

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

**Relación entre las Variantes Genéticas de  $\kappa$ -Caseína con el contenido de Proteína, Calcio, Fósforo y Estabilidad Térmica en leche de vacas Frisón Negro. Época de Invierno.**

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

**Marisel Andrea Urrutia Sánchez**

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**

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

---

Sra. Irma Molina V.  
Prof. Matemáticas y Física, M. en Estadística  
Instituto de Estadística  
Facultad de Ciencias Económicas y Administrativas.

---

*Con amor a mi pequeña Constanza...*

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a Dios y a mis padres Miguel y Sonia por su cariño, paciencia y apoyo durante estos años de estudio, que sin duda sin ellos no habría logrado cumplir esta importante meta.

Agradezco en forma especial a la Sra. Luz Haydeé Molina, por su constante dedicación, apoyo, paciencia y amistad brindada durante mis años de estudio y en transcurso de esta tesis.

A mi querido Alejandro, debido a su apoyo, comprensión y amor durante mis años universitarios.

En especial a Mabel y Yasna por su amistad incondicional, gracias de corazón nunca pensé que encontraría unas amigas tan maravillosas durante mi vida universitaria, ojala perdure por siempre.

A todos los que de una u otra forma contribuyeron a la realización de esta tesis, en especial a Don José y Otto, por su gran disponibilidad y ayuda.

Al proyecto FONDECYT 1030345 (2003 – 2005), por el financiamiento otorgado para la realización de esta tesis.

## INDICE DE MATERIA

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Características del ganado Frisón Negro	3
2.2	Composición de la leche	4
2.3	Proteínas de la leche	4
2.3.1	Micelas de caseína	6
2.3.2	Características de la $\kappa$ -caseína	7
2.3.3	Proteínas del suero	8
2.4	Polimorfismo genético de las proteínas de la leche	9
2.5	Influencia del polimorfismo genético de las proteínas de la leche en la producción, composición y propiedades tecnológicas de la leche	11
2.6	Minerales en la leche	12
2.6.1	Calcio	15
2.6.2	Fósforo	15
2.7	Estabilidad térmica de la leche	16
3	MATERIAL Y MÉTODO	18
3.1	Materiales	18
3.1.1	Obtención de las muestras	18
3.1.2	Desarrollo del ensayo	18
3.1.3	Diseño experimental	18
3.2	Metodología de análisis	19
3.2.1	Determinación de proteína total	19
3.2.2	Determinación de calcio	19

3.2.3	Determinación de fósforo total	19
3.2.4	Determinación de la termoestabilidad de la leche	20
3.2.5	Determinación de las variantes genéticas de $\kappa$ -caseína	20
3.2.6	Análisis estadístico	21
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	22
4.1	Contenido de proteína total	22
4.2	Contenido de calcio	24
4.3	Contenido de fósforo	26
4.4	Estabilidad térmica de la leche	27
4.5	Variantes genéticas de $\kappa$ - caseína identificadas por electroforesis de isoenfoque	29
4.6	Variantes genéticas de $\kappa$ - caseína y su relación con el contenido de proteína total, calcio, fósforo y estabilidad térmica de la leche	30
4.6.1	Contenido de proteína	31
4.6.2	Contenido de calcio	32
4.6.3	Contenido fósforo	33
4.6.4	Estabilidad térmica de la leche	34
4.7	Producción de leche	34
4.8	Análisis de la leche mezcla	36
4.9	Análisis de correlación entre las variables estudiadas	37
5	CONCLUSIONES	38
6	RESUMEN	39
	SUMMARY	40
7	BIBLIOGRAFÍA	41



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Frecuencia genotípica y alélica de $\kappa$ - caseína (%)	3
2	Porcentaje de proteína en la leche de diferentes razas bovinas	5
3	Frecuencia de los genes que determinan la biosíntesis de las proteínas de la leche en diferentes razas bovinas (expresadas en %)	10
4	Concentración de los principales minerales de la leche	13
5	Composición promedio del contenido de minerales en la leche de vacas de la provincia de Valdivia	14
6	Diseño experimental	19
7	Valor promedio y desviación estándar del contenido proteico de las muestras de leche de vacas individuales por muestreo	22
8	Valor promedio y desviación estándar del contenido de calcio para las muestras de leche de vacas individuales por muestreo.	24
9	Valor promedio y desviación estándar del contenido de fósforo para las muestras de leche de vacas individuales por muestreo.	26
10	Valor promedio y desviación estándar de la estabilidad térmica de las muestras de leche por muestreo	27
11	Proporción y Variantes genéticas identificadas en cada muestra de leche.	30
12	Promedio y desviación estándar del contenido de proteína, calcio, fósforo y estabilidad térmica para las variantes genéticas de $\kappa$ – caseína	31



13	Contenido de calcio en las muestras de leche según variantes genéticas	33
14	Producción de leche durante los cuatro muestreos (L)	35
15	Promedio y desviación estándar de la producción de leche de vacas Frisón Negro	35
16	Promedio y desviación estándar de la producción de leche para las variantes genéticas de $\kappa$ – caseína	36
17	Valor promedio ponderado y experimental para las respuestas estudiadas en la leche mezcla.	36
18	Análisis de correlación entre las variables estudiadas	37

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Caracterización de las vacas en estudio	53
2	Semipurificación de $\kappa$ - caseína de acuerdo al método de McKENZIE y WAKE (1961)	54
3	Electroforesis de isoenfoque en geles de poliacrilamida	55
4	Valores obtenidos de pH, termoestabilidad, contenido de proteína total, calcio, fósforo en los diferentes muestreos	56
5	Ecuaciones obtenidas a partir de las curvas de calibración, para la determinación del contenido de fósforo en cada muestreo	60
6	Volumen de muestra utilizada para las electroforesis a partir de las preparaciones de $\kappa$ – caseína semipurificadas	61
7	Bandas electroforéticas obtenidas para cada muestra en estudio, además de los estándares utilizados	63
8	Distancia de migración de las bandas de $\kappa$ – caseína en cada electroforesis	64
9	Densitometrías de $\kappa$ – caseína en las muestras de leche realizadas con el programa UNSCANIT	66
10	Resultados obtenidos según análisis estadístico	67

## 1. INTRODUCCIÓN

El consumo de leche y productos lácteos es masivo en la actualidad, y constituye una parte fundamental en la alimentación de la humanidad. Es por ello que la ciencia en los últimos años, apoyada en la tecnología, se ha dedicado al estudio de dichos productos, lo cual ha permitido obtener mejores rendimientos.

Existe una clara determinación a estimular el mejoramiento de la composición de la leche, especialmente en el ámbito de las proteínas, por ser un componente de alto valor nutritivo y de importancia en las propiedades tecnológicas de la leche.

Las proteínas de la leche son de alta calidad, y se dividen en dos grandes grupos: la caseína que representan aproximadamente el 80% del total, y las proteínas del suero que constituyen el 20% restante. Individualmente cada una de estas proteínas posee una conformación genética diferente, como resultado de la sustitución de uno o más aminoácidos en su estructura primaria.

En diversos estudios se ha mencionado que las variantes genéticas de las proteínas lácteas tienen efectos importantes sobre las propiedades tecnológicas de la leche, especialmente en la fabricación quesera.

En el presente trabajo se plantea como hipótesis que la leche con la variante genética B de  $\kappa$ -CN, tiene una mayor estabilidad térmica y también un alto contenido de proteína total, calcio y fósforo.

El objetivo general de este estudio es identificar las variantes genéticas de  $\kappa$ -caseína de leche de 10 vacas Frisón Negro por electroforesis de isoenfoco y relacionarlas con el contenido de proteínas, minerales y la estabilidad térmica de la leche.

Objetivos específicos del estudio:

- Identificar las variantes genéticas de  $\kappa$ -caseína por electroforesis de isoenfoque en las muestras de leche.
- Determinar el contenido de proteína total, calcio y fósforo en las muestras de leche.
- Evaluar la estabilidad térmica en las muestras de leche.
- Relacionar el efecto de la expresión de las variantes genéticas de la  $\kappa$ -caseína con los parámetros analizados.
- Evaluar si existen diferencias estadísticas en las variables analizadas, considerando muestreo y expresión de la variante genética.
- Analizar la influencia de las variantes de  $\kappa$  - CN sobre la producción de leche.
- Relacionar la estabilidad térmica de la leche con el pH, contenido proteico y mineral.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Características del ganado Frisón Negro

La raza Frisón Negro Chileno (Overo Negro), se introdujo al sur de Chile, a principios del siglo pasado, con importaciones de Alemania y Holanda. Esta raza con grados variables de sangre Holstein, se encuentra principalmente en la décima región, y también, en la categoría de pequeños productores en la novena región, más al norte representa aproximadamente el 25% de las vacas de los productores pequeños. Su alimentación se basa principalmente en heno y ensilaje de praderas, con porcentajes variables de alimentos concentrados, dependiendo del potencial lechero de las vacas (EHREFENFELD, 1991; ANRIQUE *et al.*, 2004).

El ganado Frisón Negro Chileno tiene una baja producción de leche y grasa en comparación al ganado Frisón Neozelandés y Holstein Americano, según una investigación realizada en la décima región por GONZALEZ *et al.* (2002).

**CUADRO 1 Frecuencia genotípica y alélica de  $\kappa$ - caseína (%).**

Raza	AA	BB	AB	A	B	Nº de animales
Holstein (USA)	81,3	3,1	15,6	89,1	10,9	32
Frisón Negro Danés	73,5	3,6	22,9	85,0	15,0	223
Frisón Negro Chileno	65,8	1,1	33,1	82,4	17,6	278

FUENTE: FELMER y BUTENDIECK (1998).

En el CUADRO 1 se observan los resultados obtenidos en un estudio realizado por FELMER y BUTENDIECK (1998), sobre la frecuencia alélica y genotípica de  $\kappa$ - caseína, en ganado Frisón Negro Chileno en comparación al ganado Frisón Negro Danés y Holstein, determinaron que los rebaños estudiados presentan mayor frecuencia alélica de  $\kappa$ -caseína AA.

## 2.2 Composición de la leche

La leche es un fluido producto de la ordeña de vacas sanas, bien alimentadas y en reposo, de composición y estructura compleja. Es un sistema coloidal donde la materia grasa se encuentra en emulsión, las proteínas constituyen una suspensión, mientras que los restantes componentes (lactosa, otras sustancias nitrogenadas, minerales, etc) forman parte de una solución. (ALAIS, 1985; AMIOT, 1991; PRIMO, 1997; FOX y McSWEENEY, 1998; CHILE, MINISTERIO DE SALUD, 2001)

ALAIS (1985); FOX y McSWEENEY (1998); WALSTRA *et al.* (2001), tras diversos estudios han señalado que la variabilidad natural en la composición y propiedades de la leche, se deben a numerosos factores, destacándose principalmente:

- De tipo ambiental y de manejo (alimentación, época del año, temperatura ambiente, sistema de ordeña),
- Fisiológicos (evolución durante el ciclo de lactación, edad de la vaca, número de lactaciones y gestación),
- Estados patológicos (mastitis) y genéticos (variaciones raciales e individuales, herencia de los componentes, efectos de la selección)

WALSTRA *et al.* (2001), además indican que la llegada de compuestos extraños, ya sea desde la propia vaca o después de la ordeña, tales como, pesticidas, antibióticos u otros contaminantes, producen un incremento en la variabilidad.

PINTO *et al.* (1998), señalan que el contenido promedio de materia grasa, proteína y lactosa en leche cruda fue de  $3,53 \pm 0,02$ ,  $3,51 \pm 0,01$  y  $4,91 \pm 0,02$  respectivamente, según un estudio realizado a nivel de silos de plantas lecheras de la VIII, IX y X regiones del país.

### 2.3 Proteínas de la leche

Las proteínas son polímeros de pesos moleculares elevados, que oscilan entre 10.000 y varios millones. Compuesta por aminoácidos. Todas sus propiedades nutritivas y sus características físicas y químicas dependen completamente del tipo, de la concentración y de la secuencia de unión de los aminoácidos constituyentes (BADUI, 1999; COULTATE, 1998).

El orden de los aminoácidos en una proteína, se determina por el código genético, y le otorga a la proteína una conformación única. Posteriormente, la conformación espacial de la proteína le otorga su función específica. La concentración de proteína en la leche varía de 3.0 a 4.0% (30-40 gramos por litro). El porcentaje varía con la raza de la vaca, como se puede observar en el CUADRO 2 (WATTIAUX, 2005).

**CUADRO 2 Porcentaje de proteína en la leche de diferentes razas bovinas.**

Raza	Proteína (%)	Referencia
Holstein	3,0	Jennes (1985)
Holstein	3,7	Sharaby (1988)
Holstein	2,8	Nagel and Broderick 1992)
Holstein	3,0	Rodríguez <i>et al.</i> (1997a)
Holstein	2,9	Rodríguez <i>et al.</i> (1997b)
Jersey	3,6	Jenness (1985)
Jersey	4,5	Sharaby (1988)
Jersey	3,7	Rodríguez <i>et al.</i> (1997a)
Jersey	4,5	Rodríguez <i>et al.</i> (1997b)
Lecheras*	3,2	Mondragón <i>et al.</i> (1983)
Guernsey	3,5	Jenness (1985)
Ayrshire	3,3	Jenness (1985)
Brown Swiss	3,2	Jenness (1985)

\* = Pardo Suizo, Holstein y sus cruas.

FUENTE: VELAZQUEZ (2000), modificado.

En el CUADRO 2 se observa el efecto de la [genética](#) en la composición de la leche. Se puede observar que no sólo existe una gran variación entre razas,

sino que además varía bastante entre individuos dentro de una misma raza. Además, existen otros factores que afectan en menor o mayor grado la composición proteica tales como: factores fisiológicos, alimentarios climáticos, genéticos y factores zootécnicos (ALAIS, 1985).

La leche es un buen alimento debido a la alta calidad de sus proteínas, las cuales, para su estudio se han dividido en dos grandes grupos de acuerdo a su estado de dispersión: las caseínas (80%) y las proteínas del suero (20%) (BADUI, 1999).

**2.3.1 Micelas de caseína.** Las micelas de caseína están constituidas por agua, proteínas y sales. La proteína es la caseína. La caseína está en forma de caseinato, lo que implica que une cationes, fundamentalmente de calcio y magnesio. El resto de las sales de las caseínas están en forma de fosfato cálcico, y también contienen una pequeña cantidad de citrato. Estas sales suelen llamarse fosfato cálcico coloidal y al conjunto se le denomina complejo caseinato – cálcico / fosfato – cálcico (WALSTRA *et al.*, 2001).

Las caseínas son un complejo de fosfoproteína y glicoproteína que están en forma de suspensión coloidal, en micelas estabilizadas, que precipitan por acidificación en su punto isoeléctrico (pH 4,6). Son hidrofóbicas; poseen una carga bastante elevada, así como también, muchos residuos de prolina y pocos de cistina (ALAIS, 1985; AMIOT, 1991; PRIMO, 1997; BADUI, 1999).

(GONZALEZ DE LLANO, 1990; FENNEMA, 1993; FOX y McSWEENEY, 1998; WALSTRA *et al.*, 2001), las micelas de caseína se caracterizan por ser:

- ✓ Altamente hidratadas.
- ✓ Contienen 6,6% de material inorgánico, el cual está constituido principalmente de fosfato cálcico.
- ✓ Varían de tamaño desde 30 a 300 nm de diámetro, cada micela está constituida por  $10^4$  moléculas de caseína.
- ✓ Son insolubles en el punto isoeléctrico.



- ✓ Coagulan por acción de las proteasas y son muy estables a altas temperaturas.

Además se caracterizan por ser las principales responsables de la estabilidad física de los productos lácteos, ya sea, durante un tratamiento térmico, en el proceso de concentración y/o durante el almacenamiento (WALSTRA *et al.*, 2001). Una práctica que impacta sobre la estabilidad de las micelas caseínicas, es la refrigeración de la leche en silos, ya que, puede incrementar la cantidad de fracciones proteicas disociadas y hacerlas más susceptibles a la proteólisis y favorece el desarrollo de bacterias psicrótrofas responsables de la aparición de proteasas termorresistentes. Esto puede dar origen a inconvenientes durante el tratamiento térmico y defectos en los productos elaborados como la aparición de sabores amargos y fenómenos de gelificación en leches larga vida (ALLOCATY y MUSET, 2000).

Las micelas de caseínas están constituidas por cuatro familias de polipéptidos:  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ - caseínas, las cuales representan un 38%, 10%, 35% y un 15% respectivamente. Las caseínas se diferencian principalmente por (GONZALEZ DE LLANO, 1990; HAVRANECK *et al.*, 1993; CREAMER y HARRIS, 1997; FELMER y BUTENDIEK, 1998):

- ✓ Número de aminoácidos de la cadena polipeptídica
- ✓ Peso molecular
- ✓ Punto isoeléctrico
- ✓ Estabilidad frente al ión calcio
- ✓ Poseer diferentes variantes alélicas que son el resultado de la sustitución de uno o más aminoácidos

**2.3.2 Características de la  $\kappa$  - caseína.** Representa el 15% de las caseínas es muy distinta al resto de las caseínas, ya que, sólo contiene dos residuos de cisteína capaces de formar puentes disulfuro intermoleculares. Ocupa una posición excepcional, a pesar de encontrarse en pequeña proporción, es soluble y es insensible a la precipitación por el ión calcio en un amplio rango de

temperatura. Por lo cual, posee un poder estabilizante frente al calcio en comparación a las demás caseínas, debido a su estructura y estabilidad micelar. Tiene el papel de coloide protector, permite la formación de micelas estables en presencia de calcio (ALAIS, 1985; WALSTRA *et al.*, 2001).

Además la  $\kappa$  - caseína se diferencia de las demás caseínas por presentar una menor proporción de los grupos fosfato asociados y, por su baja tendencia a precipitarse en presencia de iones calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ), como se mencionó anteriormente. De acuerdo, a su solubilidad, está compuesta de dos regiones: una se caracteriza por la presencia de residuos hidrófobos, y la otra con una marcada naturaleza hidrofílica (LÓPEZ y VÁSQUEZ, 2004).

La  $\kappa$ - caseína juega un importante rol en la química de la leche, ya que, es esencial en la formación y estabilización de las micelas de caseína, por ello dependen de la presencia de ella en la superficie de la micela, donde existe una interfase entre la caseína hidrofóbica de la micela interior y aquella que está en contacto con el ambiente (CREAMER y HARRIS, 1997; LAWRENCE *et al.*, 1998).

La estructura primaria de la  $\kappa$  - caseína consta de 169 aminoácidos y un grupo fosfato, presenta cuatro variantes genéticas A, B, C y E siendo las variantes A y B las más estudiadas, dado que se encuentran en la mayoría de las razas bovinas. Mediante el análisis de las secuencias de aminoácidos de las proteínas y de nucleótidos de las variantes génicas que las codifican, se han podido establecer los polimorfismos de: el alelo A, que tiene treonina en la posición 136 y aspartato en la posición 148, mientras que la variante B, presenta isoleucina y alanina en las posiciones antes mencionadas (EIGEL *et al.*, 1984; GONZALEZ DE LLANO, 1990; FELMER y BUTENDIEK, 1998; LÓPEZ y VÁSQUEZ, 2004; NG – KWAI – HANG, 1997). De acuerdo a ROBINSON (1991), la  $\kappa$  - caseína difiere de las demás caseínas en que sólo contiene un residuo fosfoserina y, además, tiene un resto de oligosacárido.

**2.3.3 Proteínas del suero.** Se caracterizan por ser compactas, globulares, con un peso molecular entre 14.000 y 1.000.000 dalton; solubles en un amplio intervalo de pH, tienen un interés considerable por su elevado valor nutritivo, están compuestas de a lo menos ocho diferentes fracciones, siendo las principales la  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina, seroalbúmina e inmunoglobulina, las cuales representan aproximadamente un 50, 20 y 10% del total de las proteínas del suero. Son relativamente lábiles a las altas temperaturas, no precipitan cuando la leche debe ser ajustada a pH 4,6, ya que, permanecen en el suero (BADUI, 1999; ALAIS, 1985; FOX y McSWEENEY, 1998).

#### **2.4 Polimorfismo genético de las proteínas de la leche**

El término polimorfismo proteico es utilizado para indicar las múltiples formas que una determinada proteína puede presentar. Cuando este polimorfismo obedece a causas hereditarias se denomina polimorfismo genético, el cual está constituido por un conjunto de variantes genéticas (ESCODA *et al.*, 1983).

Las principales proteínas de la leche se presentan bajo 2, 3, 4 o 5 formas genéticas. Las variantes genéticas se designan por las letras A, B, C. Existen individuos homocigotos con una sola variante: AA, BB, CC; por el contrario, la leche de los individuos heterocigotos contienen una mezcla de dos variantes: AB, AC, BC (ALAIS, 1985).

HAVRANEK *et al.* (1993), AALTONEN y ANTILA (1987) y MAYER *et al.* (1997) indican que la presencia de las variantes genéticas y su frecuencia son características de la población bovina. Algunas variantes se presentan en todas las razas bovinas, mientras que otras se encuentran sólo en algunas de ellas. Ciertas variantes genéticas están asociadas a mejorar la producción, composición y aptitud de coagulación de la leche.

Es así como, en un estudio realizado por FELMER y BUTENDIECK (1998), encontraron que la variante A de  $\kappa$ -caseína predominaba en el ganado Frisón

Negro Chileno, con una frecuencia de 82,4%, predominando igualmente en razas Holstein y Ayshire, mientras que el alelo B en raza Jersey presenta una frecuencia de 89% (MEDRANO y SHARROW, 1989).

En un estudio realizado a 278 vacas Holstein por TSIARAS *et al.* (2005), encontraron una frecuencia para los genotipos AA y AB de  $\kappa$ -caseína de 89 y 11%, respectivamente.

ALAIS (1985), señala que el gen A de la  $\beta$  - caseína es el único encontrado en la raza bovina Shorthorn y Ayshire, su frecuencia llega a valores superiores al 90% en razas Frisona y de Flandes; el tipo C, sólo o mezclado, se ha encontrado en algunas razas. Los alelos A y B de la  $\kappa$ -caseína son los más comunes, se pueden encontrar en la mayoría de las razas bovinas en proporciones variables (LÓPEZ y VÁSQUEZ, 2004).

En general la frecuencia de genes varía según la raza bovina como se puede observar en el CUADRO 3.

**CUADRO 3 Frecuencia de los genes que determinan la biosíntesis de las proteínas de la leche en diferentes razas bovinas (expresadas en %).**

	Caseínas						$\beta$ - lactoglobulina		
	$\alpha_{s1}$		$\beta$			$\kappa$		A	B
Razas Bovinas	B	C	A	B	C	A	B	A	B
Normanda	82	18	54	45	1,0	34	66		
Frisona (Holanda)	99	1,0	93	7,0	-	66	34		
Frisona (U.S.A)	87	8,0	98	2,0	-	85	15	50	50
Montbeliarda	91	9,0	79	19	2,0			52	46
Flamenca	87	9,0	94	6,0	-				
Jersey	60-90	40-10	60	40	-	10-50	90-50	40	55
Ayshire	100	-	100	-	-	80	20	30	70
Shorthorn	99	1,0	100	-	-			11	89

FUENTE: ALAIS (1985) (modificado).

## **2.5 Influencia del polimorfismo genético de las proteínas de la leche en la producción, composición y propiedades tecnológicas de la leche**

En diferentes estudios se menciona que las variantes genéticas de las proteínas lácteas tienen efectos importantes sobre las propiedades tecnológicas de la leche, especialmente en la fabricación quesera. En éste aspecto, se señala que el fenotipo BB de  $\kappa$ - caseína presenta mayores porcentajes de proteínas, mejores propiedades de coagulación, mejores efectos sobre la sinéresis del queso y, en consecuencia, el rendimiento quesero aumenta entre un 5 a 10 % (RAHALI y MENARD, 1991; FELMER y BUTENDIECK, 1998; VIANA *et al.*, 2001).

STRZALKOWSKA *et al.* (2002), señalan que la producción y la composición de la leche son características que son afectadas por factores ambientales y de variación genética. La  $\kappa$ -caseína y la  $\beta$  – lactoglobulina son proteínas expresadas en la leche, y debido a su polimorfismo, pueden servir como información de marcadores moleculares para la producción, composición y propiedades tecnológicas de la leche.

PEREZ – RODRIGUEZ *et al.* (1998), señalan que la combinación de las variantes A de  $\beta$  – lactoglobulina, y B de  $\beta$  y  $\kappa$  – caseína mejoran la producción de la leche, mientras que la combinación de dichas proteínas, que presenten la variante B, sería más favorable en términos de contenido de caseína. A su vez, BOBE (2004), tras un estudio con 592 muestras individuales, provenientes de 233 vacas Holstein Friesian, demostró que las vacas con el genotipo BB de  $\kappa$  – caseína y BB de  $\beta$  – lactoglobulina producen leche con una composición proteica favorable para aumentar la producción de queso.

En un estudio realizado por FITZGERALD *et al.* (1999), se mostró que en la distribución del fenotipo de  $\kappa$  – caseína la variante BB era muy baja 1,98% comparados a 53,07% para la  $\kappa$  – caseína AA y 44,95% para la  $\kappa$  – caseína AB en leche proveniente de 6007 vacas individuales de raza Irish Holstein-Friesian.

El alelo B de  $\kappa$  – caseína se ha destacado por su favorable y significativo efecto, tanto sobre el contenido de proteína en la leche, como en la relación entre el contenido de proteína y las propiedades tecnológicas de la leche. Además, contiene una mayor proporción de  $\kappa$  – caseína, respecto de la variante A de  $\kappa$  – caseína (MARIANI y SUMMER, 1999; STRZALKOWSKA *et al.*, 2002).

VAN EENEMAN y MEDRANO (1991); FITZGERALD *et al.* (1999); LÓPEZ y VÁSQUEZ (2004), señalan que el uso de leche proveniente de vacas con genotipo BB de  $\kappa$  – caseína presentan un rendimiento superior en la producción de queso, ya que, produce un corto tiempo de coagulación, una cuajada más firme y aporta características especiales al queso, en comparación a quesos fabricados a partir de leche derivada de vacas con genotipo AA o AB de k-caseína. Sin embargo, el fenotipo AA de  $\kappa$  – caseína, esta asociada con una alta producción de leche (NG – KWAI – HANG, 1997).

De acuerdo a RON *et al.* (1994), la k-caseína está asociada con el tiempo de coagulación de la leche, además, un alto contenido de proteína se ha encontrado en leche donde se encuentra presente la variante BB de k-caseína, mientras que las leches con variante AB de k-caseína se relaciona con el contenido de grasa de la leche.

## **2.6 Minerales en la leche**

Son una fracción pequeña en relación con los constituyentes principales de la leche, ya que, contiene aproximadamente 7,3 g de minerales por litro. Se dividen en macrominerales (calcio, fósforo, magnesio, sodio, potasio y cloro) y elementos trazas (yodo, cobalto, hierro, molibdato, zinc, cobre y manganeso) (RENNER, 1983; Anderson citado por VERA, 2000).

De acuerdo a WALSTRA *et al.* (2001), de los elementos trazas encontrados en la leche el que está en mayor concentración es el zinc, cuyo contenido es de aproximadamente 3 mg / kg, los restantes elementos están en cantidades muy inferiores.

En la leche, los minerales se pueden presentar en dos fases, una acuosa donde se encuentran disueltos, conjuntamente compuestos nitrogenados solubles, sales minerales u orgánicas donde los constituyentes más importantes son los cloruros, además de los fosfatos solubles y citratos, Mg, Na y trazas de Fe y parte del calcio (33% del calcio total aproximado), mientras que en la fase coloidal se encuentran en suspensión micelas de caseína insolubles que contienen cerca de un 20% de calcio y fósforo unidos a su estructura, además de sales compuestas de fosfato de calcio coloidal, citratos y magnesio, los cuales le dan mayor estabilidad a las micelas (RENNER, 1983; CASADO Y GARCIA, 1985; BELITZ y GROSCH, 1997; CLOSA *et al.*, 2003).

En el CUADRO 4 se señalan las principales concentraciones de sales presentes en la leche y el estado en el que se encuentran.

CUADRO 4 Concentración de los principales minerales de la leche.

Concentración (mg /100 g)			
Componente	Total	Coloidal	Soluble
Calcio	117,7	81,1	36,6
Magnesio	12,1	4,3	7,8
Citrato	176,0	19,0	158,0
Fósforo	95,1	50,8	44,2
Sodio	58,0	54,5	3,5
Potasio	140,0	10,0	130,0
Cloruro	104,0	0	104,5

FUENTE: BADUI (1999).

La composición mineral de la leche varía en función de numerosos factores, principalmente respecto de aquellos de carácter fisiológico, de alimentación, genéticos y climáticos, entre otros, siendo, muy difícil identificar el factor principal (ALAIS, 1985; PINTO *et al.*, 1986; FOX, 1997).

Los minerales cumplen un importante rol en la nutrición porque aunque no proporcionan energía son esenciales para la utilización y síntesis biológica de nutrientes esenciales. En muchos casos existen problemas de deficiencia de uno o más minerales. Este tipo de deficiencia podría causar pérdidas

importantes en producción de leche debido a que cumplen un rol importante en la síntesis de leche, metabolismo y salud en general. Diversos estudios señalan que la deficiencia de fósforo reduce la producción de leche y la eficiencia de la utilización de los alimentos (CEBALLOS *et al.*, 2004; GARCIA y PICONE, 2004, GOMEZ y FERNANDEZ, 2002).

La presencia de mastitis afecta el contenido de minerales, causando efectos tales como, una disminución del calcio total y un aumento en cloruros y sodio, afectando directamente la calidad de la leche (ALAIS, 1985; Auldish y Hubble citados por MOLINA *et al.*, 2001).

La etapa de lactancia es importante en el contenido de minerales de la leche. Se producen grandes cambios al inicio y término del período de lactancia. Los contenidos de Ca y P de la leche descienden durante las primeras cinco semanas de lactancia, para aumentar en las últimas (GRAVERT, 1987; BADUI, 1999).

**CUADRO 5 Composición promedio del contenido de minerales en la leche de vaca de la provincia de Valdivia.**

Componente	Valores promedio (g/l)
Sodio	0,341 ± 0,174
Potasio	1,536 ± 0,110
Calcio	0,959 ± 0,127
Fósforo	0,414 ± 0,147

FUENTE: PINTO *et al.* (1986)

En el CUADRO 5, se presenta la composición mineral promedio de leche mezcla en la provincia de Valdivia, según un estudio que fue realizado durante el período de primavera – verano (PINTO *et al.*, 1986).

**2.6.1 Calcio.** Aproximadamente el 99% del total de calcio en el cuerpo se encuentra en huesos y dientes. El 1% restante de calcio interviene en un gran número de transformaciones y mecanismos, como son la coagulación de la



sangre, contracción muscular, activación enzimática, transmisión de impulsos nerviosos, permeabilidad celular, secreción de ciertas hormonas, acción cardíaca, entre otras. La deficiencia de calcio reduce el crecimiento y la producción de leche (BADUI, 1999 y FAHEY, 1994).

De acuerdo a FOX (1997), la concentración de calcio en la leche es muy elevada en el calostro y cuando la lactancia se encuentra en su etapa final.

El calcio total en la leche corresponde al 1,3 %, el cual se encuentra distribuido en diversas formas, tales como: calcio ligado a la caseína (0,27 %), fosfato tricálcico (0,6%), sales de calcio no ionizadas (0,28%) y  $\text{Ca}^{++}$  ionizado (0,15%) (ALAIS, 1985).

Aproximadamente un 69% del calcio total de la leche existe en estado coloidal asociado a las caseínas, y el resto, en forma iónica en solución. Existe un equilibrio entre éstas dos formas de calcio que depende, del pH y de la temperatura del sistema. En condiciones ácidas hay un desplazamiento del Ca coloidal al soluble que incrementa la inestabilidad de las proteínas, mientras que a temperaturas elevadas se favorece la formación de calcio coloidal (ALAIS, 1985; BADUI, 1999).

**2.6.2 Fósforo.** En el cuerpo del animal, un 80% del fósforo se encuentra en el esqueleto. El papel más importante del fósforo es ser integrante fundamental de huesos y dientes. Otras funciones biológicas del fósforo son: fosforilación de la glucosa, transporte y utilización de la energía, formación de ATP (BADUI, 1999; GARCIA y PICONE, 2004).

El fósforo total representa el 1% de la composición mineral de la leche, el cual está distribuido como fosfato tricálcico (0,3%), fosfatos en solución (0,34%), fosfoserina de la caseína (0,19%), además se encuentra en pequeñas cantidades de combinaciones orgánico-fosforadas, como son las lecitinas, ésteres hexosafosfóricos, nucleótidos y un complejo vitamínico con riboflavina (0,17%) (ALAIS, 1985).

## 2.7 Estabilidad térmica de la leche

SINGH (2004), indica que la estabilidad térmica de la leche es la capacidad de ésta para soportar altas temperaturas en un proceso, sin coagulación visible o gelación.

El calentamiento es uno de los tratamientos a que se someten la leche y los productos lácteos, el cual tiene como finalidad mejorar la calidad higiénica y su conservación, por destrucción de bacterias y enzimas, o bien conseguir alguna otra modificación, especialmente de tipo químico. Los efectos dependen principalmente de la intensidad del calentamiento, es decir, se debe cuidar la combinación temperatura – tiempo de tratamiento (ALAIS, 1985 y WALSTRA *et al.*, 2001).

O`CONNEL y FOX (2000), sostienen que la estabilidad térmica de la leche aumenta notablemente en un rango de pH de 6,4 a 7,1.

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

La estabilidad térmica de los productos lácteos depende de la relación de concentración de las sales de la leche, de tal forma que los iones de calcio y magnesio tienden a inestabilizar el sistema proteico, ya que, un aumento de ellos causa agregación de las partículas, y una disminución provoca una dispersión en las partículas de menor tamaño; mientras que los citratos y el fósforo lo estabilizan, dado que actúan en forma opuesta a los iones de calcio y magnesio, porque forman complejos que no se disocian con calcio y magnesio, disminuyendo la concentración eficaz de éstos iones (BADUI, 1999; WALSTRA *et al.*, 1999). SINGH (2004), señala que la concentración de calcio iónico y magnesio disminuyen la estabilidad en todos los rangos de pH.

### 3. MATERIAL Y MÉTODO

#### 3.1 Materiales

**3.1.1 Obtención de las muestras.** Las muestras de leche se obtuvieron de diez vacas individuales de raza Frisón Negro, del Fundo Santa Rosa de la Universidad Austral de Chile, de acuerdo a la Norma Chilena N.Ch. 1011/1 (CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN, 1998).

**Las diez vacas Frisón Negro fueron seleccionadas según características similares: segunda lactancia, libre de mastitis, información de la progenie y sometidas a una dieta de alimentación similar (ANEXO 1).**

Se realizaron 4 muestreos durante la temporada de invierno, entre los meses de julio y septiembre del año 2003. Cabe señalar que durante cada muestreo se efectuó el Test California Mastitis, con el fin de verificar el estado sanitario de las vacas en estudio. Las fechas de cada muestreo fueron las siguientes:

Muestreo N° 1: 21 de Julio

Muestreo N° 2: 11 de Agosto

Muestreo N° 3: 8 de Septiembre

Muestreo N° 4: 22 de Septiembre

**3.1.2 Desarrollo del ensayo.** Los análisis de las muestras se llevaron a cabo en el Laboratorio de Química del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad Austral de Chile.

**3.1.3 Diseño experimental.** En el CUADRO 6 se presenta el diseño experimental que se llevó a cabo en el presente estudio. Además, en cada muestreo se preparó una leche mezcla perteneciente a la producción de leche

de cada vaca en estudio. Cabe destacar que se realizaron cuatro muestreos durante la época de invierno.

**CUADRO 6** Diseño experimental.

Vacas	Factores	VARIABLES
Leche de 10 Vacas Individuales	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Muestreos</li> <li>➤ Expresión de <math>\kappa</math>-CN (A ó B)</li> </ul>	Proteína Total Contenido de Calcio Contenido de Fósforo Termoestabilidad

### 3.2 Metodología de análisis

**3.2.1 Determinación de proteína total.** La cuantificación de proteína total se realizó de acuerdo al método Semi Micro Kjeldahl IDF/FIL 20B: 1993, basado en el principio de digestión de la muestra de leche, a través de la adición de ácido sulfúrico, peróxido de hidrógeno y sulfato de potasio, junto con un catalizador para convertir el nitrógeno orgánico presente en sulfato de amonio. Con la adición de un exceso de hidróxido de sodio se realizó la destilación del amonio, luego el destilado que ha sido recogido en una solución de ácido bórico se titula con ácido sulfúrico. El contenido de nitrógeno de la leche, se determina a partir del amonio producido.

**3.2.2 Determinación de calcio.** Se utilizó el método complexométrico, basado en la retrotitulación con una solución estándar de cloruro de sodio, en una alícuota de leche diluida que contiene un exceso de etilendiamino tetraacetato (EDTA), usando calceína como indicador. (NTAILIANAS y WHITNEY, 1964).

**3.2.3 Determinación fósforo total.** La determinación de fósforo total se llevó a cabo según el método espectrofotométrico IDF /FIL 42B: 1990, el fundamento de éste método está basado en la digestión de la leche usando ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno, formando azul de molibdeno por adición de una solución

de molibdato-ácido ascórbico. La absorbancia de cada muestra fue medida a una longitud de onda de 820 nm.

**3.2.4 Determinación de la termoestabilidad de la leche.** Es un método subjetivo de evaluación de la estabilidad térmica de las proteínas y consiste en la determinación del tiempo de coagulación en muestras de leche preparadas en tubos y bajo agitación constante en un baño de aceite termorregulado a una temperatura de 135° C (DAVIES y WHITE (1966), modificado por GONZÁLEZ, 2000).

**3.2.5 Determinación de las variantes genéticas de  $\kappa$  - caseína.** La semi-purificación de la  $\kappa$  - caseína se obtuvo según el método señalado por McKENZIE y WAKE (1961), modificado (ANEXO 2).

La determinación de las variantes genéticas  $\kappa$  - caseína, se realizó por medio de electroforesis de isoenfoque (ANEXO 3). Previamente a la electroforesis, cada muestra de  $\kappa$  - caseína semipurificada fue analizada según el método LOWRY *et al.* (1951) con el fin de determinar el contenido de proteína en cada una de ellas (ANEXO 6).

Como estándares de las variantes A y B de  $\kappa$ -caseína se emplearon muestras preparadas por CASANOVA (2001). Como estándar A se utilizó la muestra Steamy (raza Holstein-Friesian), la cual tenía una proporción de 2,0: 1 de  $\kappa$ -CN A con respecto a la  $\kappa$ -CN B. Como estándar B se utilizó la muestra purificada de  $\kappa$ -CN de la vaca número 3971 (raza Jersey) con una proporción de 1: 1,5 de variante A con respecto a B.

Las muestras de  $\kappa$ -caseína semi-purificadas, se prepararon según lo indicado por ADDEO *et al.* (1983). La cantidad de muestra en cada tubo de electroforesis fue de 22 ug de proteína para la identificación de las variantes de  $\kappa$ - caseína (ANEXO 6).

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

**3.2.6 Análisis estadístico.** Los resultados fueron analizados en el programa computacional STATGRAPHIC PLUS Versión 5.1, se realizó un análisis de varianza multifactorial para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los factores estudiados (muestreo y expresión de las variantes de  $\kappa$  – caseína), y para cada parámetro en estudio, a su vez se llevó a cabo una comparación de promedios para cada variable, previamente se aplicó el test de homocedasticidad.

## 4. PRESENTACIÓN y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 4.1 Contenido de proteína total

En el CUADRO 7, se presentan los valores promedios del contenido de proteína total (%) de las muestras de leche y su correspondiente desviación estándar, además de los niveles mínimos y máximos para cada muestreo. Los valores de proteína total obtenidos durante cada muestreo, se presentan en el ANEXO 4.

**CUADRO 7 Valor promedio y desviación estándar del contenido proteico de las muestras de leche de vacas individuales por muestreo.**

Muestreo	Nº muestras	Promedio $\pm$ desviación estándar (%)	Mínimo	Máximo
1	20	3,04 $\pm$ 0,23 ab	2,66	3,41
2*	18	3,17 $\pm$ 0,18 b	2,84	3,43
3	20	2,96 $\pm$ 0,22 a	2,59	3,32
4	20	3,19 $\pm$ 0,25 b	2,83	3,87
Total	78	3,09 $\pm$ 0,24	2,59	3,87

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

Muestreo 2, una vaca con mastitis

De acuerdo a los resultados obtenidos, existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con un intervalo de confianza de un 95% entre los muestreos 2 – 3, 3 y 4 (ANEXO 10).

El valor promedio para el contenido de proteína total coincide con el valor encontrado por KRAMM (2003), en un estudio realizado con 10 vacas de raza Frisón Negro, en época de primavera y que se encontraban en su primera lactancia (3,09  $\pm$  0,18%). Sin embargo, CID (2004), obtuvo un valor promedio para el contenido de proteína total de 3,27%, pero en invierno, el valor determinado por CID (2004) es superior al obtenido en la presente investigación, las muestras utilizadas en este estudio pertenecían a un segundo

grupo de vacas, pero de igual raza bovina (Frisón Negro) y de segunda lactancia.

LAVIN (1996), en un estudio sobre la variación de la composición láctea y número de lactancia, encontró que la fracción proteica de la leche aumenta hasta la segunda lactancia, para luego disminuir, encontrando un valor de 3,21 % de proteína en aquellas vacas de segunda lactancia.

En un estudio realizado por AULDIST *et al.* (1998), para evaluar la influencia estacional y la etapa de lactancia sobre la composición de la leche de ganado Neozelandes, hallaron que los niveles de proteína no eran significativamente afectados por la etapa de lactancia, pero sí por la estación del año, lo cual puede deberse a la disponibilidad y calidad del alimento a través del año.

Rogers, Stewart, y Gaunt citados por PEREZ (2003b), señalan que la concentración de proteína es relativamente baja en invierno y verano para vacas de partos de otoño y primavera, pero son mayores durante la primavera, cuando las pasturas son abundantes y de alta calidad. Lo cual podría justificar el bajo porcentaje de proteína de este estudio, ya que las vacas eran de partos de otoño.

Los factores que más influyen en el contenido de proteína en la leche son la genética y la alimentación siendo el más importante el primero de ellos, existiendo además otras fuentes de variación como son la edad, sanidad de la ubre, etapa de lactación (LATRILLE, 1999; McDONALD *et al.*, 1999; VELAZQUEZ, 2000). Al respecto BUXADE (1996), indica que la alimentación es fuente de gran variación en la composición química de la leche, debido a que un nivel energético deficiente en la alimentación disminuye el contenido de proteína y la producción de la leche. BOBE (2004), señala que la dieta tiene un mínimo efecto en la composición proteica de la leche, según un estudio realizado con un total de 592 muestras individuales de leche provenientes de 233 vacas Holstein Friesian.



La alimentación de las vacas del presente estudio no fue del todo homogénea durante los cuatro muestreos (ANEXO 1), lo cual pudo haber afectado el contenido de proteína, tal como lo señala BUXADE (2004).

#### 4.2 Contenido de calcio

Los valores de cada muestra de leche para el contenido de calcio se presentan en el ANEXO 4. En el CUADRO 8 se encuentra el valor promedio, desviación estándar y los niveles mínimo y máximo por muestreo.

El análisis de varianza indicó que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con un intervalo de confianza de un 95% entre los primeros tres muestreos con respecto al cuarto (ANEXO 10).

**CUADRO 8 Valor promedio y desviación estándar del contenido de calcio para las muestras de leche de vacas individuales por muestreo.**

Muestreo	Nº muestras	Promedio $\pm$ desviación estándar (g/l)	Mínimo	Máximo
1	20	0,92 $\pm$ 0,077 a	0,80	1,00
2*	18	0,98 $\pm$ 0,094 a	0,80	1,10
3	20	0,94 $\pm$ 0,059 a	0,90	1,08
4	20	0,72 $\pm$ 0,095 b	0,54	0,83
Total	78	0,89 $\pm$ 0,128	0,54	1,10

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

\* Muestreo 2, una vaca con mastitis

El valor promedio para calcio fue de 0,89  $\pm$  0,128 (g/l), el cual es inferior a los valores encontrados en otras investigaciones con muestras de leche provenientes de vacas individuales de raza Frisón Negro, tales como, PEREZ (2003a) y CID (2004), los cuales especifican un valor promedio para el contenido de calcio de: 1,26 y 1,11g/l en otro grupo de vacas durante la época de primavera e invierno respectivamente. VERA (2000), indica un valor promedio de 1,37 (g/l) de calcio tras un estudio realizado con muestras obtenidas a nivel de silos de almacenamiento, por 16 plantas lecheras de tres zonas del país, VIII, IX y X región.

PINTO *et al.* (1986), indican un valor de 0,959 g/l de calcio en leche perteneciente a tres grupos de vacas de raza Holando Europeo, valor al que se acerca más el valor obtenido en el presente estudio.

OÑATE (2004), indica un valor de 1,176 g/l para el contenido de calcio en época de invierno, en un estudio realizado con rebaños pertenecientes a cinco Centros de Acopio Lechero de la décima región. En una investigación realizada con leche proveniente de 17 plantas lecheras ubicadas desde la VIII a la X regiones, donde fueron utilizados rebaños de raza Frisón Negro se obtuvo un valor promedio de 1,28 g/l en el contenido de calcio (BALLESTEROS, 1997).

OSTERSEN *et al.* (1997), realizó una investigación sobre la variación estacional en la composición proteica de la leche y las propiedades de coagulación en 39 vacas Danish Holstein, señalando que el calcio alcanza una mínima concentración en la mitad de la lactancia. Lo cual justificaría en parte la baja concentración de calcio obtenida en el último muestreo del presente estudio, ya que, las vacas se encontraban durante la mitad de la lactancia, período que comprende entre 61-210 días según lo señalado por STRZALKOWSKA *et al.* (2002).

FOX (1997) y LATRILLE (1999), indica que existe un aumento en el contenido de calcio al término de la etapa de lactancia, además, sufre pequeñas variaciones con la alimentación o estación del año.

Es posible que el bajo contenido de calcio presentado en el último muestreo tenga relación con la calidad del alimento ingerido. PINTO *et al.* (1986), señalan, que bajos niveles de calcio en la leche podrían explicarse por una deficiencia de este mineral en la pradera.

Al respecto CUEVAS *et al.* (1983), al estudiar los minerales de las principales especies de una pradera permanente en la décima región, reportan bajos niveles de calcio en la pradera, los cuales se pueden deber a la falta de calcio en la fertilización o a la falta de leguminosas (suplementos) en la pradera.

### 4.3 Contenido de fósforo

En el ANEXO 4 se encuentran los valores obtenidos para el contenido de fósforo de cada muestra de leche y en el ANEXO 5 las curvas de calibración para la determinación de fósforo. En el CUADRO 9 se encuentran el valor promedio, desviación estándar y los niveles mínimo y máximo por muestreo.

**CUADRO 9 Valor promedio y desviación estándar del contenido de fósforo para las muestras de leche de vacas individuales por muestreo.**

Muestreo	Nº muestras	Promedio $\pm$ desviación estándar (%m/m)	Mínimo	Máximo
1	20	0,095 $\pm$ 0,014 a	0,077	0,131
2*	18	0,088 $\pm$ 0,013 ab	0,072	0,111
3	20	0,090 $\pm$ 0,007 ab	0,078	0,107
4	20	0,082 $\pm$ 0,012 b	0,052	0,096
Total	78	0,089 $\pm$ 0,013	0,052	0,131

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

- Muestreo 2, una vaca con mastitis

CID (2004), obtuvo un valor promedio de 0,089 %m/m de fósforo en muestras provenientes de 10 vacas individuales durante la época de invierno y de segunda lactancia, el mismo grupo de vacas fue analizado por PEREZ (2003a), durante su primera lactancia y en época de primavera, obteniendo un promedio de 0,093% m/m para el contenido de fósforo

En el presente estudio el valor promedio de los cuatro muestreos fue de 0,089  $\pm$  0,013 %m/m, mostrando diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), con un intervalo de confianza de un 95% entre muestreos (ANEXO 9). El valor promedio de fósforo obtenido en el presente estudio coincide con el indicado por CID (2004), en leche de otro grupo de vacas Frison negro.

Una investigación realizada en leche mezcla de rebaños pertenecientes a cinco Centros de Acopio Lechero de la décima región, indicó un valor promedio para la concentración de fósforo total en leche durante la época de invierno de 0,581  $\pm$  0,107 g/l, menor al obtenido en el presente estudio (OÑATE, 2004).

PINTO *et al.* (1986), encontró que el efecto lactancia era altamente significativo, con respecto al contenido de sodio, potasio y fósforo, es decir, al aumentar el número de lactancias aumenta el contenido de sodio y disminuye el contenido de potasio y fósforo, según un estudio realizado a tres grupos de vacas Holando Europeo .

#### 4.4 Estabilidad térmica de la leche

No existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), entre los muestreos para la variable de termoestabilidad con un nivel de confianza del 95% (ANEXO 10).

En el CUADRO 10 se observan los valores promedio, desviación estándar y los niveles mínimo y máximo por muestreo para la estabilidad térmica de la leche medida en segundos. El ANEXO 4 contiene los resultados de termoestabilidad para cada muestra durante los cuatro muestreos realizados.

**CUADRO 10 Valor promedio y desviación estándar de la estabilidad térmica de las muestras de leche por muestreo.**

Muestreo	Nº muestras	Promedio $\pm$ desviación estándar (s)	Mínimo	Máximo
1	20	64,6 $\pm$ 4,19a	60	70
2*	18	64,3 $\pm$ 4,03a	58	70
3	20	64,9 $\pm$ 5,03a	58	70
4	20	64,9 $\pm$ 4,33a	60	70
Total	78	64,7 $\pm$ 4,34	58	70

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

\* Muestreo 2, una vaca con mastitis

Para los cuatro muestreos el promedio general fue de 64,7  $\pm$  4,34 (s), con un mínimo y máximo de 58 y 70 segundos respectivamente. El promedio obtenido en ésta investigación es relativamente menor al obtenido por CID (2004) durante el estudio de la estabilidad térmica en época de invierno el cual fue de 66,30  $\pm$  5,86 (s), valor obtenido con distintas muestras, es decir, otro grupo de vacas de igual raza bovina que en el presente estudio.

Un valor cercano al hallado en el presente estudio se obtuvo, en una

investigación realizada en la décima región por MOLINA *et al.* (2001), en época de primavera (año 1999) donde obtuvieron un valor promedio de  $63,38 \pm 3,96$  (s) de un total de 96 muestras de leche provenientes de 11 predios. Mientras que, OÑATE (2004), en una investigación de cinco Centros de Acopio de la provincia de Valdivia, presentó un valor promedio de termoestabilidad en época de invierno de  $71,34 \pm 5,4$  (s).

FITZGERALD y HILL (1997), indican que existen varios factores que afectan la estabilidad térmica, tales como, precalentamiento de la muestra, pH, la concentración individual de la proteína, el contenido iónico de la leche entre otros.

GRAVERT (1987); AUGUSTIN (2000), señalan que las sales minerales presentes en la leche tienen un efecto significativo sobre la estructura y estabilidad de las proteínas de la leche.

En un estudio realizado con leche recombinada, se encontró que la coagulación térmica de la leche es afectada por el contenido de proteínas y los constituyentes minerales de la leche (SHARMA y SINGH, 1999).

SINGH (2004), indica que varios factores influyen en la estabilidad coloidal de la leche, de los cuales son importantes el ión calcio y el pH, en donde ambos disminuyen las repulsiones electroestáticas y alteran posiblemente la conformación de la  $\kappa$ -caseína en la superficie de la micela.

MOLINA *et al.* (2001) y SINGH (2004), sostienen que al aumentar la concentración de  $\text{Ca}^+$  y Mg disminuye la estabilidad térmica en todos los rangos de pH, por alteraciones del balance salino.

Las diferencias de los valores obtenidos para cada variable, de diferentes estudios pueden deberse, al tamaño de muestras analizadas, condiciones del análisis, y efecto estacional como señala WALSTRA *et al.* (2001), y además si son muestras de rebaños o de vacas individuales.

#### 4.5 Variantes genéticas de $\kappa$ - caseína identificadas por electroforesis de isoenfoco

En el ANEXO 7 se presenta la figura con las bandas electroforéticas obtenidas para cada muestra en estudio, además de los estándares utilizados.

De esta forma fue posible detectar la presencia de las variantes A, AB ó B de  $\kappa$ - caseína en cada muestra de leche.

La distancia de migración de la  $\kappa$ - caseína presentó variaciones entre cada muestreo y entre las diferentes corridas (ANEXO 8), esto debido a las variaciones experimentales, ya que, existen factores que desempeñan una función importante en la separación electroforética, que pueden presentar variaciones, por ejemplo la fuerza iónica, cambios en el voltaje, entre otras.

En el CUADRO 11 se muestran las variantes genéticas identificadas en cada muestra de leche.

De las diez vacas muestreadas, en solo una vaca se presentó el alelo A y seis de ellas presentaron el alelo B de  $\kappa$ - caseína y en las muestras restantes se observó la variante heterocigota AB de  $\kappa$ - caseína, esto representa un 10, 30 y 60 % del total de las vacas muestreadas respectivamente.

**CUADRO 11 Proporción y Variantes genéticas identificadas en cada muestra de leche.**

Vacas Frisón Negro	Variantes de $\kappa$ - caseína	Proporción promedio $\kappa$ - CN A : $\kappa$ - CN B
825	A	-
904	B	-
1311	AB	5,4 : 1
1321	AB	1,3 : 1
1342	B	-
1353	B	-
1357	B	-
1376	B	-

1398	AB	4,0 : 1
2266	B	-

De acuerdo a las densitometrías realizadas de cada muestra en estudio (ANEXO 9), se determinó una mayor proporción de la expresión de la variante A de  $\kappa$ -caseína, en las muestras con la variante heterocigota. Choi *et al*, citado por VAN EENENNAAM y MEDRANO (1991), señalan que el control de la expresión de estos genes está influenciada por la regulación hormonal de la transcripción de los genes, la estabilidad del mRNA y la tasa de traducción de proteína.

En un estudio realizado con 148 muestras de leche provenientes de vacas con la variante heterocigota de  $\kappa$ -caseína, Choi *et al*, citado por VAN EENENNAAM y MEDRANO (1991) postulan, que existe una regulación hormonal en la glándula mamaria que influye en la mayor o menor expresión de una u otra variante.

#### **4.6 Variantes genéticas de $\kappa$ - caseína y su relación con el contenido de proteína total, calcio, fósforo y estabilidad térmica de la leche.**

La identificación de las variantes genéticas de las proteínas, tienen como propósito mostrar la relación de éstas con la composición, la calidad y producción de leche, además de su relación con las propiedades tecnológicas de la leche (JACOB, 1994).

En la presente investigación se realizó un análisis de varianza para determinar si la presencia de las variantes genéticas identificadas influía en el contenido de proteína, minerales y la estabilidad térmica de la leche (ANEXO 10).

En el CUADRO 12 se muestran los promedios del contenido de las variables analizadas con respecto a cada variante genética de  $\kappa$ - caseína.

Según el análisis de varianza no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre las variantes genéticas y el contenido de calcio y

fósforo, mientras que el efecto de las variantes genéticas de  $\kappa$ -caseína es estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) para las variables de proteína total y estabilidad térmica de la leche.

**CUADRO 12 Promedio y desviación estándar del contenido de proteína, calcio, fósforo y termoestabilidad para las variantes genéticas de  $\kappa$ -Caseína.**

Variantes $\kappa$ -CN	n	Promedio $\pm$ Desviación estándar			
		Proteína (%)	Calcio (g/l)	Fósforo (%m/m)	Estabilidad (s)
A	8	3,05 $\pm$ 0,08 ab	0,90 $\pm$ 0,11 a	0,083 $\pm$ 0,0039a	66,2 $\pm$ 2,31ab
AB	24	2,94 $\pm$ 0,20 a	0,86 $\pm$ 0,12 a	0,088 $\pm$ 0,0092 a	62,7 $\pm$ 4,82 a
B	46	3,17 $\pm$ 0,23 b	0,89 $\pm$ 0,13 a	0,090 $\pm$ 0,015 a	65,4 $\pm$ 4,06 b

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

n: número de muestras

**4.6.1 Contenido de proteína.** A través del análisis de varianza se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en el porcentaje de proteína total en las leches de vaca donde se identificaron las variantes AB y B de  $\kappa$ -caseína. Determinando que aquellas muestras de leche que presentaron la variante B de  $\kappa$ -caseína, poseen un mayor contenido de proteína total que las leches con la variante A o AB respectivamente.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo descrito en otras investigaciones realizadas por WALSTRA *et al.* (2001); IKONEN *et al.* (1999); JAKOB (1994) y NG – KWAI – HANG *et al.* (1990), que señalan que los fenotipos BB de  $\kappa$ -caseína presentan mayor porcentaje de proteína que los fenotipos AA y AB.

**4.6.2 Contenido de calcio.** DAVIS (2001) indica que, existe gran variación substancial en la concentración del calcio de la leche, el cual se asocia en gran parte al contenido proteínico de está (caseínas), señalando que hay una variación genética en el calcio de la leche que se encuentra asociado a las caseínas.



De acuerdo al análisis de varianza (95% de confianza), no se detectaron diferencias estadísticamente significativas, indicando que en la presente investigación las variantes genéticas de  $\kappa$ -caseína no influyen sobre el contenido de calcio en las leches muestreadas.

Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con lo obtenido por RAHALI y MENARD (1991), quienes indican en una investigación realizada sobre la influencia de las variantes genéticas sobre la composición de la leche y la aptitud de coagulación de ésta, encontraron que al comparar los genotipos de  $\kappa$ -caseína (AA, AB y BB) y el contenido de calcio total no existían diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de leche. MACHEBOEUF *et al.* (1993), obtuvieron los mismos resultados en un estudio realizado con tres razas de ganado lechero: Holstein, Montbéliarde y Tarentaise. En el CUADRO 13 se muestran las concentraciones de calcio correspondientes a las variantes genéticas, según lo obtenido por los estudios antes señalados.

En el CUADRO 13, se observa que existe levemente un mayor contenido de calcio, en el estudio, de RAHALI y MENARD (1991), para la variante AB de  $\kappa$ -caseína.

**CUADRO 13 Contenido de calcio en las muestras de leche según variantes genéticas.**

	Variantes genéticas de $\kappa$ -caseína			Autor
	AA	AB	BB	
Concentración de calcio (g/l)	1,31	1,33	1,32	RAHALI y MENARD (1991)
	1,22	1,23	1,24	MACHEBOEUF <i>et al.</i> , (1993)

En el presente estudio se encontró que las muestras que presentaron el alelo A de  $\kappa$ -caseína, tenían un contenido de calcio levemente mayor en comparación al alelo B. Sin embargo, PEREZ (2003a) informó diferencias estadísticamente significativas en el contenido de calcio, en leche de 10 vacas Frisón Negro, en

la época de primavera en otro grupo de vacas. De igual modo, HORNE y MUIR (1994), postularon que leches con el fenotipo BB de  $\kappa$ -caseína registraban un mayor contenido del ión calcio respecto de las demás variantes. Por otra parte CID (2004), indica que no hay diferencias estadísticamente significativas (al 95% de confianza) en el contenido de calcio, en leche de 10 vacas Frisón Negro de segunda lactancia y en época de invierno.

**4.6.3 Contenido de fósforo.** El análisis de varianza (95% de confianza), indica que no existen diferencias estadísticamente significativas, por lo tanto no hay una influencia directa de las variantes genéticas identificadas en el presente estudio con el contenido de fósforo. Pero si se observó un mayor contenido de fósforo en aquellas muestras con la variante B de  $\kappa$ -caseína.

CID (2004), al igual que en la presente investigación no informa diferencias estadísticamente significativas entre las variantes genéticas de  $\kappa$ -caseína con respecto al contenido de fósforo, pero si encontró valores superiores en aquellas muestras con la variante B, según un estudio en leche de diez vacas Frisón Negro, durante la época de invierno (2002).

En una investigación realizada por MARIANI *et al.* (1997) en leche proveniente de vacas de raza Bruna, se encontró un alto contenido de fosfato de calcio coloidal en aquellas muestras que presentaron la variante B de  $\kappa$ -caseína.

**4.6.4 Estabilidad térmica de la leche.** Según la evaluación estadística realizada para ver la influencia de las variantes genéticas de  $\kappa$ -caseína en la estabilidad de la leche, esta indicó que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Además, al realizar una comparación de promedios (CUADRO 12) se observa que las leches con el fenotipo A tienen un valor levemente superior de aquellas que presentaron la variante genética B. Lo cual difiere de lo encontrado en la literatura, tal como indican FITZGERALD y HILL (1997), que la variante BB de  $\kappa$ -caseína tienen mayor estabilidad térmica que la  $\kappa$ -caseína AB o AA, lo cual se atribuye a que tienen altos niveles de  $\kappa$  - caseína

y, como consecuencia, las micelas de caseína tienen un menor tamaño.

Las diferencias encontradas en el presente estudio pueden deberse al tamaño de muestras analizadas, condiciones del análisis, y efecto estacional como señala WALSTRA *et al.* (2001).

#### 4.7 Producción de leche

La producción de la leche depende fundamentalmente de la raza de la vaca. En general, el orden de producción de las razas británicas más importantes son: Holstein, Friesian, Ayrshire, Guernsey y Jersey. Sin embargo, existen grandes variaciones dentro de cada raza, en relación a la estirpe y la individualidad (McDONALD *et al.*, 1999).

En el CUADRO 14, se presenta la producción de leche por cada animal a lo largo de los cuatro muestreos, durante el ordeño AM, donde se puede destacar que la vaca con mayor producción de leche fue la 904.

**CUADRO 14 Producción de leche durante los cuatro muestreos (L).**

Vacas	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4
825	17	18	13	19
904	17	19	21	23
1311	11	13	14	14
1321	17	16	19	19
1342	16	18	19	18
1353	14	15	16	16
1357	15	14	15	15,5
1376	19	E	15	15
1398	13	15	17	15
2266	14	14	16	15

E: una vaca con mastitis

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los muestreos, siendo el promedio general para la producción de leche de 16,1

$\pm 2,45$  (L), con un valor mínimo y máximo de 11 y 23 litros respectivamente (CUADRO 15 y ANEXO 10).

**CUADRO 15 Promedio y desviación estándar de la producción de leche de vacas Frisón Negro.**

Meses de Muestreo	Nº muestras	Promedio $\pm$ desviación estándar (s)	Mínimo	Máximo
1	10	15,3 $\pm$ 2,36 a	11	19
2*	9	15,8 $\pm$ 2,11a	13	19
3	10	16,5 $\pm$ 2,51a	13	21
4	10	16,9 $\pm$ 2,77a	14	23
Total	39	16,1 $\pm$ 2,45	11	23

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

\* Muestreo 2, una vaca con mastitis

BUXADE (1996), señala que la producción de leche depende mayormente de factores ligados al medio que de aquellos de carácter genético.

Según el análisis estadístico no existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las variantes genéticas y la producción de leche. En el CUADRO 16, se observa que las leches con el fenotipo A y B presentan una mayor producción de leche en comparación a las muestras con la variante AB de  $\kappa$ -Caseína.

**CUADRO 16 Promedio y desviación estándar de la producción de leche para las variantes genéticas de  $\kappa$ -Caseína.**

Variantes de $\kappa$ -Caseína	Número de muestras	Promedio $\pm$ D.E (%)
A	8	16,7 $\pm$ 2,43a
AB	24	15,4 $\pm$ 2,14a
B	46	16,5 $\pm$ 2,37a

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

**4.8 Análisis de la leche mezcla** En el presente estudio se realizó un análisis del comportamiento de la leche mezcla, la cual se obtuvo a partir del 10% de la producción de leche de cada vaca durante los cuatro muestreos.

En el CUADRO 17. se presenta el valor promedio experimental y ponderado para el contenido de proteína total, calcio, fósforo y estabilidad térmica a partir de la leche mezcla obtenida en cada muestreo.

**CUADRO 17 Valor promedio ponderado y experimental para las respuestas estudiadas en la leche mezcla**

Muestreo	Proteína total (%)		Calcio (g/L)		Fósforo (%m/m)		Estabilidad térmica (s)	
	Análisis laboratorio	Valor ponderado	Análisis laboratorio	Valor ponderado	Análisis laboratorio	Valor ponderado	Análisis laboratorio	Valor ponderado
1	2,92	3,03	0,90	0,92	0,087	0,087	60	64,5
2	3,20	3,17	1,05	0,97	0,090	0,090	60	64,5
3	2,85	2,97	0,99	0,93	0,084	0,091	60	65
4	3,30	3,18	0,72	0,72	0,070	0,083	69,5	65

Se puede observar que existen leves diferencias, excepto en el análisis de estabilidad térmica entre el valor promedio calculado teóricamente y el obtenido tras un análisis de laboratorio para cada respuesta estudiada, lo cual pudo deberse a variaciones en las condiciones experimentales durante la realización de los análisis.

#### 4.9 Análisis de correlación entre las variables estudiadas

Las relaciones existentes entre la estabilidad térmica de la leche y el contenido de minerales es muy compleja, ya que, no sólo están relacionados entre sí, sino que a su vez forman parte de las caseínas, donde la estabilidad de la leche dependerá de un conjunto de factores, tales como, contenido de minerales, proteína, el precalentamiento de la muestra, y el pH del medio, entre otros (FITGERALD y HILL, 1997; PÉREZ, 2003a y SINGH, 2004).

**CUADRO 18 Análisis de correlación entre las variables estudiadas.**

Termoestabilidad	Proteína	Calcio	Fósforo	pH
	0,468*	0,134*	0,169*	0,215*

\* Correlaciones estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ )

En el CUADRO 18 se presenta la correlación determinada entre la termoestabilidad térmica de la leche y las variables analizadas: proteína, calcio, fósforo y pH.

Existe una correlación positiva estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre las variables termoestabilidad y contenido de proteína, calcio y fósforo. Donde las variables de termoestabilidad y proteína presentaron la correlación más alta con un valor de 0,468.

CID (2004), también encontró una correlación positiva entre la variable de termoestabilidad y proteína, pero con un valor de 0,502, lo cual atribuyó a la influencia que posee el contenido de proteína sobre la estabilidad de la leche frente a los tratamientos térmicos.

## 5. CONCLUSIONES

- Del total de las muestras leche, una presentó la variante A de  $\kappa$ -caseína, seis de ellas la variante B y en tres muestras se identificaron ambas variantes.
- No se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al contenido de calcio y fósforo según las variantes genéticas, pero sí, en el contenido de proteína y termoestabilidad de la leche.
- El mayor contenido de proteína se determinó en las muestras que presentaron la variante B de  $\kappa$ -caseína.
- Se detectó una correlación positiva y significativa entre la estabilidad térmica de la leche y las variables proteína total, calcio y fósforo.

## 6. RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo identificar las variantes genéticas de  $\kappa$ -caseína de leche de 10 vacas Frisón Negro por electroforesis de isoenfoque y relacionarlas con el contenido de proteínas y minerales, y evaluar la termoestabilidad.

Las muestras de leche de vacas Frisón Negro fueron obtenidas desde el predio Santa Rosa de la Universidad Austral de Chile. Se realizaron cuatro muestreos entre los meses de julio y septiembre (2003).

A las muestras de leche se les realizó análisis de proteína total, contenido de calcio y fósforo, además de evaluar la estabilidad térmica. A su vez se realizó una separación de  $\kappa$  - caseína. Posteriormente se determinó la presencia de las variantes genéticas de  $\kappa$  - caseína, a través del método de electroforesis de isoenfoque.

El promedio obtenido para proteína total, calcio, fósforo y estabilidad térmica fue de 3,09%, 0,89 g/l, 0,089% y 64,9s respectivamente. Encontrando diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los meses de muestreo y las variables; proteína, calcio y fósforo.

Se obtuvo como resultado que el fenotipo B de  $\kappa$ -CN ejerce una influencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) sobre los contenidos de proteína total y el fenotipo A no difiere del fenotipo B en la estabilidad térmica de la leche. En cuanto al calcio y fósforo no se obtuvieron diferencias significativas según la variante genética.

El análisis de correlación fue estadísticamente significativo entre la termoestabilidad y las variables proteína, calcio y fósforo. Presentándose la correlación más alta entre la variable termoestabilidad y contenido de proteína, con un valor de 0,468.



## SUMMARY

The present work had as objective to identify the genetic variants of  $\kappa$ -casein of milk of 10 Frisón Negro cows by isoelectric focusing (IEF) electrophoresis and to relate them to the content of proteins and minerals, and heat stability of milk.

The milk samples were obtained from Frisón Negro cows, from the Santa Rosa farm of the Universidad Austral de Chile, with four samplings in the months of Julio and September (2003).

To the milk samples total protein analysis was made to them, calcium content and phosphorus, besides to evaluate the thermal stability. Was made as well a separation of  $\kappa$ -casein. Later was determined the presence of the genetic variants of  $\kappa$ -casein, through the method isoelectric focusing (IEF) electrophoresis.

The average obtained for total protein, calcium, phosphorus and thermal stability was of 3.09%, 0.89 g/l, 0.089% and 64,9s respectively. Finding differences statistically significant ( $p < 0,05$ ) between the months of sampling and the variables; protein, calcium and phosphorus.

It was obtained like result that phenotype B of  $\kappa$ -cn exerts a statistically significant influence ( $p < 0,05$ ) on the total protein contents and phenotype A does not differ from phenotype B in the thermal stability of milk. As far as calcium and phosphorus significant differences were not obtained according to the genetic variant.

The correlation analysis was statistically significant between the heat stability and the variables protein, calcium and phosphorus. Appearing the highest correlation between the variable heat stability and protein content, with a value of 0,468.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- AALTONEN, M. y ANTILA, V. 1987. Milk renneting properties and the genetic variants of proteins. *Milchwissenschaft*. 42 (8): 490-492.
- ADDEO, F., CHIANESE, A., DI LUCCIA, P., PETRILLI, R., MAURIELLO, R. y ANELLI, G. 1983. Identification of bovine casein variants by gel isoelectric focusing. *Milchwissenschaft*. 38 (10): 586-588.
- ALAIS, C. 1985. *Ciencias de la leche. Principio de técnicas lecheras*. Ed. Reverté. Barcelona. España. 873p.
- ALLOCATY y MUSET, 2000. Caracterización de la proteólisis en leche cruda bovina. Jornada de desarrollo e innovación. Instituto Nacional de tecnología Industrial. (Original no consultado). En: <http://www4.inti.gov.ar/GD/jornadas2000/citil-ptm-098.htm>
- AMIOT, J. 1991. *Ciencia y tecnología de la leche. Principio y aplicaciones*. Ed. Acribia. Zaragoza. España. 547p.
- ANRIQUE, R., LATRILLE, L., BALOCHI, O., PINOCHET, D., MOREIRA, V., SMITH, R., ALOMAR, D. y VARGAS, G. 2004. La producción de leche en Chile: Características técnicas a nivel predial. [Universidad Austral de Chile](#) . Facultad de [Ciencias Agrarias](#). Valdivia, [Chile](#). 59p
- AUGUSTIN, M. A. 2000. Mineral salts and their effect on milk functionality. *The Australian Journal of Dairy Technology*. 55: 61-64.
- AULDIST, M.J; WALSH, B.J y THOMSON, N.A.1998. Seasonal and lactational influences on bovine milk composition in New Zealand. *Journal of Dairy Research*. 65: 401-411.
- BADUI, S. 1999. *Química de alimentos*. Ed. Alambra Mexicana. México. 648p.

- BALLESTEROS, C. 1997. Determinación de minerales en leche de vaca: Sodio, potasio, calcio total, calcio complexométrico, fósforo total y fósforo no proteico. Tesis Lic. en Ing. en Alimentos. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia. 57 p.
- BELITZ, H. y GROSCH, W. 1997. Química de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 1087 p.
- BOBE, G. 2004. Milk protein genotypes explain variation of milk protein composition. A.S. Leaflet R 1901. Iowa State University Animal Industry Report. Disponible en: [www.ans.iastate.edu](http://www.ans.iastate.edu). Consultado: 27/09/2005.
- BUXADE, C. 1996. Zootecnia. Bases de producción animal Tomo VII. Producción vacuna de la leche y carne. Ed Mundi Prensa. 342p
- CASADO, P. y GARCIA, J. 1985. La calidad de la leche y los factores que la influyen. Industrias Lácteas Españolas. N°81. 298 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.
- CEBALLOS, A., BETANCOURTH, T. y RONCANCIO, D. 2004. Determinación de la concentración de calcio, fósforo y magnesio en el parto de vacas lecheras en Manizales, Colombia. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 17 (2): 125-133. Disponible en: <http://kogi.udea.edu.co/revista/17/17-2-2.pdf>. Consultado: 01/10/2005.
- 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.
- CLOSA, S.J., LANDETA, M.C., ANDERICA, D., PIGHIN, A y CUFRE, J. 2003. Contenido de nutrientes minerales en leche de vaca y derivados de

- Argentina. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 53 (3):
- CREAMER, L. y HARRIS, D. 1997. Relationship between milk protein polymorphism and physico – chemical properties. In: Milk protein polymorphism. International Dairy Federation. Proceedings of the IDF. Seminar held in Palmerston North, New Zealand: 110-123.
- CUEVAS, B., BALOCHI, L., ANRIQUE, G y JORQUERA, I. 1983. Valor nutritivo de las principales especies de una pradera permanente en la décima región. Parte II. Contenido de minerales. Agro sur. 11(1): 13-22.
- COULTATE, T. 1998. Manual de química y bioquímica de los alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza.366p.
- CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACION (INN). 1998. Leche y productos lácteos. Muestreo, parte I. Norma Chilena NCh 1011/1. Santiago. Chile. 9 p.
- CHILE, MINISTERIO DE SALUD. 2001. Reglamento Sanitario de los Alimentos. Diario Oficial de la republica de Chile. 13 de mayo de 1997. 208 p.
- DAVIES, D. y WHITE, J. 1966. The stability of milk protein to heat. I Subjectiva measurement of heat stability of milk. Journal of Dairy Reserch. 33: 67-81.
- DAVIS, S.R; FARR, V.C; KNOWLES, S.O; LEE,J; KOLVER, E y AULDIST, M.2001.Source of variation in milk calcium content. The Australian Journal of Dairy Technology. 56 (2): 156.
- EIGEL, W., BUTLER, J., ERNSTROM, C., FARREL, H., HARWALKAR, V., JENNESS, R. y WHITNEY, R. 1984. Nomenclature of Proteins of Cow`s Milk: Fifth Revision. Journal of Dairy Science 67 (8): 1599-1631.
- EHREFENFELD, J. 1991. Raza Frisón Negro. Centro de inseminación artificial. Universidad Austral de Chile. Disponible en:

<http://www.uach.cl/centro/inseminacionartificial/productos/frizonnegro.htm>

[Consultado el -05-03](#)

- ESCODA, A.; ALVAREZ, L.O. y YEPEZ, S. 1983. Estudio de los polimorfismos genéticos de las proteínas de la leche producida en algunas haciendas de la zona de Carora. Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad de Zulia. Maracaibo, Venezuela. Disponible en: [www.redpav-fpolar.info.ve](http://www.redpav-fpolar.info.ve) Consultado 1/05/03.
- FAHEY, G., COLLINS, M., MERTENS, D y MOSER, L. 1994. Forage quality, evaluation, and utilization. 998p
- FELMER, R y BUTENDIECK, M. 1998. Frecuencia alélica del gen de la  $\kappa$ -caseína bovina en un rebaño Frisón Negro Chileno. Archivos de Medicina Veterinaria. 30 (2):145-151.
- FENNEMA, O. 1993. Química de alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza. España.
- FITZGERALD, R.J., WALSH, D., GUINEE, T.P., MURPHY, J.J., MEHRA, R., HARRINGTON, D y CONNOLLY, J.T. 1999. Genetic variants of milk protein – Relevance to milk composition and cheese production. En: <http://www.teagasc.ie/research/reports/dairyproduction/4245/eopr-4245.pdf>. Consultado: 15/06/2003
- FITZGERALD, R. y HILL, J. 1997. The Relationship between Milk Protein Polymorphism and the Manufacture and Functionality of Dairy Products. En: Milk Protein Polymorphism. International Dairy Federation. Brussels, Belgium. Pp. 355-371.
- FOX, P. 1997. Development in dairy chemistry. Editorial Chapman & Hall. Londres. Inglaterra. 539 p.
- FOX, P. F. y McSWEENEY, P. 1998. Dairy Chemistry and Biochemistry. Blackie Academic & Professional. London. Pp. 146 – 237.

- GARCIA, F.O y PICONE, L.I.2004. Fósforo: Dinamica y manejo en sistema de siembra directa. El fósforo en la nutrición animal. Informaciones Agronomicas N° 55: Pg 12. En: [http://www.ppi-ppic.org/ppiweb/iaecu.nsf/\\$webindex/A368A67290DC616E05256F5800513C7B/\\$file/Inf-Agro.55.pdf](http://www.ppi-ppic.org/ppiweb/iaecu.nsf/$webindex/A368A67290DC616E05256F5800513C7B/$file/Inf-Agro.55.pdf). Consultado 05/01/2006
- GONZALEZ de LLANO, D. 1990. Polimorfismo genético de las proteínas de la leche de vaca. Alimentación, Equipos y Tecnología. Julio-Agosto:77-81.
- GONZALEZ, R. 2000. Estudio de la relación entre termoestabilidad y pruebas de alcohol de la leche a nivel de un centro de acopio lechero (CAL). Tesis Lic. Ingeniería en Alimentos. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia. 89p.
- GONZALEZ, H., GARCIA, X., MAGOFKE, J.C y CUEVAS, A. 2002.Comparación de diferentes cruzamientos entre Frisón Negro Chileno, Frisón Neozelandés y con Holstein Americano. Archivos de Zootecnia. 50: 303-314.
- GOMEZ, C y FERNANDEZ, M. 2002. Minerales para mejorar la producción de leche y fertilidad en vacas lecheras. Revista virtual visión veterinaria. 1 (11).En:<http://www.visionveterinaria.com> ISSN 1680-9335. Consultado: 02/02/2006.
- GRAVERT, H.O. 1987. Dairy – cattle: production. Ámsterdam: Elsevier Science. 309p.
- HAVRANEK, J., CURIK, I., SAMARZIJA, D y ANTUMAC, N. 1993. Polimorfismo delle proteine del latte nella raza simmental croata. Scienza e Técnica Lattiero-Caseiria. Instituto Lattiero della Facoltà di agraria. 44 (3): 155-160.
- HORNE, D. y MUIR, D. 1994. Genetic polymorphism of  $\kappa$ -casein and rennet coagulation time. Effects of serum phase components. Milchwissenschaft. 49 (8): 446-449.

- IKONEN, T., OJALA, M., y RUOTTINEN, O., 1999. Associations Between Milk Protein Polymorphism and First Lactation Milk Production Traits in Finnish Ayrshire Cows. *Journal of Dairy Science*. 82:1026-1033
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF/FIL). 1993. Milk: Determination of Nitrogen content. Part 3: Block – digestion method. FIL/IDF 20B: 1993.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF/FIL).1990. Milk determination of total phosphorus content – Spectrometic method. FIL/IDF 42 B: 1990.
- JAKOB, E. 1994. Genetic polymorphism of milk proteins. FIL-IDF Bulletin 298. 11 p.
- KRAMM, J. 2003. Composición proteíca y su relación con las variantes genéticas A y B de  $\kappa$ -caseína y  $\beta$ -lactoglobulina en leche de vaca Frisón Negro. Tesis Lic. en Ing. en Alimentos. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia. 114 p.
- LATRILLE, L. 1999. Calidad de la leche y sistemas de pago. In: Anrique, R. (Ed.) Competitividad de la producción lechera nacional. Tomo II. Universidad Austral de Chile . Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia, Chile . Pp: 259 – 316.
- LAVIN, R. 1996. Variaciones de la composición láctea de vacas con distinto número de lactancia. Tesis Lic. Medicina Veterinaria. Universidad Austral de Chile. Facultad de Medicina Veterinaria. Valdivia. 84 p.
- LAWRENCE, K., CREAMER., PLOWMAN, J.E., LIDDELL, M.J., SMITH, M.H y HILL, J.P.1998. Micelle Stability:  $\kappa$  - casein structure and function. *Journal of Dairy Science*. 81: 3004-3012.
- LOPEZ, E y VASQUEZ, N. 2004. Determinación del sexo y genotipificación del gen de la  $\kappa$  - caseína en embriones bovinos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 17 (3): 231-240. En: [http://kogi.udea.edu.co/revista/volumen\\_17\\_03.htm](http://kogi.udea.edu.co/revista/volumen_17_03.htm). Consultado:

27/09/2005.

- LOWRY, O., ROSEBROUGH, N., FARR, A. y RANDALL, R. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.
- McDONALD, P., EDWARDS, R., GREENHALGH, J. y MORGAN, C. 1999. [Nutrición](#) Animal. Quinta edición. Zaragoza, [España](#) . Acribia. 576pp.
- MACHEBOEUF, D., COULON, J. y D' HOUR, P. 1993. Effect of breed, protein genetic variants and feeding on cows milk coagulation properties. *Journal of Dairy Research*. 60:43-54.
- MARIANI, P y SUMMER, A. 1999. Polimorfismo delle proteine ed attitudine tecnologico-casearia del latte. *Scienza e Tecnica Lattiero – Casearia*. 50(3) : 197-230.
- MARIANI, P., ZANZUCCHI, G., MASORI, M., SERVENTI, P. y PECORARI, M. 1997. Percentage distribution of caseins and kappa-casein fractions separated by reverse-phase HPLC in Italian Brown cows with different genotypes at the kappa-casein locus. *Sc. Tecn. Latt. Caes*. 46: 30-35.
- MAYER, H; MARCHLER, A; PROHASKA, C. y NORZ, R. 1997. Milk protein polymorphism in Australian dairy cattle breeds. *Milchwissenschaft*. 52 (7):366-359.
- McKENZIE, H y WAKE, R. 1961. An improved method for the isolation of  $\kappa$  - casein. *Biochimic Biophys Acta*. 47: 240 – 242.
- 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 Research*. 72 (12): 3190-3196.
- MOLINA, L. H; GONZALEZ, R; BRITO, C; CARRILLO, B y PINTO, M. 2001. Correlación entre la termoestabilidad y prueba de alcohol de la leche a



nivel de un Centro de Acopio Lechero. Archivos de Medicina Veterinaria. 33 (2):

- NG-KWAI-HANG, K., MONARDES, H. y HAYES, J. 1990. Association between genetic polymorphism of milk proteins and production traits during three lactations. *Journal of Dairy Science*. 73: 3414-3420.
- NG-KWAI-HANG, K. 1997. A review of the relationship between milk protein polymorphism and milk composition/milk production. En *Milk protein polymorphism*. International Dairy Federation. Proceedings of the Seminar held in Palmerston North, New Zealand. Pp. 22-37
- NTAILIANAS, H. y WHITNEY, R. 1964. Calcein as an indicator for the determination of total calcium and magnesium and calcium alone in the same aliquot of milk. *Journal of Dairy Science*. 47 (1): 19-27.
- O`CONNELL, J. E. y FOX, P.F. 2000. The Two-Stage Coagulation of Milk Proteins in the Minimum of the Heat Coagulation Time – pH Profile of Milk: Effect of Casein Micelle Size. *Journal Dairy Science*. 83: 378-386.
- OÑATE, C.2004. Sales minerales (calcio, fósforo y citratos) en las fases solubles y coloidal de la leche de cinco centros de acopio de la provincia de Valdivia. Tesis Lic. en Ing. en Alimentos. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia. 107p.
- 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.
- PÉREZ, E. 2003a. Relación entre el polimorfismo de  $\kappa$ -CN y  $\beta$ -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.

- PÉREZ, L. 2003b. Estudio de algunos factores no genéticos que afectan la producción y composición de la leche en un rebaño de pariciones biestacionales en la Décima Región. Tesis Licenciado en Agronomía. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia. 143 p.
- PÉREZ-RODRÍGUEZ, M; MARTÍN-ALVAREZ, P; RAMOS, M; GARCÍA-MURO, E; ZARAZAGA, I. y AMIGO, L. 1998. Genetic polymorphism of bovine milk proteins in Holstein-Friesian and Fleckvieh breeds exploited in Spain. *Milchwissenschaft*. 53 (10): 541-546.
- PINTO, M., ANRIQUE, R., VEGA, R., ISRAEL, L.E., y DEL PICÓ, R.1986. Influencia de factores nutricionales y número de lactancias en el contenido de sodio, potasio, calcio y fósforo en leche de vaca. *Agro Sur*. 14 (1): 30-41.
- PINTO, M., CARRASCO, E., FRASER, B., LETELIER, A. y DÖRNER, W.1998. Composición química de la leche cruda y sus variaciones a nivel de silos en plantas lecheras de la VIII, IX y X regiones de Chile. Parte 1. Macrocomponentes. *Agro Sur*. 26 (2): 97-109.
- PRIMO, Y. 1997. Química de alimentos. Ed. Síntesis. S.A. 461p.
- RAHALI, V y MENARD, J. 1991. Influencia des variants genetiques de la  $\beta$ -lactoglobuline et de la  $\kappa$ -caséine sur la composition de lait et son aptitude fromagère. *Lait*. N° 7 : 275-297.
- RENNER, E. 1983. Milk and Dairy Products in human nutrition. Friedrich Pustet. Degensburg. Alemania. 450 p.
- ROBINSON, D.S. 1991. Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza. España.
- RON, M., YOFFE, O., EZRA, E., MEDRANO, J.F y WELLER, I.1994. Determination of effects of milk protein. Genotype on production traits

- of Israeli Holsteins. *Journal Dairy Science*. 73:1106 -1113.
- SINGH, H. 2004. Heat stability of milk. *Internacional Journal of Dairy Technology*. 57(2/3):111-115.
- SINGH, H., FOX, P. 1987. Heat stability of milk: influence of colloidal and soluble salts and protein modification on the pH-dependent dissociation of micelar  $\kappa$ -casein. *Journal of Dairy Research*. 54: 523-534.
- SHARMA, R. y SINGH, H. 1999. Heat stability of recombined milk system as influenced by the composition of fat globule surface layers. *Milchwissenschaft*. 54 (4): 193-196.
- STRZALKOWSKA, N., KRZYZEWSKI, J., ZWIERZCHOWSKI, L. y RYNIOWICZ, Z. 2002. Effects of  $\kappa$ - casein and  $\beta$  - lactoglobulin *loci* polymorphism, cow`s 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*. Institute of Genetics and Animal Bredings, Jastrzbiec, Poland. 20 (1): 21-35 <http://www.ighz.edu.pl/pdf/krzy.pdf>. Consultado Marzo 2005.
- TSIARAS, A.M., BARGOULLI, G.G., BANOS, G y BOSCOS, C.M. 2005. Effect of kappa-casein and beta – lactoglobulin *loci* on milk producction traits and reproductive performance of Holstein Cows. *Journal Dairy Science*. 88: 327-334.
- VAN EENENNAM, A y MEDRANO, J. 1991. Differences in allelic protein expresión in the milk of heterozygous  $\kappa$ -casein cows. *Journal Dairy Science*. 74: 1491-1496.
- VELAZQUEZ, M. 2000. Udder health and milk composition, with special reference to beef cows. A literature review. Swedish University of Agricultural Sciences Skara. Faculty of Veterinary Medicine. Department of Animal Environment and Health. Skara, Suecia. <http://www-mat21.slu.se/publikation/pdf/udderhealth.pdf>. (1 septiembre 2004).

- VERA, C. J. 2000. Contenidos de sodio, potasio, cloruros, calcio, fósforo no proteico y fósforo total en leche de la VIII, IX y X regiones. Tesis Lic. Ingeniería en Alimentos. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia. 84 p.
- VIANA, J., FERNÁNDEZ, A., IGLESIAS, A., SÁNCHEZ, L y BECERRA, J. 2001. Análisis de los genotipos más frecuentes de la  $\kappa$ -caseína en la raza vacuna rubia galega mediante PCR/RFLPs. Archivos de Zootecnia. 50:91-96.
- 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
- WATTIAUX, M.A. 2005. Composición de la leche y valor nutricional. Capítulo 19. Instituto Babcock para la Investigación y Desarrollo internacional de la Industria Lechera. Universidad de Wisconsin-Madison [www.babcock.wisc.edu](http://www.babcock.wisc.edu). Consultado. 5 enero 2006.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1

### Caracterización de las vacas en estudio.

#### Características generales de las vacas en estudio

Nombre	Padre	Nº de Lactancia	Etapa de lactancia al 30/07/03
825	Tauch	2	3 meses 9 días
904	Word	2	2 meses 22 días
1311	Berger	2	2 meses 29 días
1321	Javillo	2	3 meses 27 días
1342	Emblema	2	2 meses 20 días
1353	Javillo	2	2 meses 22 días
1357	Cleiton	2	2 meses 19 días
1376	Cleiton	2	3 meses 20 días
1398	Lacar	2	2 meses
2266	Navajo	2	1 mes

FUENTE: CHILE, CENTRO DE INSEMINACION ARTIFICIAL, Universidad Austral de Chile, (2003)

#### Alimentación del ganado durante los cuatro muestreos

Muestreo 1 (21 Julio 2003)	Muestreo 2 (11 Agosto 2003)	Muestreo 3 (08 sep 2003)	Muestreo 4 (22Sep 2003)
Pradera (Ballica + avena)	Avena Verde	Avena Verde	Pradera (Ballica + avena)
Concentrado 5kg	Concentrado 5kg	Concentrado 5kg	Concentrado 5kg
Núcleo proteico 1kg	Núcleo proteico 1kg	Soya/ afrecho 500g	Melazán 2kg
Melazán 2kg	Melazán 2kg	Sales minerales 250g	Soya/ afrecho 500g
Sales minerales 250g	Sales minerales 250g		Sales minerales 250g

## ANEXO 2

### **Semipurificación de $\kappa$ - caseína de acuerdo al método de McKENZIE y WAKE (1961).**

#### Tratamiento de la muestra.

Se precipita la caseína de aproximadamente 950 ml de leche descremada (obtener alrededor de 20 g de caseína), por adición de HCl 0.1 N hasta obtener un pH de 4.5.

- Se centrifuga a 4000 r.p.m. por 15 min.
- El precipitado se filtra a través de filtros Whatman N°2 u otra forma equivalente
- La caseína obtenida se lava 4 veces con agua destilada centrifugando a 4000 r.p.m por 15 min. Entre cada lavado.
- Luego de los 4 lavados, la caseína se purifica con una re-precipitación isoeléctrica, disolviéndola con hidróxido de sodio diluido (0.05 M).
- Se agrega HCl hasta obtener un pH 4.7.
- Se centrifuga a 4000 r.p.m por 15 min.
- La caseína ácida se disuelve con NaOH 1 N hasta pH 7.0-7.5, y se completa con agua hasta obtener un volumen aproximado de 300 ml.
- Se enfría a 2°C y se agregan 30 ml de CaCl<sub>2</sub> 4 M ajustado a pH 6.5 – 7.0 con NaOH 1 N.
- Se agita continuamente durante 1 hora. Las caseínas sensibles al calcio precipitarán por calentamiento a 35°C.
- El precipitado se remueve a temperatura ambiente por centrifugación a 5500 r.p.m por 60 min.

### ANEXO 3

#### **Electroforesis de isoenfoque en geles de poliacrilamida.**

##### **- Preparación de la muestra (ADDEO *et al.*, 1983)**

0,5% (p/v) de caseína purificada (5-7ul) disueltos en urea 7M que contenga 0,1% de 2- mercaptoetanol.

##### **- Preparación del gel. A partir del método utilizado por Pearce *et al.* citado por CASANOVA 2001 (modificado)**

- 5,5 ml solución de acrilamida (40% acrilamida, 0,6% bis acrilamida en agua).
- 1,1 ml N, N, N', N'- tetrametiletildiamina (TEMED) (1.75% en agua).
- 2,75 ml persulfato de amonio (0,37% en agua).
- 0,55 ml anfolito pH 3.5 – 10 (Sigma A-5174).
- 12,1 ml de agua.

##### **- Buffer electrodos.**

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2% en el ánodo

NaOH 0,02 N en el cátodo.

- Pre-corrída.

200 V x 15 min.

300 V x 30 min.

400 V x 60 min.

##### **- Corrida**

400 V x 13 horas , en refrigeración.

##### **- Fijación, tinción y desteñido de los geles.**

- 30 minutos en solución fijadora (TCA 15%)
- 30 minutos en solución de desteñido (500 ml de Etanol, 160 ml de ácido acético, aforar a un litro con agua destilada).
- 30 minutos en solución de tinción a 60°C (0,46g de Coomassie G250, 400 ml de solución de desteñido)
- Se agrega solución para desteñir



#### ANEXO 4

**Valores obtenidos de pH, termoestabilidad, contenido proteína total, calcio, fósforo en los diferentes muestreos.**

##### Muestreo N° 1 (21 Julio 2003)

<b>Muestras</b>	<b>pH</b>	<b>% Proteína</b>	<b>Calcio (g/L)</b>	<b>Fósforo (%m/m)</b>	<b>Termoest. (s)</b>
825	6,7	3,01	0,9	0,086	65
825	6,7	3,04	1	0,087	65
904	6,7	3,27	1	0,131	68
904	6,7	3,28	1	0,129	68
1311	6,6	2,82	0,9	0,077	60
1311	6,6	2,86	0,9	0,082	60
1321	6,6	2,66	0,9	0,101	60
1321	6,6	2,71	0,9	0,099	60
1342	6,7	2,95	0,9	0,082	65
1342	6,7	2,96	0,8	0,083	65
1353	6,6	3,33	1	0,090	60
1353	6,6	3,37	1	0,088	60
1357	6,7	2,9	1	0,097	68
1357	6,7	2,95	1	0,096	68
1376	6,6	2,86	0,9	0,096	60
1376	6,6	2,87	0,8	0,096	60
1398	6,7	3,07	1	0,094	70
1398	6,7	3,13	0,9	0,095	70
2266	6,7	3,41	0,8	0,100	70
2266	6,7	3,35	0,8	0,099	70
Mezcla	6,7	2,91	0,9	0,079	60
Mezcla	6,7	2,92	0,9	0,083	60

(Continuación ANEXO 4)

**Muestreo N° 2 (11 Agosto 2003)**

<b>Muestras</b>	<b>pH</b>	<b>% Proteína</b>	<b>Calcio (g/L)</b>	<b>Fósforo (%m/m)</b>	<b>Termoest. (s)</b>
825	6,7	3,11	1	0,079	65
825	6,7	3,07	1	0,079	65
904	6,6	3,42	1	0,100	68
904	6,6	3,43	1	0,111	68
1311	6,6	3,08	0,9	0,079	58
1311	6,6	3,07	0,9	0,074	58
1321	6,7	2,87	0,9	0,102	60
1321	6,7	2,84	0,9	0,105	60
1342	6,7	2,99	0,8	0,107	65
1342	6,7	2,98	0,8	0,106	65
1353	6,7	3,22	1,1	0,072	60
1353	6,7	3,25	1,1	0,073	60
1357	6,6	3,22	1	0,077	65
1357	6,6	3,24	1	0,075	65
1398	6,7	3,25	1	0,087	70
1398	6,7	3,23	1	0,087	70
2266	6,7	3,39	1,1	0,093	68
2266	6,7	3,41	1,1	0,085	68
Mezcla	6,7	3,21	1	0,0856	60
Mezcla	6,7	3,19	1,1	0,094	60

(Continuación ANEXO 4)

**Muestreo N° 3 (8 Septiembre 2003)**

<b>Muestras</b>	<b>pH</b>	<b>% Proteína</b>	<b>Calcio (g/L)</b>	<b>Fósforo (%m/m)</b>	<b>Termoest. (s)</b>
825	6,7	2,93	0,94	0,087	70
825	6,7	2,97	0,94	0,084	70
904	6,7	3,17	0,9	0,105	70
904	6,7	3,2	0,9	0,107	70
1311	6,6	2,75	0,9	0,094	60
1311	6,6	2,79	0,9	0,094	60
1321	6,7	2,59	0,9	0,087	58
1321	6,7	2,64	0,9	0,087	58
1342	6,6	2,89	0,9	0,082	65
1342	6,6	2,88	0,9	0,097	65
1353	6,7	3,24	0,9	0,087	58
1353	6,7	3,29	0,9	0,082	60
1357	6,6	2,83	0,9	0,097	68
1357	6,6	2,88	0,9	0,095	66
1376	6,7	2,79	0,99	0,093	60
1376	6,7	2,8	0,9	0,078	60
1398	6,6	3	0,99	0,093	70
1398	6,6	3,05	0,99	0,093	70
2266	6,7	3,32	1,08	0,082	70
2266	6,7	3,27	1,08	0,083	70
Mezcla	6,6	2,84	0,99	0,092	60
Mezcla	6,6	2,85	0,99	0,076	60

(Continuación ANEXO 4)

**Muestreo N° 4 (22 Septiembre 2003)**

<b>Muestras</b>	<b>pH</b>	<b>% Proteína</b>	<b>Calcio (g/L)</b>	<b>Fósforo (%m/m)</b>	<b>Termoest. (s)</b>
825	6,7	3,16	0,72	0,086	65
825	6,7	3,14	0,72	0,078	65
904	6,7	3,15	0,63	0,093	68
904	6,7	3,11	0,63	0,096	67
1311	6,7	3,27	0,72	0,078	68
1311	6,7	3,23	0,72	0,071	66
1321	6,7	3,01	0,54	0,080	60
1321	6,7	3,01	0,54	0,081	60
1342	6,7	3,17	0,81	0,089	68
1342	6,7	3,21	0,81	0,094	70
1353	6,8	3,19	0,81	0,071	60
1353	6,8	3,17	0,81	0,074	60
1357	6,7	3,12	0,81	0,056	70
1357	6,7	3,1	0,81	0,052	70
1376	6,7	3,19	0,63	0,082	60
1376	6,7	3,2	0,63	0,087	60
1398	6,7	2,83	0,828	0,096	60
1398	6,7	2,87	0,828	0,091	60
2266	6,8	3,85	0,72	0,084	70
2266	6,8	3,87	0,72	0,091	70
Mezcla	6,7	3,29	0,72	0,070	69
Mezcla	6,7	3,31	0,72	0,069	70

**ANEXO 5**

**Ecuaciones obtenidas a partir de las curvas de calibración para la determinación del contenido de fósforo para cada muestreo.**

<b>Muestreo N°</b>	<b>Ecuación</b>
<b>1</b>	<b><math>Y = 0,0168X - 0,0193; R^2 = 0,9955</math></b>
<b>2</b>	<b><math>Y = 0,0151X - 0,0043; R^2 = 0,9954</math></b>
<b>3</b>	<b><math>Y = 0,0160X - 0,0079; R^2 = 0,9999</math></b>
<b>4</b>	<b><math>Y = 0,0165X - 0,0149; R^2 = 0,9999</math></b>

## ANEXO 6

**Volumen de muestra utilizada para las electroforesis a partir de las preparaciones de  $\kappa$ -caseína semipurificadas.**

Vacas	Muestras	A	B	C	D	E	F	G
825	1	0,154	38,94	64,90	25	1622,5	64,90	34
	2	0,354	128,25	213,75	25	5353,8	214,15	10
	3	0,211	60,67	101,10	25	2527,5	101,10	22
	4	0,355	111,05	185,08	25	4627,0	185,08	12
904	1	0,214	59,36	98,93	25	2473,3	98,93	22
	2	0,293	102,93	171,55	25	4288,8	171,55	13
	3	0,237	72,64	121,07	25	3026,8	121,07	18
	4	0,307	95,42	159,03	25	3975,8	159,03	14
1311	1	0,193	50,76	84,60	25	2115,0	84,60	26
	2	0,323	115,38	192,30	25	4807,5	192,3	11
	3	0,220	63,49	105,82	25	2645,5	105,82	21
	4	0,345	107,8	179,67	25	4491,8	179,67	12
1321	1	0,342	95,91	159,85	25	3996,3	159,85	14
	2	0,303	107,08	178,47	25	4461,8	178,47	12
	3	0,306	95,10	158,50	25	3962,5	158,5	14
	4	0,151	44,65	74,42	25	3460,8	138,43	16
1342	1	0,112	26,21	43,68	25	1092,0	43,68	50
	2	0,313	111,23	185,38	25	4634,5	185,38	12
	3	0,223	64,43	107,38	25	2684,5	107,38	20
	4	0,426	134,17	223,62	25	3962,5	158,50	14
1353	1	0,361	101,67	169,45	25	1092,0	43,68	50
	2	0,423	156,89	261,48	25	6537,0	261,48	8
	3	0,170	47,81	79,68	25	1992,0	79,68	28
	4	0,411	129,28	215,47	25	5386,8	215,47	10

Donde:

A: Absorbancia a 750 nm.

B:  $\mu\text{g}$  Proteína/0,6 mL.

C:  $\mu\text{g}$  Proteína/1 mL.

D: Dilución

E: Proteína total [ $(\mu\text{g}/\text{mL}) \times (\text{dilución})$ ]

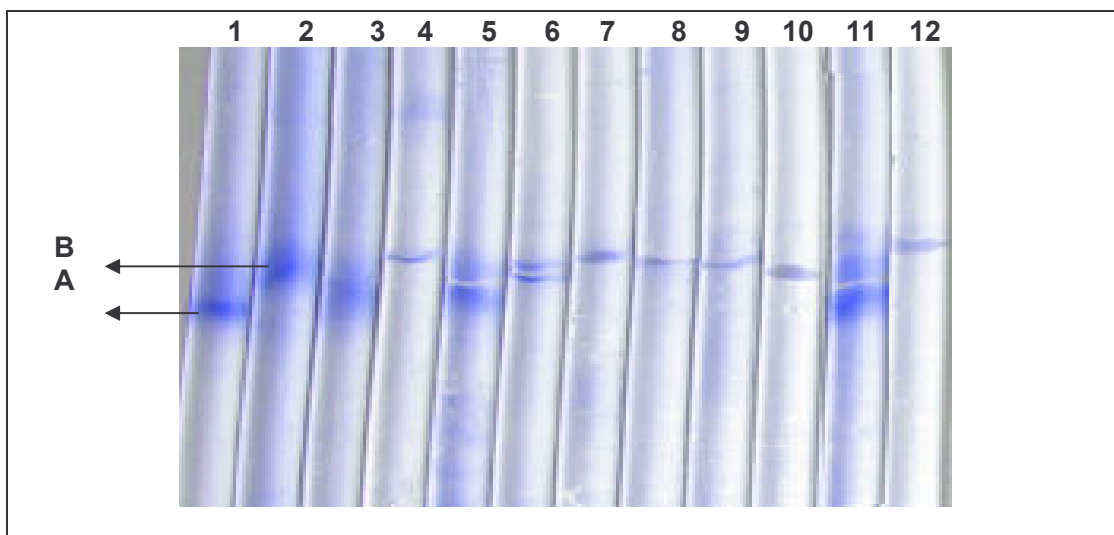
F: Proteína en 40  $\mu\text{L}$  ( $\mu\text{g}$ ).

G: Volumen utilizado en cada electroforesis ( $\mu\text{L}$ ).



## ANEXO 7

Bandas electroforéticas obtenidas para cada muestra en estudio, además de los estándares utilizados.



**FIGURA 1** Electroforesis de isoenfoque para  $\kappa$ -caseína en muestras de leche de vacas Frisón Negro.

Donde:

- 1) Estándar A  $\kappa$ -CN; 2) Estándar B  $\kappa$ -CN; 3) 825; 4) 904; 5) 1311; 6) 1321; 7) 1342; 8) 1353; 9) 1357; 10) 1376; 11) 1398; 12) 2266.



## ANEXO 8

Distancia de migración de las bandas de  $\kappa$  - caseína en cada electroforesis

## Muestreo N° 1

Muestra	Dist. migración de la Muestra (cm)	Dist. migración (cm) Estándar $\kappa$ -CN		Variante identificada
		A	B	
825	4,17	4,05	5,83 y 6,11	A
904	4,99	4,42	4,26 y 4,70	B
1311	5,85	4,05	5,83 y 6,11	B
1321	4,46	4,05	5,83 y 6,11	B
1342	6,37	4,05	5,83 y 6,11	B
1353	5,10	4,05	5,83 y 6,11	B
1357	4,58	4,05	5,83 y 6,11	B
1376	4,97	4,05	5,83 y 6,11	B
1398	4,39	4,42	4,26 y 4,70	A
2266	4,68	4,05	5,83 y 6,11	B
LM	4,09	3,40	4,40	B

## Muestreo N° 2

Muestra	Dist. migración de la Muestra (cm)	Dist. migración (cm) Estándar $\kappa$ -CN		Variante identificada
		A	B	
825	3,44	3,40	4,40	A
904	3,59	3,40	4,40	B
1311	3,99	3,40	4,40	B
1321	3,60 y 4,09	3,40	4,40	AB
1342	3,94	3,40	4,40	B
1353	4,44	3,40	4,40	B
1357	3,51	3,40	4,40	B
1376*	-	-	-	-
1398	4,30	4,42	4,26 y 4,70	A
2266	4,09	3,40	4,40	B
LM	4,86	4,05	5,83 y 6,11	B

- Vaca 1376 con mastitis

(Continuación ANEXO 7)

**Muestreo N° 3**

Muestra	Dist. migración de la Muestra (cm)	Dist. migración (cm) Estándar $\kappa$ -CN		Variante identificada
		A	B	
825	4,02	3,97	4,59	A
904	4,51	3,97	4,59	B
1311	4,01 y 4,54	3,97	4,59	AB
1321	4,08	3,89	4,09	B
1342	4,55	3,97	4,59	B
1353	4,93	3,97	4,59	B
1357	4,52	3,97	4,59	B
1376	4,16	3,97	4,59	B
1398	4,34	3,97	4,59	B
2266	4,48	3,97	4,59	B
LM	4,58	3,97	4,59	B

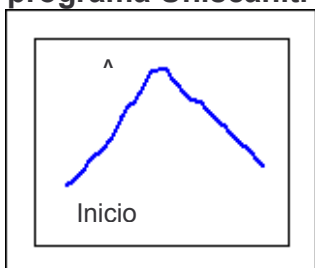
**Muestreo N° 4**

Muestra	Dist. migración de la Muestra (cm)	Dist. migración (cm) Estándar $\kappa$ -CN		Variante identificada
		A	B	
825	3,65	3,89	4,09	A
904	4,09	3,89	4,09	B
1311	3,95 y 4,29	3,89	4,09	AB
1321	4,25	4,42	4,26 y 4,70	A
1342	4,10	3,89	4,09	B
1353	4,53	3,89	4,09	B
1357	4,87	4,42	4,26 y 4,70	B
1376	A/L	A/L	A/L	-
1398	3,81 y 4,48	3,89	4,09	AB
2266	4,71	4,42	4,26 y 4,70	B
LM	4,34	4,42	4,26 y 4,70	B

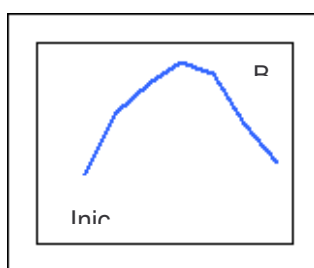
Nota: la medición fue realizada desde el ánodo.

## ANEXO 9

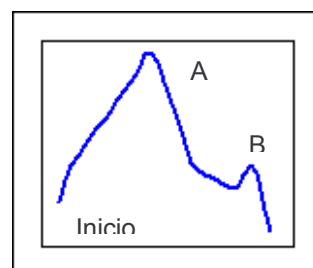
Densitometrias de k-CN de las muestras de leche realizadas con el programa Uniscanit.



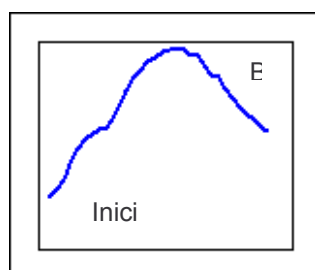
Muestra N° 825



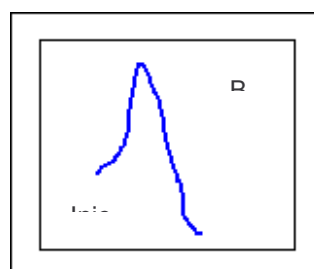
Muestra N° 904



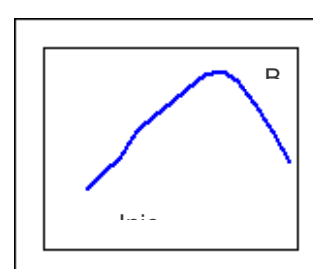
Muestra N° 1311



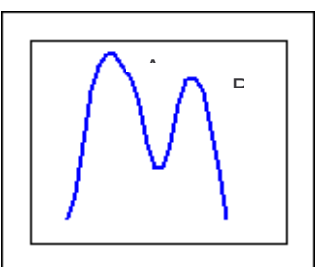
Muestra N° 1342



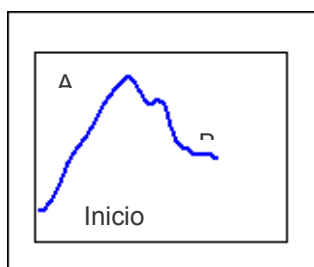
Muestra N° 1353



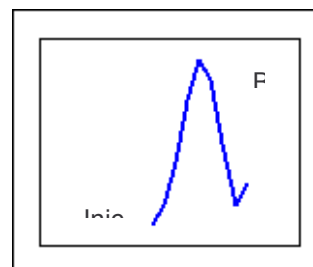
Muestra N° 1357



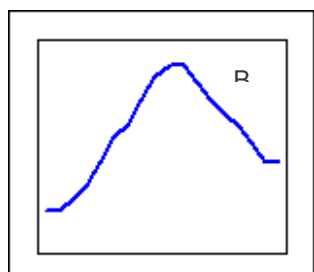
Muestra N° 1321



Muestra N° 1398



Muestra N° 2266



Muestra N° 1376

## ANEXO 10

## Resultados obtenidos según análisis estadístico.

## ➤ Contenido de proteína total

## Análisis de Varianza para proteína total

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	P-valor
Efectos principales					
A: Muestreos	0,721939	3	0,240646	6,12	0,0009
B: k -caseína	0,871118	2	0,435559	11,08	0,0001
RESIDUAL	2,82923	72	0,0392949		
TOTAL (Corregido)	4,39479	77			

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

Test de rango múltiple Tukey 95% por muestreo en relación al contenido de proteína

Muestreos	Cantidad	Promedio	Grupos Homogéneos
3	20	2,962	X
1	20	3,042	XX
2	18	3,171	X
4	20	3,192	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
1 - 2	-0,139698	0,16947
1 - 3	0,076	0,164868
1 - 4	-0,1525	0,164868
2 - 3	*0,215698	0,16947
2 - 4	-0,0128019	0,16947
3 - 4	*-0,2285	0,164868

- Denota diferencia estadísticamente significativa

(Continuación ANEXO 10)

Test de rango múltiple Tukey 95% según variantes genéticas en relación al contenido de proteína

Variantes	Cantidad	Promedio	Grupos Homogéneos
AB	24	2,942	X
A	8	3,053	XX
B	46	3,176	X
Contraste	Diferencia		+/- Limites
AB - B	*-0,233416		0,119532

\*Denota diferencia estadísticamente significativa

### ➤ Contenido de calcio

#### Análisis de Varianza para Calcio

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	P-valor
Efectos principales					
A: Muestras	0,765506	3	0,255169	37,84	0,0000
B: k -caseína	0,0137886	2	0,0068943	1,02	0,3649
RESIDUAL	0,485481	72	0,00674279		
TOTAL (Corregido)	1,26223	77			

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

(Continuación ANEXO10)

Test de rango múltiple Tukey 95% por muestreo en relación al contenido de calcio

Muestras	Cantidad	Promedio	Grupos Homogéneos
4	20	0,722224	X
1	20	0,920424	X
3	20	0,935924	X
2	18	0,979061	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
1 - 2	-0,0586377	0,0702013
1 - 3	-0,0155	0,0682951
1 - 4	*0,1982	0,0682951
2 - 3	0,0431377	0,0702013
2 - 4	*0,256838	0,0702013
3 - 4	*0,2137	0,0682951

\* Denota diferencia estadísticamente significativa

➤ Contenido de fósforo

Análisis de Varianza para Fósforo

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	P-valor
Efectos principales					
A: Muestras	0,00198475	3	0,000661583	4,62	0,0052
B: k -caseína	0,000317448	2	0,000158724	1,11	0,3360
RESIDUAL	0,0103212	72	0,00014335		
TOTAL (Corregido)	0,0126255	77			

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

(Continuación ANEXO 10)

Test de rango múltiple Tukey 95% por muestreo en relación al contenido de fósforo

Muestras	Cantidad	Promedio	Grupos Homogéneos
4	20	0,0798667	X
2	18	0,0868785	XX
3	20	0,0887167	XX
1	20	0,0937667	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
1 - 2	0,00688821	0,0102359
1 - 3	0,00505	0,0099579
1 - 4	*0,0139	0,0099579
2 - 3	-0,00183821	0,0102359
2 - 4	0,00701179	0,0102359
3 - 4	0,00885	0,0099579

\* Denota diferencia estadísticamente significativa

### ➤ Estabilidad Térmica

Análisis de Varianza para Estabilidad térmica

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	P-valor
Efectos principales					
A: Muestras	2,93708	3	0,9790	0,05	0,983
B: k -caseína	132,935	2	66,467	3,64	0,031
RESIDUAL	1314,22	72	18,253		
TOTAL (Corregido)	1450,99	77			

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

(Continuación ANEXO 10)

Test de rango múltiple Tukey 95% según variantes genéticas en relación a la estabilidad térmica

Variantes	Cantidad	Promedio	Grupos Homogéneos
AB	24	62,75	X
B	46	65,40	X
A	8	66,25	XX
Contraste	Diferencia		+/- Limites
AB - B	*-2,65094		2,57621

\* Denota diferencia estadísticamente significativa

#### ➤ Producción de leche

Análisis de Varianza para producción de leche

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	P-valor
Efectos principales					
A: Muestras	25,5774	3	8,52579	1,64	0,1881
B: k -caseína	20,8051	2	10,4026	2,00	0,1430
RESIDUAL	374,756	72	5,20494		
TOTAL (Corregido)	421,615	77			

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