

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

**Influencia de las Variantes Genéticas A y B de  $\beta$ -Lactoglobulina  
sobre el Contenido de Caseína y Pruebas de Aptitud  
Tecnológica de la Leche. Época de Invierno.**

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

**Beatriz Lorena Leiva Valdés**

VALDIVIA - CHILE

2005

## **PROFESOR PATROCINANTE**

Sra. Luz Haydée Molina C.  
Prof. Biología y Química  
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

## **PROFESORES INFORMANTES**

Sra. Carmen Brito C.  
Ing. en Alimentos, M. Sc. Food Science  
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Sr. Bernardo Carrillo L.  
Ing. Agrónomo, M. Cs. en Ing. en Alimentos  
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

## INDICE DE MATERIA

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Definición y composición de la leche	3
2.2	Factores de variación de la composición química de la leche y producción de leche	5
2.2.1	Factores relacionados con las características del animal	5
2.2.2	Factores relacionados con la alimentación	8
2.3	Proteínas de la leche	10
2.3.1	Caseína	11
2.3.2	Proteínas del suero	12
2.3.3	$\kappa$ -caseína y la $\beta$ -lactoglobulina	12
2.3.3.1	$\kappa$ -caseína	13
2.3.3.2	$\beta$ -lactoglobulina	13
2.4	Coagulación de la leche	13
2.4.1	Coagulación de la leche con cuajo	14
2.4.2	Propiedades de aptitud tecnológica de la leche	15
2.4.2.1	Tiempo de coagulación	15
2.4.2.2	Firmeza del gel	16
2.4.2.3	Sinéresis de la cuajada	16
2.5	El polimorfismo genético de las proteínas de la leche	17

2.6	Relación entre el polimorfismo genético de la $\kappa$ -caseína y $\beta$ - lactoglobulina, contenido de caseína, y las propiedades de aptitud tecnológica de la leche.	19
2.6.1	Polimorfismo genético y contenido de proteínas de la leche	19
2.6.2	Polimorfismo genético y propiedades de coagulación de la leche	21
2.6.3	Polimorfismo genético y rendimiento quesero	22
3	MATERIAL Y MÉTODO	24
3.1	Materiales	24
3.1.1	Obtención de las muestras	24
3.1.2	Muestreo	24
3.2	Metodología	24
3.2.1	Contenido de caseína	24
3.2.2	Determinación de las propiedades tecnológicas	25
3.2.3	Identificación de las variantes genéticas	25
3.2.3.1	Preparación de la muestra para electroforesis	25
3.2.3.2	Cuantificación de las proteínas en las preparaciones de la $\beta$ -lactoglobulina	26
3.2.3.3	Electroforesis de isoenfoque	26
3.2.3.4	Densitometría	26
3.3	Análisis de resultados	26
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	28

4.1	Contenido de caseína en las muestras de leche de vacas Frisón negro, época invierno	28
4.2	Propiedades tecnológicas de las leches	31
4.3	Identificación de las variantes genéticas	37
4.3.1	Electroforesis de isoenfoque	37
4.3.2	Densitometría	39
4.4	Relación entre la presencia de la variante genética A y B de $\beta$ -lactoglobulina con las propiedades de coagulación de la leche y el contenido de caseína	41
5	CONCLUSIONES	46
6	RESUMEN	47
	SUMMARY	48
7	BIBLIOGRAFÍA	49
	ANEXOS	62

## INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición promedio de la leche de vaca	4
2	Porcentaje promedio de proteínas y caseína de leche de distintas razas	11
3	Frecuencia génica de la variante A y B de $\kappa$ -CN y $\beta$ -Ig	18
4	Contenido de proteína total, caseína y número de caseína para distintos fenotipos de $\kappa$ -CN y $\beta$ -Lg	20
5	Relación entre el polimorfismo genético de las proteínas de la leche, contenido de caseína y las propiedades tecnológicas de la leche en la fabricación del queso	23
6	Métodos utilizados para determinar las propiedades de tecnológicas de la leche	25
7	Diseño experimental	26
8	Porcentaje promedio de caseína y número de caseína en las muestras de leche de vacas Frisón negro	30
9	Efecto del mes de muestreo sobre las propiedades tecnológicas de la leche	32
10	Resultados del análisis de varianza aplicado a las propiedades tecnológicas de las vacas Frisón negro estudiadas.	33
11	Resultados promedios de las propiedades de tecnológicas y contenido de caseína obtenidos en la leche de las diez vacas Frisón negro	34

12	Coeficientes de correlación determinados entre contenido de caseína y las pruebas de aptitud tecnológicas en las muestras de leche	36
13	Variantes genéticas obtenidas en las muestras de $\beta$ -Lg en la leche de las vacas Frisón negro	37
14	Proporción de la expresión de las variantes genéticas A y B de $\beta$ -Lg en las vacas en estudio	40
15	Efecto de la variante genética A y B de $\kappa$ -CN y $\beta$ -Lg sobre las propiedades de aptitud a la coagulación de la leche y el contenido de caseína	41
16	Interacción entre el contenido de caseína, las pruebas de coagulación y las variantes genéticas A y B de $\kappa$ -CN y la $\beta$ -Lg. Época de invierno	44

## INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Componentes de la leche	4
2	Contenido promedio de caseína en la leche de las diez vacas en los cuatro muestreos	29
3	Contenido promedio de caseína en la leche de las diez vacas en cada uno de los muestreos	30
4	Aptitud a la coagulación y firmeza del gel (valores promedios) en la leche de las diez vacas estudiadas	34
5	Aptitud a la coagulación y sinéresis de la cuajada (valores promedios) en la leche de las diez vacas estudiadas	35
6	Electroforesis de isoenfoque para $\beta$ -Lg en diez muestras de leche de vaca Frisón negro	38
7	Densitogramas de las variantes A y B de $\beta$ -Lg en las muestras de leche de vacas Frisón negro	39
8	Efecto del fenotipo de $\beta$ -Lg sobre la aptitud a la coagulación y la firmeza del gel	42
9	Efecto del fenotipo de $\beta$ -Lg sobre la sinéresis y el contenido de caseína.	43



## INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Estructura primaria de la $\kappa$ -CN B bovina	63
2	Estructura primaria de la $\beta$ -Lg B bovina	64
3	Características de las vacas en estudio	65
4	Determinación de las propiedades de coagulación	67
5	Preparación de la muestra para electroforesis	68
6	Curva de calibración para determinación de proteínas de acuerdo al método desarrollado por LOWRY <b>et al.</b> (1951)	69
7	Electroforesis de isoenfoque	71
8	Resultados del contenido de caseína y número de caseína en la leche de las diez vacas Frisón negro estudiadas	72
9	Contrastes de varianzas del contenido de caseína y número de caseína de la leche	74
10	Análisis de varianza del contenido de caseína entre muestreos	75
11	Resultados de las propiedades de aptitud a la coagulación en la leche de las diez vacas Frisón negro estudiadas	76
12	Repetibilidad de los métodos de aptitud de coagulación, firmeza del gel y sinéresis de la cuajada	78
13	Contraste de varianzas de la aptitud de coagulación de la leche	80

14	Análisis de varianzas y Tukey al 95%	81
15	Volumen de muestra de la preparaciones de proteínas Utilizado en la electroforesis	83
16	Migración de las variantes A y B de las muestras de $\beta$ - Lg con los estándares en cada corrida de electroforesis en los cuatro muestreos	84
17	Proporción de la expresión de las variantes A y B de $\beta$ -Lg en los cuatro muestreos	85
18	Análisis de varianza multifactorial para las propiedades tecnológicas y el contenido de caseína en las leches estudiadas	87

## 1. INTRODUCCION

Es importante para la industria elaboradora de queso disponer de leche con excelente potencial y mejores propiedades queseras para obtener un producto de calidad.

El rendimiento, composición y estructura del queso son dependientes de la estructura de la cuajada, la cual es determinada durante el proceso de coagulación. Idealmente, la leche utilizada como materia prima para la elaboración de queso debería coagular rápidamente, producir cuajadas firmes con una alta tasa de sinéresis y retener una alta proporción de grasa. Por lo tanto, las más importantes propiedades de la leche con respecto a la elaboración del queso son tiempo de coagulación o aptitud de coagulación, firmeza de la cuajada y tasa de sinéresis.

En todas las proteínas de la leche se ha descrito el polimorfismo genético y en forma especial el de la  $\kappa$ -caseína y la  $\beta$ -lactoglobulina por su influencia en la composición y propiedades de la leche. La  $\kappa$ -caseína y  $\beta$ -lactoglobulina poseen diferentes variantes genéticas, las cuales difieren por solamente una o dos sustituciones de aminoácidos. Las variantes genéticas más comunes de ambas proteínas son la A y B.

Los componentes de la leche de mayor influencia en las propiedades tecnológicas son las proteínas lácteas; la más importante es la caseína seguida por una de las principales proteínas del suero la  $\beta$ -lactoglobulina.

La hipótesis de este estudio es que “la presencia del fenotipo AB o BB de  $\beta$ -Lactoglobulina están asociadas con mejores propiedades de coagulación de la leche y un mayor contenido de caseína”.

El objetivo general de esta investigación es determinar el efecto de las variantes genéticas A y B de  $\beta$ -lactoglobulina sobre las pruebas de aptitud tecnológica y el contenido de caseína de la leche en vacas individuales durante el período de invierno.

Los objetivos específicos de la investigación son los siguientes:

- Cuantificar el contenido de caseína en las muestras de leche.
- Determinar las pruebas de aptitud tecnológica de las muestras de leche es decir tiempo de coagulación, sinéresis y firmeza del gel.
- Identificar las variantes genéticas de la  $\beta$ -lactoglobulina de las muestras en estudio.
- Relacionar las variantes genéticas de  $\beta$ -lactoglobulina con el contenido de caseína y las pruebas de aptitud de coagulación en las muestras del estudio.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

### 2.1 Definición y composición de la leche

La leche es un líquido opaco, dos veces más viscoso que el agua, de color blanco a blanco amarillento: el sabor es algo dulce y el olor es inespecífico (BELITZ y GROSCH, 1997).

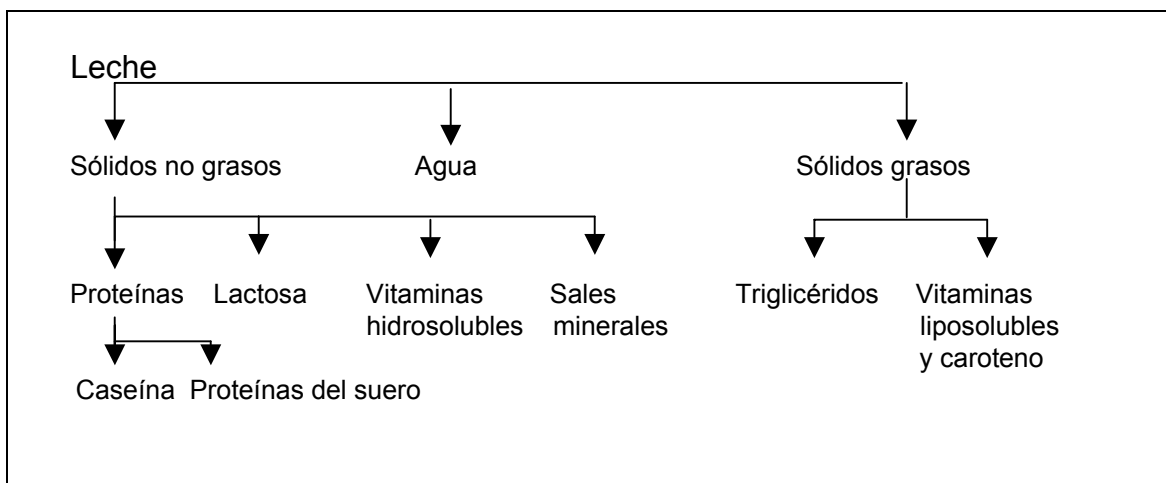
La leche “es el producto de la ordeña completa e interrumpida de vacas sanas, bien alimentadas y en reposo, exenta de calostro”, según el Reglamento Sanitario de los Alimentos (CHILE MINISTERIO DE SALUD, 2000).

Una de las propiedades fundamentales de la leche es la de ser mezcla, tanto física como química. Químicamente es una mezcla de sustancias definidas: lactosa, glicéridos de ácidos grasos, caseínas, albúminas, y otros componentes menores. Desde el punto de vista físico, los diferentes componentes de la leche coexisten en varios estados: emulsión, suspensión y solución (ALAIS, 1985).

La leche es un producto íntegro no adulterado ni alterado y sin calostro, procedente del ordeño higiénico, regular, completo e interrumpido de vacas sanas (CASADO Y GARCÍA, 1985).

La leche es una emulsión de materia grasa, en forma globular, en un líquido que muestra analogía con el plasma sanguíneo, este líquido es asimismo una suspensión de materias proteicas en un suero constituido por una solución neutra que contiene, principalmente, lactosa y sales minerales. Hay por lo tanto, en la leche, cuatro tipos de componentes importantes (ALAIS, 1985).

En la FIGURA 1 de acuerdo a PORTER (1981), los componentes de la leche se pueden agrupar como sólidos no grasos, componentes solubles, en agua y sólidos grasos.



**FIGURA 1. Componentes de la leche.**

FUENTE: PORTER (1981)

En el CUADRO 1, se presenta la composición de los principales componentes de la leche de vaca según diferentes autores.

**CUADRO 1. Composición promedio de la leche de vaca.**

Agua %	Lactosa %	Grasa %	Proteínas %	Minerales %	Autores
87,60	4,70	3,80	3,30	0,70	PORTER (1981)
87,30	4,80	3,70	3,40	0,70	FOX y McSWEENEY (1998)
88,06	4,91	3,53	3,51	S/I	PINTO <b>et al.</b> (1998)*
87,10	4,60	4,00	3,25	0,70	WALSTRA <b>et al.</b> (1999)
87,10	5,00	3,90	3,30	0,70	POTTER y HOT CHKISS (1999)

\*Corresponde a la composición promedio aproximada de la VIII, IX y X regiones de Chile.  
S/I: sin información.

## **2.2 Factores de variación de la composición química de la leche y producción de leche.**

La leche es un fluido biológico muy variable. Además para interespecies diferentes, la leche de cualquier especie particular varía con la individualidad del animal, la raza (en el caso de especies de lechería comercial), salud (mastitis y otras enfermedades), estado nutricional, etapa de lactación, edad, intervalo entre ordeña, entre otros (FOX y McSWEENEY, 1998).

Mahieu, citado por CASADO y GARCÍA (1985); ALAIS (1985) afirman que dentro de los factores de variación en la composición de la leche, el 26% a 36% están ligados al animal y alrededor del 60% se deben al medio ambiente en que se desarrolla el animal. La materia grasa es uno de los componentes que sufre mayor variación debido a la influencia de estos factores. El contenido de proteína también varía aunque en menor proporción que la grasa (CASADO y GARCIA, 1985).

**2.2.1 Factores relacionados con las características del animal:** se mencionan a continuación:

- **Período de lactación.** A continuación del período calostrado, la producción de leche crece gradualmente hasta el segundo mes de lactación, después se mantiene constante y comienza a decrecer en forma progresiva hasta el término de la lactación (NG-KWAI-HANG *et al.*, 1984; NG-KWAI-HANG *et al.*, 1987). En cuanto a la composición química de la leche, la concentración de grasas y proteínas disminuye durante el primer mes de lactación, para luego ir aumentando en forma progresiva. Según ROGERS y STEWART (1982), el porcentaje de proteínas disminuye durante los dos primeros meses para luego aumentar hasta el final de la lactancia. En cambio, De PETERS y FERGUSON (1992), señalan que la disminución del porcentaje

de proteínas ocurre desde la quinta a décima semana de lactancia. En el curso de la lactación la concentración de materia grasa y proteína evolucionan en sentido inverso a la lactosa (CASADO y GARCIA, 1985).

- **Factores genéticos.** Dentro de una misma especie, las diferentes razas producen leches cuya composición varía, aunque dentro de límites reducidos, conservándose constantes ciertos caracteres. En términos generales, son más bien la cantidad de la leche producida y su riqueza global las que varían de una raza a otra y de una manera inversamente proporcional, las leches más ricas provienen de razas cuyo nivel de producción es relativamente bajo ( ALAIS, 1985). En todo caso, las vacas de una misma raza no presentan rendimientos lecheros similares, y la leche producida no tiene la misma composición, ya que la aptitud para la producción de mayor o menor cantidad de leche o de leches con una determinada composición, son caracteres que se transmiten por herencia (VEISSEYRE, 1980). De VEER (1990), también afirma que dentro de cada raza hay una gran variabilidad en cuanto a producción y composición química de la leche, más aún, entre vacas individuales de una misma raza. LATRILLE (1993), señala que la fuente más importante de variación en el contenido de proteína verdadera de la leche es la genética, existiendo diferencias importantes entre razas y dentro de una raza.
- **Número de partos.** Según CASADO y GARCIA (1985), la cantidad de leche producida, así como la materia grasa y sólidos no grasos, aumentan del primer al quinto parto, luego comienzan a disminuir. A medida que aumenta el número de partos, disminuye el contenido de caseína de la leche, sin embargo, el contenido total de proteínas puede no cambiar debido al aumento de las proteínas del suero (LATRILLE, 1993). En cambio Rook y Pyanovskaya, citados por LAVIN (1996), afirman que el contenido total de proteínas no varía a consecuencias del número de partos.



- **Estado sanitario.** El estado de salud influye en la composición de la leche (ALAIS, 1985). Según PORTER (1981), las diferentes enfermedades que pueden presentar las vacas en su periodo de lactancia, también afectan la producción y composición de leche. La mastitis es lejos la más importante enfermedad del ganado para la industria láctea. Haenlein **et al.** citado por CASADO y GARCÍA (1985) y URECH **et al.** (1999), señalan que la mastitis no ejerce una gran variación sobre el contenido total de proteínas pero las distintas fracciones proteicas si se ven afectadas es decir, la  $\alpha$  y  $\beta$ -caseína,  $\alpha$ -lactoalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina disminuyen su proporción, en cambio, las proteínas provenientes de la sangre como la seroalbúmina e inmunoglobulinas aumentan. Un aumento en el contenido de células somáticas en la leche influye negativamente en las propiedades de aptitud de coagulación de la leche, es decir se produce una disminución en la firmeza de la cuajada, un aumento en el tiempo de coagulación y un desuerado lento. Por lo tanto, la presencia de solamente una pequeña proporción de mastitis en un rebaño pueden conducir cambios composicionales en la leche los cuales son perjudiciales para el uso en la elaboración del queso (GRANDISON, 1986). Por tanto, de acuerdo a CASADO y GARCÍA (1982) y CARRILLO (1997), la leche proveniente de vacas con mastitis presenta un menor rendimiento industrial. Según CASADO y GARCIA (1985), el incremento en el tiempo de coagulación y la reducción en la firmeza del gel, puede ser debido al aumento del pH y a la disminución de la actividad del ion calcio, además de una posible solubilización de las caseínas.
- **Ordeño.** Según CASADO y GARCIA (1985), durante el ordeño la composición de la leche varía de la siguiente manera: al comienzo es más rica en proteína, lactosa y sales minerales, pero más pobre en materia grasa que la que se obtiene al final del ordeño. Cuando se ordeña dos veces al día, la producción de leche en la mañana es mayor, aunque más

pobre en grasa que la de la tarde (VEISSEYRE, 1980). Además, según ROGERS y STEWART (1982), las vacas ordeñadas tres a cuatro veces al día tienen una mayor producción de leche que las que son ordeñadas solamente dos veces al día.

- **Período estacional.** Según NG-KWAI-HANG *et al.* (1984), CASADO y GARCIA (1985), uno de los factores que causa la más importante variación es la estacionalidad afectando principalmente sobre los contenidos de materia grasa y proteína, los que aumentan en invierno y disminuyen en época de verano.

La máxima producción de leche se da en la época primavera-verano donde los días son más largos, por consiguiente se tiene un efecto adverso sobre la composición de la leche (disminución en el contenido proteico de la leche); por lo tanto en la época de invierno la vaca se encontrará en la última fase de lactación. En la época otoño-invierno la máxima producción de leche se da en los días de corta duración, favoreciendo el incremento de los componentes de la leche, por lo tanto, cuando se presenten días de larga duración (primavera-verano), la vaca se encontrará en la fase de menor producción lechera, debido a efectos depresores como altas temperaturas en esta época, posibles sequías con efecto en la alimentación de la vaca (CASADO y GARCÍA, 1985). Los animales que son expuestos a altas temperaturas según ASELTINE (1989), presentan una disminución en la producción de leche y en la cantidad de materia grasa, proteína, lactosa y extracto seco total.

**2.2.2 Factores relacionados con la alimentación.** La producción y composición de leche va a depender del tipo de alimentación que tenga el animal. Sin embargo, según VEISSEYRE (1980), no es posible modificar notablemente el contenido de los constituyentes de la leche variando la

alimentación animal.

- ***Mala alimentación y la sobrealimentación.*** En un animal mal alimentado, la producción de leche disminuye. Lo mismo ocurre con el porcentaje de proteína y de lactosa, sin embargo, el contenido de materia grasa aumenta (VEISSEYRE, 1980). Al contrario la sobrealimentación produce un aumento en la producción, al igual que en el contenido de proteínas y del extracto seco magro (CASADO y GARCÍA, 1985). Una subalimentación, lo cual significa un 70% o menos de la ingesta de la energía requerida en la dieta, será la causante de una disminución en la concentración de proteína (CASADO y GARCIA, 1985; LATRILLE, 1993).
- ***Aportes energéticos y aportes proteicos.*** La producción y composición de la leche varía en respuesta a ciertas manipulaciones nutricionales. El contenido de materia grasa es el más influenciado por la dieta del animal, (SUTTON, 1989). Los glúcidos y fibra bruta en la ración aumentan el contenido de materia grasa en la leche; en cuanto al contenido de proteínas se ve aumentado si está presente en la dieta (CASADO y GARCÍA, 1985). CASADO y GARCÍA (1985), De PETERS y FERGUSON (1992), KREUZER **et al.** (1996) y MACKLE **et al.** (1999), afirman que al aumentar el contenido energético de la ración, aumenta el contenido de proteínas en la leche. CASAS (1996), señala que aquellos animales en los que su alimentación es en base a praderas presentan leches con mayor contenido proteico. En la práctica, generalmente una deficiencia energética de la ración base, se corrige con un mayor nivel de concentrado en la ración (LAWRENCE, 1991; LATRILLE, 1993).

Cabe destacar que según Virtanen citado por ALAIS (1985), la vaca puede producir leche de una composición proteica normal, no obstante estar sometida a una alimentación totalmente exenta de proteínas, sin más que urea y sales

amoniacaes asociadas a materias hidrocarbonadas purificadas, vitaminas y sales minerales.

### 2.3 Proteínas de la leche

Las proteínas constituyen la parte más compleja de la leche. Las principales proteínas de la leche se sintetizan en las glándula mamaria a partir de un conjunto de aminoácidos libres (ALAIS, 1985).

Las proteínas de la leche comprenden las caseínas y proteínas del suero (FENNEMA, 1993).

Alrededor del 95% del nitrógeno es proteico, lo que equivale aproximadamente a 35 g. de proteína por kg. de leche (WALSTRA **et al.**, 1999).

El 95% de las proteínas de la leche bovina han sido caracterizadas y clasificadas de acuerdo a sus propiedades bioquímicas. La caseína ha sido la más estudiada y es la proteína de mayor importancia para la industria lechera. Comprende cuatro principales familias de polipéptidas:  $\alpha_{S1}$ -caseína,  $\alpha_{S2}$ -caseína,  $\beta$ -caseína y  $\kappa$ -caseína ( $\kappa$ -CN) representando cerca del 80% del total de las proteínas de la leche (STEWART **et al.**, 1984). El 20% restante corresponde a las dos principales proteínas del suero,  $\alpha$ -lactoalbúmina y  $\beta$ -Lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) (Jenness citado por FELMER y BUTENDIEK, 1998). La composición de proteínas varía dependiendo de las distintas razas bovinas existentes.

En el CUADRO 2 se presenta el porcentaje promedio de proteína total y caseína encontrado en distintas razas según el estudio de De PETERS y FERGUSON (1992).

**CUADRO 2. Porcentaje promedio de proteína y caseína de leche de distintas razas.**

Raza	Proteína cruda %	Proteína verdadera %	Caseína %
<b>Holstein</b>	3,22 ± 0,43	3,07 ± 0,43	2,53 ± 0,40
<b>Jersey</b>	4,22 ± 0,51	4,07 ± 0,49	3,39 ± 0,40
<b>Guernsey</b>	3,70 ± 0,55	3,56 ± 0,53	2,88 ± 0,44
<b>Ayrshire</b>	3,47 ± 0,50	3,30 ± 0,52	2,73 ± 0,43

FUENTE: De PETERS y FERGUSON (1992).

Otra raza bovina de la cual se conoce su aporte proteico es la raza Frisón. Se ha determinado que el contenido de proteína total en la raza Frisón es de alrededor de 3,30% (ROGERS y STEWART, 1982) y de acuerdo AALTONEN y ANTILA (1987) este valor puede alcanzar hasta un 3,39 %.

**2.3.1 Caseína.** La caseína es la principal proteína presente en la leche de bovinos. Está constituida por un grupo de proteínas, que a su vez existen en varias formas moleculares (FELMER y BUTENDIEK, 1998). La caseína pertenece al grupo de las gluco-fosfoproteínas y precipita sólo cuando se acidifica la leche a pH 4,6, por lo que se le ha llamado proteína insoluble de la leche; son además muy estables al calor (BADUI, 1984).

Todas las caseínas forman un complejo esférico singular altamente hidratado, conteniendo fosfato cálcico, denominado micela. Estos complejos varían de tamaño desde 30 a 300 nm de diámetro. Debido a las características anormales de la caseína y del complejo micelar, las proteínas de la leche pueden separarse fácilmente en las fracciones caseína y proteínas del suero (FENNEMA, 1993).

La micela de caseína es una unidad compleja compuesta de muchas unidades

caseínicas constituidas por cadenas de aminoácidos. Una unidad de caseína está formada aproximadamente por el 40% de  $\alpha$ -caseína, el 35% de  $\beta$ -caseína, el 15%  $\kappa$ -CN y el 10% de componentes minoritarios (SCOTT, 1991).

La importancia de la caseína se halla en que determina la estabilidad física de algunos productos lácteos durante el tratamiento térmico y concentración, al mismo tiempo su comportamiento es esencial en las primeras etapas de fabricación de queso (WALSTRA *et al.*, 1999).

**2.3.2 Poteínas del suero.** Las proteínas del lactosuero o proteínas solubles, permanecen en solución cuando se acidifica la leche a pH 4,6 o por coagulación enzimática de las caseínas. Sin embargo, el calentamiento de la leche las desnaturaliza y pierden su solubilidad (ALAIS, 1985).

Le Mens citado por MARTINEZ *et al.* (1993), señala que las proteínas del suero corresponden a las holoproteínas, es decir, no contienen fósforo ni azúcares en su molécula.

Según ALAIS (1985), las proteínas del suero están formadas por la  $\beta$ -Lg,  $\alpha$ -lactoalbúmina, inmunoglobulinas y seroalbúmina.

Los primeros estudios sobre variantes genéticas de las proteínas del suero se han realizado en  $\beta$ -Lg. La  $\beta$ -Lg fue la primera proteína láctea en la que fue descrito el polimorfismo genético (MARTINEZ *et al.*, 1993).

**2.3.3  $\kappa$ - Caseína y  $\beta$ -Lactoglobulina.** La  $\kappa$ - CN constituye un 13 % de las caseínas de la leche. La  $\beta$ -Lg es la proteína más importante del suero de la leche y constituye un 50 % de ésta (ALAIS, 1985).

**2.3.3.1  $\kappa$ -Caseína.** Posee sobre las otras caseínas, un poder estabilizante

frente al calcio. Tiene el papel de “coloide protector”; permite la formación de las micelas estables en presencia de calcio y así, es responsable de que la leche sea líquida. La  $\kappa$ -CN contiene dos restos de cisteína que pueden formar enlaces disulfuros, además contiene glúcidos. (ALAIS, 1985).

Según AMIOT (1991), la  $\kappa$ -CN constituye el sustrato específico de la acción proteolítica del cuajo en la coagulación de la leche.

La molécula de  $\kappa$ -CN contiene un enlace Fen-Met (105-106) muy lábil que constituye el sustrato específico de la quimosina en el curso de la primera fase que precede a la coagulación de la leche. Los productos hidrolíticos son para  $\kappa$ -CN (residuos 1-105) y macropéptido (residuos 106-169). Su estructura primaria consta de 169 aminoácidos y su peso molecular es de 19.000 dalton (ALAIS, 1985).

**2.3.3.2  $\beta$ -Lactoglobulina.** La  $\beta$ -Lg es la seroproteína más abundante. Al pH de la leche se encuentra como un dímero de 2 subunidades monoméricas no unidas covalentemente, que en su estructura primaria contienen 162 residuos de aminoácidos (GONZALEZ de LLANO, 1990).

Según ALAIS (1985), la  $\beta$ -Lg es la proteína más importante del suero, la cual durante el calentamiento forma un complejo con la  $\kappa$ -CN mediante un puente de disulfuro siendo este complejo más estable que sus componentes por separados.

## **2.4 Coagulación de la leche.**

La coagulación de la leche puede ocurrir de dos formas, que constituyen reacciones completamente diferentes: coagulación por acción del cuajo al pH

neutro de la leche y coagulación ácida, que ocurre en el punto isoeléctrico de la caseína (FAO, 1983).

**2.4.1 Coagulación de la leche con cuajo.** Para que esta coagulación se produzca es necesario agregar una enzima proteolítica, la cual actúa sobre la  $\kappa$ -CN. La hidrólisis de la  $\kappa$ -CN y la acción de la quimosina o cuajo, genera una profunda alteración del sistema micelar y provoca como resultado la coagulación de la leche. El sustrato específico de tal acción enzimática es la micela la cual está constituida de subunidades de caseína  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ , más el fosfato coloidal. Como resultado de la acción enzimática la  $\kappa$ -CN pierde su porción terminal fuertemente hidrófila y su propiedad de protector coloidal, por lo cual el sistema micelar se vuelve inestable. Como resultado de la acción enzimática el potencial electrocinético del grado de hidratación de la micela se reduce sensiblemente. Al disminuir la fuerza de repulsión entre las micelas ahora denominadas para- $\kappa$ -caseínas favorece la formación de una red intermicelar como resultado de la unión de estas con los iones de calcio, lo que lleva a la formación del gel (MARIANI y SUMMER, 1999).

En relación al párrafo anterior se han descrito tres reacciones en la coagulación enzimática de la leche: reacción primaria, reacción secundaria y proteólisis general. En la segunda fase comienza la sinéresis, es decir la contracción de la red regular formada por las proteínas coaguladas que contiene los glóbulos grasos y el suero, con expulsión progresiva de este último (ALAIS, 1985).

Durante la fabricación de queso, la coagulación es una etapa fundamental que determina las propiedades de la cuajada y las principales características del queso (ALAIS, 1985).

Las propiedades de la leche más importantes durante la elaboración del queso son: aptitud a la coagulación, firmeza y sinéresis de la cuajada (GRANDISON,



1986; PUHAN y JAKOB, 1993).

Es necesario considerar que previo a la coagulación, al calentar la leche la  $\kappa$ -CN y la  $\beta$ -Lg forman un complejo menos sensible a la acción del cuajo que la  $\kappa$ -CN original, prolongándose de esta manera el tiempo de coagulación y se obtienen cuajadas más blandas que desueran más lentamente (SCOTT, 1991).

**2.4.2 Propiedades de la aptitud tecnológica de la leche.** La estructura de la cuajada o gel se determina durante el proceso de coagulación de la leche y tiene directa relación con el rendimiento, composición y estructura del queso.

Las propiedades de coagulación son influenciadas por muchos factores de composición de la leche, y métodos de elaboración del queso. La leche para la elaboración de queso debería coagular rápidamente, producir cuajadas firmes, con un adecuado desuerado y retener una alta proporción de grasa (STORRY *et al.*, 1982; OKIGBO *et al.*, 1985; GRANDISON, 1986; MACHEBOEUF *et al.*, 1993 e IKONEN *et al.*, 1999).

**2.4.2.1 Tiempo de coagulación.** Un factor determinante en la elaboración de queso es la aptitud o habilidad de la leche para coagular, la cual depende principalmente de la composición de la leche (MACHEBOEUF, 1993).

Las leches que poseen una alta aptitud a la coagulación presentan contenidos mayores de proteína que aquellas leches que tienen baja aptitud a la coagulación (STORRY *et al.*, 1982).

STORRY *et al.* (1982), señala que las leches que presentan una mejor aptitud a la coagulación (coagulan rápidamente), poseen un mayor contenido de proteína total y además se debe considerar otro parámetro que es el contenido de calcio en la leche, ya que un alto contenido de este mineral mejora esta

propiedad.

Según MARSHALL (1982) y STORRY y FORD (1982), si el contenido de calcio en la leche es bajo, las propiedades de aptitud a la coagulación de la leche se ven alteradas es decir, se obtienen tiempos largos de coagulación y cuajadas blandas.

**2.4.2.2 Firmeza del gel.** La firmeza de la cuajada depende del contenido total de proteínas, caseínas en la leche y de las concentraciones de sales minerales (GRANDISON *et al.*, 1984 y GUINEE *et al.*, 1997).

La firmeza de la cuajada también depende de la aptitud a la coagulación presente en la leche, es decir una leche de coagulación rápida originará cuajadas firmes y viceversa (GRANDISON *et al.*, 1984; GUINEE *et al.*, 1997 y WALSTRA *et al.*, 1999).

Se han determinado correlaciones significativas y altas (0,851 - 0,926) entre la firmeza de la cuajada y el contenido total de caseínas, es decir a medida que la leche presenta un mayor contenido de caseínas la cuajada formada es mas firme (Jaraim *et al.*, citado por STORRY *et al.*, 1982).

**2.4.2.3 Sinéresis de la cuajada.** La sinéresis se produce como resultado de la contracción del coágulo obtenido durante la formación de la cuajada, la cual está relacionada directamente con el contenido de proteínas, caseínas y calcio de igual forma que las otras propiedades (MARSHALL, 1982).

Ambas propiedades firmeza y sinéresis de la cuajada, son consideradas como fundamentales en la elaboración de queso, así que la leche que presenta una baja aptitud a la coagulación, presenta cuajadas blandas y una sinéresis pobre o desuerado incompleto (WALSTRA *et al.*, 1999).

## 2.5 El polimorfismo genético de las proteínas de la leche

EL estudio del polimorfismo genético de las proteínas permite obtener nuevas explicaciones en las variaciones de las propiedades de la leche de vacas individuales (PUHAN y JAKOB, 1993).

Las variantes genéticas difieren una de la otra por solamente unas pocas sustituciones de aminoácidos (BARANY **et al.**, 1993). La existencia de estas variantes para una misma proteína, dentro de una misma población se conoce como polimorfismo (LEHNINGER y NELSON, 1995).

Las variantes genéticas se indican por letras como A, B, C, D, pudiendo existir individuos homocigotos y heterocigotos, los que pueden presentar una variante AA, BB o una mezcla de ellas es decir AB, AC, BC (ALAIS, 1985).

Las variantes genéticas no aparecen aleatoriamente ni con igual frecuencia, aún cuando algunas son variantes universales, otras son exclusivas de ciertas razas (GONZALEZ de LLANO, 1990).

La variante A  $\kappa$ -CN difiere de la B por sustitución de la treonina por isoleucina en la posición 136 y en ácido aspártico por alanina en la posición 148 (VEGARUD **et al.**, 1989). La variante A de la  $\beta$ -Lg difiere de la B en que la posición 64 que corresponde al ácido aspártico es sustituida por glicina y la valina por alanina en la posición 118 (Jamienson **et al.**, citado por RODELLAR **et al.**, 1992).

La identificación del polimorfismo de la proteína de la leche ha sido obtenida mayormente por electroforesis de isoenfoque en geles de almidón, de poliacrilamida o geles de agarosa (VEGARUD **et al.**, 1989).

Los ANEXOS 1 y 2, presentan las estructuras primarias de la  $\kappa$ -CN B y de la  $\beta$ -Lg B, los sitios subrayados corresponden a las diferencias mutacionales con la variante A en ambas proteínas.

Las variantes genéticas de las proteínas lácteas tienen importantes efectos en la composición de la leche y sus derivados (Grosclaude citado por RODELLAR *et al.*, 1992).

En el CUADRO 3 se pueden observar las frecuencias génicas más comunes (A y B) de la  $\kappa$ -CN y  $\beta$ -Lg en distintas razas respectivamente.

**CUADRO 3. Frecuencia génica de la variante A y B de  $\kappa$ -CN y  $\beta$ -Lg.**

Raza	Frecuencia génica			
	$\kappa$ -CN		$\beta$ -Lg	
	A	B	A	B
Frison (US)	0,850 <sup>1</sup>	0,150 <sup>1</sup>	0,500 <sup>1</sup>	0,500 <sup>1</sup>
Holstein-Friesian (US) <sup>2</sup>	0,750 <sup>2</sup>	0,250 <sup>2</sup>	-	-
Friesian (NZ) <sup>3</sup>	0,826 <sup>3</sup>	0,174 <sup>3</sup>	0,487 <sup>3</sup>	0,513 <sup>3</sup>
Holstein (USA)	0,890 <sup>4</sup>	0,110 <sup>4</sup>	0,500 <sup>2</sup>	0,500 <sup>2</sup>
Frisón negro chileno <sup>4</sup>	0,820	0,180	-	-

FUENTE: <sup>1</sup> Aschaffenburg citado por ALAIS (1985); <sup>2</sup> GONZALEZ de LLANO (1990); <sup>3</sup> WINKELMAN y WICKHAM (1997); <sup>4</sup> FELMER y BUTENDIEK (1998).

WINKELMAN y WICKMAN (1997), estudiaron las variantes genéticas de las proteínas lácteas en ganado lechero Neozelandés y determinaron que la variante A de  $\kappa$ -CN predomina sobre el alelo B, y este es encontrado con mayor frecuencia en la raza Friesian. Además, encontraron que la variante B de la  $\beta$ -Lg predominaba sobre la variante A, presentándose con mayor frecuencia en la raza Ayrshire.

BARANY *et al.* (1997), trabajaron con ganado lechero húngaro y reportaron que

existía predominancia de la variante A para  $\kappa$ -CN y la variante B para  $\beta$ -Lg en la mayoría de las razas estudiadas. La excepción fue la raza Friesian en la que se encontró un ligero predominio de la variante B de  $\kappa$ -CN.

## **2.6 Relación entre el polimorfismo genético de la $\kappa$ -caseína y $\beta$ -lactoglobulina, contenido de caseína, y las propiedades de aptitud tecnológica de la leche.**

En los últimos años se ha estudiado la influencia que tienen las variantes genéticas, en las características físico-químicas y en los beneficios que pueda presentar en propiedades tecnológicas de la leche (HORNE *et al.*, 1997).

**2.6.1 Polimorfismo genético y contenido de proteínas de la leche.** Las leches de vacas con  $\kappa$ -CN fenotipo BB, tienen 0,07 % y 0,10 % más de proteína y caseína respectivamente, que leche con fenotipo AA, además el número de caseína también se ve favorecido por este fenotipo (GONYON *et al.*, 1987; ALEANDRY *et al.*, 1990; BOVENHIUS *et al.*, 1992).

En estudios de 174 vacas Fleckvieh españolas, se encontraron que la leche de fenotipo AB para  $\kappa$ -CN tiene un contenido más alto de proteína que leches con fenotipo AA (AMIGO *et al.*, 2001).

JAKOB (1994), señala que las mejores propiedades de coagulación en leche con  $\kappa$ -CN BB se deben principalmente a un alto contenido de  $\kappa$ -CN y en general de todas las caseínas. RAMOS y AMIGO (1996), asocia a la variante B de  $\kappa$ -CN con un mayor contenido de proteínas.

Van den Berg y Reichardt citados por NG-KWAI HANG (1997), señalan que contenidos más elevados de caseína se encuentran en leches de vacas con  $\beta$ -

Lg BB.

Según PEREZ **et al.** (1998), se ha señalado que la combinación de las variantes A de  $\kappa$ -CN y  $\beta$ -Lg mejoran la producción de leche, mientras que la variante B de las mismas proteínas serían favorables para el contenido de caseínas, propiedades de coagulación y rendimientos en quesos.

Autores como DELACROX - BUCHET **et al.** (1993) y MARIANI **et al.** (1995), determinaron contenidos más altos de caseínas en leches provenientes de vacas con fenotipo BB de  $\kappa$ -CN y  $\beta$ -Lg.

La combinación de la variante B de las proteínas  $\kappa$ -CN y  $\beta$ -Lg mejoran el contenido de caseína de la leche, las propiedades de coagulación y el rendimiento en la elaboración de queso (VAN EENENNAAM y MEDRANO, 1991).

En el CUADRO 4 se presentan valores promedios de proteína, caseína y N° de caseína de los fenotipos AA, AB y BB de  $\kappa$ -CN y  $\beta$ -Lg en vacas Holstein-Friesian determinados por NG KWAI HANG **et al.** (1986) y JAKOB y PUHAN (1995).

**CUADRO 4. Contenido de proteína total, caseína y N° de caseína para distintos fenotipos de  $\kappa$ -CN y  $\beta$ -Lg.**

Fenotipo	% Proteína total		% Caseína		N° Caseína	
	$\kappa$ -CN <sup>1</sup>	$\beta$ -Lg <sup>2</sup>	$\kappa$ -CN <sup>1</sup>	$\beta$ -Lg <sup>2</sup>	$\kappa$ -CN <sup>1</sup>	$\beta$ -Lg <sup>2</sup>
<b>AA</b>	3,37	3,41	2,65	2,66	78,91	77,95
<b>AB</b>	3,37	3,41	2,67	2,71	79,32	79,46
<b>BB</b>	3,44	3,37	2,75	2,72	80,06	80,86

FUENTE: <sup>1</sup> NG KWAI HANG **et al.** (1986); <sup>2</sup> JAKOB y PUHAN (1995).

En este cuadro se observa que la presencia del fenotipo BB en ambas proteínas ( $\kappa$ -CN y  $\beta$ -Lg) indica un aumento en el porcentaje de caseína y en el N° de caseína.

### **2.6.2 Polimorfismo genético y propiedades de coagulación de la leche.**

Según PUHAN y JAKOB (1993), la leche con micelas de caseína más pequeñas coagulan más rápido y resulta en un gel más firme. También ha sido reportado que la leche  $\kappa$ -CN BB contiene un 40% más de micelas pequeñas en comparación con leche  $\kappa$ -CN AA. Esta debe ser una de las razones porque la leche con  $\kappa$ -CN B muestra mejores propiedades de coagulación.

SHAAR **et al.** (1985), encontraron que el tiempo de coagulación era bastante reducido en leches que contienen  $\kappa$ -CN B.

SCHAAR (1984), FITZGERALD y HILL (1997), HORNE **et al.** (1997), señalan que la  $\kappa$ -CN B tiene un efecto favorable en las propiedades de coagulación de la leche, por ejemplo menor tiempo de coagulación y una cuajada más firme.

Las variantes B y AB de la  $\kappa$ -CN están asociadas con cortos tiempos de coagulación y cuajadas más firmes que la variante A (SHAAR, 1984). En muchos casos la leche  $\kappa$ -CN AA produce un gel débil húmedo, a diferencia de aquellos producidos con  $\kappa$ -CN BB, que son más firmes y más consistentes (HORNE **et al.**, 1996).

La leche de vaca  $\kappa$ -CN BB tiene un tiempo de coagulación menor y una formación del gel más firme que la leche con  $\kappa$ -CN AA (MACHEBOEUF **et al.**, 1993 y IKONEN **et al.**, 1999). Macheboeuf **et al.** citados por CREAMER y HARRIS (1997), determinaron que leches con  $\kappa$ -CN BB tienen un tiempo de coagulación más corto y una mayor firmeza del gel que la  $\kappa$ -CN AA, ubicando el

fenotipo AB en una posición intermedia.

Se ha observado que en los productos elaborados con leche  $\kappa$ -CN BB se produce una menor separación del suero (MUIR **et al.**, 1997). En sus estudios MACHEBOEUF **et al.** (1993), encontraron menor drenaje del suero en leche que poseía la variante B de  $\kappa$ -CN, y lo relacionaron con la más baja proporción de grasa/proteína de esta leche, debido a que la retención de agua en la cuajada aumentó cuando esta proporción disminuyó.

La leche que contiene la variante B de la  $\beta$ -Lg da cuajadas más firmes que la que contiene la variante A (GRANDISON, 1986).

La leche cruda y pasteurizada con  $\beta$ -Lg BB produce una cuajada más rápida que leche con  $\beta$ -Lg AA. En cambio en el caso de la sinéresis, se produce mayor drenaje con  $\beta$ -Lg AA que con  $\beta$ -Lg BB (Bo y Pitotti citados por FITZGERALD y HILL, 1997).

La leche que contiene la variante B de  $\kappa$ -CN y  $\beta$ -Lg produce una cuajada más firme que la que contiene la variante A (TONG **et al.**, 1993). Al estudiar la influencia de la variante A y B de  $\kappa$ -CN y  $\beta$ -Lg sobre la sinéresis de la cuajada, se determinó que las leches con  $\kappa$ -CN B presentaron mayor drenaje y las con  $\beta$ -Lg B el menor drenaje (McLEAN y SCHAAR, 1989).

**2.6.3 Polimorfismo genético y rendimiento quesero.** El uso de leche que contiene la variante B de  $\kappa$ -CN para la fabricación de quesos Parmesanos y Cheddar producen alrededor de un 5% más de queso respectivamente, comparado con leche que contienen la variante A de  $\kappa$ -CN. El mejor fenotipo de la  $\beta$ -Lg para la elaboración del queso parece ser el BB; la razón principal se debe a que presenta el más alto contenido de grasa y contenido de caseína,



puesto que estos son los dos mayores constituyentes de la leche que influyen en el rendimiento del queso. La firmeza del gel producido por la leche con  $\beta$ -Lg BB puede también ser parcialmente responsable por los altos rendimientos de esta leche, puesto que un gel más firme está asociado a un aumento en el rendimiento del queso (TONG *et al.*, 1993).

En el CUADRO 5 se presenta la influencia de las variantes genéticas de las proteínas de la leche sobre el contenido de caseína, aptitud a la coagulación y rendimiento quesero (PUHAN y JAKOB, 1993).

**CUADRO 5. Relación entre el polimorfismo genético de las proteínas de la leche, contenido de caseína y las propiedades tecnológicas de la leche en la fabricación del queso.**

Proteínas	Variantes Genéticas			
	A	B	C	E
<b><math>\kappa</math>-caseína</b>				
Contenido de proteína	=	Más alto		
Número de caseína	=	Más alto		
Tiempo de coagulación	=	Más corto	Como A	
Sinéresis	=	Más rápida		
Firmeza de la cuajada	=	Más firme	Como A	
Rendimiento del queso	=	Más alto		
<b><math>\beta</math>-lactoglobulina</b>				
Contenido de caseína	=	Más alto		
Contenido de proteína del suero	=	Más bajo		
Contenido de caseína	=	Más alto		
Firmeza de la cuajada	=	Más alto		
Rendimiento del queso	=	Más alto		

FUENTE: PUHAN y JAKOB, 1993

= No hay cambio en las propiedades de aptitud de coagulación ni en proteínas de la leche.

### 3. MATERIAL Y METODO

#### 3.1 Materiales

**3.1.1 Obtención de las muestras.** Las muestras de leche fueron obtenidas de 10 vacas de raza Frisón Negro de acuerdo a la Norma Chilena 1011/1 (CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACION, 1998).

Las vacas estudiadas provienen del predio Santa Rosa de la Universidad Austral de Chile ubicado a la salida Norte de la ciudad de Valdivia.

**3.1.2 Muestreo.** Las vacas fueron seleccionadas en estudios anteriores en base a características semejantes como: raza, % de Holsteinización, edad, N° de lactancias, época de parto, libre de mastitis y tipo de alimentación. Para verificar la alimentación se realizó una encuesta periódicamente. Estos antecedentes generales y la alimentación entregada diariamente se encuentran en el ANEXO 3.

Se realizaron cuatro muestreos durante los meses: junio, julio, agosto y septiembre del 2002, época invierno. Cada muestreo se dividió a su vez en dos sub-muestreos de 5 vacas elegidas al azar.

#### 3.2 Metodología

Los análisis de las muestras de leche se realizaron en duplicado.

**3.2.1 Contenido de caseína.** Para determinar las caseínas en las muestras de

leche, primero se tuvo que proceder a determinar la proteína total según el método semi micro Kjeldahl IDF/FIL 20B:1993, análisis realizado en forma paralela por CID (2004). Luego se separó el suero de las caseínas en la muestra de leche según McGANN **et al.** citado por PINTO **et al.** (1998). En el suero obtenido se determinó el Nitrógeno No Caseínico por el método semi micro Kjeldahl IDF/FIL 20B:1993. El Cálculo del Nitrógeno Caseínico se realizó mediante la fórmula:

$$\text{Nitrógeno Caseínico: Nitrógeno}_{\text{TOTAL}} - \text{Nitrógeno}_{\text{NO CASEÍNICO}}$$

**3.2.2 Determinación de las propiedades tecnológicas.** Para determinar las propiedades tecnológicas en las muestras de leche se realizaron los siguientes análisis representados en el CUADRO 6 (ANEXO 4).

**CUADRO 6. Métodos utilizados para determinar las propiedades tecnológicas de la leche.**

Propiedades de coagulación	Método
Aptitud a la coagulación	Por fuerza del cuajo modificado sin adición de CaCl <sub>2</sub> , ALAIS (1985) y CORTES (2001).
Firmeza de la cuajada	Mediante el uso del equipo INSTRON 1011, según STORRY y FORD (1982) (Modificado según CORTES (2001).
Sinéresis del gel	Según el método de MARSHALL (1982).

**3.2.3 Identificación de las variantes genéticas.** La identificación de las variantes genéticas para  $\beta$ -lactoglobulina en las muestras de leche se realizó por electroforesis de isoenfoque.

**3.2.3.1 Preparación de la muestra para electroforesis.** La preparación de

las muestras de  $\beta$ -Lg se realizó según LOWE *et al.* (1995), (ANEXO 5).

**3.2.3.2 Cuantificación de las proteínas en las preparaciones de  $\beta$ -lactoglobulina.** Se determinó el contenido de proteína en el extracto  $\beta$ -Lg, con la ayuda de una curva de calibración de acuerdo el método descrito por LOWRY *et al.* (1951) (ANEXO 6).

**3.2.3.3 Electroforesis de isoenfoque.** Se realizó según la técnica descrita por PEARCE *et al.* (1972) y ADDEO *et al.* (1983) modificado por CASANOVA (2001) (ANEXO 7).

**3.2.3.4 Densitometría.** La densitometría de las bandas teñidas para ambas proteínas se realizó mediante el uso del programa computacional UN-SCAN-IT GEL.

**3.3 Análisis de resultados.** Los resultados obtenidos fueron sometidos a un diseño experimental como indica el CUADRO 7.

**CUADRO 7. Diseño experimental.**

Muestras	Factores		Respuestas
	Muestreo	Variantes de proteínas	
1	Junio	$\beta$ - lactoglobulina	A
2			B
3			A
4			
5	Julio	$\beta$ - lactoglobulina	B
6			
7	Agosto	$\beta$ - lactoglobulina	A
8			B
9			A
10			
	Septiembre		

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante comparación de promedios, análisis de varianza multifactorial (ANDEVA) con un 95 % nivel de confianza, prueba de Tukey y análisis de correlaciones utilizando el software computacional Statgraphics Plus 2.0, con el propósito de determinar si los meses de muestreos, las variantes de  $\beta$ - lactoglobulina influyen sobre las pruebas de aptitud tecnológicas y el contenido de caseína de la leche.

## 4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

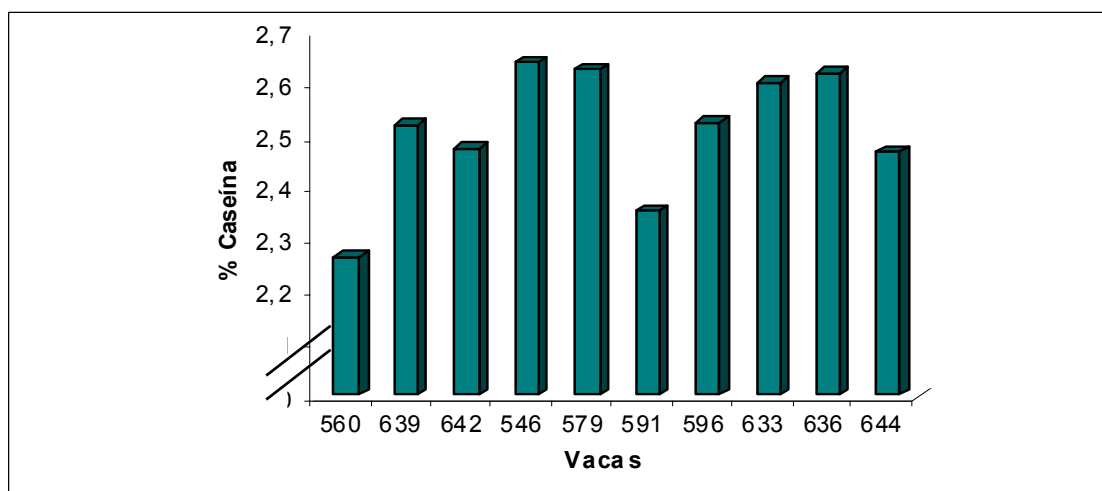
### 4.1 Contenido de caseína en las muestras de leche de vacas frisón negro, época invierno.

El contenido de caseína obtenido en la leche de las diez vacas en estudio fue de un  $2,51 \pm 0,14\%$ , valor algo mayor comparado con los valores obtenidos por KRAMM (2003), en la leche de las mismas vacas pero en época primavera-verano, el cual fue un  $2,36 \pm 0,16 \%$ . También este resultado es mayor que el encontrado por los autores McLEAN *et al.* (1984), en 238 vacas Holstein-Friesian que fue de  $2,39 \pm 0,12\%$ . Pero CERBULIS y FARRELL (1975), encontraron que el porcentaje promedio de caseína en muestras individuales es de  $2,89 \%$ , pudiendo haber variaciones que fluctúan entre un  $2,53\%$  para Holstein hasta  $3,39\%$  para Jersey, valores que se acercan a los obtenidos en este estudio.

En el ANEXO 8 se encuentran los resultados del contenido de caseína de las diez vacas Frisón negro estudiadas. La explicación probable del mayor contenido de caseína en la época invierno se debería a los factores de etapa de lactancia, estacionalidad y alimentación. Estas vacas se encontraban en su segunda lactancia, en época de invierno y con un régimen de alimentación homogénea a base de ensilaje de pradera permanente, melazán, concentrado de suralin, sales minerales y pradera. Por lo tanto, según NG-KWAI-HANG *et al.* (1984), CASADO y GARCIA (1985), los contenidos de materia grasa y proteína aumentan en invierno y disminuyen en época de verano. Con respecto a la lactancia CASADO y GARCIA (1985), afirman que la materia grasa y sólidos no grasos, aumentan desde la primera a la quinta lactancia, luego

comienzan a disminuir. Además, CASADO y GARCIA (1985), De PETERS y FERGUSON (1992), KREUSER *et al.* (1996) y MACKLE *et al.* (1999), señalan que al aumentar el contenido energético en la ración y al estar la proteína presente en la dieta aumenta el contenido de proteínas en la leche.

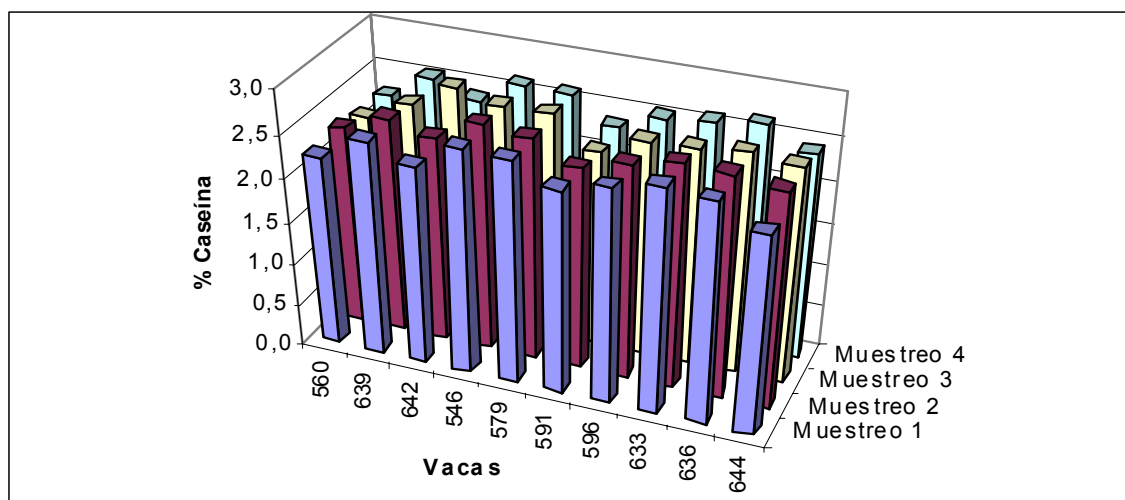
En la FIGURA 2, se observa que la leche de las vacas 546, 579, 636 y 633 presentaron el mayor contenido de caseína para los cuatro muestreos con un valor promedio de  $2,64 \pm 0,01\%$ ,  $2,63 \pm 0,01\%$ ,  $2,62 \pm 0,03$  y  $2,60 \pm 0,05$  respectivamente. Cabe destacar que estas vacas no difieren del resto, ya que todas fueron seleccionadas en base a características semejantes.



**FIGURA 2. Contenido promedio de caseína en la leche de las diez vacas en los cuatro muestreos.**

A continuación en la FIGURA 3, se observa una comparación de los valores de caseína para cada vaca en cada uno de los muestreos, donde no se visualiza diferencia entre los muestreos. Antes de aplicar análisis de varianza se realizó un análisis de contraste de varianzas en el contenido de caseína en los cuatro muestreos de las vacas estudiadas, el cual determinó que las varianzas son homogéneas con un 95 % nivel de confianza (ANEXO 9). El análisis de varianza indicó que no existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ), para el contenido

de caseínas para las diez vacas en los cuatro muestreos realizados (ANEXO 10).



**FIGURA 3. Contenido promedio de caseína en la leche de las diez vacas en cada uno de los muestreos.**

En el CUADRO 8 se presentan los promedios de contenido de caseína y N° de caseína de cada una de las vacas de cuatro muestreos.

**CUADRO 8. Porcentaje promedio de caseína y N° de caseína en las muestras de leche de vacas Frisón negro.**

Vacas	% caseína Prom. $\pm$ D. E.	N° de caseína $\pm$ D. E.
546	2,64 $\pm$ 0,02	75,76 $\pm$ 0,07
560	2,27 $\pm$ 0,05	74,07 $\pm$ 0,36
579	2,63 $\pm$ 0,02	78,83 $\pm$ 0,42
591	2,36 $\pm$ 0,04	74,11 $\pm$ 0,27
596	2,53 $\pm$ 0,01	78,29 $\pm$ 0,09
633	2,60 $\pm$ 0,05	75,75 $\pm$ 0,22
636	2,62 $\pm$ 0,03	78,14 $\pm$ 0,23
639	2,52 $\pm$ 0,03	77,82 $\pm$ 0,17
642	2,47 $\pm$ 0,18	75,25 $\pm$ 1,05
644	2,47 $\pm$ 0,10	74,99 $\pm$ 0,47
<b>Promedio</b>	<b>2,51 <math>\pm</math> 0,14</b>	<b>76,30 <math>\pm</math> 0,34</b>

D. E.: Desviación estándar



Para el número de caseína también se aplicó contraste de varianzas y se obtuvo que las varianzas son homogéneas con un 95 % nivel de confianza.

El promedio del N° de caseína para estas diez vacas fue de  $76,30 \pm 0,34\%$ , lo que es similar a lo encontrado por KRAMM (2003), que determinó en su estudio utilizando las mismas vacas pero en época primavera-verano, un promedio del N° de caseína igual a  $76,44 \pm 1,56 \%$ . Además, este resultado concuerda con lo señalado por ALAIS (1985), CASADO y GARCÍA (1985), BADUI (1984) y AMIOT (1991), quienes mencionan que la caseína representa aproximadamente el 78% de la proteína total.

CERBULIS y FARRELL (1975), señalan con respecto al N° de caseína un valor promedio de 77,9 con variaciones entre 64,3 y 83,7. Además, indican que para leche de una misma raza, es factible encontrar distintos números de caseína.

#### **4.2 Propiedades tecnológicas de las leches.**

En el ANEXO 11 se encuentran los valores obtenidos en las propiedades tecnológicas en las leches estudiadas.

Se determinó la repetibilidad de los métodos de aptitud a la coagulación, firmeza de la cuajada y sinéresis del gel, ANEXO 12. La repetibilidad de un método indica la diferencia entre los resultados de dos determinaciones sobre la misma muestra efectuados simultáneamente por el mismo analista. La aptitud a la coagulación obtuvo una repetibilidad igual a 1:1980 (g cuajo / mL leche), lo que en tiempo equivale a 30,3 segundos. La repetibilidad de la firmeza del gel y de la sinéresis de la cuajada fue de 0,60 gf y 0,55 mL respectivamente.

Para las propiedades tecnológicas estudiadas se realizó contraste de

varianzas, obteniéndose como resultado en los tres casos por igual que no existen diferencias significativas en sus varianzas en los cuatro muestreos con 95 % nivel de confianza. En el ANEXO 13 se puede observar los análisis de contraste de varianza aplicados a cada una de las propiedades tecnológicas estudiadas.

El CUADRO 9 presenta los resultados del análisis de varianza multifactorial, el cual indicó que el mes de muestreo no tuvo efecto sobre las propiedades tecnológicas de las leches.

**CUADRO 9. Efecto del mes de muestreo sobre las propiedades tecnológicas.**

<b>Factores (mes de muestreo)</b>	<b>N</b>	<b>Aptitud a la coagulación (mL leche/g cuajo)</b>	<b>Efecto</b>
Junio	20	16.754,7± 8.823,87	NS
Julio	20	16.782,4 ± 8.917,37	
Agosto	20	16.755,0 ± 8.831,1	
Septiembre	20	16.845,5 ± 8.911,27	
		<b>Firmeza del gel (gf)</b>	NS
Junio	20	8,95 ± 1,52	
Julio	20	8,91 ± 1,49	
Agosto	20	8,94 ± 1,55	
Septiembre	20	8,92 ± 1,51	
		<b>Sinéresis de la cuajada (mL)</b>	NS
Junio	20	8,69 ± 1,93	
Julio	20	8,60± 1,88	
Agosto	20	8,52 ± 1,99	
Septiembre	20	8,56 ± 2,07	

n: número muestras

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

Además se aplicó un análisis específico de Tukey al 95%, el cual determinó que no existía diferencia significativa entre los meses de muestreo.

Para determinar si las 10 vacas Frisón negro estudiadas presentaban propiedades tecnológicas distintas o semejantes se realizaron análisis de varianzas y Tukey al 95% (ANEXO 14).

El CUADRO 10 presenta los resultados de los análisis de varianzas realizados, los que indicaron que hay diferencia significativa al 95% entre las propiedades tecnológicas de las 10 vacas raza Frisón negro estudiadas. La prueba específica de Tukey confirmó la diferencia significativa encontrada.

**CUADRO 10. Resultados del análisis de varianza aplicado a las propiedades tecnológicas de las vacas Frisón negro estudiadas.**

<b>Propiedades tecnológicas</b>	<b>Valor P</b>
<b>• Aptitud a la coagulación</b>	0,0000*
<b>• Firmeza de la cuajada</b>	0,0000*
<b>• Sinerésis</b>	0,0000*

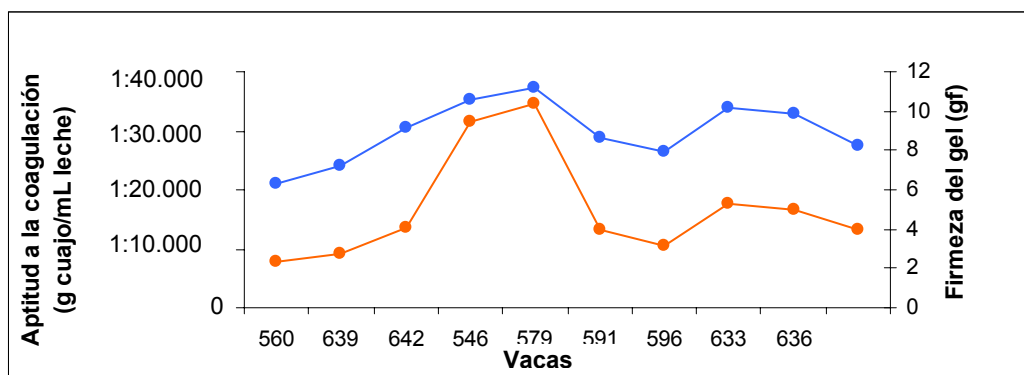
\*Valor P < 0,05 al 95% indica diferencia significativa

En el CUADRO 11 se presentan los resultados promedios determinados para las 10 vacas. La aptitud a la coagulación promedio fue  $16.784,4 \pm 383,59$  (g/mL), la firmeza de la cuajada  $8,93 \pm 0,17$  (gf), la sinéresis del gel  $8,59 \pm 0,21$  (mL) y el contenido de caseína fue de  $2,51 \pm 0,05$  %.

**CUADRO 11. Resultados promedios de las propiedades tecnológicas y contenido de caseína obtenidos en la leche de las diez vacas Frisón negro.**

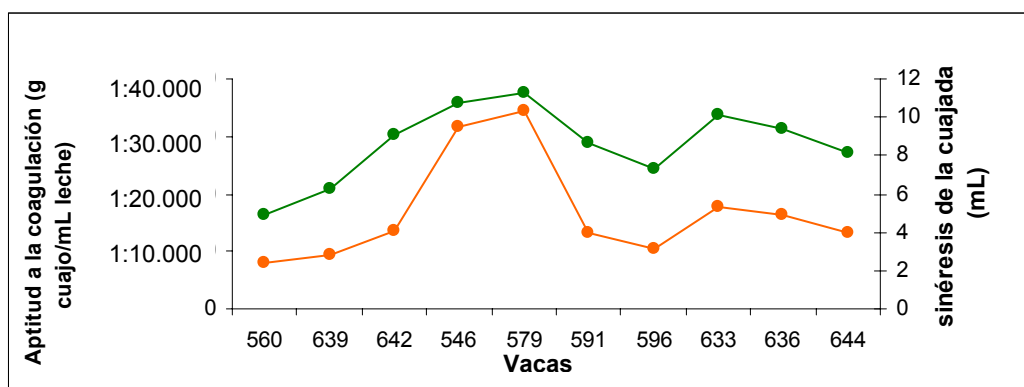
Vacas	Aptitud a la coagulación (mL leche/g cuajo)	Firmeza del gel (gf)	Sinéresis de la cuajada (mL)	Caseína (%)
546	31.571,0 ± 769,07	10,59 ± 0,12	10,79 ± 0,16	2,64 ± 0,02
560	7.910,5 ± 77,13	6,31 ± 0,13	4,86 ± 0,31	2,27 ± 0,05
579	34.475,1 ± 1.344,0	11,21 ± 0,16	11,25 ± 0,23	2,63 ± 0,02
591	13.326,3 ± 489,43	8,63 ± 0,17	8,70 ± 0,19	2,36 ± 0,04
596	10.358,6 ± 96,89	7,92 ± 0,17	7,28 ± 0,31	2,53 ± 0,01
633	17.730,1 ± 326,80	10,14 ± 0,15	10,15 ± 0,18	2,60 ± 0,04
636	16.501,2 ± 278,75	9,84 ± 0,31	9,42 ± 0,16	2,62 ± 0,03
639	9.227,6 ± 235,43	7,19 ± 0,07	6,26 ± 0,23	2,52 ± 0,03
642	13.587,0 ± 102,13	9,18 ± 0,18	9,09 ± 0,16	2,47 ± 0,18
644	13.156,7 ± 116,34	8,28 ± 0,20	8,13 ± 0,15	2,47 ± 0,09
<b>Prom.</b>	<b>16.784,4 ± 383,59</b>	<b>8,93 ± 0,17</b>	<b>8,59 ± 0,21</b>	<b>2,51 ± 0,05</b>

En la FIGURA 4 se puede observar la relación entre aptitud a la coagulación y firmeza del gel.



**FIGURA 4. Aptitud a la coagulación y firmeza del gel (valores promedios) en la leche de las diez vacas estudiadas.**

La FIGURA 5 muestra la relación entre aptitud de coagulación y la sinéresis de la cuajada.



**FIGURA 5. Aptitud a la coagulación y sinéresis de la cuajada (valores promedios) en la leche de la diez vacas estudiadas.**

Se observa claramente en las figuras 4 y 5 que la vaca 579 y 546 mostraron las mejores propiedades de aptitud de coagulación y que en contraste la vaca 560 obtuvo las peores propiedades de coagulación. Además, estas dos figuras muestran una relación positiva entre las tres pruebas tecnológicas estudiadas, es decir una leche que presenta una aptitud a la coagulación rápida originará cuajadas firmes y viceversa (GRANDISON *et al.*, 1984; GUINEE *et al.*, 1997 y WALSTRA *et al.*, 1999). También se observa el contraste es decir que la leche que presenta una baja aptitud a la coagulación, presenta cuajadas blandas y una sinéresis pobre o desuerado incompleto (WALSTRA *et al.*, 1999).

Las vacas que presentaron las mejores aptitudes de coagulación es decir la 579 y 546, además poseen los más altos contenidos de caseína, un  $2,63 \pm 0,02$  % y un  $2,64 \pm 0,02$  % respectivamente.

La vaca 560 presentó las peores aptitudes tecnológicas y además obtuvo el más bajo contenido de caseína igual a un  $2,27 \pm 0,05$ .

De acuerdo a lo indicado anteriormente la aptitud a la coagulación y el contenido de caseína determinados en este estudio están relacionados.

En el CUADRO 12 se presenta un análisis de correlación aplicado al contenido de caseína y las pruebas de aptitud tecnológicas.

**CUADRO 12. Coeficientes de correlación determinados entre el contenido de caseína y las pruebas de aptitud tecnológicas en las muestras de leche.**

<b>Variable dependiente</b>	<b>Aptitud a la coagulación</b>	<b>Firmeza de la cuajada</b>	<b>Sinéresis de la cuajada</b>
<b>Caseína</b>	0,6776	0,7919	0,7526
Valor P	(0,0313)*	(0,0063)*	(0,0120)*

\* Valor P < 0,05 indica relación estadísticamente significativa al 95%.

El análisis estadístico determinó que entre estos parámetros hay correlaciones significativas y positivas con un 95% de confianza.

De acuerdo a los resultados obtenidos las propiedades tecnológicas estudiadas: aptitud a la coagulación, firmeza de la cuajada y sinéresis del gel son favorecidas con un mayor contenido de caseína, lo cual concuerda con los estudios de STORRY **et al.** (1982) y OKIGBO **et al.** (1985).

Jaraim **et al.** citado por STORRY **et al.** (1982), determinaron correlaciones significativas y altas (0,851 - 0,926) entre la firmeza de la cuajada y el contenido total de caseína. La correlación obtenida entre estos dos parámetros en el estudio fue un poco menor (0,792), pero también fue significativa.

### 4.3 Identificación de las variantes genéticas.

Para la determinación del contenido de proteína de  $\beta$ -Lactoglobulina en el extracto semipurificado, se utilizó una curva de calibración del método LOWRY (ANEXO 6). Luego se determinó el volumen de muestra utilizado en las electroforesis, el cuál contenía 10  $\mu$ g de proteínas (ANEXO 15).

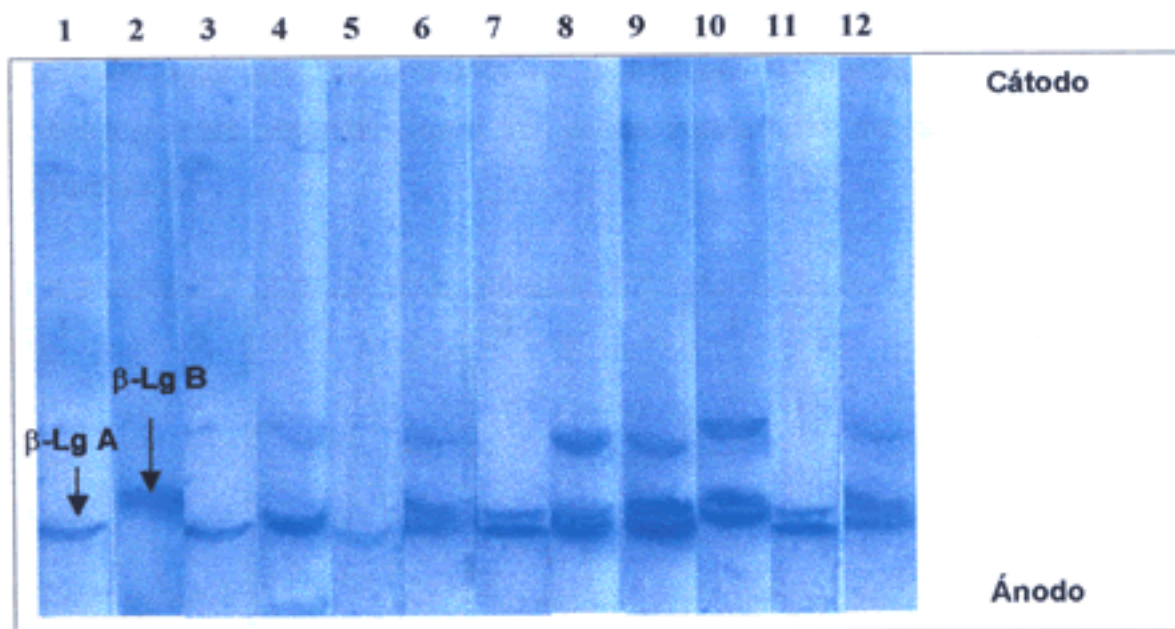
**4.3.1 Electroforésis de isoenfoque.** En el CUADRO 13 se muestran las variantes genéticas determinadas de  $\beta$ -Lg en la leche de las diez vacas, con la correspondiente migración promedio desde el ánodo.

El CUADRO 13 incluye los estándares A y B de  $\beta$ -Lg presentes en cada corrida de electroforesis (ANEXO 16).

**CUADRO 13. Variantes genéticas obtenidas en las muestras de  $\beta$ -Lg en la leche de vacas Frisón negro.**

Vaca	Variante	Promedio de migración desde el ánodo (cm)	Promedio de migración de estándares(cm)
		A y B	A y B
560	A	1,92	1,92 y 1,96
639	A	1,90	1,90 y 1,96
642	A	1,87	1,87 y 1,96
546	A y B	1,90 y 2,26	1,96 y 2,21
579	A y B	1,93 y 2,27	1,96 y 2,21
591	A y B	1,90 y 2,25	1,96 y 2,21
596	A y B	1,72 y 2,14	1,76 y 2,12
633	A y B	1,75 y 2,15	1,90 y 2,22
636	A y B	1,86 y 2,22	1,81 y 2,15
644	A y B	1,69 y 2,14	1,77 y 2,13

La FIGURA 6 presenta las bandas obtenidas en las muestras de  $\beta$ -Lg.



**FIGURA 6. Electroforesis de isoenfoque para  $\beta$ -Lg en diez muestras de leche de vaca Frisón negro.**

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

En la FIGURA 6 se puede visualizar claramente dos bandas teñidas que corresponden a la variante A y B de  $\beta$ -Lg. La vaca 560, 639 y 642 expresaron la variante A de esta proteína. Pero además se observa otra banda que correspondería a la proteína  $\alpha$ -Lactoalbúmina, la cual no se logró separar durante la preparación de las muestras.

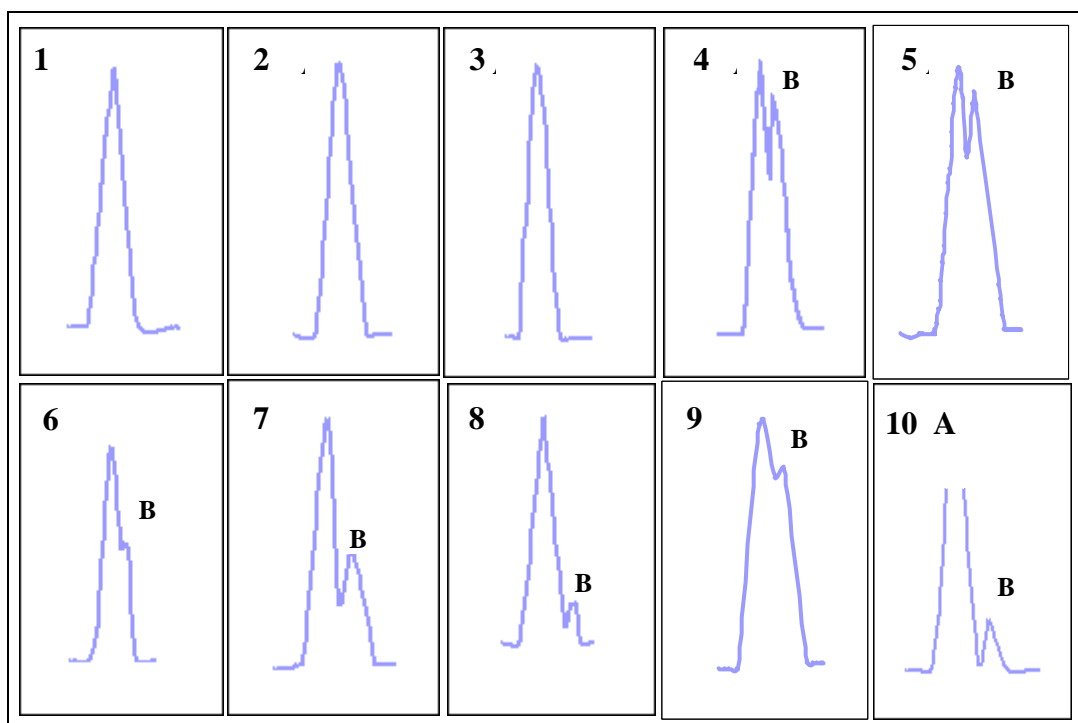
LOWE **et al.** (1995), también observaron en las muestras que analizaron además de las variantes de  $\beta$ -Lg la presencia de la proteína  $\alpha$ -Lactoalbúmina.

Las variantes de proteínas encontradas en las muestras de  $\beta$ -Lg concuerdan con lo encontrado por BENAVIDES (2003) que estudió las mismas vacas pero



en época de primavera-verano.

**4.3.2 Densitometría.** La cuantificación de la expresión de las variantes A y B de  $\beta$ -lactoglobulina se presenta en la FIGURA 7, donde se observan los densitogramas obtenidos para las vacas individuales de raza Frisón negro estudiadas.



**FIGURA 7. Densitogramas de las variantes A y B de  $\beta$ -Lg en las muestras de leche de vacas Frisón negro.**

1. Vaca 560, 2. Vaca 639, 3. Vaca 642, 4. Vaca 546, 5. Vaca 579, 6. Vaca 591  
7. Vaca 596, 8. Vaca 633, 9. Vaca 636, 10. Vaca 644.

En el CUADRO 14, se muestran las proporciones de la variante A y B encontradas en las muestras de  $\beta$ -Lg de las 10 vacas estudiadas, donde se puede visualizar que hay una mayor proporción de la variante A (ANEXO 17).

**CUADRO 14. Proporción de la expresión de las variantes A y B de  $\beta$ -Lg en las vacas en estudio.**

<b>Vaca</b>	<b>Promedio proporción <math>\beta</math>-Lg A : <math>\beta</math>-Lg B</b>
546	1,09 : 1
579	1,03 : 1
591	1,17 : 1
596	2,56 : 1
633	5,45 : 1
636	1,68 : 1
644	4,73 : 1

Además, se determinó la frecuencia de las variantes genéticas identificadas en la leche de las vacas raza Frisón negro para la  $\beta$ -Lg y se encontró que la variante A se presentó en un 65% y la variante B en un 35%, lo que coincide con BENAVIDES (2003).

De las diez vacas Frisón negro estudiadas un 30 % resultó homocigotas y el resto heterocigotas.

Las frecuencias génicas obtenidas para  $\beta$ -Lg son cercanas a las encontradas en el estudio de McLEAN *et al.* (1984), quienes determinaron en vacas Friesian que la variante A estaba presente en un 61,4% y la variante B en un 38,6%.

Los resultados obtenidos concuerdan con los estudios de Ng-Kwai-Hang y Grosclaude citados por BOLAND y HILL (2001), ya que ellos determinaron que la variante A de  $\beta$ -Lg presenta una mayor expresión que la variante B en leches de vacas heterocigotas AB.

#### 4.4 Relación entre la presencia de la variante genética A y B de $\beta$ -Lactoglobulina con las propiedades tecnológicas de la leche y el contenido de caseína

Los análisis de varianzas presentados en el ANEXO 18, indicaron que el fenotipo de  $\beta$ -Lg presentó un efecto significativo sobre las propiedades tecnológicas y el contenido de caseína.

Al incluir los análisis de CID (2004), se observó que las variantes de  $\kappa$ -CN a diferencia de la  $\beta$ -Lg no tuvieron ningún efecto sobre estos parámetros.

En el CUADRO 15 se presentan los resultados de estos análisis, en cual está incluido los resultados obtenidos en la investigación paralela realizada por CID (2004).

**CUADRO 15. Efecto de la variante genética A y B de  $\kappa$ -CN y  $\beta$ -Lg sobre las propiedades de aptitud a la coagulación de la leche y el contenido de caseína.**

Variantes	N	Apt. a la coagulación (mL leche / g cuajo)	Firmeza del gel (gf)	Sinéresis de la cuajada (ml)	Contenido de caseína (%)	Efecto
$\kappa$ -CN <sup>1</sup>						NS
A	16	21.192,8±1.524,34 <sup>a</sup>	8,76±0,26 <sup>a</sup>	8,06±0,32 <sup>a</sup>	2,45±0,03 <sup>a</sup>	
B	64	14.257,3±880,079 <sup>a</sup>	8,71±0,15 <sup>a</sup>	8,38±0,18 <sup>a</sup>	2,52±0,02 <sup>a</sup>	
$\beta$ -Lg						*
AA	24	9.658,9±1.320,12 <sup>a</sup>	7,25±0,22 <sup>a</sup>	6,27±0,27 <sup>a</sup>	2,38±0,02 <sup>a</sup>	
AB	56	25.791,2±1.164,23 <sup>b</sup>	10,22±0,19 <sup>b</sup>	10,16±0,24 <sup>b</sup>	2,58±0,02 <sup>b</sup>	

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

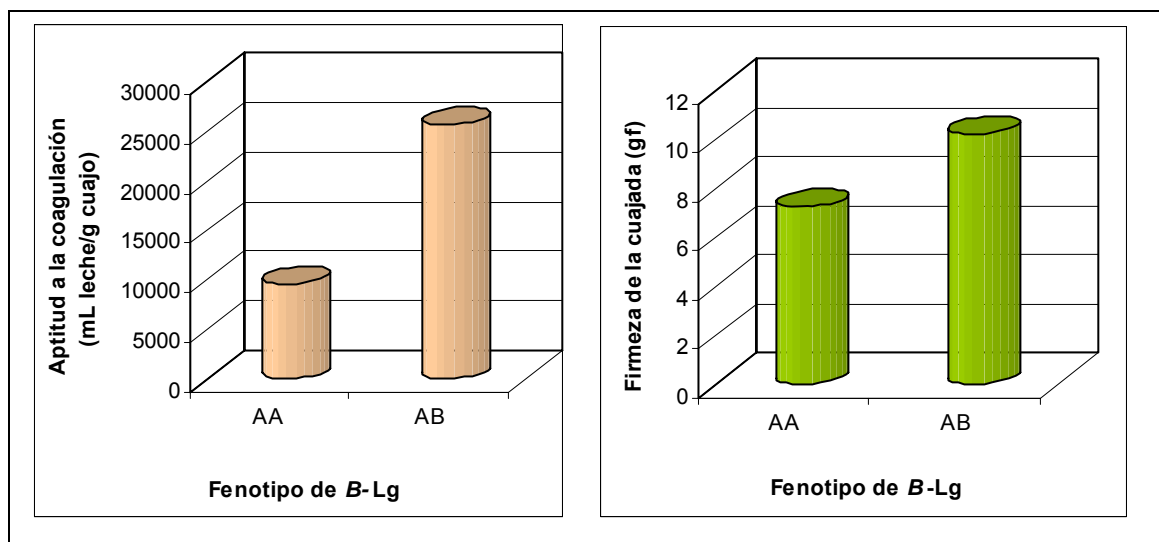
\*significativo al 95% ( $p < 0,05$ ), NS: no significativo al 95% ( $p > 0,05$ )

<sup>1</sup> Análisis realizado en investigación paralela (CID, 2004)

Graham citado por GONZALEZ de LLANO (1990), determinó en un estudio

sobre fabricación de quesos que las leches de vacas de raza Frisón presentan un tiempo de coagulación que aumenta en un orden de fenotipo de  $\beta$ -Lg de AA>AB>AB, es decir el fenotipo AA presenta una menor aptitud a la coagulación. La leche cruda y pasteurizada con  $\beta$ -Lg BB forma una cuajada en forma más rápida (menor tiempo de coagulación) que leche con  $\beta$ -Lg AA (FITZGERALD y HILL, 1997). Además y sobre lo mismo GRANDISON (1986), señala que leches que contienen la variante B de la  $\beta$ -Lg dan cuajadas firmes y un mayor contenido de materia seca que la variante A. Lo mismo mencionan LODES *et al.* (1996), referente a la firmeza del gel. Además WALSTRA *et al.* (1999), afirman que la leche con un mayor contenido de caseína coagula más rápidamente y por lo tanto, posee una mejor aptitud a la coagulación.

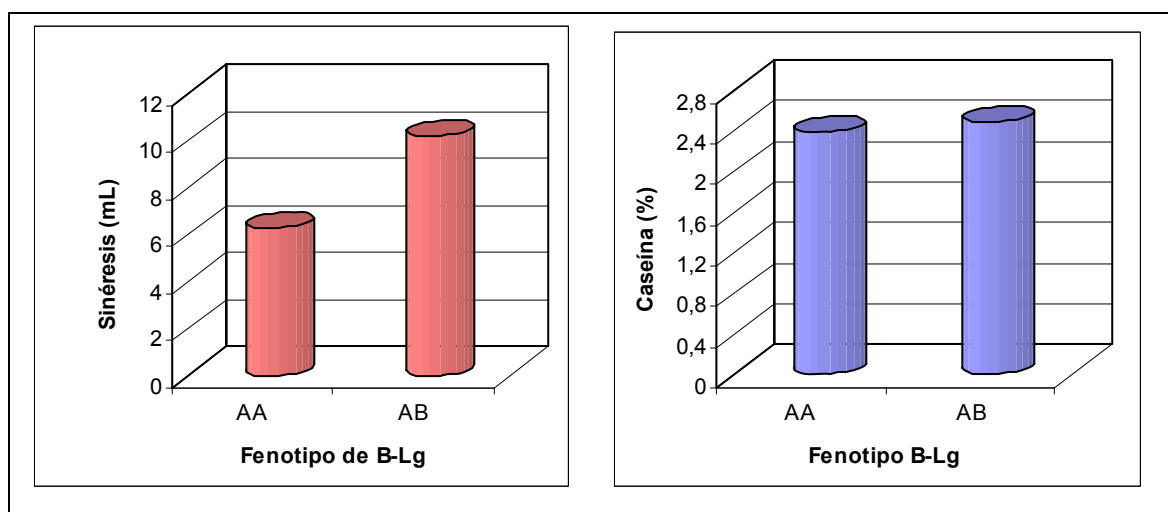
La sinéresis se relaciona directamente con la aptitud a la coagulación y con la firmeza de la cuajada. Aquellas leches que presentan una baja aptitud de coagulación, presentan cuajadas blandas y una sinéresis pobre (desuerado incompleto) y viceversa (WALSTRA *et al.* 1999).



**FIGURA 8. Efecto del fenotipo de  $\beta$ -Lg sobre la aptitud a la coagulación y la firmeza del gel.**

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

En la FIGURA 8 y 9, se puede visualizar que el fenotipo AB  $\beta$ -Lg presenta una mejor aptitud a la coagulación, firmeza del gel, sinéresis y un mayor contenido de caseína que el fenotipo AA, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas según el Test de Tukey al 95% (ANEXO 19).



**FIGURA 9. Efecto del fenotipo de  $\beta$ -Lg sobre la sinéresis y el contenido de caseína.**

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

BENAVIDES (2003), en el estudio con las mismas vacas pero en época de primavera-verano también encontró que el fenotipo AB de  $\beta$ -Lg presenta las mejores aptitudes tecnológicas y el mayor contenido de caseína.

Por lo tanto y conforme a estos resultados se puede deducir que leches de vacas que presenten el fenotipo AB de  $\beta$ -Lg serán más aptas para la coagulación.

Es importante destacar que las variantes de  $\kappa$ -CN por si solas no tuvieron efecto significativo sobre las propiedades tecnológicas y contenido de caseína, pero por la importancia que ha tenido en estudios anteriores al igual que es el caso de la  $\beta$ -Lg no se debe subestimar la presencia de la variante de  $\kappa$ -CN.

Es así como las variantes B y AB de la  $\kappa$ -CN están asociadas con cortos tiempos de coagulación y cuajadas más firmes que la variante A de acuerdo a SHAAR (1984). Además SHAAR *et al.* (1985), encontraron que el tiempo de coagulación se redujo sustancialmente en leches que contienen  $\kappa$ -CN B comparada con la variante A. También autores como SCHAAR (1984), FITZGERALD y HILL (1997), HORNE *et al.* (1997), han señalado que la  $\kappa$ -CN B tiene un efecto favorable en las propiedades de coagulación de la leche, por ejemplo menor tiempo de coagulación y una cuajada más firme.

Con el fin de corroborar lo mencionado en el párrafo anterior se realizó un análisis de interacción entre las variantes de  $\kappa$ -CN y el fenotipo de  $\beta$ -Lg.

El CUADRO 16 muestra un análisis de interacción realizado entre los fenotipos de  $\beta$ -Lg de este estudio y las variantes de  $\kappa$ -CN encontradas en el estudio realizado en paralelo por CID (2004).

**CUADRO 16. Interacción entre las pruebas de coagulación, contenido de caseína y las variantes genéticas A y B de  $\kappa$ -CN y  $\beta$ - Lg.**

**Época de invierno.**

Variantes		N	Apt. a la coagulación (mL leche / g cuajo)	Firmeza del gel (gf)	Sinéresis (ml)	Contenido de caseína (%)
$\kappa$ -CN <sup>1</sup>	$\beta$ - Lg					
A	AA	8	7910,5 $\pm$ 2106,95	6,31 $\pm$ 0,35	2,27 $\pm$ 0,04	4,86 $\pm$ 0,44
A	AB	8	34475,1 $\pm$ 2006,75	11,21 $\pm$ 0,33	2,49 $\pm$ 0,03	11,25 $\pm$ 0,42
B	AA	16	11407,3 $\pm$ 1489,84	8,18 $\pm$ 0,25	2,43 $\pm$ 0,04	7,68 $\pm$ 0,31
B	AB	48	17107,3 $\pm$ 860,161	9,23 $\pm$ 0,14	2,54 $\pm$ 0,02	9,08 $\pm$ 0,18

<sup>1</sup> Análisis realizado en estudio paralelo (CID, 2004)

En el CUADRO 16 se observa que la interacción entre el fenotipo AB de  $\beta$ -Lg y la variante A de  $\kappa$ -CN presenta las mejores propiedades tecnológicas, pero este resultado no es representativo ya que es el valor promedio de una sola vaca (8 muestras) durante los cuatros muestreos. No obstante, la interacción entre el fenotipo AB de  $\beta$ -Lg y la variante B de  $\kappa$ -CN se considera también como una adecuada interacción para las propiedades tecnológicas estudiadas, ya que representa el valor promedio de 6 vacas (48 muestras), además, ésta relación también posee el mayor contenido de caseína. Estos resultados coinciden con lo encontrado en la investigación de BENAVIDES (2003).

Los resultados obtenidos también concuerdan con el estudio de VAN EENENNAAM y MEDRANO (1991), quienes afirman que la combinación de la variante B de las proteínas  $\beta$ -Lg y  $\kappa$ -CN mejoran el contenido de caseína de la leche, las propiedades de coagulación y también el rendimiento en la elaboración de queso.

## 5. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se concluyó que:

- ❖ El 70% de las vacas en estudio presentaron el fenotipo AB de  $\beta$ -lactoglobulina.
- ❖ El fenotipo AB de  $\beta$ -Lg presentó las mejores propiedades tecnológicas de las leches y un mayor contenido de caseína.
- ❖ Se acepta la hipótesis planteada en este estudio, debido a que el fenotipo AB de  $\beta$ -Lg, está asociado con las mejores propiedades tecnológicas y a un mayor contenido de caseína de la leches.



## 6. RESUMEN

El objetivo general de este estudio fue determinar la relación entre las variantes A y B de  $\beta$ -Lg con las propiedades de aptitud de coagulación y el contenido de caseína en muestras de leche.

Las muestras de leche fueron obtenidas de 10 vacas individuales de raza Frisón Negro. Se realizaron un total de cuatro muestreos entre los meses junio y septiembre del 2002 (época invierno). Además, las vacas para el estudio fueron seleccionadas en base a características similares, es decir, presentaban una alimentación homogénea, con 4 años de edad, en segundo mes de lactancia y libre de mastitis.

En las muestras de leche de las 10 vacas estudiadas se determinaron el contenido de caseína, aptitud de coagulación de la leche, firmeza del gel, sinéresis de la cuajada y, se identificaron las variantes genéticas de  $\beta$ -Lg. Se aplicaron análisis estadísticos de varianza y correlación con el programa Statgrafic/Plus 2.0.

Se obtuvieron mediante electroforesis los Fenotipos AA y AB de la  $\beta$ -Lg.

Se concluyó que el fenotipo AB de  $\beta$ -Lg esta asociado con las mejores propiedades tecnológicas de las leches y con un mayor contenido de caseína.

## SUMMARY

The general objective of this study was to determine the relation between the variants A and B of  $\beta$ -Lg with the properties of aptitude of coagulation and the content of casein in samples of milk.

The milk samples were obtained from 10 individual cows of Black Friesian breed. June and September of the 2002 were made a total of four samplings between the months (time winter). In addition, the cows for the study were selected on the basis of similar characteristics, that is to say, they presented/displayed a homogenous feeding, with 4 years of age, in second month of lactancia and of free mastitis.

In the milk samples of the 10 studied cows it determined the casein content, coagulation aptitude of milk, firmness the curd, sineresis of the curd and, the genetic variants of  $\beta$ -Lg were identified. To statistical analyses of variance and correlation with the program Statgrafic/Plus 2.0 were applied.

Phenotypes AA and AB of  $\beta$ -Lg were obtained by means of electrophoresis.

One concluded that the phenotype AB of  $\beta$ -Lg is associated with the best properties of aptitude of coagulation of the milk and with a major content of casein.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- AALTONNEN, L y ANTILA, V. 1987. Milk renneting properties and the genetic variants of proteins. *Milchwissenschaft*. 42 (8): 490-492.
- ADDEO, F., CHIANESE, L., DI LUCCIA, A., PETRILLI, P., MAURIELLO, R., ANELLI, G. 1983. Identification of bovine casein variants by gel Isoelectric focusing. *Milchwissenschaft*. 38 (10): 586 – 588.
- ALAIS, C. 1985. *Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera*. Ed. Reverté. Barcelona. España. 873 p.
- ALEANDRI, R., BUTTAZZONI, L., SCHNEIDER, J., CAROLI, A Y DAVOLI, R. 1990. The effects of milk protein polymorphisms on milk components cheese producing ability. *Journal of Dairy Science*. 73: 241-255.
- AMIGO, L., MARTIN-ALVAREZ, P., GARCIA-MURO, E. y ZARAGOZA, I. 2001 Effect of milk protein haplotypes on the composition and technological properties of Fleckvieh bovine milk. *Milchwissenschaft*. 56 (9): 488-499.
- AMIOT, J. 1991. *Ciencia y tecnología de la leche. Principios y aplicaciones*. Ed. Acribia. Zaragoza. España. 547 p.
- ASELTINE, M. 1989. Cows can be managed to improve solids content of milk. *Feedstuffs*. Julio. Pp 13 y 25.
- BADUI, S. 1984. *Química de los alimentos*. Madrid, España. 430 p.

- BARANYI, M., BÔSZE, Z., BUCHBERGER, J. y KRAUSE, I. 1993. Genetic Polymorphism of Milk Proteins in Hungarian Spotted and Hungarian Grey Cattle: A Possible New Genetic Variant of  $\beta$ -Lactoglobulin. *J. of Dairy Science*. 76: 630-636.
- BELITZ, H-D. y GROSCH, W. 1997. *Química de los alimentos*. Acribia S.A. Zaragoza, España. 1087p.
- BENAVIDES, T. 2003. Efecto de las variantes genéticas A y B de  $\kappa$ -caseína y  $\beta$ -lactoglobulina sobre las propiedades de coagulación de la leche. Tesis Lic. en Ing. en Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 108 p.
- BOLAND, M. y HILL, J. 2001. Genetic selection to increase cheese yield. The Kaikoura experience. *The Australian Journal of Dairy Technology*. 56-(2):171-176.
- BOVENHIUS, H., van ARENDONK, J., KORVER, S. 1992. Associations between milk protein polymorphism and milk production traits. *Journal of Dairy Science*. 72: 2549-2559.
- CARRILLO, B. 1997. *Calidad higiénica de leche cruda*. Instituto de Desarrollo Agropecuario (INDAP). Universidad Austral de Chile. Valdivia. Uniprint S.A. 110 p.
- CASADO, P. y GARCIA, J. A. 1985. La calidad de la leche y los factores que la influyen. *Industrias Lácteas Españolas*. Nº 81. 298 p.
- CASANOVA, M. 2001. Identificación de las variantes genéticas de  $\kappa$ -caseína en leche de vacas Holstein – Friesian y Jersey por electroforesis de

isoenfoque. Tesis Lic. en Ing. en Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 102 p.

CASAS, M. 1996. Variación en el Contenido de Proteína y Materia Grasa de leche, según las diferentes Estaciones del año y Sistema de Alimentación en Predios de la Zona Sur. Tesis Lic. Medicina Veterinaria. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias. 84 p.

CERBULIS, J. y FARREL, H. 1975. Composition of Milks of Dairy Cattle. I. Protein, Lactose, and Fat Contents and Distribution of Protein Fraction. Journal of Dairy Science. 58: 817-827.

CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACION. INN. 1998. Norma Chilena Oficial 1011/1. Leche y productos lácteos. Muestreo. Parte I. Santiago. Chile.

CHILE, MINISTERIO DE SALUD. 2000. Reglamento Sanitario de los Alimentos. Editorial Texto Jurídico Chile. 1<sup>a</sup> Edición. 108 p.

CID, A. 2004, Proteína total, calcio, fósforo y estabilidad térmica de la leche y su relación con las variantes genéticas de  $\kappa$ -caseína. Época de invierno. Tesis Ingeniería en Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 90 p.

CORTES, X. 2001. Contenido de proteínas y su relación con pruebas de aptitud tecnológicas en leche de Centros de Acopio lechero. Tesis Ingeniería en Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 122 p.

- CREAMER, L. y HARRIS, D. 1997. Relationship between milk protein polymorphism and physico-chemical properties. En: Milk Protein Polymorphism. International Dairy Federation. Brussels, Belgium. Pp.112-117.
- DELACROIX – BUCHET, A., LEIFIER, D. y NUYS – PETIT, V. 1993. Polimorfismo of kappa casein from three French breeds and its coagulability. Lait. 73: 61 – 72.
- De PETERS y FERGUSON J. 1992. Nonprotein nitrogen and protein distribution in the milk of cow. Journal of Dairy Science 75 (11): 3192-3209.
- De VEER, C. 1990. Algunos aspectos del mejoramiento genético del ganado lechero. En: Avances en producción animal. L. Latrille (ed). Valdivia, Chile, pp 124-126.
- EIGEL, W., BUTLER, J., ERNSTROM, C., FARREL, H., HARWALKAR, V., JENNES, R., y WHITNEY, R. 1984. Nomenclature of Proteins of Cow: Fifth Revision. J. of Dairy Science. 67 (8): 1599-1631.
- FAO, FOOD AND AGRICULTURED ORGANIZATION. 1983. Tecnología y Control de Calidad de Productos Lácteos. Equipo Regional de Fomento de Capacitación en Lechería para América latina. Pp 5.17-5.19.
- FELMER, R. y BUTENDIEK, N. 1998. Frecuencia alélica del gen de la  $\kappa$ -caseína bovina en un rebaño Frisón Negro Chileno. Arch. Med. Vet. 30 (2): 145-151.
- FENNEMA. O. 1993. Química de los alimentos. Ed. Acribia S.A. Zaragoza.

España. Pp 276-413.

FITZGERALD, R. y HILL, J. 1997. The relationship between milk protein polymorphism and the manufacture and functionality of dairy products. In: Milk protein polymorphism. International Dairy Federation. Proceedings of the IDF Seminar held in Palmerston North, New Zealand: 355-371.

FOX y McSWEENEY. 1998. Dairy Chemistry and Biochemistry. Department Food Chemistry University College. Cork. Ireland. 478 p.

GONYON, D., MATHER, R., HINES, H., HAENLEIN, C., ARAVE, C. y GAUNT, S. 1987. Association of bovine blood and milk polymorphism with lactation traits: Holstein. Journal of Dairy Science. 70: 2585-2598.

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

GRANDISON, A., OWEN, J., MILLARD, D. y FORD, G. 1984. Chemical composition and coagulating properties of renneted Friesian milk during the transition from winter rations to spring grazing. Journal of Dairy Research. 52 (1): 69-78.

GRANDISON, A. 1986. Causes of variation in milk composition and their effects on coagulation and cheesemaking. Dairy Industries International. 51 (3): 21-24.

GUINEE, T., GORRY, C., O'CALLAGHAM, D., O'KENNEDY, B., O'BRIEN, N. y FENELON. M. 1997. The effects of composition and some processing

treatments on the rennet coagulation properties of milk. *International Journal of Dairy Technology*. 50 (3): 99-106.

HORNE, D., BANKS, J. y MUIR, D. 1997. Genetic polymorphism of bovine  $\kappa$ -caseína: effects on renneting and cheese yield. In: *Milk protein polymorphism*. International Dairy Federation. Proceedings of the IDF Seminar held in Palmerston North, New Zealand: 162-171.

HORNE, D., BANKS, J. y MUIR, D. 1996. Genetic polymorphism of milk proteins: Understanding the Technological Effects. *Annual Report Hanna Research*: 70-78.

IKONEN, T., AHLFORS, K. y KEMPE, R. 1999. Genetic parameters for the milk coagulation properties and prevalence of noncoagulating milk in Finish dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 82 (1): 205-214.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. 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. *International Dairy Federation Bulletin* N° 298. 11p.

JAKOB, E. y PUHAN, Z. 1995. Implications of Genetic Polymorphism of Milk Proteins on Production and Processing of Milk. *Bulletin FIL-IDF*. 304. 25p.

KRAMM, J. 2003. Composición proteica y su relación con las variantes genéticas de A y B de  $\kappa$ -caseína y  $\beta$ -lactoglobulina en leche de vacas raza Frisón Negro. Tesis Lic. en Ing. en Alimentos. Valdivia.



Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 114p.

KREUZER, M., SCHULZ, J., FRY, C y ABEL, H. 1996. Rennet coagulation properties of milk from cows at three stages of lactation supplied with graded levels of an antimicrobial feed supplement. *Milchwissenschaft* 51 (5): 243-247.

LATRILLE, L. 1993. El valor nutritivo de la leche y factores que afectan su composición. In: LATRILLE, L. P. *Producción Animal*. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile. Pp 27-56.

LAVIN, R. 1996. Variaciones de la composición láctea de vacas con distinto número de lactancias. Tesis Licenciado en Medicina Veterinaria. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias. 54 p.

LAWRENCE, R. 1991. Factors affecting the yield of cheese. In: International Dairy Federation (IDF/FIL). Bruselas. Pp 109-127.

LEHNINGER, A y NELSON, C. 1995. *Principios de bioquímica*. Editorial Omega. Barcelona, España. Pp. 136-147.

LODES, A., BUCHBERGER, J., KRAUSE, I., AUMANN, J. y KLOSTERMEYER, H. 1996. The influence of genetic variants of milk protein on the compositional and technological properties of milk. 2. Rennet coagulation time and firmness and rennet curd. *Milchwissenschaft*. 51 (10): 543-547.

LOWE, R., ANEMA, S. G., PATERSON, G. R. y HILL, J. P. 1995. Simultaneous

separation of the lactoglobulin A, B y C variants using polyacrylamide gel electrophoresis. *Milchwissenschaft*. 50 (2): 663-666.

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

MACHEBOEUF, D., COULON, J. Y D' HOUR, P. 1993. Effect of breed, protein genetic variants and feeding on cow's milk coagulation properties. *Journal of Dairy Research* 60: 43-53.

MACKLE, T., BRYANT, A., PETCH, J. y AULDIST, M. 1999. Nutritional on the composition of milk cows of different protein phenotypes in New Zealand. *Journal of Dairy Science*. 82 (1): 172-180.

MARIANI, P. y SUMMER, A. 1999. Polimorfismo delle proteine ed attitudine tecnologico-casearia del latte. *Scienza e tecnica lattiero-casearia* 50 (3): 197-223.

MARIANI, P., ZANZUCCHI, G., MASORI, M., SERVENTI, P. y PECORARI, M. 1995. 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.

MARSHALL, R. J. 1982. An improved method for measurement of the syneresis of curd formed by rennet action on milk. *National Institute for Research in Dairying Reading*. 44: 329-336.

MARTINEZ, J., GARZON, D., MENDEZ, F. y RUIZ, A. 1993. Influencia de las variantes genéticas de la  $\beta$ -lactoglobulina sobre el pH, caseína total y

rendimiento en cuajada en ovejas de raza manchega. Archivos de Zootecnia. 42: 245-252.

McLEAN, D y SCHAAR, J. 1989. Effects of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\kappa$ -casein genetic variants and concentrations on syneresis of gels from renneted heated milk. Journal of Dairy Research. 56: 297-301.

MUIR, D., HORNE, D. y WEST, I. 1997. Genetic polymorphism of bovine  $\kappa$ -casein: effects on textural properties and acceptability of plain, Set Yoghurt. In: Milk protein polymorphism. International Dairy Federation. Proceedings of the IDF Seminar held in Palmerston North, New Zealand: 182-184.

MUJICA, F. y EHRENFELD, J. 1993. Evaluación de las consecuencias del proceso de Holsteinización en Chile. Producción Animal, serie B-17: 72-98.

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. Brussels, Belgium. Pp. 22-37.

NG-KWAI-HANG, K., HAYES, J., MOXLEY, J. y MONARDES, H. 1987. Variation in Milk Protein Concentrations Associated with Genetic Polymorphism and Environmental Factors. Journal of Dairy Science. 70 (3): 563-570.

NG-KWAI-HANG, K., HAYES, J., MOXLEY, J. y MONARDES, H. 1986. Relationships Between Milk Polymorphism and Major Milk Constituents in Holstein-Friesian Cows. Journal of Dairy Science. 69 (1): 22-26.

- NG-KWAI-HANG, K., HAYES, J., MOXLEY, J. y MONARDES, H. 1984. Variability of Test-Day Milk Production and Composition and Relation of Somatic Cell Counts with Yield and Compositional Changes of Bovine Milk. *Journal of Dairy Science*. 67 (2): 361-366.
- OKIGBO, L., RICHARDSON, G y BROWN, R. 1985. Variation in coagulation properties of milk from individual cows. *Journal of Dairy Science*. 68 (4): 822-828.
- PEARCE, F., BANKS, B., BANTHORPE, D., BERRY, A., DAVIES, H. y VERNON, CH. 1972. The Isolation and Characterization of Nerve-Growth Factor from the Venom of *Vipera russelli*. *Eur. J. Biochem*. 29: 417-425.
- PEREZ, M., MARTIN, P., RAMOS, M., GARCIA, E., ZARAZAGA, I. y AMIGO, L. 1998. Genetic polymorphism of bovine milk proteins in Holstein-Friesian and Fleckvieh breeds exploited in Spain. *Milchwissenschaft*. 53 (10): 543-546.
- PINTO, M., CARRASCO, E., FRASER, B., LETELIER, A. y DÔRNER, W. 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, Macrocoponentes. *Agrosur*. 26(2): 97-109.
- PORTER, J. 1981. *Leche y productos lácteos*. Ed. Acribia. Zaragoza. España. 85 p.
- POTTER, N. y HOTCHKISS, J. 1999. *Ciencia de los Alimentos*. Ed. Acribia S.A. Zaragoza. España. Pp 35-38.
- PUHAN, Z. y JAKOB, E. 1993. Genetic variants of milk proteins and cheese

yield. In: Cheese yield & factors affecting its control. International Dairy Federation. Proceedings of the IDF seminar held in Cork, Ireland: 111-120.

RAMOS, M. y AMIGO, L. 1996. Polimorfismo genético de las proteínas lácteas y su relación con la calidad. En: III Taller sobre Calidad de la Leche. Universidad Austral de Chile. Valdivia. 9-11 de Octubre: 43.

RODELLAR, C., BRAILLON, C., LEVEZIEL, H., OSTA, R., ZARAZAGA, I. y ZARAGOZA, P. 1992. Identificación de las variantes genéticas de la  $\beta$ -lactoglobulina bovina mediante las técnicas de PCR y RFLP. Archivos de Zootecnia. 41: 661-666.

ROGERS, G. y STEWART, J. 1982. The effects of some nutritional and non nutritional factors on milk protein concentration and yield. Australia. Journal Dairy Technology. 37 (1): 26-32.

SCHAAR, J. 1984. Effects of  $\kappa$ -casein genetic variants and lactation number on the renneting properties of individual milks. Journal of Dairy Research. 51: 397-406.

SCHAAR, J., HANSSON, B. y PETTERSSON, H. 1985. Effects of genetic variants of  $\kappa$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin on cheesemaking. Journal of Dairy Research. 52: (14): 429-437.

SCOTT, R. 1991. Fabricación de queso. Editorial acribia, S.A. Zaragoza. España. 520 p.

STEWART, A. F., WILLIS, Y. M. y MACKINLAY, A. G. 1984. Nucleotide sequences of bovine  $\alpha_{s1}$  and  $\kappa$ -casein cDNA<sub>s</sub>, Nucleic Acids Res. 12:

3895-3907.

STORRY, J. y FORD, G. 1982. Development of coagulum firmness in renneted milk-a two-phase process. *J. of Dairy Research*. 49: 343-346.

STORRY, E., GRANDISON, A., MILLARD, D y OWEN, J. 1982. Chemical composition and coagulating properties of renneted milks from different breeds and species of ruminant. *Journal of Dairy Research* 50: 215-229.

SUTTON, J. 1989. Altering Milk Composition by Feeding. *Journal of Dairy Science*. 72 (10): 2801-2814.

TONG, P., VINK, S., FARKYE, N. y MEDRANO, J. 1993. Effect of genetic variants of milk proteins on the yield of Cheddar cheese. In: *Cheese yield and factors affecting its control*. International dairy Federation. Proceedings of the IDF seminar held in Cork, Ireland: 179-186.

URECH, E., PUHAN, Z. y SCHÄLLIBAUM, 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 Polymorphism in California Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*. 74 (5): 1730-1742.

VEGARUD, G., MOLLAND, T., BROVOLD, M., DEVOLD, T., ALESTROM, P., STEINE, T., ROGNE, S y LANGSRUD, T. 1989. Rapid separation of genetic variants of caseins and whey proteins using urea-modified gels and fast electrophoresis. *Milchwissenschaft* 44(11): 689-691.

VEISSEYRE, R. 1980. *Lactología técnica*. Composición, recogida, tratamiento y

transformación de la leche. Ed. Acribia S.A. Zaragoza. España. 629 p.

WALSTRA, P., GEURTS, T., NOOMEN, A., JELLEMA, A. y VAN BOEKEL, M. 1999. Dairy Technology. Principles of Milk Properties and Processes Marcel Dekker AG. USA. 727 p.

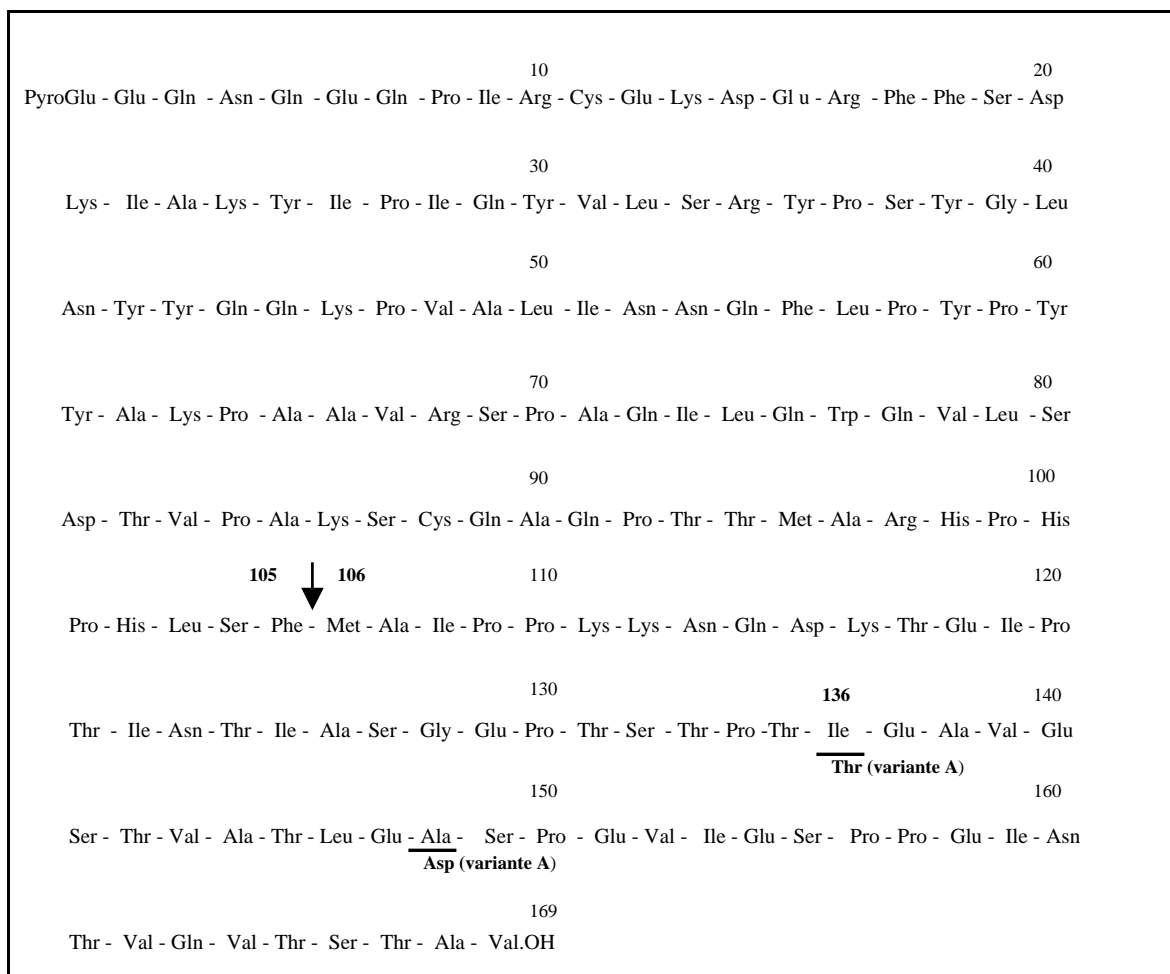
WINKELMAN, A. y WICKHAM, B. 1997. Associations between milk protein genetic variants and production traits in New Zealand Dairy cattle. En: Milk Protein Polymorphism. International Dairy Federation. Brussels, Belgium. Pp. 38-45.

## **ANEXOS**



## ANEXO 1

### Estructura primaria de la $\kappa$ -CN B bovina.



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

La flecha en la figura indica el punto de ataque de la quimosina.

## ANEXO 2

### Estructura primaria de la $\beta$ -Lg B bovina.

10	20
H.Leu - Ile - Val - Thr - Gln - Thr - Met - Lis - Gly - Leu - Asp - Ile - Gln - Lys - Val - Ala - Gly - Thr - Trp - Tyr	
30	40
Ser - Leu - Ala - Met - Ala - Ala - Ser - Asp - Ile - Ser - Ile - Leu - Asp - Ala - Gln - Ser - Ala - Pro - Leu - Arg	
50	60
Val - Tyr - Val - Glu - Glu - Leu - Lys - Pro - Thr - Pro - Glu - Gly - Asp - Leu - Glu - Ile - Leu - Leu - Glu - Lys	
64	80
Trp - Glu - Asn - <u>Glu - Glu - Cys - Ala - Gln - Lis - Lis - Ile - Ile - Ala - Glu - Lys - Thr - Lys - Ile - Pro - Ala</u> <u>Asp (variante A)</u>	
90	100
Val - Phe - Lys - Ile - Asp - Ala - Leu - Asn - Glu - Asn - Lys - Val - Leu - Val - Leu - Asp - Thr - Asp - Tyr - Lys	
110	120
Lys - Tyr - Leu - Leu - Phe - Cys - Met - Glu - Asn - Ser - Ala - Glu - Pro - Glu - Gln - Ser - Leu - <u>Ala - Cys - Gln</u> <u>(Variante A) Val</u>	
130	140
Cys - Leu - Val - Arg - Thr - Pro - Glu - Val - Asp - Asn - Glu - Ala - Leu - Glu - Lys - Phe - Asp - Lys - Ala - Leu	
150	160
Lys - Ala - Leu - Pro - Met - His - Ile - Arg - Leu - Ser - Phe - Asn - Pro - Thr - Gln - Leu - Glu - Glu - Gln - Cys	
162	
His - Ile. OH	

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

### ANEXO 3

#### Características de las vacas en estudio.

□ Información de la de las vacas.

R. P.	PADRE	ABUELO MATERNO	BISABUELOS		% HF
			MATERNO	PATERNO	
546	Loyal 120	Mandarín	Gay		46.75
560	Loyal 120	Cañón	Encino	Wilowendeavour	27.75
579	Mora	Ripken	Asteroide	Country home Astro King	25
591	Loyal 120	Trade	Diagrat		43.5
596	Continental	Jim Ben	Cañon	Athol Famous Prefect	34.38
633	Loyal 120	Kentucky	Cañon	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 Ademo 261	0
644	Stefens	Kay	1641 (madre)		100

Donde, %HF indica la proporción entre la mezcla de las razas Holstein y Frisón Negro.

□ Antecedentes generales.

Edad: 4

N° de lactancias: 2

Estado sanitario: libre de mastitis

Tipo de alimentación: ensilaje de pradera permanente, avena, concentrado de suralin de alta proteína, con sales minerales y pradera.

## Continuación ANEXO 3

□ Encuesta de alimentación.

Esta encuesta verificó el tipo de alimentación y además la cantidad entregada de cada alimento a las vacas estudiadas.

Tipo de Alimentación

- Alimentación diaria promedio entregada durante los cuatro muestreos:
- Ensilaje de pradera permanente: 30 kg
- Melazán: 2 kg
- Concentrado de suralin de alta proteína: 4 kg
- Sales y minerales: 250 gr
- Pradera: pastoreo

□ Producción de leche de vacas individuales en litros.

(La producción de leche fue medida en cada muestreo)

<b>Vaca</b>	<b>Muestreo 1 (L)</b>	<b>Muestreo 2 (L)</b>	<b>Muestreo 3 (L)</b>	<b>Muestreo 4 (L)</b>	<b>Promedio (L)</b>
<b>546</b>	18	13,5	14	16	15,38
<b>560</b>	9	9	12	8	9,50
<b>579</b>	12	15	17,5	18	15,63
<b>591</b>	14	14,5	16	15,5	15,00
<b>596</b>	13	18,5	14	18,5	16,00
<b>633</b>	10	11,5	8	12	10,38
<b>636</b>	12	12	20	12	14,00
<b>639</b>	17	15,5	15	19	16,63
<b>642</b>	11	13,5	15	13	13,13
<b>644</b>	13	15	16	16	15,00

## ANEXO 4

### Determinación de las propiedades de coagulación.

1) *Aptitud de coagulación.* Según ALAIS (1985).

La aptitud de coagulación se determina por la fuerza del cuajo modificado sin adición de  $\text{CaCl}_2$ , ALAIS (1985).

La fuerza del cuajo: corresponde a los litros de leche a una temperatura de  $35^\circ\text{C}$ , que es capaz de coagular 1 g de cuajo en un tiempo de 40 minutos (tiempo normal de coagulación mixta).

2) *Fuerza de la cuajada.*

La cuajada se obtiene temperando a  $35^\circ\text{C}$  un volumen de 100 mL de leche y luego adicionar 2 mL de una solución de cuajo al 2% (cuajo en polvo HA-LA Laboratorio Chistian Hansen) con agitación constante durante 30 segundos y luego se debe mantener la muestra en baño María ( $35^\circ\text{C}$ ) por 30 min.

Finalmente se mide la fuerza de la cuajada mediante el uso del equipo INSTRON 1011, según STORRY y FORD (1981).

La modificación realizada por CORTEZ (2001), consiste en medir la fuerza de la cuajada a 2 cm de profundidad, utilizando un transductor de baja capacidad (5 kg), un penetrómetro de 1,5 de diámetro y una velocidad de 2mm/min.

3) *Sinéresis del gel.*

Según MARSCHALL (1982), consiste en medir cuantitativamente el volumen de suero liberado de la cuajada, obtenido por la adición de 1 mL de solución de cuajo al 1% (cuajo en polvo HA-LA Laboratorio Chistian Hansen) a 50 mL de leche temperado en baño maría a  $35^\circ\text{C}$  con agitación por 30 segundos. Después de 30 min. se corta la cuajada en forma de cruz. Luego de 10 a 15 min. Se cuantifica el volumen del suero liberado por medio de una probeta.

## ANEXO 5

### **Preparación de la muestra para electroforesis.**

*Preparación de la muestra de  $\beta$ -Ig el método de LOWE **et al.**, (1985).*

- 1) Preparar el suero ajustando las muestras de leche a pH 4.6 con HCl 1M.
- 2) Centrifugar a 13.000 r.p.m. por un tiempo de 5 min.
- 3) El sobrenadante es diluído 10 veces en buffer muestra.

## ANEXO 6

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

1) *Curva estándar:*

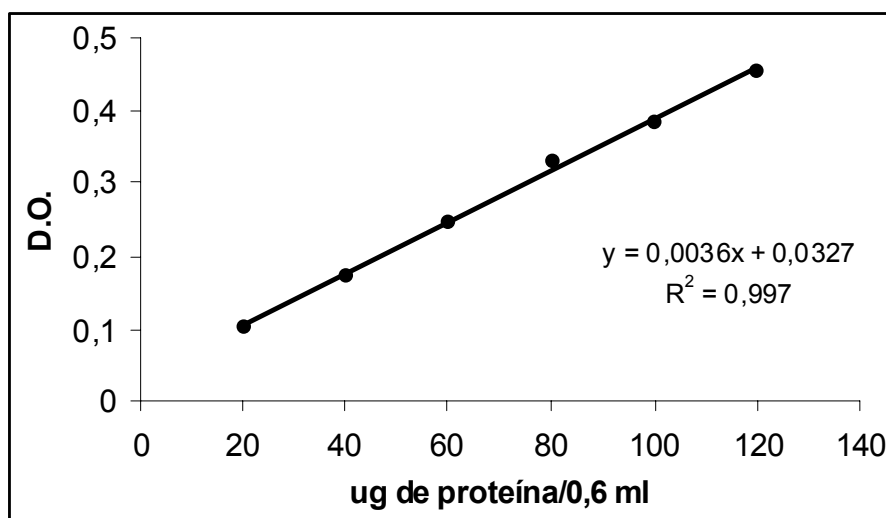
- 1 Solución patrón: seroalbúmina de bovina (BSA) 2 mg/mL.
- 2 Medir de la solución de BSA 10, 20, 30, 40, 50 y 60  $\mu$ L (20, 40, 60, 80, 100 y 120  $\mu$ g de proteína) en tubos de ensayo, agregar agua hasta completar 0.6 mL.
- 3 Se agrega a cada tubo 3 mL de solución C y se deja a temperatura ambiente 10 min.
- 4 Se agrega 0.3 mL de reactivo Folin-Ciocalteau 1 N.
- 5 Se deja 30 min. A temperatura ambiente.
- 6 Se mide la absorbancia a 750 nm.
- 7 Se gráfica  $\mu$ g de proteína v/s D.O 750 nm.

#### Absorbancia determinada en distintas cantidades de solución de BSA.

Ug de proteína/0,6 ml	D.O. a 750 nm.
20	0,101
40	0,172
60	0,248
80	0,332
100	0,384
120	0,456

Continuación ANEXO 6

Con estos resultados de absorbancia se obtuvo una ecuación, con la cual luego se determinó el contenido de proteína en las preparaciones de  $\beta$ -Lg.



Curva de calibración



## ANEXO 7

### Electroforesis de isoenfoque.

- **Preparación del gel** (PEARCE et al., 1972).
  - 5.5 mL solución de (40%, 0.6 bis en agua).
  - 1.1mL N'N'N'N'-tatrmetiletilendiamina (TEMED) (1,75% en agua).
  - 2.75 mL persulfato de amonio (0.37% en agua).
  - 0.55 mL anfolito pH 3.5-10 (Sigma. A-5174).
  - 12.1 mL de agua.
- **Buffer electrodos** (PEARCE et al., 1972 y ANDREWS, 1992). En el ánodo  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.2% y en el cátodo NaOH 0.02N.
- **Preparación del buffer para las muestras y estándares** (ADDEO et al., 1983). Las muestras fueron disueltas en urea 7M con 0,1% de 2-mercaptoetanol, de manera de agregar 10 $\mu$  de muestra en cada gel.
- **Corrida de los geles.**

Precorrida:	Corrida:
- 200V x 15min.	
- 300V x 30min.	- 400V x 4 horas para $\beta$ -Lg
- 400V x 60min.	
- **Fijación, tinción y desteñido de los geles.**
  - Fijación: 30 min. en Acido tricloroacético al 15%.
  - Desteñido: 30 min. en solución de desteñido.
  - Tinción: 30 min. en solución de tinción a 40 °C.
  - Desteñido: desteñir a 40 °C hasta que se vean las bandas.

Solución de tinción: 0.23g Coomassie Brilliant Blue G-250 en 200mL de S. D.  
 Solución de desteñido (S.D.): 500mL etanol más 160mL ácido acético y completar hasta 2 litros con agua destilada.

Ref: CASANOVA (2001)

## ANEXO 8

### Resultados del contenido de caseína y N° de caseína en le leche de las diez vacas Frisón negro estudiadas.

Vaca	Muestreo	Proteína total* (%)	Proteína del suero (%)	Contenido de caseína (%)	Número de caseína
560	1	3,03	0,791	2,239	73,89
560	1	3,05	0,794	2,256	73,97
639	1	3,24	0,718	2,522	77,84
639	1	3,24	0,719	2,521	77,81
642	1	3,15	0,801	2,349	74,57
642	1	3,14	0,802	2,338	74,46
546	1	3,50	0,848	2,652	75,77
546	1	3,46	0,840	2,62	75,72
579	1	3,01	0,35	2,66	78,60
579	1	3,00	0,41	2,59	78,63
591	1	3,19	0,820	2,37	74,29
591	1	3,23	0,824	2,406	74,49
596	1	3,22	0,697	2,523	78,35
596	1	3,21	0,699	2,511	78,22
633	1	3,50	0,851	2,649	75,69
633	1	3,47	0,855	2,615	75,36
636	1	3,32	0,735	2,585	77,86
636	1	3,34	0,737	2,603	77,93
644	1	3,12	0,810	2,31	74,04
644	1	3,17	0,805	2,365	74,61
560	2	3,13	0,805	2,325	74,28
560	2	3,15	0,802	2,348	74,54
639	2	3,28	0,725	2,555	77,90
639	2	3,26	0,722	2,538	77,85
642	2	3,27	0,812	2,458	75,17
642	2	3,20	0,81	2,39	74,69
546	2	3,52	0,849	2,671	75,88
546	2	3,50	0,845	2,655	75,86
579	2	3,07	0,462	2,608	78,44
579	2	3,09	0,464	2,626	78,51
591	2	3,22	0,828	2,392	74,29
591	2	3,19	0,825	2,365	74,14
596	2	3,21	0,702	2,508	78,13
596	2	3,22	0,701	2,519	78,23
633	2	3,47	0,843	2,627	75,71
633	2	3,50	0,848	2,652	75,77
636	2	3,34	0,729	2,611	78,17
636	2	3,35	0,732	2,618	78,15
644	2	3,40	0,841	2,559	75,26
644	2	3,36	0,84	2,52	75,00

## Continuación ANEXO 8

Vaca	Muestreo	Proteína total (%)	Proteína del suero (%)	Contenido de caseína (%)	Número de caseína
560	3	3,02	0,801	2,219	73,48
560	3	3,04	0,798	2,242	73,75
639	3	3,19	0,713	2,477	77,65
639	3	3,18	0,715	2,465	77,52
642	3	3,57	0,825	2,745	76,89
642	3	3,59	0,828	2,762	76,94
546	3	3,46	0,842	2,618	75,66
546	3	3,49	0,846	2,644	75,76
579	3	3,17	0,518	2,652	79,50
579	3	3,19	0,555	2,635	79,47
591	3	3,13	0,822	2,308	73,74
591	3	3,12	0,819	2,301	73,75
596	3	3,24	0,702	2,538	78,33
596	3	3,23	0,699	2,531	78,36
633	3	3,35	0,811	2,539	75,79
633	3	3,35	0,814	2,536	75,70
636	3	3,34	0,736	2,604	77,96
636	3	3,34	0,731	2,609	78,11
644	3	3,38	0,83	2,55	75,44
644	3	3,39	0,832	2,558	75,46
560	4	3,02	0,775	2,245	74,34
560	4	3,04	0,781	2,259	74,31
639	4	3,27	0,721	2,549	77,95
639	4	3,27	0,718	2,552	78,04
642	4	3,19	0,81	2,38	74,61
642	4	3,19	0,808	2,382	74,67
546	4	3,48	0,845	2,635	75,72
546	4	3,49	0,847	2,643	75,73
579	4	3,09	0,46	2,63	78,64
579	4	3,08	0,451	2,629	78,86
591	4	3,20	0,827	2,373	74,16
591	4	3,16	0,822	2,338	73,99
596	4	3,24	0,701	2,539	78,36
596	4	3,25	0,704	2,546	78,34
633	4	3,44	0,82	2,62	76,16
633	4	3,41	0,824	2,586	75,84
636	4	3,38	0,73	2,65	78,40
636	4	3,41	0,732	2,678	78,53
644	4	3,24	0,81	2,43	75,00
644	4	3,27	0,813	2,457	75,14

\*Proteína total determinada en el estudio realizado en forma paralela (CID, 2004)

## ANEXO 9

### Contraste de varianzas del contenido de caseína y número de caseína de la leche.

#### 1) Contenido de caseína

Cochran's C test: 0,315427 P-Value = 0,691805

Bartlett's test: 1,02582 P-Value = 0,59427

Hartley's test: 1,88473

#### **Conclusión:**

Al analizar los dos valores P, se puede observar que el mas pequeño ( $P= 0,59427$ ) es mayor que 0,05 por lo tanto, esto significa que no hay diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar con un 95% de nivel de confianza. Es decir, las varianzas del contenido de caseína dentro de cada uno de los 4 muestreos es la misma o son homogéneas.

#### 2) Número de caseína

Cochran's C test: 0,279027 P-Value = 1,0

Bartlett's test: 1,00496 P-Value = 0,946777

Hartley's test: 1,31876

#### **Conclusión:**

Al analizar los dos valores P, se puede observar que el mas pequeño ( $P=0,946777$ ) es mayor que 0,05 por lo tanto, esto significa que no hay diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar con un 95% de nivel de confianza. Es decir, las varianzas del Número de caseína dentro de cada uno de los 4 muestreos es la misma o son homogéneas.

## ANEXO 10

### Análisis de varianza del contenido de caseína entre muestreos.

Análisis de varianza del contenido de caseína entre muestreos

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gL.	Cuadrados medios	F	Valor P
Muestreos	0,01163	3	0,00387667	0,20	0,8962
Residual	0,70056	36	0,01946		
Total (Corregido)	0,71219	39			

Valor de  $P < 0,05$  indica diferencia estadísticamente al 95% de confianza.

## ANEXO 11

**Resultados de las propiedades tecnológicas en la leche de las diez vacas  
Frisón negro estudiadas.**

Vaca	Muestreo	Aptitud (mL leche/g cuajo)	Firmeza (gf)	Sinéresis (mL)	Variante $\kappa$ -CN	Variante $\beta$ -Lg
560	1	7.955,45	6,21	5,2	A	A
560	1	7.742,25	6,29	5,1	A	A
639	1	9.250,68	7,19	6,4	B	A
639	1	9.301,01	7,23	6,2	B	A
642	1	13.568,52	9,18	9,3	B	A
642	1	13.417,12	9,24	9,0	B	A
546	1	31.445,57	10,76	11,0	B	AB
546	1	31.367,55	10,54	10,6	B	AB
579	1	33.369,29	11,21	11,5	A	AB
579	1	35.355,23	11,32	11,5	A	AB
591	1	13.000,32	8,88	8,7	B	AB
591	1	13.666,50	8,60	8,9	B	AB
596	1	10.277,49	7,93	7,8	B	AB
596	1	10.411,87	8,01	7,0	B	AB
633	1	17.950,31	10,11	10,2	B	AB
633	1	17.750,90	10,05	10,0	B	AB
636	1	16.612,29	9,62	9,5	B	AB
636	1	16.610,45	9,82	9,4	B	AB
644	1	13.027,86	8,06	8,2	B	AB
644	1	13.013,83	8,68	8,2	B	AB
560	2	7.879,81	6,54	5,0	A	A
560	2	7.900,32	6,31	5,0	A	A
639	2	9.545,11	7,08	6,5	B	A
639	2	8.765,98	7,25	6,3	B	A
642	2	13.608,00	9,21	9,0	B	A
642	2	13.602,91	9,14	9,0	B	A
546	2	32.378,12	10,52	11,0	B	AB
546	2	31.004,23	10,73	10,8	B	AB
579	2	35.267,45	11,22	11,0	A	AB
579	2	34.000,13	10,93	11,0	A	AB
591	2	13.251,76	8,76	8,5	B	AB
591	2	13.452,67	8,34	8,9	B	AB
596	2	10.200,28	7,85	7,6	B	AB
596	2	10.504,90	7,87	7,4	B	AB
633	2	16.987,05	10,02	10,1	B	AB
633	2	17.923,77	10,24	10,3	B	AB
636	2	16.495,56	9,48	9,1	B	AB
636	2	16.287,89	10,21	9,3	B	AB
644	2	13.250,44	8,27	8,0	B	AB
644	2	13.342,23	8,21	8,2	B	AB

## Continuación ANEXO 11

Vaca	Muestreo	Aptitud (mL leche/)	Firmeza (gf)	Sinéresis (mL)	Variante $\kappa$ -CN	Variante $\beta$ -Lg
560	3	7.955,12	6,22	4,9	A	A
560	3	7.979,23	6,18	4,7	A	A
639	3	9.443,11	7,21	6,0	B	A
639	3	9.082,09	7,30	6,1	B	A
642	3	13.565,46	9,47	9,0	B	A
642	3	13.546,23	9,03	9,4	B	A
546	3	32.667,87	10,61	10,7	B	AB
546	3	30.212,33	10,41	10,8	B	AB
579	3	32.211,17	11,24	11,1	A	AB
579	3	36.389,56	11,36	11,3	A	AB
591	3	14.001,23	8,74	8,4	B	AB
591	3	12.385,22	8,56	8,6	B	AB
596	3	10.415,78	7,64	7,1	B	AB
596	3	10.418,34	8,23	7,3	B	AB
633	3	17.890,56	10,01	10,0	B	AB
633	3	17.696,21	10,22	10,0	B	AB
636	3	15.989,34	10,34	9,45	B	AB
636	3	16.947,11	9,54	9,60	B	AB
644	3	13.223,78	8,38	8,0	B	AB
644	3	13.080,45	8,02	8,0	B	AB
560	4	7.902,23	6,49	4,2	A	A
560	4	7.969,56	6,27	4,8	A	A
639	4	9.228,55	7,14	6,6	B	A
639	4	9.204,39	7,16	6,0	B	A
642	4	13.789,12	9,29	9,0	B	A
642	4	13.598,77	8,85	9,0	B	A
546	4	31.744,02	10,67	10,8	B	AB
546	4	31.748,04	10,49	10,6	B	AB
579	4	33.907,65	11,01	11,5	A	AB
579	4	35.300,38	11,36	11,1	A	AB
591	4	13.616,23	8,66	8,9	B	AB
591	4	13.236,56	8,49	8,7	B	AB
596	4	10.322,67	7,82	7,0	B	AB
596	4	10.317,34	7,97	7,0	B	AB
633	4	18.002,12	10,43	10,1	B	AB
633	4	17.640,33	10,03	10,5	B	AB
636	4	16.608,22	9,89	9,5	B	AB
636	4	16.458,95	9,81	9,5	B	AB
644	4	13.111,32	8,33	8,0	B	AB
644	4	13.203,31	8,29	8,4	B	AB

## ANEXO 12

**Repetibilidad de los métodos de aptitud a la coagulación, firmeza del gel y sinéresis de la cuajada.**

Muestra	$W_i$ aptitud	$(W_i^2)$	$W_i$ firmeza	$(W_i^2)$	$W_i$ sinéresis	$(W_i^2)$
1	213,2	45454,24	-0,08	0,0064	0,1	0,01
2	-50,33	2533,1089	-0,04	0,0016	0,2	0,04
3	151,4	22921,96	-0,06	0,0036	0,3	0,09
4	78,02	6087,1204	0,22	0,0484	0,4	0,16
5	-1985,94	3943957,68	-0,11	0,0121	0	0
6	-666,18	443795,792	0,28	0,0784	-0,2	0,04
7	-134,38	18057,9844	-0,08	0,0064	0,8	0,64
8	199,41	39764,3481	0,06	0,0036	0,2	0,04
9	1,84	3,3856	-0,2	0,04	0,1	0,01
10	14,03	196,8409	-0,62	0,3844	0	0
11	-20,51	420,6601	0,23	0,0529	0	0
12	779,13	607043,557	-0,17	0,0289	0,2	0,04
13	5,09	25,9081	0,07	0,0049	0	0
14	1373,89	1887573,73	-0,21	0,0441	0,2	0,04
15	1267,32	1606099,98	0,29	0,0841	0	0
16	-200,91	40364,8281	0,42	0,1764	-0,4	0,16
17	-304,62	92793,3444	-0,02	0,0004	0,2	0,04
18	-936,72	877444,358	-0,22	0,0484	-0,2	0,04
19	207,67	43126,8289	-0,73	0,5329	-0,2	0,04
20	-91,79	8425,4041	0,06	0,0036	-0,2	0,04
21	-24,11	581,2921	0,04	0,0016	0,2	0,04
22	361,02	130335,44	-0,09	0,0081	-0,1	0,01
23	19,23	369,7929	0,44	0,1936	-0,4	0,16
24	2455,54	6029676,69	0,2	0,04	-0,1	0,01
25	-4178,39	17458943	-0,12	0,0144	-0,2	0,04
26	1616,01	2611488,32	0,18	0,0324	-0,2	0,04
27	-2,56	6,5536	-0,59	0,3481	-0,2	0,04
28	194,35	37771,9225	-0,21	0,0441	0	0
29	-957,77	917323,373	0,8	0,64	-0,15	0,0225
30	143,33	20543,4889	0,36	0,1296	0	0
31	-67,33	4533,3289	0,22	0,0484	-0,6	0,36
32	24,16	583,7056	-0,02	0,0004	0,6	0,36
33	190,35	36233,1225	0,44	0,1936	0	0
34	-4,02	16,1604	0,18	0,0324	0,2	0,04
35	-1392,73	1939696,85	-0,35	0,1225	0,4	0,16
36	379,67	144149,309	0,17	0,0289	0,2	0,04
37	5,33	28,4089	-0,15	0,0225	0	0
38	361,79	130892,004	0,4	0,16	-0,4	0,16
39	149,27	22281,5329	0,08	0,0064	0	0
40	-91,99	8462,1601	0,04	0,0016	-0,4	0,16
$\sum w_i^2$		<b>39180007,5</b>		<b>3,6301</b>		<b>3,0725</b>



## Continuación ANEXO 12

**Repetibilidad del método de aptitud de coagulación**

$$Sr = ((1/(2*q))^* \sum w_i^2)^{1/2} \quad r = 2,83 * Sr$$

donde:

- r : repetibilidad
- Sr : desviación estándar
- q : número de muestras
- w : diferencia entre duplicados

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

$$Sr = ((1/(2*40))^* 39180007,5)^{1/2}$$

$$Sr = 699,821473$$

$$r = 2,83 * Sr$$

$$r = 2,83 *(699,821473 )$$

$$r = 1980,49477 = 1 : 1980 \text{ (g cuajo / mL leche)}$$

$$CV = (Sr/x)*100 = (699,8215 / 16.784,4 ) * 100 = 4,17 \%$$

**Repetibilidad del método de firmeza del gel**

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

$$Sr = ((1/(2*40))^* 3,6301 )^{1/2}$$

$$Sr = 0,21301702$$

$$r = 2,83 * Sr$$

$$r = 2,83 *(0,21301702)$$

$$r = 0,60283816 \text{ gf}$$

$$CV = (Sr/x)*100 = (0,21301702/ 8,92837 ) * 100 = 2,39 \%$$

**Repetibilidad del método de sinéresis de la cuajada**

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

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

$$Sr = 0,19597513$$

$$r = 2,83 * Sr$$

$$r = 2,83 *(0,19597513)$$

$$r = 0,55460961$$

$$CV = (Sr/x)*100 = (0,19597513 / 8,59187 ) * 100 = 2,28 \%$$

## ANEXO 13

### Contraste de varianzas de las propiedades tecnológicas de las leches

#### 1) Aptitud de Coagulación de la leche

Cochran's C test: 0,25262 P-Value = 1,0  
 Bartlett's test: 1,00005 P-Value = 0,999943  
 Hartley's test: 1,0213

#### **Conclusión:**

Al analizar los valores P, se puede observar que el mas pequeño ( $P=0,999943$ ) es mayor que 0,05 por lo tanto, esto significa que no hay diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar con un 95% de nivel de confianza. Es decir, las varianzas de la aptitud de coagulación de la leche dentro de cada uno de los 4 muestreos es la misma o homogéneas.

#### 2) Firmeza del gel

Cochran's C test: 0,260304 P-Value = 1,0  
 Bartlett's test: 1,00037 P-Value = 0,998816  
 Hartley's test: 1,07808

#### **Conclusión:**

Al analizar los dos valores P, se puede observar que el mas pequeño ( $P=0,998816$ ) es mayor que 0,05 por lo tanto, esto significa que no hay diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar con un 95% de nivel de confianza. Es decir, las varianzas de la firmeza del gel dentro de cada uno de los 4 muestreos es la misma o son homogéneas.

#### 3) Sinerésis de la cuajada

Cochran's C test: 0,275856 P-Value = 1,0  
 Bartlett's test: 1,00265 P-Value = 0,978126  
 Hartley's test: 1,21564

#### **Conclusión:**

Al analizar los dos valores P, se puede observar que el mas pequeño ( $P=0,978126$ ) es mayor que 0,05 por lo tanto, esto significa que no hay diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar con un 95% de nivel de confianza. Es decir, las varianzas de la sinéresis de la cuajada dentro de cada uno de los 4 muestreos es la misma o son homogéneas.

## ANEXO 14

## Análisis de varianzas y Tukey al 95%

## • Análisis de varianza multifactorial 95% para contenido de caseína

Fuente	S. C.	G.L.	C.M.	F	Valor P
Efectos principales					
A:Vaca	1,10696	9	0,122996	25,45	0,0000
Residual	0,338309	70	0,00483298		
Total corregido	1,44527	79			

## Test de rango Múltiple Tukey al 95%

Vaca	C	Prom.	Grupo homogéneo
560	8	2,26662	X
591	8	2,35663	XX
644	8	2,46862	XX
642	8	2,4755	X
639	8	2,52237	XX
596	8	2,52688	XX
633	8	2,603	XX
636	8	2,61975	XX
579	8	2,62875	XX
546	8	2,64225	X

## • Análisis de varianza multifactorial 95% para la aptitud a la coagulación

Fuente	S. C.	G.L.	C.M.	F	Valor P
Efectos principales					
A:Vaca	5,9605E9	9	6,62278E8	2270,73	0,0000
Residual	2,04161E7	70	291658,0		
Total corregido	5,98092E9	79			

## Test de rango Múltiple Tukey al 95%

Vaca	C	Prom.	Grupo homogéneo
560	8	7910,5	X
639	8	9227,61	X
596	8	10358,6	X
644	8	13156,7	X
591	8	13326,3	X
642	8	13587,0	X
636	8	16501,2	X
633	8	17730,1	X
546	8	31570,9	X
579	8	34475,1	X

Continuación ANEXO 14

• **Análisis de varianza multifactorial 95% para la firmeza de la cuajada**

Fuente	S. C.	G.L.	C.M.	F	Valor P
Efectos principales					
A:Vaca	173,496	9	19,2774	619,08	0,0000
Residual	2,17971	70	0,0311387		
Total corregido	175,676	79			

**Test de rango Múltiple Tukey al 95%**

Vaca	C	Prom.	Grupo homogéneo
560	8	6,31375	X
639	8	7,195	X
596	8	7,915	X
644	8	8,28	X
591	8	8,62875	X
642	8	9,17625	X
636	8	9,83875	X
633	8	10,1388	X
546	8	10,5913	X
579	8	11,2063	X

• **Análisis de varianza multifactorial 95% para la sinerésis**

Fuente	S. C.	G.L.	C.M.	F	Valor P
Efectos principales					
A:Vaca	292,333	9	32,4814	707,28	0,0000
Residual	3,21469	70	0,0459241		
Total corregido	295,547	79			

**Test de rango Múltiple Tukey al 95%**

Vaca	C	Prom.	Grupo homogéneo
560	8	4,8625	X
639	8	6,2625	X
596	8	7,275	X
644	8	8,125	X
591	8	8,7	X
642	8	9,0875	X
636	8	9,41875	X
633	8	10,15	X
546	8	10,7875	X
579	8	11,25	X

**ANEXO 15**  
**Volumen de muestra de las preparaciones de proteínas utilizado en las electroforesis.**

Vaca	Muestreo	A	B	C	D	E	F
560	1	0,243	58,42	1460,42	2434,03	24,34	41
	2	0,239	57,31	1432,64	2387,73	23,88	42
	3	0,302	74,81	1870,14	3116,90	31,17	32
	4	0,241	57,86	1446,53	2410,88	24,11	41
644	1	0,358	90,36	2259,03	3765,05	37,65	27
	2	0,352	88,69	2217,36	3695,60	36,96	27
	3	0,35	88,14	2203,47	3672,45	36,72	27
	4	0,422	108,14	2703,47	4505,79	45,06	22
591	1	0,325	81,19	2029,86	3383,10	33,83	30
	2	0,321	80,08	2002,08	3336,81	33,37	30
	3	0,422	108,14	2703,47	4505,79	45,06	22
	4	0,331	82,86	2071,53	3452,55	34,53	29
546	1	0,541	141,19	3529,86	5883,10	58,83	17
	2	0,544	142,03	3550,69	5917,82	59,18	17
	3	0,555	145,08	3627,08	6045,14	60,45	17
	4	0,241	57,86	1446,53	2410,88	24,11	41
579	1	0,514	133,69	3342,36	5570,60	55,71	18
	2	0,417	106,75	2668,75	4447,92	44,48	22
	3	0,521	135,64	3390,97	5651,62	56,52	18
	4	0,321	80,08	2002,08	3336,81	33,37	30
639	1	0,389	98,97	2474,31	4123,84	41,24	24
	2	0,263	63,97	1599,31	2665,51	26,66	38
	3	0,385	97,86	2446,53	4077,55	40,78	25
	4	0,396	100,92	2522,92	4204,86	42,05	24
596	1	0,398	101,47	2536,81	4228,01	42,28	24
	2	0,388	98,69	2467,36	4112,27	41,12	24
	3	0,389	98,97	2474,31	4123,84	41,24	24
	4	0,403	102,86	2571,53	4285,88	42,86	23
636	1	0,333	83,42	2085,42	3475,69	34,76	29
	2	0,477	123,42	3085,42	5142,36	51,42	19
	3	0,469	121,19	3029,86	5049,77	50,50	20
	4	0,521	135,64	3390,97	5651,62	56,52	18
633	1	0,423	108,42	2710,42	4517,36	45,17	22
	2	0,416	106,47	2661,81	4436,34	44,36	23
	3	0,249	60,08	1502,08	2503,47	25,03	40
	4	0,419	107,31	2682,64	4471,06	44,71	22
642	1	0,366	92,58	2314,58	3857,64	38,58	26
	2	0,364	92,03	2300,69	3834,49	38,34	26
	3	0,436	112,03	2800,69	4667,82	46,68	21
	4	0,365	92,31	2307,64	3846,06	38,46	26

A: Absorbancia a 750 nm    D: Dilución (25 veces) de muestra original en agua (µg/mL)  
 B: µg proteína/0,6 mL        E: Dilución (10 veces) en buffer (µg/mL)  
 C: µg proteína/mL            F: Volumen utilizado en electroforesis

## ANEXO 16

**Migración de las variantes A y B de las muestras de  $\beta$ -Lg con los estándares en cada corrida de electroforesis en los cuatro muestreos.**

Vacas	Muestreo 1		Muestreo 2		Muestreo 3		Muestreo 4	
	Migración desde el ánodo (cm)	Migración de estándares (cm)	Migración desde el ánodo (cm)	Migración de estándares (cm)	Migración desde el ánodo (cm)	Migración de estándares (cm)	Migración desde el ánodo (cm)	Migración de estándares (cm)
560	A: 2,09	A: 2,1	A: 1,91	A: 1,97	A: 1,65	A: 1,59	A: 2,01	A: 2,17
	B: -	B: -	B: -	B: -	B: -	B: -	B: -	B: -
639	2,13	2,1	2,01	1,97	1,48	1,59	1,96	2,17
	B: -	B: -	B: -	B: -	B: -	B: -	B: -	B: -
642	A: 1,94	A: 2,1	A: 1,84	1,97	1,61	1,59	2,07	2,17
	B: -	B: -	B: -	B: -	B: -	B: -	B: -	B: -
546	A: 1,84	A: 2,1	A: 1,85	A: 1,97	A: 1,77	A: 1,59	A: 2,14	A: 2,17
	B: 2,29	B: 2,3	B: 2,33	B: 2,21	B: 2,1	B: 1,96	B: 2,33	B: 2,36
579	A: 2,11	A: 2,1	A: 2,01	A: 1,97	A: 1,45	A: 1,59	A: 2,15	A: 2,17
	B: 2,44	B: 2,3	B: 2,37	B: 2,21	B: 1,92	B: 1,96	B: 2,35	B: 2,36
591	A: 2,01	A: 2,1	A: 1,77	A: 1,97	A: 1,67	A: 1,59	A: 2,16	A: 2,17
	B: 2,38	B: 2,3	B: 2,35	B: 2,21	B: 2,01	B: 1,96	B: 2,24	B: 2,36
596	A: 2,11	A: 2,1	A: 2,02	A: 1,97	A: 1,47	A: 1,59	A: 1,27	A: 1,36
	B: 2,52	B: 2,3	B: 2,41	B: 2,21	B: 1,85	B: 1,96	B: 1,79	B: 1,99
633	A: 2,08	A: 2,1	A: 1,65	A: 1,97	A: 1,99	A: 2,17	A: 1,27	A: 1,36
	B: 2,29	B: 2,3	B: 2,19	B: 2,21	B: 2,27	B: 2,36	B: 1,84	B: 1,99
636	A: 2,17	A: 2,1	A: 1,61	A: 1,59	A: 2,23	A: 2,17	A: 1,41	A: 1,36
	B: 2,28	B: 2,3	B: 1,99	B: 1,96	B: 2,52	B: 2,36	B: 2,1	B: 1,99
644	A: 1,78	A: 1,97	A: 1,43	A: 1,59	A: 2,19	A: 2,17	A: 1,37	A: 1,36
	B: 2,33	B: 2,21	B: 1,88	B: 1,96	B: 2,41	B: 2,36	B: 1,95	B: 1,99

- : no se encontro banda

**ANEXO 17**  
**Proporción de la expresión de las variantes A y B de  $\beta$ -Lg en los cuatros muestreos.**

Vacas	Proporción $\beta$ -Lg A : $\beta$ -Lg B			
	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4
546	1,09 : 1	1,09 : 1	1,09 : 1	1,09 : 1
579	1,03 : 1	1,04 : 1	1,02 : 1	1,03 : 1
591	1,16 : 1	1,17 : 1	1,19 : 1	1,16 : 1
596	2,55 : 1	2,56 : 1	2,56 : 1	2,57 : 1
633	5,43 : 1	5,47 : 1	5,45 : 1	5,45 : 1
636	1,68 : 1	1,68 : 1	1,67 : 1	1,68 : 1
644	4,73 : 1	4,75 : 1	4,70 : 1	4,73 : 1

- Promedio % pix total (área), determinado por el programa computacional UN-SCAN-IT-gel.

**Vaca 546**

Segment	Pixel Total	Background	Pix Total*	Pix Total%*
1-1	119636.5	101845.7	17790.8	52.14
1-2	124168.0	107836.6	16331.37	47.86

**Vaca 579**

Segment	Pixel Total	Background	Pix Total*	Pix Total%*
1-1	46110	36403.05	9706.95	50.92
1-2	36178	26823.3	9354.7	49.08

**Vaca 636**

Segment	Pixel Total	Background	Pix Total*	Pix Total%*
1-1	72624	47998.23	24625.77	62.66
1-2	43476	28798.94	14677.07	37.34

## Continuación ANEXO 17

**Vaca 596**

<b>Segment</b>	<b>Pixel Total</b>	<b>Background</b>	<b>Pix Total*</b>	<b>Pix Total%*</b>
1-1	71814	64800.63	7013.37	71.92
1-2	35138	32400.31	2737.69	28.08

**Vaca 644**

<b>Segment</b>	<b>Pixel Total</b>	<b>Background</b>	<b>Pix Total*</b>	<b>Pix Total%*</b>
1-1	45590	36856.67	8733.33	82.61
1-2	10510	8672.16	1837.84	17.39

**Vaca 633**

<b>Segment</b>	<b>Pixel Total</b>	<b>Background</b>	<b>Pix Total*</b>	<b>Pix Total%*</b>
1-1	82454	65781.17	16672.83	84.44
1-2	18252	15180.27	3071.73	15.56

**Vaca 591**

<b>Segment</b>	<b>Pixel Total</b>	<b>Background</b>	<b>Pix Total*</b>	<b>Pix Total%*</b>
1-1	36326	33352.26	2973.74	53.74
1-2	29848	27288.21	2559.79	46.26



## ANEXO 18

### Análisis de varianza multifactorial para las propiedades tecnológicas y el contenido de caseína en las leches estudiadas.

#### 1) Aptitud a la coagulación

##### 1 Análisis de varianza multifactorial 95%

Fuente	S. C.	G.L.	C.M.	F	Valor P
Efectos principales					
A: Muestreo	107393,0	3	35797,7	0,00	1,0000
B: B_Lg	3,12302E9	1	3,12302E9	84,00	0,0000
C: K_Cn	1,83202	1	0,057430	2,12	0,1121
Interacciones					
AB	89931,0	3	29977,0	0,00	1,0000
AC	47089,2	3	15696,4	0,00	1,0000
BC	1,306E9	1	1,306 E9	35,13	0,0000
ABC	60533,6	3	20177,9	0,00	1,0000
Residual	2,37938 E9	64	3,71778 E7		
Total corregido	5,98092 E9	79			

##### 2 Test de rango Múltiple Tukey al 95%

B_Lg	Cuenta	Promedio	Grupo homogéneo
AA	24	9658,9	X
AB	56	25791,2	X

Contrast	Difference	+/- Limits
AA - AB	*-16132,3	2971,84

\* denotes a statistically significant difference.

Continuación ANEXO 18

## 2) Firmeza

### 1 Análisis de varianza multifactorial 95%

Fuente	S. C.	G.L.	C.M.	F	Valor P
Efectos principales					
A: Muestreo	0,00555977	3	0,00185326	0,00	0,9999
B: B_Lg	105,814	1	105,814	102,55	0,0000
C: K_Cn	0,0313908	1	0,0313908	0,03	0,8621
Interacciones					
AB	0,0714848	3	0,0238283	0,02	0,9952
AC	0,0166348	3	0,00554492	0,01	0,9995
BC	44,3761	1	44,3761	43,01	0,0000
ABC	0,134079	3	0,0446928	0,04	0,9879
Residual	66,036	64	1,03181		
Total corregido	175,676	79			

### 2 Test de rango Múltiple Tukey al 95%

B_Lg	Cuenta	Promedio	Grupo homogéneo
AA	24	7,24969	X
AB	56	10,2192	X

Contrast	Difference	+/- Limits
AA - AB	*-2,96948	0,494911

\* denotes a statistically significant difference.

Continuación ANEXO 18

### 3) Sinerésis

#### 1 Análisis de varianza multifactorial 95%

Fuente	S. C.	G.L.	C.M.	F	Valor P
Efectos principales					
A: Muestreo	0,432796	3	0,144265	0,09	0,9651
B: B_Lg	181,984	1	181,984	113,98	0,0000
C: K_Cn	1,22321	1	1,22321	0,77	0,3847
Interacciones					
AB	0,262952	3	0,0876508	0,05	0,9829
AC	0,229202	3	0,0764008	0,05	0,9860
BC	74,5943	1	74,5943	46,72	0,0000
ABC	0,222796	3	0,0742654	0,05	0,9866
Residual	102,181	64	1,59659		
Total corregido	295,547	79			

#### 2 Test de rango Múltiple Tukey al 95%

B_Lg	Cuenta	Promedio	Grupo homogéneo
AA	24	6,26875	X
AB	56	10,163	X

Contrast	Difference	+/- Limits
AA - AB	*-3,89427	0,615634

\* denotes a statistically significant difference.

Continuación ANEXO 18

#### 4) Caseína

##### 1 Análisis de varianza multifactorial 95%

Fuente	S. C.	G.L.	C.M.	F	Valor P
Efectos principales					
A: Muestreo	0,0474655	3	0,0158218	1,40	0,2501
B: B_Lg	0,125768	1	0,125768	11,15	0,0014
C: K_Cn	0,33542	1	0,33542	29,74	0,0000
Interacciones					
AB	0,00379432	3	0,00126477	0,11	0,9527
AC	0,00328909	3	0,00109636	0,10	0,9613
BC	0,0508952	1	0,0508952	4,51	0,0375
ABC	0,0666443	3	0,0222148	1,97	0,1274
Residual	0,721822	64	0,0112785		
Total corregido	1,37657	79			

##### 2 Test de rango Múltiple Tukey al 95%

B_Lg	Cuenta	Promedio	Grupo homogéneo
AA	24	2,38278	X
AB	56	2,48516	X

Contrast	Difference	+/- Limits
AA - AB	*-0,102375	0,051743

\* denotes a statistically significant difference.