

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

**Proteína Total, Calcio, Fósforo y Estabilidad Térmica de
la Leche y su Relación con las Variantes Genéticas de
k-Caseína. Época de Invierno.**

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

Claudia Andrea Cid Rodríguez

VALDIVIA – CHILE

2004

PROFESOR PATROCINANTE

Sra. Luz Haydeé Molina C.

Prof. Biología y Química

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

PROFESORES INFORMANTES

Sr. Bernardo Carrillo L.

Ingeniero Agrónomo

Ms. En Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Sr. Erwin Carrasco R.

Ingeniero Civil Químico

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

***Con amor para mis padres
y esposo...***

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer en forma muy especial a la Sra. Luz Haydeé Molina, por su constante dedicación, apoyo y amistad durante mis años de estudio y en la realización de esta tesis.

A mis profesores informantes Sr. Bernardo Carrillo y Sr. Erwin Carrasco, y en general a todos aquellos profesores que de alguna u otra forma contribuyeron al desarrollo de esta investigación.

Agradecer a mis padres Julio y Yolanda, que con su amor incondicional, comprensión y esfuerzo me han ayudado lograr una de las metas de mi vida. Sin duda, su ejemplo de amor de pareja y de padres será mi próximo objetivo a alcanzar.

A mi amado David, debido a su apoyo, comprensión e infinito amor que me han acompañado desde el inicio de mis estudios universitarios.

A mis hermanos Julio y Anita, cuñados y sobrinitos por su gran apoyo y cariño a pesar de la distancia geográfica que nos separan.

En especial a mi gran compañero y amigo Eduardo Aguilar, que sin duda estos años de universidad no hubiesen sido lo mismo sin él, y cuya amistad sé que perdurará en el tiempo.

Finalmente, agradecer a mis queridos compañeros y amigos: Lucía Ortíz, Jessica González, Marcela Monje, Marianne Reutter, Mónica González y Rodrigo Vásquez, que me han acompañado a lo largo de la carrera.

ÍNDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Definición de leche	3
2.2	Composición de la leche	3
2.3	Proteínas de la leche	4
2.3.1	Factores que influyen en el contenido de proteínas	6
2.3.2	Caseínas	8
2.3.2.1	α -caseína	10
2.3.2.2	β -caseína	10
2.3.2.3	κ -caseína	11
2.3.3	Proteínas del suero	12
2.3.3.1	β -lactoglobulina	13
2.3.3.2	α -lactoalbúmina	13
2.3.4	Polimorfismo genético de las proteínas de la leche	14
2.4	Minerales de la leche	18
2.4.1	Factores que influyen en el contenido de minerales	21
2.4.2	Calcio	23
2.4.3	Fósforo	24
2.5	Estabilidad térmica de la leche	24
3	MATERIAL Y MÉTODO	28
3.1	Material	28
3.1.1	Ubicación del ensayo	28

3.1.2	Duración del ensayo	28
3.2	Método	28
3.2.1	Obtención de muestras	28
3.2.2	Diseño experimental	29
3.2.3	Análisis estadístico	29
3.2.4	Método de análisis	30
3.2.4.1	Cuantificación de proteínas	30
3.2.4.2	Determinación del contenido de calcio	31
3.2.4.3	Determinación del contenido de fósforo	31
3.2.4.4	Determinación de la termoestabilidad de la leche	31
3.2.4.5	Determinación de las variantes genéticas de κ -caseína	32
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	34
4.1	Contenido de proteína total, calcio, fósforo, evaluación de termoestabilidad y producción de leche en las muestras analizadas	34
4.1.1	Contenido de proteína total	34
4.1.2	Contenido de calcio	36
4.1.3	Contenido de fósforo	38
4.1.4	Estabilidad térmica de la leche	40
4.1.5	Producción de leche	42
4.1.6	Comportamiento de la leche mezcla	44
4.2	Análisis de correlación entre las variables termoestabilidad y p proteína, calcio y fósforo	45
4.3	Variantes genéticas de κ -caseína	47
4.4	Relación de las variantes genéticas con el contenido de proteína total, calcio, fósforo y termoestabilidad de la leche	50
4.4.1	Efecto de las variantes A ó B de κ -caseína en relación a	51

	la proteína total	
4.4.2	Efecto de las variantes de κ -caseína y calcio	52
4.4.3	Efecto de las variantes de κ -caseína y fósforo	53
4.4.4	Efecto de las variantes de κ -caseína y termoestabilidad	53
5	CONCLUSIONES	55
6	RESUMEN	56
	SUMMARY	57
7	BIBLIOGRAFÍA	58
	ANEXOS	69

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición promedio de la leche de vaca	4
2	Caseínas y sus variantes genéticas	10
3	Concentración de las principales sales de la leche	19
4	Composición mineral de la leche (g/L)	21
5	Efectos de los tratamientos térmicos sobre los componentes de la leche	27
6	Diseño experimental	29
7	Metodologías de análisis	30
8	Promedio y desviación estándar del contenido proteico para las muestras de leche según número de muestreo	34
9	Promedio y desviación estándar del contenido de calcio (expresados en g/L) para las muestras de leche según número de muestreo	36
10	Promedio y desviación estándar del contenido de fósforo para las muestras de leche según muestreo	38
11	Promedio y desviación estándar de termoestabilidad en las muestras de leche	40
12	Producción de leche (L) durante los cuatro muestreos	43
13	Promedio y desviación estándar de la producción de leche de las vacas estudiadas. Ordeño AM	43
14	Número de vaca utilizada para la preparación de la leche mezcla en cada muestreo	44
15	Promedio experimental y ponderado de las repuestas estudiadas	45

16	Coeficientes de correlación entre las variables estudiadas	46
17	Muestra de leche y la variante genética identificada	49
18	Promedio y desviación estándar de las variables en estudio para cada variante de κ -caseína	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Electroforesis de isoenfoque para κ -caseína en muestras de leche de vacas Frisón Negro	48

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Caracterización de las vacas en estudio	70
2	Procedimiento para determinación de la termoestabilidad de la leche	72
3	Preparación de las muestras de κ -caseína para electroforesis de isoenfoque	73
4	Electroforesis de isoenfoque en geles de poliacrilamida	74
5	Resultados obtenidos del valor de pH, termoestabilidad, contenido proteína total, calcio y fósforo en los diferentes muestreos	75
6	Ecuaciones obtenidas a partir de las curvas de calibración para la determinación de la masa de fósforo para cada muestreo	79
7	Curva de calibración para la determinación de proteínas siguiendo el método descrito por LOWRY <i>et al.</i> (1951)	80
8	Identificación de variantes genéticas de κ -caseína mediante electroforesis de isoenfoque	83
9	Densitometrías de κ -CN para las muestras de leche realizadas por el programa computacional UNSCANIT	85
10	Resultados obtenidos de los análisis estadísticos	86

1. INTRODUCCIÓN

El incremento de productos elaborados utilizando como materia prima la leche se debe principalmente a las características que ésta presenta, ya sea, por su composición y su uso universal en la alimentación. La leche posee diversos usos en el ámbito industrial, por lo cual es importante caracterizar su composición y los factores que la afectan.

Las proteínas representan uno de los componentes de la leche con mayor valor nutritivo y de importancia en su procesamiento, y en la estabilidad frente a tratamientos térmicos. Así mismo, los minerales calcio y fósforo que forman parte del equilibrio del complejo micelar, poseen una marcada influencia en la estabilidad de la leche, debido a las modificaciones que se producen en el contenido de las fases solubles y coloidal por efecto de los tratamientos térmicos.

En diversos estudios se ha descrito que las variantes genéticas de las proteínas poseen influencia en las propiedades de la leche, especialmente con relación a las variantes A y B de κ -caseína. Se ha especificado que la variante genética B de κ -caseína influye en forma positiva tanto en el contenido de proteína como en el equilibrio físico químico de las sales, otorgándole a la leche una mayor estabilidad en aquellos procesos que involucran tratamientos térmicos.

En el presente trabajo se presenta la siguiente hipótesis: Las leches que presentan el fenotipo B de κ -caseína (κ -CN) presentarán un mayor contenido de proteína total, calcio, fósforo y una mayor estabilidad térmica.

El objetivo general del presente trabajo es relacionar el contenido de proteína total, calcio, fósforo y la termoestabilidad de la leche, con las variantes genéticas de κ -caseína, en leche de 10 vacas individuales, de raza Frisón Negro, durante la época de invierno.

Los objetivos específicos del estudio son los siguientes:

- Determinar el contenido total de proteínas, calcio y fósforo en las muestras de leche.
- Evaluar la termoestabilidad de las muestras de leche en estudio.
- Determinar la expresión fenotípica de las variantes de K-CN, en las muestras de leche de vaca Frisón Negro.
- Evaluar la relación entre el contenido de proteína total, calcio, fósforo y termoestabilidad de la leche, con la expresión de una determinada variante genética.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Definición de leche

Según el Reglamento Sanitario de los Alimentos (CHILE, MINISTERIO DE SALUD, 2000), leche “es el producto extraído de la ordeña completa e ininterrumpida de vacas sanas, bien alimentadas y en reposo, exenta de calostro. La leche de otros animales se denominará según la especie de que proceda, como también los productos que de ella se deriven”. Además, la leche deberá presentar determinadas características, las que se describen en el Párrafo II en el Artículo 203 del mismo reglamento.

La leche es un líquido de composición compleja, de color blanco y opaco, de sabor dulce y reacción iónica próxima a la neutralidad; cuya importancia radica en su alto valor nutritivo, ya que sus componentes se encuentran en forma y proporción adecuadas (BELITZ y GROSCH, 1997; ALAIS, 1985; BADUI, 1984).

2.2 Composición de la leche

De acuerdo a AMIOT (1991), ALAIS (1985) y BADUI (1984), la leche es un sistema coloidal muy complejo, en el cual se presentan varios grados de dispersión constituido por diferentes fases físicas: solución que incluye lactosa y sales, suspensión de las proteínas y emulsión de la materia grasa.

Los componentes de la leche se encuentran en diferentes concentraciones y varían considerablemente de acuerdo a numerosos factores, entre ellos: genéticos, fisiológicos (lactancia, edad, celo), aspectos sanitarios, clima, alimentación, ordeño, entre otros (ALAIS, 1985; CASADO y GARCÍA, 1985; BADUI 1984). Mahieu citado por CASADO y GARCÍA (1985), indica un

porcentaje a los distintos factores que afectan la composición de la leche, otorgándole un 26 a 36% a aquellos factores que se encuentran asociados con el animal y cerca de un 60% a los que se relaciona con el medio ambiente en que se localiza el animal.

En el CUADRO 1 se presenta la composición promedio de los componentes fundamentales de la leche de vaca.

CUADRO 1. Composición promedio de la leche de vaca.

Componente	Composición (%)			
	1	2	3	4
Agua	87,3	86,9	87,3	87,96 *
Materia Grasa	3,4	3,9	3,9	3,53 ± 0,02
Lactosa	4,9	5,1	4,6	4,91 ± 0,02
Proteínas	3,4	3,2	3,3	3,51 ± 0,01
Sales	0,9	0,9	0,7	0.71 *

FUENTE: 1) ALAIS (1985); 2) AMIOT (1991); 3) WALSTRA y JENNESS (1984); 4) PINTO *et al.* (1998), *) PINTO y ROYO (1973).

Se observa en el CUADRO 1 que existen diferencias en la composición media de la leche de vaca según los autores citados, especialmente en el contenido de lactosa y materia grasa, estos dos componentes son los que más varían entre lo especificado por estos autores. Las diferencias de composición encontradas en la bibliografía, se deben a factores que cambian según el periodo en que fueron realizados los estudios, tales como, climáticos, alimentación, raza, entre otros, que afectan la composición química de la leche.

2.3 Proteínas de la leche

Las proteínas se encuentran en forma de suspensión coloidal en la leche y existen grandes diferencias en sus estructuras y propiedades químicas (BADUI, 1984). Asimismo, ALAIS (1985), señala que las propiedades de las proteínas derivan de su composición y de su conformación espacial en la que se encuentran, otorgándoles así una función específica.

AMIOT (1991), especifica que los aminoácidos que componen las proteínas de la leche son 19, entre los que se encuentran algunos hidrocarburos alifáticos y otros tienen grupos funcionales adicionales. En tanto, FENNEMA (1993) y BADUI (1984), indican que son 20 ó 21 los aminoácidos que conforman las proteínas.

Según FENNEMA (1993), PAQUIN y LACROIX (1993) y ALAIS (1985), las sustancias nitrogenadas son las que forman la parte más compleja en la leche; normalmente se separan en tres grupos: las caseínas, siendo la porción mayor con un 77,9 - 78% de las proteínas totales; proteínas del suero 17 – 17,2% y sustancias nitrogenadas no proteicas 4,9 – 5,0%.

Las sustancias nitrogenadas no proteicas, corresponden a una parte bastante escasa, con un número de sustancias de bajo peso molecular y de variada composición y estructura química (ALAIS, 1985).

De acuerdo a AMIOT (1991), la función nutritiva fundamental de las proteínas, es la de proveer al organismo, a través de los procesos de digestión y absorción, cantidades suficientes y equilibradas de aminoácidos, principalmente aminoácidos esenciales, los que el organismo no es capaz de sintetizar.

Entre las diferentes razas de vacas existentes en el mundo hay variaciones en el porcentaje de proteína total, como por ejemplo, lo especificado por

AALTONEN y ANTILA (1987), que indican que las razas Ayrshire, Friesian y Guernsey poseen un porcentaje de proteína de 3,33; 3,39 y un 3,60% respectivamente. Estas diferencias en el contenido proteico y en general las diferencias en la composición química en la leche, se deben a los diversos factores que afectan directa o indirectamente al animal.

2.3.1 Factores que influyen en el contenido de proteínas. La producción de leche y su composición se ven afectados por diversos factores, tales como: factores fisiológicos, alimentarios, climáticos, genéticos y factores zootécnicos (ALAIS 1985). Feagan citado por NG-KWAIFHANG *et al.* (1982), plantea que la raza del animal, la nutrición, el manejo y estado sanitario, serían factores que influyen en la composición de la leche.

ALAIS (1985), señala que en las diversas razas de ganado se encuentran variaciones importantes en las aptitudes lecheras, en cuanto a la producción y composición de la leche, debido al factor genético. Por ejemplo, Cerbulis y Farell citados por De PETERS y FERGUSON (1992), establecen que la raza Holstein - Friesian presenta una mayor producción de leche pero un menor contenido de proteína. En contraste, la raza Jersey presenta un mayor contenido de proteína, pero con una menor producción de leche.

Otros de los factores que influyen en el contenido proteico son la etapa y número de lactancia en que se encuentra el animal. LATRILLE (1993) y CASADO y GARCÍA (1985), señalan que el porcentaje de proteína desciende durante los dos primeros meses de lactancia y que luego se incrementa hasta el final de la lactación. En cuanto al número de lactancias, Ng-KWAIFHANG *et al.* (1982), afirma que entre la primera y segunda lactancia la cantidad de proteína total sufriría un leve aumento, y que en lactancias posteriores esta cantidad disminuiría. Por el contrario, existen autores que señalan que el

contenido total de proteínas no varía a causa del número de lactancias (Rook y Pyanovskaya citados por LAVIN 1996).

De acuerdo a CASADO y GARCÍA (1982), factores como el celo y la gestación producirían una disminución en el contenido de caseína pero aumentarían las globulinas y la albúmina.

Las enfermedades del animal también pueden afectar la composición proteica de la leche. CASADO y GARCÍA (1985), informan que enfermedades tal como la mastitis tiene efecto sobre el rendimiento lácteo, composición de la leche, aptitud tecnológica y efecto sobre la salud humana. Con relación a este mismo tema, URECH *et al.* (1999), señalan que esta enfermedad no influye en gran proporción sobre el contenido de proteína total, no obstante, algunas fracciones proteicas si se ven afectadas.

Entre los factores del medio ambiente que influyen en el contenido de proteína, se encuentran las estaciones del año, produciéndose una disminución de proteína en primavera – verano y un aumento de ésta en la época de otoño - invierno (CASADO y GARCÍA, 1982).

En cuanto a la alimentación del animal, ALAIS (1985), señala que el aporte de proteínas entregados a través de la ración alimenticia no genera grandes cambios en la fracción de proteínas lácteas. Del mismo modo, VEISSEYRE (1980), afirma que variando la alimentación del animal, no es posible modificar notoriamente el contenido de los constituyentes de la leche. No obstante, un estudio realizado por CASAS (1996), en el que analizó la variación del contenido proteico y su relación con las estaciones del año y los sistemas de alimentación, indica como conclusión que al emplear una mayor cantidad de concentrado en la dieta de los animales es factible obtener una mayor producción de leche y un mayor porcentaje de proteínas. Este estudio se

respalda con lo mencionado por De PETERS y FERGUSON (1992) y CASADO y GARCÍA (1985), que sostienen que al aumentar el contenido energético de la ración alimenticia del animal, provoca un aumento en el contenido de proteínas en la leche. En tanto, ROGERS y STEWART (1982), señalan que el contenido de proteína es afectado fundamentalmente por la alimentación, especialmente con la ingesta de suplemento de granos, la que incrementa la producción de leche y la concentración de proteínas.

Con respecto al cambio de alimentación entre la época invernal y primaveral GRANDISON *et al.* (1984), mencionan que se produce un aumento en el contenido proteico durante la primavera debido a un mayor aporte energético otorgado por las praderas, en comparación al ensilaje utilizado en la época de invierno. Así mismo, CASAS (1996), señala que los rebaños que disponen de praderas para su alimentación diaria registran un mayor contenido de proteínas en comparación con aquellos rebaños que no disponen de ella.

2.3.2 Caseínas. AMIOT (1991) y ALAIS (1985), señalan que estas proteínas se encuentran en forma de fosfo-caseinato de calcio y precipitan por acidificación en su punto isoeléctrico medio, o sea, a un pH 4,6.

FAO (1981), señala que las propiedades físico-químicas más importantes de la leche, se encuentran relacionadas con su estabilidad, que derivan de la presencia de prótidos en forma micelar.

La estabilidad de las caseínas se altera fácilmente a valores de pH ácidos y por la presencia de cationes divalentes, pero son estables a la mayoría de los tratamientos térmicos empleados. Se hallan principalmente en la leche como micelas, que son complejos proteicos solubles (BADUI, 1984). La coagulación enzimática de la caseína, técnica utilizada en la industria quesera, provoca la ruptura de la micela formándose fosfo-paracaseinato cálcico (AMIOT, 1991).

Conforme a BADUI (1984), las micelas de caseína son complejos proteicos solubles con un alto grado de organización estructural y estabilizados por una fuerte interacción a través de puentes hidrófobos, de hidrógeno, iónicos y de calcio. Una fracción muy pequeña se encuentra en estado libre dispersa en el suero.

Las micelas están compuestas por cuatro fracciones de caseínas, las cuales son α_s , β , κ , γ , las que se encuentran en una proporción de 55, 25, 15, y 5%, respectivamente. Las caseínas α_s , se dividen en α_{s1} y α_{s2} . La proporción de κ -CN, varía inversamente con el tamaño de la micela (AMIOT, 1991; ALAIS, 1985; BADUI, 1984).

Las diferentes caseínas poseen distintas características, es así, como por ejemplo, las caseínas α y β son sensibles al ion calcio, mientras que la κ tienen un papel estabilizante de las micelas frente al ion calcio (AMIOT, 1991; ALAIS, 1985; BADUI, 1984).

BELITZ y GROSCH (1997), AMIOT (1991) y ALAIS (1985), señalan que las β -caseínas son solubles a bajas temperaturas, contienen menos fósforo pero que son más ricas en azufre que las caseínas α . También indican que las caseínas γ son las más heterogéneas de la fracción caseínica, y todas están relacionadas con las variantes genéticas de las β -caseínas. Se ha puesto en evidencia, en diversos estudios basados en la movilidad molecular, la heterogeneidad de la caseína.

En el CUADRO 2 se presenta una recopilación de los cinco tipos de caseína existentes con sus correspondientes pesos moleculares y variantes genéticas encontradas. Cabe destacar que existen diferencias entre algunos de los autores con respecto a las variantes genéticas identificadas o descubiertas para

cada proteína presente en la leche. Por ejemplo, BELITZ y GROSCH (1997), indican que para la caseína α_{S1} existirían las variantes A, B, C, D y E, mientras que AMIOT (1991), ALAIS (1985) y BADUI (1984) para la misma proteína señalan la existencia de sólo cuatro variantes (A, B, C y D). Estos mismos autores concuerdan con la presencia de las variantes A y B para el caso la κ -caseína.

CUADRO 2. Caseínas y sus variantes genéticas.

Caseínas	Peso Molecular	Variantes Genéticas
α_{S1}	23.600	A, B, C, D, E
α_{S2}	25.150	A, B, C, D
β	24.000	A ₁ , A ₂ , A ₃ , B, BZ, C, D, E
κ	19.000	A, B
γ_1	30.650	A ₁ , A ₂ , A ₃ , 1B
γ_2		A ₂ , A ₃ , B
γ_3		A, B

FUENTE: BELITZ y GROSCH (1997); AMIOT (1991); ALAIS (1985).

2.3.2.1 a-caseína. Las caseínas α son las más ricas en fósforo y también son ricas en grupos ácidos libres. Su punto isoeléctrico es el más bajo llegando a un pH cercano a 4,1 (AMIOT, 1991; ALAIS, 1985).

Según BELITZ y GROSCH (1997) y AMIOT (1991), se distinguen principalmente 2 tipos: las α_{S1} y las α_{S2} , cada una con un peso molecular de 23.600 y 25.150 dalton, respectivamente. Para ambas se han identificado más de dos variantes genéticas.

GONZÁLEZ de LLANO (1990), menciona que las α_{S1} -CN es el componente mayoritario de las caseínas, que son sensibles al calcio, que existirían 5

variantes genéticas (A, B, C, D y E).

2.3.2.2 b-caseína. La β -caseína es la más hidrofóbica de todas las caseínas, es soluble en presencia de calcio a bajas temperaturas. Posee menos fósforo que la caseína α , pero mucho más prolina (WALSTRA *et al.*, 1999; VEISSEYRE, 1980).

Se encuentra constituida por una sola cadena polipeptídica, formada por 209 residuos de aminoácidos, con un peso molecular cercano 24.000 dalton (Ribadeu-Dumas *et al.* citados por VEISSEYRE, 1980). Su punto isoeléctrico alcanza un pH de 4,9, y posee las variantes genéticas A_1 , A_2 , A_3 , B, C, D, E (AMIOT, 1991).

2.3.2.3 k-caseína. Las κ -caseínas son pobres en fósforo (0,2%) y algunas ricas en segmentos glucídicos (5%). Son el sustrato específico de la acción proteolítica del cuajo y están constituidas por un segmento terminal aminado que es la para-Kappa-caseína (con residuos hidrófobos, electropositivos), y otro segmento terminal con un carboxilo glicopeptídico (hidrófilo, electronegativo) (AMIOT, 1991).

BADUI (1984), añade, que la caseína κ es un trímero formado por tres cadenas polipeptídicas unidas a través de enlaces disulfuro intermoleculares, y contiene un trisacárido constituido por moléculas de galactosa, galactosamida y ácido siálico.

De acuerdo a lo señalado por BELITZ y GROSCH (1997), AMIOT (1991) y ALAIS (1985), la caseína κ , es soluble en presencia de una alta concentración de iones calcio. Así, cuando se añade una concentración elevada de calcio (por ejemplo, 0,25M), a una suspensión de caseína, existe una ruptura del complejo α s- κ , ya que las caseínas α s y β tienden a precipitar, mientras que las κ -

caseínas permanecen en solución. Estas asociaciones entre las caseínas se producen principalmente por los enlaces hidrófobos, de los del tipo de Van der Waals (interacciones de los grupos no polares que son abundantes en las caseínas). Existen tres tipos de asociaciones observadas: α S- κ , β - κ y α S- β , encontrándose que la asociación mas fuerte es la que forman la α S y κ .

Debido a su estructura y propiedades las κ -caseínas poseen un poder estabilizante frente al calcio sobre las otras caseínas, por lo que se considera que tiene un papel de coloide protector (ALAIS, 1985).

Generalmente, sólo se describen las variantes A y B de κ -CN, pero GONZÁLEZ de LLANO (1990), sugiere la identificación de cuatro variantes A, B, C y E. Además, según el mismo autor, el alelo correspondiente a la variante A, tiende a predominar en la mayoría de las razas.

2.3.3 Proteínas del suero. Las proteínas del suero son compactas, globulares, con un peso molecular que varía entre 14.000 y 1.000.000 dalton. Son solubles en un intervalo de pH muy amplio y en estado nativo no se asocian a las caseínas (BADUI, 1984).

Representan aproximadamente el 20% del total de las proteínas de la leche (VEISSEYRE, 1980). Estas proteínas se encuentran estabilizadas por un mecanismo de agua de hidratación. Son muy sensibles al calor y se desnaturalizan a una temperatura superior a la de los tratamientos de pasteurización (AMIOT, 1991; ALAIS, 1985).

AMIOT (1991), indica que tienen un importante valor nutritivo, debido a que poseen mayor cantidad de aminoácidos esenciales que las caseínas.

Existen ocho fracciones distintas, que corresponden a las proteínas del suero,

siendo principales las fracciones de la α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, inmunoglobulinas, albúmina de bovino y proteasa-peptona (AMIOT, 1991; ALAIS, 1985; BADUI, 1984).

2.3.3.1 β -lactoglobulina. Es insoluble en agua destilada, soluble en soluciones diluidas de sales y precipitable en soluciones al 50% de sulfato de magnesio o de amonio, corresponde al 60% del total de las proteínas del suero, y existe en forma de dímero al pH normal de la leche (BADUI, 1984; VEISSEYRE, 1980). Existen cuatro variantes genéticas, las cuales son: A, B, C, D las que se encuentran en las razas de bovinos (AMIOT, 1991; VEISSEYRE, 1980). Sin embargo, Krause *et al.* citados por GONZÁLEZ de LLANO (1990), especifican que se han descubierto siete variantes genéticas A, B, C, D, E, F y G.

Según VEISSEYRE (1980), la β -lactoglobulina es una molécula compacta, cuya cadena se halla fuertemente plegada. El monómero de β -lactoglobulina presenta un peso molecular de 18.000 dalton (BELITZ y GROSCH, 1997). Es particularmente apta para formar dímeros, cuya complejidad es función del pH. Se puede cristalizar dializando una solución salina diluida a su pH isoeléctrico de 5,2 (VEISSEYRE, 1980).

ALAIS (1985), indica que la β -lactoglobulina no se encuentra ligada a ninguna otra fracción proteica, pero cuando se produce un calentamiento de la leche, forma un complejo con la κ -caseína, el cual es estable y se constituye mediante un puente de disulfuro.

BADUI (1984), señala que la β -lactoglobulina posee un grupo disulfuro intramolecular que le imparte características de estructura terciaria a la proteína, y un sulfhidrilo libre que la hace sumamente reactiva. Además es la fuente más importante de grupos sulfhidrilos de la leche.

2.3.3.2 α -lactoalbúmina. Según ALAIS (1985), la α -lactoalbúmina es el componente más característico del suero lácteo, porque al parecer se encontraría en la leche de todos los mamíferos. Es una proteína asociada al complejo lactosa sintetasa. Es una pequeña proteína, de peso molecular próximo a 14.200 dalton.

Se ha observado la presencia de dos variantes genéticas A y B. La α -lactoalbúmina se caracteriza por no poseer grupos sulfhidrilos libres, pero con un elevado contenido de cistina (BELITZ y GROSCH, 1997; ALAIS, 1985).

ALAIS (1985), indica que es posible que la α -lactoalbúmina posea normalmente un átomo de calcio por cada molécula, y puede estar más o menos glicosada, lo que puede causar su heterogeneidad.

2.3.4 Polimorfismo genético de las proteínas de la leche. Se han descubierto proteínas muy semejantes entre sí, ya sea en composición, peso molecular y propiedades, las que representan varias formas genéticas de una misma proteína. Las variantes genéticas se designan por las letras A, B, C. Es así, como existen individuos homocigotos (AA, BB, CC) y heterocigotos (AB, AC, BC) (ALAIS, 1985). Aschaffenburg citado por GONZÁLEZ de LLANO, 1990), sostiene que las variantes genéticas de las proteínas, son producto de genes alélicos, autosomales y codominantes que se transmiten en forma de herencia mendeliana simple.

Existen distintas variantes genéticas, cuya diferencia radica fundamentalmente en la sustitución de unos cuantos aminoácidos en la secuencia de su estructura primaria. Estas pequeñas modificaciones pueden traducirse en un cambio importante de sus propiedades (NG-KWAI-HANG, 1997; BADUI, 1984; VEISSEYRE, 1980). ALAIS (1985), sostiene que las diferencias entre las variantes genéticas son la causa de los distintos comportamientos que posee

una determinada leche frente a un tratamiento industrial. Por ejemplo, BADUI (1984), menciona que la γ -caseína tiene una secuencia de aminoácidos muy parecida a una fracción de la molécula de β -caseína, y por lo tanto la γ -caseína se considera como resultado de una degradación o una síntesis incompleta de la β -caseína.

Estas variantes genéticas han sido detectadas en varias proteínas de la leche, incluyendo, caseína α_{s1} , caseína α_{s2} , caseína β , caseína κ , β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina (NG-KWAI-HANG, 1997).

El efecto de las variantes genéticas sobre la composición y propiedades tecnológicas de la leche ha sido objeto de diferentes estudios. De acuerdo a ROBITAILLE (1995), el polimorfismo genético afecta la producción de leche y también su composición, otorgándole a la leche diferencias en las características tecnológicas, como por ejemplo, la estabilidad frente a tratamientos térmicos, tiempo de coagulación, entre otros, los cuales son de suma importancia para la industria láctea. Así mismo JAKOB (1994), señala la importancia que han alcanzado las variantes genéticas de las proteínas, debido a que éstas se han relacionado fundamentalmente con la aptitud quesera de la leche.

Son muchos los estudios asociados al conocimiento de la relación del polimorfismo genético de las proteínas lácteas y una mayor producción de leche, en este concepto, son las variante AA de la κ -caseína y la variante A de la β -lactoglobulina son las que están asociadas a una mayor producción de leche (NG-KWAI-HANG, 1997).

Según NG-KWAI-HANG (1997), la posible relación que existe entre el polimorfismo genético de las proteínas y la producción de leche, aún no llega a

un consenso general; por ejemplo, diversos estudios no han encontrado relación entre las variantes de la β -lactoglobulina y la producción de leche, mientras que otros han indicado que una mayor producción de leche depende de la variante B de la β -lactoglobulina. Por el contrario, existen otros estudios que asocia a la variante A de la β -lactoglobulina con una alta producción de leche (Atroshi *et al.*, Babukov *et al.*, Comberg *et al.*, Konevtsova *et al.* citados por NG-KWAI-HANG, 1997).

Estas diferencias que aún se encuentran entre las diferentes variantes genéticas, corresponderían a factores influyentes como la alimentación de las vacas, edad, estado fisiológico, estado de salud, raza, estación del año, entre otros (NG-KWAI-HANG, 1997; McLEAN *et al.*, 1984).

NG-KWAI-HANG *et al.* (1986), realizaron un estudio en el cual una mayor producción de leche se encontraba asociada a la presencia de los fenotipos BB de la caseína α_{S1} , A_1A_3 de β -caseína, AA κ -caseína y AA de la β -lactoglobulina. Las concentraciones de materia grasa y proteínas eran más altas en leches que poseían la variante BC de α_{S1} -CN, A_1B β -CN y BB κ -CN. Basados en los contenidos de materia grasa y caseína deseables para la fabricación de queso, encontraron ventajoso la selección de vacas que poseen los fenotipos BB de la κ -caseína y BB de la β -lactoglobulina.

FITZGERALD y HILL (1997), señalan que la variante B de κ -caseína otorga a la leche un menor tiempo de coagulación y forma una cuajada más firme, esta misma variante es asociada a una menor proteólisis en la maduración de quesos.

En cuanto a la composición mineral Berg *et al.* citados por HORNE y MUIR (1994), señalan que leches con presencia del genotipo BB de κ -CN presenta

un mayor contenido de ión calcio. DALGLEISH (1989) y DELACROIX – BUCHET *et al.* (1993), encontraron que leches que poseían la variante B de κ -caseína presentaban un tiempo de coagulación menor, que aquellas leches que presentan la variante A de κ -caseína. Esta situación tendría relación con el tamaño de la micela y también a la presencia de iones Ca^{++} libres.

VEISSEYRE (1980), revela que se ha demostrado que leches que contienen únicamente la variante α_{s1} A, tienen una velocidad de acidificación pequeña y producen una cuajada blanda con respecto a las leches que sólo contienen caseína α_{s1} BC.

McLEAN *et al.* (1984), señalan una relación entre la termoestabilidad de leches concentradas y el polimorfismo de las proteínas lácteas, la cual especifica que en leches con κ -caseína B son más estables al calor que las leches con κ -caseína AB y éstas más estables que la κ -CN A. La diferencia podría ser explicada debido a la variación de la composición y tamaño de las micelas, debido principalmente a que las leches que presentan la κ -caseína B poseen una mayor cantidad de micelas pequeñas, proporcionándole así una mayor estabilidad.

ROBITAILLE (1995), estudió la influencia de la κ -caseína (variantes AA, AB) y de la β -lactoglobulina (variantes AA, AB, BB), obteniendo como resultado que la máxima estabilidad térmica se encontraba en leches con la presencia del genotipo AA de κ -CN en comparación con leches que presentaban el genotipo AB. En cuanto a la influencia de la β -Lg, sólo era significativo cuando se encontraba presente la κ -CN AA, hallándose que la β -Lg AA poseía mayor termoestabilidad que la β -Lg BB.

En un experimento se determinó la estabilidad térmica en algunas variantes de

κ -caseínas, obteniéndose como resultado que κ -caseína BB posee una mayor estabilidad que κ -caseína AB y ésta a su vez que la κ -caseína AA (Schulte y Coerne *et al.* citados por JAKOB (1994).

FITZGERALD y HILL (1997), realizaron estudios en algunos tipos de quesos, donde demostraron que se podía obtener hasta un 10% más de rendimiento utilizando leches con κ -caseína AA que aquellos quesos que se elaboraban con leches con κ -caseína BB. Este mayor rendimiento en la producción de un determinado queso fue atribuido a que existía una mayor retención de materia grasa y la formación de una cuajada más firme cuando la leche presentaba la variante AA de κ -CN.

2.4 Minerales de la leche

El contenido total de minerales de la leche de vaca es considerablemente más alto que el que se encuentra en la leche materna del humano, alcanzando niveles de 7,3 g/L (Renner, Poiffait y Adrian, citados por FOX, 1997). Los minerales representan alrededor del 0,6 a 0,9% del peso de la leche de vaca (ALAIS, 1985; FAO, 1981).

Según FENNEMA (1993), AMIOT (1991) y BADUI (1984), una de las contribuciones nutritivas más importante de la leche y sus derivados lácteos, es su elevado contenido de elemento minerales, destacándose principalmente el calcio, fósforo y magnesio. Además existen elementos trazas en la leche de vaca como son: aluminio, boro, bromo, cobre, cromo, yodo, flúor, entre otros.

BELITZ y GROSCH (1997), estiman que los elementos minerales de la leche son esenciales para las funciones metabólicas del organismo humano, y realzan la importancia general del calcio y fósforo que son los minerales que contribuyen con mayor proporción al bienestar de la salud y formación de los tejidos humanos. Por otra parte, el sodio y otros electrolitos, desempeñan un rol

importante en la regulación de la presión osmótica y en el equilibrio ácido-base. Los minerales en la leche se presentan en dos estados: disolución y coloidal. En el estado de disolución se encuentran los cloruros, fosfatos solubles e indicios de sulfatos, yoduros, fluoruros y bromuros, el sodio y potasio, además, también se encuentra parte de calcio. En tanto, dentro de la fase coloidal, los minerales que se encuentran en mayor proporción son el calcio y el fósforo, los que se acompañan de pequeñas cantidades de magnesio y ácido cítrico (CASADO y GARCÍA 1985; RENNER 1983; CASADO y GARCÍA 1982).

El calcio y fósforo presentes en la leche se encuentran formando las micelas de fosfocaseinato cálcico, teniendo una participación clave en la termoestabilidad de la leche (CASADO y GARCÍA, 1985). FAO (1981), agrega que el calcio y fósforo forman el fosfato cálcico en la leche, esta sal disminuye su solubilidad a medida que se incremente la temperatura, hasta que a temperaturas altas comienza a precipitar (efecto de leches sobrecalentadas ó sobre pasteurizadas), produciendo coagulaciones defectuosas.

En el CUADRO 3 se señalan las concentraciones de las principales sales de la leche y en el estado en el que se encuentran.

CUADRO 3. Concentración de las principales sales de la leche.

Componente	Concentración (mg/100g)		
	Total	Estado Coloidal	Estado Soluble
Calcio	117,7	81,1	36,6
Magnesio	12,1	4,3	7,8
Acido cítrico	176,0	19,0	158,0
Fósforo	95,1	50,8	44,2
Sodio	58,0		
Potasio	140,0		
Cloruro	104,5		

FUENTE: BADUI (1984).

La proporción de las concentraciones de las sales de la leche desempeña un rol importante en la estabilidad térmica de los productos lácteos, de tal forma que los iones calcio y magnesio tienden a inestabilizar el sistema proteico, mientras que los citratos y fósforo lo estabilizan (BADUI, 1984). DALGLEISH (1989), concuerda con este principio, agregando que es aplicado en la elaboración de leches concentradas o evaporadas, en donde, se hace necesario añadir fosfatos o citratos para impedir la coagulación de las proteínas durante el proceso de esterilización.

El calcio es fundamental para producir la coagulación de la leche mediante el cuajo (ALAIS, 1985). LUCEY y FOX (1993) y McMAHON *et al.* (1984), argumentan que un nivel adecuado de calcio en la leche favorece la coagulación de las caseínas α s y β . Las caseínas son precipitadas por el ión Ca^{++} cuando se han separado de la κ -caseína, produciéndose una última hidrólisis enzimática al nivel de los aminoácidos 105 – 106 (fenilalanina – metionina), liberándose la fracción soluble del glicomacropéptido. La precipitación producida de las caseínas se conoce como cuajada. Así mismo, pequeños cambios en la concentración de iones afecta la velocidad de coagulación y cuerpo de la cuajada (LUCEY y FOX, 1993).

Además, se debe señalar que en aquellas vacas que padecen de mastitis segregan leches con un alto contenido de cloruros, por lo que la concentración de estos aniones indican un índice de sanidad de las vacas (CASADO y GARCÍA, 1985; BADUI, 1984). Del mismo modo, WHEELLOCK (1980), estableció que niveles altos de cloruros, así como también, contenidos bajos de potasio en la leche podrían revelar serios daños en la glándula mamaria.

La composición mineral de la leche varía según diversos estudios. En el CUADRO 4 se presentan valores de la composición mineral obtenidos por diversos autores.

CUADRO 4. Composición mineral de la leche (g/L).

Componente	g/L		
	1	2	3
Potasio	1,97 ± 0,17	1,60	-
Calcio	1,28 ± 0,18	1,30	1,12
Cloruro	-	1,11	-
Fósforo	0,82 ± 0,14	1,00	0,64
Sodio	0,35 ± 0,12	0,50	-

FUENTE: 1) PINTO *et al.* (1978); 2) ALAIS (1985); 3) ALANIS y CASTRO (1992).

Dentro de los minerales que se presentan en la leche de vaca los más importantes son el calcio y el fósforo, que son los que forman lo esencial de la parte minerocoloidal de la leche (NEVILLE y WATTERS, 1983; HOLT, 1981).

2.4.1 Factores que influyen en el contenido de minerales. De acuerdo a WHEELLOCK (1980), la composición mineral puede cambiar positiva o negativamente de acuerdo a factores genéticos, alimentación, lactancia entre otros.

ALAIS (1985), señala que la raza del animal influye en el contenido de minerales. JENNESS y PATTON (1976), afirman que la leche correspondiente a la raza Jersey posee un mayor contenido de calcio y fósforo que la leche de la raza Holstein. En cuanto al contenido de cloruros, en la raza Holstein, es generalmente mayor que cualquier otra raza.

Con respecto a la etapa de la lactancia, los minerales no sufrirían variación durante los primeros meses, pero aumentarían al final de ella, con excepción del potasio que disminuye. Además, cabe destacar, que los contenidos de calcio, fósforo y sodio, son mayores en los días que se secreta el calostro, y

luego descienden a un nivel normal para subir al final de la lactación (CASADO y GARCÍA, 1985; GRANDISON *et al.*, 1984).

En presencia de enfermedades del animal, como por ejemplo la mastitis, los contenidos de sodio y cloruros aumentan, haciendo la leche más salada, mientras que el contenido de calcio, fósforo y potasio disminuyen (AMIOT, 1991; WHEELLOCK, 1980).

JENNESS y PATTON (1976), afirman que existe una variación en el contenido mineral durante la época del año, aunque no están bien determinados los factores que producen dicha variación, pero, señalan que generalmente los contenidos de calcio y fósforo disminuyen al inicio del verano. Los cloruros presentan una leve variación, y el sodio y potasio no se ven afectados por el factor estacional. De la misma manera, SINGH y FOX (1987), señalan que el calcio y fósforo presentan una mayor proporción en invierno, pero la diferencia con la proporción encontrada con respecto al verano no es significativa.

En un estudio realizado en Chile por PINTO *et al.* (1978), se informó una variación significativa para sodio y potasio entre las épocas de otoño e invierno, y una variación altamente significativa para calcio y fósforo entre las estaciones de primavera y verano. Según CASADO y GARCÍA (1985), la variación de los minerales debido a los cambios estacionales, no se pueden individualizar, debido a que el efecto estacional depende de factores como el clima de la región y a las prácticas alimentarias.

Diversos estudios relacionan la alimentación del animal con el contenido de minerales. VILLOCH y PONCE (1986), estudiaron esta relación en leche de vacas Holstein, donde concluyeron que los contenidos de calcio, sodio y potasio en la leche se ven afectados significativamente por la alimentación. Sin embargo, otros son los autores que indican que el régimen de alimentación no

influye en los niveles de los minerales (ALAIS, 1985; UNDERWOOD, 1981; JENNESS y PATTON, 1976). UNDERWOOD (1981), además señala que, la deficiencia de minerales en vacas lecheras podría presentarse en aquellos rebaños con elevadas producciones, alimentadas en pastizales, entre otros. PINTO *et al.* (1986), realizó un estudio en Chile sobre la influencia de la alimentación en el contenido de minerales de la leche, encontrando que el sistema de alimentación no afectaba significativamente los contenidos de sodio, calcio y fósforo de la leche.

2.4.2 Calcio. La leche de vaca y productos lácteos, tales como, queso y yogurt, constituyen una gran fuente de calcio para la dieta humana (Miller, citado por FOX, 1997).

La leche y especialmente los productos lácteos son los que aportan entre un 60 y 70% de la cantidad de calcio total ingerido (Harris y Karmas, citados por AMIOT, 1991; PORTER 1981). Además, el organismo normalmente no retiene más que el 20 a 30% de calcio consumido y la absorción de este elemento se ve muy favorecida por la presencia de la vitamina D y de fósforo (POTTER, 1999).

Cerca del 65% del calcio total de la leche existe en estado coloidal interaccionando con las caseínas, mientras que el resto se encuentra en forma iónica en solución, además, se debe señalar, que existe un equilibrio entre estas dos formas de calcio que dependerá del pH y de la temperatura a que se encuentre el sistema (BADUI, 1984).

La importancia nutricional del calcio radica, en que es el elemento indispensable para la formación de la estructura ósea, tiene una participación importante en el control de la excitabilidad nerviosa y en la contracción muscular. Interviene en la coagulación de la sangre y en la regulación de algunos sistemas enzimáticos.

La deficiencia de calcio produce raquitismo y otras alteraciones (AMIOT, 1991; TUNICK, 1987; RENNER, 1983).

BALLESTEROS (1997), en un estudio realizado en la zona sur de Chile incluyendo a las regiones VII, IX y X, encontró un valor de 1,28 g/L para calcio, utilizando el método complexométrico de NTAILIANAS y WHITNEY (1964).

2.4.3 Fósforo. El fósforo se encuentra en la leche en pequeñas cantidades de combinaciones orgánico-fosforadas, como lo son las lecitinas, ésteres hexosafosfóricos, nucleótidos y un complejo vitamínico con riboflavina (ALAIS, 1985). Según Holt, citado por FOX (1997), cerca del 44% del fósforo inorgánico presente en la leche de vaca se encuentra asociado con las micelas de caseína como fosfato de calcio, y el 56% restante es soluble, encontrándose como iones de fósforo libre.

El fósforo, además de la importancia nutricional en la formación de huesos y dientes, tiene un rol fundamental en todas las células, ya que forma parte de los ácidos ribonucleico y desoxirribonucleico, también es parte de las moléculas de ATP y ADP de los sistemas de transporte energético. Participa en reacciones enzimáticas y metabólicas, actúa como buffer en la sangre y colabora con el control de pH (POTTER, 1999; AMIOT, 1991; RENNER, 1983).

En un estudio realizado en la zona sur de Chile, donde se determinó la composición mineral de la leche, se estableció un contenido de fósforo total encontrando un valor de 0,72 g/L, utilizando como método el descrito por FIL-IDF 42B: 1990 (BALLESTEROS, 1997).

2.5 Estabilidad térmica de la leche

La termoestabilidad de la leche se encuentra directamente relacionada con los tratamientos térmicos que ésta recibe. Según ALAIS (1985), el calentamiento es

el tratamiento más importante al cual es sometida la leche, mejorando su calidad higiénica y conservación, eliminación de agua y utilizado para diversos fines tecnológicos. Existen diversos tipos de tratamientos térmicos, los cuales difieren uno respecto de otro en la temperatura y tiempo aplicado (RENNER, 1983).

El objetivo fundamental de estos tratamientos térmicos es la conservación de la leche, destruyendo microorganismos e inactivando enzimas (WALSTRA y JENNESS, 1984). Los tratamientos térmicos más conocidos son la pasteurización y la esterilización comercial. Dentro del primer tratamiento se encuentra la pasteurización baja, que se realiza a 63 °C por 30 minutos, y la pasteurización HTST cuyas condiciones de trabajo son generalmente de 72 °C durante 15 segundos; el calentamiento UHT se ejecuta a una temperatura de 145 °C durante 1 a 2 segundos (ALAIS, 1985; VEISSEYRE, 1980).

BELITZ y GROSCH (1997) y ALAIS (1985), añaden que un tratamiento térmico tiene como consecuencia una serie de modificaciones de las características de la leche.

Diferentes estudios señalan los efectos del tratamiento térmico sobre la leche, entre estos efectos, el más conocido es el de la coagulación, la cual puede variar por la composición química u otras derivaciones que influyen en la reacción (DALGLEISH *et al.*, 1987). POTTER (1999), añade que los tratamientos térmicos pueden afectar los componentes termolábiles, el equilibrio físico - químico de las sales, producir efectos sobre la estabilidad, pH, poder óxido - reducción y afectar las propiedades organolépticas y nutritivas de la leche.

ALAIS (1985) y FAO (1981), indican que los efectos de un tratamiento térmico y sus consecuencias se relacionan con la precipitación de las proteínas solubles

sobre las caseínas restringiéndose la cantidad de calcio y fosfatos solubles. La solubilidad disminuye en la mayoría de las proteínas del suero, debido a que sufren una denaturalización por consecuencia del calentamiento de la leche, y que luego comienzan a asociarse con las micelas de caseína (BADUI, 1984).

La gran inestabilidad frente a los tratamientos térmicos de las proteínas del suero en comparación con las caseínas, debería ser efecto de la ausencia de fósforo, bajo nivel de prolina y alto contenido de cistina (RENNER, 1983). Por ejemplo, la α -lactoalbúmina se denatura a temperaturas de 100 °C por 5 minutos, en tanto la β -lactoglobulina a 86 °C por 15 segundos.

RENNER (1983), señala que producto de estos tratamientos térmicos existe inactivación de enzimas, pérdidas de vitaminas, entre otros cambios, producto del sometimiento de la leche a altas temperaturas.

FOX (1997), afirma que la exposición de la leche a elevadas temperaturas y por tiempos prolongados produce cambios tales como:

- Denaturación de proteínas del suero e interacción con la caseína
- Precipitación del fosfato de calcio
- Reacción de Maillard
- Modificación de las caseínas que incluyen desfosforilación, hidrólisis de κ -CN e hidrólisis en general
- Cambios de la hidratación y disociación de la estructura micelar
- Disminución del pH

Esta disminución de pH se debería a la producción de ácidos orgánicos, precipitación del fosfato de calcio primario y secundario y a la hidrólisis del fosfato orgánico con una posterior precipitación como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ liberando iones de hidrógeno.

En el CUADRO 5, se resumen algunas de las modificaciones ocasionadas por el sometimiento de la leche a tratamientos térmicos, sobre determinados componentes.

CUADRO 5. Efectos de los tratamientos térmicos sobre los componentes de la leche.

Componente	Efecto producido
Caseínas	Floculación y gelificación de la leche.
Proteínas solubles	Desnaturalización de proteínas. Disminución de la solubilidad. Sabor a cocido. Floculación. Descenso del valor nutritivo.
Materia grasa	Liberación de ácidos grasos. Sabor desagradable.
Lactosa	Descenso de pH. Caramelización. Influencia en el crecimiento de bacterias lácticas. Disminución del valor nutritivo.
Minerales	Insolubilización de sales de calcio. Descenso de pH. Retraso de la coagulación por cuajo. Influencia en la estabilidad de las micelas.
Vitaminas	Disminución del valor nutritivo.
Enzimas	Inactivación de las propiedades enzimáticas.

FUENTE: VEISSEYRE (1980); BADUI (1984); ALAIS (1985).

3. MATERIAL Y MÉTODO

3.1 Material

3.1.1 Ubicación del ensayo. El estudio se realizó con muestras de leche de vacas Frisón Negro provenientes del fundo Santa Rosa, perteneciente a la Universidad Austral de Chile, ubicado en la provincia de Valdivia, X Región.

Los análisis de leche necesarios para la realización de este trabajo se efectuaron en el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile.

3.1.2 Duración del ensayo. La fase experimental del estudio se realizó en la época de invierno, completando un total de 4 muestreos (dividiéndose cada muestreo en 2) durante el periodo comprendido entre los meses de Julio y Septiembre del año 2002. Las fechas de cada muestreo fueron las siguientes:

- Muestreo N° 1: 22 y 24 de Julio
- Muestreo N° 2: 5 y 7 de Agosto
- Muestreo N° 3: 26 y 27 de Agosto
- Muestreo N° 4: 9 y 11 de Septiembre

3.2 Método

3.2.1 Obtención de muestras. Las muestras se obtuvieron empleando la metodología descrita en la Norma Chilena N. CH 1011/1 (CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN, 1998), a partir de 10 vacas de raza Frisón Negro. La cantidad a muestrear fue de 1 litro de leche por vaca en estudio, además de 1 litro de leche mezcla, la que fue preparada en forma proporcional a la producción de leche de cada vaca, tomándose el 10% de cada producción.

Cada uno de los cuatro muestreos fue dividido en 2 submuestreos en la misma semana, con el fin de trabajar sin problemas en el laboratorio y evitar la alteración de la leche.

3.2.2 Diseño experimental. Se analizó la leche de 10 vacas individuales, además de la leche mezcla. Para objeto de este ensayo las vacas presentaban características similares tales como: igual edad, mismo período de lactancia, libre de mastitis, información de la progenie y alimentación homogénea (ANEXO 1).

En el CUADRO 6 se presenta el diseño experimental propuesto para el presente estudio. Cabe destacar que la época comprendida para el ensayo es la de invierno con un total de 4 muestreos

CUADRO 6. Diseño experimental.

Muestras	Factores	Respuesta estudiada
Leche de 10 vacas individuales	<ul style="list-style-type: none"> - Muestreo - Expresión de K-CN (A ó B) 	<ul style="list-style-type: none"> - Proteína total - Contenido de calcio - Contenido de fósforo - Termoestabilidad de la leche

3.2.3 Análisis estadístico. Se aplicó un análisis de varianza multifactorial y comparación de promedios, con el fin de detectar si el efecto de los factores estudiados (muestreo y variantes de κ -caseína) producían diferencias entre la leche de las diferentes vacas para cada respuesta en estudio. Se realizó un análisis de correlación para determinar el grado de relación entre las respuestas estudiadas: contenido de proteína, calcio, fósforo y termoestabilidad de la leche.

Para el análisis de los resultados obtenidos se utilizó el programa

computacional STATGRAPHIC PLUS Versión 2.0.

Además, se comprobó que entre ambos factores (muestreo y variante genética), no existe interacción, por lo que no se incluyeron estos resultados en la investigación.

3.2.4 Método de análisis. En el CUADRO 7, se resumen las metodologías que se aplicaron para la determinación de las repuestas estudiadas. Cada análisis se realizó en duplicado.

CUADRO 7. Metodologías de análisis.

Respuesta estudiada	Método utilizado
Cuantificación de proteínas	Método FIL-IDF 20B: (1993) (Semi Micro Kjeldahl).
Contenido de calcio	Método NTAILIANAS y WHITNEY, (1964).
Contenido de fósforo	Método FIL-IDF 42B: (1990)
Termoestabilidad de la leche	Método de DAVIES y WHITE (1966), modificado por GONZÁLEZ (2000).
Variantes genéticas de proteínas	Electroforesis de isoenfoque, según PEARCE <i>et al.</i> (1972), modificado por CASANOVA (2001).

3.2.4.1 Cuantificación de proteínas. Se determinó el contenido de proteína total en las muestras de leche utilizando el método Semi Micro Kjeldahl, cuyo principio radica en la digestión de la muestra de leche, con una mezcla de ácido sulfúrico concentrado y peróxido de hidrógeno y sulfato de potasio, utilizando un catalizador para convertir el nitrógeno orgánico presente en sulfato de amonio. Se realizó la destilación del amonio y el destilado se tituló con una solución estándar de ácido clorhídrico. El cálculo del contenido de nitrógeno se realizó a partir de la cantidad de amonio producido, el cual fue expresado como porcentaje de masa. Posteriormente se obtuvo el contenido de proteína cruda

expresado como % (p/p), por multiplicación del contenido de nitrógeno por el factor de 6,38.

3.2.4.2 Determinación del contenido de calcio. Se realizó de acuerdo al método complexométrico. Se efectúa mediante una retrotitulación con solución estándar de cloruro de calcio, en una alícuota de leche que contiene un exceso de Etilendiamino tetracetato (EDTA), utilizando una solución de calceína como indicador. Esta determinación de calcio sólo se realiza en rangos de pH de fluctúan entre 13– 13,5.

3.2.4.3 Determinación del contenido de fósforo. Se aplicó el método espectrofotométrico. El fundamento de este método se sustenta en la digestión de la leche usando ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno, con una formación de azul de molibdeno por adición de una solución de ácido ascórbico - molibdato. La medición de la absorbancia se realizó a una longitud de onda de 820 nm.

Para efectos de comparación en la concentración de fósforo en las muestras de leche con otros estudios, se utilizó en la conversión de unidades una densidad promedio de leche de 1,030 g/mL.

3.2.4.4 Determinación de la termoestabilidad de la leche. El método utilizado radica en que un volumen de leche conocido (2,5 mL) es colocado en tubos de Pyrex de dimensiones determinadas (10 cm de largo; 9 mm diámetro interno; 11 mm diámetro externo), los cuales son introducidos en un baño de aceite de maravilla comercial a 135 °C de temperatura con agitación constante de las muestras, de aplicó un movimiento de 60 oscilaciones por minuto.

El tiempo de coagulación se contabiliza desde el momento que se introduce el tubo en el baño hasta que se visualizan los primeros signos de coagulación en

las paredes del tubo. Es un método subjetivo que determina la estabilidad de las proteínas de la leche frente al calor (ANEXO 2).

3.2.4.5 Determinación de las variantes genéticas de κ -caseína. Las muestras correspondientes a κ -caseína fueron preparadas según MCKENZIE y WAKE (1961), siendo estas muestras semi-purificadas (ANEXO 3). Se determinó el contenido de proteína que poseía cada muestra de κ -caseína previamente semi-purificada mediante el método de LOWRY *et al.* (1951), con el fin de determinar la cantidad de muestra necesaria para la realización de las electroforesis. A cada tubo de electroforesis se le agregó 15 μg de proteína.

Como estándares de las variantes A y B de κ -caseína se utilizaron muestras preparadas por CASANOVA (2001). Como estándar A se empleó la muestra Steami (raza Holstein-Friesian), que poseía una proporción de 2.0: 1 de κ -CN A con respecto a la κ -CN B. Esta muestra empleada como estándar fue preparada a partir de la muestra original (κ -CN previamente dializada) y fue diluida 5 veces en agua. De esta solución se tomó 40 μL que fueron disueltos en 50 μL de buffer muestra, de aquí se extrajo 10 μL , los que poseían los 15 μg de proteína necesarios para la electroforesis.

Por otro parte, la muestra utilizada como estándar B fue la 3971 (raza Jersey) con una proporción de 1: 1.5 de variante A con respecto a B. Esta muestra fue preparada diluyendo la muestra original 5 veces en agua, luego se tomaron 40 μL que fueron disueltos en 200 μL de buffer muestra, de esta nueva solución se tomaron 11 μL , los que poseían los 15 μg de proteína necesarios para la electroforesis.

Las muestras de κ -caseína ya semi-purificadas, fueron preparadas según ADDEO *et al.* (1983), para la realización de las electroforesis.

En la electroforesis de isoenfoque en geles de poliacrilamida se sustituyó la riboflavina por persulfato de amonio (ANEXO 4). El principio del método se basa en la identificación y separación de proteínas mediante la migración a través del gel de poliacrilamida dependiendo del punto isoelectrico de las proteínas, provocado mediante una diferencia de pH generado por mezcla de anfolitos, los que son polímeros cargados eléctricamente.

La proporción de las variantes genéticas se determinó por densitometría mediante el programa computacional Unscanit .

4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Contenido de proteína total, calcio, fósforo, evaluación de termoestabilidad y producción de leche en las muestras analizadas

4.1.1 Contenido de proteína total. Los resultados del contenido total de proteína para las muestras en estudio se presentan en el ANEXO 5, y en el CUADRO 8 los promedios de las muestras (con su correspondiente duplicado) y las desviaciones estándares del contenido de proteína total en cada uno de los cuatro muestreos.

CUADRO 8. Promedio y desviación estándar del contenido proteico para las muestras de leche según número de muestreo.

Muestreo N°	n	Promedio \pm desviación estándar (%)
1	20	3,23 \pm 0,16 ^a
2	20	3,29 \pm 0,14 ^a
3	20	3,29 \pm 0,16 ^a
4	20	3,26 \pm 0,14 ^a
Total muestreos	80	3,27 \pm 0,15

* Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)
n: número de muestras

De acuerdo al CUADRO 8, se observa que el promedio de proteína total para los cuatro muestreos durante la época de invierno fue de 3,27 \pm 0,15%, no encontrándose diferencia estadísticamente significativa en un intervalo de confianza del 95%. El valor promedio de proteína total de los cuatro muestreos

se encuentra dentro de los valores de proteína láctea especificados por AMIOT (1991) y WALSTRA y JENNESS (1984), que especifican valores de 3,2 y 3,3% respectivamente. Las diferencias que existen entre autores, se deben principalmente a factores como la estación del año, la raza de los animales y al número de vacas utilizadas para la investigación. Es así, como De Peters y Cant citados por LATRILLE (1993), mencionan que la leche de vacas Holstein-Friesian presentan un $3,22 \pm 0,45\%$ de proteínas, y que leches de raza Jersey presentan un porcentaje de proteína de $4,22 \pm 0,51\%$. En tanto, McLEAN *et al.* (1984), señalan un porcentaje de proteína total de 3,09% para vacas de raza Holstein y un 3,93% para vacas Jersey.

En la investigación realizada por KRAMM (2003), utilizando las mismas muestras, pero en la época de primavera y animales en su primera lactancia, obtuvo un valor de proteína total de $3,09 \pm 0,18\%$. Por lo tanto, se observa que entre la primera lactancia y la segunda existe un incremento en cuanto al contenido proteico de la leche, lo cual se confirma con lo descrito por NG-KWAI-HANG *et al.* (1982), quienes analizaron muestras de leche de 2.800 vacas de la raza Holstein-Friesian, encontrando un leve aumento en contenido de proteína de la leche desde el primer y segundo parto.

LAVIN (1996), realizó un estudio de comparación entre el contenido de proteína y número de lactancias, determinando que existe un incremento de un 7,6% de proteína desde la primera a la segunda lactancia. El incremento encontrado en este estudio (de primera a segunda lactancia), fue de un 5,8%, comparado con la investigación realizada por KRAMM (2003), que estudio el mismo grupo de vacas en la primera lactancia. En cuanto a la estacionalidad de presente estudio (época de invierno) con el realizado por KRAMM (2003), el aumento del contenido de proteína se encontraría acorde con lo descrito por CASADO y GARCÍA (1985), donde afirman que éstas aumentan en el período otoño-invierno y desciende en primavera-verano.

En cuanto a la alimentación de las vacas, en el análisis de ensilaje de pradera permanente, realizado por el laboratorio de Producción Animal, se obtuvo un valor bajo de proteína bruta de 1,25%, comparado con un 4,34% de proteína bruta en el análisis de pradera realizado en la época de primavera durante el estudio de KRAMM (2003).

4.1.2 Contenido de calcio. El contenido de calcio de cada muestra de leche se presenta en el ANEXO 5 y en el CUADRO 9, se dan a conocer los promedios (muestras en duplicado) y las desviaciones estándares del contenido de calcio para cada uno de los cuatro muestreos.

CUADRO 9. Promedio y desviación estándar del contenido de calcio (expresados en g/L) para las muestras de leche según número de muestreo.

Muestreo N ^o	n	Promedio \pm desviación estándar (g/L)
1	20	1,05 \pm 0,08 ^a
2	20	1,03 \pm 0,05 ^a
3	20	1,16 \pm 0,07 ^b
4	20	1,20 \pm 0,10 ^b
Total muestreos	80	1,11 \pm 0,11

* Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)
n: número de muestras

El valor de calcio promedio para los cuatro muestreos fue de 1,11 \pm 0,11 g/L, encontrándose diferencias significativas a un nivel del 95% de confianza entre los muestreos 1-2 y 3-4. El valor promedio de calcio obtenido en los cuatro muestreos, es visiblemente menor a los valores de calcio encontrados en la literatura, aunque es necesario considerar que los valores corresponden a leche de vacas individuales. ALAIS (1985) y PINTO *et al.* (1978), especifican un valor de calcio de 1,30 y 1,28 g/L, respectivamente, en la leche de rebaños. No

obstante, ALANIS y CASTRO (1992), mencionan un valor de 1,12 g/L de calcio en la leche de rebaños, valor que se acerca más al valor de calcio encontrado en el presente estudio. A su vez, el valor de calcio encontrado es mayor al indicado por PINTO *et al.* (1986), que revela un valor de 0,959 g/L de calcio en leche proveniente de grupos de vacas de raza Holando Europeo.

BALLESTEROS (1997), encontró un valor de 1,28 g/L de calcio, en un estudio realizado con leche proveniente de 17 plantas lecheras de la zona sur de Chile, incluyendo la décima región, los rebaños utilizados pertenecían a la misma raza bovina que este estudio (Frisón Negro).

PÉREZ (2003), analizó leche del mismo grupo de vacas utilizada en esta investigación, pero con animales que se encontraban en su primera lactancia durante la época de primavera, encontrando un valor promedio de 1,26 (g/L) \pm 0,0059 de calcio, no hallando diferencias estadísticamente significativas entre los meses de muestreo. De acuerdo a este resultado habría un descenso en el contenido de calcio en la leche de las vacas en estudio de un 11,9% de primera a segunda lactancia. Mahieu *et al.* citados por VERA (2000), reportan que el efecto producido por el número de lactancias sobre el contenido de calcio es mínimo.

Otro factor que podría influir en el contenido de calcio es la estación del año, Mahieu *et al.* citados por VERA (2000), expresan que aquellas vacas que son sometidas a pastoreos diarios el contenido de calcio y fósforo en la leche son más elevados en primavera que en otoño-invierno. Por el contrario, SINGH y FOX (1987), indican que calcio y fósforo tendrían un aumento durante el invierno, aunque sus diferencias no serían significativas.

En cuanto al régimen de alimentación utilizado y al análisis efectuado al ensilaje por el laboratorio de Producción Animal, el contenido de calcio presenta valores

de un 0,08% en el presente estudio y 0,12% de calcio en el análisis de pradera en la investigación de PÉREZ (2003), las sales minerales suministradas al grupo de vacas no varió en ambos estudios (250 g aprox.). Según ALAIS (1985) y UNDERWOOD (1981), la alimentación influye muy poco en la composición mineral de la leche.

En general, las diferencias encontradas entre las diferentes investigaciones se deberían a las condiciones en las que se encontraban los rebaños al realizar las investigaciones, a la raza y al número de animales utilizados en los ensayos.

4.1.3 Contenido de fósforo. Los resultados del contenido de fósforo en cada muestra de leche, se señalan en el ANEXO 5. Para cada muestreo fue necesario preparar una curva estándar para determinar el contenido de fósforo. Las ecuaciones de las curvas correspondientes para cada muestreo se presentan en el ANEXO 6. Los promedios (muestras en duplicado) y desviaciones estándar obtenidos se presentan en el CUADRO 10.

CUADRO 10. Promedio y desviación estándar del contenido de fósforo para las muestras de leche según muestreo.

Muestreo N°	n	Promedio \pm desviación estándar (%m/m)
1	20	0,087 \pm 0,007 ^a
2	20	0,090 \pm 0,005 ^a
3	20	0,090 \pm 0,004 ^a
4	20	0,091 \pm 0,004 ^a
Total muestreos	80	0,089 \pm 0,005

* Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)
n: número de muestras

Se encontró un valor promedio de contenido de fósforo expresado en %m/m de

0,089 ± 0,005, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los muestreos realizados. Este valor es menor al encontrado por PÉREZ (2003), en la leche de los mismos animales durante el periodo primaveral, en el cual se obtuvo un contenido de fósforo de 0,093(%m/m).

Según ALAIS (1985), el contenido de fósforo presente en la leche es de 1,00 g/L, valor relativamente cercano al encontrado.

PINTO *et al.* (1986), registró un valor promedio de 0,414 g/L de fósforo en leche provenientes de grupos de vacas, mientras que BALLESTEROS (1997), informa un valor de fósforo promedio de 0,72 g/L en leche de rebaños, destacando que el mayor promedio se encontró en la décima región.

Según PINTO *et al.* (1986), la influencia de la alimentación en los animales no afecta significativamente los contenidos de sodio, potasio, calcio y fósforo, pero los bajos contenidos de calcio y fósforo encontrados en la leche de rebaños de la zona sur, serían atribuibles a la sequía existente durante el período de análisis y al bajo contenido de minerales en las praderas.

En cuanto al número de lactancias del animal Mahieu *et al.* citados por VERA (2000), indican que al aumentar el número de lactancias los niveles de sodio aumentan y el contenido de fósforo tiende a disminuir.

JENNESS y PATTON (1976), señalan que la composición mineral varía durante el periodo de lactación ocurriendo cambios al inicio y al final de este periodo, en este estudio las vacas se encontraban entre tercer y cuarto mes de lactancia en donde se produciría una disminución en el contenido de minerales, mientras que en la investigación de PÉREZ (2003), estas mismas vacas se encontraban en los últimos meses de lactación, donde se produciría un aumento de la composición mineral en la leche. Este hecho explicaría las diferencias entre los

valores de calcio y fósforo que se encontraron en esta investigación con los obtenidos por PÉREZ (2003).

4.1.4 Estabilidad térmica de la leche. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en un nivel de confianza del 95%, entre los muestreos realizados para la variable de termoestabilidad. En el ANEXO 5, se presentan los tiempos de estabilidad térmica para las leches en estudio y en el CUADRO 11, se presentan el promedio (muestras con su duplicado) y desviación estándar de los cuatro muestreos.

CUADRO 11. Promedio y desviación estándar de termoestabilidad en las muestras de leche.

Muestreo N°	n	Promedio ± desviación estándar (s)
1	20	65,40 ± 5,15 ^a
2	20	65,60 ± 6,87 ^a
3	20	67,65 ± 5,86 ^a
4	20	66,55 ± 5,59 ^a
Total muestreos	80	66,30 ± 5,86

* Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)
n: número de muestras

El promedio obtenido de la prueba de estabilidad térmica fue de $66,30 \pm 5,86$ s. PÉREZ (2003), estudió el mismo grupo de vacas, las que se encontraban en su primera lactancia durante la época de primavera-verano, obteniendo un valor relativamente menor llegando a un tiempo de $61,25 \pm 0,93$ s.

GONZÁLEZ (2000), determinó la estabilidad térmica en 96 muestras de leche provenientes de 11 predios durante la época de primavera, obteniendo un promedio de $63,38 \pm 3,96$ s, con un total de ocho muestreos. En este estudio se

encontró diferencias estadísticamente significativas entre los muestreos, no así entre los predios, los que no informan diferencias significativas.

FITZGERALD y HILL (1997) y SINGH y FOX (1987), señalan que entre los factores que afectan la estabilidad térmica de la leche se encontrarían el pH, precalentamiento de la muestra, contenido de proteínas, κ -CN, el fosfato de calcio en estado coloidal y soluble.

Se han realizado estudios sobre la estabilidad térmica de leche variando diversos factores que la pueden modificar. SHARMA y SINGH (1999), estudiaron la relación entre el pH y termoestabilidad en leche re combinada con adición de materia grasa y sólidos no grasos, concluyendo que la coagulación producida por calor es determinada por las proteínas y constituyentes minerales y no por la materia grasa. Además, determinaron que la máxima estabilidad en leche re combinada se hallaba a una temperatura de 130 °C y pH entre 6,7 y 6,9.

Fox y Hearn citados por GONZÁLEZ (2000), realizaron estudios ajustando el valor de pH en las muestras de leche, con el fin de determinar entre que pH se obtenía una mayor estabilidad térmica. Las muestras fueron sometidas a un mismo tratamiento, la conclusión final fue que entre un valor de pH de 6,4 y 6,8, la termoestabilidad aumenta debido a que la concentración de fosfato soluble inorgánico disminuye, alcanzando un máximo de estabilidad a un pH de 6,8.

Otro factor importante en la estabilidad térmica de la leche son las proteínas, en especial las caseínas. Según PIERRE (1989), se producirían alteraciones en la carga de las caseínas por cambios de hidratación, los cuales afectarían la conformación y el tamaño de las micelas. Debido a que se depende de la carga inicial de las micelas, el pH de la mínima estabilidad será diferente en cada muestra. Esto, podría estar directamente relacionado con la composición

química de las caseínas de la leche. Otro estudio realizado por O`CONNELL y FOX (2000), indican que la cinética de coagulación es afectada en forma directa por micelas de caseínas de menor tamaño, aumentando la estabilidad del complejo micelar, debido al incremento en la hidratación e hidrofobicidad.

En cuanto al balance mineral, WALSTRA y JENNESS (1984), especifican que éste se encuentra asociado a la coagulación de la leche por efecto del calor. En tanto, calcio y magnesio y por otro lado citratos y fosfatos poseen efectos opuestos sobre la coagulación. Además, ZADOW (1993), indica que un alto contenido de ión calcio sería el responsable de la sensibilidad de la leche frente a los tratamientos térmicos.

POULIOT *et al.* (1989), determinaron que se producía un descenso en el contenido de calcio y fósforo soluble en forma proporcional al aumentar la temperatura, con una disminución en magnesio y citratos, aunque, sin embargo, el fósforo inorgánico permanece constante.

4.1.5 Producción de leche. En el CUADRO 12 se presentan los valores en litros obtenidos de la producción de leche. Al comienzo de cada muestreo se realizó la medición de la producción de leche de cada vaca utilizada en la investigación.

De acuerdo CUADRO 12, se puede apreciar claramente que la muestra N° 560 presenta una producción de leche menor, con respecto al resto de las vacas. Este bajo rendimiento en la producción de leche de la vaca correspondiente a la muestra N° 560, se debe a que en el animal se detectó la presencia de mastitis subclínica en su cuarto anterior derecho, por lo que no se extrajo leche de éste.

Debido a este problema, la leche de la vaca N° 560 no se tomó en cuenta al realizar los análisis estadísticos donde se involucra la producción de leche.

CUADRO 12. Producción de leche (L) durante los cuatro muestreos.

Nº vaca	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4
546	18	13,5	14	16
560	9	9	12	9
579	12	15	17,5	18
591	14	14,5	16	15,5
596	13	18,5	14	18,5
633	10	11,5	8	12
636	12	12	20	12
639	17	15,5	15	19
642	11	13,5	15	13
644	13	15	16	16

En el CUADRO 13 se presentan los promedios y desviación estándar de la producción de leche a lo largo de la investigación.

CUADRO 13. Promedio y desviación estándar de la producción de leche de las vacas estudiadas. Ordeño AM.

Muestreo Nº	n	Promedio \pm desviación estándar (L)
1	9	13,33 \pm 2,65 ^a
2	9	14,33 \pm 2,08 ^a
3	9	15,06 \pm 3,24 ^a
4	9	15,56 \pm 2,71 ^a
Total muestreos	36	14,60 \pm 2,72

* Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)
n: número de muestras

El valor promedio de la producción de leche fue de 14,60 \pm 2,72 L, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los

muestreos.

4.1.6 Comportamiento de la leche mezcla. En el estudio se incluyó un análisis de leche mezcla, la cual fue preparada con el 10% de la producción de leche de cada animal. Como cada muestreo se subdividió en 2, se tomó el 20% de la producción de leche de cada vaca, obteniéndose valores de dos leches mezcla para cada muestreo. En el CUADRO 14 se indican las muestras que fueron utilizadas en cada muestreo.

CUADRO 14. Número de vaca utilizada para la preparación de la leche mezcla en cada muestreo.

Muestreo	Sub-muestreo	Nº animal
1	1.a	546 – 579 – 591 – 633 – 644
	1.b	560 – 596 – 636 – 639 – 642
2	2.a	546 – 579 – 596 – 636 – 639
	2.b	560 – 591 – 633 – 642 – 644
3	3.a	579 – 591 – 639 – 642 – 644
	3.b	546 – 560 – 596 – 633 – 636
4	4.a	546 – 560 – 579 – 596 – 639
	4.b	591 – 633 – 636 – 642 – 644

Nota: Las leches fueron tomadas completamente al azar.

En el CUADRO 15 se presentan los valores del contenido de proteína total, calcio, fósforo y estabilidad térmica de la leche obtenidos de los análisis realizados en laboratorio, así como también, los valores ponderados o esperados de acuerdo a la producción de leche de cada animal.

De acuerdo al CUADRO 15, se observa que en general los valores obtenidos a través de los análisis de laboratorio para el contenido de proteína total, calcio, fósforo y estabilidad térmica se encuentran en concordancia con los valores

esperados (ponderados) a partir de la producción de leche de cada vaca. Se puede apreciar que existen pequeñas diferencias entre los valores obtenidos en el laboratorio y en forma teórica, para proteína se encontró una diferencia máxima de 0,01%, mientras que para calcio, fósforo y estabilidad térmica se registraron diferencias máximas de 0,07 (g/L), 0,009 (%m/m) y 3,2 s, respectivamente.

CUADRO 15. Promedio experimental y ponderado de las respuestas estudiadas.

Muestreo	Sub-muestreo	Proteína total (%)		Calcio (g/L)		Fósforo (%m/m)		Estabilidad térmica (s)	
		I	II	I	II	I	II	I	II
1	a	3,26	3,27	1,08	1,05	0,093	0,091	64	64,5
	b	3,20	3,20	1,13	1,06	0,087	0,084	66,5	66,3
2	a	3,28	3,29	1,02	1,01	0,097	0,091	64	65,3
	b	3,30	3,29	1,07	1,04	0,099	0,091	66,5	65,9
3	a	3,30	3,30	1,16	1,13	0,099	0,090	70	68,9
	b	3,28	3,29	1,23	1,20	0,097	0,089	68	66,4
4	a	3,22	3,22	1,05	1,12	0,097	0,091	66,5	64,3
	b	3,31	3,30	1,24	1,25	0,097	0,090	72	68,8

I : Valor obtenido del análisis de laboratorio efectuado a la leche mezcla.

II : Valor ponderado de la leche mezcla según producción de leche.

4.2 Análisis de correlación entre las variables termoestabilidad y proteína, calcio y fósforo

De acuerdo a FAO (1981), para la variable termoestabilidad a los efectos del tratamiento térmico y sus consecuencias se asocian a precipitaciones de proteínas solubles sobre la caseína reduciéndose el contenido de calcio y fosfatos solubles. Asimismo, NG-KWAIFHANG (1997), indican que la estabilidad

térmica de la leche es afectada por el contenido de minerales y caseínas, tamaño de la micela, contenido de κ -CN, efecto del tratamiento térmico, pH.

En el CUADRO 16, se presentan los coeficientes de correlación entre los pares de las variables estudiadas.

CUADRO 16. Coeficientes de correlación entre las variables estudiadas.

	Proteína	Calcio	Fósforo	pH
Termoestabilidad	0,502*	0,227*	0,257*	-0,288*

* correlaciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Del CUADRO 16 se observa que existe una correlación positiva estadísticamente significativa entre la variables termoestabilidad y el contenido de proteína total, calcio y fósforo. También se incluyó el pH de las muestras, obteniendo una correlación negativa estadísticamente significativa. La correlación más alta se encontró entre la variables termoestabilidad y proteína (0,502), comprobándose la influencia que posee el contenido de proteína sobre la estabilidad de la leche frente a los tratamientos térmicos.

En la investigación realizada por PÉREZ (2003), también se encontró correlaciones positivas en cuanto a la variable termoestabilidad con calcio y fósforo, aunque sus valores fueron más altos (0,61 y 0,59 respectivamente), informando además diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), y una correlación negativa para la variable pH, no significativa. Como se mencionó anteriormente, el estudio de PÉREZ (2003), se realizó con las mismas muestras de la presente investigación, en la época de primavera con vacas en su primera lactancia, por lo que las diferencias entre los coeficientes de correlación puede ser atribuida a las distintas condiciones que se encontraban los animales al momento de realizar los análisis de termoestabilidad, calcio y fósforo, ya que se encontraron diferencias en los valores obtenidos para cada variable en ambos

estudios.

PÉREZ (2003), atribuyó que las altas correlaciones presentadas en su estudio entre termoestabilidad y las variables de calcio y fósforo se deberían a la influencia que ejercen los minerales (calcio y fósforo) sobre la estabilidad térmica, puesto que son los minerales más abundantes en la fase coloidal acompañados de pequeñas cantidades de magnesio y citratos.

4.3 Variantes genéticas de κ -caseína

Para la identificación de las variantes genéticas de κ -caseína en las muestras de leche estudiadas, se realizó una semi-purificación según la metodología descrita por McKENZIE y WAKE (1961), llegando hasta la etapa que considera la adición de cloruro de calcio, separando así el complejo micelar para obtener la κ -caseína semi-purificada.

Los valores proteicos de las muestras de κ -caseína se presentan en el ANEXO 7, así como también la cantidad de muestra que debió ser agregada para la realización de cada electroforesis.

La identificación de las variantes genéticas de κ -caseína se realizó mediante electroforesis de isoenfoque. En la FIGURA 1 se presentan las bandas electroforéticas obtenidas de cada muestra en estudio, incluyendo los estándares empleados. Se observa claramente la presencia de una sola banda en cada tubo.

Realizadas las electroforesis, se procedió a medir la distancia de migración de cada banda electroforética desde el ánodo, cuyos valores se exponen en el ANEXO 8. Existen diferencias en las distancias de migración en una misma muestra, debido a que existen condiciones que pueden modificar cada corrida electroforética, tales como la fuerza iónica, cambios de voltaje, entre otros.

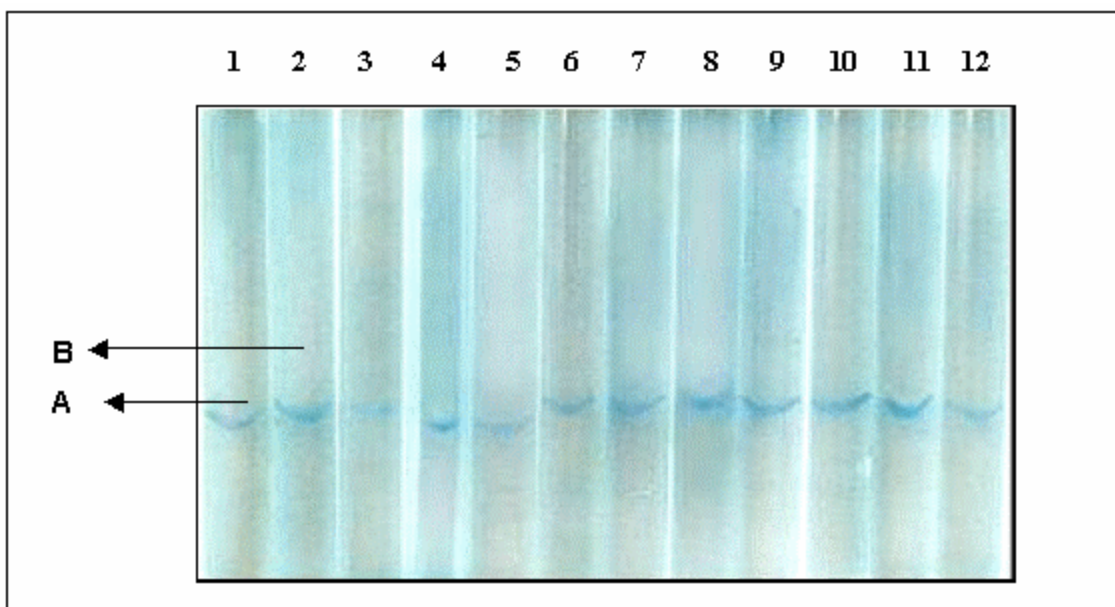


FIGURA 1. Electroforesis de isoenfoque para κ -caseína en muestras de leche de vacas Frisón Negro.

Donde:

1) Estándar A κ -CN; 2) Estándar B κ -CN; 3) 546; 4) 560; 5) 579; 6) 591; 7) 596; 8) 633; 9) 636; 10) 639; 11) 642; 12) 644.

De esta forma fue posible detectar la presencia de las variantes A o B de κ -caseína en las muestras de leche, no encontrándose ambas variantes en una misma muestra. Además, se observan la presencia de otras caseínas no separadas totalmente. En el CUADRO 17 se presentan las muestras de leche con su correspondiente variante genética.

De acuerdo al CUADRO 17, se identificó la variante A de κ -CN en sólo 2 muestras, correspondiendo al 20% de la población estudiada, mientras que en las restantes se detectó la presencia de la variante B (80% de la población). En cuanto a la leche mezcla, las bandas se presentaban difusas, por lo que no se pudo determinar la presencia de una determinada variante. El hecho de no encontrar ambas variantes en las muestras estudiadas debiera estar relacionada con la utilización de muestras de κ -caseína semi-purificadas. CASANOVA (2001), logró identificar las variantes A y B en muestras purificadas

de κ -CN provenientes de vacas Holstein-Friesian y Jersey.

CUADRO 17. Muestra de leche y la variante genética identificada.

Muestra de Leche	Variante Identificada
546	B
560	A
579	A
591	B
596	B
633	B
636	B
639	B
642	B
644	B

VAN EENENNAAM y MEDRANO (1991), estudiaron un ganado de 1152 vacas de raza Holstein, estableciendo que la frecuencia de las variantes A y B de κ -CN correspondería a un 82% y 18%, respectivamente. Así mismo, NG-KWAI-HANG *et al.* (1984), encontraron que en un ganado de 2045 vacas Holstein la frecuencia de las variantes era de un 74,4% de A y un 25,6% de B. Por lo tanto, los resultados de la identificación de la frecuencia de las variantes en este estudio difieren de lo especificado en la literatura, pero es necesario considerar el número de muestras analizadas. En el presente estudio se seleccionó un grupo de vacas elegido al azar, coincidiendo que las vacas elegidas presentaban una frecuencia mayor de la variante B de κ -CN.

En el ANEXO 9, se muestran las densitometrías realizadas a cada muestra en estudio, mediante el programa computacional Unscanit. Se comprobó la presencia de un sólo pico (banda electroforética), que corresponde a la variante

fenotípica A o B de κ -CN.

Estos resultados concuerdan con los encontrados por BENAVIDES (2003), KRAMM (2003) y PÉREZ (2003), que estudiaron el mismo grupo de vacas, pero durante la época de primavera y en su primera lactancia, identificando las mismas variantes para las muestras de leche analizadas.

4.4 Relación de las variantes genéticas con el contenido de proteína total, calcio, fósforo y termoestabilidad de la leche

Existen diversas investigaciones que relacionan a las variantes genéticas de algunas proteínas con determinadas propiedades de la leche, influyendo en el contenido de algunos de sus componentes.

En el estudio se realizaron análisis de varianza para determinar si la presencia de las variantes A y B de κ -CN influían en el contenido de algunos componentes y propiedades (ANEXO 10). En el CUADRO 18 se presenta los promedios del contenido de las variables en estudio y se relacionan con una determinada variante de κ -caseína.

CUADRO 18. Promedio y desviación estándar de las variables en estudio para cada variante de κ -caseína.

k-caseína	n	Promedio \pm Desviación estándar			
		Proteína (%)	Calcio (g/L)	Fósforo (%m/m)	Estabilidad Térmica (s)
A	16	3,07 \pm 0,06 ^a	1,08 \pm 0,11 ^a	0,089 \pm 0,005 ^a	57,5 \pm 3,16 ^a
B	64	3,31 \pm 0,13 ^b	1,11 \pm 0,11 ^a	0,090 \pm 0,005 ^a	68,5 \pm 4,01 ^b

* Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)
n: número de muestras

Se observa en el CUADRO 18, que el efecto de las variantes de κ -caseína es estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para las variables de proteína total y termoestabilidad. Además, se percibe que aquellas leches con la presencia de la variante B de κ -caseína poseen mayores valores en el contenido de proteína, calcio, fósforo y mayor tiempo de estabilidad térmica, que aquellas leches con la variante A de κ -CN.

4.4.1 Efecto de las variantes A ó B de κ -caseína en relación a la proteína total. Mediante el análisis de varianza se determinó que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) en el porcentaje de proteína total en las leches de vacas que presentan las variantes A y B de κ -caseína. Se determinó que las muestras de leche que presentan la variante B, poseen un mayor contenido de proteína total que leches con la variante A, como se observa en el CUADRO 18. KRAMM (2003), estudiando el mismo grupo de vacas, encontró una diferencia estadísticamente significativa al analizar la influencia de estas variantes sobre el porcentaje de proteína total, porcentaje de proteína de suero, porcentaje de caseína y número de caseína. Además, determinó que la variante B de κ -caseína presenta un 0,09% más de proteína total que la variante A al 95% de confianza, durante la época de primavera.

Estos resultados concuerdan con lo señalado por VAN EENENNAAM y MEDRANO (1991), NG-KWAIFHANG *et al.* (1990) y NG-KWAIFHANG *et al.* (1986), que detectaron un efecto positivo de las variantes genéticas de κ -caseína sobre el contenido de proteína total. Del mismo modo, RAHALI y MENARD (1991), indican que las variantes de κ -caseína ejercen efectos sobre la leche, originando diferencias en su composición proteica.

Los valores obtenidos concuerdan con lo descrito por JAKOB (1994), NG-KWAIFHANG *et al.* (1990) y NG-KWAIFHANG *et al.* (1986), que señalan que los

fenotipos BB de κ -CN presentan mayor porcentaje de proteína que los fenotipos AA y AB.

4.4.2 Efecto de las variantes de κ -caseína y calcio. Según el análisis de varianza (95% de confianza) no se detectó diferencia significativa, o sea, la presencia de una determinada variante de κ -caseína no tiene influencia sobre el contenido de calcio en las leches estudiadas.

PÉREZ (2003), informó diferencias estadísticamente significativas para el contenido de calcio, identificando que leches con el fenotipo B presentaban valores mayores de calcio que aquellas que poseían la variante A. De igual forma, HORNE y MUIR (1994), señalaron que leches con el fenotipo BB de κ -CN registraban un mayor contenido del ión calcio respecto a sus otras variantes.

Sin embargo, RAHALI y MENARD (1991), informaron que no existen diferencias significativas entre las muestras de leche que presentan las variantes AA, AB y BB de κ -caseína y el contenido de calcio. Pero, sí obtuvieron valores diferentes para las tres variantes, encontrando valores de 1,32, 1,28 y 1,34 g/L para los variantes AA, AB y BB, respectivamente.

WALSTRA *et al.* (1999), indican que un bajo contenido de calcio y un elevado valor de pH se relacionan con la variante genética AA de κ -caseína, argumentando además, que no siempre existe una influencia entre una determinada variante y la composición de la leche.

4.4.3 Efecto de las variantes de κ -caseína y fósforo. No se informan diferencias estadísticas significativas (al 95% de confianza) en el contenido de fósforo entre las variantes A y B de κ -caseína. Sin embargo, PÉREZ (2003), si

encontró diferencias significativas entre el contenido de fósforo total en leche y las variantes genéticas A y B encontradas en κ -caseína, en su estudio con el mismo grupo de vacas en primera lactancia, durante la primavera.

MARIANI *et al.* (1997), identificaron que la presencia de la variante B de κ -caseína en leche proveniente de vacas de la raza Bruna, presentaban un alto contenido de fosfato de calcio coloidal. En general, altos contenidos de minerales como el calcio y fósforo, se relacionan a altos contenidos de proteínas de la leche, especialmente a las caseínas, esto se debería a que calcio y fósforo son parte fundamental de la estructura de las caseínas.

4.4.4 Efecto de las variantes de κ -caseína y termoestabilidad. El análisis estadístico realizado para evaluar la influencia de las variantes de κ -caseína en la estabilidad térmica de la leche fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$).

En el CUADRO 17, se observa que las leches con el fenotipo B poseen mayores tiempos de termoestabilidad, respecto aquellas leches con la presencia de la variante A, registrándose valores de 68,5 s y 57,5 s, respectivamente.

Este resultado corrobora lo descrito por FITZGERALD y HILL (1997) y McLEAN *et al.* (1987), que señalan que las leches con la variante genética de κ -CN B, serían más estables al calor que las leches con κ -CN A. Esta diferencia es atribuida principalmente a que leches con la presencia de la variante B poseen una mayor proporción de pequeñas micelas, lo que otorga una mayor estabilidad frente a los tratamientos térmicos.

PÉREZ (2003), también encontró diferencias estadísticamente significativas para el efecto de las variantes genéticas de κ -caseína sobre la termoestabilidad

de la leche, determinando que la variante B poseía una mayor estabilidad que la variante A.

ROBITAILLE (1995), en su estudio sobre la influencia de las variantes genéticas de κ -caseína y β -lactoglobulina sobre la estabilidad de la leche, mediante la comparación de los valores promedio de estabilidad térmica determinó que tanto, leches individuales como reconstituidas presentaban un máximo de termoestabilidad aquellas que poseían la variante BB de κ -caseína. FITZGERALD y HILL (1997), encontraron que leches con la combinación de las variantes BB de κ -caseína y AA de β -lactoglobulina, presentan una mayor estabilidad frente a tratamientos que involucran una temperatura de 140 °C.

La importancia de determinar el contenido de proteína total, calcio y fósforo, radica fundamentalmente en la estrecha relación que existe entre estas variables y la estabilidad térmica de la leche. Un incremento en estos componentes puede ser beneficioso en el ámbito industrial y comercial, obteniéndose mayores rendimientos y materia prima con mejores propiedades tecnológicas, lo que finalmente significan productos con mejor calidad industrial y nutricional.

5. CONCLUSIONES

- Se determinaron diferencias estadísticamente significativas según muestreo sólo en el contenido de calcio ($p < 0,05$).
- Se detectó una correlación positiva y significativa entre la termoestabilidad y las variables proteína total, calcio y fósforo.
- Se identificaron las variantes A ó B de κ -caseína en la leche de vacas Frisón Negro, en muestras de leche semi-purificadas.
- Se hallaron diferencias significativas entre las variantes genéticas A y B de κ -caseína en termoestabilidad y contenido de proteína. Además, se observó que las muestras de leche con la variante B de κ -caseína presentaban valores mayores para proteína, calcio, fósforo y termoestabilidad.

6. RESUMEN

La presente investigación tuvo por objetivo relacionar el contenido de proteína total, calcio, fósforo y la termoestabilidad de la leche, con las variantes genéticas de κ -caseína, en muestras de leche de 10 vacas individuales, de raza Frisón Negro, durante la época de invierno.

Las muestras de leches de vacas Frisón Negro fueron obtenidas del Fundo Santa Rosa perteneciente a la Universidad Austral de Chile. Se realizaron un total de cuatro muestreos, los cuales fueron efectuados durante la ordeña matinal.

A las muestras de leche se les determinó el contenido de proteína total, calcio y fósforo y se evaluó su estabilidad térmica. Para la identificación de las variantes genéticas de κ -caseína, se utilizó el método de PEARCE *et al.* (1972), modificado por CASANOVA (2001), identificándose en el 80% de las muestras la variante B, mientras que en el restante se observó la presencia de la variante A.

Se obtuvo como resultado que el fenotipo B de κ -CN ejerce una influencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) sobre los contenidos de proteína total y también sobre la estabilidad térmica de la leche. Los valores encontrados para proteína fueron de $3,31 \pm 0,126$ % para la variante B y $3,07 \pm 0,059$ para A. En tanto los tiempos de termoestabilidad para la variante A y B fueron de $57,5 \pm 3,16$ s y $68,5 \pm 4,01$ s, respectivamente. Para calcio y fósforo no se reportaron diferencias significativas. Sin embargo, las muestras con la presencia de la variante B presentaron valores mayores en el contenido de ambos minerales. En calcio, se encontraron valores de $1,08 \pm 0,11$ g/L para el fenotipo A y $1,11 \pm 0,11$ g/L para B. En tanto que para fósforo los valores obtenidos fueron de $0,089 \pm 0,005$ %m/m y $0,090 \pm 0,05$ %m/m para las variantes A y B respectivamente.

El análisis de correlación fue estadísticamente significativo entre la termoestabilidad y las variables proteína, calcio y fósforo.

SUMMARY

The present investigation had as objective the relationship between the content of total protein, calcium, phosphorus and the heat stability of milk, with the genetic variants of κ -casein, in samples of milk from 10 individual cows, of Frisón Negro race, during winter.

The samples of milk from Frisón Negro cows were obtained from the farm Santa Rosa belonging to Universidad Austral de Chile. They were carried four samples, which they were made during the morning milk.

The milk samples were determined the total protein content, calcium and phosphorus and their heat stability was evaluated. For the identification of the genetic variants of κ -casein, the PEARCE *et al.* (1972) method was used, modified by CASANOVA (2001), identifying in the 80% of the samples the variant B, while in the remaining the presence of the variant A was observed.

As a result it was obtained that the B phenotype of κ -CN exert a significant influence ($p < 0,05$) on the contents of total protein and also on the heat stability of the milk. The founded values for protein were from $3,31 \pm 0,126\%$ for the variant B and $3,07 \pm 0,059$ for A. The according times of heat stability for the variants A and B was from $57,5 \pm 3,16$ s and $68,5 \pm 4,01$ s, respectively. For calcium and phosphorus was not reported significant differences. However, the samples with the presence of the variant B presented higher values in the content of both minerals. In calcium, they were values of $1,08 \pm 0,11$ g/L for the phenotype A and $1,11 \pm 0,11$ g/L for B. For phosphorus the values obtained were from $0,089 \pm 0,005$ %m/m and $0,090 \pm 0,05$ %m/m for the variants A and B respectively.

The analysis of correlation was significant ($p < 0,05$) between the variables of heat stability and content of protein, calcium and phosphorus.

7. BIBLIOGRAFÍA

- AALTONEN, M. y ANTILA, V. 1987. Milk renneting properties and the genetic variants of proteins. *Milchwissenschaft*. 42 (8): 490-492.
- ADDEO, F., CHIANESE, A., DI LUCCIA, P., PETRILLI, R., 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*. Editorial Reverté, S.A.. Barcelona. España. 873 p.
- ALANIS, M. y CASTRO, J. 1992. Mineral composition of milk produced in Monterrey, Nuevo León, México. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 42 (4): 456-459.
- AMIOT, J. 1991. *Ciencia y tecnología de la leche*. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 547 p.
- BADUI, S. 1984. *Química de los alimentos*. Editorial Alambra mexicana S. A.. México DF. 427 p.
- BALLESTEROS, C. 1997. *Determinación de minerales en leche de vaca: Sodio, potasio, calcio total, calcio complexométrico, fósforo total y fósforo no proteico*. Tesis Lic. en Ing. en Alimentos. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia. 57 p.

- BELITZ, H. y GROSCH, W. 1997. Química de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 1087 p.
- BENAVIDES, T. 2003. Efecto de las variantes genéticas A y B de κ -caseína y β -lactoglobulina sobre las propiedades de coagulación de la leche. Tesis Lic. en Ing. en Alimentos. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia. 108 p.
- CASADO, P. y GARCÍA, J. 1982. Composición química de la leche. Industrias Lácteas Españolas 40: 56-60.
- CASADO, P. y GARCÍA, J. 1985. La calidad de la leche cruda y los factores que la influyen. Industrias Lácteas Españolas 81: 1-294.
- CASANOVA, M. 2001. Identificación de las variantes genéticas de K-caseína en leches de vacas Holstein Friesian y Jersey por electroforesis de isoenfoque. Tesis Lic. en Ing. en Alimentos. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia. 115 p.
- CASAS, M. 1996. Variación en el contenido de proteínas y materia grasa de leche, según las diferentes estaciones del año y sistemas de alimentación en predios. Zona sur. Tesis Lic. Medicina Veterinaria. Universidad Austral de Chile. Facultad de Medicina Veterinaria. Valdivia. 84 p.
- CHILE. INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN (INN). 1998. Leche productos lácteos. Muestreo, parte 1. Norma Chilena NCh 1011/1. Santiago. Chile. 9 p.

- CHILE. MINISTERIO DE SALUD. 2000. Reglamento Sanitario de los Alimentos. Diario Oficial de la republica de Chile. 13 de mayo de 1997. 208 p.
- DALGLEISH, D., POULIOT, Y. y PAQUIN, P. 1987. Studies on the stability of milk. Journal of Dairy Research. 54: 29-37.
- DALGLEISH, D. 1989. The behaviour of minerals in heated milks. In International Dairy Federation. Bulletin Document. 248: 31-34.
- DAVIES, D. y WHITE, J. 1966. The stability of milk protein to heat. I Subjetive measurement of heat stability of milk. Journal of Dairy Research. 33: 67-81.
- DELACROIX – BUCHET, A., LEIFIER, D. y NUYTS – PETIT, V. 1993. Polymorphism of kappa casein from three French breeds and its coagulability. Lait. 73: 61-72.
- De PETERS, E. y FERGUSON, J. 1992. Non protein Nitrogen and Protein Distribution in the Milk of Cows. Journal of Dairy Science, 75 (11): 3192-3209.
- FENNEMA, O. 1993. Química de los alimentos. Editorial Acribia S.A.. Zaragoza. España. 1095 p.
- FITZGERALD, R. y HILL, J. 1997. The Relationship between Milk Protein Polymorphism and the Manufacture and Functionality of Dairy Products. En: Milk Protein Polymorphism. International Dairy Federation. Brussels, Belgium. Pp. 355-371.

- FOX, P. 1997. Development in dairy chemistry. Editorial Chapman & Hall. Londres. Inglaterra. 539 p.
- GONZÁLEZ, R. 2000. Estudio de la relación entre termoestabilidad y prueba de alcohol de la leche a nivel de un Centro de Acopio Lechero. Tesis Lic. En Ing. en Alimentos. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia. 80 p.
- GONZÁLEZ de LLANO, D. 1990. Polimorfismo genético de las proteínas de la leche de vaca. Alimentación, Equipos y Tecnología. Julio – Agosto: 77-81.
- GRANDISON, A., FORD, G., MILLARD, D. y OWEN, A. 1984. Chemical composition properties of renneted milk from cows during early lactation. Journal of Dairy Science 51 (3): 407-417.
- HOLT, C. 1981. Some principles determining salt composition and partitioning of ions in milk. Journal of Dairy Science 64 (10): 1958-1964.
- HORNE, D. y MUIR, D. 1994. Genetic polymorphism of κ -casein and rennet coagulation time. Effects of serum phase components. Milchwissenschaft. 49 (8): 446-449.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. (IDF/FIL). 1990. Milk determination of total phosphorus content -Spectrometric method. FIL /IDF 42B: 1990. 3 p.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. (IDF/FIL). 1993. International IDF Standard. 20B: 1993. Milk. Determination of Nitrogen Content. Part 3: Block – digestion method. Belgium. Pp. 7-9.

- JAKOB, E. 1994. Genetic polymorphism of milk proteins. FIL -IDF Bulletin 298. 11 p.
- JENNESS, R. y PATTON, S. 1976. Principles of dairy chemistry. Publishing Company Huntington. New York. U.S.A. 446 p.
- KRAMM, J. 2003. Composición proteica y su relación con las variantes genéticas A y B de κ -caseína y β -lactoglobulina en leche de vaca Frisón Negro. Tesis Lic. en Ing. en Alimentos. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia. 114 p.
- LATRILLE, L. 1993. El valor nutritivo de la leche bovina y factores que alteran su composición. En Latrille, L. Producción Animal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Pp: 27-56
- LAVIN, R. 1996. Variaciones de la composición láctea de vacas con distinto número de lactancia. Tesis Lic. Medicina Veterinaria. Universidad Austral de Chile. Facultad de Medicina Veterinaria. Valdivia. 84 p.
- LOWRY, O., ROSEBROUGH, N., FARR, A. y RANDALL, R. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. Journal of biological chemistry. 193: 265-275.
- LUCEY, J. y FOX, P. 1993. Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: A review Journal of Dairy Science. 76 (6): 1714-1724.
- MARIANI, P., ZANZUCCHI, G., MASORI, M., SERVENTI, P. y PECORARI, M. 1997. Percentage distribution of caseins and kappa-casein fractions separated by reverse-phase HPLC in Italian Brown cows with different genotypes at the kappa-casein locus. Sc. Tecn. Latt. Caes. 46: 30-35.

- McKENZIE, H. y WAKE, R. 1961. An improved method for the isolation of κ -casein. *Biochimic Biophys Acta*. 47: 240-242.
- McLEAN, D., GRAHAM, E., PONZONI, R. y McKENZIE, H. 1984. Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. *Journal of Dairy Research*. 51: 531-546.
- McLEAN, D., GRAHAM, E., PONZONI, R. y McKENZIE, H. 1987. Effects of milk protein genetic variants and composition on heat stability of milk. *Journal of Dairy Research*. 54: 219-235.
- McMAHON, D; BROWN, R; RICHARDSON, G. y ERNSTROM, C. 1984. effects of calcium, phosphate, and bulk culture media on milk coagulation properties. *Journal of Dairy Science*. 67 (5): 930-938.
- NEVILLE, M. y WATTERS, C. 1983. Secretion of calcium into milk. Review. *Journal of Dairy Science*. 66 (3): 371-380.
- NG-KWAI-HANG, K., HAYES, J. y MOXLEY, J. 1982. Enviromental influences on protein content an composition of bovine milk. *Journal of Dairy Science*. 65 (10): 1993-1998.
- NG-KWAI-HANG, K., HAYES, J., MOXLEY, J. y MONARDES, H. 1984. Association of genetic variants of casein and milk serum proteins with milk, fat, and protein production by dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 67: 835-840.
- NG-KWAI-HANG, K., HAYES, J., MOXLEY, J. y MONARDES, H. 1986. Relationships between milk protein polymorphisms and major milk constituents in Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*. 69: 22-26.

- NG-KWAI-HANG, K., MONARDES, H. y HAYES, J. 1990. Association between genetic polymorphism of milk proteins and production traits during tree lactations. *Journal of Dairy Science*. 73: 3414-3420.
- NG-KWAI-HANG, K. 1997. A review of the relationship between milk protein polymorphism and milk composition/milk production. En *Milk protein polymorphism*. International Dairy Federation. Proceedings of the Seminar held in Palmerston North, New Zealand. Pp. 22-37.
- NTAILIANAS, H. y WHITNEY, R. 1964. Calcein as an indicator for the determination of total calcium and magnesium and calcium alone in the same aliquot of milk. *Journal of Dairy Science*. 47 (1): 19-27.
- O'CONNELL, J. y FOX, F. 2000. The two-stage coagulation of milk proteins in the minimum of the heat coagulation time-pH profile of milk: Effect of casein micelle size. *Journal of Dairy Science*. 83: 378-386.
- ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO). 1981. Composición y propiedades de la leche. Equipo regional de desarrollo y capacitación en lechería de FAO para América latina. Santiago. Chile. 58 p.
- PAQUIN, P. y LACROIX, C. 1993. Seasonal and regional variations of different milk protein fraction: A survey of Quebec milk. En *Protein definition*. IDF. Bruselas. Pp. 32-39.
- PEARCE, F., BANKS, D., BANTHORPE, A., BERRY, H., DAVIES, H. y VERNON, C. 1972. The isolation and characterization of nerve-growth factor from the Venom of *Vipera russelli*. *Eur. J. Biochemistry*. 29: 417-425.

- PÉREZ, E. 2003. Relación entre el polimorfismo de κ -CN y β -Lg con el contenido de calcio, fósforo, citrato y termoestabilidad de la leche. Tesis Lic. en Ing. en Alimentos. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia. 103 p.
- PIERRE, A. 1989. Milk stability in ethanolic solutions. *Journal of Dairy Research*. 56: 521-527.
- PINTO, M. y ROYO, R. 1973. Composición química de la leche y sus variaciones a nivel de recepción de planta. Zona Sur de Chile. Parte I. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 5 (1): 5-13.
- PINTO, M., MOLINA, H., ROJAS, M. e ISRAEL, L. 1978. Composición química de la leche y sus variaciones estacionales. Zona Sur de Chile. Parte II. Sodio, potasio, calcio y fósforo. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 10 (1): 27-33.
- PINTO, M., ANRIQUE, R., VEGA, R., ISRAEL, L. y DEL PICÓ, R. 1986. Influencia de factores nutricionales y número de lactancias en el contenido de sodio, potasio, calcio y fósforo en leche de vaca. *Agro Sur*. 14 (1): 12-18.
- PINTO, M., CARRASCO, E., FRESER, B., LETELIER, A. y DÖRNER, P. 1998. Composición química de la leche cruda y sus variaciones a nivel de silos en plantas lecheras de la VIII, IX y X regiones de Chile. Parte I. Macrocomponentes. *Agro Sur*. 26 (2): 97-109.
- PORTER, J. 1981. *Leche y productos lácteos*. Editorial Acribia. S. A. Zaragoza. España. 85 p.

- POTTER, N. 1999. Ciencia de los Alimentos. Editorial Acribia. S. A. Zaragoza. España. 667 p.
- POULIOT, Y., BOULET, M. y PAQUIN, P. 1989. Observation on the heat-induced salt balance changes in milk II. Reversibility on cooling. Journal of Dairy Research. 56 (2): 193-199.
- RAHALI, V. y MÉNARD, J. 1991. Influence des variants génétiques de la β lactoglobuline et de la κ - caseína sur la composition du lait et son aptitude fromagere. Lait. 71: 275-297.
- RENNER, E. 1983. Milk and Dairy Products in human nutrition. Friedrick Pustet. Degensburg. Alemania. 450 p.
- ROBITAILLE, G. 1995. Influence of κ -casein and β -lactoglobulin genetic variants on the heat stability of milk. Journal of Dairy Research. 62: 593-600.
- ROGERS, G. y STEWART, J. 1982. The effects of some nutritional and non-nutritional factors on milk protein concentration and yield. Australian Journal Dairy Technology. 37 (1): 26-31.
- SHARMA, R. y SINGH, H. 1999. Heat stability of recombined milk systems as influenced by the composition of fat globule surface layers. Milchweissenschaft. 54 (4): 193-196.
- SINGH, H. y FOX, P. 1987. Heat stability of milk: influence of colloidal and soluble salts and protein modification on the pH-dependent dissociation of micelar κ -casein. Journal of Dairy Research. 54: 523-534.

- TUNICK, M. 1987. Calcium in dairy product. *Journal of Dairy Science*. 70 (12): 2429-2438.
- UNDERWOOD, E. 1981. Los minerales en la nutrición del ganado. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 210 p.
- URECH, E; PUHAN,Z y SCHÄLLIBAUN, M. 1999. Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*. 82 (11): 2402-2411.
- VAN EENENNAAM, A. y MEDRANO, J. 1991. Milk Protein Polymorphisms in California Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 47 (5): 1730-1742.
- VEISSEYRE, R. 1980. Lactología técnica. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 629 p.
- VERA, C. 2000. Contenidos de sodio, potasio, cloruro, calcio, fósforo no proteico y fósforo total en leche de la VIII, IX y X regiones. Tesis Lic. en Ing. en Alimentos. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias. Agrarias. Valdivia. 73 p.
- VILLOCH, A. y PONCE, P. 1986. Genetic an environmental factors affecting milk mineral composition in Holstien-Friesian cows. *Revista de Salud Animal*. 8 (2): 1983-191. Original no consultado. *Dairy Science abstrat*. 1987. 49(12): 844
- WALSTRA, P. y JENNESS, R. 1984. Dairy chemistry and physics. Editorial John Wiley & Sons. USA. 467 p.

WALSTRA, P., GEURTS, T.J., NOOMEN, A., JELLEMA, A. y VAN BOEKEL, M. A. J. S. 1999. Dairy technology. Principles of milk properties and processes. Marcel Dekker. Inc. New York. USA. 727 P.

WHEELLOCK, J. 1980. Influence of physiological factors on the yields and content of milk constituents. In Federetion Internationale de Laitiere. Bulletin Document. 125. Pp: 83-87.

ZADOW, J.1993. The rate of addition of alcohol has a major effect on the alcohol stability of skim milk. Australian Journal Dairy Technology. 48: 38-39.

ANEXOS

ANEXO 1

Caracterización de las vacas en estudio

- **Características generales de las vacas en estudio**

Nombre	Fecha de Nacimiento	Nº de Lactancia	Fecha último parto
546	11.05.97	2	16.04.02
560	24.06.97	2	-
579	04.06.97	2	-
591	11.08.97	2	12.04.02
596	20.08.97	2	-
633	05.03.98	2	07.04.02
636	08.03.98	2	22.03.02
639	10.03.98	2	-
642	11.03.98	2	06.04.02
644	12.03.98	2	08.05.02

FUENTE: CENTRO DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL (2001).

- **Características de alimentación**

Alimento	Cantidad diaria
Ensilaje de pradera permanente	30 Kg
Melazán	2 Kg
Concentrado Suralim	4 Kg
Sales minerales	250 gr
Pradera	pastoreo

(Continuación ANEXO 1)

- **Análisis de composición del ensilaje de pradera permanente**

- Materia seca: 20,34%
- Proteína bruta: 1,25%
- Calcio: 0,08%
- Fósforo: 0,03%

- **Información de la progenie de las vacas en estudio**

R.P.	PADRE	ABUELO. MATERNO	BISABUELO		% HF
			Materno	Paterno	
546	Loyal 120	Mandarín	Gay		46,75
560	Loyal 120	Cañón	Encino	Wilowendeavour	27,75
579	Moro	Ripken	Asteroide	Country home Astro King	25
591	Loyal 120	Trade	Diagrat		43,5
596	Continental	Jim Ben	Cañón	Athol Famous Prefect	34,38
633	Loyal 120	Kentucky	Cañón	Athol Famous Prefect	56,25
636	Gavilán	Asteroide	Dulce	Alfons	12,5
639	Tomy	G. Benevolent	Camote	Country home Astro King	7,5
642	Gavilán	Galpac	Domingo	Puyter-Adema 261	0
644	Stefens	Kay	1641(madre)		100

FUENTE: CENTRO DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL (2001).

ANEXO 2

Procedimiento para determinación de la termoestabilidad de la leche (método de DAVIES y WHITE, 1966; modificado por GONZÁLEZ, 2000)

- **Preparación de la muestra:**
 - Centrifugar la muestra de leche a 3.000 r.p.m. durante 30 minutos.
 - Filtrar con lana de vidrio, para separar la grasa de la muestra de leche descremada.

- **Materiales:**
 - Baño de aceite con temperatura regulable de dimensiones (35,5 cm; 26 cm; 23 cm).
 - Pipeta total de 2,5 mL.
 - Tubos Pyrex con tapa rosca (10 cm de largo; 9 mm diámetro interno; 11 mm diámetro externo).
 - Aceite comercial de maravilla.
 - Centrífuga (3.000 r.p.m./30 minutos)
 - Cronómetro
 - Termómetro de mercurio en un rango de -20 a 150 °C \pm 0.1 °C.

- **Determinación:**
 - Introducir un volumen de 2,5 mL de leche descremada a 20 °C a un tubo, quedando un espacio de cabeza de 4,5 cm.
 - Colocar el tubo con la muestra en el baño de aceite caliente a 135 °C, y comenzar de inmediato (simultáneamente) la agitación u oscilación de las muestras.
 - Medir el tiempo de coagulación desde que se introducen las muestras al baño provisto de agitación hasta que se producen los primeros signos de coagulación de las proteínas de la leche.

ANEXO 3

Preparación de las muestras de κ -caseína para electroforesis de isoenfoque

- **Preparación de la muestra de κ -caseína según 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 4.000 r.p.m. por 15 minutos.
 - El precipitado se filtra a través de filtro Whatman N° 2 o equivalente.
 - La caseína obtenida se lava 4 veces con agua destilada centrifugando en cada lavado.
 - La caseína lavada se reprecipita con NaOH diluido (0,05M).
 - Agregar HCL hasta obtener pH de 4,7.
 - Centrifugar a 4.000 r.p.m. durante 15 minutos.
 - Se disuelve 20 gramos 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 Cloruro de calcio (CaCl_2) 4M ajustando 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. durante 60 minutos y en el sobrenadante se recupera la κ -CN

ANEXO 4

Electroforesis de isoenfoque en geles de poliacrilamida

- **Preparación de la muestra (ADDEO *et al.*, 1983)**
 - 0,5% (p/v) de caseína purificada (5 - 7 μ l) disueltos en urea 7M que contenga 0,1% de 2-mercaptoetanol.

- **Preparación del gel (PEARCE *et al.*, 1972, modificado por CASANOVA 2001)**
 - 5,5 mL de solución de Acrilamida (40% acrilamida; 0,6% bisacrilamida)
 - 1,1 mL de TEMED (1,75% en agua)
 - 2,75 mL de Persulfato de amonio (0,37% en agua)
 - 0,55 mL de Anfolito
 - 12,1 mL de agua destilada
- **Buffer de electrodos**
 - Anodo: H₂SO₄ (0,2%)
 - Cátodo: NaOH (0,02N)
- **Precorrida**
 - 200 V x 15 minutos
 - 300 V x 30 minutos
 - 400 V x 60 minutos
- **Corrida**
 - 400 V durante 13 horas, en refrigeración
- **Tinción de geles**
 - 30 minutos en solución fijadora (TCA 15%)
 - 30 minutos en solución de desteñido (500 mL de Etanol, 160 mL de ácido Acético, aforar a 2 litros con agua destilada)
 - 30 minutos en solución de tinción a 60 °C (0,46 gramos de Coomassie G250, 400 mL de solución de desteñido)
 - Se agrega solución de desteñido.

ANEXO 5

Resultados obtenidos del valor de pH, termoestabilidad, contenido proteína total, calcio, fósforo en los diferentes muestreos

- **Muestreo N° 1**

Vaca	pH	Termoest. (s)	Prot. Total (%)	Calcio (g/L)	Fósforo (%m/m)
546	6,6	65	3,50	1,04	0,0994
546	6,6	67	3,46	0,96	0,0993
560	6,7	55	3,03	0,98	0,0803
560	6,7	58	3,05	0,98	0,0803
579	6,7	59	3,01	0,98	0,0943
579	6,7	57	3,00	0,98	0,0938
591	6,6	63	3,19	1,00	0,0812
591	6,6	63	3,23	1,00	0,0814
596	6,7	66	3,22	1,12	0,0888
596	6,7	66	3,21	1,08	0,0871
633	6,7	70	3,50	1,22	0,0849
633	6,7	68	3,47	1,26	0,0816
636	6,6	68	3,32	1,06	0,0881
636	6,6	65	3,34	1,12	0,0847
639	6,6	67	3,24	1,08	0,0822
639	6,6	70	3,24	1,02	0,0821
642	6,6	75	3,15	1,12	0,0814
642	6,6	73	3,14	1,00	0,0818
644	6,7	65	3,12	1,02	0,0943
644	6,7	68	3,17	1,00	0,0999
LM 1	6,6	65	3,21	1,04	0,0942
LM 1	6,6	63	3,25	1,12	0,0914
LM 2	6,6	67	3,15	1,14	0,0853
LM 2	6,6	64	3,19	1,12	0,0877

(Continuación ANEXO 5)

- **Muestreo N° 2**

Vaca	PH	Termoest. (s)	Prot. Total (%)	Calcio (g/L)	Fósforo (%m/m)
546	6,6	60	3,52	0,98	0,0868
546	6,6	64	3,50	1,00	0,0836
560	6,6	55	3,13	1,04	0,0867
560	6,7	50	3,15	1,06	0,0830
579	6,8	58	3,07	0,98	0,0917
579	6,8	60	3,09	0,98	0,0926
591	6,6	60	3,22	0,98	0,0895
591	6,6	65	3,19	1,00	0,0923
596	6,8	67	3,21	1,00	0,0880
596	6,7	70	3,22	1,02	0,0895
633	6,7	68	3,47	1,16	0,0975
633	6,7	72	3,50	1,14	0,0893
636	6,6	68	3,34	1,02	0,0983
636	6,6	63	3,35	1,06	0,0979
639	6,6	71	3,28	1,02	0,0891
639	6,6	72	3,26	1,04	0,0897
642	6,7	75	3,27	1,02	0,0980
642	6,6	77	3,20	1,06	0,0976
644	6,6	69	3,40	1,00	0,0857
644	6,6	68	3,36	0,98	0,0870
LM 1	6,6	65	3,22	1,02	0,0975
LM 1	6,6	63	3,20	1,02	0,0975
LM 2	6,7	68	3,35	1,12	0,0967
LM 2	6,7	65	3,33	1,02	0,1007

(Continuación ANEXO 5)

- **Muestreo N° 3**

Vaca	PH	Termoest. (s)	Prot. Total (%)	Calcio (g/L)	Fósforo (%m/m)
546	6,6	65	3,46	1,22	0,0865
546	6,6	65	3,49	1,22	0,0843
560	6,8	54	3,02	1,16	0,0898
560	6,7	61	3,04	1,22	0,0924
579	6,7	63	3,17	1,06	0,0870
579	6,7	59	3,19	1,08	0,0841
591	6,6	68	3,13	1,00	0,0888
591	6,6	65	3,12	1,04	0,0939
596	6,6	65	3,24	1,14	0,0880
596	6,6	69	3,23	1,16	0,0900
633	6,7	75	3,35	1,22	0,0968
633	6,6	69	3,35	1,24	0,0947
636	6,6	72	3,34	1,22	0,0872
636	6,6	69	3,34	1,16	0,0893
639	6,6	69	3,19	1,22	0,0874
639	6,7	75	3,18	1,20	0,0889
642	6,6	78	3,57	1,14	0,0983
642	6,5	75	3,59	1,16	0,0980
644	6,5	68	3,38	1,22	0,0873
644	6,6	69	3,39	1,16	0,0899
LM 1	6,7	72	3,26	1,22	0,0975
LM 1	6,7	68	3,34	1,10	0,1009
LM 2	6,7	66	3,29	1,22	0,0979
LM 2	6,6	70	3,27	1,24	0,0973

(Continuación ANEXO 5)

- **Muestreo N° 4**

Vaca	pH	Termoest. (s)	Prot. Total (%)	Calcio (g/L)	Fósforo (%m/m)
546	6,6	65	3,48	1,02	0,0885
546	6,6	69	3,49	1,06	0,0842
560	6,7	59	3,02	1,14	0,0912
560	6,7	55	3,04	1,16	0,0924
579	6,6	57	3,09	1,26	0,0898
579	6,6	60	3,08	1,29	0,0913
591	6,6	65	3,20	1,22	0,0877
591	6,6	62	3,16	1,20	0,0828
596	6,7	69	3,24	1,14	0,0993
596	6,7	68	3,24	1,12	0,0986
633	6,6	68	3,44	1,33	0,0910
633	6,6	75	3,41	1,33	0,0921
636	6,7	67	3,38	1,24	0,0882
636	6,7	70	3,41	1,29	0,0900
639	6,6	72	3,27	1,00	0,0872
639	6,6	69	3,27	1,04	0,0885
642	6,7	75	3,19	1,22	0,0979
642	6,7	72	3,19	1,22	0,0969
644	6,6	65	3,24	1,31	0,0884
644	6,6	69	3,27	1,31	0,0893
LM 1	6,7	64	3,22	1,06	0,0978
LM 1	6,7	69	3,21	1,04	0,0963
LM 2	6,7	75	3,28	1,26	0,0968
LM 2	6,6	69	3,33	1,22	0,0973

ANEXO 6**Ecuaciones obtenidas a partir de las curvas de calibración para la determinación de la masa de fósforo para cada muestreo**

Se confeccionaron cuatro curvas de calibración con el fin de determinar la masa de fósforo en cada una de las muestras analizadas en los diferentes muestreos, a partir del valor de la absorbancia leídas a una longitud de onda de 820nm.

Nº Muestreo	Ecuación	R²
1	$Y = 0,0197X - 0,0461$	0,9878
2	$Y = 0,0188X - 0,0251$	0,9948
3	$Y = 0,0180X - 0,0338$	0,9941
4	$Y = 0,0191X - 0,0241$	0,9948

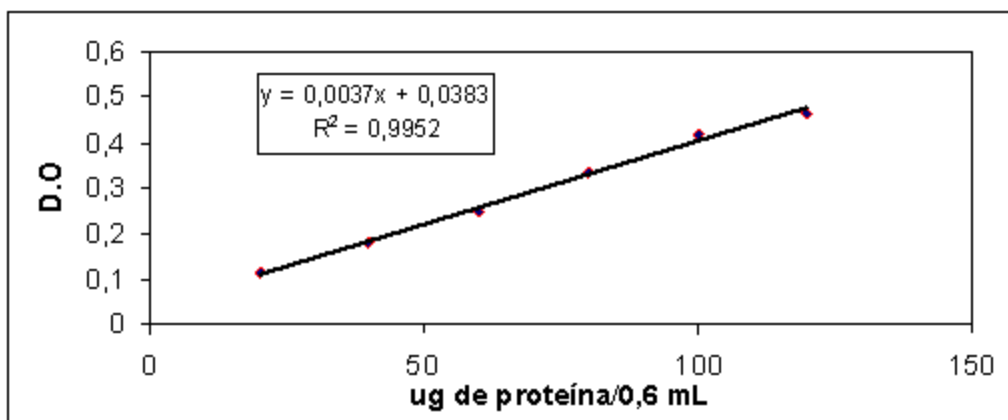
ANEXO 7

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

Se preparó una curva de calibración obteniéndose la siguiente ecuación:

$$Y = 0,0037 X - 0,0383$$

$$R^2 = 0,9952$$



Curva de calibración para la determinación de proteínas para el estudio.

- **Volumen de muestra utilizada para las electroforesis a partir de las preparaciones de k-caseína semipurificadas**

Se determinó el volumen de muestra que se debía utilizar en cada electroforesis. Se extrajo 40 μ L de la solución que contenía la muestra con la proteína total y se disolvió con buffer muestra, completando un volumen de 100 μ L. Luego, se calculó el volumen en el que se encontraban 15 μ g de proteína, encontrándose así el volumen de muestra necesario para realizar cada electroforesis.

(Continuación ANEXO 7)

Vaca	Muestreo	A	B	C	D	E	F	G
546	1	0,192	41,54	69,23	25	1730,86	69,23	22
	2	0,188	40,46	67,43	50	3371,62	134,86	22
	3	0,244	55,59	92,66	50	4632,88	185,32	16
	4	0,196	42,62	71,04	50	3551,80	142,07	21
560	1	0,152	30,73	51,22	50	2560,81	102,43	29
	2	0,135	26,46	43,56	25	1088,96	43,56	34
	3	0,162	33,43	55,72	50	2786,04	111,44	27
	4	0,183	39,11	65,18	50	3259,01	130,36	23
579	1	0,199	43,43	72,39	25	1809,68	72,39	21
	2	0,188	40,46	67,43	50	3371,61	134,86	22
	3	0,324	77,22	128,69	25	3217,34	128,69	12
	4	0,230	51,81	86,35	50	4317,57	172,70	17
591	1	0,288	66,95	111,58	25	2789,41	111,58	13
	2	0,273	63,43	105,72	25	2643,02	105,72	14
	3	0,326	77,76	129,59	25	3239,86	129,59	12
	4	0,449	111,00	185,00	25	4625,00	185,00	8
596	1	0,147	29,383	48,96	50	242695,	97,93	31
	2	0,158	32,35	53,92	50	9548,20	107,84	28
	3	0,174	36,68	61,13	50	3056,31	122,25	25
	4	0,128	24,24	40,41	50	2020,27	80,81	37
633	1	0,198	43,16	71,94	25	1798,42	71,94	21
	2	0,280	65,32	108,87	25	2721,85	108,87	14
	3	0,154	31,27	52,12	50	2605,86	104,23	29
	4	0,302	71,27	118,78	25	2969,59	118,78	13

(Continuación ANEXO 7)

636	1	0,187	40,19	66,98	50	3349,10	133,96	22
	2	0,214	47,49	79,14	50	3957,21	158,29	19
	3	0,198	43,16	71,94	50	3596,85	143,87	21
	4	0,182	38,84	64,73	25	1618,24	64,73	23
639	1	0,194	42,08	70,14	50	3506,76	140,27	21
	2	0,185	39,65	66,08	50	3304,05	132,16	23
	3	0,333	79,65	132,75	25	3318,69	132,75	11
	4	0,121	22,35	37,25	50	1862,61	74,50	40
642	1	0,230	51,81	86,35	50	4317,57	172,70	17
	2	0,225	50,46	84,10	25	2102,48	84,10	18
	3	0,300	70,73	117,88	25	2947,07	117,88	13
	4	0,209	46,14	76,89	25	1922,30	76,89	20
644	1	0,179	38,03	63,38	25	1584,46	63,38	24
	2	0,265	61,27	102,12	25	2552,93	102,12	15
	3	0,336	80,46	134,10	25	3352,48	134,10	11
	4	0,258	59,38	98,96	25	2474,10	98,96	15
LM 1	1	0,193	41,81	69,68	50	3484,23	139,37	22
	2	0,202	44,24	73,74	50	3686,94	147,48	20
	3	0,174	36,68	61,13	50	3056,31	122,25	25
	4	0,156	31,81	53,02	50	2650,90	106,04	28
LM 2	1	0,266	61,54	102,57	25	2564,19	102,57	15
	2	0,238	53,97	89,95	25	2248,87	89,95	17
	3	0,311	73,70	122,84	25	3070,95	122,84	12
	4	0,254	58,30	97,16	25	2429,05	97,16	15

Donde:

A: Absorbancia a 750 nm.

C: μg Proteína/1 mL.E: Proteína total [$(\mu\text{g}/\text{mL}) \times (\text{dilución})$]G: Volumen utilizado en cada electroforesis (μL).B: μg Proteína/0,6 mL.

D: Dilución

F: Proteína en 40 μL (μg).

ANEXO 8

Identificación de variantes genéticas de k-caseína mediante electroforesis de isoenfoque

• **Muestreo N° 1**

N° Muestra	Dist. migración (cm) Muestra	Dist. migración (cm) Estándar k-CN		Variante identificada
		A	B	
546	2,58	2,36 y 2,57	2,52 y 2,69	B
560	2,39	2,36 y 2,57	2,52 y 2,69	A
579	2,48	2,36 y 2,57	2,52 y 2,69	A
591	2,63	2,36 y 2,57	2,52 y 2,69	B
596	2,59	2,36 y 2,57	2,52 y 2,69	B
633	2,60	2,36 y 2,57	2,52 y 2,69	B
639	2,55	2,36 y 2,57	2,52 y 2,69	B
642	2,55	2,36 y 2,57	2,52 y 2,69	B
644	2,70	2,36 y 2,57	2,52 y 2,69	B
LM 1	A/L	3,37 y 3,59	3,47 y 3,67	-
LM 2	N.O	3,37 y 3,59	3,47 y 3,67	-

• **Muestreo N° 2**

N° Muestra	Dist. migración (cm) Muestra	Dist. migración (cm) Estándar k-CN		Variante identificada
		A	B	
546	N.O	3,37 y 3,59	3,47 y 3,67	-
560	3,49	3,37 y 3,59	3,47 y 3,67	A
579	3,44	3,37 y 3,59	3,47 y 3,67	A
591	3,67	3,37 y 3,59	3,47 y 3,67	B
596	3,55	3,37 y 3,59	3,47 y 3,67	B
633	3,69	3,37 y 3,59	3,47 y 3,67	B
639	3,56	3,37 y 3,59	3,47 y 3,67	B
642	3,60	3,30 y 3,45	3,42 y 3,59	B
644	3,55	3,30 y 3,45	3,42 y 3,59	B
LM 1	3,33 y 3,58	3,30 y 3,45	3,42 y 3,59	A y B (difuso)
LM 2	A/L	3,30 y 3,45	3,42 y 3,59	-

N.O: no observado

A/L: accidente de laboratorio

(Continuación ANEXO 8)

- **Muestreo N° 3**

N° Muestra	Dist. migración (cm) Muestra	Dist. migración (cm) Estándar k-CN		Variante identificada
		A	B	
546	3,44	3,30 y 3,45	3,42 y 3,59	B
560	N.O	3,30 y 3,45	3,42 y 3,59	-
579	3,43	3,30 y 3,45	3,42 y 3,59	A
591	3,44	3,30 y 3,45	3,42 y 3,59	B
596	A/L	3,30 y 3,45	3,42 y 3,59	-
633	3,01	2,59 y 2,76	2,69 y 3,00	B
639	2,82	2,59 y 2,76	2,69 y 3,00	B
642	N.O	2,59 y 2,76	2,69 y 3,00	-
644	2,72	2,59 y 2,76	2,69 y 3,00	B
LM 1	N.O	2,59 y 2,76	2,69 y 3,00	-
LM 2	2,73	2,59 y 2,76	2,69 y 3,00	B (difuso)

- **Muestreo N° 4**

N° Muestra	Dist. migración (cm) Muestra	Dist. migración (cm) Estándar k-CN		Variante identificada
		A	B	
546	2,75	2,59 y 2,76	2,69 y 3,00	B
560	2,55	2,59 y 2,76	2,69 y 3,00	A
579	2,63	2,59 y 2,76	2,69 y 3,00	A
591	N.O	2,59 y 2,75	2,93 y 3,02	-
596	2,77	2,59 y 2,75	2,93 y 3,02	B
633	2,92	2,59 y 2,75	2,93 y 3,02	B
639	N.O	2,59 y 2,75	2,93 y 3,02	-
642	2,77	2,59 y 2,75	2,93 y 3,02	B
644	2,98	2,59 y 2,75	2,93 y 3,02	B
LM 1	N.O	2,59 y 2,75	2,93 y 3,02	-
LM 2	A/L	2,59 y 2,75	2,93 y 3,02	-

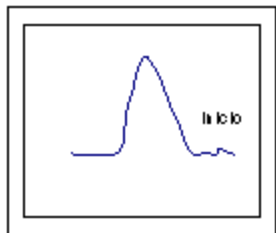
N.O: no observado

A/L: accidente de laboratorio

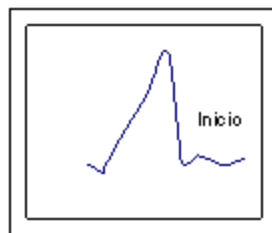
Nota: la medición fue realizada desde el ánodo.

ANEXO 9

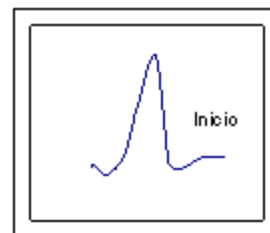
Densitometrías de k-CN para las muestras de leche realizadas por el programa computacional UNSCANIT



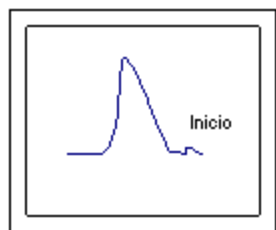
Muestra N° 546



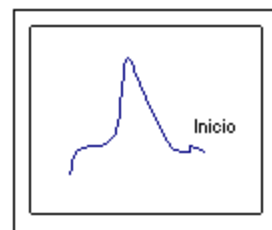
Muestra N° 560



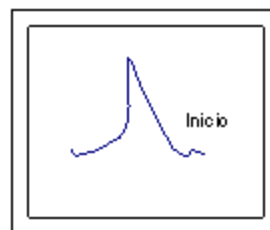
Muestra N° 579



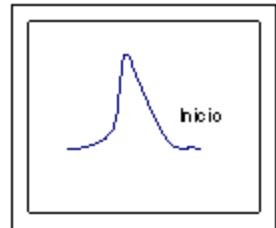
Muestra N° 591



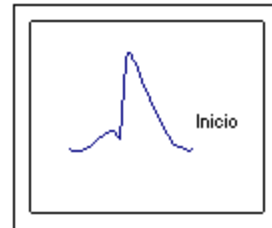
Muestra N° 596



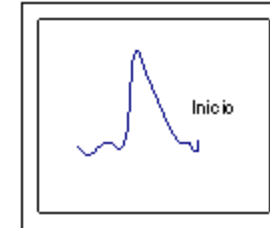
Muestra N° 633



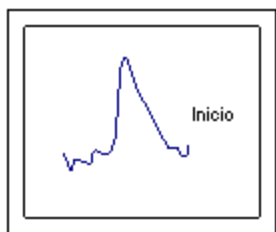
Muestra N° 636



Muestra N° 639



Muestra N° 642



ANEXO 10

Resultados obtenidos de los análisis estadístico

1) Contenido de proteína total

Análisis de varianza para el contenido de proteína total.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Valor p
Efectos principales					
A: Muestreo	0,0299942	3	0,00999805	0,73	0,5375
B: Caseína	0,729873	1	0,729873	53,26	0,0000
Residual	1,02772	75	0,0137029		
Total (corregido)	1,7902	79			

Valor $p < 0,05$ indica que el factor tiene un efecto significativo al 95% de confianza

Test de rango múltiple Tukey 95% para κ -caseína A y B

κ -caseína	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
A	16	3,07375	X
B	64	3,31258	X
Contraste	Diferencia	+/- Limites	
A - B	*0,238829	0,0651626	

* Denota diferencia estadísticamente significativa

(Continuación ANEXO 10)

2) Contenido de calcio

Análisis de varianza para el contenido de calcio.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Valor p
Efectos principales					
A: Muestreo	0,375788	3	0,125263	18,73	0,0000
B: Caseína	0,010245	1	0,010245	1,54	0,2184
Residual	0,498804	75	0,00665072		
Total (corregido)	0,886475	79			

Valor $p < 0,05$ indica que el factor tiene un efecto significativo al 95% de confianza

Test de rango múltiple Tukey 95% para muestreo.

Muestro	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
2	20	1,01951	X
1	19	1,04549	X
3	20	1,14451	X
4	21	1,18458	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
1 - 2	0,0259821	0,0686487
1 - 3	*-0,0990179	0,0686487
1 - 4	*-0,139082	0,0678477
2 - 3	*-0,125	0,0677629
2 - 4	*-0,165064	0,0669513
3 - 4	-0,0400639	0,0669513

* Denota diferencia estadísticamente significativa

(Continuación ANEXO 10)

3) Contenido de fósforo

Análisis de varianza para el contenido de fósforo.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Valor p
Efectos principales					
A: Muestreo	0,000219932	3	0,0000733107	2,79	0,0465
B: Caseína	0,0000116548	1	0,0000116548	53,26	0,5078
Residual	0,00197368	75	0,0000263157		
Total (corregido)	0,00220686	79			

Valor $p < 0,05$ indica que el factor tiene un efecto significativo al 95% de confianza

Test de rango múltiple Tukey 95% para muestreo.

Muestreo	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
1	19	0,0864079	X
3	20	0,0896987	X
4	21	0,0904284	X
2	20	0,0905487	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
1 - 2	-0,00414074	0,00431823
1 - 3	-0,00329074	0,00431823
1 - 4	-0,00402046	0,00426785
2 - 3	0,00085	0,00426251
2 - 4	0,00012028	0,00421146
3 - 4	-0,00072972	0,00421146

* Denota diferencia estadísticamente significativa

(Continuación ANEXO 10)

4) Determinación de estabilidad térmica

Análisis de varianza para termoestabilidad.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Valor p
Efectos principales					
A: Muestreo	61,1633	3	20,3878	1,39	0,2535
B: Caseína	1543,11	1	1543,11	104,94	0,0000
Residual	1102,84	75	14,7045		
Total (corregido)	2712,8	79			

Valor $p < 0,05$ indica que el factor tiene un efecto significativo al 95% de confianza

Test de rango múltiple Tukey 95% para κ -caseína A y B

κ -caseína	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
A	16	57,5	X
B	64	68,4815	X
Contraste	Diferencia		+/- Limites
A – B	*10,9815		2,13461

* Denota diferencia estadísticamente significativa

(Continuación ANEXO 10)

5) producción de leche.

Análisis de varianza para producción de leche.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Valor p
Efectos principales					
A: Muestreo	25,1319	3	8,37731	1,14	0,3495
B: Caseína	5,01389	1	5,01389	0,68	0,4175
Residual	228,431	31	7,36873		
Total (corregido)	258,576	79			

Valor $p < 0,05$ indica que el factor tiene un efecto significativo al 95% de confianza