

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

**Proteína total, Calcio y Fósforo en Leche de Vacas
Frisón Negro y su relación con las Variantes Genéticas
de β - Lactoglobulina**

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

Luis Alberto Oyarzún Gallardo

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.

Sr. Bernardo Carrillo L
Ingeniero Agrónomo, Ms. en Ciencia e Ingeniería en Alimentos
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Ciencias Agrarias.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a Dios y a mi familia, y en especial a mis padres, por brindarme su apoyo y cariño. A mis hermanos Marcelo y Mauricio. Gracias a cada uno de ellos por su cariño.

Le doy las gracias a mi profesora patrocinante Sra. Luz Haydee Molina, por su apoyo, ánimo y disposición. Cada consejo recibido lo atesoraré en mi corazón.

Quiero agradecer al Proyecto FONDECYT 1030345 por la oportunidad de realizar mi tesis, y de paso ayudar a mi formación como profesional.

A mis amigos Carlos, Claudio y Luis., son amigos que los recordaré con mucho cariño en mi vida universitaria., y en especial a Yasna que más que una amiga es un hermana.

Y finalmente a cada uno de mis profesores que me formaron como profesional.

ÍNDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Factores que intervienen en la composición de la leche	3
2.2	Proteínas de la leche	3
2.2.1	Caseínas	4
2.2.2	Proteínas del suero	5
2.2.2.1	β - Lactoglobulina	5
2.2.2.2	α – Lactoalbumina	7
2.3	Contenido mineral de la leche	7
2.4	Raza Frisón Negro	8
2.5	Polimorfismo genético de las proteínas de la leche	9
2.5.1	Polimorfismo genético de de β - Lactoglobulina	9
2.5.2	Efecto del polimorfismo genético de β - Lactoglobulina en la producción y la composición de la leche	9
3	MATERIAL Y MÉTODO	12
3.1	Materiales	12
3.1.1	Obtención de muestras	12
3.1.2	Lugar y duración del ensayo	12
3.1.3	Diseño experimental	13
3.2	Metodología	13
3.2.1	Análisis de proteína total	13

3.2.2	Preparación de las muestras de leche para determinar las variantes genéticas	13
3.2.3	Electroforesis de isoenfoque	14
3.2.4	Análisis de minerales	14
3.2.4.1	Determinación de calcio total	14
3.2.4.2	Determinación de fósforo	14
3.2.5	Análisis estadístico	15
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	16
4.1	Contenido de proteína total, calcio, fósforo y producción de leche de vacas Frisón Negro	16
4.1.1	Proteína total	16
4.1.2	Contenido de calcio	17
4.1.3	Contenido de fósforo	18
4.1.4	Producción de leche	18
4.2	Variaciones de proteína total, calcio, fósforo y producción de leche de vacas Frisón Negro con respecto al número de lactancias	19
4.2.1	Número de lactancias y contenido de proteínas	20
4.2.2	Número de lactancias y contenido mineral	20
4.2.3	Numero de lactancias y producción de leche	21
4.3	Variaciones de proteína total, calcio, fósforo y producción de leche de vacas Frisón Negro con respecto a los meses de lactancia	21
4.3.1	Meses de lactancia y contenido de proteínas	22
4.3.2	Meses de lactancia y contenido mineral	23
4.3.3	Producción de leche según los meses de lactancia	23
4.4	Variantes genéticas de β - Lactoglobulina en la leche de vacas Frisón Negro	24

4.4.1	Influencia de las variantes genéticas sobre el contenido de proteína total	27
4.4.2	Efecto de las variantes genéticas de β –Lactoglobulina sobre la composición mineral	27
4.4.3	Efecto de las variantes genéticas de β –Lactoglobulina en la producción de leche	27
5	CONCLUSIONES	29
6	RESUMEN	30
	SUMMARY	31
7	BIBLIOGRAFÍA	32
	ANEXOS	40

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Diseño experimental	13
2	Promedio y desviación estándar del contenido de proteína total, calcio, fósforo y producción de leche según el mes de muestreo	16
3	Promedio y desviación estándar del contenido de proteína total, calcio, fósforo y producción de leche según el número de lactancias	19
4	Promedio y desviación estándar del contenido de proteína total, calcio, fósforo y producción de leche según los meses de lactancia.	22
5	Variantes genéticas de β - Lactoglobulina en las muestras de leche de 20 vacas	25
6	Promedio y desviación estándar del contenido de proteína total, calcio, fósforo y producción de leche según las variantes genéticas	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura de las micelas de caseínas	4
2	Representación esquemática de la β - Lactoglobulina	6
3	Electroforesis de isoenfoque para las variantes de β - Lg en muestras de leche vacas Frisón Negro	24

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexos		Página
1	Caracterización de las vacas en estudio	41
2	Progenie de las vacas en estudio	44
3	Variantes genéticas obtenidas por electroforesis de Isoenfoque y porcentaje de expresión	45
4	Distancia de migración de las proteínas en la electroforesis	46
5	Resultados del contenido de proteína total, calcio, y fósforo en la leche de vacas Frisón negro.	48
6	pH de las muestras de leche	51
7	Producción de leche en cada muestreo (AM)	52
8	Análisis estadísticos	53
9	Densitometrías de las muestras de β - Lactoglobulina analizadas por electroforesis de isoenfoque	66

1. INTRODUCCIÓN

La producción lechera en la región de Los Lagos, representó el año recién pasado un 69,18% de la producción total del país, siendo destinada en mayor proporción a la elaboración de queso y leche en polvo.

Para la industria quesera en particular es de gran importancia recibir leche con un mayor contenido de proteínas, calcio y fósforo, lo cual será beneficioso en el aspecto nutricional como tecnológico y también desde el punto vista de calidad del producto.

Algunas variantes genéticas de las proteínas de la leche tienen influencia en la composición de la leche, así lo han demostrado varios estudios, en especial las variante A y B de β -Lactoglobulina y de k – Caseína.

La presente investigación tiene como hipótesis que la leche de vaca con la presencia de la variante B de β -Lactoglobulina, tiene mayor contenido proteína total, calcio, fósforo y la vaca produce mayor cantidad de leche.

El objetivo general de la investigación es relacionar la expresión de variantes genéticas de β -Lactoglobulina, el número de partos y mes de lactancia con el contenido de proteína total, calcio, fósforo y de la producción de leche, en la leche de vacas Frisón Negro.

Los objetivos específicos son:

- Determinar las variantes genéticas de la β - Lactoglobulina de la leche de 20 vacas Frisón Negro, por electroforesis de isoenfoque.

- Evaluar la producción de leche, el contenido de proteína total, contenido de calcio y fósforo.

- Relacionar la composición proteica, mineral y producción de leche con el número de partos, mes de lactancia y la expresión de las variantes genéticas A y B de β - Lactoglobulina.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Factores que intervienen en la composición de la leche

La composición de la leche varía de acuerdo a factores fisiológicos de alimentación y climáticos (BADUI, 1999; BUXADE, 1996). De acuerdo a LUNDEN *et al.*, (1997), los componentes de la leche varían individualmente y esto se debe a factores tanto ambientales como genéticos. Según Mahieu citado por BUXADE (1996), los factores que intervienen en la variación de la composición de la leche están referidos en un 26 a 36 % a los caracteres hereditarios del animal y un 60% es consecuencia del medio ambiente.

2.2 Proteínas de la leche

De acuerdo a WALSTRA *et al.*, (2001), aproximadamente el 95% del nitrógeno está en forma de proteína. Según BADUI (1999), el 5% restante sería el elemento no proteínico y proviene de compuestos como el amoníaco, adenina, guanina y ácido orótico.

Las proteínas de la leche se pueden separar en dos categorías; las que precipitan bajo condiciones de pH 4,6 a 20°C, conocidas como caseínas y el remanente es conocido como proteínas del suero; se encuentran disueltas en el suero y se denominan también proteínas séricas. Las proteínas de la leche son distinguidas por sus propiedades tecnológicas, físicas, químicas y funcionales (FOX, 2001; WALSTRA *et al.*, 2001).

2.2.1 Caseínas. La caseína se define como una fosfoproteína de la leche cruda y corresponde al 80 % del contenido proteico total. La caseína es un complejo de fosfoproteína y glicoproteína, no se coagula al calentar la leche a 100 ° C pero sí al bajar a un pH 4,65. (PRIMO, 1997; WONG, 1995). De acuerdo a BADUI (1999), las caseínas se pueden diferenciar por su movilidad electroforética en 4 fracciones α_s , β , k , y δ . A su vez α_s está constituido por 4 componentes α_{s1} , α_{s2} , α_{s3} , y α_{s4} . La fracción de mayor peso molecular es el α_{s1} , α_{s2} , de 23.500 y 25.500 dalton respectivamente.

En la FIGURA 1 se puede apreciar la caseína distribuida heterogéneamente en la micela, encontrándose la k - Caseína en la superficie de la micela y constituye la parte hidrofílica del complejo micelar (BYLUND, 1995).

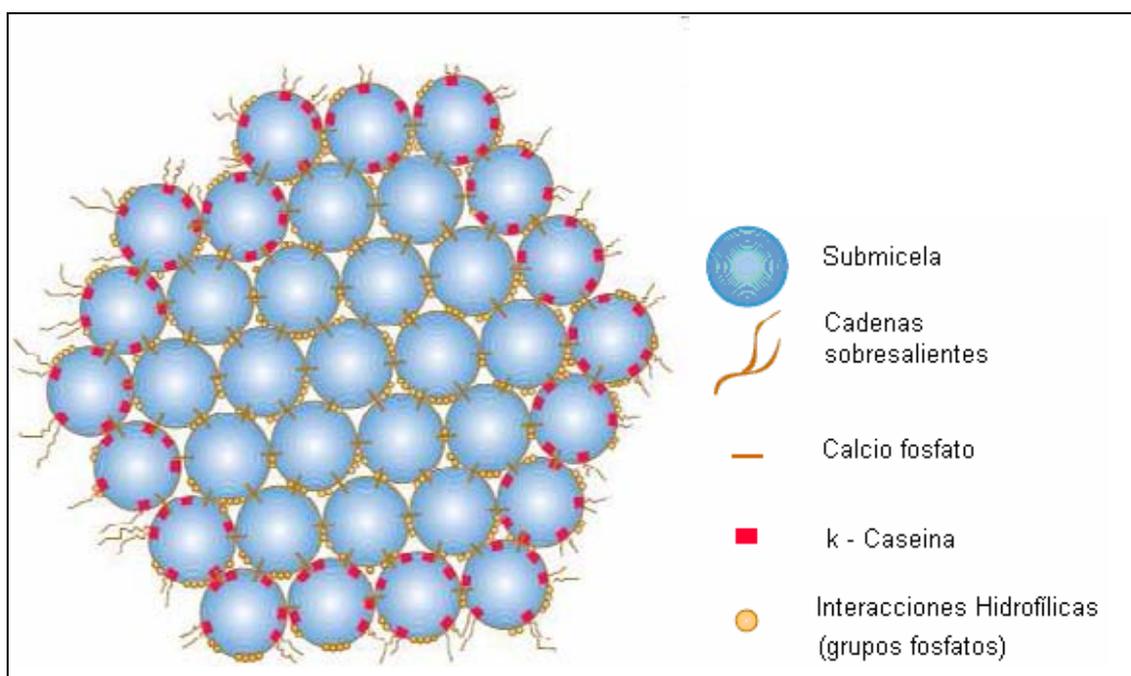


FIGURA 1. Estructura de las micelas de caseínas.

FUENTE: BYLUND (1995).

2.2.2 Proteínas del suero. Las proteínas del suero son compactas y globulares con un peso molecular entre 14.000 y 1.000.000 dalton. Presentan una hidrofobicidad relativamente elevada y sus cadenas polipeptídicas son muy compactas, contienen una gran proporción de hélices α , y la distribución de las cargas es homogénea (WALSTRA *et al.* 2001; BADUI, 1999).

Las proteínas del suero de la leche se dividen en fracciones, compuestas por la β -Lactoglobulina, α -Lactalbúmina, albúmina sérica, proteasa - peptona e inmunoglobulina, siendo las de mayor concentración en el suero la β -Lactoglobulina (50%) y α -Lactalbúmina (20%). Las proteínas del suero son muy sensibles a altas temperaturas en menor grado a pH ácido (AMIOT, 1991; ALAIS, 1985; WALSTRA *et al.*, 2001).

2.2.2.1 β - Lactoglobulina. Es la principal proteína del suero bovino, la cual es responsable de las propiedades funcionales de productos elaborados con suero de leche. Dentro de las propiedades funcionales se pueden destacar las gelificantes; de gran interés en la industria láctea, ya que se utiliza como aditivo otorgándole atributos funcionales a los productos (CREAMER *et al.*, 2004).

De acuerdo a BADUI (1999), la β - Lactoglobulina está en forma de dímero, el cual contiene un grupo disulfuro intramolecularmente impartiendo características terciarias en la proteína y un grupo sulfhidrilo libre que lo hace altamente reactivo.

La desnaturalización de la β - Lactoglobulina se produce al aumentar el pH a 8,6, al aplicar altas temperaturas y al agregar altas concentraciones de calcio. A pH 6,7 está en forma de dímero, a un pH menor a 3,5 se encuentra como monómero (BELITZ y GROSCH, 1997).

En la FIGURA 2 se puede apreciar la representación esquemática de la β -lactoglobulina presentándose como dímero la cual se separa en monómeros de acuerdo a un determinado rango de pH.

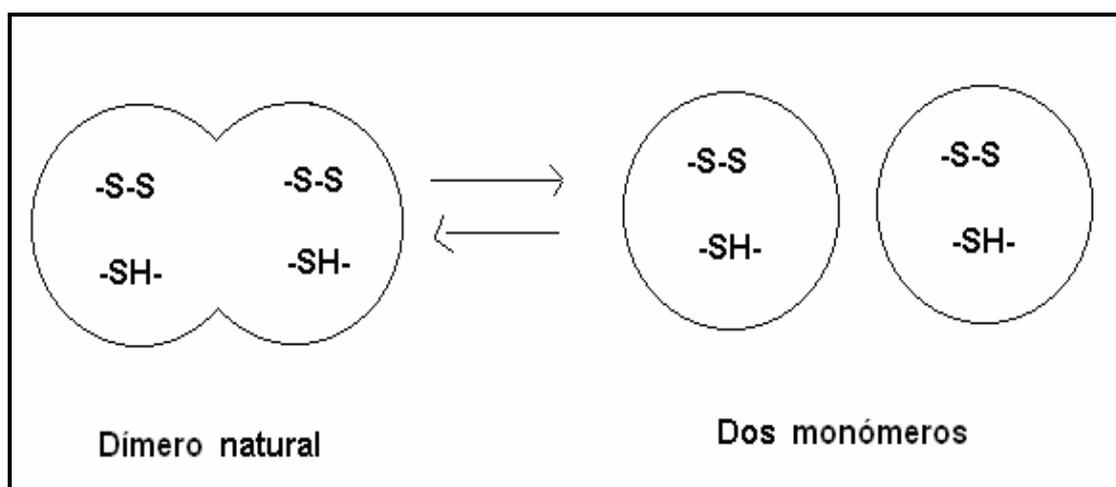


FIGURA 2. Representación esquemática de la β - Lactoglobulina.

FUENTE: BADUI (1999).

Según WALSTRA *et al.* (2001), la β - lactoglobulina es una proteína globular hidrofóbica, la solubilidad depende del pH y fuerza iónica. Según WONG (1995), los monómeros se asocian por su correspondiente segmento alfa helicoidal vía interacciones hidrofóbicas.

Una de las propiedades de la β - Lactoglobulina es la capacidad de formar gel, el calor induce a la gelificación tomando en cuenta ciertos factores tales como fuerza iónica, pH, variantes genéticas. A un pH 7,0 y con una concentración de proteínas de 8 % la variante A de β - Lactoglobulina forma geles de mayor consistencia. La adición de sales como NaCl le otorga a la variante B de la proteína una rigidez óptima. Las diferencias en gelificación son atribuibles a la conformación resultante de la sustitución de dos o mas aminoácidos de la β -

Lactoglobulina, por lo tanto las variantes genéticas tienen un rol importante en la industria alimentaria (GAO *et al.*, 2002).

2.2.2.2 α - Lactalbúmina. Es una proteína plegada de forma compacta y más o menos esférica, no se asocia excepto cuando la fuerza iónica del medio es muy baja. Su función biológica es de coenzima, en la síntesis de la lactosa (WALSTRA *et al.* 2001; BYLUND 1995).

2.3 Contenido mineral de la leche

El contenido mineral de la leche varía de acuerdo a factores tales como etapas de lactación, medio ambientales y genéticas. Otro factor de variación es el manejo de las vacas, variaciones referidas a la recolección y procesamiento de la leche (FOX y McSWEENEY, 1998).

El calcio en la leche se presenta de diversas formas, en estado coloidal libre, iónico, y formando complejos con el citrato, fósforo y caseínas, el promedio del calcio total es de 1,2 (g/L) (PHILIPPE *et al.*, 2003; FOX y McSWEENEY 1998).

El 0,85 % del contenido total de fósforo en la leche se encuentra en las caseínas, los grupos fosfatos le dan características especiales a las caseínas, como es la capacidad de ligar calcio, otorgando un valor nutricional importante a la proteína. Las micelas de caseínas, se mantienen unidas por puentes de calcio o de fosfato cálcico entre restos de fosfoserina y restos de ácido glutámico (BELITZ y GROSCH, 1997; FOX y McSWEENEY, 1998).

El fósforo es muy importante en el incremento y solubilidad de la caseína y actúa sobre la segunda fase de la acción del cuajo (FOX y McSWEENEY 1998).

Los tratamientos térmicos incrementan la vida útil de la leche, pero causa efectos negativos en algunos componentes de la leche, por ejemplo

disminuyendo el contenido de calcio y el fósforo soluble, por lo tanto causaría daños irreversibles a la distribución de las sales en la leche (DE LA FUENTE *et al.*, 2001).

En un rango de temperatura desde 60 a 80 °C hay una modificación en el fosfato – cálcico, y del pH, con la que se modifica la estructura micelar del fosfato cálcico. El descenso del fosfato se produce porque el tratamiento térmico lleva a la precipitación del fosfato cálcico. La explicación probable a la modificación del pH, sería la formación de ácido fórmico a partir de lactosa por efecto del tratamiento térmico (BELITZ y GROSCH, 1997; WALSTRA *et al.*, 2001).

2.4 Raza Frisón Negro

ROJAS (2004), señala que la raza Frisón Negro (Overo Negro) se encuentra distribuido a través de todo el país, preferentemente entre la VIII, IX y X región, siendo conocidas por la producción de carnes y leche. Las características generales de las vacas es superar a las razas productoras de carne en la producción de leche.

De acuerdo a BUXADE (1996), la producción lechera de un animal queda definida poco después del parto, por la cantidad de tejido secretor existente, sin embargo, la producción real de la leche durante la lactación está determinada por la magnitud y el tiempo en que pueda mantenerse dicho potencial productivo.

Según PIERONI *et al.*,(1997), con 40 vacas Holando Argentino de 121 días de lactancia, el suplemento alimenticio de maíz tipo flinth mejoraría la producción de la leche aumentando de 22,4 kg./día hasta 23,4 kg./día.

En el caso de raza Jersey, FOX y McSWEENEY (1998), señalan que la leche contiene más calcio y fósforo que las otras razas de vacas, pero las concentraciones de sodio y cloruros son usualmente más bajos.

2.5 Polimorfismo genético de las proteínas de la leche

Se conoce como polimorfismo genético a las variantes genéticas que presenta una misma proteína (ALAIS, 1985).

Cada una de las proteínas de la leche posee diferentes variantes alélicas, que son el resultado de la sustitución de aminoácidos dentro de una secuencia proteica (STRZALKOWSKA *et al.*, 2002).

2.5.1 Polimorfismo genético de la β - Lactoglobulina. En lo referente a la β -lactoglobulina, GAO *et al.* (2002), han informado 12 variantes genéticas denominadas: A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, X, W. Las variantes que se encuentran frecuentemente en las distintas razas bovinas son A y B. La diferencia entre las dos variantes genéticas radicaría principalmente en la sustitución de 2 aminoácidos, donde se ha sustituido la Asp por Gly y Val por Ala en la posición 64 y 118 respectivamente en un total de 162 aminoácidos (LOWE *et al.*, 1995).

2.5.2 Efecto del polimorfismo genético de β - Lactoglobulina en la producción y la composición de la leche. En un estudio realizado por BOBE *et al.* (2004), con 233 vacas Holstein – Friesian, encontraron que la producción de leche y el contenido de proteína total es igual en la leche de vacas que tienen los fenotipos AA, AB, BB, se espera que el fenotipo AB se encuentre una mayor producción de leche y proteína total.

TSIARIAS *et al.*, (2005), de acuerdo a los resultados obtenidos con 278 vacas Holstein, observaron que el fenotipo AB de β - Lactoglobulina tiene una mayor producción de leche con 17,6 (\pm 21,2) kg /día mas que el fenotipo BB.

CARDAK (2005) , en un trabajo realizado con 237 vacas Holstein – Friesian y 177 vacas Simmental, señala que la producción de la leche en vacas Holstein – Friesian fue influenciada significativamente por el fenotipo AB de β - Lactoglobulina y en las vacas Simmental fue afectada por el fenotipo BB de β - Lactoglobulina, siendo mayor la producción de leche con tales fenotipos. La mayor producción de leche con un determinado fenotipo es de importancia para determinados rebaños de diferentes razas de vacas, lo cual es beneficioso para los productores.

De acuerdo a CARDAK *et al.*, (2003), las diferentes variantes genéticas son expresadas por un gen autosomal, que afectan significativamente la composición de la leche, siendo deseables los genotipos BC, AB y AA, para un mayor contenido de caseína, que es importante en la elaboración del queso.

Según NG-KWAI- HANG *et al.*, (2002), las diferencias en la composición de la leche están dados principalmente por las variantes genéticas A y B de β - Lactoglobulina, la variante B de β - Lactoglobulina está asociada con un mayor contenido de grasa y menor contenido de proteína total. El fenotipo BB de β - Lactoglobulina está asociado con mayor contenido de caseína en comparación con el fenotipo AA (NG-KWAI- HANG, 1998).

BOBE *et al.*, (1999), analizaron la leche de 233 vacas Holsteins- Friesian, determinando que las variantes de β - Lactoglobulina afectan fenotípicamente la variación de la composición de la leche, siendo el alelo A de β - Lactoglobulina el que incrementa la proporción de β - Lactoglobulina en el contenido de proteína total. Sin embargo FAMULA y MEDRANO (1994), en un estudio con

915 vacas Holstein en la primera lactancia observaron que los fenotipos AB y AA de β -Lactoglobulina no difieren significativamente en el porcentaje de proteína total.

LUNDEN *et al.*, (1997), en un estudio realizado en Nottingham, Inglaterra con 204 vacas Holstein se observó un efecto positivo de la variante B de β -Lactoglobulina, sobre el contenido de caseína. Según AULDIST *et al.*, (2000), en un estudio realizado con 44 vacas Frisonas, encontraron que la leche con el fenotipo AA tiene mayor contenido de proteínas del suero y menor concentración de caseína.

La leche de vacas Holstein – Friesian que presentan el genotipo AA de β -Lactoglobulina genera un mayor contenido de β -Lactoglobulina, y menor contenido de caseína y materia grasa en comparación con leche de vacas que poseen genotipos BB β -Lactoglobulina (STRZALKAWSKA *et al.*, 2002).

3. MATERIAL Y MÉTODO

3.1 Materiales

3.1.1 Obtención de muestras. Se obtuvieron muestras de leche de 20 vacas de raza Frisón Negro, pertenecientes al fundo Santa Rosa de la Universidad Austral de Chile. El muestreo se efectuó de acuerdo a la Norma Chilena 1011/1 (CHILE, INSTITUTO DE NORMALIZACION 1998).

Con la finalidad de verificar el estado sanitario de las vacas en estudio, se realizó el California Mastitis Test (CMT) en todos los muestreos (CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN, 1998b) (ANEXO 1).

Con el propósito de ver la influencia del número de partos sobre las variables de respuesta se dividió las vacas en dos grupos, grupo uno (diez vacas Frisón Negro en su primer y segunda lactancia), el grupo dos (diez vacas Frisón Negro en su cuarta y quinta lactancia) (ANEXO 1).

Se dividió en tres grupos de acuerdo a los meses de lactancias, en el grupo uno se encuentran las vacas en su primer y segundo mes de lactancia, el grupo dos vacas en su tercer y cuarto mes de lactancia, y el tercer grupo dos vacas de seis meses de lactancia (ANEXO 1).

3.1.2 Lugar y duración del ensayo. Los análisis de las muestras de leche se realizaron en el Instituto de Ciencia y Tecnológica de los Alimentos (ICYTAL) de la Universidad Austral de Chile. Se hicieron tres muestreos, durante el periodo invierno en los meses de Julio, Agosto y Septiembre del 2005.

3.1.3 Diseño experimental. El diseño experimental consideró como factores las variantes A y B β - Lactoglobulina, mes de muestreo, número de lactancias y etapa de lactancia (CUADRO1).

CUADRO 1 Diseño experimental.

Muestras	Mes de Muestreo	Factores	Repuesta
1	Julio	- Variantes de	- Proteína total
2	Agosto	β - lactoglobulina (A y B)	- Contenido de
3....	Septiembre	-Mes de muestreo.	calcio y fósforo
20		- Número de lactancias	- Producción de
		- Etapa de lactancia	leche

3.2 Metodología

3.2.1 Análisis de proteína total. Se realizó por el método Semi Micro Kjeldahl FIL/IDF 20 B, (1993).

3.2.2 Preparación de las muestras de leche para determinar las variantes genéticas. La separación de β - lactoglobulina, se realizó a partir de la leche de cada una de las 20 vacas en estudio, de acuerdo al procedimiento utilizado por LOWE *et al.*, (1995), que consiste en separar las proteínas, previo una precipitación ácida, filtrando y finalmente centrifugando, a una velocidad de 13.000 rpm por 5 minutos. Una vez preparada las muestras, se determinó el contenido de proteínas por el método de LOWRY *et al.*, (1951). Previamente se midió el pH a las muestras de leche con el método potenciométrico, de acuerdo a la Norma Chilena 1671/79 (CHILE, INSTITUTO DE NORMALIZACION 1998).

3.2.3 Electroforesis de isoenfoque. Las variantes genéticas de β -Lactoglobulina se determinaron por electroforesis de isoenfoque. Se llevó a cabo según el método de PEARCE *et al.*, (1972), el cual fue modificado por CASANOVA (2001), en la sustitución del catalizador riboflavina por persulfato de amonio.

La preparación de gel fue con 5,5 mL de solución (40%, 0,6 bis en agua), siendo la concentración de acrilamida 22,5 %, posteriormente se agrega, 1,1mL N'N'N'N'-tatrmetiletilendiamina (TEMED) (1,75% en agua), 2,75 mL persulfato de amonio (0,37% en agua), 0,55 mL anfolito pH 3,5-10 y 12,1 mL de agua.

Se aplicó al gel una precorrida de 200V x 15min, 300V x 30min y 400V por 60 minutos y la corrida para la formación de la gradiente de pH se efectuó a 400V x 4 horas.

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

3.2.4 Análisis de minerales

3.2.4.1 Determinación de calcio total. El análisis de calcio se realizó con el método complexométrico que consiste en una retrotitulación con la solución estándar de cloruro de calcio, en una alícuota que contenía un exceso de etilendiamino tetraacetato (EDTA), utilizando calceína como indicador (NTAILIANAS y WHITNEY, 1964).

3.2.4.2 Determinación de fósforo. Se utilizó el método colorimétrico, según FIL/IDF 42 B (1990). El método consiste en la digestión de la muestra usando ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno, formándose azul de molibdeno por adición de una solución de molibdato-ácido ascórbico. La absorbancia de cada muestra se midió a una longitud de onda de 820 nm.

3.2.5 Análisis estadístico. Para el análisis de resultados se utilizó el programa computacional Statgraphics plus 5.1 y se aplicó un análisis de varianza unifactorial para determinar el efecto de los factores en estudio. Además, se aplicó la prueba de Tukey a un 95% nivel de confianza, con el propósito de verificar las diferencias significativas entre los promedios del contenido de proteína, calcio, fósforo total y producción de leche.

Se aplicó el Test de homocedasticidad con el propósito de validar el análisis de varianza. Por lo tanto se aplicó un análisis alternativo de varianza de Kruskal-Wallis, el cual trabaja con las medianas de los datos (ANEXO 8).

4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Contenido de proteína total, calcio, fósforo y producción de leche de vacas Frisón Negro

En el CUADRO 2 se presentan los resultados del contenido de proteína total, calcio, fósforo y producción de leche con sus respectivos promedios y desviación estándar de cada uno de los muestreos y en el ANEXO 5 se encuentra el detalle de cada una de las variables de respuesta.

CUADRO 2 Promedio y desviación estándar del contenido de proteína total, calcio, fósforo y producción de leche, según el mes de muestreo.

Muestreo	N	Promedio+/-Desviación Estándar			
		Proteína total (%)	Calcio (g/L)	Fósforo (% m/m)	Producción (AM) de leche (L)
1	40	2,82 ± 0,21 ^a	0,93 ± 0,09 ^a	0,071 ± 0,011 ^a	12,94 ± 2,74 ^a
2	40	3,04 ± 0,21 ^b	0,95 ± 0,09 ^a	0,080 ± 0,083 ^b	13,60 ± 2,29 ^a
3	40	3,41 ± 0,20 ^c	1,13 ± 0,15 ^b	0,081 ± 0,095 ^b	14,22 ± 2,04 ^a
Total	120	3,09 ± 0,320	1,00 ± 0,142	0,078 ± 0,010	13,587 ± 2,41

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

4.1.1 Proteína total. El promedio de proteína total, en la leche de las 20 vacas Frisón Negro en la época de invierno fue de $3,09 \pm 0,320\%$ encontrándose diferencias significativas, según el mes de muestreo ($p < 0,05$). El aumento del contenido de proteínas entre un muestreo y otro se debe probablemente al cambio de alimentación, ya que aumentó el suministro de concentrado en aproximadamente en 2 kg/concentrado por día y al aumento de la lactancia de

los animales en estudio. El valor promedio obtenido es similar y un 4,6% menor a los resultados obtenidos por KRAMM (2003) y CID (2004), en estudios sobre un mismo grupo de 10 vacas Frisón Negro, realizado durante las épocas de primavera e invierno respectivamente.

En el estudio realizado por LUNDEN *et al.*, (1997), se encontró un promedio de proteína total de 3,29%, de un total de 204 vacas Holstein, Swedish de Nottingham, Inglaterra, las muestras de leche se recolectaron en la mañana y en la tarde.

En un estudio realizado por BOBE *et al.*, (2004), con 233 vacas Holstein-Friesian, el porcentaje de proteína total fue de 3,25% y un 4% para vacas Jersey. IKONEN *et al.*, (2004), determinaron un contenido de proteínas de 3,39%, en 698 vacas Finnish Ayrshire recolectadas durante la época de primavera e invierno. Las diferencias que existen en los diferentes estudios, se deberían a diversos factores tales como la estacionalidad, la raza de los animales la alimentación, número de lactancias y la etapa de lactancia.

4.1.2 Contenido de calcio. El promedio del calcio para los 3 muestreos fue de $1,00 \pm 0,142$ (g/L), encontrándose diferencias significativas en el contenido de calcio entre los meses de muestreo ($p < 0,05$), dado que se obtuvo un mayor contenido de calcio en el mes de septiembre respecto a los meses anteriores. Los resultados obtenidos son inferiores en un 22% y 11% a los resultados presentados por PEREZ (2003) y CID (2004), en un grupo de 10 vacas Frisón Negro, durante la época de primavera e invierno respectivamente.

Por su parte NG- KWAI-HANG *et al.*, (2002), en un estudio realizado con 9 vacas Jersey en Nueva Zelanda, obtuvieron un contenido de calcio promedio de 1,43 (g/L). La variación del contenido de calcio se ha relacionado con el tipo de raza, siendo el promedio para vacas Jersey y Frisón Negro, de 1,4 (g/L) y 1,2

(g/L) respectivamente, en a una investigación realizada en Nueva Zelanda con 114 vacas Frisón Negro y 125 vacas Jersey (DAVIS *et al.*, 2001).

Por su parte O'BRIEN *et al.*, (1997), en un estudio realizado con 36 vacas Holstein Friesian comprobaron que al variar las dietas se puede incrementar el valor nutritivo de la leche, aumentando la concentración de proteína total, caseína y lactosa, pero no encuentran efectos significativos en calcio, fósforo y grasa.

4.1.3 Contenido de fósforo. El promedio total de fósforo en el estudio fue de $0,078 \pm 0,010$ (% m/m) encontrándose diferencias significativas entre meses de muestreo con un intervalo de confianza del 95 %, similar a lo observado en el calcio. Este resultado es un 16,2 % y un 12,4% inferior a lo obtenido por CID (2004), y PEREZ (2003), que señalan un valor promedio de fósforo de $0,093 \pm 0,0017$ y $0,089 \pm 0,005$ (% m/m) respectivamente.

De acuerdo a ROJAS (2004), las diferencias observadas entre los meses de muestreo en el contenido mineral y proteico de la leche se deben probablemente a la estacionalidad de la producción y calidad nutricional de la alimentación de los animales.

Por otra parte, un estudio realizado por BALLESTEROS (1997), en leche de rebaños encontró un valor promedio de 0,72 (g/L); la leche provenía de 17 plantas que se encontraban en la VIII, IX y X región, siendo el promedio más elevado en la X región. El efecto estacional fue significativo al comparar las regiones.

4.1.4 Producción de leche. El valor promedio de leche de ordeño/vaca AM fue de $13,59 \pm 2,41$ (L) en la época de invierno. Este valor promedio general resulta menor comparado con el valor promedio de $14,60 \pm 2,72$ (L) encontrado por CID (2004) en la época de invierno, y mayor a los $10,52 \pm 2,17$ (L) encontrados

por KRAMM (2003), en la época de primavera. Las diferencias determinadas tendrían su explicación en la alimentación, manejo, estacionalidad y número de lactancias de los animales en estudio.

BALOCCHI *et al.*, (2002), en un estudio realizado con 12 vacas de raza Frisón Negro Chileno, encontraron que la producción de leche aumentaría por la suplementación de concentrados, logrando una ganancia en el peso vivo del animal, siendo el rango de producción de leche desde 29,6 L./día hasta 32,3 L./día. Báez citado por JHAN *et al.* (2000), señala que la variación en la alimentación ya sea en volumen o calidad repercute en la producción de leche. Observándose una mayor producción de leche con alfalfa (*Medicago sativa* L.) en estado prebotón, el rango promedio de la leche fue desde 20 (L/día) durante la época de verano, con 96 vacas Holstein- Friesian.

4.2 Variaciones de proteína total, calcio, fósforo y producción de leche de vacas Frisón Negro con respecto al número de lactancias

En el CUADRO 3 se presentan los resultados promedios del contenido de proteína total, calcio, fósforo y producción de leche con sus respectivas desviaciones estándares, según el número de lactancia (ANEXO 1). Los análisis estadísticos de estas variables se presentan en el ANEXO 8.

CUADRO 3 Promedio y desviación estándar del contenido de proteína total, calcio, fósforo y producción de leche, según el número de lactancias.

Grupo	N	Promedio+/-Desviación Estándar			
		Proteína total (%)	Calcio (g/L)	Fósforo (% m/m)	Producción (AM) de leche (L)
1	60	3,05 ± 0,358 ^a	1,03 ± 0,136 ^a	0,080 ± 0,011 ^a	13,07 ± 2,21 ^a
2	60	3,13 ± 0,276 ^a	0,98 ± 0,146 ^a	0,075 ± 0,01 ^b	14,10 ± 2,51 ^b
Total	120	3,09 ± 0,321	1,00 ± 0,142	0,078 ± 0,01	13,59 ± 2,42

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

4.2.1 Número de lactancias y contenido de proteínas. El promedio total para el grupo uno y el grupo dos fue de $3,05 \pm 0,358\%$, y de $3,13 \pm 0,276\%$ respectivamente, no encontrándose diferencias significativas, pero se observa un ligero aumento del grupo dos al compararlo con el grupo uno.

El estudio realizado por KRAMM (2003), con un grupo de 10 vacas Frisón Negro en su primera lactancia, durante la época de primavera obtuvo un valor promedio de proteínas $3,09 \pm 0,18\%$, similar al valor obtenido en el presente estudio ($3,05 \pm 0,358 \%$).

En un estudio realizado con 618 vacas Finnish Ayrshire, la cantidad de proteína total no fue afectada significativamente por el número de lactancias, pero sí se notó una disminución en la cantidad de caseína, siendo el promedio de proteínas total de $3,39\%$ y de caseína $2,78\%$ durante la época de primavera (IKONEN *et al.*, 2004).

Por su parte TSIARAS *et al.*, (2005), en un estudio con 278 vacas Holstein Heifers en el norte de Grecia, no encontraron diferencias significativas entre la primera lactancia y la segunda lactancia, siendo el valor promedio de $3,28\% \pm 0,26\%$.

4.2.2 Número de lactancias y contenido mineral. El calcio promedio que se encuentra en el grupo uno (primera a segunda lactancia) fue de $1,03 \pm 0,136$ (g/L), disminuyendo a $0,98 \pm 0,146$ (g/L) (cuarta y quinta lactancia), pero no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

En un estudio que realizó PEREZ (2003), con un grupo de vacas Frisón Negro obtuvo un valor promedio de calcio total de $1,26$ g/L en su primera lactancia, durante la época de primavera, lo cual, es inferior el valor obtenido en el presente estudio, que se realizó en la época de invierno.

El contenido de fósforo también fue mayor en el grupo uno con uno y dos lactancias ($0,080 \pm 0,011\%$ m/m), y para el grupo dos con cuatro y cinco lactancias ($0,075 \pm 0,01\%$ m/m), con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

4.2.3 Número de lactancias y la producción de leche. La producción de leche promedio, presentó en el grupo uno (una y dos lactancias) $13,07 \pm 2,21$ (L) y en el grupo dos (cuatro y cinco lactancias) $14,10 \pm 2,25$ (L), con diferencias significativas ($p < 0,05$). A mayor número partos se observó mayor producción de leche.

OSORIO y SEGURA (2005), señalan que las diferencias de la producción de leche con relación al número de partos se pueden atribuir a que las vacas, al comienzo no han terminado su desarrollo corporal, por lo cual deben satisfacer primero sus requerimientos de crecimiento mantenimiento y posteriormente producción de leche.

Por su parte STRZALKAWSKA *et al.*, (2002), en un estudio realizado en Polonia con 102 vacas Holstein Friesian, señalan que la producción de leche aumentaría al haber mayor número de partos, con valores que van desde 18,9 kg/día hasta 27,4 kg/día (vacas de uno a tres partos respectivamente).

4.3 Variaciones de proteína total, calcio, fósforo y producción de leche de vacas Frisón Negro con respecto a los meses de lactancia.

En el CUADRO 4 se presentan los resultados promedios del contenido de proteína total, calcio, fósforo y producción de leche con sus respectivas desviaciones estándares, separándose en tres grupos, de acuerdo a los meses de lactancia, según se explicó en material y métodos (ANEXO 1).

CUADRO 4 Promedio y desviación estándar del contenido de proteína total, calcio, fósforo y producción de leche, según meses de lactancia.

Grupo (meses)	N	Promedio+/-Desviación Estándar			
		Proteína total (%)	Calcio (g/L)	Fósforo (% m/m)	Producción (AM) de leche (L)
1 (1 y 2)	18	2,71 ± 0,166 ^a	0,95 ± 0,092 ^a	0,074 ± 0,013 ^a	13,31 ± 1,79 ^a
2 (3 y 4)	18	2,93 ± 0,211 ^b	0,92 ± 0,078 ^a	0,069 ± 0,075 ^a	13,2 ± 3,40 ^a
3 (6)	4	2,79 ± 0,019 ^{ab}	0,88 ± 0,087 ^a	0,067 ± 0,004 ^a	10 ± 1,15 ^a
Total	40	2,82 ± 0,210	0,93 ± 0,085	0,071 ± 0,011	12,94 ± 2,74

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

Como se observa en el CUADRO 4 solo el contenido de proteínas total presentó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) de acuerdo a los meses de lactancia, no encontrándose diferencias significativas en las restantes variables de respuesta ($p > 0,05$). Los análisis estadísticos de estas variables se presentan en el ANEXO 8.

4.3.1 Meses de lactancia y contenido de proteínas. El promedio total para el grupo uno fue de $2,71 \pm 0,166$ %, el grupo dos $2,93 \pm 0,211$ % y el grupo tres $2,79 \pm 0,019$ %, aumentando a mayor mes de lactancia.

En un estudio realizado por IKONEN *et al.*, (2004), con 618 vacas Finnish Ayshire, se incrementó el contenido de proteínas durante le tercer mes de lactancia, similar situación se observa en el presente estudio.

Por su parte VALLE (1996), informó para 32 vacas Holstein, un valor promedio de $3,465 \pm 0,423$ %, aumentando los niveles de proteínas a medida que transcurre la lactancia, la que se estabiliza al pasar los 230 días de lactancia.

WU y SATTER (2000), en un estudio con 42 vacas Holstein- Friesian mencionan que el contenido de proteína total tiene un aumento desde el inicio de la lactancia estabilizándose al finalizar la lactancia, obteniendo un promedio de proteína total de $3,05 \pm 0,05$ %.

4.3.2 Meses de lactancia y contenido mineral. El calcio promedio encontrado en el grupo uno fue $0,95 \pm 0,092$ (g/L), observando una disminución en el grupo dos y tres, que corresponde a $0,92 \pm 0,078$ (g/L) y $0,88 \pm 0,087$ (g/L) respectivamente, sin diferencias significativas, ($p > 0,05$).

El contenido de fósforo fue mayor en el grupo uno con un valor de $0,074 \pm 0,013$ % m/m, para el grupo dos fue de $0,069 \pm 0,075$ % m/m y el grupo tres de $0,067 \pm 0,004$ % m/m, no encontrándose diferencias significativas, al aumentar el mes de lactancia, ($p > 0,05$).

JENNESS y PATTON (1976), señalan que habría una disminución de minerales desde el tercer al cuarto mes de lactancia, similar a los resultados obtenidos en esta investigación. VALLE (1996), menciona para 32 vacas Holstein que el contenido mineral de la leche tiene un descenso a partir del cuarto mes de lactancia para el fósforo y séptimo mes de lactancia para el calcio, obteniéndose $0,097 \pm 0,005$ %m/m y $1,35 \pm 0,107$ (g/L) respectivamente.

4.3.3 Producción de leche según los meses de lactancia. La producción de leche promedio (ordeño AM) en el grupo uno fue de $13,31 \pm 1,790$ (L), en el grupo dos $13,21 \pm 3,40$ (L) y en el grupo tres $10 \pm 1,15$ (L) no encontrándose diferencias significativas, ($p > 0,05$), pero sí se observa una disminución numérica en el grupo 3 con respecto al grupo uno. La explicación tendría fundamento en que la producción de leche disminuye a medida que la vaca finaliza su etapa de lactancia.

HERNÁNDEZ y PONCE (2005), realizaron un estudio en La Habana, Cuba con 30 vacas Holstein- Friesian, en que las muestras de leche se recolectaron

semanalmente en el ordeño de la mañana y la tarde, encontró que la producción de leche promedio fue $15,4 \pm 0,20$ (L/día), no encontrándose diferencias significativas entre meses de lactancia, aunque los autores señalan que los meses de lactancia de una vaca tienen un momento de máxima producción disminuyendo la producción de leche al finalizar la etapa de lactancia.

GONZALEZ y BAS (2002), señalan que la producción de leche de 30 vacas Holstein - Friesian aumentaría en el cuarto mes de lactancia, disminuyendo paulatinamente hasta que finaliza la etapa de lactancia, la producción promedio fue de 39,43 L/día.

4.4 Variantes genéticas de β - Lactoglobulina en la leche de vacas Frisón Negro

En la FIGURA 3, se presentan las bandas electroforéticas obtenidas de ocho muestras en estudio, incluyendo los estándares empleados.

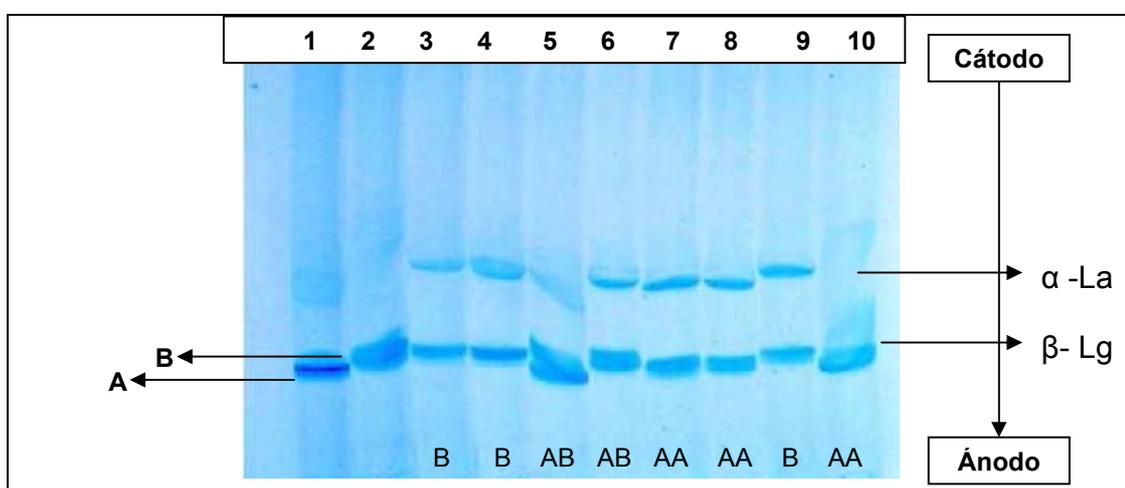


FIGURA 3. Electroforesis de isoenfoque para las variantes de β -Lg en muestras de leche de vacas Frisón Negro.

Donde:

1)Estándar A B-Ig ; 2). Estándar B B-Ig; 3). 655; 4). 686; 5)1353; 6)1579; 7)1607; 8)1652; 9)2067; 10)2246

En la FIGURA 3 se observa además la banda correspondiente a la α -Lactoalbumina, lo cual también ha sido descrito por LOWE *et al.* (1995).

En el ANEXO 3 se presentan los porcentajes de expresión de las variantes determinadas en el presente estudio.

El alelo B de β – Lactoglobulina se encontró en mayor proporción que el alelo A β – Lactoglobulina al considerar el total de las muestras, con valores de un 65,43% y un 34,38% respectivamente.

La frecuencia alélica en un estudio realizado en el norte de Grecia con 278 vacas Holstein fue 94% para el alelo A de β –Lactoglobulina y 0,06 % para el alelo B de β –Lactoglobulina (TSIARIAS *et al*, 2005).

En el CUADRO 5 se presentan las variantes genéticas determinadas en las muestras de leche en estudio, por electroforesis isoenfoque.

CUADRO 5 Variantes genéticas de β -Lactoglobulina en las muestras de leche de 20 vacas.

Muestras	Variantes genéticas	Muestras	Variantes genéticas
636	BB	1592	B *
655	B *	1593	BB
686	B *	1597	AB
720	BB	1607	AA
1348	AB	1613	B *
1353	AB	1652	AA
1573	AB	2067	B *
1579	AB	2091	BB
1581	B *	2220	B *
1586	B *	2246	AA

*En algunas muestras solo se observó una banda

En el CUADRO 5, se observa que en las muestras de leche 1348, 1353, 1573, 1579 y 1597 se identificó la presencia de los dos alelos A y B de β -Lactoglobulina. En el ANEXO 9, se presentan las densitometrías de las electroforesis de las muestras de β -Lactoglobulina, observándose un mayor porcentaje de expresión del alelo A (ANEXO 3).

En el CUADRO 6 se presentan los resultados obtenidos de proteína total, calcio, fósforo y producción de leche con sus respectivos promedios y desviaciones estándares en relación a las variantes genéticas de β -Lactoglobulina. Los análisis estadísticos de estas variables se presentan en el ANEXO 8.

Se observa en el CUADRO 6, que en cada uno de los constituyentes de la leche analizados no se observaron diferencias significativas según las variantes genéticas de la β -Lactoglobulina.

CUADRO 6 Promedio y desviación estándar del contenido de proteína total, calcio, fósforo y producción de leche, según las variantes genéticas.

Variantes	N	Promedio+/-Desviación Estándar			
		Proteína total (%)	Calcio (g/L)	Fósforo (% m/m)	Producción (AM) de leche (L)
A	18	3,08 \pm 0,290 ^a	1,00 \pm 0,160 ^a	0,081 \pm 0,129 ^a	12,93 \pm 2,27 ^a
A y B	30	3,12 \pm 0,317 ^a	1,01 \pm 0,142 ^a	0,075 \pm 0,009 ^a	14,29 \pm 1,55 ^a
B	72	3,07 \pm 0,331 ^a	0,99 \pm 0,139 ^a	0,078 \pm 0,01 ^a	13,45 \pm 2,69 ^a
Total	120	3,09 \pm 0,321	1,00 \pm 0,142	0,078 \pm 0,010	13,59 \pm 2,42

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

4.4.1 Influencia de las variantes genéticas sobre el contenido de proteína total. La proteína total no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$), con respecto a las variantes genéticas de β -lactoglobulina.

BOBE *et al.*, (2004), en un estudio realizado con 233 vacas Holstein- Friesian, encontraron que el fenotipo AB presentó un ligero aumento de proteína total, con un porcentaje promedio de los fenotipos AB, AA, BB fue de 3,28%, 3,27% y 3,25% respectivamente.

Según TSIARIAS *et al.*, (2005), en un estudio realizado con 278 vacas Holstein Heifers en el norte de Grecia, encontró que no existían diferencias significativas entre los fenotipos AA y AB , pero observaron un mayor contenido de proteína por la presencia del fenotipo AB.

MOLINA *et al.*, (2006), observaron en 10 vacas Holstein – Friesian de primera lactancia que la variante AA de β -Lactoglobulina presenta un mayor contenido de proteína total que la variante AB de β -Lactoglobulina, con un promedio de $3,10 \pm 0,03$ y $3,01 \pm 0,03$ respectivamente.

4.4.2 Efecto de las variantes genéticas de β -Lactoglobulina sobre la composición mineral. El calcio, y fósforo total no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$), con respecto a las variantes genéticas de β -Lactoglobulina.

NG- KWAI-HANG *et al.*, (2002), encontraron que el alelo B de la β -Lactoglobulina produce una mayor cantidad de calcio, obteniendo un valor de 1,5 (g/L). En el alelo A se obtuvo 1,38 (g/L) en la leche de vacas Jersey.

4.4.3 Efecto de las variantes genéticas de β -Lactoglobulina en la producción de leche. La producción de leche no presentó diferencias

significativas en respecto a las variantes genéticas con un 95% de confianza ($p > 0,05$).

BOBE *et al.*, (2004), en un estudio con 233 vacas Holstein- Friesian encontraron que la producción de leche por día no presentó diferencias significativas con los fenotipos AA, AB, BB, pero si se determinó un mayor contenido de materia grasa con el fenotipo BB, con un promedio de 3,50% respecto a los otros fenotipos.

De acuerdo a AULDIST *et al.*, (2000), en un estudio realizado con 22 vacas Frisonas homocigotas con las variantes AA de β -Lactoglobulina y 22 vacas homocigotas con las variantes BB de β -Lactoglobulina, no reportaron diferencias significativas, pero si un ligero aumento en la producción de leche de la variante AA con respecto a la variante BB de β -Lactoglobulina, desde 19,9 kg/día hasta 20,8 kg/día.

5. CONCLUSIONES

- El alelo B de β -Lactoglobulina se presentó en un 65,43% y el alelo A un 34,38% de las muestras analizadas.
- El contenido promedio de proteína, calcio y fósforo de la leche de vacas Frisón Negro varió significativamente según mes de muestreo, no así la producción de leche.
- El contenido fósforo y producción de leche presentó diferencias significativas en relación al número de lactancias. Observándose un aumento en la producción de leche, y una disminución en el contenido de fósforo en la leche con un mayor número de partos.
- El contenido de proteína total aumentó según el mes de lactancia, encontrándose diferencias significativas, con un mayor contenido en el grupo de vacas con 3 y 4 meses de lactancia respecto a vacas de 1 y 2 meses lactancia.
- El contenido de proteína total, calcio, fósforo y producción de leche de vacas Frisón Negro no varió significativamente según las variantes de β -Lactoglobulina en la época en estudio.
- Se rechaza la hipótesis nula, ya que la presencia de la variante genética B de β -Lactoglobulina en las muestras de leche no presenta diferencias significativas en el contenido de las variables estudiadas.

6. RESUMEN

El presente estudio tuvo por objetivo general relacionar la expresión de las variantes genéticas de β -Lactoglobulina, el número de partos y mes de lactancia, en leche de vacas Frisón Negro, con el contenido de proteína total, el contenido de calcio, fósforo y producción de leche.

Las muestras de leches de 20 vacas Frisón Negro fueron obtenidas del Fundo Santa Rosa perteneciente a la Universidad Austral de Chile. Se realizó un total de tres muestreos, durante el periodo Julio a Septiembre de 2005.

No se observaron diferencias significativas en el contenido de proteína total, fósforo, calcio y producción de leche con respecto a las variantes genéticas.

Los contenidos promedios de proteína total, calcio, y fósforo obtenidos durante el estudio fueron, $3,09 \pm 0,320$ (%); $1,00 \pm 0,142$ (g/L) y $0,078 \pm 0,01$ (% m/m) respectivamente, detectándose diferencias estadísticamente significativas al 95% entre los meses de muestreo. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la producción de leche, siendo el resultado promedio de $13,586 \pm 2,415$ (L).

Se determinó que tanto el fósforo y producción de leche presentan diferencias significativas en relación al número de lactancia. A mayor lactancia aumenta la producción de leche y disminuye el contenido de fósforo.

El contenido de proteína total presentó diferencias significativas según el mes de lactancia, siendo mayor con tres o más meses de lactancias.

SUMMARY

The present study had the main objective to relate various genetic expressions of β -Lactoglobulin, the number of calvings and month of lactancy, in the milk of cow of the Black Friesian breed, with the total protein content, calcium, phosphorous and production of milk.

Samples of milk from 20 cows of the Black Friesian breed were obtained from Fundo Santa Rosa belonging to the Universidad Austral de Chile. A total of three sampling were made during the period between July and September of 2005.

There were no significant differences detected in the total protein content, phosphorous, calcium and milk production in relation to the genetic variants.

The average content of the total protein, calcium and phosphorous obtained during the study were, $3,09 \pm 0,032$ (%); $1,00 \pm 0,02$ (g/L) and $0,078 \pm 0,015$ (% m/m) respectively, detecting significant statistical differences to 95% between the months of sampling. There were no significant statistical differences observed in the production of milk, being the average of $13,586 \pm 2,415$ (L).

It was determined that phosphorous and milk production presented significant differences in relation to the number of lactation. The greater amount of lactation, the greater milk production and lesser the phosphorous content.

The total protein content presented significant differences according to the month of lactancy, being higher with three or more months of lactancy.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ALAIS, CH. 1985. Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera. Reverté S.A. Barcelona, España. 873 p.
- AMIOT, J. 1991. Ciencia y tecnología de la leche. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 547 p.
- 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.
- BADUI, S. 1999. Química de los Alimentos. Editorial Pearson Educación. México. 648 p.
- BALLESTEROS, C. 1997. Determinación de minerales en leche de vaca: Sodio, potasio, calcio total, calcio complexométrico, fósforo total y fósforo no proteico. Tesis Lic. en Ing. en Alimentos. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia. 57 p.
- BALOCCHI, O., PULIDO, R y FERNÁNDEZ, J. 2002. Comportamiento de vacas lecheras en pastoreo con y sin suplementación con concentrado. Agricultura Técnica. 62(1):87-98.

- BELITZ, H-D y GROSCH, W. 1997. Química de los Alimentos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 1087 p.
- BOBE, G., FREEMAN, A., LINDBERG., L y BEITZ., D. 2004. The influence of milk protein phenotypes on fatty acid composition of milk from Holstein cows. *Milchwissenschaft*.59(1/2):3-5.
- BOBE, G., BEITZ., D., FREEMAN, A y LINDBERG, L. 1999. Effect of milk protein genotypes on milk protein composition and its genetic parameter estimates. *Journal of Dairy Science*. 82 (9):2797 – 2804.
- BUXADE, C. 1996. Producción vacuna de leche y carne. Ediciones Mundi Prensa. México. 342 p.
- BYLUND, G. 1995. Dairy Processing Handbook. Tetra Pack Processing Systems AB. Lund, Suecia, 436 p.
- CARDAK, A. 2005. Effects of genetic variants in milk protein on yield and composition of milk from Holstein – Friesian and Simmental cows. *Journal of Animal Science*. 35(1): 41- 47.
- CARDAK, A., BARTENSCHLAGER, H y GELDERMANN, H. 2003. Effects of polymorphism milk proteins on the individual milk protein content of Holstein – Friesian and Simmental cows. *Milchwissenschaft*. 58(5/6): 235-238.
- CASANOVA, M. 2001. Identificación de variantes genéticas de k-caseína en leches de vacas Holstein-Friesian y Jersey por electroforesis de

- isoenfoque. Tesis Licenciado en Alimentos. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia. Chile. 102p.
- CID, C. 2004. Proteína Total, Calcio, Fósforo y Estabilidad Térmica de la Leche y su Relación con las Variantes Genéticas de k-Caseína. Época de Invierno. Tesis Lic. Ingeniería en Alimentos. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia. 101p.
- CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN (INN). 1998. Leche y productos lácteos – Muestreo - parte 1: Leche cruda. Norma Chilena NCh 1011/1. Santiago. Chile. 9 p.
- CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN (INN). 1998. Leche y productos lácteos –Determinación del pH. Norma Chilena NCh 1671/79. Santiago. Chile. 9 p.
- CREAMER, L., NILSSON, H., PAULSSON M., COKER, C., HILL, J y JIMENEZ, R. 2004. Effect of genetic variation on the tryptic hydrolysis of bovine β -lactoglobulina A, B, Y C. *Journal of Dairy Science*. 87(12):4023-4032.
- DAVIS, S., FARR, V., KNOWLESS, S., LEE, J., KOLVER, E. y AULDIST, M. 2001. Sources of variation in milk calcium content. *The Australian Journal of Dairy Technology*. 56.(2):156.
- DE LA FUENTE, M ., JUAREZ, M y OLANO, A. 2001. Distribution of minerals between the soluble and colloidal phases in commercial UHT milks. *Milchwissenschaft*. 56(4): 194- 198.

- FAMULA, T. y MEDRANO, J.1994. Estimation of genotype effects for milk proteins with animal on sire transmitting ability models. *Journal of Dairy Science*. 77:3153 -3162.
- FOX, P. F. y McSWEENEY, P. 1998. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Blackie Academic & Professional. London. 478 p.
- FOX, P. F.2001.Milk proteins as food ingredients. *International Journal of Dairy Technology*. 54(2):41 – 55.
- GAO, H ., NG- KWAI – HANG, y BRITTEN, M. 2002. The influence of genetic variants on gelling properties of β - lactoglobulina. *Milchwissenschaft*. 57(1): 6-9.
- GONZALEZ, F. y BAS, F.2002. Efecto de la suplementación con un aceite hidrogenado de pescado sobre la producción de leche en vacas Holstein Friesian. *Ciencia e Investigación Agraria*.29 (2):73-82.
- HERNÁNDEZ, R y PONCE, P.2005. Efecto de tres tipos de dieta sobre la aparición de trastornos metabólicos y su relación con alteraciones en la composición de la leche en vacas Holstein Friesian. *Zootecnia Tropical*., 23(.3):.295-310.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. 1993. Milk. Determination of Nitrogen Content. *International IDF Standard*. 20B: 1993. Part 3: Block- digestion method. Belgium. Pp. 7-9.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. IDF/FIL.1990. Milk determination of total phosphorus content. *IDF/FIL 42B:1990*.3p.

- IKONEN, T., MORRI, S., TYRISEVÄ, A., RUOTTINEN, O y OJALA, M.2004. Genetic and phenotypic correlations between milk coagulation properties, milk production traits, somatic cell count, casein content, and pH of milk. *Journal of Dairy Science*.87 (2):458-467.
- JENNESS, R. y PATTON, S. 1976. Principles of dairy chemistry. Publishing Company Huntington. New York. U.S.A. 446 p.
- JHAN, E., VIDAL, A y SOTO, P.2000. Sistema de producción de leche basado en alfalfa (*Medicago sativa*) y maíz (*Zea mays*) para la zona centro sur. Producción de leche. *Agricultura Técnica*.60(1):43-51.
- KRAMM, J. 2003. Composición proteica y su relación con las variantes genéticas de A y B de k – caseína y β - lactoglobulina en leche de vacas raza Frisón Negro. Tesis Lic. en Ing. en Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 114 p.
- LOWE, R., ANEMA, S.G., PATERSON, G.R. y HILL, J.P. 1995. Simultaneous separation of the lactoglobulin A,B y C variants using polyacrylamide gel electrophoresis. *Milchwissenschaft*. 50(2): 663-666.
- LOWRY, O., ROSEBROUGH, N., FARR, A. y RANDALL, R. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265 - 275.
- LUNDEN, A., NILSSON, M y JANSON.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.

- MOLINA, L.H., KRAMM, J., BRITO, C., CARRILLO, B., PINTO, M y FERRANDO, A.2006. Protein composition of milk from Holstein – Friesian dairy cows and its relationship with the genetic variants A and B of κ -casein and β - lactoglobulin (Part I). *International Journal of Dairy Technology*.59 (3):183-187.
- NG-KWAI- HANG, K., DODDS, C., BOLAND, M. y AULDIST, M. 2002. The influence of genetic variants of β - lactoglobulin on gelation speed and firmness of rennet curd. *Milchwissenschaft*. 57(5): 267-269.
- NG-KWAI -HANG, K.1998. Genetic polymorphism of milk proteins: Relationships with production traits, milk composition and technological properties. *Journal Canadian of Animal Science*.131- 147 p.
- NTAILIANAS, H. y WHITNEY, R.1964. Calcein as an indicator for the determination of total calcium and magnesium and calcium alone in the same aliquot of milk. *Journal of Dairy Science*.47(1):19-27.
- O'BRIEN,B.,MURPHY,J.,CONOLLY,J.,MERHA,R.,GUINEE,T y STAKELUM,G. 1997. Effect of altering the daily herbage allowance in mid lactation on the composition and processing characteristics of bovine milk. *Journal of Dairy Research*.64:621-626.
- OSORIO, M y SEGURA J.2005. Factores que afectan la curva de lactancia de vacas *Bos taurus* por *Bos indicus* en un sistema de doble propósito en el trópico húmedo de Tabasco, México. *Tec Pecu Méx*.43(1):127-137.
- PEARCE, F., BANKS, B., BANTHORPE, D., BERRY, A., DAVIES,H y VERNON,CH.1972. The Isolation and Characterization of Nerve – Growth Factor from the Venom of *Vipera russelli*.*Eu.J.Biochem*.29:417-425.

- PÉREZ, E. 2003. Relación entre el polimorfismo de κ -CN y β -Lg con el contenido de calcio, fósforo, citrato y termoestabilidad de la leche. Tesis Lic. en Ing. en Alimentos. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia. 103 p.
- PHILIPPE, M., GAUCHERON, F., LEGRAETY, Y., MICHEL, F y GAREM, A. 2003. Physicochemical characterization of calcium- supplemented skim milk. *Lait*.83:45-59.
- PIERONI, G., REARTE, D., BALDO, A. y ROMERO J. 1997. Suplementación de vacas lecheras en pastoreo con dos variedades de maíz bajo la forma de silo de grano húmedo. Efectos sobre la producción y composición de la leche, el ambiente ruminal, el consumo y la evolución de peso vivo. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. 5 (Supl): 144-146 p.
- PRIMO, E. 1997. Química de los Alimentos. Editorial Síntesis. Madrid, España. 461 p.
- ROJAS, C. 2004. Manual de Producción de Bovinos de Carne. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Fundación para la Innovación Agraria. Chile. 254 p.
- STRZALKOWSKA, N., KRZYZEWSKI, J., ZWIERZCHOWSKI, L. y RYNIOWICZ, Z. 2002. Effects of κ -casein and β - lactoglobulina loci polymorphism, cows age, stage of lactation and somatic cell count on daily milk yield and milk composition in Polish Black and White cattle. *Animal Science papers and reports*. 20 (1):21-35.
- TSIARIAS, A., BARGOULLU, G., BANOS, G y BOSCOS, M. 2005. Effects kappa, Casein and β - lactoglobulin loci on milk production traits and

reproductive performance of Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 88(1): 327-334.

VALLE, A. 1996. Importancia del porcentaje de área negra en animales Holstein sobre el proceso adaptativo. VI. Componentes de la leche. *Zootecnia Tropical*. 14(1):3-15.

WALSTRA, P., GEURTS, T., NOOMEN, A., JELLEMA, A. y VAN BOEKEL, M. 2001. *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Ed. Acribia, Zaragoza. España. 715p.

WONG, D. 1995. *Química de los alimentos*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 338 p.

WU, Z y SATTER, D. 2000. Milk production and reproductive performance of dairy cows fed two concentrations of phosphorus for two years. *Journal of Dairy Science*. 83 (5):1052-1063.

ANEXOS

ANEXO 1

Caracterización de las vacas en estudio.

Vacas	Fecha Ultimo Parto	Lactancia Número	Meses Lactancia
1579	14-12-2004	1	6
1652	12-12-2004	1	6
1573	07-05-2005	2	1
1581	22-04-2005	2	2
1586	28-04-2005	2	2
1592	30-04-2005	2	2
1593	25-04-2005	2	2
1597	28-05-2005	2	2
1607	26-04-2005	2	2
1613	11-05-2005	2	1
655	09-05-2004	4	3
1348	22-03-2005	4	3
1353	18-03-2005	4	3
2220	09-03-2005	4	3
2246	18-03-2005	4	3
636	09-02-2005	5	4
686	23-02-2005	5	4
720	12-03-2005	5	3
2067	18-03-2005	5	3
2091	06-04-2005	5	2

FUENTE:CHILE,CENTRO DE INSEMINACION ARTIFICIAL, Universidad Austral de Chile,
(2005)

(Continuación ANEXO 1)

Las vacas se separaron en grupos, de acuerdo al número de lactancias y meses de lactancias, para un posterior análisis estadístico.

- **Número de lactancias**

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

- **Meses de lactancias**

Grupo 1			Grupo 2		
Vacas	Edad (meses)	Meses de Lactancia	Vacas	Edad (meses)	Meses de Lactancia
1573	39	2	636	89	4
1581	39	2	655	88	3
1586	39	2	686	88	4
1592	39	2	720	87	3
1593	39	2	1348	75	3
1597	38	2	1353	75	3
1607	38	2	2067	100	3
1613	38	2	2220	73	3
2091	97	2	2246	72	3

Grupo 3 se incluyeron dos vacas de seis meses lactancias

(Continuación ANEXO 1)

- **Detalle de la alimentación.**

Alimentación	Muestreo 1		Muestreo 2		Muestreo 3	
	Sub 1	Sub 2	Sub 1	Sub 2	Sub 1	Sub 2
<i>Pradera</i>	10 kg	20 kg	10 kg	7 kg	20 kg	60 kg
<i>Silos</i>	40 kg	30 kg	10 kg	20 kg	-----	-----
<i>Concentrado</i>	4kg	4 kg	6 kg	6 kg	6 kg	5 kg
<i>Sales minerales</i>	-----	---	250 gr	250 gr	250 gr	200 gr
<i>Melaza</i>	-----	----	3 kg	----	3 kg	3 kg

- **Recuento de células somáticas.**

Vacas	Recuento Células Somaticas (cel/ml x 1000)	Vacas	Recuento Células
636	56	1592	36
655	181	1593	22
686	67	1597	100
720	52	1607	15
1348	120	1613	27
1353	14	1652	25
1573	42	2067	158
1579	35	2091	41
1581	13	2220	60
1586	45	2246	20

ANEXO 2**Progenie de las vacas en estudio.**

Vacas	Padre	Abuelo	% H.F.
1579	Navajo	Incumbent	56,3%
1652	Navajo	Incumbent	56,3%
1573	Navajo	Incumbent	56,3%
1581	Norelco	Cleison	25,0%
1586	Sócrates	Kentucky	95,5%
1592	Cantor	Loyal	62,5%
1593	Sócrates	Petro	58,0%
1597	Navajo	Martillo	56,3%
1607	Navajo	Camote	56,3%
1613	Belicoso	Adonis	75,0%
655	Gavilán	Diagrat	25,0%
1348	Gavilán	Martillo	25,0%
1353	Jabillo	Futuro	77,3%
2220	Incumbent	Cleison	50,0%
2246	Arlinda	Petro	62,5%
636	Gavilán	Vale	37,5%
686	Maizero	Mineral	62,8%
720	Dayliner	Beau	100,0%
2067	Adonis	Dolor	87,5%
2091	Adonis	Especial	87,5%

FUENTE: CHILE, CENTRO DE INSEMINACION ARTIFICIAL, Universidad Austral de Chile, (2005)

ANEXO 3

Variantes genéticas obtenidas por electroforesis de Isoenfoque y porcentaje de expresión.

Electroforesis isoenfoque		
	Variantes genéticas	Proporción
636	BB	**
655	B *	**
686	B *	**
720	BB	**
1348	AB	A= 52,27% B=47,73%
1353	AB	A= 47,54% B=52,46%
1573	AB	A= 83,32% B=16,32%
1579	AB	A= 52,24% B=47,76%
1581	B *	**
1586	B *	**
1592	B *	**
1593	BB	**
1597	AB	A= 74,17% B=25,83%
1607	AA	**
1613	B *	**
1652	AA	**
2067	B *	**
2091	BB	**
2220	B *	**
2246	AA	**
Mezcla 1	AB	A= 62,42% B=37,58%

*En algunas muestras solo se observó una banda

**100 % de la expresión del alelo

ANEXO 4

Distancia de migración de las proteínas en la electroforesis.

Medición 1

Nº Muestra	Dist. migración (cm) Muestra	Dist. migración (cm) Estándares de β - Ig	
		A	B
655	1,75 \pm 0,06	1,62 \pm 0,08	1,76 \pm 0,23
686	1,78 \pm 0,03	1,62 \pm 0,08	1,76 \pm 0,23
1353	*S= 1,80 \pm 0,13 I= 1,62 \pm 0,10	1,62 \pm 0,08	1,76 \pm 0,23
1579	*S= 1,85 \pm 0,50 I= 1,68 \pm 0,07	1,62 \pm 0,08	1,76 \pm 0,23
1607	1,64 \pm 0,02	1,62 \pm 0,08	1,76 \pm 0,23
1652	1,65 \pm 0,18	1,62 \pm 0,08	1,76 \pm 0,23
2067	1,81 \pm 0,45	1,62 \pm 0,08	1,76 \pm 0,23
2246	1,65 \pm 0,61	1,62 \pm 0,08	1,76 \pm 0,23

*S= Banda superior I= Banda Inferior

Medición 2

Nº Muestra	Dist. migración (cm) Muestra	Dist. migración (cm) Estándar β - Ig	
		A	B
720	1,82 \pm 0,37	1,54 \pm 0,94	1,81 \pm 0,16
1593	1,80 \pm 0,43	1,54 \pm 0,94	1,81 \pm 0,16
2220	1,81 \pm 0,35	1,54 \pm 0,94	1,81 \pm 0,16

(Continuación ANEXO 4)

Medición 3

Nº Muestra	Dist. migración (cm) Muestra	Dist. migración (cm) Estándar β - Ig	
		A	B
1348	*S= 1,69 \pm 0,07 I= 1,55 \pm 0,05	1,53 \pm 0,21	1,69 \pm 0,02
1592	1,69 \pm 0,21	1,53 \pm 0,21	1,69 \pm 0,02
2091	1,68 \pm 0,09	1,53 \pm 0,21	1,69 \pm 0,02
Mezcla	*S= 1,69 \pm 0,04 I= 1,54 \pm 0,54	1,53 \pm 0,21	1,69 \pm 0,02

*S= Banda superior I= Banda Inferior

Medición 4

Nº Muestra	Dist. migración (cm) Muestra	Dist. migración (cm) Estándar β - Ig	
		A	B
636	1,81 \pm 0,70	1,69 \pm 0,15	1,83 \pm 0,72
1573	*S= 1,68 \pm 1,42 I= 1,77 \pm 0,01	1,69 \pm 0,15	1,83 \pm 0,72
1581	1,78 \pm 0,42	1,69 \pm 0,15	1,83 \pm 0,72
1586	1,85 \pm 1,35	1,69 \pm 0,15	1,83 \pm 0,72
1597	*S= 1,67 \pm 0,13 I= 1,85 \pm 0,27	1,69 \pm 0,15	1,83 \pm 0,72
1613	1,82 \pm 0,82	1,69 \pm 0,15	1,83 \pm 0,72

*S= Banda superior I= Banda Inferior

ANEXO 5

Resultados del contenido de proteína total, calcio y fósforo en la leche de vacas Frisón negro.

VACAS	MUESTREO	PROTEINA TOTAL	CALCIO TOTAL	FOSFORO TOTAL
636	1	2,69	0,92	0,067
636		2,71	0,94	0,077
655	1	2,59	0,8	0,082
655		2,59	0,86	0,078
686	1	3,21	1,01	0,073
686		3,19	0,96	0,072
720	1	3,07	1,02	0,074
720		3,02	1,04	0,071
1348	1	3,17	0,9	0,064
1348		3,18	0,84	0,07
1353	1	2,80	0,9	0,059
1353		2,83	0,96	0,052
1573	1	2,54	1,02	0,082
1573		2,52	0,98	0,08
1579	1	2,79	0,8	0,065
1579		2,82	0,81	0,068
1581	1	2,89	0,86	0,073
1581		2,92	0,92	0,07
1586	1	2,65	0,88	0,092
1586		2,68	0,8	0,086
1592	1	2,58	1,16	0,099
1592		2,60	1,04	0,094
1593	1	2,64	0,96	0,071
1593		2,55	0,94	0,069
1597	1	2,89	0,96	0,072
1597		2,90	0,96	0,063
1607	1	2,72	0,9	0,069
1607		2,74	1,02	0,07
1613	1	2,53	1,06	0,052
1613		2,51	0,96	0,057
1652	1	2,78	0,98	0,063
1652		2,78	0,92	0,073
2067	1	2,83	0,8	0,073
2067		2,82	0,86	0,071
2091	1	3,01	0,82	0,055
2091		2,89	0,84	0,073
2220	1	3,10	0,98	0,074
2220		3,14	1,04	0,067
2246	1	2,94	0,9	0,062
2246		2,97	0,84	0,061
M1	1	2,91	0,86	0,071
M1		2,96	1,12	0,063
M2	1	2,77	0,82	0,065
M2		2,77	0,9	0,066

(Continuación ANEXO 5)**Muestreo 2**

VACAS	MUESTREO	PROTEINA TOTAL	CALCIO TOTAL	FOSFORO TOTAL
636	2	3,25	0,88	0,079
636		3,21	0,92	0,085
655	2	2,63	0,84	0,075
655		2,66	0,86	0,060
686	2	3,36	1	0,078
686		3,33	0,94	0,080
720	2	3,17	1,04	0,092
720		3,15	1,1	0,094
1348	2	3,28	1,01	0,085
1348		3,26	1,01	0,086
1353	2	3,03	0,96	0,071
1353		3,07	1,04	0,069
1573	2	2,66	0,94	0,081
1573		2,65	0,92	0,077
1579	2	3,18	0,95	0,065
1579		3,15	0,99	0,077
1581	2	2,98	1,02	0,079
1581		2,96	1,01	0,084
1586	2	2,78	1	0,082
1586		2,77	0,94	0,083
1592	2	3,15	0,99	0,075
1592		3,11	0,99	0,080
1593	2	3,12	1,05	0,075
1593		3,08	0,95	0,081
1597	2	3,37	0,9	0,084
1597		3,36	0,85	0,083
1607	2	2,82	0,96	0,096
1607		2,80	0,92	0,097
1613	2	2,80	0,99	0,084
1613		2,78	1,02	0,086
1652	2	3,15	1,1	0,087
1652		3,17	1,06	0,094
2067	2	3,04	0,88	0,074
2067		3,04	0,83	0,073
2091	2	3,12	0,96	0,071
2091		3,10	0,94	0,068
2220	2	3,00	0,9	0,087
2220		2,97	0,92	0,090
2246	2	3,00	0,74	0,076
2246		3,04	0,7	0,080
M1	2	2,97	1,04	0,084
M1		2,99	1,02	0,084
M2	2	3,11	0,92	0,092
M2		3,11	0,98	0,077

(Continuación ANEXO 5)**Muestreo 3**

VACAS	MUESTREO	PROTEINA TOTAL	CALCIO TOTAL	FOSFORO TOTAL
636	3	3,78	1,19	0,097
636		3,79	1,21	0,098
655	3	2,93	0,82	0,063
655		2,96	0,84	0,064
686	3	3,53	0,93	0,074
686		3,53	0,99	0,068
720	3	3,49	1,29	0,090
720		3,54	1,26	0,091
1348	3	3,34	1,3	0,083
1348		3,35	1,16	0,083
1353	3	3,42	1,15	0,071
1353		3,46	1,17	0,075
1573	3	3,41	1,17	0,081
1573		3,36	1,19	0,083
1579	3	3,41	0,96	0,068
1579		3,43	0,96	0,072
1581	3	3,31	1,29	0,084
1581		3,28	1,28	0,088
1586	3	3,43	1,2	0,087
1586		3,41	1,21	0,089
1592	3	3,48	0,89	0,081
1592		3,50	0,86	0,080
1593	3	3,70	1,06	0,086
1593		3,71	1,08	0,089
1597	3	3,62	1,31	0,090
1597		3,62	1,28	0,093
1607	3	3,53	1,19	0,097
1607		3,52	1,17	0,102
1613	3	3,50	1,24	0,071
1613		3,53	1,26	0,073
1652	3	3,25	1,26	0,083
1652		3,27	1,22	0,083
2067	3	3,11	0,88	0,078
2067		3,15	0,88	0,080
2091	3	3,14	1,2	0,072
2091		3,13	1,16	0,070
2220	3	3,41	1,24	0,080
2220		3,40	1,24	0,078
2246	3	3,49	1,11	0,083
2246		3,51	1,11	0,079
M1	3	3,30	1,22	0,084
M1		3,33	1,25	0,085
M2	3	3,54	1,1	0,076
M2		3,53	1,04	0,080

ANEXO 6**- pH de las muestras de leche.**

Vacas	pH	pH	pH	Promedio +/- desviación estándar
636	6,85	6,8	6,7	6,78 ±0,08
655	6,9	6,75	6,72	6,79±0,10
686	6,9	6,8	6,7	6,80 ±0,10
720	6,85	6,65	6,68	6,73±0,11
1348	6,65	6,75	6,6	6,67±0,08
1353	6,89	6,82	6,7	6,80± 0,10
1573	6,85	6,75	6,7	6,77± 0,08
1579	6,7	6,75	6,61	6,69 ±0,07
1581	6,7	6,79	6,72	6,74 ±0,05
1586	6,7	6,8	6,75	6,75 ±0,05
1592	6,7	6,8	6,72	6,74 ± 0,05
1593	6,65	6,75	6,61	6,67 ±0,07
1597	6,79	6,72	6,6	6,70 ±0,10
1607	6,8	6,7	6,7	6,73 ±0,06
1613	6,83	6,7	6,75	6,76 ± 0,07
1652	6,7	6,65	6,78	6,71 ±0,07
2067	6,95	6,82	6,8	6,86 ±0,08
2091	6,8	6,8	6,65	6,75 ± 0,09
2220	6,75	6,72	6,68	6,72± 0,04
2246	6,8	6,75	6,7	6,75 ± 0,05

ANEXO 7**Producción de leche en cada muestreo (AM).**

Vacas	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Promedio +/- desviación estándar
636	8	13	11,8	10,93 ± 2,610
655	16,9	16	16,4	16,43 ± 0,451
686	14	14,8	16	14,93 ± 1,007
720	10	10	11,2	10,40 ± 0,693
1348	13	14,9	15	14,30 ± 1,127
1353	12,5	14,5	17,5	14,83 ± 2,517
1573	14	14,8	14,5	14,43 ± 0,404
1579	11	13,2	13	12,40 ± 1,217
1581	11,9	14,5	14,5	13,63 ± 1,501
1586	14,5	13,8	15,8	14,70 ± 1,015
1592	11	7,2	11	9,73 ± 2,194
1593	10,5	10,1	12	10,86 ± 1,002
1597	15,9	7,2	15	12,70 ± 4,784
1607	13	13	16,9	14,30 ± 2,252
1613	15	14,5	11	13,50 ± 2,179
1652	9	12,5	13,5	11,67 ± 2,363
2067	16	17,5	13,2	15,57 ± 2,183
2091	14	13	16,8	13,50 ± 0,707
2220	18,5	14,8	16,8	16,65 ± 2,616
2246	10	14,5	14	12,83 ± 2,466

ANEXO 8

Análisis estadístico.

Contraste de Varianza de las variables de respuesta.

Según muestreo.

Proteína total			Calcio		
Test de contraste		p-valor	Test de contraste		p-valor
Test Cochran's C	0,347631	1,0	Test Cochran's C	0,59835	0,0000619862
Test Bartlett's	1,00168	0,907701	Test Bartlett's	1,15353	0,000258393
Test Hartley	1,13433		Test Hartley	3,00706	
Test Levene	0,442928	0,643226	Test Levene	5,01602	0,00812729

Fósforo			Producción de leche		
Test de contraste		p-valor	Test de contraste		p-valor
Test Cochran's C	0,402096	0,400008	Test Cochran's C	0,443974	0,120585
Test Bartlett's	1,01583	0,403076	Test Bartlett's	1,03036	0,177314
Test Hartley	1,5454		Test Hartley	1,80517	
Test Levene	0,349511	0,705767	Test Levene	1,03363	0,12442

* están los tres p-valores. Dado que el menor de los p-valores es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa

Análisis de varianza según muestreo

1) Proteína total

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	Valor p
Entre grupos	7,34123	2	3,67062	87,76	0,0000
Intra grupos	4,8938	117	0,04183		
TOTAL (CORREGIDO)	12,235	119			

(Continuación del ANEXO 8)**Test de rango múltiple Tukey 95%, por muestreo con relación al contenido de proteína total**

Método: 95% HSD de Tukey				
Muestras	Recuento	Media	Sigma	Grupos Homogéneos
1	40	2,8195	0,208	X
2	40	3,0388	0,209	X
3	40	3,4183	0,196	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	*-0,21925	0,10856
1 - 3	*-0,59875	0,10856
2 - 3	*-0,3795	0,10856

* indica una diferencia significativa.

Análisis de varianza según muestreo**2) Calcio**

* Dado que el menor de los p-valores es inferior a 0,05% hay diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones típicas para un nivel de confianza del 95,0%. Infringiendo una de las asunciones importantes que subyacen en el análisis de la varianza e invalidará la mayoría de los tests estadísticos estándares.

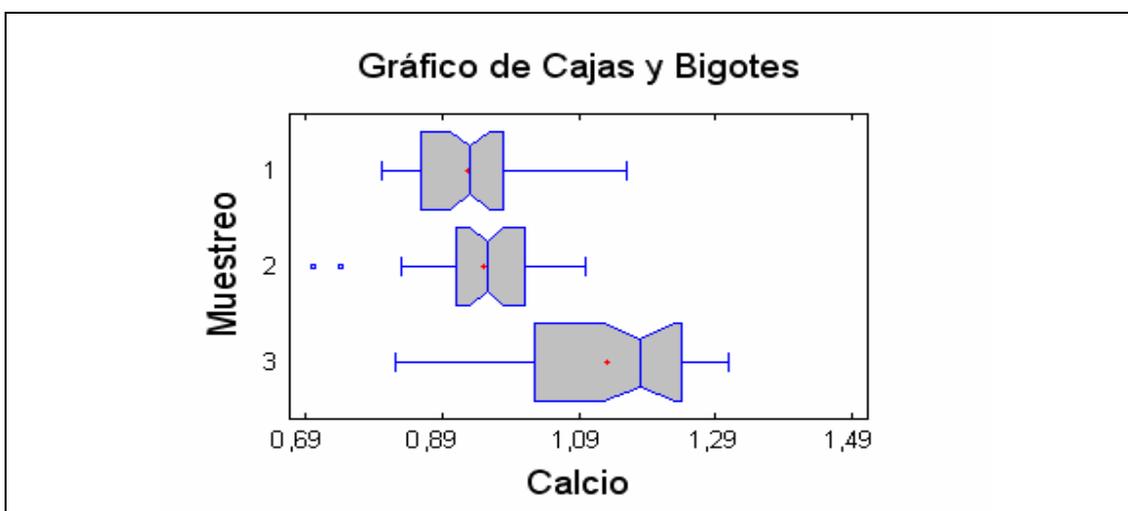
(Continuación del ANEXO 8)

Por lo tanto se usó el test de Kruskal-Wallis para el calcio, con respecto al muestreo.

Muestreo	Tamaño muestral	Rango Promedio
1	40	43,25
2	40	51,05
3	40	87,2

Estadístico = 36,4288 P-valor = 1,22911E-8

Medianas significativamente diferentes.

**Análisis de varianza según muestreo****3) Fósforo**

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	Valor p
Entre grupos	0,00264	2	0,00132	14,83	0,000
Intra grupos	0,01042	117	0,00009		
TOTAL (CORREGIDO)	0,01306	119			

(Continuación del ANEXO 8)**Test de rango múltiple Tukey 95%, por muestreo con relación al contenido de fósforo.**

Método: 95% HSD de Tukey				
Muestras	Recuento	Media	Sigma	Grupos Homogéneos
1	40	0,071075	0,010	X
2	40	0,080575	0,083	X
3	40	0,081425	0,095	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	*-0,0095	,00501003
1 - 3	*-0,01035	,00501003
2 - 3	-0,00085	,00501003

* indica una diferencia significativa.

Análisis de varianza según muestreo**3) Producción de leche**

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	Valor p
Entre grupos	33,0447	2	16,5223	3,31	0,0576
Intra grupos	661,054	117	5,65003		
TOTAL (CORREGIDO)	694,099	119			

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

(Continuación del ANEXO 8)**Contraste de Varianza de las variables de respuesta****Según variantes β - lactoglobulina**

Proteína total			Calcio		
Test de contraste		p-valor	Test de contraste		p-valor
Test Cochran's C	0,372296	0,77415	Test Cochran's C	0,393594	0,490685
Test Bartlett's	1,00401	0,794491	Test Bartlett's	1,00477	0,760529
Test Hartley	1,30121		Test Hartley	1,31557	
Test Levene	0,113118	0,893143	Test Levene	0,50667	0,603814

Fósforo			Producción de leche		
Test de contraste		p-valor	Test de contraste		p-valor
Test Cochran's C	0,462578	0,0636291	Test Cochran's C	0,488762	0,0230279
Test Bartlett's	1,02025	0,31545	Test Bartlett's	1,0947	0,00547631
Test Hartley	1,78029		Test Hartley	3,01923	
Test Levene	1,33099	0,268185	Test Levene	5,4397	0,00550859

* están los tres p-valores. Dado que el menor de los p-valores es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa

Análisis de varianza con relación a las variantes genéticas**1) Proteína total**

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Valor p
Entre grupos	0,05439	2	0,027195	0,26	0,7706
Intra grupos	12,1806	117	0,104108		
TOTAL (CORREGIDO)	12,235	119			

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

(Continuación del ANEXO 8)**Análisis de varianza con relación a las variantes genéticas****2) calcio**

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	Valor p
Entre grupos	0,003671	2	0,0018357	0,9	0,9146
Intra grupos	2,40425	117	0,0205491		
TOTAL (CORREGIDO)	2,40792	119			

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

Análisis de varianza con relación a las variantes genéticas**3) Fósforo.**

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	Valor p
Entre grupos	0,0003912	2	0,000195	1,81	0,1689
Intra grupos	0,0126724	117	0,00011		
TOTAL (CORREGIDO)	0,01306	119			

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

4) Producción de leche

* Dado que el menor de los p-valores es inferior a 0,05% hay diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones típicas para un nivel de confianza del 95,0%. Infringiendo una de las asunciones importantes que subyacen en el análisis de la varianza e invalidará la mayoría de los tests estadísticos estándares

(Continuación del ANEXO 8)

Por lo tanto se usara el test de Kruskal-Wallis para la producción de leche, en relación a las variantes genéticas

Muestreo	Tamaño muestral	Rango Promedio
A	18	48,06
AB	30	70,5
B	72	59,61

Estadístico = 4,65364 P-valor = 0,0976054

Por lo tanto no hay diferencias significativas entre medianas en un intervalo del 95% de confianza

Contraste de Varianza de las variables de respuesta

🚦 Según el número de lactancias.

Proteína total			Calcio		
Test de contraste		p-valor	Test de contraste		p-valor
Test Cochran's C	0,627788	0,0468157	Test Cochran's C	0,534978	0,592144
Test Bartlett's	1,03435	0,0468137	Test Bartlett's	1,00246	0,592137
Test Hartley	1,68664		Test Hartley	1,15044	
Test Levene	11,8257	0,00808036	Test Levene	0,382591	0,537412

Fósforo			Producción de leche		
Test de contraste		p-valor	Test de contraste		p-valor
Test Cochran's C	0,531559	0,628916	Test Cochran's C	0,562753	0,335159
Test Bartlett's	1,002	0,62891	Test Bartlett's	1,00797	0,335152
Test Hartley	1,13474		Test Hartley	1,28704	
Test Levene	0,271869	0,603058	Test Levene	0,446106	0,505494

🚦 están los tres p-valores. Dado que el menor de los p-valores es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa

(Continuación del ANEXO 8)

1) Proteína total. * Dado que el menor de los p -valores es inferior a 0,05% hay diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones típicas para un nivel de confianza del 95,0%. Infringiendo una de las asunciones importantes que subyacen en el análisis de la varianza e invalidará la mayoría de los tests estadísticos estándar

Por lo tanto se usara el test de Kruskal-Wallis para la proteína total con respecto al número de lactancias.

Muestreo	Tamaño muestral	Rango Promedio
1	60	56,35
2	60	64,65
Estadístico = 1,70857 P-valor = 0,191167		

Por lo tanto no hay diferencias significativas entre medianas

Análisis de varianza con relación al número de lactancias**2) Calcio**

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	Valor p
Entre grupos	0,06075	1	0,06075	3,05	0,831
Intra grupos	2,34717	118	0,01989		
TOTAL (CORREGIDO)	2,40792	119			

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

(Continuación del ANEXO 8)**Análisis de varianza con relación al número de lactancias****3) Fósforo.**

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	Valor p
Entre grupos	0,00062	1	0,000621075	5,89	0,016
Intra grupos	0,01244	118	0,000105445		
TOTAL (CORREGIDO)	0,01306	119			

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

Test de rango múltiple Tukey 95%, según el número de lactancias con relación al contenido de fósforo

Método: 95,0 % HSD de Tukey				
Grupo	Recuento	Media	Sigma	Grupos Homogéneos
1	60	0,079	0,011	X
2	60	0,075	0,01	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	*0,00455	0,0037126

* indica una diferencia significativa.

(Continuación del ANEXO 8)**Análisis de varianza con relación al número de lactancias****4) Producción de leche**

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	Valor p
Entre grupos	32,03	1	32,033	5,71	0,019
Intra grupos	662,06	118	5,6107		
TOTAL (CORREGIDO)	694,099	119			

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

Test de rango múltiple Tukey 95%, según el número de lactancias con relación a la Producción de leche

Método: 95,0 porcentaje HSD de Tukey				
Grupo	Recuento	Media	Sigma	Grupos Homogéneos
1	60	13,07	2,215	X
2	60	14,10	2,512	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	*-1,03	0,856396

* indica una diferencia significativa

(Continuación del ANEXO 8)**Contraste de Varianza de las variables de respuesta**

 **Según el mes de lactancias.**

Proteína total			Calcio		
Test de contraste		p-valor	Test de contraste		p-valor
Test Cochran's C	0,613082	0,0213701	Test Cochran's C	0,380214	0,9592262
Test Bartlett's	1,37102	0,00428544	Test Bartlett's	1,01188	0,815446
Test Hartley	123,78		Test Hartley	1,37738	
Test Levene	5,30197	0,00944796	Test Levene	0,0493363	0,951923

Fósforo			Producción de leche		
Test de contraste		p-valor	Test de contraste		p-valor
Test Cochran's C	0,698729	0,00176226	Test Cochran's C	0,718154	0,000878195
Test Bartlett's	1,2413	0,0238727	Test Bartlett's	1,28075	0,0139026
Test Hartley	9,15349		Test Hartley	8,67431	
Test Levene	2,30802	0,113607	Test Levene	4,37582	0,0196883

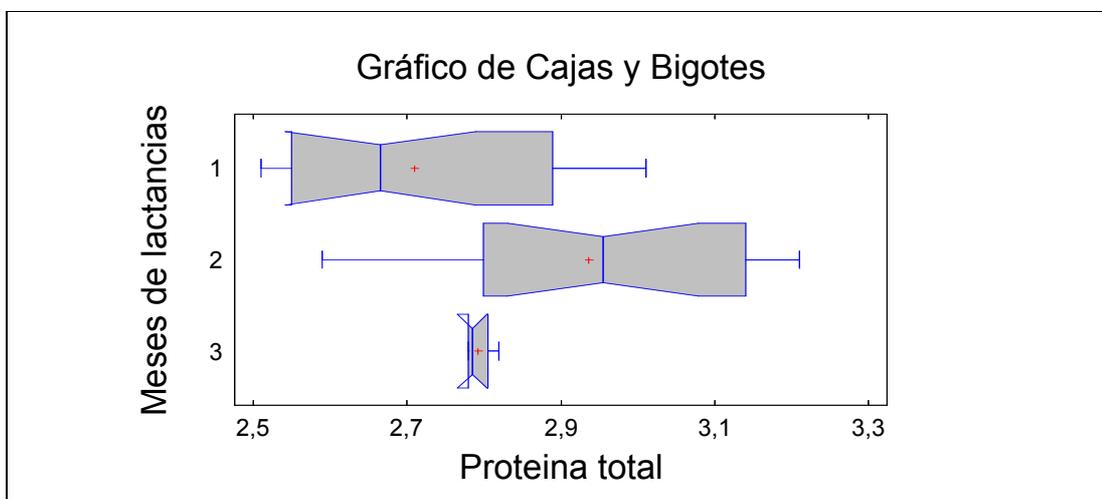
* están los tres p-valores. Dado que el menor de los p-valores es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa

1) Proteína total. * Dado que el menor de los p -valores es inferior a 0,05% hay diferencia estadísticamente significativa. Infringiendo una de las asunciones importantes que subyacen en el análisis de la varianza e invalidará la mayoría de los tests estadísticos estándar

Por lo tanto se usara el test de Kruskal-Wallis para la proteína total con respecto al número de lactancias.

Muestreo	Tamaño muestral	Rango Promedio
1	18	14,5
2	18	26,86
3	4	18,88
Estadístico = 10,1557		P-valor = 0,00623317

Medianas significativamente diferentes.



Análisis de varianza con relación al mes de lactancias

2) Calcio.

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	F	Valor p
Entre grupos	0,019013	2	0,00950639	1,30	0,2854
Intra grupos	0,270347	37	0,00730668		
TOTAL (CORREGIDO)	0,28936	39			

Como $p > 0,05$ no hay diferencias estadísticamente significativas.

3) Fósforo, dado que $p < 0,05$ infringe los test estadísticos, por lo tanto no se desarrollará el análisis de varianza, en su lugar se usará test de Kruskal-Wallis

Grupo	Tamaño muestral	Rango Promedio
1	18	22,55
2	18	19,63
3	4	15,13

Estadístico = 1,50469 P-valor = 0,471261

Por lo tanto no hay diferencias significativas entre medianas en un intervalo del 95% de confianza.

4) Producción de leche dado que $p < 0,05$ infringe los test estadísticos por lo tanto no se desarrollará el análisis de varianza, en su lugar se usará test de Kruskal-Wallis

Grupo	Tamaño de la muestra	Rango Promedio
1	18	18,94
2	18	18,06
3	4	8

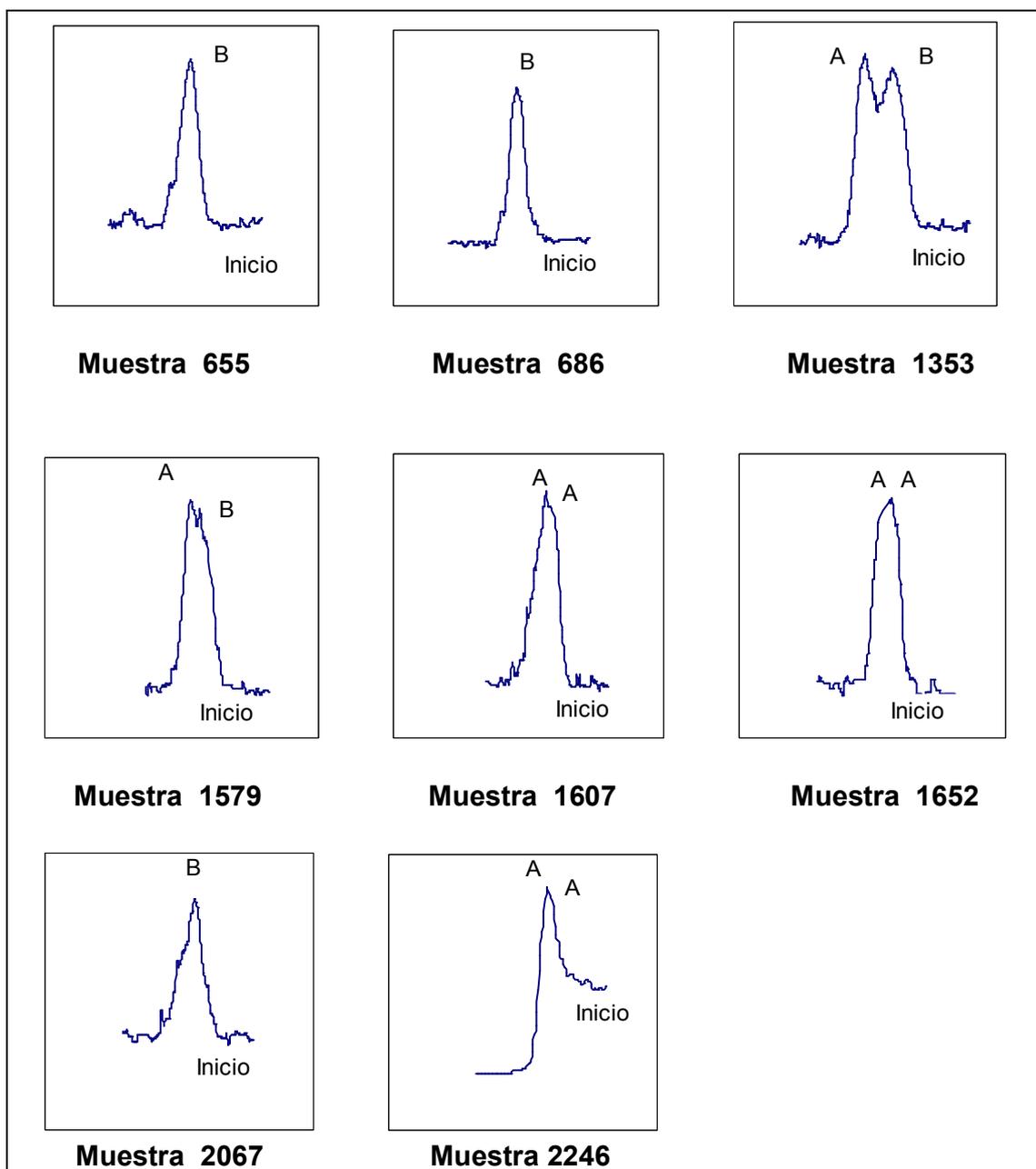
Estadístico = 5,25617 P-valor = 0,0722165

Por lo tanto no hay diferencias significativas entre medianas

ANEXO 9

Densitometrías de las muestras de β -Lactoglobulina analizadas por electroforesis de isoenfoque.

Corrida 1, corresponde a la foto 1 presentada en resultados y discusión



(Continuación del ANEXO 9)

Corrida 2 corresponde a la foto 2

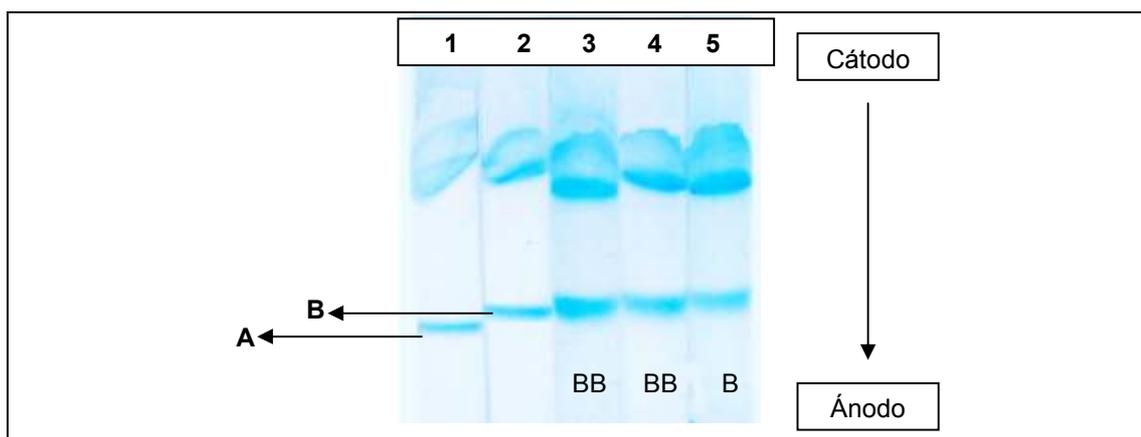
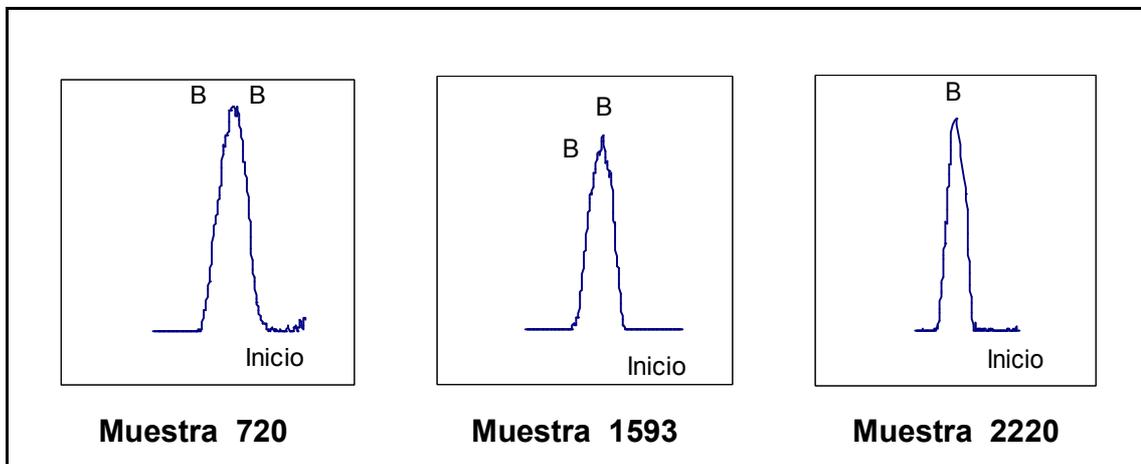


Foto número 2 Electroforesis de isoenfoque para las variantes de B- Ig en muestras de leche de vacas Frisón Negro

Donde:

1) Estándar A B-Ig ; 2). Estándar B B-Ig; 3). 720; 4). 1593; 5)2220.

(Continuación del ANEXO 9)

Corrida 3 corresponde a la foto 3

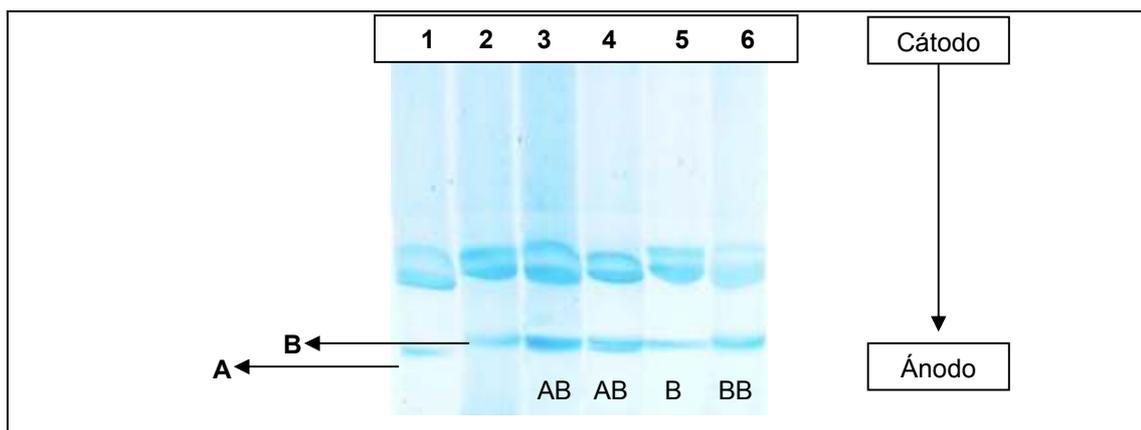
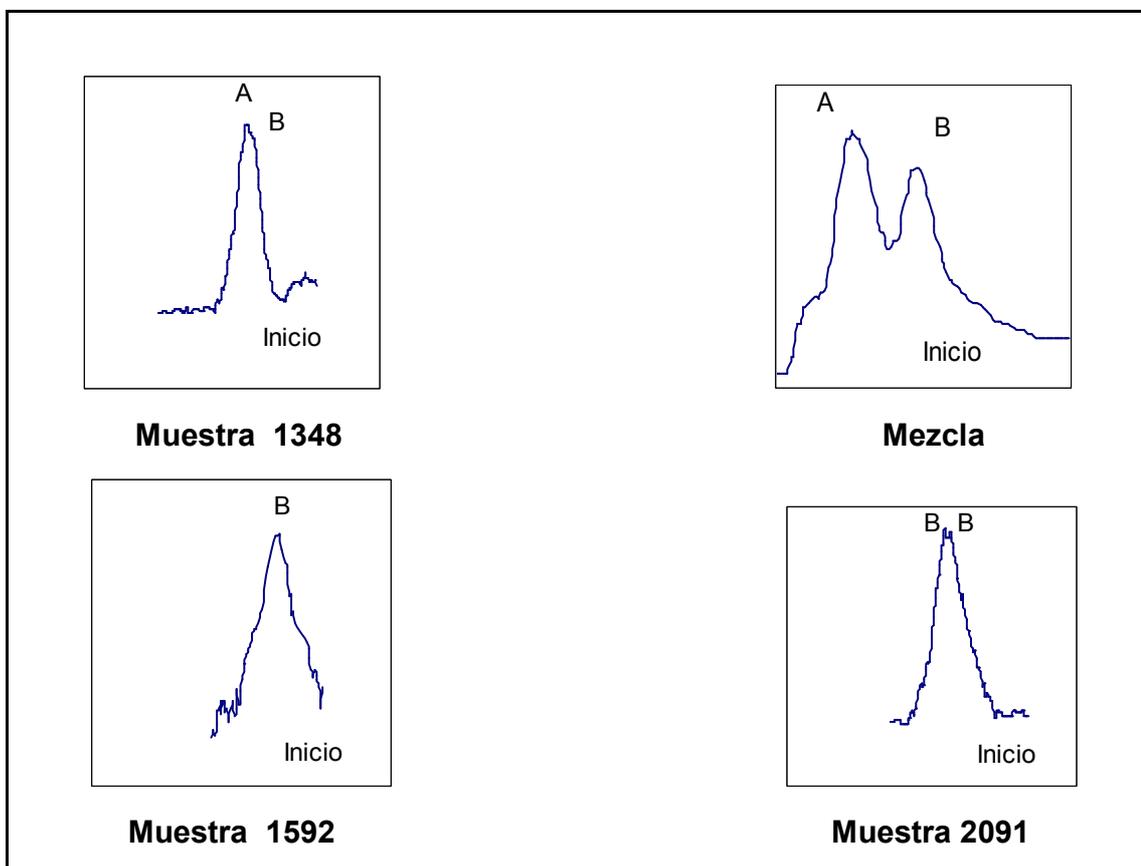


Foto 3 Electroforesis de isoenfoque para las variantes de B-Ig en muestras de leche de vacas Frisón Negro

Donde:

- 1) Estándar A B-Ig ; 2). Estándar B B-Ig; 3). 1348; 4). Mezcla; 5)1592; 6)2091

(Continuación del ANEXO 9), Corrida 4 corresponde a la foto 4

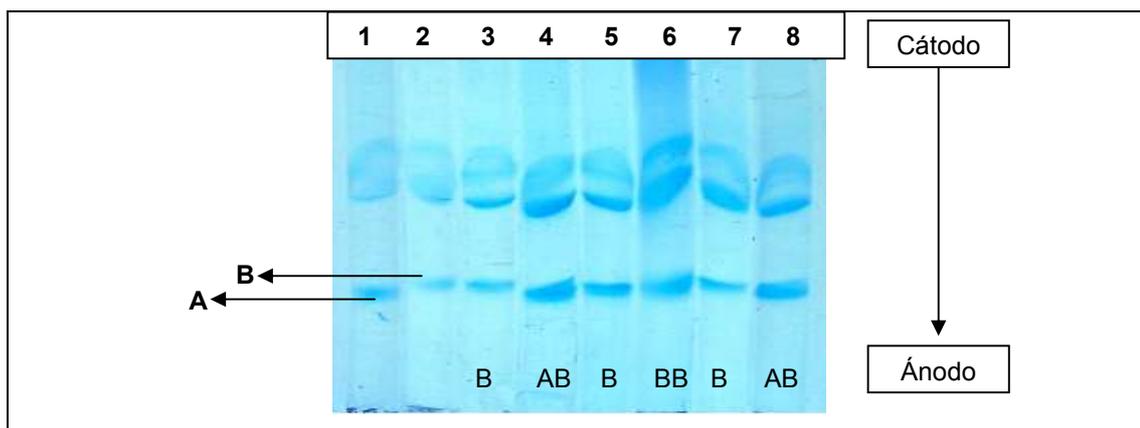
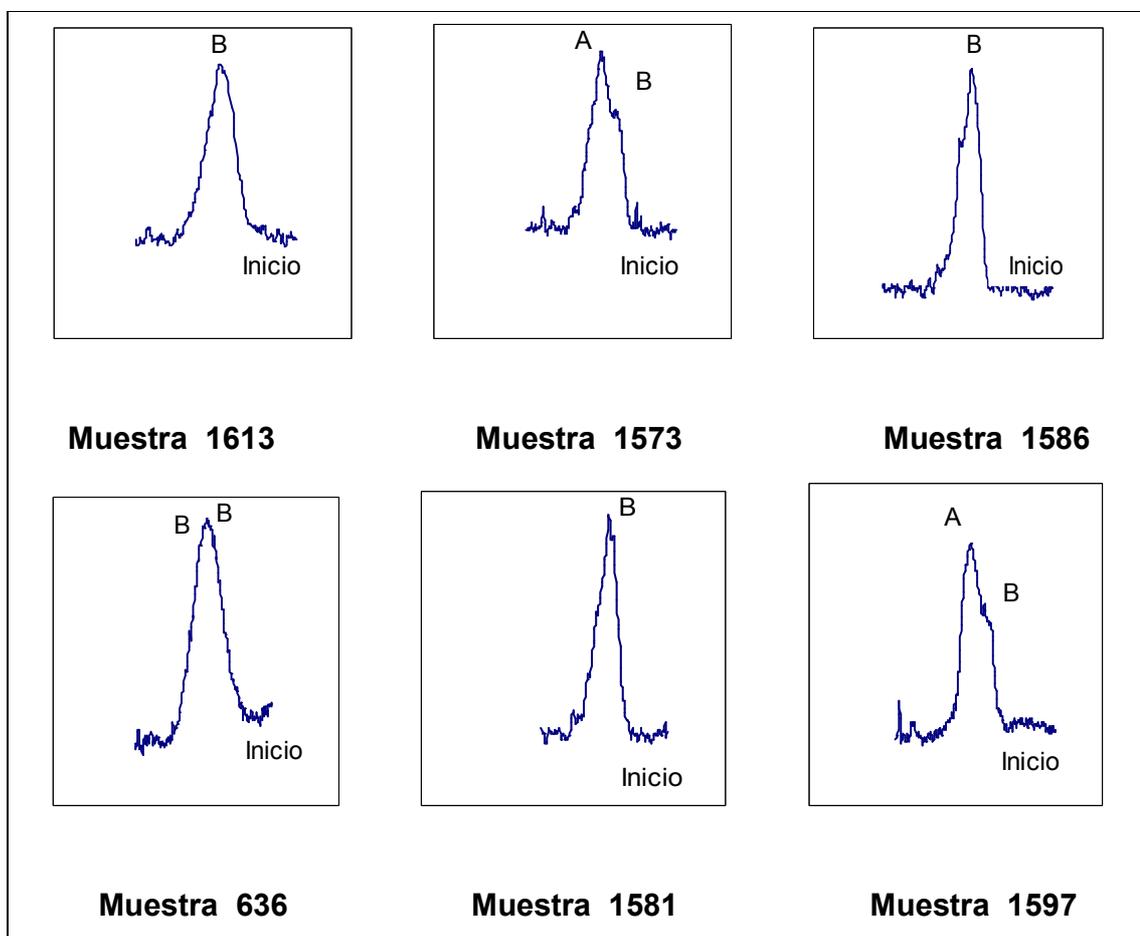


Foto 4 Electroforesis de isoenfoque para las variantes de B-Ig en muestras de leche de vacas Frisón Negro

Donde:

- 1) Estándar A B-Ig ; 2). Estándar B B-Ig; 3). 1613; 4). 1573; 5)1586; 6)636; 7)1581; 8)1597