

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

**Determinación de las Variantes Genéticas de β -lactoglobulina
por Electroforesis Alcalina e Isoenfoque y Contenido Proteico
en Leche de Vacas Frisón Negro**

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

Yasna Susana Oyarce Arellano

VALDIVIA - CHILE

2006

PROFESOR PATROCINANTE

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

PROFESORES INFORMANTES

Sra. Carmen Brito C.
Ingeniero en Alimentos, M. Sc. Food Science
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Ciencias Agrarias.

Sra. Renate Schöbitz T.
Tecnólogo Médico, M. Sc. en Microbiología de los Alimentos
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Ciencias Agrarias.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y en forma especial a mi hermano Carlos, por confiar en mis capacidades, por su amor y apoyo total.

A mi profesora patrocinante Sra. Luz Haydeé Molina, por su inmenso apoyo, dedicación y compromiso en la realización de esta tesis.

A Brian, por su amor y apoyo incondicional en el transcurso de esta tesis.

A mis amigas Mabel, Marisel y Silvia, por su amistad en estos años de estudio, por darme fuerza y cariño durante el tiempo de realización de esta tesis, quiero agradecer también a mi amigo Luchito, con quien compartí en el trabajo práctico de esta tesis y fue un apoyo fundamental en todo momento.

También deseo agradecer a los profesores del Instituto de Ciencia y tecnología de los Alimentos, a su director Sr. Alejandro Romero por facilitar la infraestructura necesaria para la realización práctica de esta tesis. A Don José, Don Tito y Otto por su disponibilidad y ayuda.

Y finalmente agradecer al Proyecto Fondecyt 1030345 (2003 - 2005), por el patrocinio otorgado para la realización de esta tesis.

INDICE DE MATERIA

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	3
2.1	Separaciones electroforéticas	3
2.1.1	Electroforesis Alcalina	4
2.1.2	Electroforesis de isoenfoque (IE)	5
2.2	Composición de la Leche y su variabilidad	6
2.3	Proteínas lácteas	8
2.3.1	Caseínas	9
2.3.2	Proteínas del suero	11
2.3.3	Influencia de las variantes genéticas de las proteínas en la producción y composición de la leche	13
2.4	Características de rebaños lecheros en Chile	15
3	MATERIAL Y METODO	17
3.1	Materiales	17
3.1.1	Origen de las muestras	17
3.1.2	Lugar del ensayo	17
3.1.3	Duración del ensayo	17
3.2	Metodología	18
3.2.1	Obtención de las muestras de leche	18
3.2.2	Diseño experimental	18
3.2.3	Determinación del contenido de caseína	18
3.2.4	Determinación del contenido de proteínas del suero	18
3.2.5	Preparación de muestras de β -lactoglobulina para electroforesis	19

3.2.6	Electroforesis	19
3.2.6.1	Electroforesis de isoenfoque	19
3.2.6.2	Electroforesis Alcalina	19
3.2.6.3	Densitometría	20
3.2.7	Análisis estadístico	20
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	21
4.1	Análisis de las variantes genéticas por métodos electroforéticos	21
4.1.1	Electroforesis alcalina	21
4.1.2	Identificación de las variantes genéticas en 20 muestras por electroforesis alcalina	22
4.1.3	Electroforesis de Isoenfoque	27
4.1.4	Ventajas y desventajas, electroforesis alcalina v/s isoenfoque	30
4.2	Contenido proteico en las muestras de leche	31
4.2.1	Contenido de caseína	31
4.2.2	Contenido de proteínas del suero	32
4.2.3	Influencia de la etapa de lactancia sobre el contenido de proteínas	33
4.3	Influencia de las variantes genéticas de β -Lg en el contenido de proteínas	35
4.3.1	Relación entre las variantes genéticas de β -Lg y contenido de caseína	35
4.3.2	Relación entre las variantes genéticas de β -Lg y el contenido de proteínas del suero	36
5	CONCLUSIONES	38
6	RESUMEN	39

	SUMMARY	40
7	BIBLIOGRAFÍA	41
	ANEXOS	50

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Puntos isoelectricos de proteínas séricas	5
2	Relación entre el contenido de proteínas y las variantes genéticas de β -Lg	8
3	Frecuencia alélica de β -Lactoglobulina A y B en diferentes razas	12
4	Características de las razas de leche más comunes en Chile	16
5	Diseño experimental	18
6	Expresión de las variantes genéticas obtenidas por electroforesis alcalina y su frecuencia	26
7	Variante genéticas obtenidas por electroforesis de Isoenfoque y electroforesis alcalina	29
8	Promedio y desviación estándar del contenido de caseína según mes de muestreo	32
9	Promedio y desviación estándar del contenido de proteínas del suero según mes de muestreo	33
10	Promedio y desviación estándar del contenido de proteínas según etapa de lactancia	34
11	Promedio y desviación estándar del contenido de proteínas según la expresión de variantes genéticas de β -Lg	35

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Electroforesis alcalina de β -lactoglobulina en muestras de leche de vacas Frisón Negro	23
2	Electroforesis alcalina de β -lactoglobulina en muestras de leche de vacas Frisón Negro	24
3	Electroforesis alcalina de β -lactoglobulina en muestras de leche de vacas Frisón Negro	25
4	Electroforesis alcalina de β -lactoglobulina en muestras de leche de vacas Frisón Negro	26
5	Electroforesis de Isoenfoque de 8 muestras	28

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Características de las vacas en estudio	51
2	Resultados de análisis RMD a la totalidad de vacas del Fundo Santa Rosa Laboratorio calidad de Leche-Cooprinsem	52
3	Preparación de muestras de β -lactoglobulina	53
4	Electroforesis Alcalina	54
5	Resultados de electroforesis alcalina	55
6	Distancias de migración de las bandas por electroforesis alcalina	58
7	Densitometrías de β -lactoglobulina por electroforesis alcalina	59
8	Electroforesis de isoenfoque de diferentes muestras en distintas corridas	61
9	Distancia de migración en la electroforesis de isoenfoque en muestras de β -lactoglobulina y estándares	63
10	Densitometrías de β -lactoglobulina por el método de isoenfoque	64
11	Contenido proteínas del suero y caseína	67
12	Análisis estadísticos para el contenido de proteína por muestreo y variantes genéticas	73
13	Análisis estadísticos del contenido de proteína por grupo de lactancia	77

1. INTRODUCCIÓN

Las características del ganado lechero, relacionadas con la producción y composición de leche, tienen importancia tanto económica para los productores lecheros, como tecnológica para la industria láctea a fin de obtener productos de mejor calidad.

La genética de los rebaños puede cambiar en forma notoria la cantidad de leche producida, la calidad y propiedades tecnológicas de la leche, por lo cual, es de gran importancia la caracterización de los rebaños lecheros.

La identificación de variantes genéticas de proteínas lácteas, ha sido una de las herramientas más utilizadas para determinar los efectos de éstas sobre la producción y calidad composicional de la leche de diferentes rebaños. Por lo tanto, se hace necesario investigar sobre métodos de identificación de variantes genéticas económicos, rápidos y de alto poder de resolución. La electroforesis es un método analítico que es sin duda, una de las técnicas más usada para caracterizar mezclas complejas de proteínas.

Diversas investigaciones han revelado que los fenotipos de las variantes genéticas de β -Lactoglobulina tienen incidencia sobre la producción y composición de la leche. Se ha informado que el fenotipo AA origina mayor producción de leche y el fenotipo BB mayor contenido de caseína.

La presente investigación plantea como hipótesis que la electroforesis alcalina como la de isoenfoque es un método adecuado para la identificación de las variantes genéticas A y B de β -Lactoglobulina y que la presencia de la variante B de β -Lactoglobulina en la leche, es un referente de mayor contenido de caseína.

El presente estudio tiene como objetivo general determinar el contenido de caseína total y proteína del suero, identificando las variantes genéticas A y B de β -Lactoglobulina por electroforesis alcalina y electroforesis de isoenfoque en leche de vacas Frisón Negro.

Los objetivos específicos del estudio son:

- Comparar el método electroforesis alcalina con electroforesis de isoenfoque como método de referencia en la identificación de las variantes genéticas de β -Lactoglobulina en muestras de leche.
- Determinar el contenido de caseína y proteínas del suero en las muestras de leche de vacas Frisón Negro y su relación con las variantes genéticas de β -Lactoglobulina.
- Relacionar el contenido de caseína y proteínas del suero con la etapa de lactancia de las vacas en estudio.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Separaciones electroforéticas

El término electroforesis es usado para describir la migración de una partícula bajo la influencia de un campo eléctrico (ANDREWS, 1992). Viene del griego *phoresis*, que significa *ser llevado*, la electroforesis separa los iones debido a la diferencia de la relación carga-tamaño (RUBINSON y RUBINSON, 2001).

Los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, además se llevan a cabo con una pequeña cantidad de muestra, sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas (GARCIA, 2000; SKOOG *et al.*, 2001).

Los geles más comunes que se emplean en los métodos electroforéticos son dos, agarosa y poliacrilamida, estos actúan como cribas lo que influye en la velocidad de migración, por lo que la electroforesis en gel tiene dos mecanismos de separación, una separación por la relación carga-tamaño y la otra por tamizado que separa sólo por tamaño, lo que hace importante el tamaño de poro de los geles (ANDREWS, 1992; RUBINSON y RUBINSON, 2001).

La electroforesis en gel de poliacrilamida existe en varias formas, la nativa-PAGE, SDS-PAGE, urea-PAGE, entre otras electroforesis comúnmente usadas está la capilar (CE) y también la electroforesis de isoenfoque (NORRIS *et al.* 1998; ANDREWS, 1992; RUBINSON y RUBINSON, 2001).

La electroforesis en geles de poliacrilamida puede realizarse en el rango de pH de 2 a 11, la mayoría de las proteínas con puntos isoeléctricos comprendidos entre pH 4 y 7,5 son separadas en geles con pH entre 8 y 9 (GARCIA, 2000).

La electroforesis es una técnica muy sensible y puede ser afectada por muchos errores experimentales, GARCIA (2000) menciona los siguientes errores:

- La temperatura durante la polimerización y la corrida del gel
- Velocidad de la polimerización. Niveles de catalizador
- Pureza de los reactivos
- Tiempo de corrida
- Preparación de las muestras

2.1.1 Electroforesis Alcalina. En las electroseparaciones, la electroforesis alcalina se realiza en geles de poliacrilamida en ambiente de pH alcalino 8,3 logrado por un sistema de buffer continuo, las proteínas presentan una carga eléctrica neta si se encuentran en un medio que tenga un pH diferente al de su punto isoeléctrico, si se encuentran en un ambiente sobre su punto isoeléctrico estas se cargan negativamente y la migración será desde el cátodo al ánodo (MEDRANO y SHARROW, 1989; PINTO *et al.*, 1998; RUBINSON y RUBINSON, 2001).

MEDRANO y SHARROW (1989), señalan que la electroforesis alcalina es un método rápido y con excelente resolución para la separación de las principales variantes genéticas de caseína y proteínas del suero, pudiendo separar las variantes A y B de κ -caseína y β -caseína y la A, B y C de α_{s1} -caseína, además de separar favorablemente la variante B de α -Lactoalbumina (α -La) y la A y B de β -Lactoglobulina (β -Lg). Las condiciones que utilizaron para las separaciones relacionadas con los sistemas de electroforesis fueron diferentes en cada caso, para las caseínas se utilizó un sistema discontinuo y para las variantes de β -Lg uno continuo, además para la separación de las variantes de

caseína en la mezcla del gel se utilizó urea. VIVANCO (2005), identificó las variantes genéticas A y B de κ -caseína, por el método descrito por MEDRANO y SHARROW (1989), obteniendo resultados similares con el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

2.1.2 Electroforesis de isoenfoque (IE). Esta técnica de electroforesis se basa en el desplazamiento de las moléculas en un gradiente de pH estable, en una disolución o gel. La separación se realiza en un medio en el que existe una diferencia de potencial y un gradiente de pH. La región del ánodo (+) es ácida y la del cátodo (-) es alcalina. El gradiente de pH se establece por tampones especiales llamados anfólitos, que migran por si mismos hasta alcanzar sus puntos isoeléctricos (pI), de esta forma las moléculas anfotéricas se sitúan en estrechas bandas donde coincide su pI con el pH (Kelvin *et al.* 1998 citado por HAMES, 1998; RUBINSON y RUBINSON, 2001; REINA, 2003).

Según RUBINSON y RUBINSON (2001), este método sólo se emplea para proteínas y péptidos anfóteros, teniendo una capacidad de resolución de diferencias de pI de 0,01 unidades de pH.

CUADRO 1 Puntos isoeléctricos de proteínas séricas.

PROTEÍNA	pI
β -Lg B ¹	5,4
α -Lactoalbúmina B ¹	4,8
Seroalbumina ²	4,9

FUENTE: FENNEMA (2000)¹; RUBINSON y RUBINSON (2001)².

2.2 Composición de la Leche y su variabilidad

De acuerdo a BELITZ y GROSCH (1999), la leche cruda está compuesta aproximadamente de un 87,7% de agua; 3,3% de proteína; 3,6% de grasa; 4,6% de carbohidratos; 0,7% de minerales y 0,2% de ácidos orgánicos.

La mayor parte de los componentes de leche no están presentes como moléculas coloidales, sino que se encuentran asociados en complejas estructuras, como las caseínas, que están presentes en micelas esféricas y los lípidos en glóbulos esféricos, los que afectan la viscosidad y la presión osmótica (FENNEMA, 2000).

La composición de la leche de vaca, desde un punto de vista cualitativo, es básicamente constante, mientras que en términos cuantitativos se pueden notar diferencias sobre todo entre especies a pesar de los numerosos trabajos que se han publicado. Según WALSTRA *et al.* (2001) y POTTER y HOTCHKISS (1999), la variación de los componentes en la leche aún no se conoce con exactitud, pero en general se debe a diferentes factores que alteran su composición, estructura y propiedades, estando entre estos la especie, raza o el individuo, la fase y número de lactación, edad de la vaca, estados patológicos (mastitis), factores ambientales y de manejo (la alimentación, el clima, sistema de ordeño).

Las variaciones se dan en mayor proporción en los constituyentes de la leche principalmente en el contenido de grasa y en menor proporción en proteínas, lactosa y cenizas (POLLOTT, 2004; WALSTRA *et al.*, 2001; FENNEMA, 2000).

De acuerdo a LATRILLE (1999), uno de los factores principales de variación del contenido de proteínas son la alimentación y la genética, considerando ésta última la más importante, la alimentación afecta en menor grado, principalmente con los aportes de energía y de proteína. Otro efecto de variación es la época

del año, lo que ha obligado a algunos países a programar la época de partos en forma estacional con el fin de maximizar la utilización de praderas, ANRIQUE *et al.* (1995), en un resumen de las características químicas de la composición de alimentos de ganado, describe las diferencias composicionales de las praderas de la décima región, observando en pradera permanente fertilizada (suelo trumao), un aumento de la proteína cruda en los meses de Agosto, Septiembre y Octubre.

Las proteínas según FOX y McSWEENEY (1998), también varían su concentración significativamente durante la lactación, especialmente durante los primeros días post-parto, ocurriendo el mayor cambio en las proteínas del suero. BUXADÉ (1996), se refiere a los cambios en los constituyentes por efecto de la edad y números de partos, mencionando que el porcentaje de proteína total varía en menor grado por estos factores, porque el descenso de las caseínas es compensado por el aumento de las proteínas del suero, además señala que a partir de la 5^a lactación los cambios en la composición de la leche tienden a ser mínimos.

MARIANI *et al.* (1997), determinaron diferencias composicionales entre las razas Bruna y Friesian, concluyendo que la raza Bruna presenta un mayor contenido fosfato de calcio y de caseína, con una mayor frecuencia de la κ -caseína B y β -caseína B, lo que aportaba una mejor aptitud tecnológica.

WALSTRA *et al.* (2001), mencionan que cada una de las proteínas individuales tiene una composición constante excepto en las variantes genéticas. Como se observa en el CUADRO 2, en una investigación realizada en 233 vacas Holstein-Friesian por BOBE *et al.* (1999), el contenido de proteínas varía levemente según las variantes genéticas de β -Lactoglobulina, no determinándose diferencia estadísticamente significativa.

Algunos autores también han relacionado las variantes genéticas con la composición total de la leche y producción de leche. Bovenhuis *et al.* 1992 citado por NG-KWAI-HANG (1997), observaron que la leche de las vacas de primera lactancia que presentaban el fenotipo AA de β -Lg tenían una producción de 93 kg mayor que aquellas que presentaban el de fenotipo BB.

CUADRO 2 Relación entre el contenido de proteínas y las variantes genéticas de β -Lg.

Variante genética	Proteína total (%)	Caseína (%)	Proteína del suero (%)
β -Lg A	3,26	2,72	0,53
β -Lg A y B	3,24	2,76	0,48
β -Lg B	3,20	2,78	0,42

FUENTE: BOBE *et al.* (1999) modificado.

2.3 Proteínas lácteas

De acuerdo a FENNEMA (2000) y FOX y McSWEENEY (1998), en la glándula mamaria se sintetizan seis proteínas como productos genéticos mayoritarios: α_s1 -caseínas (α_s1 -Cn), α_s2 -caseínas (α_s2 -Cn), β -caseínas (β -Cn), κ -caseínas (κ -Cn) y dos de las proteínas del suero, β -Lg y α -La. Cada una exhibe polimorfismo genético por ser productos de genes individuales. Otros componentes minoritarios de las proteínas del suero, como las seroalbúminas e inmunoglobulina son procedentes de la sangre.

Según WONG (1995), FOX y McSWEENEY (1998) y WALSTRA *et al.* (2001), las proteínas de la leche se agrupan en dos grandes fracciones; las caseínas que representan alrededor del 80% del contenido proteico total de la leche y las proteínas del suero el 20% restante. Además, existen otras proteínas en la leche en cantidades todavía menores y entre éstas se encuentra proteasa–

peptona, seroalbúminas, lactoferrina (FENNEMA, 2000; NORRIS *et al.*, 1998; BELITZ y GROSCH, 1997).

Dentro del total de las proteínas de la leche cruda, las que se encuentran en mayor proporción son las α -caseínas representando aproximadamente el 42% (FENNEMA, 2000). Aunque según WONG (1995), las α -caseínas representan el 50-55% del total de las caseínas, en que el componente mayoritario es la α_{s1} con un peso molecular de 23.600 dalton y está constituida por 199 restos aminoacídicos.

Según FENNEMA (2000), las β -caseínas representan un 25%, las κ -caseínas un 9% y las γ -caseínas un 4%. Según WONG (1995), la β -caseína representa el 30-35% del total de las caseínas, con un peso molecular de 24.000 dalton y una cadena de 209 restos de aminoácidos, la κ -caseína consiste en una cadena de 169 restos, con un peso molecular de 18.000 dalton. Entre las proteínas del suero es la β -Lactoglobulina la de mayor proporción, que representa el 50% de las proteínas séricas y un 9% de las proteínas totales, la α -lactoalbumina un 4%, la proteosa-peptona un 4%, las seroalbúminas un 1% y las inmunoglobulina un 2% (FENNEMA, 2000).

2.3.1 Caseína. La caseína es una proteína que precipita a pH 4,6. Es un complejo de fosfoproteínas y glicoproteínas que está en forma de suspensión coloidal, constituyendo micelas de caseína estabilizadas y su tamaño comúnmente varía entre 30 a 300 nm de diámetro (WALSTRA *et al.*, 2001; FENNEMA, 2000; PRIMO, 1997).

Una micela está formada por submicelas, en ellas las moléculas α , β y κ -caseína se agrupan ordenadamente, formando un núcleo hidrófobo con una superficie hidrófila rica en κ -caseína, las submicelas con poco o nulo contenido de κ -caseína quedan en el interior de la micela (PRIMO, 1997; WONG, 1995).

Las principales especies moleculares de las caseínas son cuatro cadenas polipeptídicas diferentes las α_{s1} , α_{s2} , β y κ . Las caseínas α_s y β precipitan en presencia de Ca^{2+} , mientras que la κ es la caseína menos sensible a la precipitación por calcio, lo que hace que ejerza un papel estabilizador, esta propiedad es de importancia para la formación del complejo de caseína y de micelas estables (WALSTRA *et al.*, 2001; FENNEMA, 2000; BELITZ y GROSCH, 1997).

De acuerdo a WALSTRA *et al.* (2001), las micelas de caseínas son responsables de la estabilidad física de la leche durante los tratamientos térmicos, concentración y almacenamiento de los productos. Además, las micelas influyen en las propiedades reológicas de los productos fermentados.

SUMMER *et al.* (2002), en un estudio en las raza Modenese y Frisón Italiano determinaron que la leche de la raza Modenese produce una cuajada de masa blanda con propiedades reológicas no características a la de un gel, lo que según los autores puede deberse al bajo grado de mineralización de las micelas en la leche de esta raza. Además, observaron que el tamaño micelar tiene directa relación con las características reológicas de la cuajada, comparando ambas razas la Modenese resultó con menor tamaño micelar y mejores características que la Frisón Italiano, 62 y 68 nm respectivamente, lo que se debe a que las micelas pequeñas tienen una mayor reacción con el cuajo y un aumento en la velocidad de la formación de la cuajada.

Las caseínas tienen excelente solubilidad y estabilidad térmica. A pH ácido de la leche se forma un gel provocando la coagulación de la leche. En la elaboración de queso la coagulación es producida por la acción de proteasas, actuando en forma específica sobre la κ -caseína, con ello la micela pierde su estabilidad y se produce la coagulación (PRIMO, 1997; ALAIS, 1985).

Las caseínas varían en su composición porcentual especialmente entre razas, según la investigación realizada por MARIANI *et al.* (1998), en las razas Bruna (Bu), Frisona (Fi), Reggiana (Rg) y Modenese (Mo), la raza Bruna resultó con el mayor contenido de κ -Cn (12,67% Bu; 11,25% Fi, 12,24% Rg, 12,28% Mo) y menor contenido de α_{s1} -Cn (33,89% Bu; 36,27% Fi, 34,37% Rg, 34,15% Mo), característica que resulta tecnológicamente favorable en el proceso de elaboración de queso, ya que se mejora la capacidad de agregación de la para-k-caseína.

2.3.2 Proteínas del suero. En la leche se encuentran en forma molecular o como agregados pequeños, todas son proteínas globulares excepto la fracción proteasa-peptona, se insolubilizan por acción del calor, produciendo su desnaturalización. La β -Lg y α -La precipitan a 100°C y pH 4,5 (WALSTRA *et al.*, 2001; NORRIS *et al.*, 1998; PRIMO, 1997).

La proteína α -Lactoalbúmina, es una molécula plegada muy compacta, no se asocia excepto cuando la fuerza iónica del medio es muy baja (WALSTRA *et al.*, 2001). Tiene variaciones según especie y razas, además existe en dos formas genéticas A y B (BELITZ y GROSCH, 1997).

La β -lactoglobulina es la principal proteína del suero, representa alrededor del 50% del total de la proteína del suero, con 162 restos de aminoácidos (monómero) su peso molecular es de 18.300 dalton (FOX y McSWEENEY, 1998; WONG, 1995).

La solubilidad de la β -Lg es muy dependiente del pH y de la fuerza iónica, pero no precipita por acidificación. En la leche se encuentra en forma de dímero, disociándose a altas temperaturas, a pH entre 3,5 y 5,2 puede llegar a formar octámero y a pH sobre 7,5 el dímero se disocia originando monómeros (WONG, 1995; BELITZ y GROSCH, 1997; FENNEMA, 2000; WALSTRA *et al.*, 2001).

Las variantes genéticas más comunes de β -Lg son la A, B, C y D, la formación de octámero sólo se ha observado en la variante A (BELITZ y GROSCH, 1997; FOX y McSWEENEY, 1998). Según NG-KWAI-HANG *et al.* (2002), se han descrito diez variantes genéticas, mientras que GAO *et al.* (2002), señalan que se han identificado hasta 12 variantes genéticas individuales (A,B,C,D,E,F,G,H,I,J,X,W), sin embargo ambos autores afirman que las más comunes en los diferentes rebaños lecheros son la variante A y B.

En la genética el genotipo de un animal representa el gen o el grupo de genes heredados responsables para cada característica en particular, es esencialmente una característica permanente del organismo, mientras que el fenotipo cambia continuamente a lo largo de la vida y es el valor tomado por una característica, o sea, es lo que puede ser observado o medido (HARTL y JONES, 1999). En el CUADRO 3 se puede observar la frecuencia de las variantes genéticas más comunes de β -Lg en diferentes razas de varios estudios.

CUADRO 3 Frecuencia alélica de β -Lactoglobulina A y B en diferentes razas.

Raza	nº	Variante genética (frecuencia (%))	
		A	B
Pezzata Rosa Italiana ⁽¹⁾	598	55	45
Friesian (New Zealand) ⁽²⁾	3.761	48,7	51,3
Ayrshire ⁽²⁾	37	29,7	70,3
Jersey ⁽³⁾	27	60	40
Friesian Holandes ⁽⁴⁾	10.000	44,5	55,5
Frisón Negro ^{(5) (6)}	10	65	35

FUENTE: (1)ALTRAN y DAL BO (1996); (2)WINKELMAN y WICKHAM (1997); (3)LUM *et al.* (1997); (4)WALSTRA *et al.* (2001); (5)KRAMM (2003); (6)BENAVIDES (2003).

Respecto a la estabilidad de la β -Lg, en general experimenta cambios estructurales a intervalos de temperatura en muchos procesos industriales. A pH 6,5 y temperaturas superiores a 60°C se forma un complejo con la κ -caseína por un enlace sulfhídrido-disulfuro, este complejo le confiere a la caseína resistencia a la acción de las proteasas (WONG, 1995; FENNEMA, 2000).

Referente a los efectos de las variantes genéticas en la elaboración de queso, Tong 1993 citado por LUM *et al.* (1997), en un estudio en que no especifica los rebaños señala, que las leches de animales homocigotos con β -Lg BB tienen bajo contenido de β -Lg y alto contenido de caseína, proteína total y grasa, lo cual resulta muy favorable para la industria quesera, resultando lo contrario para aquellas muestras de leche que tienen el fenotipo AA en que el contenido de β -Lg es mayor y la caseína, proteína total y grasa son menores.

En un estudio específico en raza Frisón Negro Chileno sobre la aptitud a la coagulación de la leche BENAVIDES (2003), utilizando 10 vacas, concluyó que en leche con variante B de β -Lg el tiempo de coagulación es menor, lo que se atribuyó en parte a la alta concentración de caseína y baja concentración de proteína del suero, al igual que BASAUL (2003), en un estudio en leche de 10 vacas (5 Jersey y 5 Holstein-Friesian).

2.3.3 Influencia de las variantes genéticas de las proteínas en la producción y composición de la leche. BRAUNSCHEWIG y PUHAN (1997), indican que los efectos de los genotipos de κ -Cn y de β -Lg influyen en la composición y producción de leche. En una investigación con vacas Holstein y Flechvieh observaron que los genotipos de β -Lg, influyen significativamente en el contenido de proteínas del suero, en que la variante AA produce el mayor contenido, seguida de la variante AB, y la de menor contenido la BB,

presentando una relación inversa en la influencia de los genotipos de β -Lg en el contenido de caseína (BB>AB>AA).

Por su parte BOETTCHER *et al.* (2004), realizaron un estudio en las razas Holstein Italiana y Brown Swiss, determinando para ambas razas que existe una significativa asociación entre los haplotipos de caseína y las características de la producción de leche (cantidad de leche y su composición), lo cual aumentaría el interés de caracterizar los ganados lecheros.

En los resultados obtenidos por OJALA *et al.* (1997), la β -Lg A tiene un efecto significativo sobre el incremento del porcentaje de proteínas de la leche de vacas Holstein y Jersey, pero no así su alelo B al cual se le atribuye efectos en el mayor contenido de materia grasa, aunque no se determinaron efectos significativos de las variantes de β -Lg sobre la producción de leche. El mismo autor se refiere a que comparado el efecto sobre la variación composicional de los genotipos de β -Lg con los de caseína en la raza Holstein, los genotipos de caseína contribuyen de un 3 a un 5% más a la variación del porcentaje de grasa, contenido de proteína y producción de leche.

KRAMM (2003), determinó en diez vacas Frisón Negro Chileno, que el porcentaje de proteína del suero en 24 muestras de leche que presentaban el fenotipo AA de β -Lg, fue mayor que el obtenido en 56 muestras de leche con fenotipo AB, con un promedio de $0,739\pm 0,008$ % y de $0,705\pm 0,007$ % respectivamente, al igual que para el porcentaje de caseína, en que el fenotipo AA reveló un valor mayor que para AB, con un promedio de $2,36\pm 0,03$ % y de $2,31\pm 0,02$ % respectivamente.

MOLINA *et al.* (2006)^a, al realizar un análisis de interacción entre las variantes genéticas A y B de κ -Cn y las variantes genéticas AA y AB de β -Lg, indican que en presencia de κ -Cn A y de β -Lg AB la proteína total disminuye, por otra parte, el contenido de proteínas del suero aumenta con la combinación κ -Cn A y AA de β -Lg, en el caso del contenido de caseína la combinación mas favorable fue κ -Cn B y de β -Lg AB obteniendo el valor más alto. Además, MOLINA *et al.* (2006)^b en otro estudio en que relaciona estas variantes con las propiedades de coagulación de la leche, determinaron que la mejor interacción para todas las características de coagulación medidas (fuerza del cuajo, firmeza de cuajada y sinéresis) se presentaron con la combinación de las variantes β -Lg AB y κ -Cn A o B.

WINKELMAN (1997), asocia la variante C de la β -Lg con la menor producción de leche, menor contenido de grasa y proteína, aunque presentó una menor frecuencia, en 2.742 muestras de leches de vacas Jersey y Jersey-Frisón el fenotipo CC de β -Lg se presentó sólo en un 0,007%.

2.4 Características de rebaños lecheros en Chile

Entre las razas lecheras más comunes en Chile se encuentran la Holstein-Friesan, Frisón Negro, Frisón Rojo y Jersey (INDAP, 2004). En el CUADRO 4 se presentan las características de la leche de estas razas, destacando la raza Holstein - Friesan con la mayor producción de leche y el menor contenido de proteína total y materia grasa; la raza Jersey presenta la menor producción de leche con 6.000 litros, pero el contenido de proteínas y materia grasa es marcadamente mayor a las demás razas.

CUADRO 4 Características de las razas de leche más comunes en Chile.

Raza	Producción de leche lt/lactancia	Proteína total %	Materia Grasa %
Holstein - Friesan	10.000	3,2	3,6
Frisón Negro	6.000	3,3	4,0
Frisón Rojo	7.000	3,3	4,0
Jersey	6.000	4,2	5,4

FUENTE: INDAP (2004).

La raza Frisón Negro junto con Holstein Friesian, constituyen las razas lecheras más importantes del país. Los animales Frisón Negro se introdujeron a Chile a principios de siglo XX, principalmente en la zona sur provenientes de ganado Alemán y Holandés. La raza Frisón Negro es considerada de doble propósito, su mayor adaptabilidad a las condiciones de la zona sur del país, permite que la producción de leche y carne se efectúe con menores costos (EHREFENFELD, 1991).

Según un estudio realizado por GONZÁLEZ *et al.* (2002), el rebaño Frisón Negro Chileno, es claramente inferior en producción de leche, con 4.229 ± 128 kg y de contenido de grasa con $156 \pm 5,3$ kg, respecto a las razas de origen Neozelandés y Holstein Americano, cuyos promedios en kilos de leche están en 5.232 ± 172 y 5.098 ± 179 respectivamente y para el contenido de grasa en $208 \pm 7,1$ y $191 \pm 7,3$ respectivamente.

3. MATERIAL Y METODO

3.1 Materiales

3.1.1 Origen de las muestras. Las muestras de leche se obtuvieron de 20 vacas de raza Frisón Negro del fundo Santa Rosa perteneciente a la Universidad Austral de Chile, ubicado en la provincia de Valdivia, X Región. Las vacas fueron seleccionadas por ausencia de mastitis, con diferentes edades, etapa y número de lactancias, con el mismo sistema de alimentación. Se subdividieron en 3 grupos, el grupo 1 con 9 vacas, una de ellas en la 5ª lactancia y las otras en la 2ª lactancia, estando todas entre el 1º y 2º mes de lactancia. El grupo 2 con 9 vacas, con 4 y 5 lactancias, todas entre los 3 y 4 meses de lactancia. El grupo 3 constituido por 2 vacas que se encontraban en el 6º mes de lactancia, con una lactancia (ANEXO 1). En todos los muestreos se efectuó el California Mastitis Test (CMT), para verificar el estado de salud mamaria de las vacas en estudio y se contó con los resultados de RMD de Cooprinsem (ANEXO 2).

3.1.2 Lugar del ensayo. Los análisis de las muestras de leche se realizaron en el Laboratorio de Química del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile.

3.1.3 Duración del ensayo. El estudio se realizó en la época Invierno, efectuando tres muestreos, distribuidos en los meses de Julio, Agosto y Septiembre del año 2005, los muestreos se dividieron en dos submuestreos por consideración a la cantidad de muestras.

3.2 Metodología

3.2.1 Obtención de muestras de leche. El muestreo se realizó de acuerdo a la metodología descrita en la Norma Chilena N. CH 1011/1 (CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN, 1998). Cada muestra de leche por vaca individual fue de 500 mL, y una muestra de leche mezcla cuya fracción de mezcla fue proporcional a la producción de cada vaca en el día del muestreo.

3.2.2 Diseño experimental. En el CUADRO 5, se presenta el diseño experimental utilizado en el estudio, en el cual se pueden observar los factores tomados en cuenta para las respuestas estudiadas. Se puede destacar que los fenotipos de β -Lg se presentan como una respuesta de los métodos de electroforesis y a la vez son considerados como factores en el contenido de proteínas.

CUADRO 5 Diseño experimental.

Muestras	Factores	Respuesta estudiada
- Leche de 20 vacas individuales	- Electroforesis de isoenfoque y alcalina	- Fenotipos de β -Lg
- Leche mezcla	- Mes de muestreo - Fenotipos de β -Lg (A y/o B) - Etapa de lactancia	- Contenido de caseína - Contenido de proteína del suero

3.2.3 Determinación del contenido de caseína. El contenido de caseína se determinó por diferencia entre el contenido de proteína total (estudio paralelo) y el contenido de proteínas del suero.

3.2.4 Determinación del contenido de proteínas del suero. Se obtuvo el suero de la leche según técnica de McGann *et al.* 1973 citado por PINTO *et al.*

(1998). El contenido de proteínas del suero se determinó por el método semi micro Kjeldahl FIL/IDF 20B (1993).

3.2.5 Preparación de muestras de β -lactoglobulina para electroforesis. La separación de la proteína se realizó de acuerdo al método descrito por LOWE *et al* (1995) (ANEXO 3).

3.2.6 Electroforesis. El contenido de proteínas en las muestras de β -Lg se determinó por el método de LOWRY *et al.* (1951). Los estándares de proteínas utilizados para los métodos de electroforesis fueron los siguientes:

- Estándar A de β -lactoglobulina: Sigma, L-5137
- Estándar B de β -lactoglobulina: Sigma, L-8005
- Estándar A & B de β -lactoglobulina: Sigma, L-0130

3.2.6.1 Electroforesis de isoenfoque. Se llevó a cabo según el método de PEARCE *et al.* (1972) modificado por CASANOVA (2001), utilizando persulfato de amonio (0,37%) en vez de riboflavina (0,004%). Los estándares se utilizaron en concentración de 1mg/ml de buffer muestra. Las condiciones de corrida fueron:

- Gel continuo con solución de acrilamida a una concentración final de 10,15%.
- Precorrida: 200 V por 15 min, 300 V por 30min y 400 V por 60 min.
- Corrida: 400 V por 4 horas.

3.2.6.2 Electroforesis Alcalina. Se llevó a cabo según el método descrito por MEDRANO Y SHARROW (1989) (ANEXO 4). Para la preparación de la muestra fue necesario diluir la muestra en agua destilada en una proporción 1:1, antes de la dilución con urea. La preparación de los estándares fue igual a la de las muestras, en que la proteína separada se diluyó 3:1 con urea 9,6 M. Las

distancias de migración de las bandas se midieron desde el ánodo con pie de metro digital marca Mitutoyo.

3.2.6.3 Densitometría. Se efectuó sobre las bandas de proteína teñidas, utilizando el Software Unscanit.

3.2.7 Análisis estadístico. Se utilizó el programa computacional STATGRAPHIC PLUS Versión 5.1. Se realizó el análisis de homocedasticidad y se aplicó análisis de varianza (ANDEVA) entre las variables estudiadas y cuando fue necesario se aplicó el test de Tuckey. Si existió diferencia significativa entre varianzas en el análisis de homocedasticidad, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis.

4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Análisis de las variantes genéticas por métodos electroforéticos

Se identificaron las variantes A y B de β -Lg, utilizando electroforesis alcalina y de isoenfoque como se mencionó en material y método.

4.1.1 Electroforesis alcalina. Se realizaron pruebas preliminares de corrida de las muestras utilizando estándares para la identificación de las proteínas y para determinar las condiciones de corrida y los estándares a utilizar posteriormente (ANEXO 5).

Como resultado de los ensayos preliminares se observó en los geles, que el tiempo de corrida fue insuficiente. Además, en el ANEXO 5 (Gel 1) se observa que la cantidad de muestra aplicada en el primer ensayo fue excesiva (15 μ l) obteniéndose bandas difusas y no definidas. Ambos factores, tiempo y cantidad de muestra afectaron la separación de las proteínas. En el mismo ensayo se observa en el pocillo 5 en una muestra de estándar, una banda tenue y en el pocillo 6 no se observó banda, lo cual, fue atribuido a la degradación de la proteína del estándar B de β -Lg que se encontraba congelado por un tiempo indeterminado.

De acuerdo a GARCIA (2000), los tiempos de corrida muy cortos impiden que las muestras migren adecuadamente para su correcta separación. Posteriormente en el segundo y tercer ensayo el tiempo de corrida se aumentó en 15 min y la cantidad de muestra se disminuyó a 10 μ l para obtener una mejor definición de las bandas, a excepción del estándar B congelado en que

se aumentó en el segundo ensayo a 18 μ l (pocillo 1 y 2) y en el tercero a 25 μ l sin obtener bandas visibles (pocillo 3). De esta forma, se descarta para una futura utilización como estándar en el análisis de las muestras, por lo que la preparación fresca de la muestra se hace primordial por la posible degradación de las proteínas. En el 2º y 3º ensayo se agregó un estándar AB de β -Lg, lo cual se observa en el ANEXO 5 en el gel2 el pocillo 7 y 8, gel3 el pocillo 1, la muestra estándar AB de β -Lg en ambos ensayos logró la separación del alelo A y B pero ésta no fue clara, lo que se atribuyó nuevamente a que el tiempo de corrida aún no fue suficiente.

Los estándares de β -Lg preparados según lo indicado por MEDRANO y SHARROW (1989), presentan un comportamiento que se ajusta a lo descrito para las variantes de β -Lg, con un tiempo de corrida de 2 horas a 150 V, en que migra en primer lugar la variante A y en segundo lugar la variante B (ANEXO 5) por lo que se seleccionaron como estándares para el posterior análisis de las muestras (gel 1, 2 y 3).

De acuerdo a BELITZ y GROSCH (1997) y WALSTRA *et al.* (2001), al pH normal de la leche la β -Lg se encuentra en forma de dímero, a pH sobre 7,5 el dímero se disocia originando monómeros, por lo tanto la doble banda observada en la electroforesis alcalina corresponde a la expresión de variantes genéticas A y B de la proteína.

4.1.2 Identificación de las variantes genéticas en 20 muestras por electroforesis alcalina. Al realizar la electroforesis alcalina para las 20 muestras se logró identificar el fenotipo de β -lactoglobulina, además, se observó la presencia de una banda con migración más tardía correspondiente a α -lactoalbumina y también se observaron proteínas de mayor peso molecular que corresponderían a Inmunoglobulina y seroalbumina de bovino (FIGURAS 1,2,3

y 4), estas bandas también se presentan en los geles de electroforesis presentados por MEDRANO y SHARROW (1989).

En las FIGURAS 1 y 2 se observa que hay una mejor resolución de las proteínas cuando se aplica menor cantidad de muestra (10 μ l), como se puede ver en las figuras mencionadas al repetir una muestra con 15 y 10 μ l en pocillos correlativos, como se observa en los pocillos 4 y 5, 6 y 7, 8 y 9 de la FIGURA 1 y en los pocillos 5 y 6, 7 y 8, 9 y 10 de la FIGURA 2.

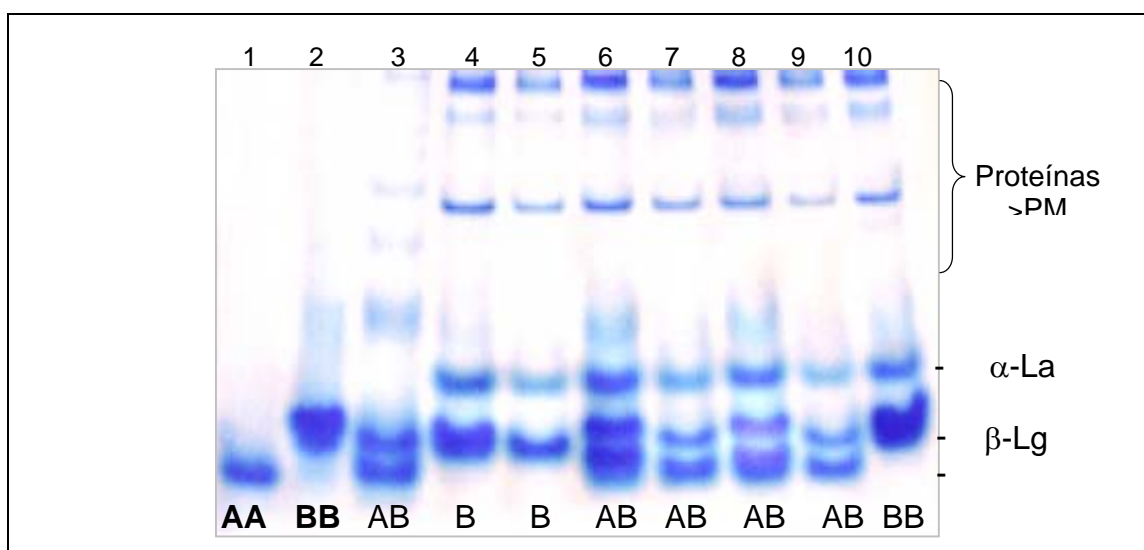


FIGURA 1. Electroforesis alcalina de β -lactoglobulina en muestras de leche de vacas Frisón Negro.

1: St. β -Lg A, 2: St. β -LgB, 3: St. β -LgA&B, 4: 1579(15 μ l), 5: 1579(10 μ l), 6: 2220(15 μ l), 7: 2220(10 μ l), 8: 1592(15 μ l), 9: 1592(10 μ l), 10: 2091(15 μ l)

En las electroforesis presentadas en las FIGURAS 3 y 4 se usaron sólo 8 μ l de muestra observándose bandas con una definición aún mejor, además, en el pocillo 6 de la FIGURA 4 se corrió muestra de leche mezcla, en ella se pueden ver dos bandas identificadas como fenotipo AB, lo cual indica la existencia de ambos alelos en la leche de las muestras de vacas individuales.

Los resultados de las electroforesis obtenidos para cada muestreo fueron repetitivos como se observa en el ANEXO 5. En el ANEXO 6 se muestran las

distancias de migración de las bandas obtenidas en diferentes corridas de las muestras con sus respectivos estándares, aquellas muestras con la expresión BB y AA se midieron en el centro de la banda, ya que la presencia de ambos alelos sólo se logró detectar por densitometría observándose dos picos leves en una misma banda (ANEXO 7).

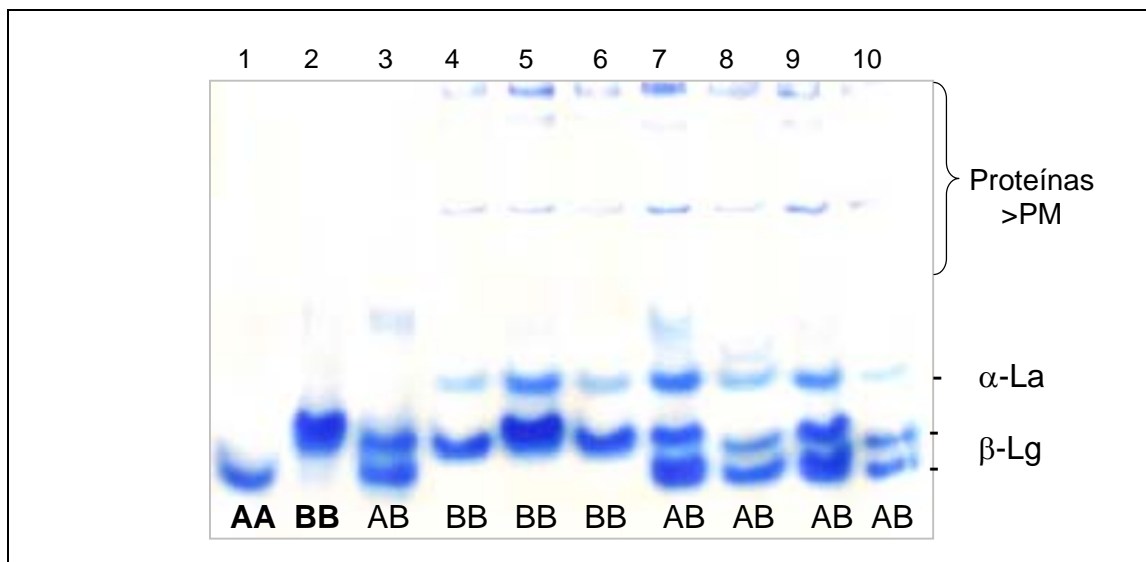


FIGURA 2. Electroforesis alcalina de β -lactoglobulina en muestras de leche de vacas Frisón Negro.

1:St. β -LgA, 2:St. β -LgB, 3:St. β -LgA&B, 4:2091(10 μ l), 5:1593(15 μ l), 6:1593(10 μ l), 7:1348(15 μ l), 8:1348(10 μ l) .9:1652(15 μ l), 10:1652(10 μ l)

En la FIGURA 3 y 4 se presentan los resultados de las demás muestras, en las cuales se aplicaron sólo 8 μ l de muestra para una mejor resolución. En el CUADRO 6 se presenta la expresión fenotípica de las variantes de β -Lg y la frecuencia de cada una identificadas para las muestras de leche estudiadas, como se puede ver, en el 10% de las muestras se identificó el fenotipo AA de β -Lg y en el 5% se observó sólo una banda identificada como variante A de β -Lg, el fenotipo BB se identificó en un 15% de las muestras, en el 30% de las muestras se observó sólo un alelo identificado como B y en el 40% se identificó el fenotipo AB. La frecuencia de la expresión alélica identificada en el total de las muestras fue de 60,61% del alelo B y de 39,39% del alelo A.

En una investigación realizada por WINKELMAN y WICKHAM (1997), en 3.761 vacas Friesian (New Zealand), identificaron una mayor frecuencia de la variante B con un 51,3% y un 48,7% de la variante A, al igual que lo descrito por SUMMER *et al.* (2002), en 424 vacas Friesian Italiana, con una frecuencia de B mayor a de A con 54,1% y 45,9% respectivamente. Así mismo, en el caso de la raza Holstein en un estudio de 251 muestras realizado por LUNDÉN *et al.*(1997), la variante B se encontró en una frecuencia levemente mayor que la A (50,2% y 49,8% respectivamente).

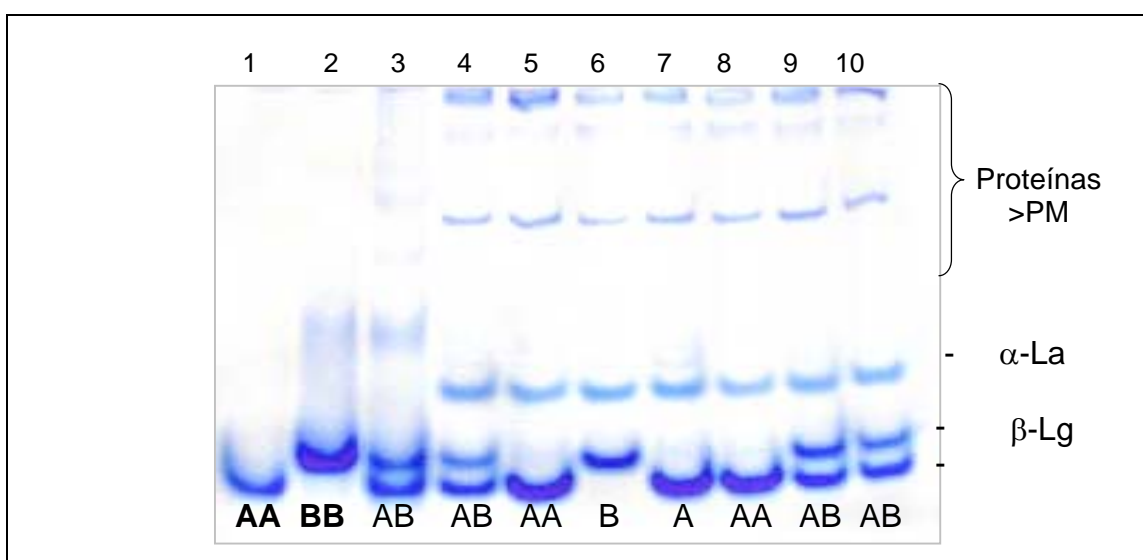


FIGURA 3. Electroforesis alcalina de β-lactoglobulina en muestras de leche de vacas Frisón Negro.

1:St.β-Lg A, 2: St.β-Lg B. 3:St.β-Lg A&B, 4:655(8μl), 5:2246(8μl), 6:1613(8μl), 7:686(8μl), 8:1607(8μl), 9:1353(8μl), 10:1597(8μl)

En el ANEXO 7 se presenta los resultados de las densitometrías realizadas a las bandas de los geles por electroforesis alcalina, de las muestras de β-lactoglobulina. Las muestras en que se presentaron ambas variantes revelan mayor porcentaje de variante A respecto a la de B, con un promedio de $56,41 \pm 2,09\%$ y $43,60 \pm 2,09\%$ respectivamente, al igual que lo descrito por KRAMM (2003) y BENAVIDES (2003), en leche de 10 vacas Frisón Negro, en que también obtuvieron una mayor proporción de la variante A en las muestras con

ambas variantes. En la densitometría además, se observa que las muestras 636 y 1586 de acuerdo a la medición con sus respectivos estándares son B, teniendo en consideración que el gel 3 (ANEXO 5) está difuso. En las densitometrías de las muestras 1579 y 1581 se observa un leve hombro considerándolo como un pico.

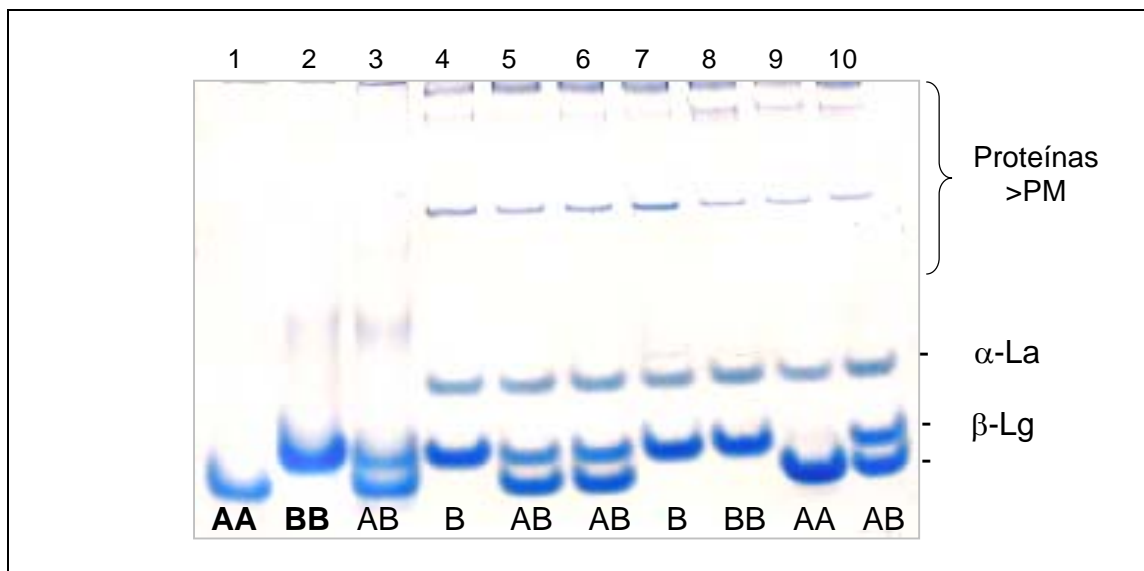


FIGURA 4. Electroforesis alcalina de β -lactoglobulina en muestras de leche de vacas Frisón Negro.

1:St. β -Lg A, 2:St. β -LgB, 3:St. β -LgA&B, 4:1581(8 μ l), 5:1573(8 μ l), 6: Mezcla(8 μ l), 7:2067(8 μ l), 8:720(8 μ l), 9:1607*(8 μ l), 10:1573(8 μ l)

CUADRO 6 Expresión de las variantes genéticas obtenidas por electroforesis alcalina y su frecuencia.

Muestra	nº	Expresión de las variantes	Frecuencia %
1607 – 2246	2	AA	15
636	1	A	5
720 – 1593 – 2091	3	BB	15
636 – 1579 – 1581 1586 – 1613 – 2067	6	B	30
655 – 1348 – 1353 1573 – 1592 – 1597 1652 – 2220	8	AB	40

4.1.3 Electroforesis de Isoenfoque. Los resultados de la expresión de las variantes genéticas de las muestras en estudio por electroforesis de isoenfoque permitió la identificación de los fenotipos de los individuos heterocigotos u homocigotos. En este tipo de electroforesis la sensibilidad a la expresión de un alelo u otro, está relacionado con la pureza de la muestra y condiciones de la realización del método, por lo tanto se deben controlar estos factores. Según RUBINSON y RUBINSON (2001), la precisión de la localización de la proteína queda limitada por la capacidad de reproducir la gradiente de pH. Las distancias de migración para la identificación de las variantes de β -Lg se presentan en el ANEXO 9.

La separación de las variantes A y B de β -lactoglobulina es mínima, ya que sus puntos isoelectricos se diferencian en 0,1 unidades, según los estándares A y B de β -Lg utilizados en el método cuyos pI son de 5,3 y 5,4 respectivamente. El método utilizado para confirmar la presencia de una o dos bandas fue por análisis de densitometría. En cinco de las muestras analizadas se logró identificar los alelos A y B de β -Lg, en la leche mezcla y las muestras 1348, 1353, 1573, 1579 y 1597 (ANEXO 10), detectando claramente por densitometría la presencia de dos picos. En la muestra de leche mezcla el porcentaje de expresión del alelo A corresponde a un 63,16% y al alelo B un 36,84%, en la muestra 1348 corresponde a un 52,27% de A y 47,73% de B, en la muestra 1353 a un 57,21% de A y 42,79% de B, en la 1573 un 70,04% de A y un 29,96% de B, en la 1579 un 41,78% de A y 58,22% de B y en la muestra 1597 de un 61,97% de A y un 38,03% de B, con un promedio de las cinco muestras de $56,65 \pm 10,59\%$ y $43,35 \pm 10,59\%$ del alelo A y B respectivamente.

En la FIGURA 5 se muestran los geles de 8 de las muestras en estudio con sus respectivos estándares, en el ANEXO 8 se presentan las corridas de los geles con los resultados de las 12 muestras restantes, cada muestra se presenta con su estándar en la corrida que mejor se observan las bandas para efectos de

visualización. En cada corrida además de las variantes A y B de β -Lg, se observa la presencia de α -lactoalbumina, proteína que no fue posible eliminar completamente de la muestra, pero cuya presencia no interrumpe el análisis de las proteínas de interés, lo que también fue observado por MOLINA *et al.* (2006)^a

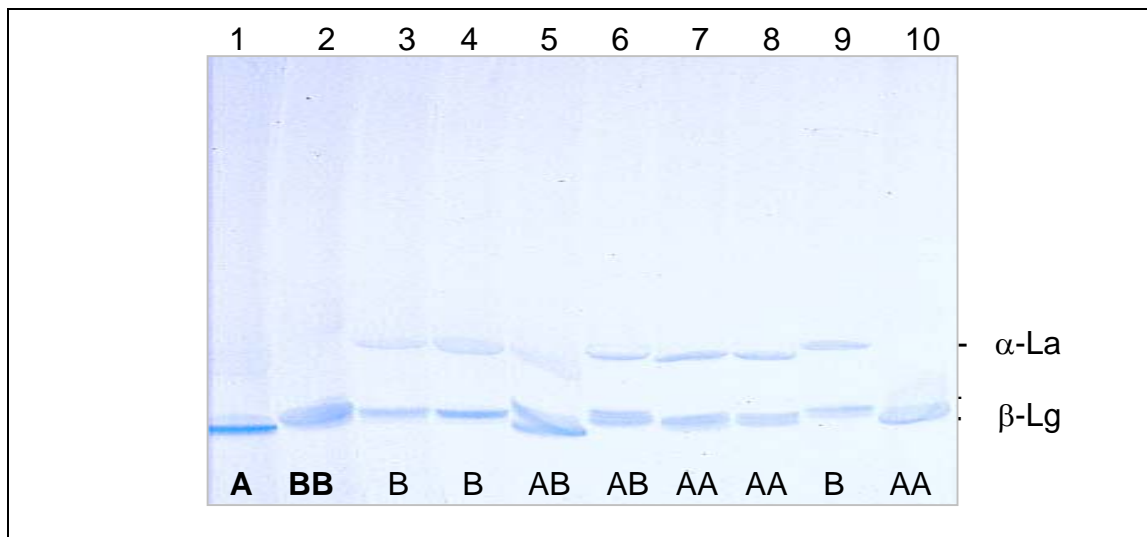


FIGURA 5. Electroforesis de Isoenfoque de 8 muestras.

1:St. β -Lg A, 2:St. β -Lg B, 3:655, 4:686, 5:1353, 6:1579, 7:1607, 8:1652, 9:2067, 10:2246

En el CUADRO 7 se presenta un resumen de los resultados de la identificación de la expresión fenotípica de β -Lg obtenidos por electroforesis de isoenfoque y alcalina, observándose por electroforesis de isoenfoque principalmente el fenotipo B de β -Lg, en 8 muestras se observó un alelo identificado como B en 12 se observaron dos alelos, cuatro de éstos identificados como BB, en cinco se observó el fenotipo AB y en sólo 3 se identificó AA.

Como se observa en el CUADRO 7, en seis muestras hay diferencia en la identificación de la expresión fenotípica entre los diferentes métodos. Las muestras 655, 1592, 1652 y 2220 se observan por electroforesis alcalina como AB y por electroforesis de isoenfoque estas muestras se observan como

expresión B, a excepción de la 1652 que resulta AA. El porcentaje del alelo A en las cuatro muestras AB, es levemente mayor a la de B según las densitometrías por electroforesis alcalina ($56,41 \pm 2,09\%$ de A y $43,60 \pm 2,09\%$ de B), razón por la cual, al realizar electroforesis de isoenfoque en el caso de estas muestras se podría estar revelando sólo uno de sus alelos. En la muestra 1579 se observa sólo un alelo por electroforesis alcalina identificado como B y por electroforesis de isoenfoque se observan dos alelos identificados como AB, cuyo porcentaje de A es menor al de B con $41,78\%$ y $58,22\%$ respectivamente. Respecto la muestra 686, se observa por electroforesis alcalina como A y por electroforesis de isoenfoque como B, ésta diferencia no queda clara en este estudio, pero podría estar asociada a la sensibilidad de cada uno de los métodos aplicados.

CUADRO 7 Variantes genéticas obtenidas por electroforesis de Isoenfoque y electroforesis alcalina.

Muestra	Electroforesis		Muestra	Electroforesis	
	Alcalina	Isoenfoque		Alcalina	Isoenfoque
636	B	BB	1592	AB (55,3/44,7)*	B
655	AB (57,38/42,62)*	B	1593	BB	BB
686	A	B	1597	AB (55,96/44,07)*	AB (61,97/38,03)*
720	BB	BB	1607	AA	AA
1348	AB (56,36/43,64)*	AB (52,27/47,73)*	1613	B	B
1353	AB (52,27/47,73)*	AB (57,21/42,77)*	1652	AB (59,21/40,79)*	AA
1573	AB (58,21/41,79)*	AB (70,04/29,96)*	2067	B	B
1579	B	AB (41,78/58,22)*	2091	BB	BB
1581	B	B	2220	AB (56,56/43,44)*	B
1586	B	B	2246	AA	AA

* () : Porcentaje de variante A y B.

4.1.4 Ventajas y desventajas, electroforesis alcalina v/s isoenfoque. Una de las ventajas de la electroforesis alcalina es ser un método económico, puesto que según VIVANCO (2005), en un estudio de costos de implementación de métodos de identificación de variantes genéticas de κ -caseína, en el cual comparó los métodos de electroforesis alcalina con electroforesis de isoenfoque y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y (RFLP), observó que el método de electroforesis alcalina era el más económico.

En términos generales, se puede decir que la diferencia radica en los reactivos, los equipos y su capacidad. Este último factor, cantidad de muestras capaz de analizar por corrida, dependerá de la capacidad individual del equipo utilizado, lo que para este estudio significó una mayor capacidad para la electroforesis alcalina, ya que el equipo utilizado (Miniprotean) permite el análisis de 14 muestras y 6 estándares por corrida, con la posibilidad de aumentar las cámaras en la misma fuente de poder, multiplicando por 4 el número de muestras a analizar en un mismo tiempo de corrida, en cambio para isoenfoque la cámara utilizada sólo tiene capacidad para 10 muestras y 2 estándares.

El menor tiempo de corrida es otra ventaja en la electroforesis alcalina relacionada con el aspecto económico, utilizando 2 horas de corrida mientras que para isoenfoque se necesitan 4 horas de corrida con muestra y 1 hora 45 minutos para precorrida del gel sin muestra.

Al tener como principio de separación la electroforesis de isoenfoque el gradiente de pH, se logra la obtención de especificidad en las separaciones, observándose en los geles sólo las proteínas de interés si se logra una buena separación de ésta, en cambio al realizar las corridas por electroforesis alcalina se observan todas las degradaciones e impurezas de la muestra.

La electroforesis es una técnica muy sensible y puede ser afectada por muchos errores experimentales, como la pureza del reactivo, tiempo de corrida, variación de voltaje, preparación de las muestras y velocidad de la polimerización, la cual está relacionada directamente con la preparación del gel en que la deficiente homogenización de la solución influye en la distribución de mezcla del gel en los tubos para isoenfoque (RUBINSON y RUBINSON, 2001). Referente a lo anterior, el hecho de usar una placa para la formación del gel en electroforesis alcalina es una ventaja, ya que en el caso de la placa todas las muestras y estándares corridos se enfrentan a condiciones idénticas. Las diferencias obtenidas en el presente estudio entre ambos métodos utilizados se explicarían por los factores anteriormente mencionados.

4.2 Contenido proteico en las muestras de leche

En el ANEXO 11 se presentan los resultados del contenido de proteínas de cada muestra según mes de muestreo.

4.2.1 Contenido de caseína. En el CUADRO 8 se observa que existe diferencia significativa entre los meses de muestreo según los resultados obtenidos en el contenido de caseína (ANEXO 12).

El promedio general para el total de muestras fue de $2,33 \pm 0,27\%$, lo que concuerda con lo publicado por SUMMER *et al.* (2002), quienes obtuvieron un promedio de $2,32 \pm 0,1 \%$ de un total de 12 muestras de vacas Friesian Italiana, valor que también coincide con lo obtenido por MARIANI *et al.* (1998) en la misma raza. Para la raza Holstein, según LUNDÉN *et al.* (1997), el promedio del contenido de caseína fue de $2,36 \pm 0,24\%$ en 204 muestras.

CUADRO 8 Promedio y desviación estándar del contenido de caseína según mes de muestreo.

Muestreo	Número de muestras	Promedio \pm desviación estándar (%)
Julio	40	2,10 \pm 0,19 ^a
Agosto	40	2,28 \pm 0,20 ^b
Septiembre	40	2,60 \pm 0,15 ^c
Total muestreos	120	2,33 \pm 0,27

Letras desiguales demuestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

El contenido de caseína fue determinado por diferencia entre las proteínas del suero y las proteínas totales como se mencionó en material y método. En el estudio paralelo en el cual se analizó el contenido de proteína total también se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre muestreos, lo cual fue explicado por la diferencia de la alimentación entre los meses de muestreo, al igual que para caseína, dado que ésta representa alrededor del 80% del contenido total de proteínas de la leche (WALSTRA *et al.*, 2001).

POLLOTT (2004), describió en 36 vacas Friesian, la variación de los componentes de la leche según dietas con diferentes cantidades de concentrado, observando diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos de 16 kg y 24 kg de concentrado, obteniendo 2,43 y 2,61% de caseína respectivamente, tendencia que se cumple en el presente estudio en los meses de muestreo Agosto y Septiembre con 2,28 \pm 0,20% y 2,60 \pm 0,15% respectivamente, en que la cantidad de concentrado en la alimentación de las vacas es mayor que en el primer mes de muestreo (ANEXO 1).

4.2.2 Contenido de proteínas del suero. Para las proteínas del suero el promedio calculado en el total de las muestras fue de 0,77 \pm 0,09 % similar a lo obtenido por AULDIST *et al.* (2004) en 29 vacas Friesian, cuyo promedio fue de

0,81%. En cambio, NG-KWAI-HANG (2002), obtuvo un promedio de $0,84 \pm 0,06\%$, en 6 vacas de raza Jersey. Los promedios obtenidos en cada muestreo se pueden observar en el CUADRO 9, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre el primer y segundo mes de muestreo con el tercer mes de muestreo.

Según WALSTRA *et al.* (2001), una dieta rica en proteínas podría originar un aumento de nitrógeno no proteico, como se observa en el ANEXO 1, la alimentación en el mes de Septiembre incluye melaza, concentrado y un aumento en la pradera. De acuerdo a ROJAS y CATRILEO (2004), el melazan aporta una proteína con alto contenido de nitrógeno no proteico, lo cual podría estar contribuyendo a la diferencia estadísticamente significativa existente de este mes con los dos anteriores, ya que con el método de determinación (Kjeldahl) se obtiene el contenido de proteína cruda presente en la muestra.

CUADRO 9 Promedio y desviación estándar del contenido de proteínas del suero según mes de muestreo.

Muestreo	Número de muestras	Promedio \pm desviación estándar (%)
Julio	40	$0,72 \pm 0,09^a$
Agosto	40	$0,76 \pm 0,07^a$
Septiembre	40	$0,82 \pm 0,09^b$
Total muestreos	120	$0,77 \pm 0,09$

Letras desiguales demuestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

4.2.3 Influencia de la etapa de lactancia sobre el contenido de proteínas.

En el CUADRO 10 se presenta el promedio del contenido de caseína y el promedio del contenido de proteínas del suero obtenido de los resultados en el primer mes de muestreo, para tres grupos de vacas separadas por meses de lactancias (ANEXO 1).

CUADRO 10 Promedio y desviación estándar del contenido de proteínas según etapa de lactancia.

Grupos etapa de lactancia (Etapas)	Número de muestras	Promedio \pm desviación estándar	
		Caseína (%)	Proteínas del suero (%)
1 (1 y 2)	18	2,06 \pm 0,17 ^a	0,65 \pm 0,05 ^a
2 (3 y 4)	18	2,15 \pm 0,23 ^a	0,78 \pm 0,09 ^b
3 (6)	4	2,08 \pm 0, 02 ^a	0,72 \pm 0,01 ^c
Total	40	2,10 \pm 0,19	0,72 \pm 0,09

En el caso de las caseínas, no existe diferencia significativa entre los diferentes grupos de vacas, sin embargo, numéricamente se observa un aumento en el segundo grupo con $2,15 \pm 0,23\%$, grupo que se encontraba en el tercer y cuarto mes de lactancia. En el tercer grupo se observa un descenso del contenido de caseína con $2,08 \pm 0,02\%$.

Según lo determinado por OSTERSEN *et al.* (1997), el valor máximo del contenido de caseína se presenta al cuarto mes de lactancia, observando un descenso en las siguientes etapas, AULDIST *et al.* (1998), sin embargo, revela un aumento del contenido de caseína con las etapas de lactancia, reportando al comienzo de la lactancia $2,36\%$ de caseína y en la mitad de la lactancia $2,77\%$.

En el análisis estadístico, de las proteínas del suero para determinar las diferencias significativas se debió utilizar el gráfico de caja y bigote (ANEXO 13). Como se observa en el CUADRO 10 existe diferencia estadísticamente significativa el contenido de proteínas del suero, obteniéndose el promedio menor en el primer grupo de vacas con $0,65 \pm 0,05\%$ que se encontraban en el primer y segundo mes de lactancia, mostrando un aumento en el segundo grupo con $0,78 \pm 0,09\%$ y para el tercer grupo se observa una disminución con $0,72 \pm 0,01\%$.

AULDIST *et al.* (1998), en un estudio a 80 vacas Friesian, observaron que los valores de proteínas del suero van aumentando con las etapas de lactancia, con un valor en el inicio de 0,50% y a la mitad de la etapa de lactancia de 0,60%, siguiendo la tendencia al aumento al final de ésta. Por otra parte, OSTERSEN *et al.* (1997) en 39 vacas Holstein, observaron una disminución de las proteínas del suero entre el primer y segundo mes de lactancia, aumentando éstas después de los seis meses de lactancia.

4.3 Influencia de las variantes genéticas de β -Lg en el contenido de proteínas

En el CUADRO 11 se presentan los resultados del efecto de las variantes genéticas sobre el contenido de caseína y proteínas del suero, realizado según los resultados obtenidos por electroforesis alcalina (ANEXO 12).

CUADRO 11 Promedio y desviación estándar del contenido de proteínas según la expresión de variantes genéticas de β -Lg.

Variantes genéticas	Número de muestras	Promedio \pm desviación estándar	
		Caseína (%)	Proteínas del suero (%)
A	18	2,32 \pm 0,26 ^a	0,83 \pm 0,10 ^a
A y B	48	2,30 \pm 0,27 ^a	0,77 \pm 0,08 ^b
B	54	2,35 \pm 0,27 ^a	0,74 \pm 0,09 ^b
Total muestreos	120	2,33 \pm 0,27	0,77 \pm 0,09

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

4.3.1 Relación entre las variantes genéticas de β -Lg y contenido de caseína. Como se muestra en el CUADRO 11, no se encontró diferencias estadísticamente significativas según el fenotipo de β -Lg en el contenido de caseína, sin embargo numéricamente el promedio del contenido de caseína es

mayor en las muestras que presentan la variante B con un promedio de $2,35 \pm 0,27\%$.

KRAMM (2003), en muestras de leche de 10 vacas, tampoco encontró diferencias significativas en el porcentaje de caseína respecto a las variantes genéticas de β -lactoglobulina, pero el mayor porcentaje lo presentó la variante A.

Por otra parte AULDIST *et al.* (2000), determinaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los resultados del contenido de caseína de 22 vacas Friesian, con dos tratamientos de alimentación (pastoreo libre y restringido) el fenotipo AA se caracterizó por un menor contenido de caseína en ambos tratamientos, con 2,56% y 2,67 % respectivamente y un mayor contenido en las muestras con fenotipo BB, con 2,70% y 2,84% respectivamente.

4.3.2 Relación entre las variantes genéticas de β -Lg y el contenido de proteínas del suero. En los resultados del efecto de las variantes genéticas sobre el contenido de proteínas del suero no existe diferencia estadísticamente significativa entre las variantes B y AB como se observa en el CUADRO 11, sin embargo, sí se determinó diferencia estadísticamente significativa entre éstas y la expresión de la variante A, cuyas muestras revelan el mayor contenido de proteínas del suero con $0,83 \pm 0,10\%$ (A>AB>B).

Estos resultados coinciden con lo reportado por KRAMM (2003), cuya investigación fue realizada con 10 muestras de vacas Frisón Negro en época de invierno, en que el porcentaje de proteínas del suero para leche con fenotipo AA de β -Lg fue mayor que el obtenido en leches de fenotipo AB, existiendo diferencia estadísticamente significativa entre ellas.

BRAUNSCHEWEIG y PUHAN (1997), en un estudio de genotipos en rebaños de dos razas, raza Braunvieh y Fleckvieh, ambas con porcentaje de Holstenización, se encontró influencia significativa en el contenido de proteínas del suero en ambas razas (AA>AB>BB).

5. CONCLUSIONES

- Al realizar electroforesis alcalina se logró la identificación de las variantes genéticas A y B de β -Lg, resultando un método más rápido y fácil de realizar que la electroforesis de isoenfoque.
- Se rechaza la hipótesis nula, ya que la presencia de la variante genética B de β -Lg en las muestras de leche no presenta un efecto significativo en el mayor contenido de caseína.
- Se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de caseína y proteínas del suero entre los meses de muestreo (Julio, Agosto y Septiembre).
- No se determinaron diferencias estadísticamente significativa en el contenido de caseína según la etapa de lactancia para el contenido de caseína, pero sí entre el contenido de proteínas del suero.
- No se observaron efectos de las variantes genéticas de β -Lg sobre el contenido de caseína, pero si en las proteínas del suero entre las variantes AB y B de β -Lg respecto a la A.

6. RESUMEN

El objetivo general del presente estudio fue determinar el contenido de caseína total y proteína del suero, además de identificar las variantes genéticas A y B de β -Lactoglobulina por electroforesis alcalina y electroforesis de isoenfoque en leche de vacas Frisón Negro.

Las muestras de leche se obtuvieron de 20 vacas individuales, provenientes del fundo Santa Rosa perteneciente a la Universidad Austral de Chile, ubicado en la provincia de Valdivia, X Región. Se realizaron tres repeticiones en la época Invierno, en los meses de Julio, Agosto y Septiembre del año 2005.

Al realizar electroforesis alcalina se logró la identificación de las variantes genéticas A y B de β -Lg, las muestras en que se presentaron ambas revelan un mayor porcentaje de variante A respecto a la de B, con un promedio de $55,96 \pm 3,77\%$ y $44,87 \pm 3,76\%$ respectivamente. La frecuencia alélica identificada en el total de las muestras fue de $60,61\%$ de B y $39,39\%$ de A.

El promedio del contenido de caseína fue de $2,33 \pm 0,27\%$, existiendo diferencia estadísticamente significativa entre muestreos. Para el contenido de proteínas del suero se obtuvo un promedio de $0,77 \pm 0,09\%$, existiendo diferencia significativa sólo en el promedio del tercer muestreo.

Para el contenido de caseína no se observó influencia de las variantes de β -lactoglobulina, con un promedio para la variante A de $2,32 \pm 0,26\%$, la variante AB de $2,30 \pm 0,27\%$ y la variante B de $2,35 \pm 0,27\%$. Se determinó diferencia estadísticamente significativa sobre el contenido de proteínas del suero entre las muestras que presentan la variante B y AB con las que presentan variante A de β -Lg (A>AB>B).

SUMMARY

The objective of this study was to determine the total content of casein and protein of the whey and identifying the A and B genetic variants of β -Lactoglobulin by alkaline and isoelectric focusing electrophoresis in the milk of cows Chilean Holstein-Friesian breed.

The milk samples were obtained from 20 individual cows from Fundo Santa Rosa which belongs to the Universidad Austral de Chile, in the province of Valdivia, X Region. Three repetitions were made during the winter months of July, August and September of 2005.

When alkaline electrophoresis was done, identification of the genetic variants A and B of β -Lg was possible, the sample in which both variants were present showed a larger percentage of the A strain in relation to the B, with an average of $55,96 \pm 3,77\%$ and $44,98 \pm 3,76\%$ respectively. The allelic frequency identified in the overall total of samples was of 60,61% of B and 39,39% of A.

The casein content average was $2,33 \pm 0,27 \%$, with a significant difference between the samples. For the whey protein content, the average was $0,77 \pm 0,09 \%$.

For the casein content, no influence of the β -lactoglobulin variants were observed, with an average of the A variant of $2,32 \pm 0,26\%$, AB of $2,30 \pm 0,27\%$ and B de $2,35 \pm 0,27\%$. A significant statistical difference was determined on the whey protein content between the samples that present a B and AB variants and those in which the A strain was present in β -Lg (A>AB>B).

7. BIBLIOGRAFÍA

- ALAIS, C. 1985. Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera. Editorial Reverté. Barcelona. España. 873 p.
- ALTRAN, L. y DAL BO, A. 1996. Influenze sulla composizione del latte del polimorfismo genetico della β -lattoglobulina nella razza pezzata rossa allevata in friuli. *Scienza e Tecnica lattiero-casearia* 47(5): 331 - 338.
- ANDREWS, A., 1992. Electrophoresis; Theory, Techniques, and biochemical and Clinical Applications. Editorial Oxford University. New York. EEUU. 452 p.
- ANRIQUE, R., VALDERRAMA, X. y FUCHSLOCHER, R. 1995. Composición de alimentos para el ganado. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia, Chile. 56p
- AULDIST, M., JOHNSTON, K., WHITE, N., FITZSIMONS, P. y BOLAND, M. 2004. A comparison of the composition, coagulation characteristics and cheesemaking capacity of milk from Friesian and Jersey dairy cows. *Journal of Dairy Research* 71: 51–57.
- AULDIST, M., THOMSON, N., MACKLE, T., HILL, J. y PROSSER, C. 2000. Effects of Pasture Allowance on the Yield and Composition of Milk from Cows of Different β -Lactoglobulin Phenotypes. *Journal of Dairy Science* 83 (9): 2069 - 2074.

- AULDIST, M., WALSH, B. y THOMSON, N. 1998. Seasonal and lactational incidences on bovine milk composition in New Zealand. *Journal of Dairy Research* 65: 401 – 411.
- BASAUL, K. 2003. Relación entre las variantes genéticas de β -Lg con propiedades de composición y aptitud a la coagulación de leche de vacas Holstein-Friesian y Jersey. Tesis Lic. Ingeniería en Alimentos. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia. 74 p.
- BELITZ, H. y GROSCH, W. 1997. Química de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 1087 p.
- BELITZ, H., GROSCH, W. 1999. Tabla de composición de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 430 p.
- BENAVIDES, T. 2003. Efecto de las variantes genéticas A y B de κ -caseína y β -lactoglobulina sobre las propiedades de coagulación de la leche. Tesis Lic. Ingeniería en Alimentos. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia. 108 p.
- BOBE, G., BEITZ, D., FREEMAN, A. y LINDBERG, G. 1999. Effects of milk protein composition and its genetic parameter estimates. *Journal of Dairy Science* 82 (12): 2797 - 2804.
- BOETTCHER, P., CAROLI, A., STELLA, A., CHESSA, S., BUDELLI, E. y CANAVESI, F. 2004. Effects of casein haplotypes on milk production traits in Italian and Brown Swiss cattle. *Journal of Dairy Science* 87 (12): 4311 - 4317.

- BRAUNSCHEWEIG, M. y PUHAN, Z. 1997. Influence of casein haplotypes on quantitative traits in milk of braunvieh and fleckvieh in switzerland. En: Milk Protein Polymorphism. International Dairy Federation. Brussels, Belgium. 60 – 70p.
- BUXADÉ, C. 1996. Zootecnia, bases de producción animal, producción vacuna de leche y carne. Ediciones Mundi-Prensa. España. 342 p.
- CASANOVA, M. 2001. Identificación de las variantes genéticas de k-caseína en leche de vacas Holstein Friesian y Jersey por electroforesis de isoenfoque. Tesis Lic. Ingeniería en Alimentos. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia. 115 p.
- CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACION (INN). 1998. Leche y productos lácteos – Muestreo - parte 1: Leche cruda. Norma Chilena NCh 1011/1. Santiago. Chile. 9 p.
- EHREFENFELD, J. 1991. Frison Negro. Centro de inseminación artificial-CIA Universidad Austral de Chile. Disponible en: <http://www.uach.cl/centro/inseminacionartificial/productos/frizonnegro.htm>. Consultado el 15-05-05
- FENNEMA, O. 2000. Química de los alimentos. Editorial Acribia S. A. Zaragoza. España. 1258 p.
- FOX, P. y McSWEENEY, P. 1998. Dairy Chemistry and Biochemistry. Blackie Academic & Professional. Ireland. 478 p.

GAO, H., NG-KWAI-HANG, K. y BRITTEN, M. 2002. The influence of genetic variants on gelling properties of β -lactoglobulin. *Milchwissenschaft* 57(1): 6 – 9 p.

GARCÍA, H. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnóstico*. 1 (2): 31-40. Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/uni/vol1_2_00/uni07200.htm. Consultado el 06/05/05.

GONZÁLEZ, H., GARCÍA, X., MAGOFKE, J.C. Y CUEVAS, A. 2002. Comparación de diferentes cruzamientos entre frisón negro chileno con frisón neozelandés y con holstein americano. Disponible en: <http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/articulos/2002/195/pdf/gonzalez.pdf>. Consultado 12-05-05.

HAMES, B. 1998. *Gel electrophoresis of Proteins, A practical approach*. Oxford University Press. EE.UU. 847 p.

HARTL, D. y JONES, E. 1999. *Genetic: Principles and analysis*. Jones and Bartlett publishers. London. UK. 840 p.

INSTITUTO DE DESARROLLO AGROPECUARIO - INDAP. 2004. Estándar Técnico: Ganado Lechero. Disponible en: <http://serinfo.indap.cl/Doc/Est%C3%A1ndar%20T%C3%A9cnico%20Ganado%20Lechero.doc>. Consultado el 15-05-05.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF/FIL). 1993. *Milk: Determination of Nitrogen content. Part 3: Block – digestion method*. FIL/IDF 20B: 1993.

- KRAMM, J. 2003. Composición Proteica y su Relación con las Variantes Genéticas A y B de κ -caseína y β -lactoglobulina en Leche de Vacas Frisón Negro. Tesis Lic. Ingeniería en Alimentos. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia. 126 p.
- LATRILLE, L. 1999. Calidad de la leche. En: Producción Animal 1999. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias – Instituto de Producción Animal. Valdivia, Chile . 215 – 236 p.
- LOWE, R., ANEMA, S., PATERSON, G. y HILL, J. 1995. Simultaneous separation of the β -lactoglobulina A, B and C variants using polyacrylamide gel electrophoresis. *Milchwissenschaft*. 50(12): 663 - 666.
- LOWRY, O., ROSEBROUGH, N., FARR, A. y RANDALL, R. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265 - 275.
- LUM, L., DOVC, D. y MEDRANO, J. 1997. Polymorphisms of Bovine β -lactoglobulin promoter and differences in the binding affinity of activator protein-2 transcription factor. *Journal of Dairy Science* 80(7): 1389 - 1397.
- LUNDÉN, A., NILSSON, M. y JANSON, L. 1997. Marked effect of β -lactoglobulin polymorphism on the ratio of casein to total protein in milk. *Journal of Dairy Science* 80(11): 2996 – 3005.
- MARIANI, P., SUMMER, A., FRANCHETTI, M., VECCHIA, P. y FOSSA, E. 1998. Ripartizione percentuale delle caseine in latí di massa delle vacche

di razza Frisona, Bruna, Reggiana e Modenase. *Scienza e Técnica lattiero-casearia* 49(4): 191 - 192.

MARIANI, P., SERVENTI, P. y FOSSA, E. 1997. Contenido di caseina, varianti genetiche ed attitudine tecnologico-casearia del latte delle vacche di razza bruna nella produzione del formaggio grana. Allegato alla rivista "la razza bruna italiana". 2: 8-14.

MEDRANO, J. y SHARROW, L. 1989. Milk protein typing of bovine mammary gland tissue used to generate a complementary deoxyribonucleic acid library. *Journal of Dairy Science* 72(12): 3190 – 3196.

MOLINA, L., KRAMM, J., BRITO, C., CARRILLO, B., PINTO, M. y FERRANDO, A. 2006^a. Protein composition of milk from Holstein-Friesian dairy cows its relationship with the variants A and B of kappa-casein and beta-lactoglobulin (Part I). *International Journal of Dairy Technology*. 59(3): 193 – 187.

MOLINA, L., BENAVIDES, T., BRITO, C., CARRILLO, B. y MOLINA, I. 2006^b. Relationship between A and B variants of κ -casein and β -lactoglobulin and coagulation properties of milk (Part II). *International Journal of Dairy Technology*. 59(3): 188 – 191.

NG-KWAI-HANG, K., OTTER, D., LOWE, E., BOLAND, M. y AULDIST, M. 2002. Influence of genetic variants of β -lactoglobulin on milk composition and size casein micelles. *Milchwissenschaft* 57(6): 303 – 306.

NG-KWAI-HANG, K. 1997. A review of the relationship between milk protein polymorphism and milk composition/milk production. En: *Milk protein*

polymorphism. International Dairy Federation. Proceedings of the Seminar held in Palmerston North, New Zealand. 22 – 37.

NORRIS, C., TSAO, M., HAGGARTY, N. y OTTER, D. 1998. Comparison of analytical methods to quantify whey proteins. En: Whey. International Dairy Federation. Belgium. 123 – 139.

OJALA, M., THOMAS, R. y MENDRANO, J. 1997. Effects of milk protein genotypes on the variation for milk production traits of Holstein and Jersey cow in California. *Journal of Dairy Science* 80(8): 1776 – 1785.

OSTERSEN, S., FOLDAGER, J. y HERMANSEN, J. 1997. Effects of stage of lactation, milk protein genotype and body condition at calving on protein composition and renneting properties of bovine milk. *Journal of Dairy Research* 64: 207 – 219.

PEARCE, F., BANKS, B., BANTHORPE, D., BERRY, A., DAVIES, H., y VERNON, C. 1972. Isolation and characterization of Nerve-Growth Factor from the Venom of *Visperarusselli*. *Eur. Biochemistry*: 27: 417-425.

PINTO, M., VEGA Y LEON, S. y PEREZ, N. 1998. Métodos de análisis de la leche y derivados. Garantía de calidad. Editorial U.A.CH., Dirección de investigación y desarrollo. Valdivia. Chile. 489 p.

POLLOTT, G. 2004. Deconstructing milk yield and composition during lactation using biologically based lactation models. *Journal of Dairy Science* 87: 2375–2387.

POTTER, N. y HOTCHKISS, J. 1999. *Ciencia de los Alimentos*. Editorial Acribia. S. A. Zaragoza. España. 667 p.

- PRIMO, E. 1997. La leche y los productos lácteos: Química de alimentos. Editorial Síntesis. S.A. Madrid. España. 462 p.
- REINA, M. 2003. Electroforesis en geles de poliacrilamida. Disponible en: <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/page.htm>. Consultado el: 16-05-05.
- ROJAS, C. y CATRILEO, A. 2004. Alimentación del ganado. En: Manual de producción de bovinos de carne para la VIII, IX y X regiones. Instituto de Investigación Agropecuaria. Temuco. Chile. 85 – 106 p.
- RUBINSON, K. y RUBINSON, J. 2001. Análisis instrumental. Editorial Prentice-Hall. España. 847 p.
- SKOOG, D., HOLLER, J. y NIEMAN, T. 2001. Principios de análisis instrumentales. Editorial McGraw-Hill. Madrid. España. 1028 p.
- SUMMER, A., MALACARNE, M., MARTUZZI, F. y MARIANI, P. 2002. Structural and functional characteristics of modenese cow milk in parmigiano-reggiano cheese production. Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma. 22: 163 - 174.
- VIVANCO, O. 2005. Identificación de las Variantes Genéticas A y B de k-caseína por Electroforesis Alcalina, de Isoenfoque, y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Tesis Lic. Ingeniería en Alimentos. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia. 82 p.
- WALSTRA, P., GEURTS, T., NOOMEN, A., JELLEMA, A. y VAN BOEKEL, M. 2001. Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos. Editorial Acribia S. A. Zaragoza. España. 730 p.

- WINKELMAN, A. 1997. Associations of β -lactoglobulin A, B and C variants with production traits in New Zealand dairy cattle. En: Milk Protein Polymorphism. International Dairy Federation. Brussels. Belgium. 71 – 80.
- 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. 38 – 45.
- WONG, D. 1995. Química de los Alimentos: Mecanismo y Teoría. Editorial Acribia S. A. Zaragoza. España. 476 p.

ANEXOS

ANEXO 1

Características de las vacas en estudio

- Vacas seleccionadas según características generales agrupadas según etapa de lactancia.

Grupo	Nombre	Edad (meses)	Nº de Lactancia	Etapa de Lactancia meses	Mastitis
1	1573	39	2	1	A
	1597	38	2	1	A
	1613	38	2	1	A
	1581	39	2	2	A
	1586	39	2	2	A
	1592	39	2	2	A
	1593	39	2	2	A
	1607	38	2	2	A
	2091	97	5	2	A
2	655	88	4	3	A
	720	87	5	3	A
	1348	75	4	3	A
	1353	75	4	3	A
	2067	100	5	3	A
	2220	73	4	3	A
	2246	72	4	3	A
	636	89	5	4	A
	686	88	5	4	A
3	1579	39	1	6	A
	1652	36	1	6	A

FUENTE: CHILE, CENTRO DE INSEMINACIÓN ARTIFICIA, Universidad Austral Chile (2005)

- En cada muestreo la muestra 1348 se tomó de 3 cuartos por tener 1/4 seco.

- A: Ausencia de mastitis

- Alimentación por mes de muestreo

Alimento/ vaca (Kg/día)	INVIERNO					
	Julio		Agosto		Septiembre	
Ensilaje	40	30	10	20	-	-
Melazán	-	-	3	-	3	3
Concentrado Suralim	4	4	6	6	5	5
Sales minerales	-	-	0,250	0,250	0,250	0,200
Pradera (pastoreo)	~10	~20	~10	~7	~60	~60

ANEXO 2
Resultados de análisis RMD a la totalidad de vacas del Fundo Santa Rosa
Laboratorio calidad de Leche-Cooprinsem

Muestra	Recuento Células Somáticas (x 1000)	Muestra	Recuento Células Somáticas (x 1000)
546	1484	1586	45
591	136	1592	36
636	56	1593	22
642	583	1596	24
655	181	1597	100
659	647	1607	15
686	67	1609	49
690	40	1611	21
698	491	1613	27
716	183	1614	22
720	52	1631	41
825	4330	1638	14
1096	291	1639	162
1117	81	1652	25
1145	375	1655	23
1173	38	1903	490
1309	283	1957	63
1311	15	1985	30
1348	120	2067	158
1353	14	2068	176
1357	26	2091	41
1388	1520	2168	400
1398	227	2172	118
1571	21	2182	1009
1573	42	2220	60
1574	15	2246	20
1579	35	ESTQ.PREDIO	248
1581	13		

- > 200.000 = Presencia de Mastitis.

ANEXO 3

Preparación de muestras de β -lactoglobulina

Separación de β -lactoglobulina de acuerdo al método descrito por LOWE *et al* (1995). Modificado, aumentando el tiempo de centrifugación (13.000 r.p.m) de 5 a 10 min.

- Centrifugar a 5.000 r.p.m. por 20 min para descremar la leche.
- Filtrar con lana de vidrio.
- Ajustar las muestras de leche a pH 4,6 con HCl 1M para preparar el suero.
- Centrifugar a 5.000 r.p.m. por 15 min.
- Filtrar con papel filtro Wattman N°40.
- Centrifugar el suero a 13.000 r.p.m. por 10 min.
- El sobrenadante se utiliza de inmediato o se almacena en congelación.

ANEXO 4

Electroforesis Alcalina

Referencia: MEDRANO y SHARROW (1989).

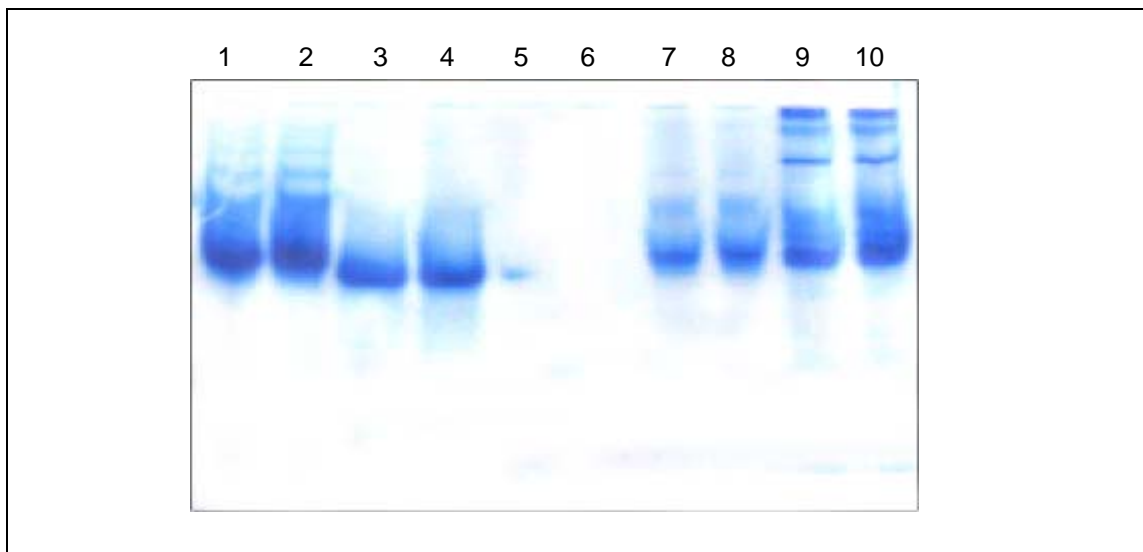
- **Preparación de la muestra.** La proteína separada, se debe diluir con agua destilada en proporción 1:1 a fin de tener 10 μ g de muestra y luego 3:1 con urea 9,6 M y se aplican 8 μ l de muestra en los pocillos del gel.
- **Buffer gel, pH 8,9 (Tris-1,5M).** Disolver 46g Tris en 500 ml de agua, ajustar a pH 8,9 por adición de HCL concentrado (\pm 4ml), luego continuar ajustando con HCL diluido, llevar a un volumen final de 1 litro con agua destilada.
- **Buffer electrodos, pH 8,3.** Disolver 1,4g Tris y 13,0g de glicina en agua y llevar a un volumen final de 2 litros. Si es necesario ajustar el pH.
- **Preparación del gel.** El gel de corrida contiene 2,54 ml de acrilamida/bis-acrilamida al 30,0/0,8%, 0,5 ml de agua destilada, 1,38 ml de buffer Tris 1,5 M de pH 8,9. Se polimeriza por 0,92 ml de persulfato de amonio (APS) 0,37% y 0,17 ml de N,N,N',N'tetrametil-etilendiamina ("TEMED") al 1,75%. Obteniendo un volumen final de solución de 5 ml para una placa.
- **Corrida.** Precorrer el gel a 50 V x 10 min. Luego correr el gel con muestra a 150 V hasta que el frente iónico abandone el gel (aprox. 30 min), correr 90 min más, cumpliéndose 2 horas en la corrida completa.
- **Fijación y teñido.** Los geles se fijan y tiñen con 0,25 g de azul de coomasie R-250 disuelto en 125 ml de isopropanol, 50 ml de ácido acético y en 125 ml de agua destilada.
- **Solución de desteñido.** Ácido acético al 7%.

ANEXO 5

Resultados de electroforesis alcalina

Ensayos preliminares

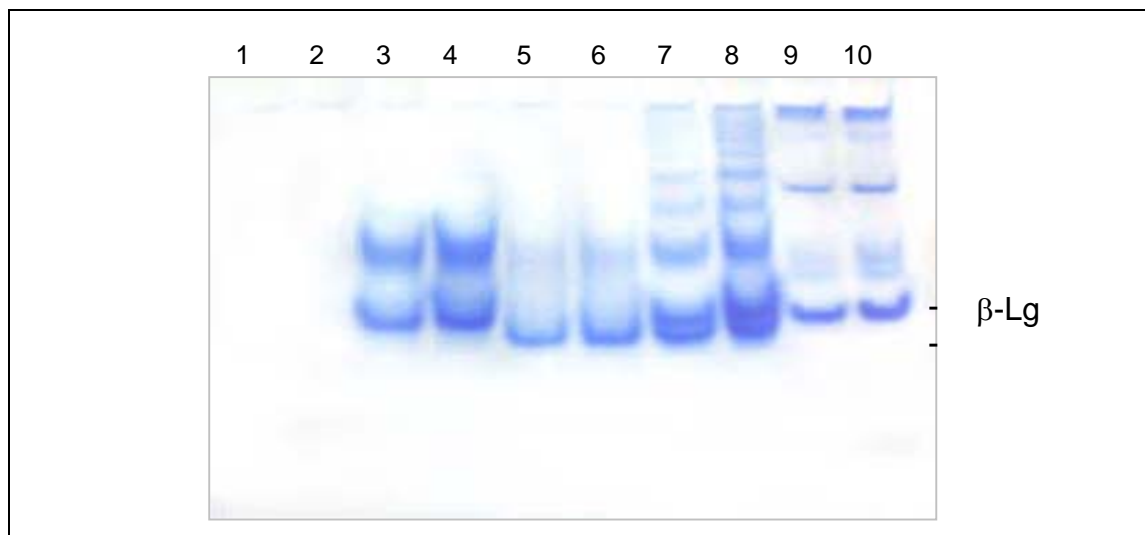
GEL-1. Primer ensayo de electroforesis alcalina



1:β-Lg B, 2:β-Lg B, 3:β-Lg A, 4:β-Lg A, 5:β-Lg B*, 6:β-Lg B*, 7:β-Lg B**, 8:β-Lg B**, 9:muestra 636, 10: muestra 636

- β-Lg B* : Estándar preparado congelado (durante aprox. 1 año).
- β-Lg B** : preparación según electroforesis alcalina para κ-caseína.

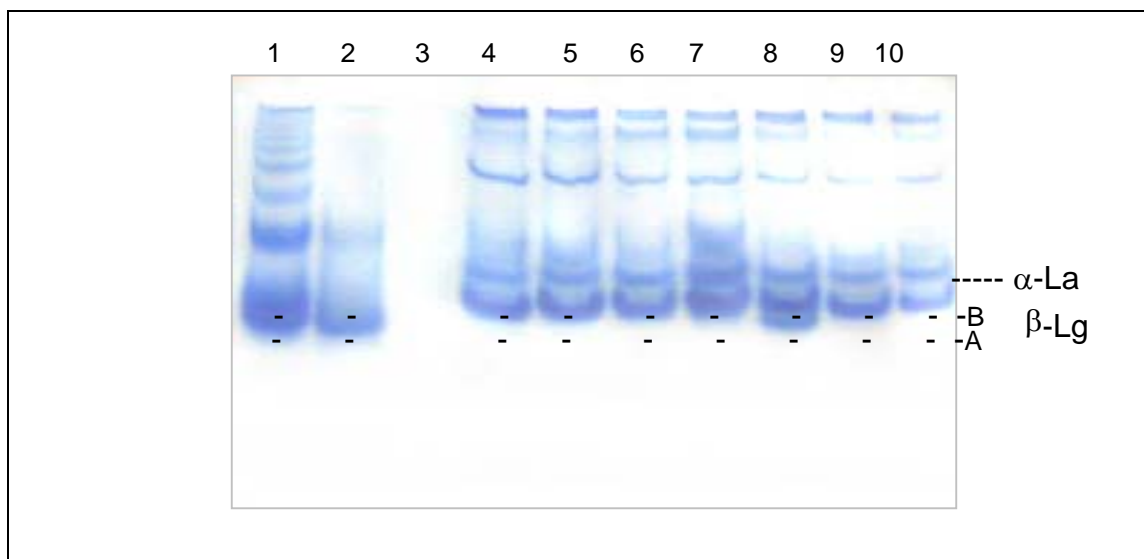
▪ GEL-2. Segundo ensayo de electroforesis alcalina.



1:β-Lg B*, 2: β-Lg B*, 3:β-Lg B, 4:β-Lg B, 5:β-LgA, 6:β-LgA, 7:β-Lg A&B, 8:β-Lg A&B, 9:muestra 636, 10:muestra 636

Continuación ANEXO 5

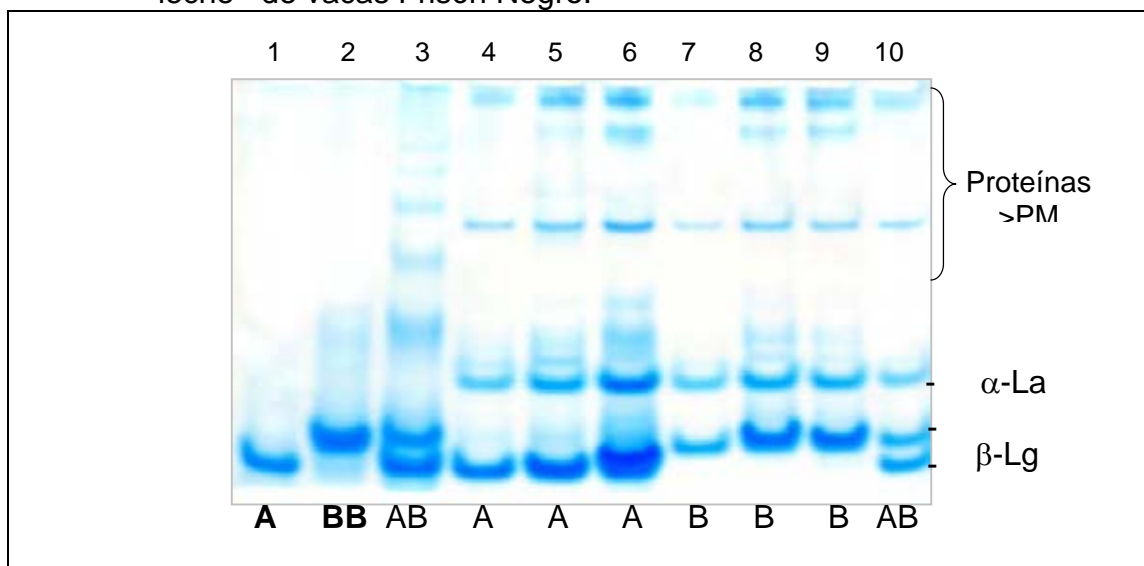
- **GEL-3.** Tercer ensayo de electroforesis alcalina.



1:β-Lg A&B, 2:β-Lg A, 3:β-Lg B*, 4:636, 5:636, 6:1586, 7:1586, 8:Mezcla, 9:636, 10:β-Lg B

Electroforesis Alcalina, 3 repeticiones por muestreo

- **GEL-4.** Electroforesis alcalina para β-lactoglobulina en muestras de leche de vacas Frisón Negro.

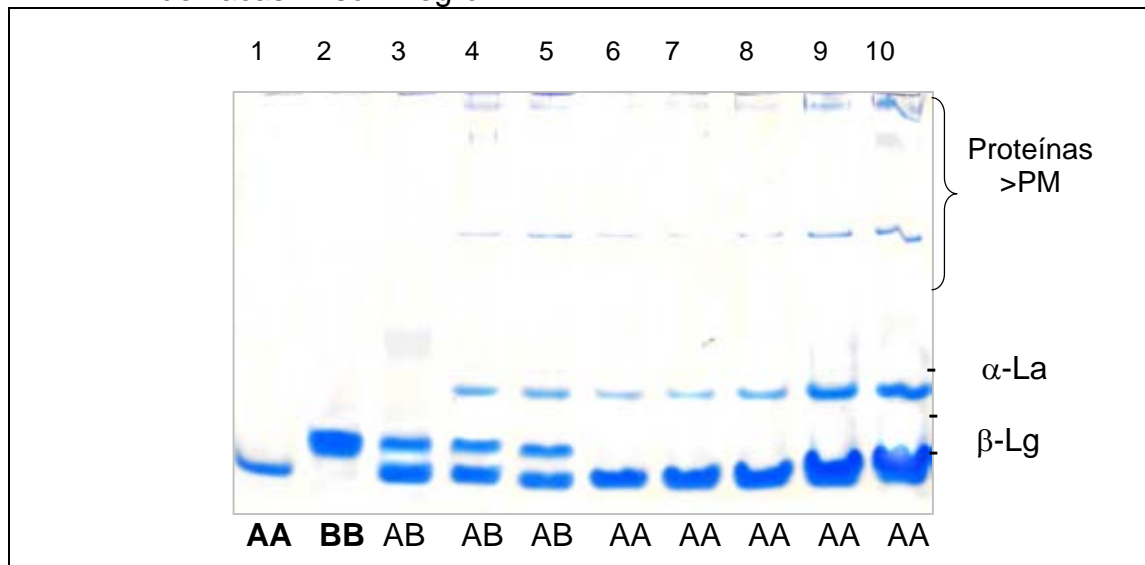


1: St.β-Lg A, 2: St.β-Lg B, 3:St.β-LgA&B, 4:686(M1), 5:686(M2), 6:686(M3), 7:1613(M1), 8:1613(M2), 9:1613(M3), 10:1353(M1)

- M = Muestreo

Continuación ANEXO 5

- **GEL-5.** Electroforesis alcalina para β -lactoglobulina en muestras de leche de vacas Frisón Negro.



1:St.β-Lg A, 2:St.β-Lg B, 3:St.β-Lg A&B, 4:1353(M2), 5:1353(M3), 6:1607(M1), 7:1607(M2), 8:1607(M3), 9:2246(M2), 10:2246(M3)

- M = Muestreo

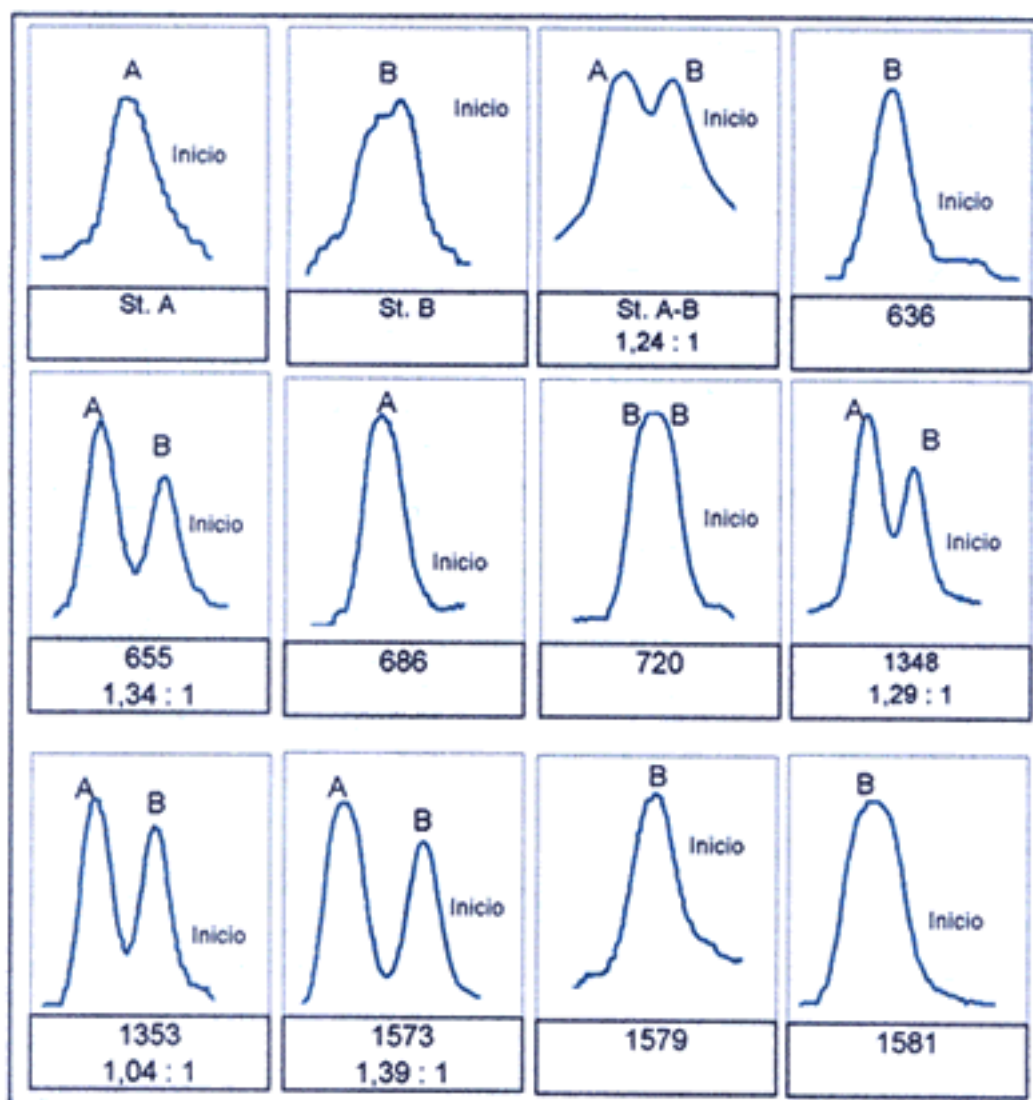
ANEXO 6

Distancias de migración de las bandas por electroforesis alcalina

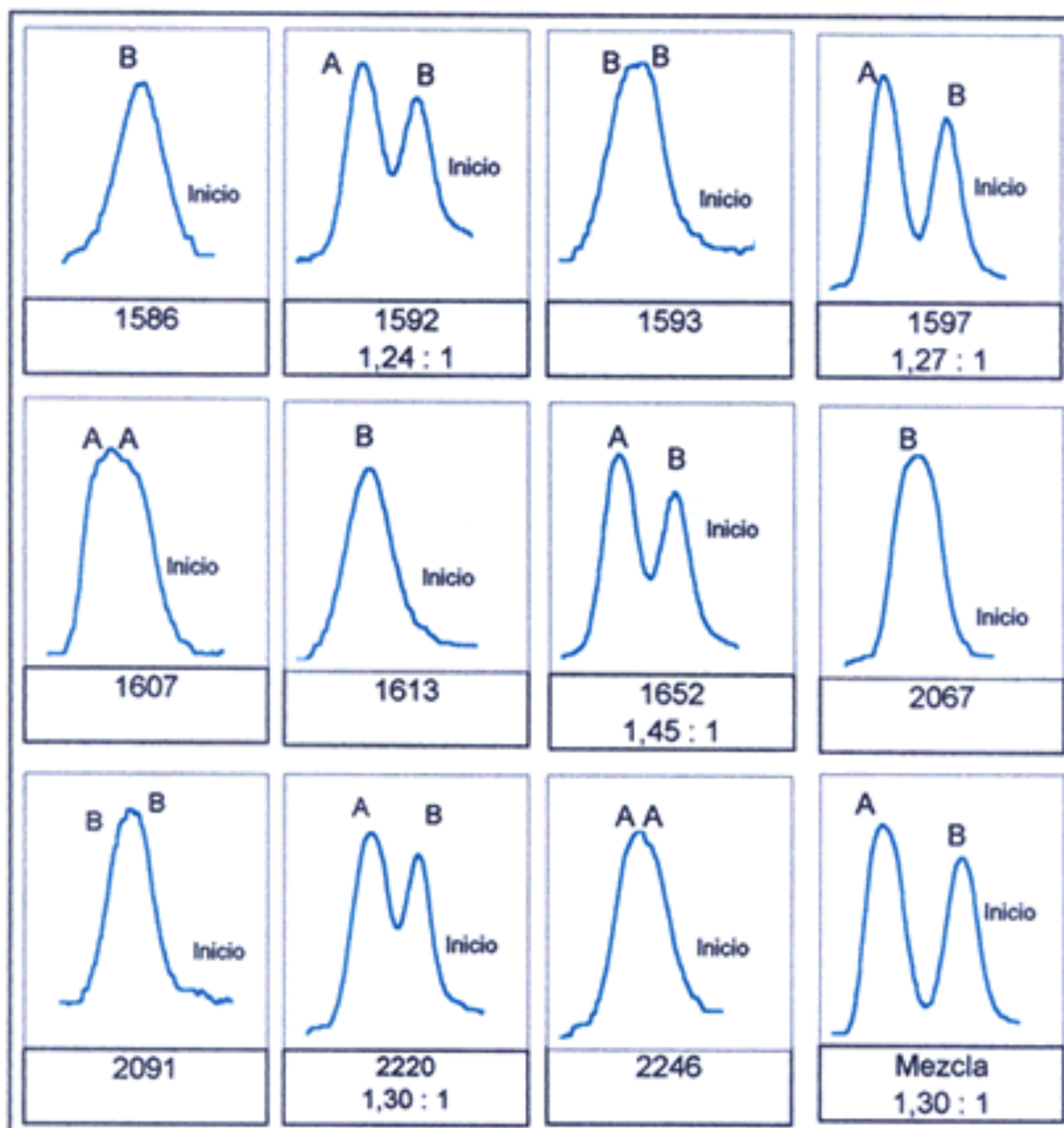
Muestra	\bar{x} Distancia migración muestra (mm)	Fenotipo	Distancia migración estándar (mm)		
			estándar A-B	estándar A	estándar B
636 (Gel 3)*	33,82 ± 4,33	B	23,92 - 35,09	22,57	32,08
655 Fig 3	11,28 ± 0,25	A	11,00 - 14,62	11,77	15,84
	14,69 ± 0,13	B			
686 Fig 3	10,67 ± 0,01	A	11,00 - 14,62	11,77	15,84
720 Fig 4	13,81 ± 0,09	BB	10,31 - 13,50	10,75	13,50
1348 Fig 2	13,33 ± 0,18	A	13,44 - 17,48	12,11	17,51
	17,74 ± 1,19	B			
1353 Fig 3	15,29 ± 0,05	A	11,00 - 14,62	11,77	15,84
	12,12 ± 0,02	B			
1573 Fig 4	13,48 ± 0,03	A	10,31 - 13,50	10,75	13,50
	10,78 ± 0,11	B			
1579 Fig 1	16,90 ± 0,57	B	14,05 - 16,95	13,06	18,80
1581 Fig 4	13,44 ± 0,03	B	10,31 - 13,50	10,75	13,50
1586(Gel 3)*	35,03 ± 6,87	B	23,92 - 35,09	22,57	32,08
1592 Fig 1	13,01 ± 0,13	A	14,05 - 16,95	13,06	18,80
	18,82 ± 0,19	B			
1593 Fig 2	16,64 ± 0,08	BB	13,44 - 17,48	12,11	17,51
1597 Fig 3	12,62 ± 0,30	A	11,00 - 14,62	11,77	15,84
	16,27 ± 0,10	B			
1607 Fig 3	11,01 ± 0,48	AA	11,00 - 14,62	11,77	15,84
1613 Fig 3	14,40 ± 0,41	B	11,00 - 14,62	11,77	15,84
1652 Fig 2	13,38 ± 0,17	A	13,44 - 17,48	12,11	17,51
	16,64 ± 0,23	B			
2067 Fig 4	13,79 ± 0,12	B	10,31 - 13,50	10,75	13,50
2091 Fig 2	16,63 ± 0,07	BB	13,44 - 17,48	12,11	17,51
2220 Fig 1	13,74 ± 0,35	A	14,05 - 16,95	13,06	18,80
	17,89 ± 1,50	B			
2246 Fig 3	10,81 ± 0,52	AA	11,00 - 14,62	11,77	15,84
Mezcla Fig 4	10,64 ± 0,04	A	10,31 - 13,50	10,75	13,50
	13,91 ± 0,06	B			

- Las mediciones se realizaron en los geles con mejor resolución.
- * Gel 3 indicado en el ANEXO 5.

ANEXO 7
Densitometrías de β -lactoglobulina por electroforesis alcalina

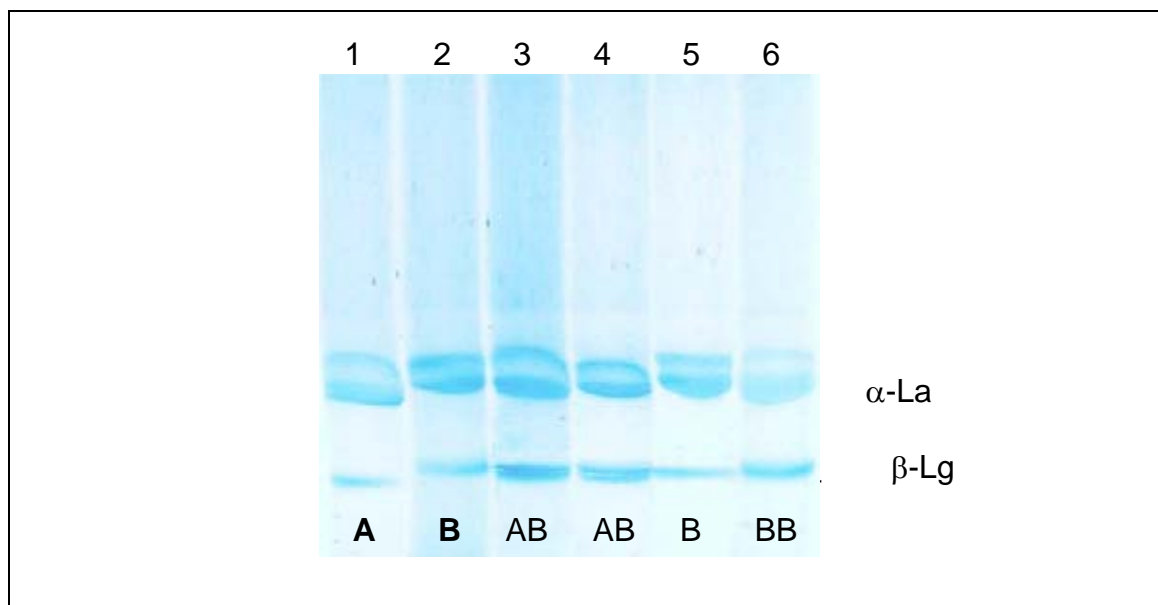


Continuación ANEXO 7



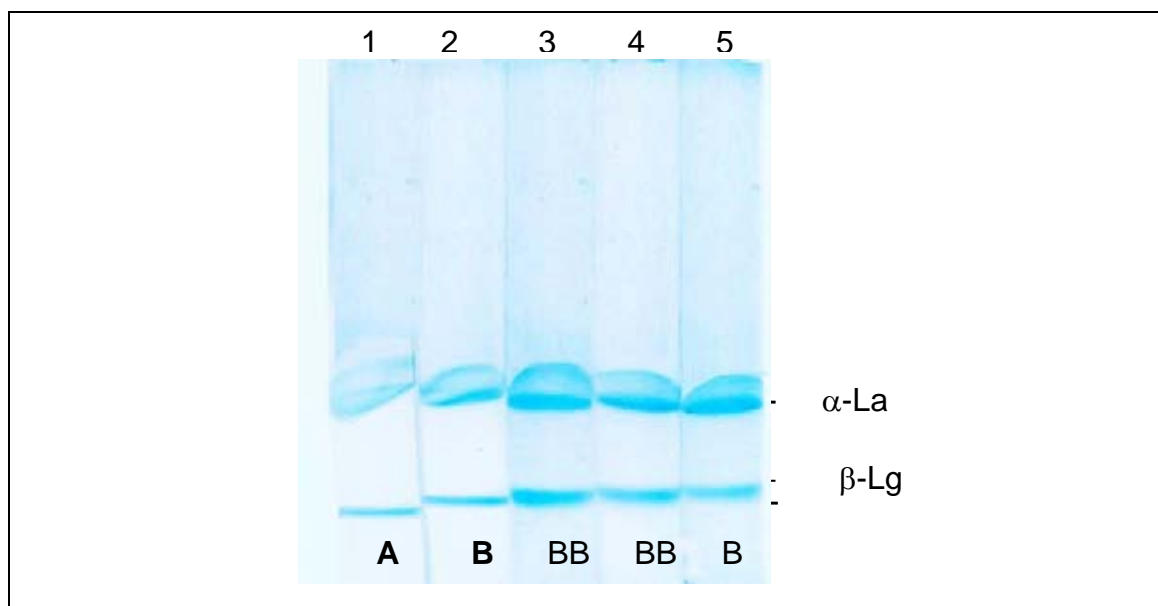
ANEXO 8
Electroforesis de isoenfoque de diferentes muestras en distintas corridas

CORRIDA 2



1:St. β -Lg A, 2: St. β -Lg B. 3:1348, 4:Mezcla, 5:1592, 6:2091.

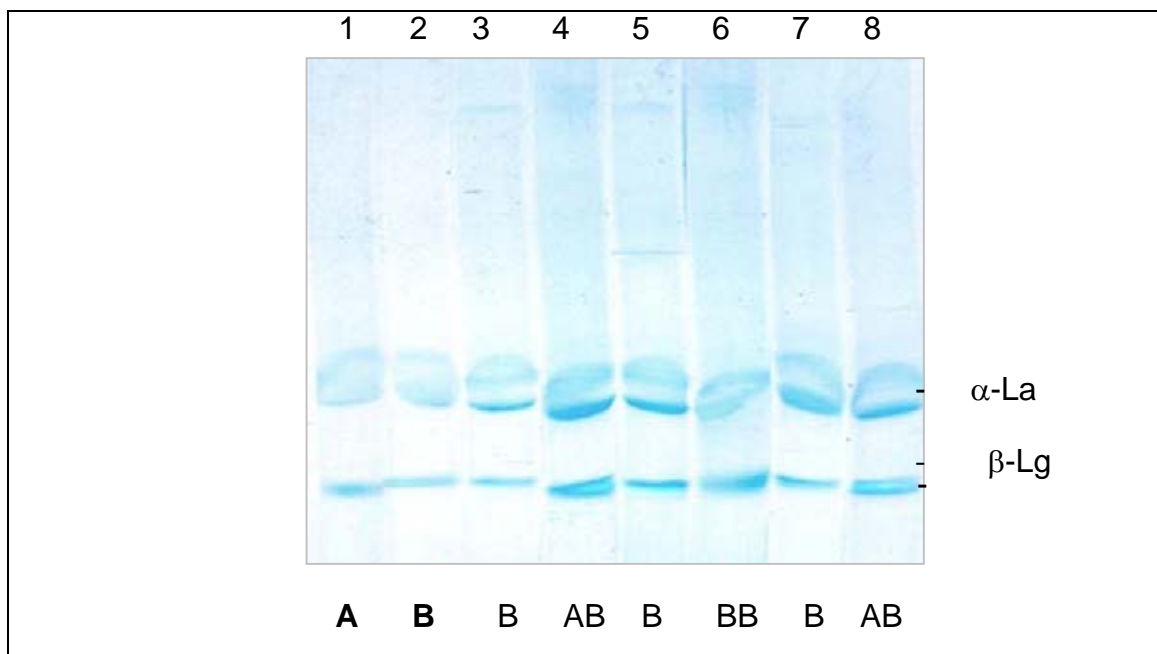
CORRIDA 3



1:St. β -Lg A, 2: St. β -Lg B. 3:720, 4:1593, 5:2220.

Continuación ANEXO 8

- CORRIDA 4



1:St. β -Lg A, 2: St. β -Lg B. 3:1613, 4:1573, 5:1586, 6:636, 7:1581, 8:1597.

ANEXO 9

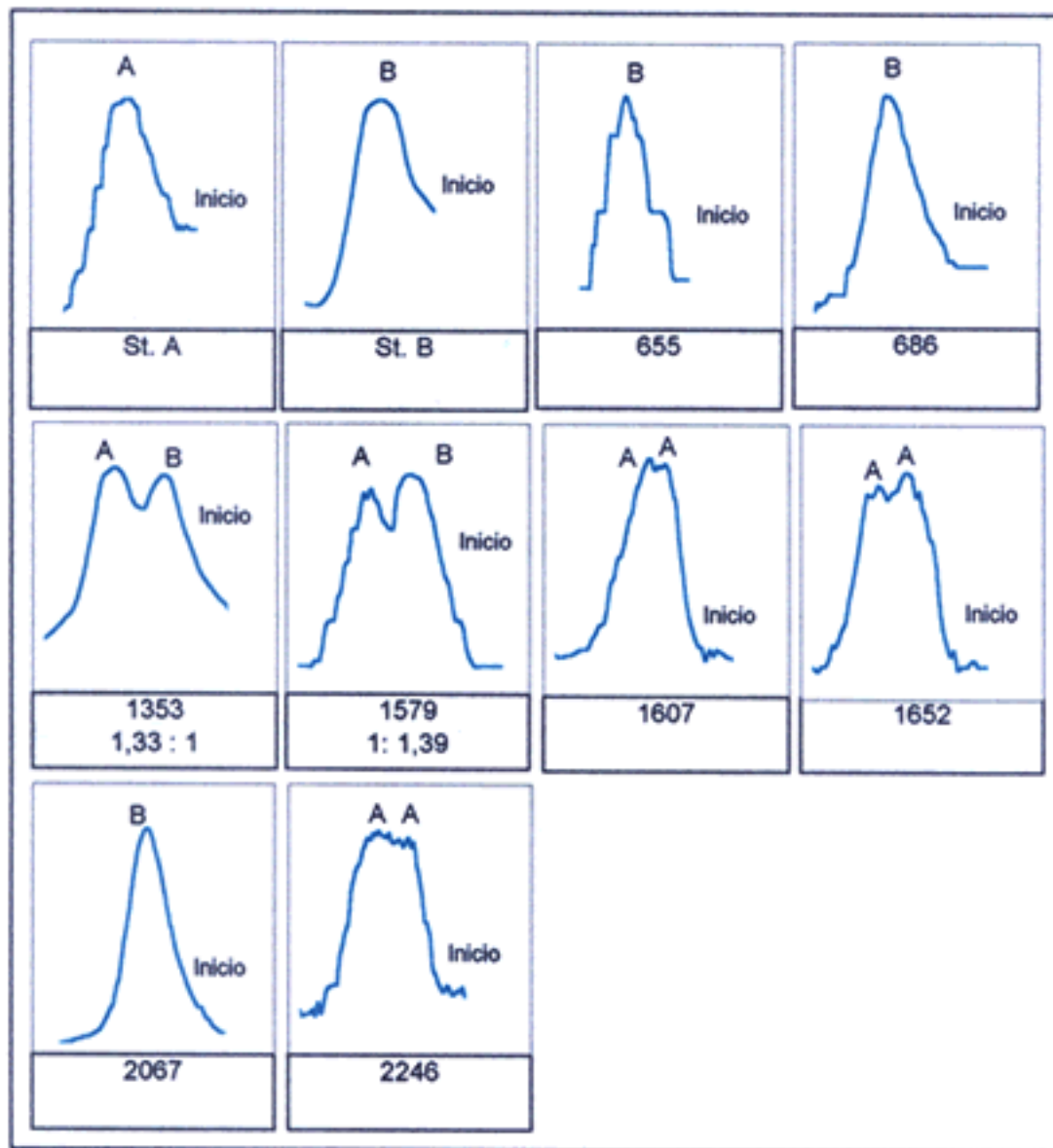
Distancia de migración en la electroforesis de isoenfoque en muestras de β -lactoglobulina y estándares

Muestra	Distancia promedio de migración de muestras (mm)	Fenotipo	Distancia promedio de migración de estándares (mm)	
			A	B
636	15,85 \pm 0,70	BB	16,93 \pm 0,15	18,35 \pm 0,72
655	17,52 \pm 0,06	B	16,21 \pm 0,08	17,55 \pm 0,23
686	17,79 \pm 0,03	B	16,21 \pm 0,08	17,55 \pm 0,23
720	18,18 \pm 0,37	BB	15,36 \pm 0,94	18,05 \pm 0,16
1348	15,50 \pm 0,05	A	15,30 \pm 0,21	16,92 \pm 0,02
	16,87 \pm 0,07	B		
1353	16,19 \pm 0,10	A	16,21 \pm 0,08	17,55 \pm 0,23
	18,01 \pm 0,13	B		
1573	16,81 \pm 1,42	A	16,21 \pm 0,08	17,55 \pm 0,23
	17,71 \pm 0,01	B		
1579	16,71 \pm 0,07	A	16,21 \pm 0,08	17,55 \pm 0,23
	18,49 \pm 0,50	B		
1581	17,79 \pm 0,42	B	16,93 \pm 0,15	18,35 \pm 0,72
1586	18,48 \pm 1,35	B	16,93 \pm 0,15	18,35 \pm 0,72
1592	16,86 \pm 0,21	B	15,30 \pm 0,21	16,92 \pm 0,02
1593	18,00 \pm 0,43	BB	15,36 \pm 0,94	18,05 \pm 0,16
1597	16,74 \pm 0,13	A	16,93 \pm 0,15	18,35 \pm 0,72
	18,48 \pm 0,27	B		
1607	16,29 \pm 0,02	AA	16,21 \pm 0,08	17,55 \pm 0,23
1613	18,21 \pm 0,82	B	16,93 \pm 0,15	18,35 \pm 0,72
1652	16,47 \pm 0,18	AA	16,21 \pm 0,08	17,55 \pm 0,23
2067	18,10 \pm 0,45	B	16,21 \pm 0,08	17,55 \pm 0,23
2091	16,80 \pm 0,09	BB	15,30 \pm 0,21	16,92 \pm 0,02
2220	18,12 \pm 0,35	B	15,36 \pm 0,94	18,05 \pm 0,16
2246	16,55 \pm 0,61	AA	16,21 \pm 0,08	17,55 \pm 0,23
Mezcla	15,43 \pm 0,54	A	15,30 \pm 0,21	16,92 \pm 0,02
	16,87 \pm 0,04	B		

ANEXO 10

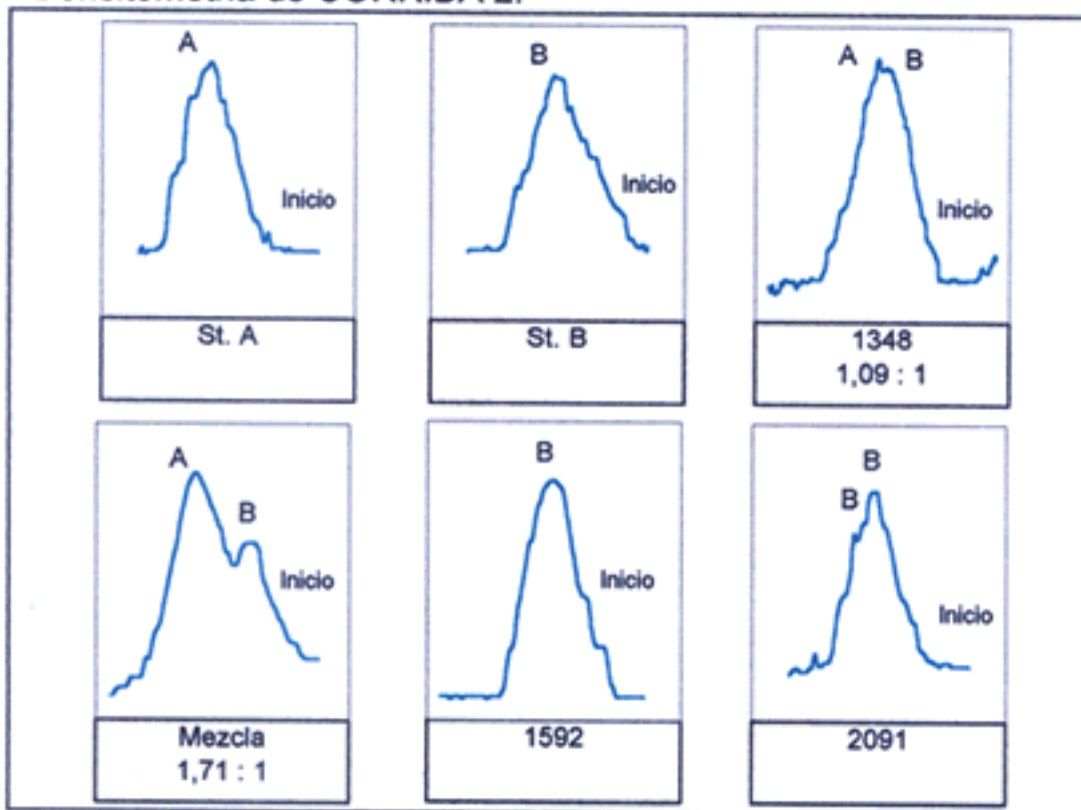
Densitometrías de β -lactoglobulina por el método de isoenfoque

- Densitometria de FIGURA 5.

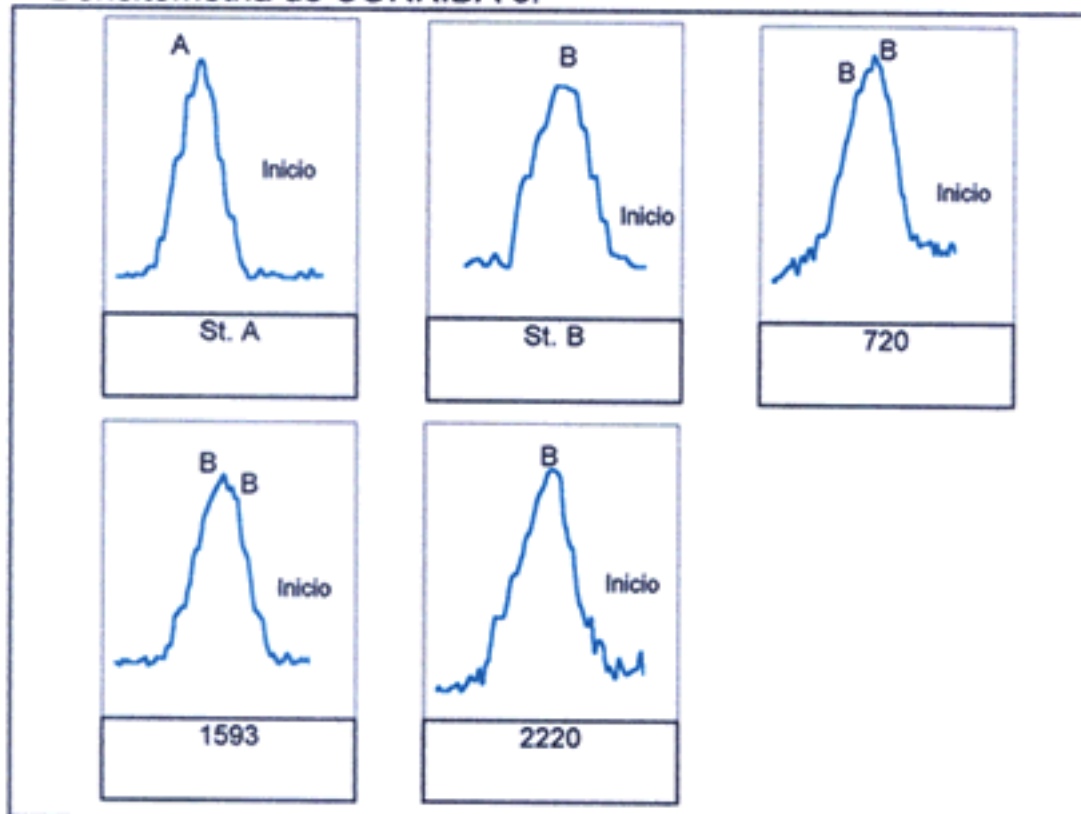


Continuación ANEXO 10

- Densitometria de CORRIDA 2.

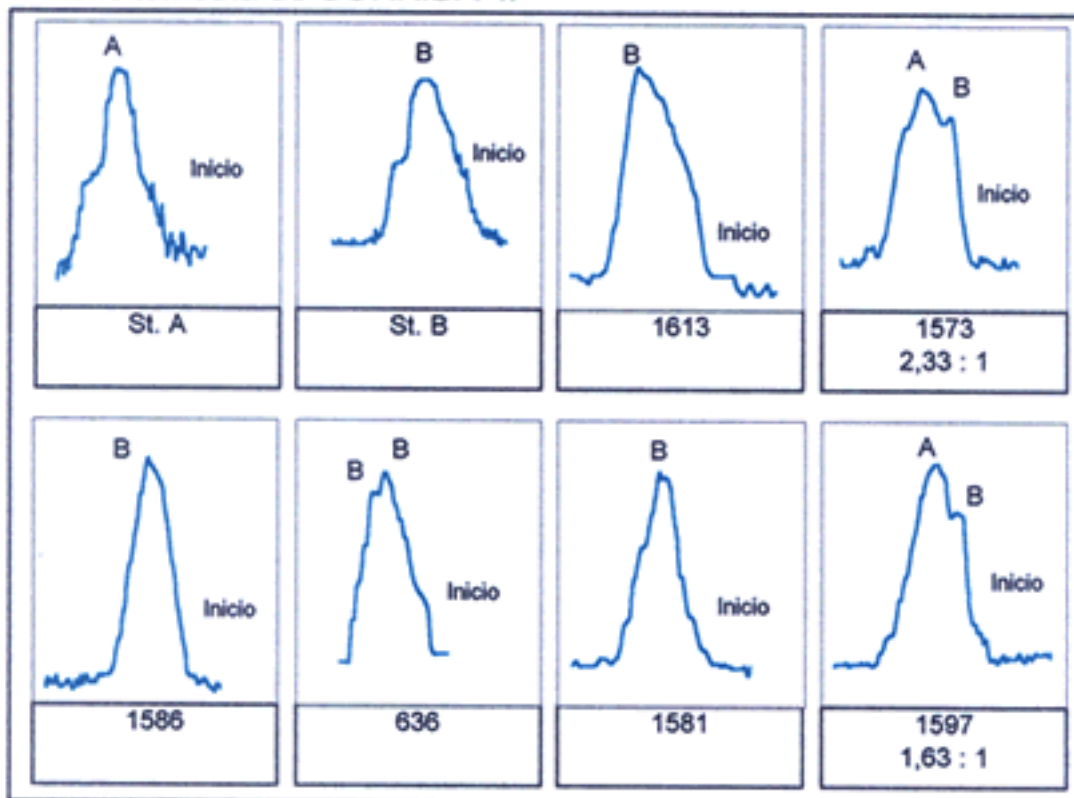


- Densitometria de CORRIDA 3.



Continuación ANEXO 10

- Densitometria de CORRIDA 4.



ANEXO 11

Contenido proteínas del suero y caseína

▪ Resultados 1º muestreo, submuestreo N°1 (Julio 4, 2005).

Muestra	% Proteína Total	% Proteínas del Suero	Promedio % Proteínas del Suero	% Caseína	Promedio % Caseína
636	2,69	0,91	0,92	1,78	2,70
	2,71	0,92		1,79	
1348	3,17	0,74	0,74	2,43	3,17
	3,18	0,74		2,44	
1579	2,79	0,72	0,72	2,07	2,81
	2,82	0,72		2,10	
1581	2,89	0,60	0,60	2,29	2,90
	2,92	0,60		2,32	
1586	2,65	0,57	0,58	2,08	2,66
	2,68	0,58		2,10	
1592	2,58	0,71	0,71	1,87	2,59
	2,60	0,71		1,89	
1593	2,64	0,65	0,65	1,99	2,59
	2,55	0,65		1,90	
1652	2,78	0,72	0,72	2,06	2,78
	2,78	0,71		2,07	
2091	3,01	0,65	0,65	2,36	2,95
	2,89	0,65		2,24	
2220	3,10	0,73	0,73	2,37	3,12
	3,14	0,73		2,41	
Mezcla	2,91	0,68	0,69	2,23	2,94
	2,96	0,69		2,27	

- Muestra 636 se tomó de 3 cuartos(1/4 con mastitis según análisis de CMT).

Continuación ANEXO 11

▪ Resultados 1º muestreo, submuestreo N°2 (Julio 11, 2005).

Muestra	% Proteína Total	% Proteínas del Suero	Promedio % Proteínas del Suero	% Caseína	Promedio % Caseína
655	2,59	0,73	0,73	1,86	1,86
	2,59	0,74		1,85	
686	3,21	0,88	0,88	2,33	2,32
	3,19	0,88		2,31	
720	3,07	0,72	0,71	2,35	2,33
	3,02	0,71		2,31	
1353	2,80	0,67	0,68	2,13	2,13
	2,83	0,69		2,14	
1573	2,54	0,62	0,64	1,92	1,89
	2,52	0,66		1,86	
1597	2,89	0,71	0,71	2,18	2,18
	2,90	AL		2,19	
1607	2,72	0,71	0,71	2,01	2,02
	2,74	0,70		2,04	
1613	2,53	0,60	0,60	1,93	1,92
	2,51	0,60		1,91	
2067	2,83	0,74	0,74	2,09	2,09
	2,82	0,74		2,08	
2246	2,94	0,91	0,91	2,03	2,05
	2,97	0,90		2,07	
Mezcla	2,77	0,70	0,71	2,07	2,06
	2,77	0,71		2,06	

Continuación ANEXO 11

▪ Resultados 2º muestreo, submuestreo N°1 (Agosto 8, 2005).

Muestra	% Proteína Total	% Proteínas del Suero	Promedio % Proteínas del Suero	% Caseína	Promedio % Caseína
720	3,17	0,73	0,74	2,44	2,42
	3,15	0,75		2,40	
1353	3,03	0,87	0,87	2,16	2,18
	3,07	0,87		2,20	
1573	2,66	0,67	0,67	1,99	1,98
	2,65	0,68		1,97	
1586	2,78	0,69	0,70	2,09	2,07
	2,77	0,70		2,07	
1593	3,12	0,74	0,74	2,38	2,36
	3,08	0,74		2,34	
1607	2,82	0,72	0,72	2,10	2,09
	2,80	0,73		2,07	
1613	2,80	0,69	0,69	2,11	2,10
	2,78	0,69		2,09	
1652	3,15	0,84	0,84	2,31	2,32
	3,17	0,85		2,32	
2220	3,00	0,87	0,87	2,13	2,12
	2,97	0,88		2,09	
Mezcla	2,97	0,77	0,76	2,20	2,17
	2,99	0,76		2,23	

Continuación ANEXO 11

▪ Resultados 2º muestreo, submuestreo N°2 (Agosto 16, 2005).

Muestra	% Proteína Total	% Proteínas del Suero	Promedio % Proteínas del Suero	% Caseína	Promedio % Caseína
636	3,25	0,80	0,79	2,45	2,44
	3,21	0,79		2,42	
655	2,63	0,77	0,77	1,86	1,88
	2,66	0,76		1,90	
686	3,36	0,83	0,83	2,53	2,51
	3,33	0,84		2,49	
1348	3,28	0,78	0,78	2,50	2,49
	3,26	0,77		2,49	
1579	3,18	0,70	0,71	2,48	2,45
	3,15	0,72		2,43	
1581	2,98	0,68	0,68	2,30	2,29
	2,96	0,68		2,28	
1592	3,15	0,82	0,81	2,33	2,32
	3,11	0,81		2,30	
1597	3,37	0,68	0,68	2,69	2,69
	3,36	0,68		2,68	
2067	3,04	0,81	0,81	2,23	2,23
	3,04	0,81		2,23	
2091	3,12	0,68	0,68	2,44	2,43
	3,10	0,69		2,41	
2246	3,00	0,76	0,76	2,24	2,26
	3,04	0,76		2,28	
Mezcla	3,11	0,74	0,74	2,37	2,37
	3,11	0,74		2,37	

Continuación ANEXO 11

▪ Resultados 3º muestreo, submuestreo N°1 (Septiembre 5, 2005).

Muestra	% Proteína Total	% Proteínas del Suero	Promedio % Proteínas del Suero	% Caseína	Promedio % Caseína
655	2,93	0,76	0,76	2,18	2,19
	2,96	0,75		2,20	
686	3,53	0,96	0,96	2,56	2,57
	3,53	0,96		2,57	
1348	3,34	0,75	0,75	2,59	2,60
	3,35	0,75		2,60	
1579	3,41	0,83	0,83	2,58	2,59
	3,43	0,82		2,60	
1592	3,48	0,84	0,84	2,64	2,65
	3,50	0,84		2,66	
1593	3,70	0,80	0,80	2,90	2,90
	3,71	0,80		2,91	
1652	3,25	0,76	0,77	2,48	2,49
	3,27	0,78		2,50	
2067	3,11	0,67	0,67	2,44	2,46
	3,15	0,67		2,48	
2091	3,14	0,72	0,72	2,42	2,42
	3,13	0,72		2,41	
2220	3,41	0,90	0,90	2,51	2,51
	3,40	0,90		2,51	
Mezcla	3,30	0,80	0,80	2,50	2,52
	3,33	0,80		2,53	

Continuación ANEXO 11

- Resultados 3º muestreo, submuestreo N°2 (Septiembre 12, 2005).

Muestra	% Proteína Total	% Proteínas del Suero	Promedio % Proteínas del Suero	% Caseína	Promedio % Caseína
636	3,78	1,03	1,03	2,75	2,75
	3,79	1,03		2,76	
720	3,49	AL	0,83	2,66	2,69
	3,54	0,83		2,71	
1353	3,42	0,92	0,92	2,51	2,52
	3,46	0,92		2,54	
1373	3,41	0,77	0,77	2,64	2,62
	3,36	0,77		2,59	
1581	3,31	0,70	0,71	2,61	2,59
	3,28	0,72		2,56	
1586	3,43	0,83	0,83	2,61	2,59
	3,41	0,83		2,58	
1597	3,62	0,82	0,82	2,80	2,80
	3,62	0,82		2,80	
1607	3,53	0,78	0,79	2,75	2,74
	3,52	0,79		2,73	
1613	3,50	0,84	0,84	2,66	2,67
	3,53	0,85		2,68	
2246	3,49	0,95	0,95	2,54	2,55
	3,51	0,95		2,56	
Mezcla	3,54	0,88	0,88	2,66	2,65
	3,53	0,89		2,65	

* Vaca 1348 se tomó muestra de $\frac{3}{4}$ durante todo el periodo de muestreos por tener $\frac{1}{4}$ seco.

ANEXO 12

Análisis estadísticos para el contenido de proteína por muestreo y variantes genéticas

- **Contenido de caseína por muestreo**

Chequeo de varianza

Test	P-Valor
Cochran's	0,42
Bartlett's	0,20
Levene's	0,07

→ Valor $p > 0,05$ indica que el factor no diferencia significativa al 95% de confianza.

Análisis de varianza para el contenido de caseína

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Valor p
Efectos principales					
A: Muestreo	4,9423	2	2,47115	74,69	0,0000
Residual	3,87112	117	0,0330865		
Total (corregido)	8,81341	119			

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

Test de rango múltiple, Tukey 95%

Muestreo	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
1	40	2,10375	X
2	40	2,2805	X
3	40	2,5945	X
Contraste			
		Diferencia	+/- Limites
1 - 2		*-0,17675	0,0965553
1 - 3		*-0,49075	0,0965553
2 - 3		*-0,314	0,0965553

* Denota una diferencia estadísticamente significativa

Continuación ANEXO 12

- Relación de las variantes genéticas de β -Lg y el contenido de caseína

Chequeo de varianza

Test	P-Valor
Cochran's	0,82
Bartlett's	0,85
Levene's	0,62

→ Valor $p > 0,05$ indica que el factor no diferencia significativa al 95% de confianza

Análisis de varianza

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Valor p
Efectos principales					
A: variante	0,0605042	2	0,0302521	0,40	0,6683
Residual	8,75291	117	0,0748112		
Total (corregido)	8,81341	119			

→ Valor $p > 0,05$ indica que el factor no tiene un efecto significativo al 95% de confianza.

Continuación ANEXO 12

▪ Contenido de proteína del suero por muestreo Chequeo de varianza

Test	P-Valor
Cochran's	0,35
Bartlett's	0,08
Levene's	0,57

→ Valor $p > 0,05$ indica que el factor no diferencia significativa al 95% de confianza.

Análisis de varianza para el contenido de proteína del suero

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Valor p
Efectos principales					
Muestreo	0,237965	2	0,118983	16,94	0,0000
Residual	0,821715	117	0,00702321		
Total (corregido)	1,05968	119			

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

Test de rango múltiple, Tukey 95%

Muestreo	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
1	40	0,71575	X
2	40	0,75825	X
3	40	0,824	X
Contraste	Diferencia		+/- Limites
1 - 2	-0,0425		0,0444855
1 - 3	*-0,10825		0,0444855
2 - 3	*-0,06575		0,0444855

* Denota una diferencia estadísticamente significativa

Continuación ANEXO 12

- Relación de las variantes genéticas de β -Lg y el contenido de proteínas del suero

Chequeo de varianza

Test	P-Valor
Cochran's	0,32
Bartlett's	0,14
Levene's	0,33

→ Valor $p > 0,05$ indica que el factor no diferencia significativa al 95% de confianza

Análisis de varianza

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Valor p
Efectos principales					
Variante	0,121362	2	0,0606809	7,57	0,0008
Residual	0,938318	117	0,00801981		
Total (corregido)	1,05968	119			

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

Test de rango múltiple, Tukey 95%

Variante genética	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
B	54	0,73963	X
AB	48	0,770208	X
A	18	0,833889	X

Contraste	Diferencia		+/- Limites
A - AB	*0,0636806		5,14387E-8
A - B	*0,0942593		5,06534E-8
AB - B	0,0305787		3,69197E-8

* Denota una diferencia estadísticamente significativa

ANEXO13

**Análisis estadísticos del contenido de proteína
por grupo de lactancia**

- **Contenido de caseína según etapa de lactancia para el primer mes de muestreo**

Chequeo de varianza

Test	P-Valor
Cochran's	0,009111
Bartlett's	0,002199
Levene's	0,009305

→ El menor de los valores es $p < 0,05$, lo que indica que hay diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones típicas al 95% de confianza. Esto invalida la mayoría de los tests estadísticos estándar.

- **Test Kruskal-Wallis**

Grupo	Tamaño de la muestra	Rango Medio
1	18	17,9167
2	18	23,4444
3	4	18,875
Estadístico = 2,0997		P-Valor = 0,349991

→ Valor $p > 0,05$ indica que el factor no tiene un efecto significativo al 95% de confianza.

Continuación ANEXO 13

- **Contenido de proteínas del suero según etapa de lactancia para el primer mes de muestreo**

Chequeo de varianza

Test	P-Valor
Cochran's	0,000218
Bartlett's	0,000224
Levene's	0,091986

→ El menor de los valores es $p < 0,05$, lo que indica que hay diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones típicas al 95% de confianza. Esto invalida la mayoría de los tests estadísticos estándar.

- **Test Kruskal-Wallis**

Grupo	Tamaño de la muestra	Rango Medio
1	18	10,4444
2	18	29,9722
3	4	23,125

Estadístico = 25,6054

P-Valor = 0,000003

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

- **Gráfico de caja y bigote**

