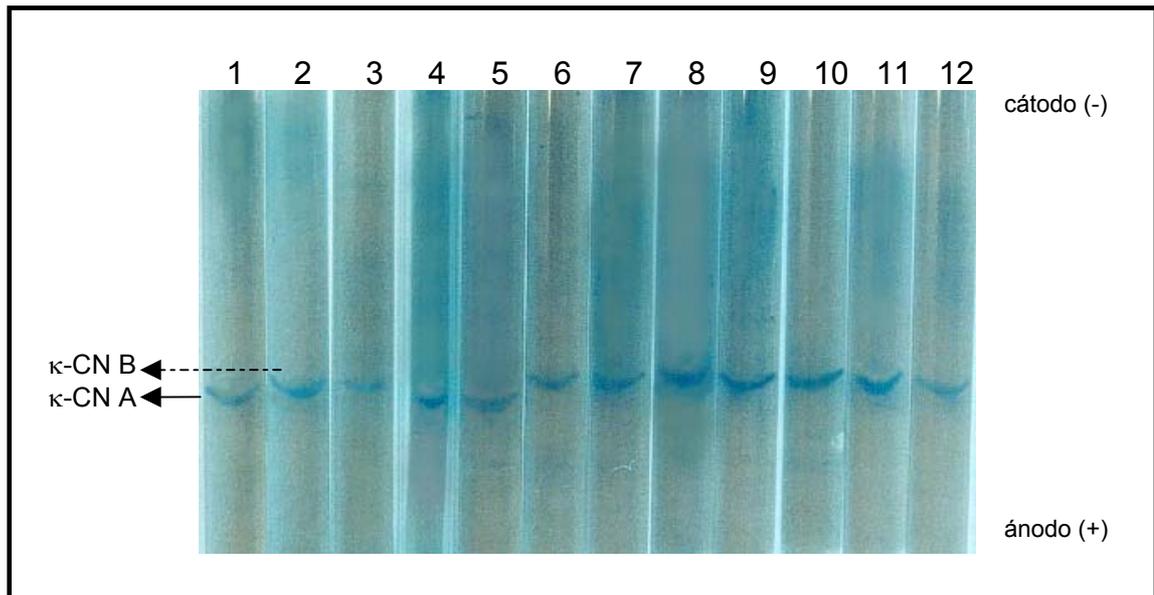


FIGURA 1. Electroforesis de isoenfoque de κ -caseína en leche de vacas Frisón Negro.

1. St. 4052-2 (AB), 2. St. 3971-1 (AB), 3. 546, 4. 560, 5. 579, 6. 591, 7. 596, 8. 633, 9. 636, 10. 639, 11. 642, 12. 644

4.2 Identificación de las variantes genéticas A y B de β -lactoglobulina

Para la identificación de las variantes A y B de β -lactoglobulina, se determinó que el estándar de β -Lg A migra en primer lugar por tener un punto isoelectrico (pI) levemente mas ácido (pI 5,3) que el estándar B de β -Lg, el cual presenta un pI de 5,4 (LOWE *et al.*, 1995; CASANOVA, 2001).

En el CUADRO 10 se presenta el promedio de las distancias de migración medidas desde el ánodo (mm), de las muestras preparadas con β -lactoglobulina y las variantes obtenidas en cada una de ellas. Los resultados de las muestras individuales en cada muestreo se presentan en el ANEXO 8.

Se puede observar en este cuadro, que 7 de las 10 muestras de leche de vacas individuales presentaron las variantes genéticas A y B de β -lactoglobulina, y solamente 3 vacas presentaron la variante genética A de esta proteína.

CUADRO 10. Variantes genéticas obtenidas en las muestras de β - Lg.

Muestra	Promedio de migración ¹ desde el ánodo (mm)	Promedio de migración de estándares (mm)	Variante
	A y B	St. β -Ig A y St. β -Ig B	
636	15,42 y 17,56	15,16 y 17,67	A y B
579	15,95 y 17,99	15,40 y 17,40	A y B
596	15,19 y 17,59	14,94 y 17,35	A y B
546	14,93 y 17,12	14,94 y 17,35	A y B
591	15,54 y 17,93	15,40 y 17,40	A y B
633	15,45 y 17,05	15,40 y 17,40	A y B
644	15,51 y 16,94	15,40 y 17,40	A y B
639	15,55	15,50 y 17,27	A
642	14,95	15,40 y 17,40	A
560	15,52	15,40 y 17,40	A

¹ promedio de los cuatro muestreos

En la FIGURA 2 se presenta los resultados del análisis de electroforesis en las muestras preparadas con β -lactoglobulina, donde además de las variantes A y B de esta proteína, se observa una banda que migró posteriormente y que correspondería a la α -lactoalbúmina, no separada completamente durante la preparación de las muestras. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por LOWE *et al.*, (1995), quienes también observaron en todas las muestras, la presencia de la α -lactoalbúmina.

La cuantificación de la expresión de las variantes A y B de β -lactoglobulina se determinó por densitometría, a través del cálculo del área de los picos dibujados por el densitómetro.

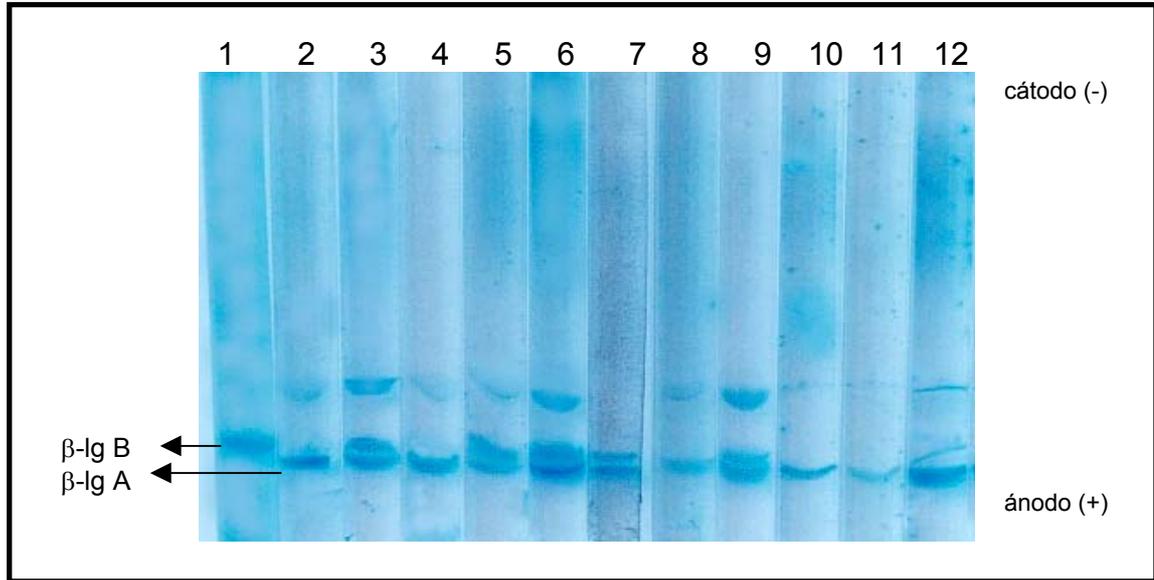


FIGURA 2. Electroforesis de isoenfoque de β -lactoglobulina en leche de vacas Frisón Negro.

1. St. β -Ig B, 2. St. β -Ig A, 3. 546, 4. 560, 5. 579, 6. 591, 7. 596, 8. 633, 9. 636, 10. 639, 11. 642, 12. 644

En la FIGURA 3 se presenta los densitogramas obtenidos de las 10 muestras de leche de vacas individuales Frisón Negro. Se puede apreciar en esta figura que las muestras # 560, 639 y 642 presentan una sola banda que corresponde a la variante A de β -lactoglobulina.

En el CUADRO 11 se presenta la proporción de la expresión de las variantes A y B de β -lactoglobulina en las muestras de leche. Según se observa, todas las muestras de leche de vacas individuales presentaron una mayor proporción de la expresión de la variante A de β -lactoglobulina.

Estos resultados concuerdan con Ng-Kwai-Hang y Grosclaude citados por BOLAND y HILL (2001), quienes determinaron que la variante A de β -lactoglobulina tiene una mayor expresión que la variante B en leche de vacas heterocigotas AB. El mas alto nivel de expresión de esta variante ha sido ligado a niveles mas altos de mRNA para esta proteína, implicando un nivel mas alto de transcripción del gen A. Por otra parte, los niveles de expresión mas bajos de β -lactoglobulina B, en algunas ocasiones se ha relacionado al mayor contenido de caseína presente en la leche que contiene esta variante (PROSSER *et al.*, 1997).

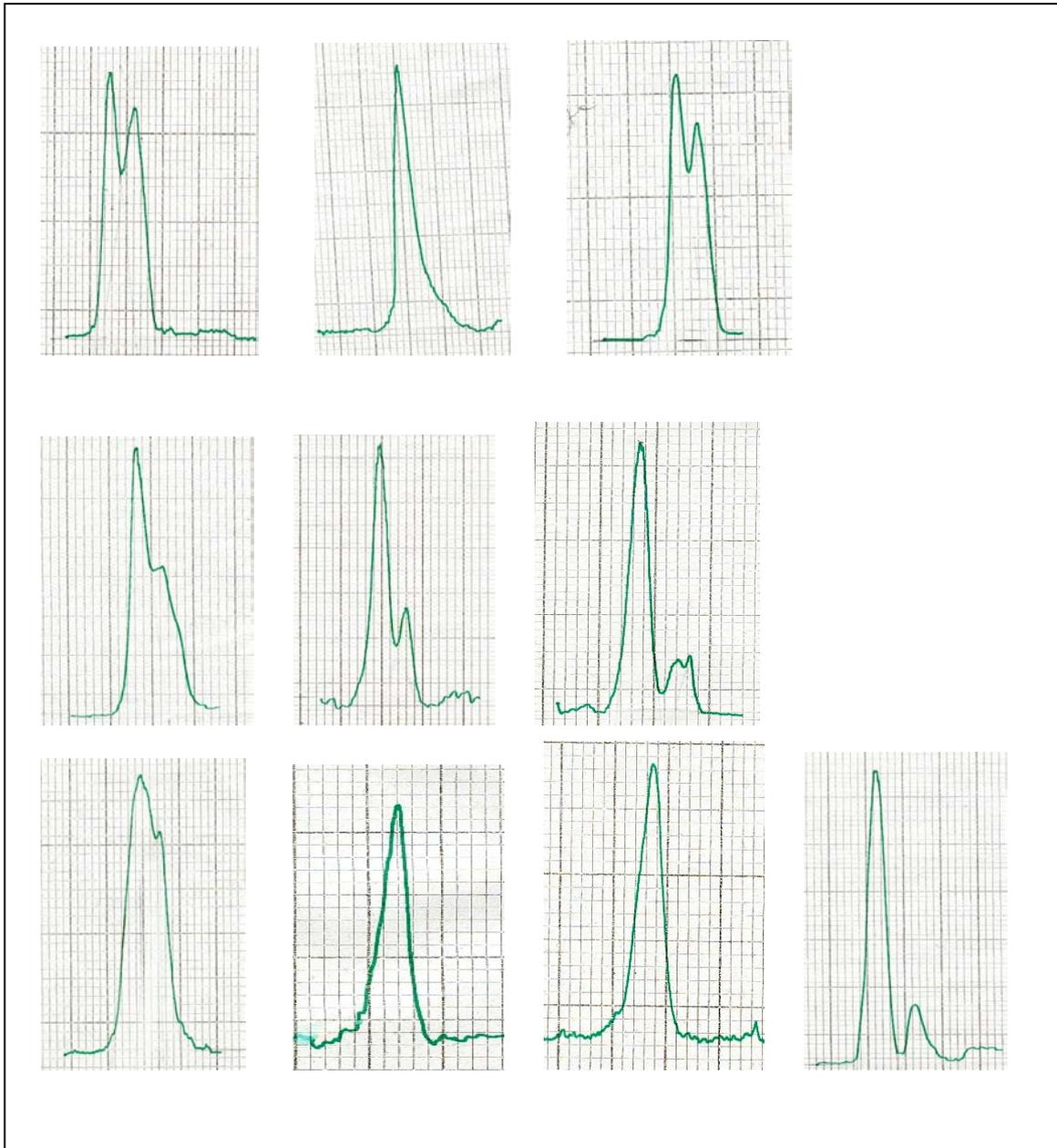


FIGURA 3. Densitogramas de las variantes A y B de β -Lg en las muestras de leche de vacas Frisón Negro

Además, hay que considerar que el mecanismo que controla la expresión de los genes en la glándula mamaria, está influenciada por la regulación hormonal de la transcripción de los genes, la estabilidad del mRNA y la tasa de traducción del mRNA (Choi *et al.* citados por VAN EENENNAAM y MEDRANO, 1991; UFFO *et al.*, 2000).

CUADRO 11. Proporción de la expresión de las variantes A y B de β -Ig en muestras de leche de vacas Frisón Negro.

Vaca	Proporción β-Lg A : β-Lg B
579	1,02 : 1
546	1,08 : 1
636	1,66 : 1
596	2,89 : 1
644	4,99 : 1
633	5,40 : 1
591	1,15 : 1

4.3 Efecto de las variantes genéticas A y B de κ -caseína y β -lactoglobulina sobre las propiedades de coagulación de la leche

Se ha demostrado a través de muchos estudios, que las variantes genéticas de las proteínas lácteas, especialmente la κ -caseína y β -lactoglobulina, tienen influencia sobre la composición y propiedades de procesamiento de la leche, incluyendo el rendimiento del queso (JAKOB, 1994).

Las variantes más comunes de estas proteínas en la mayoría de las razas lecheras, son la A y B (GONZALEZ de LLANO, 1990), las cuales han sido asociadas con favorables propiedades de coagulación, como menor tiempo de coagulación y mayor firmeza del coágulo (JAKOB y PUHAN, 1995).

4.3.1 Efecto del mes de muestreo y de las variantes genéticas de κ -CN y β -Lg sobre la aptitud a la coagulación de la leche. El tiempo de coagulación medido a través de la fuerza del cuajo y expresado como aptitud a la coagulación de la leche (g de cuajo / mL de leche), es un factor determinante en el proceso de coagulación durante la elaboración del queso.

Esta propiedad depende de muchos factores tales como: el pH, la temperatura de la leche, la concentración de enzima, el contenido de caseína y las sales de calcio (GRANDISON, 1986; FOX y McSWEENEY, 1998).

El análisis de varianza multifactorial, indicó que el fenotipo de β -lactoglobulina tiene un efecto significativo sobre la aptitud a la coagulación de la leche ($p < 0,05$), sin embargo el mes de muestreo y las variantes de κ -CN no tuvieron ningún efecto sobre este parámetro ($p > 0,05$) (ANEXO 9). Para aplicar el análisis de varianza se estandarizaron los datos mediante la función logaritmo, a fin de que las varianzas resultaran homogéneas.

Se determinó la repetibilidad del método de aptitud a la coagulación, a pesar de ser un método estandarizado por la Federación Internacional de la Leche, y se obtuvo un $r = 1: 1.588$ (g cuajo / mL leche), es decir, la diferencia entre los resultados de dos determinaciones sobre la misma muestra efectuados simultáneamente o en rápida sucesión por el mismo analista, corresponden a este valor, que en tiempo equivale a diferencias de 43,75 seg entre los duplicados (ANEXO 10).

En el CUADRO 12 se presenta los resultados del efecto de los factores estudiados sobre la aptitud de coagulación de la leche. Según se observa en este cuadro, a pesar de no existir diferencias significativas entre los meses de muestreo, el máximo valor de aptitud correspondió al mes de diciembre ($1: 17.254 \pm 1.908$ g cuajo / mL de leche) y el mínimo al mes de octubre ($1 : 12.544$

± 1.567 g cuajo / mL de leche), que representan el cuarto y segundo muestreo, respectivamente.

CUADRO 12. Efecto del mes de muestreo, fenotipo de β -lactoglobulina y variantes de κ -caseína, sobre la aptitud a la coagulación de la leche.

Factores	n ¹	Aptitud a la coagulación (g cuajo / mL leche)	Efecto
Mes de muestreo			NS
Septiembre	10	1 : 13.500 \pm 1.932 a	
Octubre	10	1 : 12.544 \pm 1.567 a	
Noviembre	10	1 : 16.373 \pm 1.920 a	
Diciembre	10	1 : 17.254 \pm 1.908 a	
β -lactoglobulina			*
AA	3	1 : 9.420 \pm 1.895 a	
AB	7	1 : 23.221 \pm 1.241 b	
κ -caseína			NS
A	2	1 : 16.027 \pm 2.419 a	
B	8	1 : 13.647 \pm 1.209 a	

Letras diferentes indican valores significativamente distintos (Test de Tukey 95%)

* significativo al 95% ($p < 0,05$), NS: no significativo al 95% ($p > 0,05$)

¹ número de vacas observadas

A pesar de no existir diferencias significativas entre los meses de muestreo, se observa un leve aumento de la aptitud a la coagulación, lo que puede atribuirse por una parte, al aumento en el contenido de caseína de la leche durante la etapa de lactación. En el presente estudio, las vacas analizadas se encontraban en el sexto y noveno mes de lactación en septiembre y diciembre, respectivamente. CASADO y GARCIA (1985), señalan que en el curso de la

lactación la concentración de proteína aumenta en forma progresiva, siendo este enriquecimiento mas acusado a partir del quinto mes de lactación. Esto concuerda con lo señalado por NG-KWAI-HANG *et al.*, (1982), quienes determinaron que la etapa de lactación afecta significativamente el contenido de proteína y caseína en la leche. Y según STORRY y FORD (1982b), concluyen que las leches que poseen un mayor contenido de proteína presentan un menor tiempo de coagulación, lo que se traduce en una mejor aptitud de coagulación de la leche.

Además, en un estudio realizado en paralelo con las mismas muestras de leche, se observó que el contenido de caseína aumentaba al avanzar los meses de lactación, pero no se obtuvieron diferencias significativas.

Por otro lado, según COULON *et al.* (1994) y CASADO y GARCIA (1985), la salida de los animales al pasto en primavera, después de haber transcurrido el periodo invernal con una alimentación a base de ensilado, produce un aumento en el contenido de proteína láctea, siendo esto atribuible al mayor aporte energético de la pradera. Además, MACHEBOEUF *et al.* (1993), midieron el efecto de la alimentación sobre las propiedades de coagulación de la leche y concluyeron que éstas mejoraban significativamente luego de sacar los animales al pasto, debido a que éste produce un aumento en los niveles de caseína y cambios en el contenido mineral de la leche.

En este estudio, la alimentación de las vacas durante los meses de septiembre y octubre consistió de ensilaje, concentrado y sales minerales, además pastoreo durante algunas horas en la mañana. En los dos últimos meses (noviembre y diciembre), se suspendió definitivamente el ensilaje y la alimentación consistió básicamente de pastoreo directo de pradera permanente mejorada, además de concentrado y sales (ANEXO 1). Por lo tanto, esto

también pudo favorecer en parte el leve aumento de la aptitud a la coagulación durante los meses de noviembre y diciembre.

El fenotipo AB de β -lactoglobulina presentó mejor aptitud a la coagulación de la leche que el fenotipo AA, observándose diferencias significativas según el test de Tukey 95% (CUADRO 12). Estos resultados indican que leche con fenotipo AB de β -lactoglobulina sería más favorable para la coagulación, tal como se observa en la FIGURA 4.

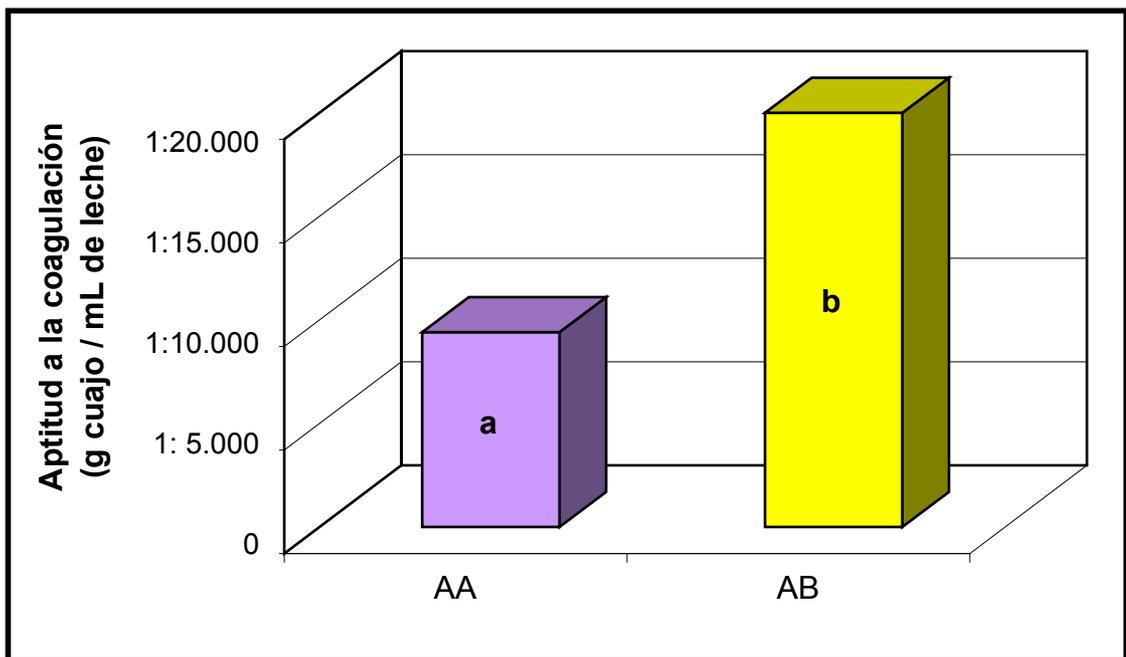


FIGURA 4. Efecto del fenotipo de β -lactoglobulina sobre la aptitud a la coagulación de la leche.

*Letras diferentes indican valores significativamente distintos (Test de Tukey 95%)

La mejor aptitud a la coagulación observada en la leche con el fenotipo AB de β -lactoglobulina ($1 : 23.221 \pm 1.241$ g cuajo / mL leche), está de acuerdo con lo expuesto por Graham citado por GONZALEZ de LLANO (1990), quien determinó, en su estudio sobre fabricación de quesos con leche de vacas

Frisonas, que el tiempo de coagulación para los fenotipos de β -lactoglobulina incrementan en el siguiente orden: AA>AB>BB, lo que implica que el fenotipo AA presenta menor aptitud a la coagulación. Contrariamente, IKONEN *et al.* (1999), determinaron que el tiempo de coagulación de la leche es menor con el fenotipo AA de β -lactoglobulina en comparación con el fenotipo AB y BB, en una población de raza Finnish durante una lactación completa.

El menor tiempo de coagulación observado en leches con variante B de β -Lg, se debe en parte a la asociación de esta variante con más alta concentración de caseína y más baja concentración de proteína del suero, siendo esto correlacionado con un número de caseína significativamente más alto (McLEAN *et al.*, 1984; NG-KWAI-HANG *et al.*, 1986; VAN DEN VERG, 1993; JAKOB y PUHAN, 1995).

Según WALSTRA *et al.* (1999), la leche con mayor contenido en caseína cuaja más fácilmente, es decir, su tiempo de coagulación es menor, lo que se traduce en una mejor aptitud a la coagulación de la leche.

Además, MACHEBOEUF *et al.* (1993), evaluaron el efecto de la raza, las variantes genéticas y la alimentación de las vacas sobre las propiedades de coagulación, y determinaron que para las razas Holstein, Montbéliarde y Tarantaise, las variantes de β -lactoglobulina tuvieron efecto solamente sobre el contenido de proteína soluble (10% más para la variante A comparado con la variante B) y el tiempo de coagulación (25% más para la variante B comparado con la variante A).

Por otra parte, las variantes de κ -caseína no tuvieron efecto sobre la aptitud a la coagulación de la leche ($p>0,05$) (CUADRO 12). Este resultado coincide con lo observado por MARZIALI y NG-KWAI-HANG (1986a), quienes determinaron que la variante de κ -caseína no tiene efecto sobre el tiempo de coagulación.

Sin embargo, en algunas investigaciones se ha determinado la asociación entre el tiempo de coagulación de la leche y las variantes de κ -caseína, presentando la variante B un menor tiempo con respecto a la variante A (SCHAAR, 1984; AALTONEN y ANTILA, 1987; MACHEBOEUF *et al.*, 1993; LODÉS *et al.*, 1996). Esta propiedad favorable con la variante B de κ -caseína, es atribuido en parte, por la asociación de esta variante con mayor contenido de caseína, calcio, fósforo y más alto contenido de κ -caseína, componentes de la leche que tienen directa relación con las propiedades de coagulación (McLEAN *et al.*, 1984; JAKOB y PUHAN, 1995).

WALSH *et al.*, (1995), determinaron el efecto de las variantes de κ -caseína sobre las propiedades de coagulación, durante la elaboración de queso Cheddar con leche de vacas Holstein Friesian. En dicho estudio se concluyó que el tiempo de coagulación fue más largo para la leche con κ -CN A comparado con la leche de κ -CN B, a pH natural y ajustado (6,6). Sin embargo, el tiempo de coagulación a pH ajustado (6,6) fue generalmente menor que a pH natural de la leche.

Existen otros factores importantes que influyen en la aptitud a la coagulación como el contenido de caseína y calcio en la leche (FOX y McSWEENEY, 1998), los cuales no fueron determinados en este trabajo. Así, un bajo contenido de calcio en la leche disminuye la aptitud, es decir, se produce una coagulación lenta y se obtiene como resultado una cuajada muy blanda. Por otra parte, leches con un mayor contenido de caseína cuajan más fácilmente, es decir su tiempo de coagulación es menor, por lo tanto, presenta una mejor aptitud a la coagulación (AMIOT, 1991; WALSTRA, 2000).

El pH de la leche también influye en la coagulación, de tal forma que un descenso del pH favorece la aptitud a la coagulación, debido a que la acidez

facilita la acción del cuajo sobre las caseínas, reduciendo su carga eléctrica y por lo tanto su estabilidad (AMIOT, 1991; FOX y McSWEENEY, 1998).

El coeficiente de correlación determinado entre el pH y la aptitud a la coagulación de la leche fue -0,4664, indicando una relación inversamente proporcional, ya que a medida que el pH disminuye la aptitud de coagulación aumenta, siendo además estadísticamente significativa ($p < 0,05$) (ANEXO 11). La correlación obtenida es similar a la determinada por STORRY y FORD (1982a) y OKIGBO *et al.* (1985), quienes encontraron un coeficiente de correlación de -0,58.

El rango de pH obtenido en el presente estudio fue entre 6,60 y 6,88. Según ALAIS (1985), el rango de pH en leche cruda fluctúa entre 6,60 y 6,80, considerándose valores anormales aquellos que se encuentren bajo 6,50 o sobre 6,90.

Los valores promedios de pH para las muestras de leche con fenotipo AA y AB de β -lactoglobulina, fueron 6,77 y 6,68, respectivamente. Según el test de comparación de promedios, hubo diferencia estadísticamente significativa entre el pH de la leche con fenotipo AA y AB de esta proteína (ANEXO 12). Por lo tanto, la mejor aptitud de coagulación observada en las muestras de leche con fenotipo AB de β -lactoglobulina, podría deberse en parte a que estas muestras presentaron un pH levemente más ácido.

No se encontró diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre el pH de las muestras de leche con variantes A y B de κ -caseína (ANEXO 12).

El análisis de interacción entre los factores mes de muestreo, fenotipo de β -lactoglobulina y variantes de κ -caseína para la aptitud a la coagulación de la leche, indicó que solamente fue significativa la interacción entre el fenotipo de β -lactoglobulina y las variantes de κ -caseína, algunos con efectos favorables en la aptitud y otros con efectos desfavorables ($p < 0,05$) (ANEXO 9).

En el CUADRO 13 se presenta los resultados de este análisis de interacción, donde se puede observar, que de las interacciones entre β -Lg y κ -CN, la mejor aptitud a la coagulación correspondió a las muestras de leche de vacas que presentaron el fenotipo AB de β -lactoglobulina con la variante A de κ -caseína, sin embargo, este valor corresponde al promedio de una sola vaca, lo cual no es representativo del muestreo. Por lo tanto, la mejor interacción sería del fenotipo AB de β -lactoglobulina con la variante B de κ -caseína, que presentaron 6 vacas del estudio y cuyo promedio de aptitud a la coagulación fue de $1: 14.766 \pm 1.021$ g cuajo / mL leche.

CUADRO 13. Interacción entre los fenotipos de β -Lg y las variantes de κ -CN, para la aptitud a la coagulación de la leche.

Interacciones		n ¹	Aptitud a la coagulación (g cuajo / mL leche)
β -Lg	κ -CN		
AA	A	1	1 : 7.034 ± 2.258
AA	B	2	1 : 12.611 ± 1.596
AB	A	1	1 : 23.041 ± 2.250
AB	B	6	1 : 14.766 ± 1.021

¹ número de vacas observadas

4.3.2 Efecto del mes de muestreo y las variantes genéticas de κ -CN y β -lg sobre la firmeza del gel. La firmeza de la cuajada o fuerza del gel, expresada como gramos fuerza (gf), depende fundamentalmente de la concentración de caseína (STORRY *et al.*, 1982; GRANDISON *et al.*, 1984a) y la concentración y distribución de los minerales en la leche (GRANDISON, 1986).

Además, existen otros factores que influyen sobre la firmeza del gel como son: la concentración de enzima, la temperatura, pH y el calentamiento previo de la leche (FOX y McSWEENEY, 1998).

El análisis de varianza de los resultados presentado en el ANEXO 9, indicó que el mes de muestreo y las variantes de κ -caseína no tuvieron efecto sobre la firmeza del gel, sin embargo, el fenotipo de β -lactoglobulina presentó un efecto altamente significativo sobre este parámetro ($p < 0,05$). En el CUADRO 14 se presenta los resultados de este análisis.

CUADRO 14. Efecto del mes de muestreo, fenotipo de β -lactoglobulina y variantes de κ -caseína, sobre la firmeza del gel.

Factores	n ¹	Firmeza del gel (gf)	Efecto
Mes de muestreo			NS
Septiembre	10	10,06 ± 0,37 a	
Octubre	10	9,99 ± 0,30 a	
Noviembre	10	10,74 ± 0,41 a	
Diciembre	10	10,95 ± 0,38 a	
β -lactoglobulina			*
AA	3	9,07 ± 0,23 a	
AB	7	11,79 ± 0,20 b	
κ -caseína			NS
A	2	10,13 ± 0,27 a	
B	8	10,74 ± 0,16 a	

Letras diferentes indican valores significativamente distintos (Test de Tukey 95%)

* significativo al 95% ($p < 0,05$), NS: no significativo al 95% ($p > 0,05$)

¹ número de vacas observadas

Debido principalmente, a que el método de firmeza del gel no se encuentra estandarizado por la FIL, se determinó la repetibilidad del método y se obtuvo un $r = 0,88$ gf, es decir, la máxima diferencia entre duplicados corresponde a este valor (ANEXO 10).

A pesar de no existir diferencia estadísticamente significativa entre los meses de muestreo, la firmeza del gel aumentó levemente, observándose una mayor

firmeza en el mes de diciembre ($10,95 \pm 0,38$ gf). Esto puede explicarse, por el aumento del contenido total de proteína y en especial el contenido de caseína en la leche durante el curso de la lactación (ALAIS, 1985), siendo estos componentes directamente relacionados con la firmeza del gel, ya que a medida que la leche presenta un mayor contenido de caseína la cuajada obtenida será mas firme (STORRY *et al.*, 1982; GRANDISON *et al.*, 1984a). Se debe destacar que los muestreos realizados en la estación de primavera, correspondieron al 6^{to}, 7^{mo}, 8^{vo} y 9^{no} mes de lactancia para todas las vacas en estudio.

Al respecto, OKIGBO *et al.*, (1985), estudiaron las variaciones en las propiedades de coagulación de la leche, y determinaron que la etapa de lactancia, el pH y el contenido de caseína en la leche, son los principales factores que influyen en la firmeza del gel.

Además, en un estudio realizado sobre el contenido de proteína y su relación con las pruebas de aptitud tecnológicas, se determinó que la firmeza del gel depende principalmente del contenido de caseína en la leche, cuyo coeficiente de correlación fue de 0,576 entre ambos parámetros (CORTEZ, 2001).

Por otra parte, al relacionar la firmeza del gel con la aptitud a la coagulación de la leche, se puede observar que existe una relación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) cuyo coeficiente de correlación fue de 0,7988 (ANEXO 11). Esto coincide con lo mencionado por OKIGBO *et al.*, (1985) y CORTEZ (2001), quienes también determinaron coeficientes de correlación altamente significativos de 0,86 y 0,75, respectivamente.

El fenotipo de β -lactoglobulina tuvo un efecto significativo sobre la firmeza del gel (CUADRO 12), presentando las muestras de leche con fenotipo AB de β -lactoglobulina mayor firmeza ($11,79 \pm 0,20$ gf) en comparación con las muestras

de fenotipo AA ($9,07 \pm 0,23$ gf). En la FIGURA 5 se muestra el resultado de esta comparación en forma gráfica, donde se observa mayor firmeza en las muestras de leche con fenotipo AB de β -lactoglobulina, en comparación con el fenotipo AA.

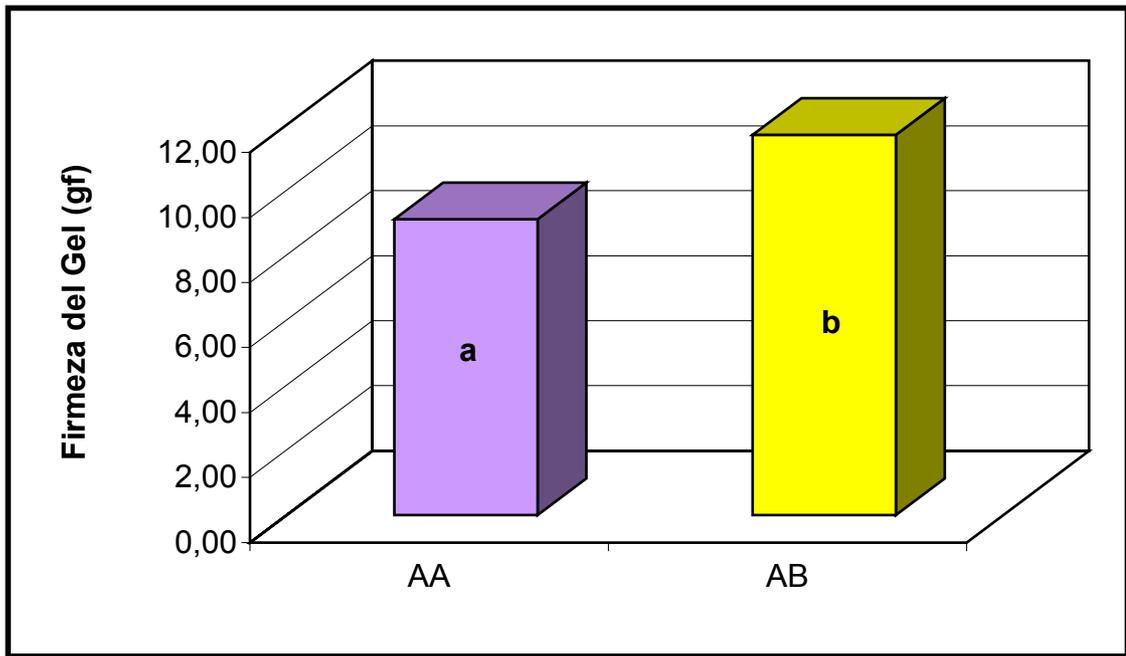


FIGURA 5. Efecto del fenotipo de β -lactoglobulina sobre la firmeza del gel.

*Letras diferentes indican valores significativamente distintos (Test de Tukey 95%)

La diferencia observada en la firmeza del gel entre los fenotipos de β -Lg está de acuerdo con lo obtenido por LODÉS *et al.*, (1996), quienes concluyeron que la leche con fenotipo BB de β -Lg presenta una firmeza mayor que con fenotipo AB, y ésta a su vez mayor que el fenotipo AA. La variante B de β -Lg está relacionada con cuajadas más firmes, debido a la asociación de esta variante con mayor contenido de grasa y caseína y más bajo contenido de proteína del suero en la leche (NG-KWAI-HANG *et al.*, 1986).

MARZIALI y NG-KWAI-HANG (1986a), determinaron que la leche con fenotipo

AA de β -lactoglobulina está asociada con una mayor firmeza del gel en comparación con el fenotipo BB y AB de β -lactoglobulina. Sin embargo, AALTONEN y ANTILA (1987), determinaron que el fenotipo de β -lactoglobulina no tiene efecto sobre las propiedades de coagulación, y tampoco sobre el contenido total de proteína y caseína, en leche de vacas Friesian.

El coeficiente de correlación determinado entre el pH y la firmeza fue de -0,60, indicando una relación inversamente proporcional, siendo además estadísticamente significativa ($p < 0,05$) (ANEXO 11). Según STORRY y FORD (1982b), un descenso en el pH provoca el aumento en la firmeza del gel, debido a que la acidez reduce la carga eléctrica de la caseína facilitando de esta forma la acción del cuajo. Por lo tanto, la mayor firmeza del gel observada en las muestras de leche con fenotipo AB de β -lactoglobulina, podría deberse en parte, a que estas muestras presentaron un pH levemente más ácido (6,68), en comparación con las muestras de leche con fenotipo AA (6,77).

Con respecto a las variantes de κ -caseína (CUADRO 14), no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las variantes A ($10,13 \pm 0,27$ gf) y B ($10,74 \pm 0,16$ gf) para la firmeza del gel, lo cual es similar a lo determinado por MARZIALI y NG-KWAI-HANG (1986a), quienes no observaron diferencia en las propiedades de coagulación entre las variantes de κ -caseína.

Sin embargo, a pesar de no existir diferencias estadísticamente significativas, se observa que la variante B presentó una firmeza del gel levemente mayor que la variante A de κ -caseína (CUADRO 14).

Algunos estudios afirman que la variante B de κ -caseína está asociada con la formación de una cuajada más firme en comparación con la variante A (SCHAAR, 1984; AALTONEN y ANTILA, 1987; MACHEBOEUF *et al.*, 1993;

WALSH *et al.*, 1995; LODES *et al.*, 1996). Este efecto se debe principalmente a que la variante B de κ -caseína está correlacionada con niveles más altos de caseína, así como también contienen una mayor proporción de κ -caseína como porcentaje de caseína total, por lo tanto, las micelas de caseína son más pequeñas en promedio y éstas requieren menos acción del cuajo que las micelas grandes para permitir la coagulación (VAN DEN BERG, 1993; JAKOB y PUHAN, 1995; HORNE *et al.*, 1996; HORNE *et al.*, 1997)

De acuerdo al análisis de interacción entre los factores estudiados, sólo fue estadísticamente significativa la interacción entre los fenotipos de β -lactoglobulina y variantes de κ -caseína ($p < 0,05$) (ANEXO 9). En el CUADRO 15 se presentan los resultados de este análisis.

CUADRO 15. Interacción entre los fenotipos de β -Lg y las variantes de κ -CN, para la firmeza del gel.

Interacciones		n ¹	Firmeza del gel (gf)
β -Lg	κ -CN		
AA	A	1	7,57 \pm 0,37
AA	B	2	10,58 \pm 0,27
AB	A	1	12,68 \pm 0,36
AB	B	6	10,91 \pm 0,15

¹ número de vacas observadas

Según se observa en este cuadro, la interacción entre el fenotipo AB de β -lactoglobulina y la variante A de κ -caseína, presentó la mayor firmeza del gel (12,68 \pm 0,36 gf), sin embargo, este valor es el promedio de una sola vaca durante los meses de muestreo. Por lo tanto, se considera a la interacción AB de β -Lg y B κ -CN como la mayor firmeza (10,91 \pm 0,15 gf), debido a que este valor representa el promedio de 6 vacas, al igual que lo observado en la aptitud a la coagulación.

4.3.3 Efecto del mes de muestreo y las variantes genéticas de κ -CN y β -Ig sobre la sinéresis de la cuajada. La sinéresis de la cuajada o expulsión del suero, expresada en unidades de volumen (mL), es un fenómeno que ocurre tras la coagulación de la leche como resultado de la contracción de la red regular formada por las micelas de caseína (MARSHALL, 1982; GRANDISON, 1986).

La sinéresis es importante porque la cantidad de suero expulsado influye en el contenido de humedad de la cuajada, y ésta a su vez afecta las propiedades sensoriales y funcionales del queso (CALVO y BALCONES, 2000).

Existen algunos factores que influyen sobre la sinéresis de la cuajada, tales como el contenido de grasa y caseína en la leche, la temperatura de coagulación, el contenido de calcio, la cantidad de cuajo utilizado y el tamaño de los gránulos de la cuajada (FOX y McSWEENEY, 1998)

En el cálculo de la repetibilidad del método de sinéresis, se obtuvo un $r = 0,99$ mL, que significa que la diferencia entre duplicados no debería exceder a este valor, según las condiciones utilizadas en la metodología (ANEXO 10).

En el CUADRO 16 se presenta los resultados del análisis de varianza multifactorial, el cual indicó que el muestreo y las variantes de κ -caseína no influyen sobre la sinéresis de la cuajada ($p > 0,05$), sin embargo, el fenotipo de β -lactoglobulina sí presentó influencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$), siendo mayor el volumen de suero expulsado en las muestras de leche con fenotipo AB de β -lactoglobulina que las muestras con fenotipo AA (ANEXO 9).

CUADRO 16. Efecto del mes de muestreo, fenotipo de β -lactoglobulina y variantes de κ -caseína, sobre la sinéresis de la cuajada.

Factores	n ¹	Sinéresis de la cuajada (mL)	Efecto
Mes de muestreo			NS
Septiembre	10	9,81 ± 0,45 a	
Octubre	10	9,38 ± 0,42 a	
Noviembre	10	10,56 ± 0,40 a	
Diciembre	10	10,58 ± 0,36 a	
β-lactoglobulina			*
AA	3	8,47 ± 0,27 a	
AB	7	11,70 ± 0,24 b	
κ-caseína			NS
A	2	9,84 ± 0,31 a	
B	8	10,32 ± 0,19 a	

Letras diferentes indican valores significativamente distintos (Test de Tukey 95%)

* significativo al 95% (p<0,05), NS: no significativo al 95% (p>0,05)

¹ número de vacas observadas

Se observó un leve incremento en los dos últimos meses de muestreo (noviembre y diciembre), época en que se encontraban las vacas en 8^{vo} y 9^{no} mes de lactación, respectivamente. Esto concuerda con GRANDISON *et al.*, (1984b), quienes también observaron una tendencia al aumento de la sinéresis con los meses de lactación.

Es importante considerar, que la sinéresis de la cuajada fue directamente correlacionada con la firmeza 0,91 y la aptitud a la coagulación 0,84 de la leche, siendo además estos coeficientes estadísticamente significativos (p<0,05) (ANEXO 11). Estos resultados están de acuerdo con GRANDISON *et al.*, (1984b), quienes observaron que leches que tienen una buena aptitud a la coagulación presentan una cuajada más firme y el suero drena más fácilmente.

Según WALSTRA *et al.* (1999), las propiedades de coagulación de la leche, consideradas fundamentales en la elaboración de queso, se relacionan entre ellas, y es así como aquellas leches que poseen una baja aptitud a la coagulación presentarán cuajadas blandas y sinéresis defectuosa por desuerado incompleto, dando origen a un producto con mayor grado de humedad en el queso.

Además, la sinéresis está relacionada a algunos factores que afectan el desarrollo de la cuajada, pero es también influenciado por la concentración de grasa. De esta forma, cuando la concentración de grasa en la leche aumenta, la expulsión del suero o sinéresis disminuye (STORRY *et al.*, 1982b). Esto es probablemente, porque los glóbulos grasos quedan atrapados en la red de la cuajada y bloquean el flujo del suero a través de la red (GRANDISON, 1986).

Respecto al efecto del fenotipo de β -lactoglobulina sobre la sinéresis de la cuajada, se observa que el fenotipo AB de β -lactoglobulina presentó mayor volumen de suero ($11,70 \pm 0,24$ mL) que el fenotipo AA de β -lactoglobulina ($8,47 \pm 0,27$ mL) (CUADRO 16 y FIGURA 6).

Este resultado difiere a lo observado por McLEAN y SCHAAR (1989), quienes determinaron que leches con β -lactoglobulina B tuvieron significativamente menor sinéresis comparado con leches de β -lactoglobulina A, por lo que concluyeron que la variante B de esta proteína podría ser utilizada para la elaboración de quesos con alto contenido de humedad, como por ejemplo el Cammenbert.

Por otra parte, VAN DEN BERG (1993), determinó que las variantes de β -lactoglobulina no tienen influencia sobre el contenido de humedad en la elaboración de queso Gouda, durante la época de primavera y otoño.

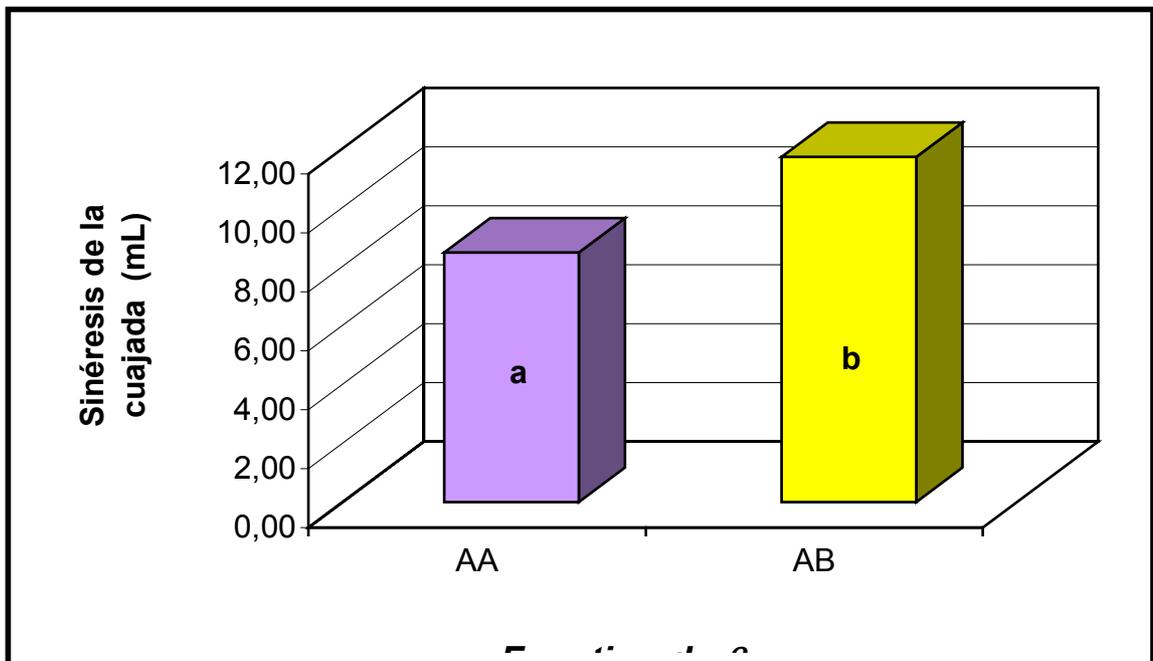


FIGURA 6. Efecto del fenotipo de β -lactoglobulina sobre la sinéresis de la cuajada.

*Letras diferentes indican valores significativamente distintos (Test de Tukey 95%)

A pesar de no existir diferencia significativa entre las variantes de κ -caseína (CUADRO 16), se observa que la variante B presenta una sinéresis levemente mayor que la variante A, lo que está de acuerdo con McLEAN y SCHAAR (1989), quienes observaron que la sinéresis fue generalmente mayor en leche que contiene la variante B de κ -CN comparado con la variante A. Sin embargo, el mayor drenaje del suero con la variante B podría ser menos deseable en la elaboración de quesos blandos.

Por otra parte, SCHAAR (1985), investigó la influencia de las variantes de κ -caseína sobre la elaboración del queso Svecia, y no encontró diferencia significativa en el contenido de humedad entre los quesos elaborados con κ -caseína A y B, debido principalmente a que este tipo de queso es elaborado a una temperatura de cocción mas baja (41°C) en comparación con otros tipos de

quesos como el Parmesano (55°C), el cual tiene una sinéresis más intensa. Por lo que concluyó, que el efecto de las variantes A y B de κ -caseína sobre la sinéresis se observa mejor a temperaturas más altas de cocción (queso Parmesano), ya que la temperatura tiene una directa relación con la expulsión del suero.

Para la sinéresis de la cuajada, el análisis de interacción entre los factores estudiados, indicó que solamente fue significativa la interacción entre el fenotipo de β -lactoglobulina y las variantes de κ -caseína ($p < 0,05$) (ANEXO 9).

En el CUADRO 17 se presentan los resultados de interacción entre los fenotipos AA y AB de β -lactoglobulina y las variantes A y B de κ -caseína. Al igual que lo observado en la aptitud a la coagulación y la firmeza del gel, se considera que la leche de vacas con fenotipo AB de β -Lg y variante B κ -CN, obtuvieron el mejor drenaje del suero ($10,65 \pm 0,18$ mL), por representar el promedio de un mayor número de observaciones.

Por otra parte, las muestras de leche mezcla presentaron en todos los muestreos propiedades de coagulación similares al cálculo del promedio ponderado de cada una de éstas propiedades, lo que indicaría, el aporte de cada muestra de leche considerada en la leche mezcla (ANEXO 13).

CUADRO 17. Interacción entre los fenotipos de β -Lg y las variantes de κ -CN, para la sinéresis de la cuajada.

Interacciones		n ¹	Sinéresis de la cuajada (mL)
β -Lg	κ -CN		
AA	A	1	6,94 \pm 0,44
AA	B	2	9,99 \pm 0,31
AB	A	1	12,75 \pm 0,42
AB	B	6	10,65 \pm 0,18

¹ número de vacas observadas

En el ANEXO 14 se presenta un resumen de los resultados obtenidos en todos los análisis realizados.

5. CONCLUSIONES

- Se identificaron las variantes genéticas A y B de κ -caseína y β -lactoglobulina en muestras de leche de vacas individuales, mediante la técnica de electroforesis de isoenfoque.
- Los fenotipos de β -lactoglobulina tuvieron influencia sobre las propiedades de coagulación, presentando las muestras de leche con fenotipo AB mejor aptitud a la coagulación, mayor firmeza del gel y mejor drenaje del suero que las muestras con fenotipo AA de β -lactoglobulina.
- Las variantes A y B de κ -caseína no tuvieron influencia sobre las propiedades de coagulación de la leche.
- Se presentó una interacción favorable entre β -lactoglobulina AB y κ -caseína B, para las propiedades de coagulación estudiadas.
- Se rechaza la hipótesis planteada al comienzo de este trabajo, debido a que sólo las variantes de β -lactoglobulina tuvieron influencia sobre las propiedades de coagulación de la leche.

6. RESUMEN

El objetivo del presente estudio consistió en relacionar las variantes genéticas A y B de κ -caseína y β -lactoglobulina con las propiedades de coagulación de la leche, para lo cual se utilizaron 10 vacas de raza Frisón Negro, pertenecientes al fundo Santa Rosa de la Universidad Austral de Chile.

Las muestras de leche se recolectaron de vacas individuales durante la ordeña de la mañana, realizándose un total de cuatro muestreos durante la estación de primavera del año 2001. Además, todas vacas seleccionadas para el estudio eran de primer parto, similar edad, igual mes de lactación.

Los análisis realizados a las muestras de leche fueron: aptitud a la coagulación, firmeza del gel y sinéresis de la cuajada. Para la identificación de las variantes genéticas de las proteínas se utilizó la técnica de electroforesis de isoenfoque, con la cual se obtuvieron los fenotipos AA y AB de β -lactoglobulina y las variantes A y B de κ -caseína.

Los resultados obtenidos mostraron que los fenotipos de β -lactoglobulina tuvieron un efecto significativo sobre las propiedades de coagulación, presentando las muestras de leche con fenotipo AB de β -Lg mejor aptitud a la coagulación ($1:23.221 \pm 1.241$ g cuajo / mL leche), mayor firmeza del gel ($11,79 \pm 0,20$ gf) y mejor drenaje del suero ($11,70 \pm 0,24$ mL) que las muestras con fenotipo AA de β -Lg ($1:9.420 \pm 1.895$ g cuajo / mL leche); $9,07 \pm 0,23$ gf y $8,47 \pm 0,27$ mL), respectivamente. Sin embargo, las variantes de κ -caseína no tuvieron influencia sobre estas propiedades de coagulación, pero si se presentó interacción entre la κ -caseína y la β -lactoglobulina.

SUMMARY

The objective of this study was related genetic variants A and B of κ -casein y β -lactoglobulin with milk coagulation properties , in order to that it utilized ten cows of the Black Friesian breed, from the farm "Santa Rosa" belonging to "Universidad Austral de Chile".

The milk samples were collected from individual cows during the morning milking, taking four sampling during the spring season of 2001. Additionally, all the selected cows for the study were primiparous, similar in age and had the same month of lactation.

The coagulation aptitud, the curd firmness and syneresis from each sample were determined. For the identification of the genetic variants of the proteins used the technical of isoelectric focusing, with which they obtained the phenotypes AA and AB of β -lactoglobulin and the variants A and B of κ -casein.

The results showed that the phenotypes of β -lactoglobulin had a significant effect on the milk properties coagulation. The milk samples with phenotype AB of β -lactoglobulin had better aptitud of coagulation ($1:23.221 \pm 1.241$ g rennet mL milk), higher curd firmness ($11,79 \pm 0,20$ gf) and better whey drainage ($11,70 \pm 0,24$ mL) than milk samples with phenotype AA of β -lactoglobulin ($1:9.420 \pm 1.895$ g rennet / mL milk); $9,07 \pm 0,23$ gf y $8,47 \pm 0,27$ mL). The variants of κ -casein did not influence of the coagulation properties, but it's presented interaction between the κ -casein and the β -lactoglobulin.

7. BIBLIOGRAFIA

- AALTONNEN, L. y ANTILA, 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*. Reverté S. A. Barcelona, España. 873 p.
- ALEANDRI, R., BUTTAZZONI, G.L. y SCHNEIDER, J.C. 1990. The effects of Milk Protein Polymorphisms on Milk Components and Cheese-Producing Ability. *Journal of Dairy Science* 73: 241-255.
- AMIOT, J. 1991. *Ciencia y Tecnología de la leche*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 547 p.
- BELITZ, H-D y GROSCH, W. 1997. *Química de los alimentos*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 1087 p.
- BOLAND, M. y HILL, J. 2001. Genetic selection to increase cheese yield – the Kaikoura experience. *The Australian Journal of Dairy Technology*. 56 (2): 171-176.

- CALVO, M. y BALCONES, E. 2000. Some factors influencing the syneresis of bovine, ovine, and caprine milks. *Journal of Dairy Science* 83: 1733-1739.
- CASADO, P. y GARCIA, J. 1985. La calidad de leche y los factores que la influncian. *Industrias Lácteas Españolas*. N°81. 298 p.
- CASANOVA, M. 2001. Identificación de las variantes genéticas de κ -caseína en leche de vacas Holstein-Friesian y Jersey por Electroforesis de Isoenfoque. Tesis Licenciado en Alimentos. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia. Chile. 102p.
- CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACION. (INN). 1979. Norma Chilena Oficial 1671. Leche y productos lácteos. Determinación de pH.
- CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACION. (INN). 1998. Norma Chilena Oficial 1011/1. Leche y productos lácteos. Muestreo. Parte I
- CORTEZ, X. 2001. Contenido de Proteína y su relación con pruebas de aptitud tecnológicas en leche de Centros de Acopio Lecheros de la Provincia de Valdivia. Tesis Licenciado en Alimentos. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia. Chile. 131p.
- COULON, J., AGABRIEL, C., BRUNSCWING, G., MULLER, C. y BONAITI, B. 1994. Effects of practices on milk concentration of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 77(9): 2614-2620.

- COVINGTON, C. 1993. Genetic and environmental factors affecting milk composition and their relationship to cheese yield. In: Cheese yield and factors affecting its control. International Dairy Federation: Proceedings of the IDF Seminar held in Cork. Ireland. pp: 76-84 .
- CREAMER, L.K. y HARRIS, D.P. 1997. Relationship between milk protein polymorphism and physico-chemical properties. In: Milk Protein Polymorphism. International Dairy Federation. Proceedings of the IDF Seminar held in Palmerston North, New Zealand: 111-123..
- De PETERS, E. y CANT, J. 1992. Nutritional 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 (11):3192-3209.
- De VEER, C. 1990. Algunos aspectos del mejoramiento genético del ganado lechero. En: Avances en Producción Animal. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Producción Animal. Valdivia, Chile. pp 124-126.
- EIGEL, W.; BUTLER, J.; ERNSTROM, C.; FARRELL, H.; HARWALKAR, V.; JENNESS, R. y WHITNEY, R. 1984. Nomenclature of Protein of cow's milk. Fifth revisión. Journal of Dairy Science. 67(8): 1599-1631.

ESCODA, A.; ALVAREZ, L.O. y YEPEZ, S. 1981. Estudio de los polimorfismos genéticos de las proteínas de la leche producida en algunas haciendas de la zona de Carora. Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad de Zulia. Maracaibo, Venezuela. Available at: www.redpav-fpolar.info.ve
Accesed: 20/05/02.

FELMER, R y BUTENDIECK, N. 1998. Frecuencia alélica del gen de k-caseína bovina en un rebaño Frisón Negro Chileno. Arch. Med. Vet. 30(2): 145-150.

FENNEMA, O. 1993. Química de los alimentos. Editorial Acribia, S.A.. Zaragoza, España. 1095 p.

FITZGERALD, R.J. y HILL, J.P. 1997. The relationship between milk protein polymorphism and the manufacture and functionality of dairy products. In: Milk protein polymorphism. International Dairy Federation. Proceedings of the IDF Seminar held in Palmerston North, New Zealand: 355-361.

FOX, P.F. y McSWEENEY. 1998. Dairy Chemistry and Biochemistry. Primera Edición. Cork Ireland. 478 p.

GONZALEZ de LLANO, D. 1990. Polimorfismo Genético de las proteínas de la leche de vaca. Alimentación, Equipos y Tecnología. Julio-agosto: 77-81.

- GRANDISON, A. 1986. Causes of variation in milk composition and their effects on coagulation and cheesemaking. Dairy Industries International. 51(3): 21-24.
- GRANDISON, A. S., FORD, G.D., OWEN, A.J. y MILLARD, D. 1984a. 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.
- GRANDISON, A. S., FORD, G.D., OWEN, A.J. y MILLARD, D. 1984b. Chemical composition and coagulating properties of renneted milks from cows during early lactation. Journal of Dairy Research 51: 407-416.
- HAMES, B. 1998. Gel Electrophoresis of Protein. Oxford University Press Inc. New York. USA. Pp 127-187.
- HILL, J.P. 1993. The relationship between β -lactoglobulin phenotypes and milk composition in New Zealand Dairy Cattle. Journal of Dairy Science. 76: 281-286.
- HORNE, D.S., BANKS, J.M. y MUIR, D.D. 1996. Genetic polymorphisms of milk protein: Understanding the technological effects. Hannah Research Institute Yearbook. 70-78 pp.
- HORNE, D.S., BANKS, J.M. y MUIR, D.D. 1997. Genetic polymorphism of bovine κ -caseina: effects on renneting and cheese yield. In: Milk protein polymorphism. International Dairy Federation. Proceedings of the IDF Seminar held in Palmerston North, New Zealand: 162-171.

- IKONEN, T., AHLFORS, K., KEMPE, R., OJALA, M. y RUOTTINEN, O. 1999. Genetic parameters for the milk coagulation properties and prevalence of noncoagulating milk in Finnish dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 82: 205-214.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. (IDF/FIL). 1985. Milk. Definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis – Application to calibration procedure and quality control in dairy laboratory. IDF/FIL Standard 128: 10p.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. (IDF/FIL). 1987. Calf rennet and adult bovine rennet. Determination of chymosin and bovine pepsin contents (Chromatographic method). Brussels. Apéndice A. 110 A. 7p.
- JAKOB, E. 1994. Genetic polymorphism of milk proteins. *Bulletin of the International Dairy Federation*. IDF 298: 17-27.
- JAKOB, E. y PUHAN, Z. 1995. Implications of genetic polymorphism of milk protein on production and processing of milk. *Bulletin of the International Dairy Federation*. IDF 304: 2-25.
- KRUZE, J. 1998. La rutina de ordeño y su rol en los programas de control de mastitis bovina. *Archivos de Medicina Veterinaria*. N°2: 7-16.
- LATRILLE, L. 1993. El valor nutritivo de la leche bovina y factores que alteran su composición. *Producción Animal*. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Producción Animal. Valdivia. Chile. pp 27-56.

- LATRILLE, L. 1999. Calidad composicional de la leche. Producción Animal. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Producción Animal. Valdivia. Chile. pp 215-236.
- LAWRENCE, R.C. 1991. Cheese yield potencial of milk. . In: Factors Affecting the Yield of Cheese. International Dairy Federation: Proceedings of the IDF Seminar held in Palmerston North. New Zealand: pp 109-120.
- LAWRENCE, R.C. 1993. Relation between milk protein genotypes and cheese yield capacity. In: Factors Affecting the Yield of Cheese. International Dairy Federation: Proceedings of the IDF Seminar held in Palmerston North. New Zealand: pp 121-125.
- LODES, A., BUCHBERGER, J., KRAUSE, I., AUMANN, J. y KLOSTERMEYER, H. 1996. The influence of genetic variants of milk protein on the compositional and technological properties of milk. 2. Rennet coagulation time and firmness of the rennet curd. *Milchwissenschaft* 51(10): 543-547.
- LOWE, R., ANEMA, S.G., PATERSON, G.R. y HILL, J.P. 1995. Simultaneous separation of the lactoglobulin A, B y C variants using polyacrylamide gel electrophoresis. *Milchwissenschaft*. 50(2): 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.

- MACHEBOEUF, D.; COULON, J. y D'HOUR, P. 1993. Effect of breed, protein genetic variants and feeding on cow's milk coagulation properties. *Journal of Dairy Research*: 60:43-54.
- MARSHALL, R.J. 1982. An improved method for measurement of the syneresis of curd formed by rennet action on milk. *Journal of Dairy Research* 44: 329-336.
- MARZIALI, A.S. y NG-KWAI-HANG, K.F., 1986a. Effects of milk composition and genetic polymorphism on coagulation properties of milk. *Journal of Dairy Science* 69 (7): 1793-1798.
- MARZIALI, A.S. y NG-KWAI-HANG, K.F., 1986b. Relationship between milk protein polymorphisms and cheese yielding capacity. *Journal of Dairy Science* 69: 1193-1201.
- McKENZIE, H.A. y WAKE, R.G. 1961. An improved method for the isolation of κ -casein. *Biochimica et Biophysica Acta* 47: 240-242.
- McLEAN, D. M., GRAHAM, E. R. B., PONZONI, R. W. y McKENZIE, H. A. 1984. Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. *Journal of Dairy Research*. 51: 531-546.
- McLEAN, D. y SCHAAR, J. 1989. Effects of β -lactoglobulin and κ -casein genetic variants and concentrations on syneresis of gels from renneted heated milk. *Journal of Dairy Research*. 56 : 297-301.

- MEDRANO, J. y SHARROW, L. 1989. Milk protein typing of bovine mammary gland tissue used to generate a complementary deoxyribonucleic acid library. *Journal of Dairy Science*. 72 (12): 3190-3196.
- NG-KWAI-HANG, K.F., HAYES, J.F., MOXLEY, J.E. y MONARDES, H.G. 1982. Enviromental influences on protein content and composition of bovine milk. *Journal of Dairy Science*. 65 (10): 1993 - 1998.
- NG-KWAI-HANG, K.F., HAYES, J.F., MOXLEY, J.E. y MONARDES, H.G. 1986. Relations between milk protein polymorphisms and major milk constituents in Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*. 69: 22-26.
- NG-KWAI-HANG, K.F., HAYES, J.F., MOXLEY, J.E. y MONARDES, H.G. 1990. Association between genetic polymorphism of milk proteins and production traits during three lactations. *Journal of Dairy Science*. 73: 3414 - 3420.
- NG-KWAI-HANG, K.F. 1997. A review of the relationship between milk protein polymorphism and milk composition and production. In: *Milk Protein Polymorphism*. International Dairy Federation. Proceedings of the IDF Seminar held in Palmerston North. New Zealand: 22-37.
- OKIGBO, L., RICHARDSON, G. y BROWN, R. 1985. Variation in coagulation properties of milk from individuals cows. *Journal of Dairy Science* 68 (4): 822 – 828.

- PEARCE, F., BANKS, B., BANTHORPE, D., BERRY, A., DAVIES, H. y VERNON, C. 1972. Isolation and characterization of Nerve-Growth Factor from the Venom of *Visperarusselli*. *Eur. J. Biochemistry*: 27 417-425.
- PRIMO, E. 1997. *Química de los Alimentos*. Editorial Sintesis. Madrid, España. 461 p.
- PROSSER, C.G., McLAREN, R.D., FARR, V.C., LANGLEY, B. y L'HIULLIER, P.J. 1997. Differential production of whey proteins by cows homozygous for β -lactoglobulin. In: *Milk protein polymorphism*. International Dairy Federation. Proceedings of the IDF Seminar held in Palmerston North, New Zealand: 80-82.
- PUHAN, Z. y JAKOB, E. 1993. Genetic variants of milk proteins and cheese yield. In: *Cheese yield and factors affecting its control*. International Dairy Federation: Proceedings of the IDF Seminar held in Cork. Ireland. pp: 111-122.
- RAHALI, V. y MENARD, J.L. 1991. Influence des variants génétiques de la β -lactoglobuline et de la κ -caséine sur la composition du lait et son aptitude fromagère. *Lait* 71: 275-297.
- RODELLAR, C.; BRAILLON, C.; LEVEZIEL, H.; OSTA, R.; ZARAZAGA, I. y ZARAGOZA, P. 1992. Identificación de las variantes genéticas de la β -lactoglobulina bovina mediante las técnicas de PCR y RFLPs. *Archivos de Zootecnia* 41: 661-666.

- SCHAAR, J. 1984. Effects of κ -casein genetic variants and lactation number on the renneting properties of individual milks. *Journal of Dairy Research* 51: 398-406.
- SCHAAR, J. 1985. Effects of genetic variants of κ -casein y β -lactoglobulin on cheesemaking. *Journal of Dairy Research* 52: 429-437.
- SABOUR, M.P., LIN, C.Y., KEOUGH, A., MECHANDA, S.M. y LEE, A.J. 1993. Effects of selection practiced on the frecuencies of κ -casein and β -lactoglobulin genotypes in canadian artificial insemination bulls. *Journal of Dairy Science* 76: 274-280.
- SCOTT, R. 1991. Fabricación de queso. Editorial Acribia. S.A. Zaragoza. España. 520p.
- STORRY, E. y FORD, G. 1982a. Development of coagulum firmness in renneted milk – a two phase process. *Journal of Dairy Research* 49:343-346.
- STORRY, E. y FORD, G. 1982b. Some factors affecting the post clotting development of coagulum strength in rennet milk. *Journal of Dairy Research* 49:470-477.
- STORRY, E., GRANDISON, A. MILLARD, D. y OWEN, J. 1982. Chemical composition and coagulating properties of renneted milks from different breeds and species of ruminant. *Journal of Dairy Research* 50: 215-229.

- TESSMANN, N., RADLOFF, H., KLEINMANS, J., DHIMAN, R. y SATTER, L. 1991. Milk production response to dietary forraje: grain ratio. *Journal of Dairy Science*, 8 (74): 2696-2707.
- UFFO, O.; SANZ, A. y MARTINEZ, S. 2000. Marcadores moleculares en el mejoramiento y la genética animal. Editorial Edicensa. La Habana, Cuba. 94p.
- VAN DEN VERG, G. 1993. Genetic polymorphism of κ -casein and β -lactoglobulina in relation to milk composition and cheesemaking properties. International Dairy Federation. Proceedings of the IDF Seminar held in Palmerston North. New Zealand: 123-133.
- VAN EENENNAAM, A.L. y MEDRANO, J.F. 1991. Differences in Allelic Protein Expression in the milk of Heterozygous κ -casein Cows. *Journal of Dairy Science*. 74(5): 1491-1496.
- WALSH, C., GUINEE, T., HARRINGTON, D., MEHRA, R., MURPHY, J., CONNOLLY, J. y FITZGERALD, R. 1995. Cheddar cheesemaking and rennet coagulation characteristics of bovine milks containing κ -casein AA or BB genetic variants. *Milchwissenschaft*. 50(9): 492-495.
- WALSTRA, P., GEURTS, T., NOOMEN, A., JELLENA, A. y BOEKEEL, M. 1999. Principles of milk properties and proceses. Marcel Dekker, New York. 727 p.
- WALSTRA, P. 2000. General Principles. In: Practical Guide for Control of Cheese Yield. International Dairy Federation. Ithaca, N.Y. 19-24 pp.

ANEXOS

ANEXO 1

Caracterización de las vacas seleccionadas para el estudio.

- Antecedentes de nacimiento y parto

Vaca	Fecha de nacimiento	Fecha de parto	Nº de lactancia	Fecha de inseminación	Fecha probable de parto
636	08/3/98	01/3/01	1	24/6/01	30/3/02
639	10/3/98	17/3/01	1	10/10/01	12/7/02
546	11/5/97	19/3/01	1	07/7/01	12/4/02
591	11/8/97	20/3/01	1	28/6/01	03/4/02
579	04/6/97	23/3/01	1	05/8/01	20/4/02
633	05/3/98	23/3/01	1	05/7/01	10/4/02
642	11/3/98	28/3/01	1	25/6/01	06/4/02
644	12/3/98	29/3/01	1	27/7/01	03/6/02
560	24/6/97	31/3/01	1	15/8/01	21/5/02
596	20/8/97	10/4/01	1	21/9/01	21/6/02

- Alimentación

Componente (kg/día/vaca)	Promedio Invierno	PRIMAVERA			
		Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
Ensilaje	53,75	3,30	2,91	0	0
Concentrado	4,47	4,40	4,40	4,40	4,40
Sales minerales	0,24	0,22	0,22	0,35	0,35
Afrecho de soya	0,35	0	0	0	0
Melazán	2,50	0	0	0	0

- Información de Progenie

R.P.	PADRE	ABUELO. MATERNO	BISABUELO	
			Materno	Paterno
546	Loyal 120	Mandarín	Gay	
560	Loyal 120	Cañón	Encino	Wilowendeavour
579	Moro	Ripken	Asteroide	Astro King
591	Loyal 120	Trade	Diagrat	
596	Continental	Jim Ben	Cañón	Famous Prefect
633	Loyal 120	Kentucky	Cañón	Famous Prefect
636	Gavilán	Asteroide	Dulce	Alfons
639	Tomy	GBenevolent	Camote	Country Astro King
642	Gavilán	Galpac	Domingo	Puyter-Adema 261
644	Stefens	Kay	1641(madre)	

ANEXO 2

Encuesta sobre información de vacas en estudio (Predio Santa Rosa)

1. Raza de la vaca _____
2. Información de progenie _____
3. Nombre de la vaca (código) _____
4. Edad (fecha de nacimiento) _____
5. Fecha de parto _____
6. Época de parto _____
7. Número de lactancias _____
8. Mes de lactancia _____
9. Producción de leche, materia grasa y proteínas (Predio)
10. Alimentación
 - Pradera: _____ Natural _____ Mejorada _____ Artificial
 - Suplemento: _____ Concentrado _____ Ensilaje _____ Heno

Observaciones generales:

ANEXO 3

Preparación de muestras para Electroforesis de Isoenfoque

- Preparación de κ -caseína para electroforesis MCKENZIE y WAKE (1961).
 - Precipitar la caseína de 950 ml de leche descremada por adición de HCL 0.1 N hasta obtener un pH de 4,5.
 - Centrifugar a 4000 r.p.m. por 15 min.
 - El precipitado se filtra a través de filtro Whatman N° 2 u otra forma equivalente.
 - La caseína obtenida se lava 4 veces con agua destilada.
 - La caseína lavada se purifica con una re-precipitación isoeléctrica, disolviéndola con Na OH diluido (0.05 M).
 - Agregar HCl hasta obtener un pH de 4,7
 - Se centrifuga a 4000 r.p.m. por 15 minutos.
 - Se disuelve 20 gr de caseína ácida con NaOH 1N hasta pH 7,0 – 7,5 y se completa con agua destilada hasta obtener un volumen aproximado de 300 ml.
 - Se enfría a 2°C y se agrega 30 ml. de CaCl₂ 4M ajustado a PH 6,5 – 7,0 con NaOH 1N.
 - Se agita continuamente durante 1 hora. El calcio sensible precipitará por calentamiento a 35°C.
 - El precipitado se remueve a temperatura ambiente por centrifugación a 5500 r.p.m por 60 minutos.

- Purificación de β -lg para electroforesis, LOWE *et al* (1995).
 - Preparar el suero ajustando las muestras de lche a pH 4,6 con HCl 1M.
 - Luego, centrifugar a 13.000 r.p.m por 5 min.
 - El sobrenadante es diluido 10 veces en buffer muestra.

ANEXO 4

Curva de calibración para la determinación de proteínas de acuerdo al método descrito por LOWRY *et al.* (1951)

Curva Estándar

- Solución patrón: seroalbúmina de bovino (BSA) 2 mg/mL.
- Medir de la solución de BSA 10, 20, 30, 40, 50 y 60 μL (20, 40, 60, 80, 100 y 120 μg de proteína) en tubos de ensayo, agregar agua hasta completar 0.6 mL.
- Se agrega a cada tubo 3 mL. de solución C y se deja a temperatura ambiente por 10 min.
- Se agrega 0.3 mL de reactivo Folin – Ciocalteu 1N.
- Se deja 30 min. a temperatura ambiente
- Se grafica μg de proteína v/s D.O. a 750 nm.

Se determinó la absorbancia de la solución patrón en diferentes cantidades de solución de BSA, obteniéndose los siguientes resultados:

Absorbancia determinada en diferentes cantidades de solución de BSA

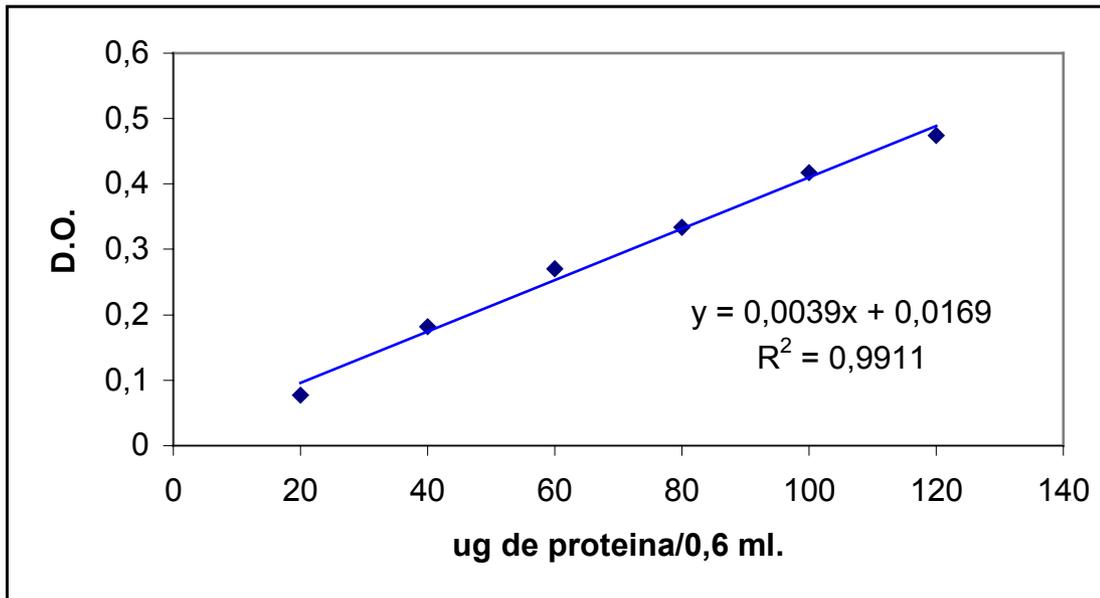
Curva estándar 1			Curva estándar 2		
μL sol. BSA (2 mg/mL)	μg de proteína	D.O. 750 nm	μL sol. BSA (2 mg/mL)	μg de proteína	D.O. 750 nm
10	20	0,077	10	20	0,103
20	40	0,182	20	40	0,157
30	60	0,27	30	60	0,275
40	80	0,334	40	80	0,340
50	100	0,417	50	100	0,419
60	120	0,474	60	120	0,485

Con estos resultados se obtuvo una ecuación, mediante la cual se determinó el contenido de proteína en las preparaciones de κ -caseína y β -lactoglobulina.

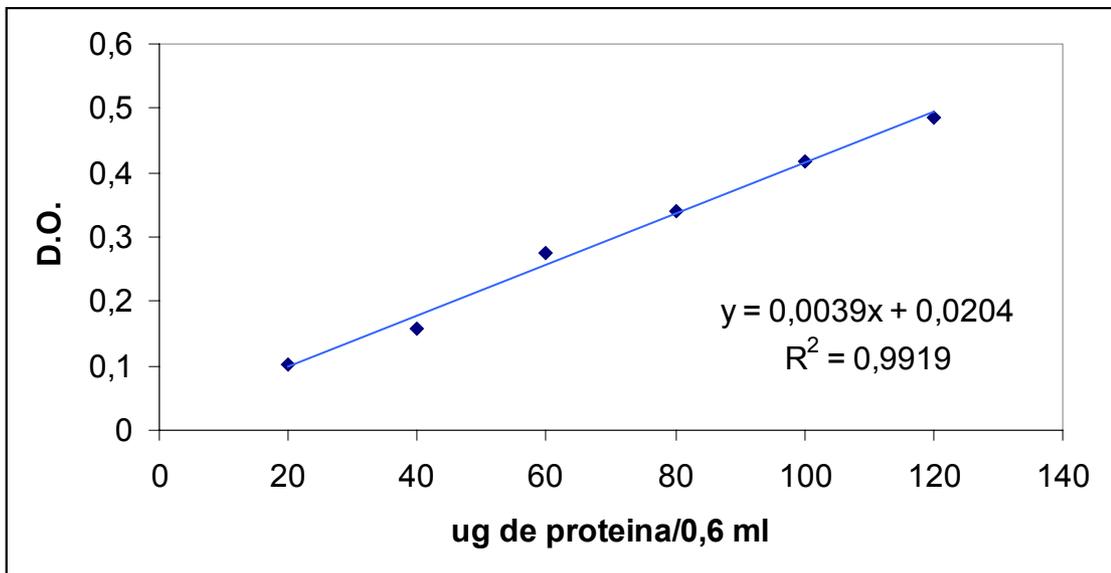
Continuación ANEXO 4

Se utilizaron dos curvas de calibración, la primera para los muestreos 1 y 2, y la segunda para los muestreos 3 y 4.

Curva de Calibración Estándar (1)



Curva de Calibración Estándar (2)



ANEXO 5

Electroforesis de Isoenfoque

- Preparación del buffer para las muestras (ADDEO *et al.*, 1983).

Las muestras fueron disueltas en urea 7M con 0,1% 2-mercaptoetanol de tal manera de colocar 10 µg de muestra en cada tubo con gel.
- Preparación del gel (PEARCE *et al.*, 1972).
 - 5 ml solución de acrilamida (40% acrilamida, 0,6% bis-acrilamida en agua)
 - 1 ml N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) (1,75% en agua).
 - 2,5 ml persulfato de amonio (0,37 % en agua).
 - 0,5 ml anfolito pH 3.5-10 (Sigma A-5174)
 - 11 ml de agua
- Buffer electrodos (PEARCE *et al.* 1972 y ANDREWS, 1992)
 - Anodo: H₂SO₄ 0,2%
 - Cátodo: NaOH 0,02N
- Pre-corrída
 - 200 V x 15 min.
 - 300 V x 30 min.
 - 400 V x 60 min.
- Corrida
 - 400 V x 13 horas en refrigeración
- Fijación, tinción y desteñido de los geles
 - ½ hora en solución fijadora
 - ½ hora en solución de desteñido
 - ½ hora en solución de tinción a 60°C
 - colocar en solución de desteñido.

Solución Fijadora	Solución de tinción	Solución de desteñido
Acido tricloroacético (TCA 15%)	- 0,23 g Coomassie Brilliant Blue G-250 - 200 ml sol. de desteñido	- 500 ml etanol - 160 ml ácido acético - completar hasta 2L con H ₂ O

Ref: CASANOVA (2001)

ANEXO 6

Volumen de muestra de las preparaciones proteicas utilizado en cada electroforesis.

• **Muestras de k-CN**

Vaca	Muestreo	A	B	C	D	E	F
644	1	0,07	13,99	23,32	2331,73	466,35	21
	2	0,084	17,52	29,20	2919,53	583,91	17
	3	0,124	26,62	44,37	4436,98	887,40	11
	4	0,055	9,27	15,45	1545,10	309,02	32
591	1	0,059	11,22	18,70	1869,88	373,98	27
	2	0,067	13,23	22,06	2205,77	441,15	23
	3	0,083	16,31	27,19	2718,62	543,72	18
	4	0,075	14,30	23,83	2383,33	476,67	21
636	1	0,083	17,27	28,78	2877,55	575,51	17
	2	0,089	18,78	31,29	3129,47	625,89	16
	3	0,061	10,78	17,97	1796,57	359,31	28
	4	0,114	24,11	40,18	4017,87	803,57	12
639	1	0,051	9,20	15,34	1533,99	306,80	33
	2	0,074	15,00	25,00	2499,67	499,93	20
	3	0,086	17,07	28,44	2844,35	568,87	18
	4	0,101	20,84	34,73	3473,02	694,60	14
642	1	0,072	14,49	24,16	2415,70	483,14	21
	2	0,082	17,01	28,36	2835,56	567,11	18
	3	0,106	22,10	36,83	3682,58	736,52	14
	4	0,089	17,82	29,70	2970,08	594,02	17
560	1	0,053	9,71	16,18	1617,96	323,59	31
	2	0,057	10,72	17,86	1785,90	357,18	28
	3	0,089	17,82	29,70	2970,08	594,02	17
	4	0,09	18,07	30,12	3012,00	602,40	17
596	1	0,049	8,70	14,50	1450,01	290,00	34
	2	0,059	11,22	18,70	1869,88	373,98	27
	3	0,075	14,30	23,83	2383,33	476,67	21
	4	0,097	19,83	33,05	3305,37	661,07	15
579	1	0,059	11,22	18,70	1869,88	373,98	27
	2	0,064	12,48	20,80	2079,81	415,96	24
	3	0,099	20,34	33,89	3389,20	677,84	15
	4	0,095	19,33	32,22	3221,55	644,31	16
546	1	0,068	13,49	22,48	2247,75	449,55	22
	2	0,075	15,25	25,42	2541,66	508,33	20
	3	0,095	19,33	32,22	3221,55	644,31	16
	4	0,088	17,57	29,28	2928,17	585,63	17
633	1	0,069	13,74	22,90	2289,74	457,95	22
	2	0,084	17,52	29,20	2919,53	583,91	17
	3	0,099	20,34	33,89	3389,20	677,84	15
	4	0,088	17,57	29,28	2928,17	585,63	17

A = Absorbancia 750 nm

B = μg de proteína / 0,6 mL

C = μg de proteína / mL

D = dilución (100 veces) en agua de muestra original ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

E = dilución (5 veces) en buffer ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

F = Volumen utilizado en electroforesis (μL)

Continuación ANEXO 6

• **Muestras preparadas de β -Ig**

Vaca	Muestreo	A	B	C	D	E	F
644	1	0,075	15,25	25,42	2541,66	254,17	39
	2	0,104	22,56	37,59	3759,26	375,93	27
	3	0,098	20,08	33,47	3347,29	334,73	30
	4	0,092	18,57	30,96	3095,82	309,58	32
591	1	0,079	16,26	27,10	2709,60	270,96	37
	2	0,104	22,56	37,59	3759,26	375,93	27
	3	0,098	20,08	33,47	3347,29	334,73	30
	4	0,089	17,82	29,70	2970,08	297,01	34
636	1	0,076	15,50	25,84	2583,64	258,36	39
	2	0,097	20,79	34,65	3465,36	346,54	29
	3	0,078	15,05	25,09	2509,06	250,91	40
	4	0,097	19,83	33,05	3305,37	330,54	30
639	1	0,083	17,27	28,78	2877,55	287,75	35
	2	0,103	22,30	37,17	3717,27	371,73	27
	3	0,096	19,58	32,63	3263,46	326,35	31
	4	0,109	22,85	38,08	3808,31	380,83	26
642	1	0,067	13,23	22,06	2205,77	220,58	45
	2	0,103	22,30	37,17	3717,27	371,73	27
	3	0,065	11,79	19,64	1964,21	196,42	51
	4	0,078	15,05	25,09	2509,06	250,91	40
560	1	0,081	16,76	27,94	2793,57	279,36	36
	2	0,092	19,53	32,55	3255,42	325,54	31
	3	0,084	16,56	27,61	2760,53	276,05	36
	4	0,093	18,83	31,38	3137,73	313,77	32
596	1	0,063	12,23	20,38	2037,82	203,78	49
	2	0,119	26,33	43,89	4389,06	438,91	23
	3	0,083	16,31	27,19	2718,62	271,86	37
	4	0,092	18,57	30,96	3095,82	309,58	32
579	1	0,065	12,73	21,22	2121,79	212,18	47
	2	0,099	21,30	35,49	3549,33	354,93	28
	3	0,076	14,55	24,25	2425,24	242,52	41
	4	0,092	18,57	30,96	3095,82	309,58	32
546	1	0,06	11,47	19,12	1911,86	191,19	52
	2	0,063	12,23	20,38	2037,82	203,78	49
	3	0,076	14,55	24,25	2425,24	242,52	41
	4	0,113	23,86	39,76	3975,95	397,60	25
633	1	0,087	18,27	30,45	3045,49	304,55	33
	2	0,106	23,06	38,43	3843,23	384,32	26
	3	0,077	14,80	24,67	2467,15	246,71	41
	4	0,092	18,57	30,96	3095,82	309,58	32

A = Absorbancia 750 nm

B = μg de proteína / 0,6 mL

C = μg de proteína / mL

D = dilución (100 veces) en agua de muestra original ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

E = dilución (10 veces) en buffer ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

F = Volumen utilizado en electroforesis (μL)

ANEXO 7

Distancia de migración de las muestras de κ -CN para la identificación de las variantes genéticas.

Vaca	Muestreo	Distancia de migración (mm)	Estándares utilizados				Variante
			St. κ -CN B	mm	St. κ -CN A	mm	
636	1	28.7	4052-2	30.1	κ -CN sigma	25.1	B
	2	A/L	A/L		A/L		A/L
	3	33	4052-2	32	κ -CN sigma	29.5	B
	4	34.9	4052-2	34.9		33.8	B
579	1	28.3	4052-2	30.1	κ -CN sigma	25.1	A
	2	A/L	A/L				A/L
	3	30.5	4052-2	32	κ -CN sigma	29.5	A
	4	33.5	3971-1	34.9		33.5	A
596	1	29.1	4052-2	30.1	κ -CN sigma	25.1	B
	2	23.7	4052-2	23			B
	3	33	4052-2	32	κ -CN sigma	29.5	B
	4	35.3	3971-1	34.9		33.5	B
642	1	29.5	4052-2	30.1	κ -CN sigma	25.1	B
	2	A/L	A/L				A/L
	3	31	4052-2	32	κ -CN sigma	29.5	B
	4	34.6	4052-2	34.9		33.8	B
560	1	27.4	4052-2	30.1	κ -CN sigma	25.1	A
	2	22.7	4052-2	23			A
	3	30.5	4052-2	32	κ -CN sigma	29.5	A
	4	33.1	3971-1	34.9		33.5	A
546	1	29.7	4052-1	30.1	3971-1	29.2	B
	2	23.2	4052-2	23			B
	3	33	4052-2	32	κ -CN sigma	29.5	B
	4	34.2	4052-2	34.9		33.8	B
591	1	29.7	4052-2	30.1	3971	29.2	B
	2	24	4052-2	23.48	κ -CN sigma	20.3	B
	3	32	4052-2	32	κ -CN sigma	29.5	B
	4	34.5	4052-2	34.9		33.8	B
633	1	30	4052-2	30.1		--	B
	2	25.7	4052-2	23		--	B
	3	31.5	4052-2	32	κ -CN sigma	29.5	B
	4	34.9	3971-1	34.9		33.5	B
639	1	30.1	4052-2	30.1	κ -CN sigma	25.1	B
	2	25.1	4052-2	23.48	κ -CN sigma	20.3	B
	3	31.1	4052-2	32	κ -CN sigma	29.5	B
	4	36	4052-2	34.9		33.8	B
644	1	NO	NO	--		--	NO
	2	NO	NO	--		--	NO
	3	33.1	4052-2	32	κ -CN sigma	29.5	B
	4	35.2	4052-2	34.9		33.8	B

NO: no observado (sin bandas)

ANEXO 8

Distancia de migración de las muestras de β -lactoglobulina para la identificación de las variantes genéticas.

Vaca	Muestreo	Distancia de migración (mm)		Estándares		Variante
				St. β -Ig A (mm)	St. β -Ig B (mm)	
		A	B			
636	1	17.10 – 19.10		15.10	17.80	AB
	2	14.48 – 16.8		14.28		AB
	3	15.40 – 18.24		15.48	17.40	AB
	4	14.70 – 16.10		15.76	17.80	AB
579	1	15.50 – 17.5		15.10	17.80	AB
	2	14.48		15.26	16.60	A*
	3	16.00 – 18.38		15.48	17.40	AB
	4	16.34 – 18.10		15.76	17.80	AB
596	1	14.20 – 16.86		13.40	16.40	AB
	2	15.50 – 17.50		15.10	17.80	AB
	3	15.42 – 18.00		15.48	17.40	AB
	4	15.64 – 17.98		15.76	17.80	AB
642	1	13.00		15.26	16.60	A
	2	15.40		15.10	17.80	A
	3	15.38		15.48	17.40	A
	4	16.00		15.76	17.80	A
560	1	15.70		15.10	17.80	A
	2	15.20		15.26	16.60	A
	3	15.70		15.48	17.40	A
	4	15.46 – 16.58		15.76	17.80	AB*
546	1	13.40 – 16.70		13.40	16.40	AB
	2	15.00 – 16.50		15.10	17.80	AB
	3	15.60 – 17.76		15.48	17.40	AB
	4	15.70 – 17.50		15.76	17.80	AB
591	1	15.50 – 18.10		15.26	16.60	AB
	2	15.4		15.10	17.80	A*
	3	15.40 – 17.82		15.48	17.40	AB
	4	15.72 – 17.86		15.76	17.80	AB
633	1	15.40 – 16.10		15.26	16.60	AB
	2	15.30 – 17.10		15.10	17.80	AB
	3	15.38 – 17.78		15.48	17.40	AB
	4	15.70 – 17.22		15.76	17.80	AB
639	1	14.60		15.26	16.60	A
	2	A/L		15.10	17.80	A/L
	3	16.04		15.48	17.40	A
	4	16.00		15.76	17.80	A
644	1	15.80 – 17.10		15.10	17.80	AB
	2	15.20 – 16.50		15.26	16.60	AB
	3	15.90 – 17.86		15.48	17.40	AB
	4	15.12 – 16.30		15.76	17.80	AB

A/L: accidente de laboratorio (geles rotos) * : difuso

ANEXO 9

Análisis de varianza de las propiedades de coagulación de la leche

9.1 Aptitud a la Coagulación

Análisis de varianza multifactorial 95%

Fuente	S.C	G.L	C.M	F	P-valor
Efectos principales					
A: Muestreo	0,157415	3	0,524718	1,98	0,1262
B: β -actoglobulina	0,058541	1	1,84313	69,47	0,0000
C: κ -caseína	1,84313	1	0,058541	2,21	0,1423
Interacciones					
AB	0,0114367	3	0,003812	0,14	0,9334
AC	0,112557	3	0,037519	1,41	0,2468
BC	1,25496	1	1,25496	47,30	0,0000
ABC	0,050822	3	0,016940	0,64	0,5930
Residual	1,69803	64	0,0265318		
Total corregido	4,78072	79			

Test de Rango Múltiple Tukey 95%

Muestreo	Cuenta	Promedio	Grupo homogéneo	Límites \pm
1	20	4,13033	X	0,138876
2	20	4,09842	X	0,138876
3	20	4,21413	X	0,138876
4	20	4,23688	X	0,138876

Test de Rango Múltiple Tukey 95%

b-Ig	Cuenta	Promedio	Grupo homogéneo	Límites \pm
AA	24	3,97398	X	0,079361
AB	56	4,36589	X	0,079361

Continuación ANEXO 9

Test de Rango Múltiple Tukey 95%

k-caseína	Cuenta	Promedio	Grupo homogéneo	Límites ±
B	64	4,13502	X	0,09092
A	16	4,20486	X	0,09092

9.2 Firmeza del Gel

Análisis de varianza 95%

Fuente	S.C	G.L	C.M	F	P-valor
Efectos principales					
A: Muestreo	8,39574	3	2,79858	2,45	0,0717
B: κ -caseína	4,54408	1	4,54408	3,97	0,0505
C: β -lactoglobulina	89,0905	1	89,0905	77,92	0,0000
Interacciones					
AB	4,56355	3	1,52118	1,33	0,2723
AC	2,08729	3	0,695763	0,61	0,6119
BC	68,7036	1	68,7036	60,09	0,0000
ABC	5,42482	3	1,80827	1,58	0,2025
Residual	73,1757	64	1,14337		
Total corregido	212,323	79			

Test de Rango Múltiple Tukey 95%

Muestreo	Cuenta	Promedio	Grupo homogéneo	Límites ±
1	20	10,0622	X	0,991979
2	20	9,98635	X	0,991979
3	20	10,7427	X	0,991979
4	20	10,9495	X	0,991979

Continuación ANEXO 9

Test de Rango Múltiple Tukey 95%

k-caseína	Cuenta	Promedio	Grupo homogéneo	Límites ±
A	16	10,1275	X	0,696856
B	64	10,7429	X	0,696856

Test de Rango Múltiple Tukey 95%

b-Ig	Cuenta	Promedio	Grupo homogéneo	Límites ±
AA	24	9,07281	X	0,520979
AB	56	11,7976	X	0,520979

9.3 Sinéresis de la cuajada

Análisis de varianza 95%

Fuente	S.C	G.L	C.M	F	P-valor
Efectos principales					
A: Muestreo	12,5414	3	4,18046	2,73	0,0509
B: κ -caseína	2,71939	1	2,71939	1,78	0,1872
C: β -lactoglobulina	125,373	1	125,373	81,95	0,0000
Interacciones					
AB	4,14296	3	1,38099	0,90	0,4448
AC	0,57920	3	0,19306	0,13	0,9443
BC	79,8897	1	79,8897	52,22	0,0000
ABC	3,01202	3	1,00401	0,66	0,5820
Residual	97,9075	64	1,5298		
Total corregido	264,858	79			

Continuación ANEXO 9

Test de Rango Múltiple Tukey 95%

Muestreo	Cuenta	Promedio	Grupo homogéneo	Límites ±
1	20	9,80833	X	1,23175
2	20	9,37917	X	1,23175
3	20	10,5563	X	1,23175
4	20	10,5833	X	1,23175

Test de Rango Múltiple Tukey 95%

k-caseína	Cuenta	Promedio	Grupo homogéneo	Límites ±
A	16	9,84375	X	0,69039
B	64	10,3198	X	0,69039

Test de Rango Múltiple Tukey 95%

b-Ig	Cuenta	Promedio	Grupo homogéneo	Límites ±
AA	24	8,46563	X	0,602622
AB	56	11,6979	X	0,602622

ANEXO 10

Cálculo de la repetibilidad de los métodos de aptitud a la coagulación, firmeza del gel y sinéresis de la cuajada.

Muestra	Wi aptitud	(Wi ²)	Wi firmeza	(Wi ²)	Wi sinéresis	(Wi ²)
1	-1422,1	2022368,41	-0,5	0,25	-0,3	0,09
2	143,38	20557,8244	0,38	0,1444	0,5	0,25
3	448,87	201484,2769	0,25	0,0625	0	0
4	157,99	24960,8401	0,37	0,1369	0,5	0,25
5	142	20164	-0,5	0,25	0	0
6	519,48	269859,4704	-0,375	0,140625	0,5	0,25
7	166,13	27599,1769	-0,5	0,25	0,5	0,25
8	-551,18	303799,3924	-0,25	0,0625	-0,5	0,25
9	-1039	1079521	-0,5	0,25	0,5	0,25
10	628,2	394635,24	0,12	0,0144	0,5	0,25
11	-1180,6	1393816,36	0,5	0,25	0	0
12	41,6	1730,56	0,25	0,0625	-0,5	0,25
13	211,68	44808,4224	-0,5	0,25	0,2	0,04
14	-626,4	392376,96	-0,25	0,0625	-0,5	0,25
15	541,3	293005,69	0,12	0,0144	-0,5	0,25
16	217,15	47154,1225	0	0	0,5	0,25
17	314,13	98677,6569	0,4	0,16	0,5	0,25
18	-583,69	340694,0161	-0,25	0,0625	0,5	0,25
19	1095,5	1200120,25	0,25	0,0625	-0,5	0,25
20	406,53	165266,6409	0,625	0,390625	0,5	0,25
21	1196,4	1431372,96	0,63	0,3969	1	1
22	641,2	411137,44	-0,37	0,1369	-0,7	0,49
23	999,4	998800,36	0,5	0,25	0,5	0,25
24	751,6	564902,56	-0,37	0,1369	-0,5	0,25
25	-422,3	178337,29	-0,62	0,3844	-0,5	0,25
26	-139,6	19488,16	0,325	0,105625	0,5	0,25
27	117,65	13841,5225	-0,55	0,3025	0,5	0,25
28	182,66	33364,6756	-0,25	0,0625	-0,5	0,25
29	1661,8	2761579,24	-0,37	0,1369	-0,5	0,25
30	1422,1	2022368,41	0,63	0,3969	0,5	0,25
31	1571,9	2470869,61	-0,5	0,25	0,5	0,25
32	132,5	17556,25	0,63	0,3969	0,5	0,25
33	1020,4	1041216,16	-0,25	0,0625	0	0
34	-915	837225	-0,48	0,2304	-0,5	0,25
35	1435,9	2061808,81	-0,62	0,3844	0,3	0,09
36	-445,7	198648,49	-0,375	0,140625	-0,5	0,25
37	-362,85	131660,1225	-0,5	0,25	1	1
38	526,6	277307,56	-0,375	0,140625	0,3	0,09
39	1032,2	1065436,84	-0,37	0,1369	0,5	0,25
40	555,5	308580,25	0,75	0,5625	0,2	0,04
Σwi²		25188102,02		7,741		9,840

* extraído de tabla de datos (ANEXO 14)

10.1 Repetibilidad del método de aptitud a la coagulación

$$Sr = ((1/(2*q)) * \sum wi^2)^{1/2}$$

$$r = 2,83 * Sr$$

donde :

r : repetibilidad

Sr : desviación estándar de la repetibilidad

q : número de muestras

w : diferencia entre duplicados

$$Sr = ((1/2*q) * \sum wi^2)^{1/2}$$

$$Sr = ((1/2*40) * 25188102,02)^{1/2}$$

$$Sr = 561,116098$$

$$r = 2,83 * Sr$$

$$r = 2,83 * (561,116098)$$

$$r = 1.587,958557 = 1 : 1.588 \text{ (g de cuajo / mL leche)}$$

$$CV = (Sr/x) * 100 = (561,1160 / 17.069) * 100 = 3,28 \%$$

10.2 Repetibilidad del método de firmeza del gel

$$Sr = ((1/2*q) * \sum wi^2)^{1/2}$$

$$Sr = ((1/2*40) * 7,741)^{1/2}$$

$$Sr = 0,311067$$

Repetibilidad (r):

$$r = 2,83 * Sr$$

$$r = 2,83 * (0,311067)$$

$$r = 0,880319 \text{ gf.}$$

$$CV = (Sr/x) * 100 = (0,311067 / 10,6862) * 100 = 2,91 \%$$

10.3 Repetibilidad del método de sinéresis de la cuajada

$$Sr = ((1/2*q) * \sum wi^2)^{1/2}$$

$$Sr = ((1/2*40) * 9,840)^{1/2}$$

$$Sr = 0,350714$$

Repetibilidad (r):

$$r = 2,83 * Sr$$

$$r = 2,83 * (0,350714)$$

$$r = 0,992519 \text{ mL.}$$

$$CV = (Sr/x) * 100 = (0,350714 / 10,355) * 100 = 3,39 \%$$

ANEXO 11

Coeficientes de correlación determinados para las variables en estudio.

Variable dependiente	Firmeza del gel	pH	Sinéresis cuajada
Aptitud a la Coagulación	0,7988 (0,0000)	-0,4664 (0,0000)	0,8477 (0,0000)
Firmeza del gel		-0,6001 (0,0000)	0,9140 (0,0000)

- valores de $p < 0,05$ indican relación estadísticamente significativa

ANEXO 12

Comparación de promedios de pH

- Comparación de promedio de pH de β -Lg AA y β -Lg AB

Comparación de promedios

Intervalo de confianza 95% para el promedio de β -Lg AA: 6,7658 +/- 0,05489

Intervalo de confianza 95% para el promedio de β -Lg AB: 6,6775 +/- 0,02413

Intervalo de confianza 95% para la diferencia entre los promedios:

Varianzas iguales: 0,088333 +/- 0,0489485

Varianzas desiguales: 0 088333 +/- 0 0584158

Prueba de "t" para comparar promedios

Hipótesis nula : promedio1 = promedio 2

(1)Hipótesis alternativa: promedio 1 \neq promedio 2

varianzas iguales : t = 3,65326 P= 0,00077819

varianzas desiguales: t = 3,20383 P= 0,0054941

(2)Hipótesis alternativa: promedio 1 > promedio 2

varianzas iguales : t = 3,65326 P= 0,000389095

varianzas desiguales: t = 3,20383 P= 0,00274705

(3)Hipótesis alternativa: promedio 1 < promedio 2

varianzas iguales : t = 3,65326 P= 0,999611

varianzas desiguales: t = 3,20383 P= 0,997253

P < 0,05 : existe diferencia estadísticamente significativa

Continuación ANEXO 12

➤ Comparación de promedio de pH de κ -CN A y κ -CN B

Comparación de promedios

Intervalo de confianza 95% para el promedio de κ -CN A: 6,73625 +/- 0,0990142

Intervalo de confianza 95% para el promedio de κ -CN B: 6,69594 +/- 0,0245361

Intervalo de confianza 95% para la diferencia entre los promedios:

Varianzas iguales: 0,0403125 +/- 0,0638272

Varianzas desiguales: 0,0403125 +/- 0,10006

Prueba de "t" para comparar promedios

Hipótesis nula : promedio1 = promedio 2

(1)Hipótesis alternativa: promedio 1 \neq promedio 2

varianzas iguales : t = 1,27859 P= 0,208797

varianzas desiguales: t = 0,9253 P= 0,381263

(2)Hipótesis alternativa: promedio 1 > promedio 2

varianzas iguales : t = 1,27859 P= 0,104399

varianzas desiguales: t = 0,9253 P= 0,190632

(3)Hipótesis alternativa: promedio 1 < promedio 2

varianzas iguales : t = 1,27859 P= 0,895601

varianzas desiguales: t = 0,9253 P= 0,809368

P < 0,05 : existe diferencia estadísticamente significativa

ANEXO 13

Promedio ponderado de las propiedades de coagulación de la leche

- **Producción de leche de vacas individuales**

# vaca	Producción de leche (L)			
	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4
546	14	12	10	11
560	9	10	9	8
579	11	14	15	12
591	14	9	12	12
596	12	13	12	13
633	10	11	9	11
636	11	7	12	10
639	10	6,5	10	12
644	9,5	6	8	7
642	10	8	12	9

- **Muestras de leche de vacas individuales en la leche mezcla**

Muestreo		Leche mezcla (# de vaca)
1	LM1 a	546 - 591 - 636 - 644 - 633
	LM1 b	596 - 560 - 639 - 579 - 642
2	LM2 a	591 - 636 - 644 - 639 - 642
	LM2 b	596 - 633 - 546 - 579 - 560
3	LM3 a	546 - 591 - 636 - 644 - 633
	LM3 b	596 - 560 - 639 - 579 - 642
4	LM4 a	591 - 636 - 644 - 639 - 642
	LM4 b	596 - 633 - 546 - 579 - 560

LM: leche mezcla

a: sub-muestreo día lunes

b: sub-muestreo día miércoles

Continuación ANEXO 13

- **Promedio ponderado de las propiedades de coagulación de la leche y resultados de análisis de leche mezcla**

Muestreo	Sub-muestreo	Aptitud a la coagulación (g cuajo / mL leche)		Firmeza del gel (gf)		Sinéresis (mL)		Variante	
		Promedio ponderado ¹	LM	Promedio ponderado ¹	LM	Promedio ponderado ¹	LM	κ-CN	β-Lg
1	a	1:13.617	1:14.092	10,28	10,88	10,61	11,75	A/L	A-B
	b	1:16.052	1:13.877	10,30	10,06	9,64	10,75	NO	A
2	a	1:9.719	1:8.550	10,61	10,63	10,15	9,25	A-B	A-B
	b	1:18.878	1:16.057	10,40	10,13	9,94	9,50	A/L	NO
3	a	1:19.952	1:18.022	11,24	10,56	10,79	10,25	NO	A-B
	b	1:19.845	1:18.937	11,01	10,61	10,51	10,75	NO	A
4	a	1:17.482	1:17.529	10,70	10,12	10,66	10,00	A-B	A-B
	b	1:24.512	1:21.330	11,62	11,00	11,33	10,75	A-B	NO

¹ calculado de acuerdo a la producción de leche por vaca

A/L: accidente de laboratorio; NO: no observado (sin bandas)

ANEXO 14

Resultados de los análisis realizados a las muestras de leche

Muestreo	Vaca	pH	Aptitud (g cuajo/mL leche)	Firmeza (gf)	Sinéresis (mL)	Variante κ -CN	Variante β -Lg
1	546	6,68	27149,3	11,5	13	B	AB
1	546	6,68	28571,4	12	13,3	B	AB
1	591	6,75	7185,63	9,13	9,5	B	AB
1	591	6,75	7042,25	8,75	9	B	AB
1	636	6,75	8759,12	10,75	9,5	B	AB
1	636	6,75	8310,25	10,5	9,5	B	AB
1	644	6,73	7142,86	9,12	9,5	B	AB
1	644	6,73	6984,87	8,75	9	B	AB
1	633	6,7	14669,9	10,75	11,5	B	AB
1	633	6,7	14527,9	11,25	11,5	B	AB
1	596	6,79	7792,21	9,5	9	B	AB
1	596	6,79	7272,73	9,875	8,5	B	AB
1	560	6,84	6666,67	6,5	6,5	A	A
1	560	6,84	6500,54	7	6	A	A
1	639	6,86	9448,82	10,5	9	B	A
1	639	6,86	10000	10,75	9,5	B	A
1	579	6,67	38961	11,75	13	A	AB
1	579	6,67	40000	12,25	12,5	A	AB
1	642	6,74	15665,8	12,12	11	B	A
1	642	6,74	15037,6	12	10,5	B	A
2	546	6,6	24793,4	11,25	12,5	B	AB
2	546	6,6	25974	10,75	12,5	B	AB
2	591	6,6	11194	11,25	11	B	AB
2	591	6,6	11152,4	11	11,5	B	AB
2	636	6,6	7537,69	10	9,2	B	AB
2	636	6,6	7326,01	10,5	9	B	AB
2	644	6,6	11952,2	11,25	11	B	AB
2	644	6,6	12578,6	11,5	11,5	B	AB
2	633	6,6	11450,4	11,62	9,5	B	AB
2	633	6,6	10909,1	11,5	10	B	AB
2	596	6,6	9756,1	9,875	9,5	B	AB
2	596	6,6	9538,95	9,875	9	B	AB
2	560	6,75	6703,91	7,25	6	A	A
2	560	6,75	6389,78	6,85	5,5	A	A
2	639	6,7	8000	10	9,5	B	A
2	639	6,7	8583,69	10,25	9	B	A
2	579	6,6	36809,8	12	11,5	A	AB
2	579	6,6	35714,3	11,75	12	A	AB
2	642	6,6	9538,95	10,5	10	B	A
2	642	6,6	9132,42	9,875	9,5	B	A

Continuación ANEXO 14

Muestreo	Vaca	pH	Aptitud (g cuajo/mL leche)	Firmeza (gf)	Sinéresis (mL)	Variante κ -CN	Variante β -Lg
3	546	6,69	28846,2	13,25	12,5	B	AB
3	546	6,69	27649,8	12,62	11,5	B	AB
3	591	6,71	15831,1	9,75	9,5	B	AB
3	591	6,71	15189,9	10,12	10,2	B	AB
3	636	6,73	21201,4	11,87	11	B	AB
3	636	6,73	20202	11,37	10,5	B	AB
3	644	6,72	16666,7	10,25	10	B	AB
3	644	6,72	15915,1	10,62	10,5	B	AB
3	633	6,71	20339	11	11	B	AB
3	633	6,71	20761,3	11,62	11,5	B	AB
3	596	6,76	10869,6	9,825	9	B	AB
3	596	6,76	11009,2	9,5	8,5	B	AB
3	560	6,88	7159,9	7,825	8	A	A
3	560	6,88	7042,25	8,375	7,5	A	A
3	639	6,77	9273,57	9	8,5	B	A
3	639	6,77	9090,91	9,25	9	B	A
3	579	6,67	36144,6	13,75	13,5	A	AB
3	579	6,67	34482,8	14,12	14	A	AB
3	642	6,71	28571,4	12,75	12	B	A
3	642	6,71	27149,3	12,12	11,5	B	A
4	546	6,61	37500	13,5	13,5	B	AB
4	546	6,61	35928,1	14	13	B	AB
4	591	6,73	20000	11,5	11	B	AB
4	591	6,73	19867,5	10,87	10,5	B	AB
4	636	6,69	21428,6	11,75	12	B	AB
4	636	6,69	20408,2	12	12	B	AB
4	644	6,73	18072,3	10,37	10	B	AB
4	644	6,73	18987,3	10,85	10,5	B	AB
4	633	6,62	27522,9	12,25	12,3	B	AB
4	633	6,62	26087	12,87	12	B	AB
4	596	6,73	12320,3	9,625	9,5	B	AB
4	596	6,73	12766	10	10	B	AB
4	560	6,88	7822,69	8,125	8,5	A	A
4	560	6,88	8185,54	8,625	7,5	A	A
4	639	6,77	10889,3	8,875	9,5	B	A
4	639	6,77	10362,7	9,25	9,2	B	A
4	579	6,6	35714,3	12,75	13	A	AB
4	579	6,6	34682,1	13,12	12,5	A	AB
4	642	6,69	20689,7	11,37	11,2	B	A
4	642	6,69	20134,2	10,62	11	B	A