

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**ESTUDIO DEL POLIMORFISMO DE LAS PROTEÍNAS DE LECHE**

**DE OVEJA DE LAS RAZAS MANCHEGA Y SEGUREÑA.**

**APTITUD A LA COAGULACIÓN Y RENDIMIENTO QUESERO.**

Memoria que para optar al grado de

DOCTOR EN VETERINARIA

presenta

GLORIA LÓPEZ GÁLVEZ

Madrid, 1993



**MERCEDES RAMOS GONZALEZ, DRA. EN FARMACIA, PROFESOR DE INVESTIGACION DEL INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES DEL C.S.I.C.**

**C E R T I F I C A:** que el presente trabajo titulado "Estudio del polimorfismo de las proteínas de leche de oveja de las razas Manchega y Segureña. Aptitud a la coagulación y rendimiento quesero" y que constituye la Memoria que presenta la Licenciada Gloria López Gálvez para optar al grado de Doctor, ha sido realizado en el Instituto de Fermentaciones Industriales y en el Instituto del Frio del C.S.I.C., bajo mi dirección y la de la Dra. Manuela Juárez, Profesor de Investigación del C.S.I.C.

Y para que conste firmo el presente certificado en Madrid a veintinueve de Enero de mil novecientos noventa y tres.

Manuela Juárez

Mercedes Ramos



*A mi madre*

*Esta Tesis se ha realizado en el Instituto de Fermentaciones Industriales y el Instituto del Frío bajo la dirección de las doctoras Mercedes Ramos y Manuela Juárez a quienes quiero agradecer sus valiosas directrices y sugerencias que han posibilitado no sólo la realización de este trabajo sino también mi formación investigadora.*

*Una parte de esta Tesis ha sido realizada en el Instituto de Industrias Agrarias de la Universidad de Nápoles. Deseo expresar mi gratitud a la Dra. Lina Chianese y al Prof. Francesco Addeo ya que con su experiencia y dedicación se ha llegado a concluir un importante capítulo de este trabajo. Asimismo agradezco al Dr. Luigi Moio su amabilidad al facilitarme parte del material inmunológico.*

*Quiero agradecer a la Dra. Carmen San José su atenta disposición al haber aceptado officinar de ponente de esta Tesis.*

*Deseo destacar la labor del Dr. Pedro Martín por su contribución en el tratamiento estadístico de los resultados. Dejo constancia de mi agradecimiento a los doctores Salvio Jiménez y Ángel Goicoechea por su ayuda en las determinaciones viscosimétricas. Quiero también expresar mi reconocimiento al Dr. Agustín Olano por su apoyo y sugerencias durante la realización de este trabajo.*

*Asimismo quiero agradecer a D<sup>a</sup> Ana Garzón, al Dr. Juan Carlos Boixo, al Dr. Rafael Caballero y al Dr. Miguel Cruz por su ayuda a la obtención de muestras de leche de oveja. Igualmente agradezco al Sr. Rosique y al Sr. Heredia la cesión de los equipos automatizados de análisis de composición.*

*Agradezco al Ministerio de Educación y Ciencia la concesión de una beca de Formación de Personal Investigador y a la Dra. Carmen Polo y al Dr. José Miguel Díaz, directores del Instituto de Fermentaciones Industriales y el Instituto del Frío respectivamente, por las facilidades con las que he contado para que esta Tesis pudiera llevarse a cabo.*

*Deseo dejar testimonio de agradecimiento a todas las personas que de un modo u otro han colaborado en la realización de esta Tesis, especialmente a mis compañeros de laboratorio por su constante ayuda y apoyo y la amistad que me han brindado durante estos años.*

*Finalmente deseo agradecer a mi familia y a mis amigos, y muy especialmente a Antonio, por su estímulo y apoyo sin los que no habría podido completar este trabajo.*

***INDICE***

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1. Composición y propiedades de la leche de oveja</b> .....	4
1.1.1. Características generales de la leche de oveja .....	4
1.1.2. Composición media. Factores de variación .....	5
<b>1.2. Variantes genéticas de proteínas lácteas</b> .....	6
1.2.1. Variantes genéticas en proteínas de leche de vaca ....	8
1.2.2. Variantes genéticas en proteínas de leche de oveja ...	12
<b>1.3. La aptitud quesera de la leche</b> .....	20
1.3.1. Características del coágulo .....	21
1.3.1.1. Fracción proteica .....	21
1.3.1.2. Calcio soluble y fosfato calcico coloidal .....	25
1.3.2. Rendimiento quesero .....	27
<b>1.4. Influencia de las variantes genéticas de proteínas lácteas en la aptitud quesera de la leche</b> .....	30
1.4.1. Influencia de las variantes genéticas en la composición de la leche .....	30
1.4.2. Influencia de las variantes genéticas en las propiedades de coagulación de la leche .....	32
1.4.2.1. Variantes de $\kappa$ -caseína .....	32
1.4.2.2. Variantes de $\alpha_{s1}$ -caseína .....	34
1.4.2.3. Variantes de $\beta$ -caseína .....	34
1.4.2.4. Fenotipos compuestos .....	35
1.4.2.5. $\beta$ -lactoglobulinas .....	35
1.4.3. Influencia de las variantes genéticas en la sinéresis de la cuajada .....	37
1.4.4. Influencia de las variantes genéticas en el rendimiento y calidad del queso .....	38
<b>1.5. Mejora genética en el ganado lechero</b> .....	41
<b>2. OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO</b> .....	44
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	46
<b>3.1. Muestras de leche</b> .....	46
<b>3.2. Análisis de composición físico-química</b> .....	47
3.2.1. Determinación del pH .....	47
3.2.2. Análisis de la composición química global .....	47
3.2.3. Determinación del contenido en calcio .....	49
<b>3.3. Aislamiento y purificación de proteínas lácteas</b> .....	50
3.3.1. Métodos de precipitación química .....	50
3.3.1.1. Obtención de caseínas y seroproteínas .....	50
3.3.1.2. Obtención de $\beta$ -lactoglobulinas .....	52
3.3.2. Métodos cromatográficos .....	53
3.3.2.1. Fraccionamiento de las caseínas mediante cromatografía de intercambio iónico .....	53

3.3.2.2. Fraccionamiento de las caseínas mediante cromatografía de afinidad .....	54
<b>3.4. Análisis de la fracción proteica .....</b>	<b>56</b>
3.4.1. Electroforesis .....	57
3.4.1.1. Electroforesis de las caseínas .....	57
3.4.1.2. Electroforesis de las proteínas de suero .....	61
3.4.2. Isoelectroenfoque .....	62
3.4.2.1. Isoelectroenfoque de las caseínas .....	62
3.4.2.2. Isoelectroenfoque de las proteínas de suero .....	69
3.4.2.3. Isoelectroenfoque de leche entera .....	72
3.4.3. Electroforesis bidimensional .....	73
3.4.3.1. Electroforesis bidimensional de las caseínas .....	73
3.4.3.2. Electroforesis bidimensional de las proteínas de suero .....	74
Métodos de tinción .....	75
Métodos de secado .....	76
Métodos de medida .....	76
3.4.4. Inmunotransferencia .....	77
3.4.4.1. Inmunosueros .....	77
3.4.4.2. Metodología .....	78
<b>3.5. Aptitud a la coagulación .....</b>	<b>80</b>
3.5.1. Determinación de las características del coágulo .....	80
3.5.1.1. Equipos de medida .....	80
3.5.1.2. Parámetros trombodínamográficos .....	84
3.5.2. Determinación del rendimiento quesero .....	86
3.5.2.1. Fabricación de quesos a escalas semipiloto y laboratorio .....	86
3.5.2.2. Elaboración de quesos a partir de leches individuales .....	89
3.5.2.3. Expresión de los resultados .....	89
<b>3.6. Análisis estadístico .....</b>	<b>91</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>92</b>
<b>4.1. Polimorfismo de las proteínas de leche de oveja .....</b>	<b>92</b>
4.1.1. Fracción caseínica de la leche de oveja .....	92
4.1.1.1. Electroforesis. Inmunotransferencia .....	92
4.1.1.2. Isoelectroenfoque .....	104
4.1.1.3. Electroforesis bidimensional. Inmunotransferencia .....	126
4.1.1.4. Fraccionamiento de las caseínas mediante técnicas cromatográficas .....	132
4.1.1.5. Distribución de fenotipos .....	139
4.1.2. Fracción seroproteica de la leche de oveja .....	143
4.1.2.1. Aplicación de técnicas electroforéticas monodimensionales .....	143
4.1.2.2. Aplicación de técnicas electroforéticas bidimensionales. Inmunotransferencia .....	151
4.1.2.3. Distribución de fenotipos .....	159

4.1.3. Estudio conjunto de las caseínas y seroproteínas de leche de oveja mediante isoelectroenfoque .....	162
<b>4.2. Aptitud quesera de la leche de oveja .....</b>	<b>163</b>
4.2.1. Composición físico-química de la leche de oveja .....	165
4.2.1.1. Composición química global y pH .....	165
4.2.1.2. Composición proteica .....	169
4.2.2. Características del coágulo de la leche de oveja .....	172
4.2.2.1. Determinación de las características del coágulo mediante tromboelastografía .....	173
4.2.2.2. Empleo del formógrafo para la determinación de las características del coágulo .....	180
4.2.3. Rendimiento quesero de leche de oveja .....	192
4.2.3.1. Comparación de los rendimientos queseros obtenidos a escala semipiloto y escala de laboratorio .....	192
4.2.3.2. Rendimientos queseros de las leches individuales .	194
<b>4.3. Estudio estadístico de los resultados .....</b>	<b>197</b>
4.3.1. Aplicación del análisis de conglomerados .....	197
4.3.2. Influencia del polimorfismo de las proteínas lácteas en la aptitud quesera de la leche de oveja ...	202
4.3.2.1. Influencia de las proteínas de suero .....	202
4.3.2.2. Influencia de las caseínas .....	207
 <b>5. CONCLUSIONES .....</b>	 <b>210</b>
 <b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	 <b>212</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

EF	Electroforesis
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-agarosa
disc-PAGE	Electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida
IEF	Isoelectroenfoque, enfoque isoeléctrico
PAGIF	Isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida
UTLIEF	Isoelectroenfoque en gel ultrafino
EF-2D	Electroforesis bidimensional
SDS	Dodecil sulfato sódico
TEMED	N, N, N', N'-Tetrametiletildiamina
NC	Nitrocelulosa
PBS	Solución Tampón Fosfato
WB	Solución Tampón de lavado
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
ATC	Acido tricloroacético
DEAE	Dietilaminoetil
EST	Extracto seco total
pI	Punto isoeléctrico
CN	Caseína
SR	Super-rápida
Lg	Lactoglobulina
La	Lactoalbúmina
SA	Seroalbúmina
Ig	Inmunoglobulinas
sat	Satélite
T1, T2, T3	Tipos de caseínas con 3 bandas en el complejo $\alpha_s$ observados del análisis mediante electroforesis a pH alcalino.
Q1, Q2	Tipos de caseínas con 4 bandas en el complejo $\alpha_s$ observados del análisis mediante electroforesis a pH alcalino.
C	Tipo de caseínas con 5 bandas en el complejo $\alpha_s$ observado del análisis mediante electroforesis a pH alcalino.
S	Tipo de caseínas con 6 bandas en el complejo $\alpha_s$ observado del análisis mediante electroforesis a pH alcalino.
"r"	Tiempo de coagulación
"v"	Velocidad de coagulación
"Am"	Elasticidad máxima del coágulo
FIL/IDF	Federación Internacional de Lechería
DSA	Dairy Science Abstracts
FESLAC	Fundación de Estudios Lácteos
GCTA	Grupo de Cromatografía y Técnicas Afines

## **1. INTRODUCCIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

Aunque en el contexto de la producción láctea mundial la leche de oveja ocupa el tercer lugar, después de las de vaca y búfala, en algunos países mediterráneos ha alcanzado una importancia económica considerable debido a la aceptación de los productos elaborados, principalmente queso. El queso de oveja presenta unas características organolépticas muy apreciadas y alcanza precios en el mercado superiores a los del queso de vaca.

La producción láctea ovina en España tiene tres orígenes: rebaños especializados, razas de doble aptitud leche-carne con ordeño opcional y razas no lecheras donde la eventualidad del ordeño depende del momento del destete o sacrificio de los corderos, del estado de los pastos y de la predisposición de los pastores asalariados para ordeñar; existen 4 áreas principales que se dedican a la producción de leche de oveja:

- Castilla-León: razas Churra y Castellana.
- La Mancha: raza Manchega.
- Norte: raza Lacha.
- Extremadura: raza Merina.

En España la producción de leche de oveja se elevó en 1990 a 320 millones de litros, lo que la sitúa entre los principales productores europeos, detrás de Turquía, Italia, Grecia, Rumanía y Bulgaria, y en tercer lugar entre los países de la Comunidad Europea.

Debido a las cotas impuestas por la CE a la producción lechera bovina y a la gran competencia a que están sometidos los productos lácteos españoles elaborados con leche de vaca en el contexto europeo, en los últimos años la leche de oveja en España ha tomado un nuevo auge; prueba de ello es el notable incremento (67%) en la producción desde 1980 a 1990 (tabla 1.1).

**Tabla 1.1. Producción (millones de litros) y destino de la leche de oveja en España desde 1980 a 1990. (Tomada del MAPA, 1991).**

Años	Producción total	Consumo directo	Consumo industrial
1980.....	191	8	183
1983.....	236	7	229
1984.....	238	7	231
1985.....	224	5	219
1986.....	245	6	239
1987.....	233	3	230
1988.....	263	2	261
1989.....	276	2	273
1990.....	320	2	318

Tal y como puede apreciarse en la tabla 1.1, de la leche de oveja producida en España durante 1990 se destinó más del 99% al tratamiento industrial. De los productos lácteos elaborados con leche de oveja destacan principalmente los quesos y, entre ellos, los elaborados con Denominación de Origen (Caja, 1991).

En la tabla 1.2 se recogen los quesos elaborados en España a partir de leche de oveja sólo o con mezcla de leche de vaca y cabra. A estos quesos habría que añadir otros quesos artesanales de producción reducida pero de características muy apreciadas, como el Queso Segureño (elaborado con leche de oveja Segureña), y que posiblemente en un futuro se incluyan en el catálogo de Quesos de España.

Tabla 1.2. Quesos españoles elaborados con leche de oveja. (Tomada de Sánchez-Belda y Sánchez-Trujillano, 1986).

Denominación	Composición			Características						Otras
	Oveja solo	Oveja con		Fresco	Blando	Duro no cocido	Pasta Azul	Forma	Peso (kg)	
		Cabra	Vaca							
1. Avila		+	+			+		c	0,1-3	Ahumado
2. Andévalo	+				+			c	1,2-1,5	
3. Aralar	+					+		c	1,5-2,5	Ahumado
4. Bogajo	+				+			c	1,5-2	
5. Burgos	+			+				c	1 -2	
6. Burriana	+			+				c	1 -1,5	
7. Cabrales		+	+				+	c	2 -5	
8. Calahorra (de la)	+					+		c	2 -3	
9. Carranzana	+				+			d	0,5	
10. Castellano	+					+		c	2 -3,5	
11. Entzia	+					+		c	1,5-2	Ahumado
12. Gáldar		+				+		d	0,5-1	
13. Gamonedo		+	+				+	c	2 -5	
14. Gaztazarra	+				+					Contenido en tarro
15. Gorbea	+					+		c	0,5-1	
16. Grazalema	+					+		c	2 -3	
17. Herreño		+				+		d	1 -1,5	Ahumado a rayas
18. Huelva	+					+		c	1 -1,5	Impregnado aceite
19. Ibiza	+					+		c/b	1 -2	Atado para colgar
20. Idiazábal	+					+		c	1,5-2	Ahumado
21. Lebeña		+	+	+				c	0,5-1	
22. Mahón			+			+		p	2 -4	
23. Majorero		+		+		+		c	1 -1,5	
24. Manchego	+					+		c	2,5-3,5	
25. Orbaiceta	+					+		c	1 -1,5	
26. Orduña	+					+		c	1,5-2,5	Ahumado
27. Oropesa	+					+		c	1,5-2	
28. Palmero		+				+		c	1 -1,5	Ahumado
29. Pedroches	+					+		c	1,5-2,5	
30. Puzol		+		+				d	0,2-0,5	Cazoleta
31. Quesucos	+		+	+				d	0,1-0,2	
32. Roncal	+					+		c	1,8-2	
33. Serena	+				+			ci	1,01-1,5	
34. Serrat	+					+		c	2 -2,5	
35. Torta del Casar	+				+			ci	1 -1,5	
36. Treviso		+	+				+	c	2 -3	
37. Tronchón		+				+		c	0,5-1,5	Escudillado
38. Tupí	+			+						Contenido en tarro
39. Urbasa	+					+		c	1,5-2,5	
40. Veyos (de los)		+	+			+		c	2 -2,5	
41. Villalón	+			+				c/b	0,5-2	
42. Zamorano	+					+		c	2 -2,5	

Claves: c: Cilíndrica; d: Discoidal; ci: Cilíndrica aplanada y contorno irregular; p: Paralelepípeda (cantos y ángulos redondeados); c/b: Cilíndrica en barra.

## 1.1. COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES DE LA LECHE DE OVEJA.

### 1.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA LECHE DE OVEJA

Assenat (1991) resume las características generales de la leche de oveja en los siguientes puntos:

- En la observación visual, la leche de oveja es de color blanco nacarado, semejante a la porcelana. Su opacidad y viscosidad es mayor que la de las leches de vaca y de cabra.

- La leche de oveja es especialmente rica en grasa y proteínas. Así, para cantidades iguales de leche, con la leche de oveja se obtiene un rendimiento quesero muy superior (aproximadamente el doble) al de la leche de vaca.

- La acidez de la leche de oveja, expresada en grados Dornic, se sitúa en el intervalo entre 18 y 22.

- La leche de oveja tiene un olor *sui generis*, característico del animal que la produce, aunque es relativamente débil en la leche recogida en buenas condiciones.

- La leche de oveja tiene una resistencia especialmente elevada a la proliferación de bacterias en las primeras horas, que se debe atribuir, en parte, a la actividad inmunológica típica de esta leche. A esto se añade el alto contenido en minerales de la leche de oveja, que implica una capacidad tampón claramente superior a la de la leche de vaca, lo que representa una ventaja clara a su conservación; en cambio puede ser un inconveniente para el tratamiento de esta leche fresca ya que ofrece una resistencia mayor a las fermentaciones lácticas.

- La leche de oveja produce una cuajada dura, mucho más que la que haría suponer la relación entre los rendimientos queseros de la leche de vaca y de oveja (en promedio 1:2).

- Los productos queseros obtenidos de la leche de oveja tienen ciertas particularidades en su aspecto y sabor. La pasta es, en general, más blanca que la obtenida con leche de vaca y es menos frecuente la aparición de sabores amargos, hecho que se

atribuye a la menor susceptibilidad de las caseínas ovinas a la proteólisis. Los sabores típicos y más intensos que tienen la mayor parte de los quesos de leche de oveja se deben principalmente a la materia grasa: los triglicéridos de la leche de esta especie tienen una mayor proporción de ácidos grasos de cadena corta en comparación con la leche de vaca; así, destaca una proporción particularmente alta de los ácidos caprílico y cáprico.

### 1.1.2. COMPOSICIÓN MEDIA. FACTORES DE VARIACIÓN

Dado que la producción de leche de oveja se limita a muy pocos países, los datos que conciernen a su composición no son tan abundantes como los publicados para leche de vaca.

La tabla 1.3 recoge los intervalos de composición media de leche de oveja. La composición de la leche de esta especie está influida por distintos factores, semejantes a aquellos que afectan a la composición de la leche de vaca (Juárez, 1985); estos factores son fundamentalmente la raza, el estado de lactación, el estado sanitario, la alimentación, la estación del año y, en general, las técnicas de manejo y explotación del ganado lechero, entre las que se incluyen los sistemas de ordeño (Núñez, 1989).

**Tabla 1.3. Intervalos de composición media de leche de oveja recogidos de la bibliografía. (Tomada de Juárez y Ramos, 1984).**

Sólidos totales (%) _____	15,8 - 23,4
Grasa (%) _____	4,54 - 12,6
Proteínas (%) _____	4,3 - 6,77
Caseínas (%) _____	4,27 - 4,51
Lactosa (%) _____	4,19 - 5,25
Cenizas (%) _____	0,79 - 0,95

Es necesario puntualizar que la curva de producción anual de leche de oveja depende del sistema de explotación. En sistemas extensivos la leche se produce en primavera y verano; en sistemas mixtos entre Octubre y Julio y, en sistemas intensivos el periodo de producción puede abarcar casi todo el año. El efecto de la estacionalidad de la producción en la composición de la leche de oveja ha sido estudiado por Askar y col. (1984) quienes han observado que la leche producida en invierno contiene un mayor porcentaje de sólidos totales, grasa y cenizas y menor contenido en sólidos no grasos y proteínas, además de valores superiores para el pH.

## **1.2. VARIANTES GENÉTICAS DE PROTEÍNAS LÁCTEAS**

Con la expresión "variantes genéticas de proteínas lácteas" se definen las formas genéticas de cada proteína con diferente composición de aminoácidos. Existe además un polimorfismo no genético debido a distintos grados de glicosilación o fosforilación de las cadenas peptídicas.

Desde 1955 en que Aschaffenburg y Drewry descubren la existencia de polimorfismo en una proteína láctea, la  $\beta$ -Lg, han sido muchas las investigaciones que se han llevado a cabo en este tema, fundamentalmente en leche de vaca. Actualmente se sabe que las principales proteínas de la leche se presentan bajo 2, 3, 4 ó 5 formas genéticas. Las variantes se designan con letras mayúsculas (A, B, C, D y E). Existen individuos homocigotos (AA, BB, CC, etc.) que producen una sola variante; por el contrario, la leche de los individuos heterocigotos contiene una mezcla de dos variantes (AB, AC, BC, etc.).

Las variantes de una proteína se distinguen por mínimas diferencias de composición. En general, se trata de la sustitución de 1 ó 2 aminoácidos en las cadenas peptídicas. A veces hay una delección, es decir, falta un fragmento en una cadena. Cuando

las variaciones originan un cambio en la carga neta de la molécula se pueden detectar aplicando métodos electroforéticos; son los progresos de estos métodos analíticos los que están permitiendo descubrir nuevas variantes genéticas.

Se ha comprobado que en algunos casos las variaciones no dan lugar a cambios en la carga de la molécula: son las denominadas "variantes silenciosas", cuya detección parece posible mediante técnicas de HPLC ("High Performance Liquid Chromatography") (Fox, 1992).

En los últimos años se están perfeccionando los métodos inmunológicos para su aplicación a la identificación de proteínas lácteas. Los inmunoensayos han demostrado ofrecer ventajas sobre los métodos convencionales ya que además de su sencillez de ejecución permiten la cuantificación; en esta línea Rodríguez y col. (1990) han aplicado la técnica ELISA a la detección de leche de vaca en leche y quesos de oveja.

Recientemente, mediante la técnica PCR ("Polymerase-catalyzed Chain Reaction") se han analizado las secuencias de ADN de sangre y semen para su aplicación a la investigación de polimorfismos genéticos lácteos (Fox, 1992).

El polimorfismo de varias proteínas puede depender de *loci* estrechamente ligados o confundidos sobre los cromosomas. Esto se ha demostrado para las caseínas  $\alpha_s$  y  $\beta$  por el estudio de la descendencia de toros heterocigotos: el padre no transmite todas las combinaciones posibles a su descendencia (Grosclaude, 1979).

En general en las especies estudiadas se ha descrito una mayor heterogeneidad para las caseínas que para las seroproteínas lácteas. Ribadeau-Dumas (1988) explica este hecho aduciendo que durante la evolución las caseínas solamente han conservado las características que les permiten ser secretadas en la glándula mamaria, formar micelas y ser fácilmente degradadas en el tracto digestivo; la evolución de las seroproteínas ha sido más lenta ya que tienen una función biológica determinada perteneciendo cada

una de ellas a una familia de proteínas: la de la lisozima para la  $\alpha$ -La y la de las proteínas capaces de transportar pequeños ligandos hidrofóbicos para la  $\beta$ -Lg. La  $\alpha$ -La ha perdido residuos característicos asociados a la catálisis de la lisozima, pero ha adquirido nuevos sitios de unión para la galactosil-transferasa y, probablemente, iones calcio. La función de la  $\beta$ -Lg parece estar relacionada con el transporte de retinol (Godovac-Zimmermann y col., 1985; Godovac-Zimmermann y Braunitzer, 1987) y, debe haber conservado durante la evolución tanto los residuos de aminoácidos involucrados en la unión al retinol como los asociados a interacciones con un receptor.

Las investigaciones sobre variantes genéticas de proteínas lácteas tiene un gran interés tecnológico, ya que han demostrado ejercer una clara influencia sobre las propiedades de la leche relacionadas con el tratamiento térmico y la aptitud quesera de la misma.

Por otra parte, el estudio de las variaciones genéticas lácteas es interesante desde el punto de vista genético y la selección del ganado. Sin embargo aún existen muchas lagunas y preguntas abiertas con respecto a este tema. Por ejemplo, no se sabe si el predominio de un determinado tipo genético es el resultado de mutaciones recientes o bien está en relación con otras características base de la selección en zootecnia (conformación animal, producción de carne, etc.).

#### **1.2.1. VARIANTES GENÉTICAS EN PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA**

Una excelente revisión sobre las variantes genéticas de las proteínas de leche de vaca es la realizada por Grosclaude (1988).

En la tabla 1.4 se recogen algunas características de las proteínas lácteas bovinas.

En la tabla 1.5 se indican las variantes genéticas de las caseínas y seroproteínas así como la frecuencias génicas de estas variantes descritas en las razas bovinas francesas. Estos datos

son muy similares a los recopilados por Fox (1982) por lo que se pueden considerar representativos del resto de las razas bovinas.

En la figura 1.1 se indican las diferencias bioquímicas y relaciones filogenéticas entre las variantes genéticas de las caseínas y seroproteínas lácteas bovinas.

Uno de los resultados más interesantes del análisis del polimorfismo de las proteínas lácteas bovinas ha sido la puesta en evidencia de un posible ligamiento genético entre los locus de estructura de las 4 caseínas. Este ligamiento se traduciría a nivel de población por el denominado "desequilibrio de ligamiento", esto es, una asociación no aleatoria de los alelos de estos locus. Concretamente, este desequilibrio de unión da lugar, mediante la transmisión mendeliana de padres a descendientes, a combinaciones prácticamente indisociables de los alelos de los 4 locus, denominadas "haplotipos", término utilizado por los especialistas genéticos para designar este tipo de fenómenos. El haplotipo del grupo de caseínas  $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$  y  $\kappa$  bovinas más frecuente en la raza Flamande ha sido el BA<sup>1</sup>A, en las razas Holstein, Monbéliarde y Tarentaise el BA<sup>2</sup>A y en la raza Normanda el BBB (Grosclaude, 1988). El locus de la  $\beta$ -Lg no parece estar ligado al locus de las caseínas ni tampoco se han encontrado relaciones con el locus de la  $\alpha$ -La que podría ser independiente.

Tabla 1.4. Algunas características de las proteínas de leche de vaca. (Tomada de Grosclaude, 1988).

	Número de restos de aminoácidos	Número de grupos fosfato	Presencia de grupos glucídicos	Cantidad en la leche (g/l)	Proporción relativa de caseínas
Caseína $\alpha_{s1}$	199	8-9 (1)	-	10,3	} 27 38
Caseína $\alpha_{s2}$	207	10-13 (1)	-	2,7	
Caseína $\beta$	209	5	-	10,5	
Caseína $\kappa$	169	1-2 (1)	si (1)	3,5	
$\alpha$ -lactalbumina	123	-	-	1,2	13
$\beta$ -lactoglobulina	162	-	-	3,1	

(1) Existe heterogeneidad en el número de grupos fosfato (caseínas  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  y  $\kappa$ ) y de grupos glucídicos (caseína  $\kappa$ ).

Tabla 1.5. Frecuencias alélicas del locus de las proteínas lácteas bovinas. (Tomada de Grosclaude, 1988).

Raza	Año	N	$\alpha_{s1}$ -Cn				$\alpha_{s2}$ -Cn		$\beta$ -Cn					$\kappa$ -Cn		$\alpha$ -La		$\beta$ -Lg		
			A	B	C	D	A	D	A <sup>1</sup>	A <sup>2</sup>	A <sup>3</sup>	B	C	A	B	A	B	D		
Abondance	1985	127	-	0,78	0,22	-	1	-	0,12	0,79	-	0,07	0,02	0,56	0,44	-	1	0,62	0,37	0,1
Aubrac	1982	94	-	0,97	0,02	0,01	1	-	0,08	0,90	-	0,01	0,01	0,62	0,38	-	1	0,54	0,46	-
Bazadaise	1965	44	-	0,90	0,09	0,01	1	-	(0,97) (2)		0,03	-	n. a.	-	1	0,46	0,54	-	-	
Blonde d'Aquitaine	1968	161	-	0,84	0,14	0,02	1	-	0,21	0,71	-	0,08	-	0,65	0,35	n. a. (1)	-	n. a.	-	
Bretonne Pie-Noire	1985	83	-	0,93	0,07	-	1	-	0,31	0,55	-	0,04	0,10	0,60	0,40	-	1	0,30	0,70	-
Bruce des Alpes	1979	155	-	0,93	0,06	0,01	1	-	0,33	0,46	-	0,18	0,03	0,52	0,48	-	1	0,52	0,48	-
Charolaise	1986	152	-	0,92	0,08	-	1	-	0,10	0,76	-	0,13	0,01	0,49	0,51	-	1	0,67	0,33	-
Ferrandaise	1979	81	-	0,91	0,09	-	1	-	0,22	0,72	-	0,02	0,04	0,72	0,28	-	1	0,61	0,39	-
Fiamande	1971	298	-	0,80	0,12	0,08	1	-	0,41	0,53	-	0,06	-	0,85	0,15	-	1	0,58	0,42	-
F.F.P.N.	1965	366	-	0,99	0,01	-	1	-	(0,95) (2)		0,05	-	0,66	0,34	-	1	0,56	0,44	-	
Holstein	1967	281	<0,01	0,97	0,03	-	1	-	0,53	0,45	0,01	0,01	-	0,71	0,29	n. a.	-	n. a.	-	
Limousine	1973	40	-	0,70	0,29	0,01	1	-	0,09	0,74	-	0,12	0,05	0,40	0,60	0,01	0,99	0,62	0,38	-
Maine-Anjou	1973	39	-	0,96	0,04	-	1	-	0,60	0,36	-	0,03	0,01	0,72	0,28	n. a.	-	n. a.	-	
Montbéliarde	1965	350	-	0,91	0,09	-	n. a. (1)	-	0,15	0,64	-	0,19	0,02	0,63	0,37	-	1	0,52	0,46	0,02
" "	1976	646	-	0,87	0,13	0,01	0,99	0,01	0,22	0,60	-	0,17	0,01	0,63	0,37	-	1	0,39	0,59	0,02
Normande	1965-6	155	-	0,81	0,19	-	1	-	0,20	0,32	0,02	0,45	0,01	0,34	0,66	-	1	0,48	0,52	-
" "	1972	318	-	0,82	0,18	-	1	-	0,19	0,29	0,04	0,47	0,01	0,34	0,66	n. a.	-	n. a.	-	
Parthenaise	1984	174	-	0,85	0,15	-	1	-	0,29	0,47	-	0,22	0,02	0,56	0,44	-	1	0,37	0,63	-
Salers	1979	161	-	0,96	0,04	-	1	-	0,19	0,70	-	0,11	-	0,53	0,46	-	1	0,63	0,36	-
Tarentaise	1967	286	-	0,86	0,14	-	1	-	0,26	0,59	-	0,04	0,11	0,63	0,37	-	1	0,47	0,53	-
Tachetée de l'Est	1979	142	-	0,90	0,10	-	1	-	0,28	0,63	-	0,03	0,06	0,60	0,40	-	1	0,38	0,62	-
Villars de Lans	1976	56	-	0,86	0,10	0,04	1	-	0,21	0,68	-	0,11	-	0,47	0,53	-	1	0,50	0,50	-
Vosgienne	1975	246	-	0,91	0,09	-	0,91	0,09	0,24	0,70	-	0,02	0,04	0,48	0,52	0,01	0,99	0,57	0,43	<0,01

N. Número de muestras

(1) n. a.: no analizado

(2) Frecuencia de  $\beta$ -CN A<sup>1</sup> +  $\beta$ -CN A<sup>2</sup> +  $\beta$ -CN A<sup>3</sup>

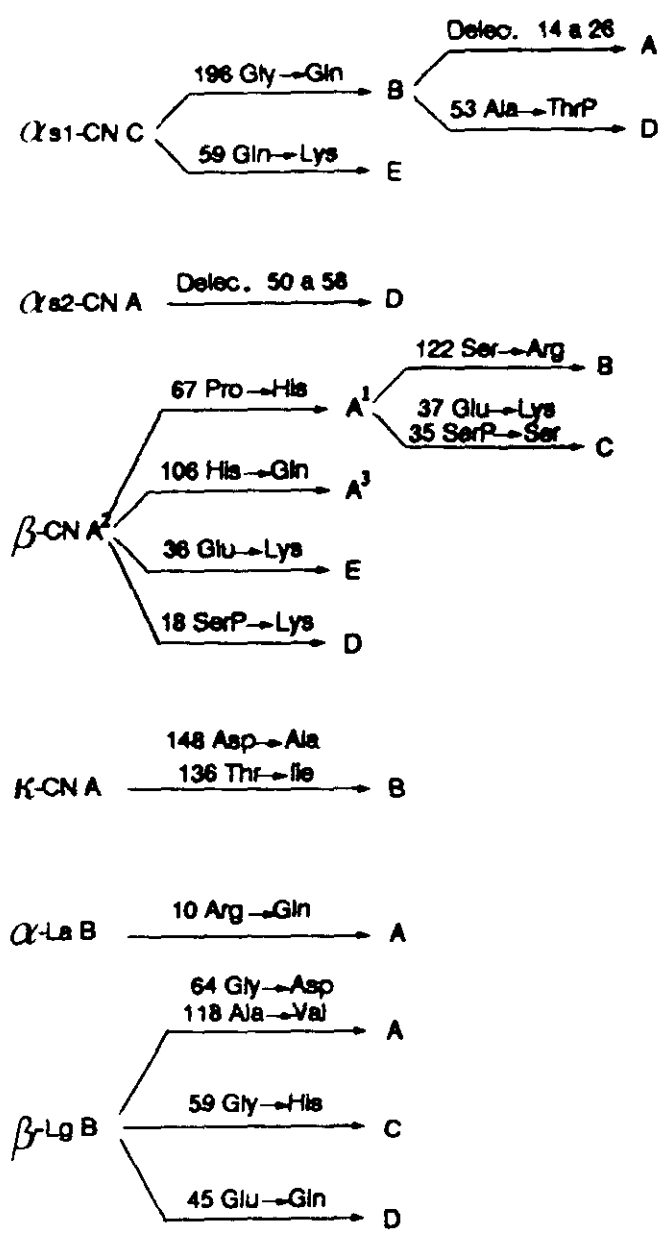


Figura 1.1. Diferencias bioquímicas y relaciones filogenéticas entre las variantes genéticas de las proteínas de leche de vaca. (Tomada de Grosclaude, 1988).

### 1.2.2. VARIANTES GENÉTICAS EN PROTEÍNAS DE LECHE DE OVEJA

Los estudios llevados a cabo sobre polimorfismo genético en proteínas de leche de oveja son más escasos que los realizados en leche de vaca.

La técnica más utilizada para la separación de proteínas lácteas ovinas ha sido la electroforesis. Últimamente se están imponiendo, por su mayor resolución, el isoelectroenfoco y la electroforesis bidimensional. Para la identificación de bandas se ha empleado la técnica de inmunotransferencia acoplada a separaciones electroforéticas; con respecto a esta última técnica existe aún dificultad de aplicación dado que la mayoría de anticuerpos anticaseínas y antiseroproteínas lácteas ovinas no son asequibles comercialmente y, se hace necesaria su obtención en el laboratorio.

Los resultados sobre variantes en proteínas de leche de oveja no parecen ser aún definitivos y, salvo para la variante Welsh (King, 1966), existe un gran confusionismo en lo que se refiere a la nomenclatura e identificación de las distintas formas descubiertas. Además, el uso de diferentes versiones electroforéticas (tipo de soporte, pH, etc.) hace que los resultados obtenidos sean difícilmente extrapolables. Por tanto será necesario estandarizar los métodos de análisis y canalizar las investigaciones para llegar a obtener resultados más fácilmente comparables.

Por otra parte, existe poca unanimidad en cuanto a la terminología a emplear para definir los sistemas proteicos que representan los distintos polimorfismos bioquímicos detectados mediante electroforesis. Baker y Manwell (1977) denominaron *sistema polimórfico* a aquel en que existe una clara variación genéticamente interpretable, *sistema variable* al que presenta una variación electroforética que no está realmente interpretada y *sistema monomórfico* a aquel en que la zona de migración electroforética no muestra variación.

## A. CASEÍNAS

El polimorfismo genético de las caseínas ovinas ha sido estudiado mediante electroforesis en gel de almidón, gel de poliacrilamida-agarosa y gel de poliacrilamida. La mayoría de las investigaciones concluyen, en general, que en la leche de oveja existen morfos más homogéneos que en la leche de vaca.

En la leche ovina se ha observado polimorfismo genético para las fracciones caseínicas  $\alpha_s$  y  $\beta$ .

Dada la complejidad que entraña la explicación de los resultados electroforéticos, distintos autores han aportado una serie de esquemas que sintetizan y clarifican los electroforegramas que se pretenden describir. Algunos de estos modelos se muestran en las figuras 1.2, 1.3 y 1.4.

La  $\beta$ -CN da origen en el perfil electroforético más frecuente ya sea a pH alcalino (Di Stasio, 1983; Russo y Davoli, 1983; Chiofalo y Micari, 1987) o ácido (Davoli y col., 1985) a dos bandas de intensidad similar, con menor velocidad electroforética que las otras fracciones caseínicas; estas bandas se han denominado  $\beta_2$  y  $\beta_1$  y se diferencian por su grado de fosforilación (Richardson y Creamer, 1976), conteniendo la  $\beta_1$  un grupo fosfato más que la  $\beta_2$ . Se han descrito 3 electroforegramas variantes observados mediante análisis en sistemas electroforéticos alcalinos: uno de ellos con 1 sola banda y los otros dos con 3 bandas de  $\beta$ -CN. Estos últimos perfiles se caracterizan además de por las dos bandas normalmente presentes, por una banda adicional más rápida (King, 1966; Rossi y Clementi, 1984: fig. 1.2), o más lenta (Arave y col., 1973; Chiofalo y Micari, 1987: fig. 1.3).

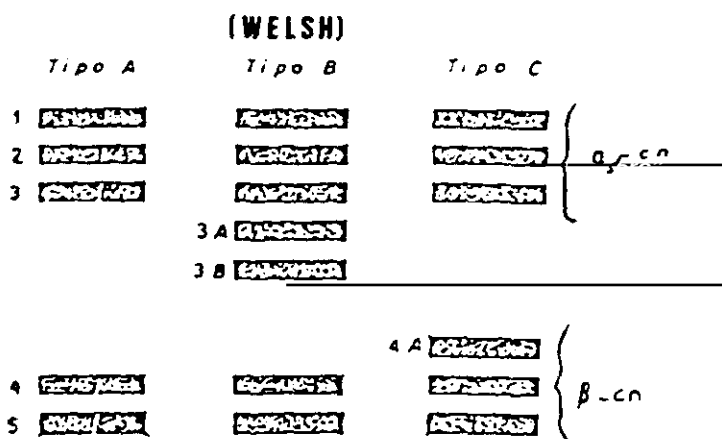


Figura 1.2. Esquema de los 3 tipos electroforéticos de las caseínas ovinas  $\alpha_s$  y B obtenidos por Rossi y Clementi (1984) mediante electroforesis a pH 8,6.

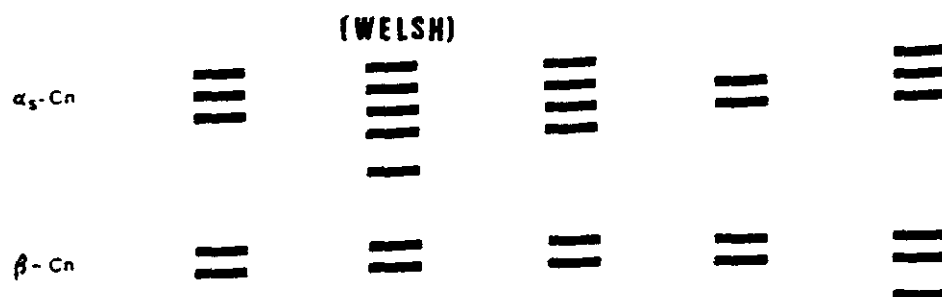


Figura 1.3. Patrones electroforéticos de las caseínas ovinas  $\alpha_s$  y B obtenidos por Chiofalo y Micari (1987) mediante electroforesis a pH 8,6.

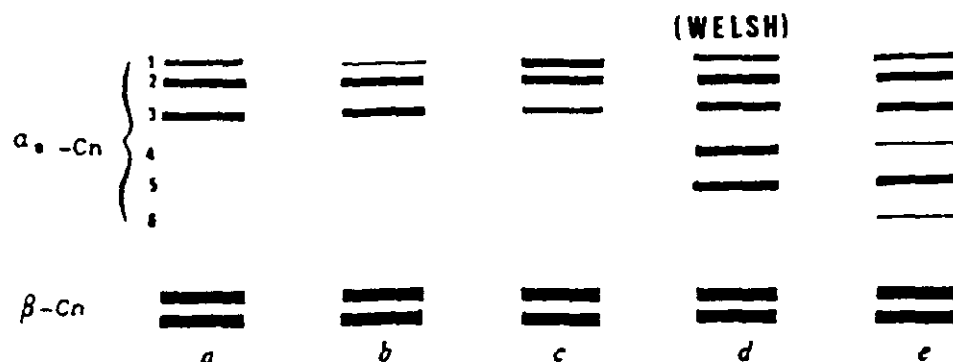


Figura 1.4. Perfiles electroforéticos de las caseínas ovinas  $\alpha_s$  y B obtenidos por Dall'Olio y col. (1989) mediante electroforesis a pH 8,6.

El estudio del polimorfismo de la  $\kappa$ -CN ovina es complejo, ya que mediante electroforesis a pH alcalino está solapada por la  $\beta$ -CN (Alais y Jollès, 1967; Dall'Olio y col., 1989; Chianese y col., 1990a). En un principio Alais y Jollès (1961) describieron dos posibles variantes genéticas de la  $\kappa$ -CN:  $\kappa$ A y  $\kappa$ B. Sin embargo, posteriormente se ha comprobado que cuando se aísla la  $\kappa$ -CN da origen en electroforesis a pH alcalino a 5 bandas de idéntica composición aminoacídica pero con diverso grado de glicosilación lo que provoca la diferente movilidad electroforética (Alais y Jollès, 1967; Soulier y col., 1975). Addeo y col. (1992) en estudios realizados mediante isoelectroenfoque han sugerido la posibilidad de polimorfismo genético de la fracción  $\kappa$  ya que obtienen varias bandas de intensidad semejante en los isoelectroforegramas.

Para la  $\alpha_s$ -CN se han descrito en medio alcalino diversos tipos de perfiles electroforéticos (Di Stasio, 1983; Russo y Davoli, 1983; Davoli y col., 1985; Chiofalo y Micari, 1987; Dall'Olio y col. 1989: fig. 1.4) que se diferencian por el número de bandas, de 2 a 6. De los diagramas variantes, solamente el llamado Welsh, que se caracteriza por 5 bandas electroforéticas (ver fig. 1.2, 1.3, 1.4), es el que se ha estudiado con mayor profundidad ya que se ha observado en casi todas las razas ovinas hasta ahora estudiadas; King (1966) postuló que la Welsh debería ser una variante de  $\alpha_s$  y Mauriello y col. (1990) han demostrado que se trata de un polimorfismo genético de la fracción  $\alpha_{s1}$ -CN. En el electroforegrama más común a pH alcalino se distinguen 3 bandas de  $\alpha_s$ -CN de mayor velocidad electroforética que las otras fracciones caseínicas. Richardson y Creamer (1976) denominaron a estas bandas  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  y  $\alpha_{s3}$ , denominación que puede inducir a confusión ya que según los últimos estudios (Dall'Olio y col., 1989; Chianese y col., 1990a, 1992b) no se trata de 3 fracciones caseínicas sino solamente de la  $\alpha_{s1}$  y la  $\alpha_{s2}$ . La electroforesis a pH alcalino no es idónea para el estudio de las caseínas  $\alpha_s$

ovinas ya que no permite separar la  $\alpha_{s1}$  y la  $\alpha_{s2}$ , separación posible mediante electroforesis a pH ácido (Davoli y col., 1985), isoelectroenfoque y electroforesis bidimensional (Mauriello y col., 1990; Chianese y col., 1990a, 1992b). La existencia de estas dos fracciones en la leche ovina ha sido probada por Mercier y col. (1985) que han preparado ADNc de  $\alpha_{s1}$  y  $\alpha_{s2}$  a partir de ARN aislado de células de la glándula mamaria de oveja. Dall'Olio y col. (1990) mediante cromatografía de afinidad han logrado separar el complejo  $\alpha_s$ -CN en dos fracciones distintas:  $\alpha_{s1}$  y  $\alpha_{s2}$ . Aunque se ha establecido la composición aminoacídica de la  $\alpha_s$  ovina (Richardson y Creamer, 1976), todavía no se ha aclarado completamente la secuencia aminoacídica de las dos fracciones de  $\alpha_s$ -CN.

Algunos autores han demostrado posibles relaciones entre las  $\beta$ - y las  $\alpha_s$ -CN ya que la distinta intensidad con que se presentan las bandas que integran el complejo  $\alpha_s$  en los electroforegramas parece estar relacionada con la intensidad de las  $\beta$ -CN (Richardson y Creamer, 1976) o, según investigaciones más recientes, con unas bandas de menor movilidad que las  $\beta$  principales que Chianese y col. (1990a, 1992b) han denominado bandas satélite de la  $\beta$ -CN.

Por otra parte, la nomenclatura de las distintas variantes, salvo para la variante Welsh, es bastante arbitraria. La mayoría de los autores denominan los patrones electroforéticos con letras mayúsculas (figura 1.2) o minúsculas (figura 1.4) o bien números. Otros investigadores como El-Negoumi y Burfening (1972) y Arave y col. (1973) han nombrado las variantes de  $\alpha_s$  y  $\beta$  con una terminología idéntica a la ya establecida para las variantes genéticas conocidas en leche de vaca (letras mayúsculas y superíndices); sin embargo es cuestionable asignar esta denominación a formas proteicas en las que no se ha determinado la secuencia aminoacídica.

## B. SEROPROTEÍNAS

Las investigaciones hasta ahora efectuadas sobre las seroproteínas de leche de oveja indican polimorfismo tanto para la  $\alpha$ -La como para la  $\beta$ -Lg, con dos variantes (A y B).

Las frecuencias génicas observadas por diversos autores para las variantes de  $\beta$ -Lg y  $\alpha$ -La se recogen en las tablas 1.6 y 1.7, respectivamente. De estos resultados se deduce que las variantes más frecuentes son la A y la B para la  $\beta$ -Lg y la A para la  $\alpha$ -La. La  $\beta$ -Lg C (descrita por primera vez por Aliev y Koloteva, 1975) parece ser bastante rara o bien estar ligada a determinadas razas (Erhardt y col., 1989). La  $\alpha$ -La B se ha descrito solo en 4 grupos étnicos con una frecuencia muy baja y siempre en estado heterocigoto.

Para el locus  $\beta$ -Lg se ha podido demostrar el origen genético del polimorfismo. Se sabe que los genes que controlan la síntesis de  $\beta$ -Lg son alelos autosómicos codominantes que se transmiten siguiendo las leyes de la herencia genética de Mendel (Bell y McKenzie, 1967) originando en la descendencia todos los genotipos posibles que se pueden obtener de la libre combinación de los alelos A, B y C (King, 1969; Bell y McKenzie, 1964, 1967; Mácha y Novackova, 1974; Erhardt y col., 1989). Así las variantes de  $\beta$ -Lg se presentan singularmente o en pareja dando lugar a los genotipos  $\beta$ -Lg<sup>AA</sup>,  $\beta$ -Lg<sup>BB</sup>,  $\beta$ -Lg<sup>CC</sup>,  $\beta$ -Lg<sup>AB</sup>,  $\beta$ -Lg<sup>AC</sup> y  $\beta$ -Lg<sup>BC</sup>.

La composición de aminoácidos de las variantes A y B de  $\beta$ -Lg fue estudiada por Bell y McKenzie (1967) observando que solo difieren en un aminoácido simple en la posición 20 (His→Tyr). Kolde y Braunitzer (1983) determinaron la secuencia de aminoácidos de una de las variantes de  $\beta$ -Lg ovina. Gaye y col. (1986) analizaron la secuencia de nucleótidos correspondientes a los alelos A y B de la  $\beta$ -Lg. El cambio de un aminoácido ácido por uno neutro implica un punto isoeléctrico (pI) más básico de la  $\beta$ -Lg B en comparación con la  $\beta$ -Lg A, lo que origina la posición más anódica de la  $\beta$ -Lg A en los análisis mediante electroenfoque.

**Tabla 1.6. Frecuencias genéticas observadas por diversos autores en el locus  $\beta$ -lactoglobulina en distintas razas ovinas. (Tomado en parte de Chiofalo y Micari, 1987).**

Raza	N° de ovejas	$\beta$ -Lg			Ref. bibliográfica
		A	B	C	
Manchega	74	0,642	0,358	—	Amigo (1989)
Blackface	18	0,556	0,444	—	King (1969)
Cheviot	8	0,625	0,375	—	• •
Clun Forest	174	0,802	0,198	—	• •
Dorset Horn	16	0,906	0,009	—	• •
Finnish Landrace	8	0,750	0,250	—	• •
Merino	18	0,781	0,219	—	• •
Soay	11	0,864	0,136	—	• •
Suffolk	15	0,700	0,300	—	• •
Welsh	110	0,614	0,386	—	• •
Wiltshire Horn	5	0,500	0,500	—	• •
Latvian Darkheaded	240	0,575	0,425	—	Stambekov y col. (1974)
Stavropol Merino	304	0,756	0,242	—	Mácha y Novackova (1974)
Mutton Merino	126	0,905	0,095	—	• •
Tsigaya	129	0,585	0,415	—	• •
Improved Wallach	61	0,836	0,164	—	• •
Romanov	7	0,429	0,571	—	• •
Tajik	—	0,045	0,624	0,320	Ajev y Koloteva (1975)
Sarda	72	0,465	0,535	—	Russo y col. (1981)
Massese	54	0,528	0,472	—	• •
Comisana	250	0,500	0,500	—	Chiofalo y col. (1986)
Barbaresca-siciliana	62	0,621	0,379	—	Chiofalo y Micari (1987)
Siciliana-pinzitta	72	0,500	0,500	—	• •
Merinoland	181	0,579	0,246	0,175	Erhardt (1989)
Blackface	145	0,848	0,152	—	• •
East Friesian	89	0,770	0,230	—	• •
Rhön Sheep	36	0,324	0,676	—	• •
Pleven	36	0,528	0,472	—	• •
Tsigaya	23	0,652	0,348	—	• •
Black Razka	25	0,760	0,240	—	• •
Hyfer	136	0,840	0,160	—	Thomas y col. (1989)

**Tabla 1.7. Frecuencias genéticas observadas por diversos autores en el locus  $\alpha$ -lactoalbúmina en distintas razas ovinas.**

Raza	N° de ovejas	$\alpha$ -La		Ref. bibliográfica
		A	B	
Latvian Darkheaded	240	0,775	0,225	Stambekov y col. (1974)
Comisana	293	0,988	0,012	Chiofalo y Micari (1987)
Barbaresca-siciliana	200	0,995	0,005	' '
Siciliana-pinzinta	229	0,996	0,004	' '

Bell y McKenzie (1967) estudiaron algunas de las propiedades físico-químicas de las variantes A y B de  $\beta$ -Lg: cristalización, espectro de absorción, sedimentación, dispersión óptica rotatoria y propiedades inmunológicas.

Erhardt (1989) describe la  $\beta$ -Lg C en la raza Merinoland y también en una  $F_1$  (Hungarian Merino x Pleven). Sugiere que el alelo  $\beta$ -Lg<sup>C</sup> fue originado por los Merinos españoles ya que ambas razas, Merinoland y Hungarian Merino, contienen sangre de aquellos primeros Merinos. Erhardt y col. (1989) han estudiado la  $\beta$ -Lg C de leche de oveja y demuestran que este alelo variante exhibe una alta frecuencia ( $q_C = 0,17$ ) en comparación al bovino, donde se han descrito en algunas razas alelos con muy baja frecuencia (menor de 0,04) con respecto a las variantes más comunes; estos mismos autores han propuesto que la  $\beta$ -Lg C ovina es un subtipo de la  $\beta$ -Lg A con un cambio simple de Arg→Gln en la posición 148, hecho que puede influir en la polimerización de la  $\beta$ -Lg.

King (1969) lanzó una hipótesis sobre la posibilidad de algunos signos de asociación entre la  $\beta$ -Lg y las variantes de

caseínas (Welsh, de  $\alpha_s$ -CN, y una variante de  $\beta$ -CN); según el mismo autor sería deseable realizar más análisis para identificar posibles asociaciones, pero la escasez de variantes de caseínas lo hacen difícil. No obstante, la falta de asociación estaría de acuerdo con las investigaciones realizadas en vacuno y con las grandes diferencias químicas entre los dos tipos de proteína láctea (Grosclaude, 1979).

### **1.3. LA APTITUD QUESERA DE LA LECHE**

La calidad de la leche para quesería puede basarse en su aptitud para dar un buen queso, en las condiciones normales de trabajo, y con un rendimiento satisfactorio. Ello depende de algunas de sus características: composición química (especialmente su riqueza en caseína), carga microbiana y naturaleza de la microflora, así como la aptitud para el desarrollo de bacterias lácticas y el comportamiento frente al cuajo (Brule y Schneid, 1990).

Los queseros conocen, por experiencia, que todas las leches no presentan el mismo comportamiento en el momento de la coagulación por el cuajo. Las leches pueden presentar aptitudes distintas para formar, por acción del cuajo, un gel de características reológicas tales que podrá, sin pérdidas importantes, resistir las acciones mecánicas del desuerado. Algunas leches coagulan lentamente, dando lugar a geles blandos que tienden a fragmentarse en forma de fino polvo y dan después del desuerado cuajadas con alto nivel de humedad cuya maduración será difícil de controlar; otras, por el contrario, coagulan rápidamente, el gel formado es duro, se desuera generalmente bien y la cuajada presenta una textura y humedad adecuadas, permitiendo obtener después del proceso de maduración un queso de buena calidad (Mocquot y col., 1954).

Aunque en la práctica las características del coágulo y el

rendimiento quesero están íntimamente relacionados se ha creído más oportuno el comentar separadamente estos parámetros utilizados normalmente para expresar la aptitud quesera de la leche.

### **1.3.1. CARACTERÍSTICAS DEL COÁGULO**

Los criterios de control habitualmente utilizados para definir las características del coágulo son: el tiempo y velocidad de coagulación, la elasticidad del coágulo y, eventualmente, la velocidad y magnitud de la sinéresis. Estos parámetros son de gran importancia para la industria quesera cuyo objetivo es obtener una cuajada firme para alcanzar el rendimiento quesero y la composición del producto final más favorable.

Los distintos parámetros de coagulación, expresión de transformaciones físico-químicas complejas, pueden ser determinados mediante diferentes métodos como son el método de Berridge, el torsiómetro de Plint o los viscosímetros de torsión tipo tromboelastógrafo.

A continuación se recoge la influencia de distintos factores, relacionados con las características de composición de la leche, sobre las características de la coagulación; la mayoría de los trabajos publicados a este respecto son relativos a leche de vaca.

#### **1.3.1.1. FRACCIÓN PROTEÍCA**

Varios estudios han confirmado que las propiedades de coagulación, medidas en términos de tiempo de coagulación, ritmo de formación de cuajada (o velocidad de coagulación) y elasticidad del coágulo, están influenciadas por las características cuali- y cuantitativas de las proteínas lácteas.

La concentración de caseínas constituye uno de los factores que más influyen en la elasticidad del coágulo, pero su efecto sobre el tiempo de coagulación es relativamente escaso, al menos dentro de determinados límites como ha sido probado en leche de

vaca (Storry y Ford, 1982a, 1982b) y en leche de oveja (Ahmed y col., 1984).

Así, una dilución de la leche con lactosuero o con un ultrafiltrado, en proporción 70/30, posee poca incidencia sobre el tiempo de coagulación; por el contrario, ello reduce sensiblemente la elasticidad del gel. Una dilución mayor, en proporción 50/50, determina un aumento muy importante del tiempo de coagulación. Inversamente, el incremento de la concentración en caseínas, por ultrafiltración o por adición de un sedimento de ultracentrifugación, se traduce por un aumento neto de la elasticidad del coágulo mientras que el tiempo de coagulación no se ve afectado o en todo caso se observa un ligero incremento (Storry y Ford, 1982b).

Estas relaciones entre el tiempo de coagulación y la concentración en caseínas se explican por el hecho de que el fenómeno de la coagulación es dirigido por dos reacciones, la hidrólisis de la caseína  $\kappa$  y la agregación de las micelas modificadas. Así, la formación de la cuajada depende de la hidrólisis inicial de la  $\kappa$ -CN (aproximadamente 10% de la caseína total) por el cuajo que implica una desestabilización de las micelas de caseína; datos experimentales han demostrado que cuando el 85-90% de la  $\kappa$ -CN se hidroliza por la enzima, la coagulación empieza por la formación de enlaces que conducen a la agregación de racimos de  $\alpha_s$ -CN,  $\beta$ -CN y  $\kappa$ -CN hidrolizada parcialmente (parak-CN) y la formación de una malla que atrapa la grasa, algunas proteínas de suero y minerales. Si la concentración de caseínas es baja, la velocidad de agregación es lenta en comparación con la velocidad de proteólisis. A elevada concentración, el tiempo de coagulación viene determinado por la velocidad de acción del enzima.

No obstante, el enriquecimiento de la leche en proteínas mediante ultrafiltración puede poseer efectos variables sobre el tiempo de coagulación según las condiciones experimentales,

especialmente el pH y la naturaleza de la enzima. En el aspecto reológico se ha observado que este enriquecimiento acelera la velocidad de coagulación, aumenta la elasticidad máxima y reduce la velocidad de sinéresis. Así, un incremento del 10% del porcentaje de caseína total en leche (por adición de un sedimento de ultrafiltración), determina un 15% de incremento de la elasticidad máxima del coágulo; por debajo de un nivel de concentración de caseína en leche del 0,7% no se produce la formación del gel; por encima del 2,5% la relación entre la concentración de caseína y la elasticidad del coágulo es lineal.

Las proporciones relativas de los diversos componentes de la caseína influyen también en las características del coágulo y, según algunos autores (Losi y col., 1973), el tiempo de coagulación sería más sensible a las variaciones del contenido en caseína  $\kappa$  que a los de caseína  $\alpha_s$  ó  $\beta$ . Una correlación bastante estrecha ha sido observada entre el tiempo de coagulación y la concentración en caseína  $\beta$  (Storry y col., 1983); por el contrario, la elasticidad del gel está más estrechamente ligada a la concentración en caseína  $\alpha_s$  que a la de caseína  $\kappa$  ó  $\beta$  (Storry y col., 1983; Grandison y col., 1984). La influencia marcada del contenido en caseína  $\alpha_s$  sobre la elasticidad del coágulo viene a apoyar la hipótesis según la cual las caseínas  $\alpha_s$ , debido a su elevado grado de fosforilación, juegan un papel estructural importante en la reticulación del gel, análogo al que se les atribuye en el seno de las micelas de caseína (Grandison y col., 1984). Ello podría también explicar el hecho de que, incluso a concentraciones en caseína igual a la leche de vaca, la leche de cabra, caracterizada por su bajo contenido en caseínas  $\alpha_s$ , da lugar a un coágulo mucho menos elástico (Remeuf y Lenoir, 1986). Ambrosoli y col. (1988) compararon las propiedades de coagulación de la leche de cabra a partir de muestras con bajo y alto contenido en  $\alpha_{s1}$ -CN, concluyendo que las de bajo contenido coagulaban más rápidamente, mientras que las de alto contenido

producían una cuajada más elástica, asociada a una composición química más favorable.

En esta línea se ha observado que la alimentación del ganado es importante por su influencia en la composición de la leche. Así se ha demostrado que la transición de la alimentación de invierno (rica en concentrados) al pasto de primavera se traduce especialmente por un aumento del contenido en caseína y elasticidad del coágulo (Grandison y col, 1984). La naturaleza del pasto también puede influir: con la leche producida a partir de trébol blanco, más rica en caseína total y en caseínas  $\alpha_s$  y  $\beta$  se obtiene un coágulo más elástico que con la leche producida a partir de raigrás.

La influencia del periodo de lactación es igualmente importante en este aspecto. A lo largo de las primeras semanas, la disminución en la concentración de caseína, calcio y fósforo inorgánico, al igual que las variaciones de las proporciones relativas de las caseínas, se traducen por una disminución sensible de la elasticidad del coágulo (Grandison y col., 1984). Las leches al final de la lactación coagulan más difícilmente y dan geles blandos; estas leches se caracterizan, como las leches mamíticas, por una fuerte actividad de plasmina y una mayor proporción de caseínas  $\gamma$  y de otros productos de degradación de las caseínas. Las leches analizadas en la mitad de la lactación, en que la curva de composición química de la leche se estabiliza, darían lugar a valores superiores de elasticidad del coágulo (Okigbo y col., 1985a).

La influencia de la naturaleza de las variantes genéticas de las proteínas ha demostrado también ser el origen de ciertas diferencias en el comportamiento de leche frente al cuajo. El efecto del polimorfismo de las proteínas lácteas en el proceso de coagulación se revisará posteriormente (apartado 1.4.2).

Por otra parte, ha sido demostrada la relación entre el tamaño de las micelas y el tiempo de coagulación de la leche: el

tiempo de coagulación es mayor cuanto menor es el diámetro medio de las micelas. Este efecto posiblemente se debe a las diferencias de composición de las micelas en función de sus dimensiones, especialmente su contenido en fosfato cálcico coloidal, el cual es más elevado en las grandes micelas que en las pequeñas. Parecen asimismo ejercer influencia las proporciones relativas de la  $\kappa$  caseína que son más elevadas en las pequeñas micelas que en las grandes (Dalglish y col., 1981) al igual que el grado de hidratación también superior en las pequeñas micelas.

#### **1.3.1.2. CALCIO SOLUBLE Y FOSFATO CÁLCICO COLOIDAL**

Las micelas de caseína, después de la acción del cuajo se presentan muy sensibles a los iones calcio y pequeñas variaciones en la concentración en calcio de la leche pueden afectar notablemente al tiempo de coagulación y a la elasticidad del gel (Pyne, 1962).

Así, la influencia de la relación Ca/N sobre el tiempo de coagulación es muy marcada; la evolución inversa de estos dos parámetros a lo largo del periodo de lactación lo muestran claramente. Mocquot y col. (1954) establecieron que la relación Ca/N es sensiblemente distinta en las "leches lentas" ( $<0,20$ ) y en las "leches normales" o "rápidas" ( $>0,23$ ); otras características de estos tipos de leche (definidos por Mocquot y col., 1954) se comentarán posteriormente. La velocidad de coagulación estaría especialmente ligada a la relación  $\text{Ca}/(\text{fosfato}+\text{citrato})$  de la fase acuosa, aumentando el tiempo de coagulación cuando esta relación disminuye.

La adición de cloruro cálcico a la leche, práctica corriente en quesería, tiene por efecto reducir el tiempo de coagulación y aumentar la elasticidad del coágulo. Esta influencia no está únicamente ligada al aumento del contenido en calcio iónico, sino que se debe también a la disminución del pH, debida a la liberación de iones  $\text{H}^+$  por transformación de los iones  $\text{PO}_4\text{H}^-$  en

fosfato tricálcico, y al aumento de calcio micelar.

La sensibilidad de la leche a la acción del cuajo está estrechamente relacionada con el contenido en fosfato cálcico de la micela, siendo el tiempo de coagulación más corto y el gel más elástico cuando el fosfato cálcico micelar aumenta.

Los aspectos considerados en los dos apartados anteriores (1.3.1.1 y 1.3.1.2) se observan claramente en las leches mamíticas. Estas leches poseen una composición proteica profundamente modificada: la proporción de caseínas se ve reducida y, el porcentaje de proteínas solubles, especialmente la seroalbúmina y las inmunoglobulinas, aumenta; el pH de la leche es más elevado, pudiendo alcanzar e incluso superar valores de 7 - 7,2; además el contenido en sodio aumenta sensiblemente mientras que el de calcio tiende a disminuir. Todos estos factores contribuyen a alargar el tiempo de coagulación y a la menor elasticidad del coágulo de leches anormales, fenómenos que pueden también explicarse por una cierta degradación de las caseínas, debido al aumento de la plasmina. Los efectos del pH de la leche de oveja (leche mamítica) en las propiedades de coagulación de la leche han sido estudiados por Manfredini y col. (1992) obteniendo resultados comparables a los de leche de vaca.

Aun excluyendo las leches mamíticas, entre las leches individuales se han detectado diferencias importantes en el tiempo de coagulación. Mediante análisis de "leches lentas", "leches normales" y "leches rápidas", Mocquot y col. (1954) pusieron de manifiesto diferencias claras de composición, especialmente a nivel de contenido en calcio (relación Ca/N) y en fosfato inorgánico coloidal. También se observa un mayor contenido de caseína no centrifugable y de agua en los sedimentos de ultracentrifugación, dos características ligadas respectivamente a las dimensiones de las micelas y a su grado de hidrata-

ción. Se encontró igualmente una correlación entre el tiempo de coagulación y la aptitud para la sinéresis caracterizada por el contenido en agua de los geles enzimáticos sometidos a centrifugación; esto daría lugar al difícil desuerado de las "leches lentas".

Los caracteres diferenciales de las "leches lentas" y las "leches rápidas" tienden a mostrar que las diferencias de aptitud a la coagulación no pueden ser atribuidas a una sola de las fases de la leche, la fase acuosa o la micelar. El conocimiento del carácter dinámico de la micela y de sus factores de estabilidad permite prever que el comportamiento de la micela no puede ser independiente de su entorno.

### 1.3.2. RENDIMIENTO QUESERO

El rendimiento quesero o el rendimiento de la transformación de leche en queso es la expresión matemática de la cantidad de queso obtenida a partir de una determinada cantidad de leche (generalmente 100 l ó 100 Kg) (Vandeweghe, 1990).

Según Reinbold (1990) es más apropiado referir el rendimiento quesero a peso de leche ya que la leche cruda puede contener agua añadida fraudulentamente; también se debe considerar el peso del "starter". Por ello, una definición más exacta de rendimiento quesero es la que se deduce de la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Peso del queso}}{\text{Peso de la leche} + \text{Peso del "starter"}} \times 100$$

Existen diversas fórmulas para determinar o predecir el rendimiento quesero. Por otra parte, Aleandri y col. (1989) han demostrado que existe una correlación entre rendimiento quesero y elasticidad del coágulo; por ello, a partir de las estimaciones de las características del coágulo mediante un viscosímetro se puede llegar en cierto modo a predecir el rendimiento en queso.

El rendimiento quesero obtenido a partir de una determinada cantidad de leche está influido por una amplia gama de factores. La importancia científica y económica de estos factores ha impulsado a la FIL a organizar un Seminario sobre "Factores que afectan al rendimiento del queso y sistemas para su control" que tendrá lugar en Irlanda durante este año.

Como se muestra en la figura 1.5, Emmons (1988) ha clasificado los factores que influyen en el rendimiento quesero en dos grupos: en el primer grupo incluyen aquéllos que el quesero puede controlar; el segundo grupo está integrado por factores que el ganadero puede controlar. Dado que sería muy extensa la explicación de cada uno de los factores que influyen en el rendimiento quesero y que no es el objetivo de esta Tesis, nos hemos centrado en la influencia que ejercen las variantes genéticas de proteínas lácteas (apartado 1.4.4).

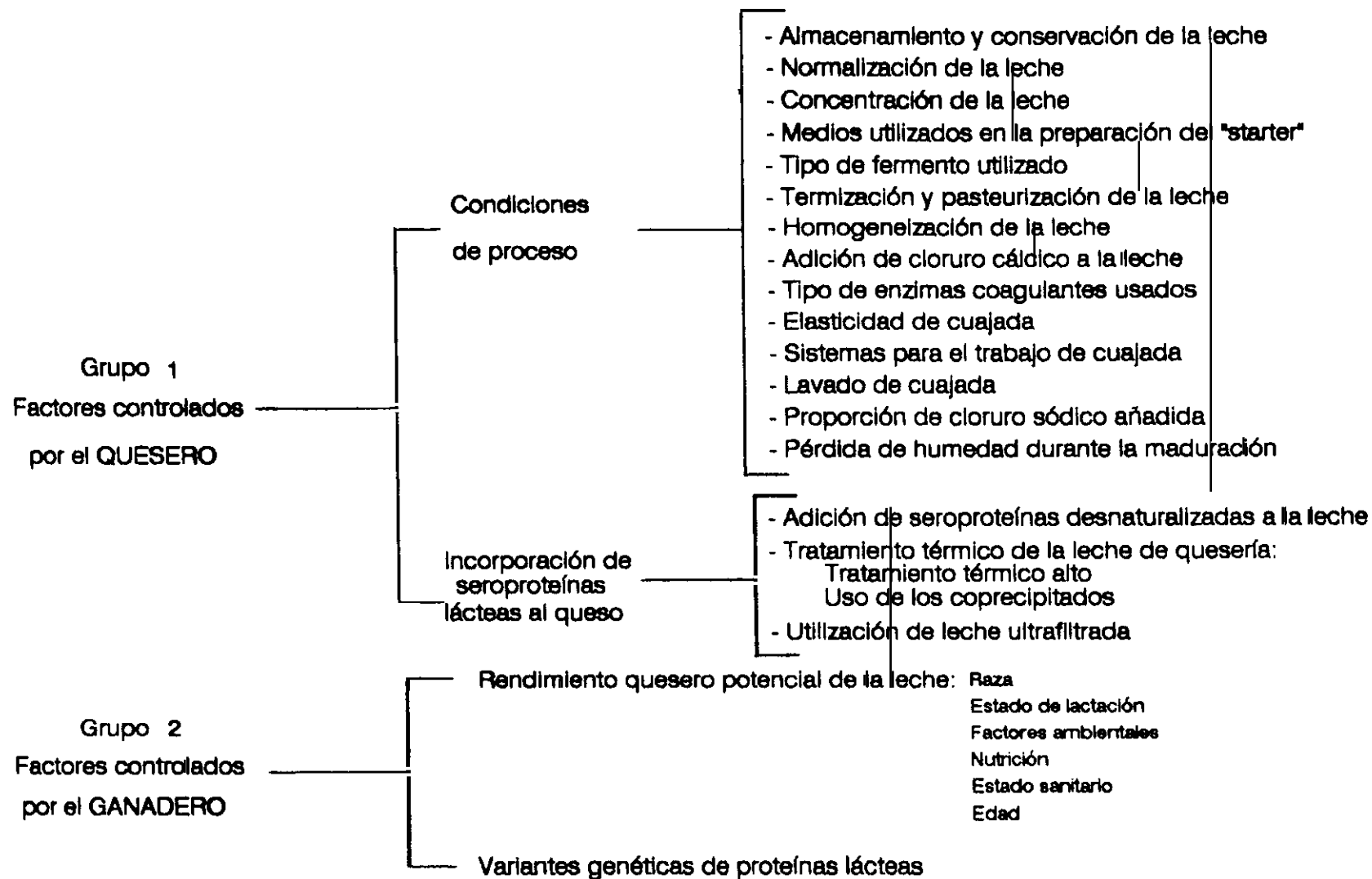


Figura 1.5. Factores que influyen en el rendimiento quesero. (Tomada de Emmons, 1988).

#### **1.4. INFLUENCIA DE LAS VARIANTES GENÉTICAS DE PROTEÍNAS LÁCTEAS EN LA APTITUD QUESERA DE LA LECHE**

Aunque desde hace tiempo ha existido evidencia de que el comportamiento tecnológico de la leche (particularmente en quesería) puede estar influido por factores hereditarios, los estudios genéticos relacionados con las propiedades tecnológicas de la leche (además de la composición de la misma) se han empezado a desarrollar desde hace solamente 25 años.

La detección del polimorfismo genético en las proteínas lácteas ofreció nuevas explicaciones para la variación de las propiedades de la leche de animales individuales. De hecho las variantes genéticas de las proteínas lácteas han demostrado claramente influir en la composición y/o el comportamiento tecnológico de la leche, como han revisado en detalle Losi y Mariani (1984) y Grosclaude (1988).

Las investigaciones en el tema de variantes genéticas y aptitud tecnológica se han desarrollado en leche de vaca. En la bibliografía consultada no se han encontrado publicaciones en este sentido en leche de oveja.

##### **1.4.1. INFLUENCIA DE LAS VARIANTES GENÉTICAS EN LA COMPOSICION DE LA LECHE**

###### **POLIMORFISMO DE LA $\beta$ -LACTOGLOBULINA**

El polimorfismo de la  $\beta$ -Lg ha demostrado tener efecto tanto en el contenido en  $\beta$ -Lg total como en el contenido en caseínas y otras fracciones nitrogenadas.

Se ha demostrado que la que contiene la leche  $\beta$ -Lg A presenta un contenido en  $\beta$ -Lg total superior a la leche con  $\beta$ -Lg B (Feagan y col., 1972; McLean y col., 1984). El alelo C ofrecería los valores más bajos de  $\beta$ -Lg total en leche.

Sobre el contenido en caseínas y otras fracciones nitrogenadas, los resultados muestran un efecto del polimorfismo de la  $\beta$ -

Lg en sentido inverso al encontrado para el contenido en  $\beta$ -Lg; así se ha demostrado que el alelo  $\beta$ -Lg B es más favorable: 78,96% de caseínas y otras fracciones nitrogenadas (en relación a proteína total) para el genotipo  $\beta$ -Lg BB, frente a 76,24% para el genotipo  $\beta$ -Lg AA (Grosclaude, 1988).

Con relación a la producción de leche por lactación los resultados son contradictorios.

En relación a la materia grasa Ng-Kwai-Hang y col. (1986) determinaron valores de 3,67% de grasa en leche para la leche con  $\beta$ -Lg AA y 3,72% para aquella con  $\beta$ -Lg BB.

### **POLIMORFISMO DE LAS CASEÍNAS**

McLean y col. (1984) en un estudio sobre 538 vacas (Jersey y Frisona) no observaron efecto significativo del polimorfismo de las caseínas  $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$  y  $\kappa$  sobre el contenido en grasa o materias nitrogenadas (a excepción de una variante de la  $\beta$ -CN sobre la cantidad de grasa).

Por el contrario, Ng-Kwai-Hang y col. (1986) que analizaron el polimorfismo genético de las caseínas de 1908 vacas (Holstein) encontraron diferencias significativas en todos los caracteres estudiados: cantidad de leche producida por lactación, grasa y materias nitrogenadas. Para la cantidad de leche, por ejemplo, las vacas cuya leche contiene los genotipos  $\alpha_{s1}$ -CN BB,  $\beta$ -CN A<sup>2</sup>A<sup>3</sup> y  $\kappa$ -CN AB producen más leche por lactación. Para el contenido en caseínas los efectos son inversos, encontrándose proporciones más elevadas para los genotipos  $\alpha_{s1}$ -CN BC,  $\beta$ -CN A<sup>1</sup>B y  $\kappa$ -CN BB.

#### **1.4.2. INFLUENCIA DE LAS VARIANTES GENÉTICAS EN LAS PROPIEDADES DE COAGULACION DE LA LECHE**

En la tabla 1.8 se recogen, a modo de resumen, los efectos de las variantes genéticas de distintas proteínas lácteas bovinas ( $\kappa$ -CN,  $\alpha_{s1}$ -CN,  $\beta$ -CN y  $\beta$ -Lg) en las propiedades de coagulación de la leche, la sinéresis de la cuajada y el rendimiento y calidad del queso. Esta tabla se ha confeccionado en base al trabajo de Jakob y Puhan (1992).

##### **1.4.2.1. VARIANTES DE $\kappa$ -CASEÍNA**

Sherbon y col. (1967) observaron que la leche de vacas con el fenotipo AA de  $\kappa$ -CN mostraba tiempos de coagulación significativamente más largos y menor elasticidad de cuajada que las de fenotipo  $\kappa$ -CN AB y particularmente que las de  $\kappa$ -CN BB. El-Negoumy (1972) que estudió la estabilidad a la renina en sistemas modelo de caseinato cálcico preparados a partir de 507 muestras de leche individuales de razas Jersey y Holstein, confirmaron las diferencias con respecto al tiempo de coagulación. Feagan y col. (1972) también detectaron, al menos, un 45% de elasticidad superior del coágulo para los fenotipos de  $\kappa$ -CN AB ó BB cuando comparaban con tipos  $\kappa$ -CN AA. En los últimos 20 años han sido demostradas en numerosas razas las mejores propiedades de coagulación de leches que contienen  $\kappa$ -CN B (Losi y col., 1973; Mariani y Leoni, 1985; VandenBerg y col., 1990). Sin embargo, otros autores encontraron que la diferencias en el tiempo de coagulación son mínimas (Schaar, 1984; Politis y Ng-Kwai-Hang, 1988b) y Marziali y Ng-Kwai-Hang (1986b) no lograron observar efecto alguno de las variantes de  $\kappa$ -CN en las propiedades de coagulación.

La obtención de coágulos más elásticos a partir de leches tipo  $\kappa$ -CN AB y BB cuando se comparaba con AA se explica en parte por su mayor contenido en caseína; Rahali y Menard (1991) contrastando leches con igual contenido en caseína demostraron

**Tabla 1.8. Efecto de las variantes genéticas de proteínas lácteas bovinas en las propiedades de coagulación de la leche, la sinéresis de la cuajada y el rendimiento y calidad del queso.**

VARIANTE	EFEECTO	REF. BIBLIOGRAFICA
K-CN BB	- Menor tiempo de coagulación y mayor elasticidad de cuajada	Losi y col. (1973) Mariani y Leoni (1985) VandenBerg y col. (1990)
	- Mayor sinéresis de cuajada	Mariani y col. (1976)
	- Menor contenido en humedad, menor proteólisis y mayor contenido en grasa y extracto seco en el queso	Morini y col. (1979) Marziali y Ng-Kwai-Hang (1986a)
$\alpha$ s1-CN CC	- Cuajada más elástica	Sherbon y col. (1967) Pagnacco y Caroli (1987)
$\alpha$ s1-CN BC	- Mayor rendimiento quesero	Aleandri y col. (1990)
$\beta$ -CN BB	- Tiempos de coagulación más cortos	El-Negoumy (1972) Jakob y Puhan (1986)
	- Mayor elasticidad de cuajada	Feagan y col. (1972) Rampilli y col. (1988)
$\beta$ -CN A <sup>1</sup> A <sup>2</sup>	- Mayor rendimiento en queso (Comparado con A <sup>1</sup> A <sup>1</sup> )	Marziali y Ng-Kwai-Hang (1986a,c)
$\beta$ -Lg AA	- Menor tiempo de coagulación	Mácha y col. (1974) Marziali y Ng-Kwai-Hang (1986b)
$\beta$ -Lg BB	- Mayor elasticidad de cuajada	Mariani y Leoni (1985) Liberatori y col. (1990)
	- Mayor rendimiento quesero y mayor contenido en proteína en el queso	Schaar y col. (1985) Marziali y Ng-Kwai-Hang (1986c) Rahali y Menard (1991)

que con leche que contiene la  $\kappa$ -CN B se obtiene también un coágulo de elasticidad superior. No obstante, merece mencionar que las diferencias en el tiempo de coagulación entre las leches con los tipos BB y AA de  $\kappa$ -CN puede ser minimizada mediante la adición de  $\text{CaCl}_2$  y/o ligera acidificación de la leche (Jakob y Puhan, 1986; VandenBerg y col., 1991).

El efecto de las variantes genéticas de  $\kappa$ -CN en el comportamiento de coagulación de leches tratadas por calor ha sido escasamente investigado. Schaar y col. (1985) en sus experiencias de quesería con leche pasteurizada ( $72^\circ\text{C}/15$  s) de los tipos  $\kappa$ -CN AA y  $\kappa$ -CN AB/BB observaron un 47% de tiempo más largo para cortar las cuajadas obtenidas con leches  $\kappa$ -CN AA. Esto indica que la  $\kappa$ -CN A tiene también un efecto negativo en leches calentadas.

#### **1.4.2.2. VARIANTES DE $\alpha_{s1}$ -CASEÍNA**

Con respecto a la influencia de las variantes genéticas de  $\alpha_{s1}$ -CN bovina en el tiempo de coagulación de la leche se han publicado algunos resultados contradictorios. Sin embargo parece existir acuerdo en que las leches que contienen  $\alpha_{s1}$ -CN C demuestran dar una cuajada más elástica que la leche con  $\alpha_{s1}$ -CN tipo BB (Sherbon y col., 1967; Pagnacco y Caroli, 1987) mientras que las leches que contienen  $\alpha_{s1}$ -CN A están asociadas a una cuajada extremadamente blanda.

#### **1.4.2.3. VARIANTES DE $\beta$ -CASEÍNA**

Los resultados disponibles en la bibliografía demuestran que tanto el tiempo de coagulación como la elasticidad de la cuajada parecen estar afectadas por las variantes de  $\beta$ -CN casi tan intensamente como por las variantes de  $\kappa$ -CN.

En los estudios que conciernen a los efectos de diferentes variantes de  $\beta$ -CN A ( $\beta$ -CN A<sup>1</sup>,  $\beta$ -CN A<sup>2</sup>,  $\beta$ -CN A<sup>3</sup>) se observa que las diferencias son poco importantes. Sin embargo, las leches que contienen la variante  $\beta$ -CN B, particularmente las leches con  $\beta$ -CN

BB, exhiben unos tiempos de coagulación más cortos (El-Negoumy, 1972; Jakob y Puhán, 1986) así como mayor elasticidad de cuajada (Feagan y col., 1972; Rampilli y col., 1988) que los tipos  $\beta$ -CN AA. De modo similar a las variantes de  $\beta$ -CN B, la  $\beta$ -CN C también ha demostrado ofrecer unos tiempos de coagulación más cortos.

#### 1.4.2.4. FENOTIPOS COMPUESTOS

Debido a que los alelos para las caseínas simples no se heredan independientemente según Grosclaude (1988) se debería prestar atención desde el punto de vista de la selección más bien a los haplotipos o fenotipos compuestos que al efecto de las proteínas simples en las propiedades tecnológicas de la leche. Desafortunadamente se han llevado a cabo pocos estudios en este aspecto.

Si se evalúa el tiempo de coagulación (Mariani y Leoni, 1985) o la elasticidad de cuajada (Corradini y Bergamaschi, 1974), la leche de vacas con el alelo B y C de  $\alpha_{s1}$ -CN unidos a los alelos B de  $\beta$ - y  $\kappa$ -CN, muestran notablemente una mejor aptitud a la coagulación que los tipos  $\alpha_{s1}$ -CN BB/ $\beta$ -CN AA/ $\kappa$ -CN AA. De los tres haplotipos más frecuentes presentes en la raza Normanda las combinaciones  $\alpha_{s1}$ -CN C/ $\beta$ -CN A<sup>2</sup>/ $\kappa$ -CN B así como  $\alpha_{s1}$ -CN B/ $\beta$ -CN B/ $\kappa$ -CN B probaron ser superiores al haplotipo  $\alpha_{s1}$ -CN B/ $\beta$ -CN A<sup>2</sup>/ $\kappa$ -CN B en lo que respecta a aptitud quesera de la leche.

#### 1.4.2.5. $\beta$ -LACTOGLOBULINAS

Aunque la  $\beta$ -Lg no está implicada directamente en el proceso de coagulación de la leche no calentada, las variantes genéticas de  $\beta$ -Lg han demostrado afectar a las propiedades de coagulación de la leche cruda de vaca. Prácticamente en todas las investigaciones realizadas se han observado tiempos de coagulación más cortos para la leche  $\beta$ -Lg AA cuando se compara con la leche  $\beta$ -Lg BB (Mácha y col., 1974; Marziali y Ng-Kwai-Hang, 1986b). Algunos investigadores demostraron una mayor elasticidad de cuajada para

la  $\beta$ -Lg BB en comparación con la  $\beta$ -Lg AA (Mariani y Leoni, 1985; Liberatori y col., 1990) mientras que en otros estudios no se encontró ninguna diferencia a este respecto (Tervala y col., 1985; Rampilli y col., 1988). Marziali y Ng-Kwai-Hang (1986c) han descrito una elasticidad de cuajada superior para el fenotipo  $\beta$ -Lg AA; sin embargo solamente 3 de las 31 vacas incluidas en este estudio eran de este fenotipo.

Otros autores no encontraron ningún efecto de las variantes de  $\beta$ -Lg ni en el tiempo de coagulación ni en la velocidad de formación de cuajada (Tervala y col., 1983; Morini y col., 1982).

Del estudio de los trabajos disponibles en la bibliografía se deduce que el efecto del polimorfismo genético de  $\beta$ -Lg en las propiedades de coagulación de la leche parece discutible; en cambio, la influencia de las variantes de  $\kappa$ -CN y  $\beta$ -CN puede ser considerada como demostrada, aunque las razones de por qué las vacas que portan el alelo B de estas caseínas producen leche con mejores propiedades de coagulación está todavía bajo discusión.

Dado que el polimorfismo genético de una proteína da lugar primariamente a una diferencia en su carga neta, una posible explicación de su influencia en las propiedades de coagulación podría ser que esto afecta la repulsión electrostática y el grado de hidratación de las micelas de caseína y/o el acceso de la quimosina al sitio sensible a la renina de la  $\kappa$ -CN; esto sería un efecto de la variante de la proteína como tal. Sin embargo, en el caso de la  $\kappa$ -CN la parte de la molécula que diferencia las variantes A y B se separa durante la coagulación como una parte del glicomacropéptido. Por lo tanto, las diferencias de carga de las micelas difícilmente pueden explicar el efecto de las variantes de  $\kappa$ -CN en la elasticidad de cuajada y sinéresis y, más que las variantes genéticas en sí mismas, los cambios concomitantes en la composición de la leche parecen ser la causa más probable de las diferencias en las propiedades de coagulación.

Los efectos del polimorfismo de las proteínas lácteas en la composición de la leche y la influencia de los componentes individuales de la leche en el proceso de coagulación, han sido muy intensamente investigados, de modo que el conocimiento actual ofrece una diversidad de teorías probables para explicar el efecto del polimorfismo genético en la aptitud a la coagulación de la leche. Como se confirma por algunas referencias disponibles, las posibles explicaciones son las siguientes:

- El contenido en caseína total y las proporciones relativas de las distintas caseínas de la leche.
- Las dimensiones de las micelas de caseína como característica influida por las proporciones relativas de las fracciones caseínicas.
- El grado de glicosilación de la  $\kappa$ -CN.
- La composición salina de la leche: contenido y actividad iónica de calcio, contenido en citrato, fosfato y pH.

En tanto que se acepta que todos estos factores son relevantes para el proceso de coagulación, su relación con el polimorfismo genético de las proteínas lácteas se ha establecido solamente en lo que respecta a los efectos cuantitativos en la fracción proteica. El polimorfismo en el locus de la proteína láctea evidentemente influye en el contenido de la proteína codificado por ese gen. Esto parece ser cierto para la  $\beta$ -Lg y particularmente para la  $\kappa$ -CN, el contenido de la cual ha demostrado ser particularmente alto en leche  $\kappa$ -CN BB ( $\kappa$ -CN BB > AB > AA).

#### **1.4.3. INFLUENCIA DE LAS VARIANTES GENÉTICAS EN LA SINÉRESIS DE LA CUAJADA**

Probablemente debido a la falta de métodos precisos y

eficaces, existen muy pocos trabajos que tratan sobre la sinéresis de cuajada obtenida a partir de leches con distintos fenotipos de proteínas lácteas.

Mariani y col. (1976) observaron que el queso fabricado a partir de leche con  $\kappa$ -CN tipo BB perdía aproximadamente un 15% más de peso dentro de las primeras 24 h que el queso de leches  $\kappa$ -CN AA, indicando una sinéresis más intensa de la cuajada tipo  $\kappa$ -CN BB.

Estas observaciones fueron confirmadas por McLean y Schaar (1989) con micelas artificiales de leche; para concentraciones similares de  $\kappa$ -CN en las citadas micelas, aquéllas que contenían  $\kappa$ -CN B estaban asociadas claramente con una mayor sinéresis. En experimentos paralelos con micelas artificiales calentadas (80°C/15 min), las muestras de leche con  $\kappa$ -CN B demostraron una mejor sinéresis. Por otra parte, la sinéresis era generalmente más lenta con las micelas conteniendo la  $\beta$ -Lg B que con las que contenían  $\beta$ -Lg A. Los autores concluyeron que, si la sinéresis de cuajada producida por coagulación ácida, mostrara la misma tendencia, esto sería importante para la fabricación de yogur. Vegarud y col. (1990), en cambio, encontraron que a partir de leche  $\kappa$ -CN AB se obtenía un yogur con mayor retención de agua cuando se comparaba con leche  $\kappa$ -CN AA.

#### **1.4.4. INFLUENCIA DE LAS VARIANTES GENÉTICAS EN EL RENDIMIENTO Y CALIDAD DEL QUESO**

Se sabe que una coagulación lenta de la leche conlleva problemas de rendimiento y calidad de queso. Los estudios sobre el efecto del polimorfismo genético de las proteínas de leche de vaca en quesería han sido llevados a cabo para varios tipos de queso.

Las primeras experiencias a este respecto fueron realizadas por Mariani y col. (1976) que fabricaron queso Parmigiano-

Reggiano a partir de leche recolectada de vacas fenotipadas  $\kappa$ -CN AA y  $\kappa$ -CN BB. La leche  $\kappa$ -CN BB, comparada con la tipo AA, ofrecía significativamente mejores propiedades relacionadas con la aptitud quesera, que se traducen en mayor elasticidad de cuajada con un corte de cuajada más uniforme así como un mayor rendimiento en queso (aproximadamente superior en 10%). Las pérdidas de grasa en el suero de quesería eran aproximadamente 50% inferiores, de aquí que el contenido de grasa de estos quesos fuera superior. Los análisis de los mismos quesos después de la maduración (Morini y col., 1979) revelaron aproximadamente un 4% menos de humedad, así como una menor proteólisis en el queso tipo  $\kappa$ -CN BB. Además, un mayor porcentaje de estos quesos fueron clasificados como "Queso de primera clase".

Graham y col. (1986) elaboraron queso Cheddar a escala de laboratorio a partir de leche de vacas individuales con los fenotipos AA de  $\beta$ -CN,  $\kappa$ -CN y  $\beta$ -Lg ("leche A") ó BB de  $\kappa$ -CN junto con AB ó BB para la  $\beta$ -CN y  $\beta$ -Lg ("leche B"). Con la "leche B" se obtuvo, en comparación a la "leche A", aproximadamente un 5% más de sólidos totales por unidad de proteína en leche; además, la recuperación de grasa y proteína en el queso fue significativamente mejor con la "leche B". Resultados similares fueron obtenidos para queso Parmesano y queso Camembert. Marziali y Ng-Kwai-Hang (1986a) en una producción a escala de laboratorio, obtuvieron queso Cheddar de aproximadamente 3,5% más de humedad y, significativamente, menores pérdidas de grasa y proteína en el suero procedente de leches  $\kappa$ -CN BB cuando se comparaba con el de leches  $\kappa$ -CN AA. Politis y Ng-Kwai-Hang (1988a) demostraron que el contenido en grasa de queso producido a partir de los tipos de leche  $\kappa$ -CN BB/AB era mayor que el de los tipos  $\kappa$ -CN AA.

Schaar y col. (1985) fueron los únicos investigadores que, utilizando leche pasteurizada, concluyeron que en la recuperación del contenido en grasa y humedad del queso, además de las variantes de  $\kappa$ -CN, también influye el procedimiento de fabrica-

ción, especialmente la temperatura de calentamiento de cuajada.

La leche de vacas homocigotas para la  $\beta$ -Lg B, al igual que la que contiene la  $\kappa$ -CN BB, muestra mejores propiedades relacionadas con la aptitud quesera particularmente con respecto al rendimiento quesero. Schaar y col. (1985), Marziali y Ng-Kwai-Hang (1986c) y Rahali y Menard (1991) encontraron que la recuperación de proteína a partir de leche con tipo  $\beta$ -Lg BB era significativamente superior que la de la leche tipo  $\beta$ -Lg AA (BB > AB > AA). Esto parece atribuirse a unos mayores contenidos relativos en caseína de leche de vacas de fenotipo  $\beta$ -Lg BB (Grosclaude, 1988).

Los efectos de los fenotipos de  $\beta$ -CN en rendimiento y composición de queso fueron estudiados por Marziali y Ng-Kwai-Hang (1986a, 1986c) que fabricaron queso a partir de leche  $\beta$ -CN A<sup>1</sup>A<sup>2</sup>, obteniendo un 4% más de rendimiento en queso y 4,2% menos en proteína comparado con leche  $\beta$ -CN A<sup>1</sup>A<sup>1</sup>.

Basado en cálculos teóricos de rendimiento en queso Parmesano, Aleandri y col. (1990) estimaron que los fenotipos BB de  $\kappa$ -CN y de  $\beta$ -Lg inducen a un mayor rendimiento quesero que los tipos AA. La leche tipo  $\alpha_{s1}$ -CN BC parece ser más adecuada que la  $\alpha_{s1}$ -CN BB. Los incrementos de rendimiento esperado por 1000 Kg de leche para las leches  $\kappa$ -CN BB y  $\alpha_{s1}$ -CN BC fueron 0,92 y 0,75 Kg de queso respectivamente. Además, los mismos autores calcularon los rendimientos queseros teóricos basados en contenido en grasa y proteína de la leche que se procesaba para queso Parmesano: los rendimientos queseros teóricos para la leche  $\kappa$ -CN BB concordaban casi perfectamente con el rendimiento quesero real. Los rendimientos calculados para leches  $\kappa$ -CN AA eran, en cambio, muy inferiores al rendimiento real. Las diferencias negativas para la leche  $\kappa$ -CN AA se consideraron como el "efecto de genotipo  $\kappa$ -CN". Este efecto posiblemente se debe a una menor retención de grasa en el coágulo de la leche  $\kappa$ -CN AA, que es el resultado de una cuajada un poco más débil.

El conocimiento actual en lo que respecta al polimorfismo de las proteínas lácteas indica que se debe realizar una clara distinción entre:

a) la relación de variantes genéticas y la composición de la leche incluída la de la fracción proteica y

b) la relación con las propiedades tecnológicas de la leche.

Los estudios que conciernen a la aptitud de la leche para la fabricación de diversos productos lácteos se han enfocado principalmente a las propiedades de la leche cruda para fabricación de queso, fundamentalmente la capacidad de coagulación y la elasticidad de la cuajada. Las relaciones entre variantes genéticas de proteínas lácteas y las propiedades tecnológicas de la leche han sido investigadas empíricamente con baja comprensión de las relaciones al azar tanto desde el punto de vista genético como del de la química láctea. Por lo tanto, antes de que las variantes genéticas se incluyan en estrategias de selección, deben ser elucidadas las relaciones reales con las características referentes al procesado de la leche.

#### **1.5. MEJORA GENÉTICA EN EL GANADO LECHERO**

Se sabe que las variantes genéticas están relacionadas con ciertas propiedades tecnológicas de la leche como la aptitud quesera o la estabilidad al calor. Por ello se está investigando y experimentando en el tema de la selección para ciertos genotipos. Es probable que en un futuro se proponga un sistema de pago para leche cruda que incluya las propiedades tecnológicas de la leche. Por ello se están poniendo a punto métodos rápidos para clasificar leches, determinando la relación de los parámetros como tiempo de coagulación o elasticidad del coágulo con el "input-output" en quesería.

Si las compañías lecheras deciden clasificar la leche en

función de sus características tecnológicas, posiblemente se afecten los programas de selección. La selección para ciertos genotipos sería muy fácil, ya que la heredabilidad de las propiedades tecnológicas parece seguir el mismo esquema que para grasa y proteína. Dentro de algunos años la leche cruda de una determinada región será utilizada principalmente para un solo producto. Por tanto, la leche llegará a ser una materia prima que se deberá adecuar a una utilización específica (Gibson, 1989).

En algunos países los programas de selección están ya planteándose incrementar la frecuencia de la variante B de  $\kappa$ -CN en el ganado bovino lechero debido a que esta variante ha mostrado repetidamente estar asociada a una leche que contiene más caseína y exhibe mejores propiedades de coagulación. Para Ng-Kwai-Hang (1990) no es recomendable en el estado actual de conocimientos un paso tan drástico en la selección, debido a la falta de información en lo que respecta a las posibles asociaciones de los genes  $\kappa$ -CN B con factores que pueden ser negativos para la producción láctea.

Actualmente el principal objetivo de mejora en ganado ovino es el aumento de la producción de leche por lactación; otros objetivos responden a facilidad de ordeño y persistencia de la lactación y, finalmente, la mejora de las características cualitativas de la leche (Espejo-Díaz, 1989). Sin embargo existen estudios que demuestran que el factor "repetibilidad" entre lactaciones del contenido en grasa y proteína es algo superior al calculado para la cantidad de leche producida (Carriedo y San Primitivo, 1989); esto es particularmente interesante en la selección del ovino productor de leche con destino a quesería, dado que el pago de la leche por calidad incluye primas considerables.

Es posible que en el futuro, en los programas de mejora genética de las razas ovinas lecheras se proponga la inclusión de las variantes genéticas de proteínas lácteas como un criterio

adicional en la selección, hecho que ya está llegando a ser una realidad en ganado vacuno.

## **2 . OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO**

## **2. OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO**

Con el establecimiento de cuotas de producción para la leche de vaca en los países pertenecientes a la CE, la leche de oveja ha cobrado un creciente interés, aumentando considerablemente su producción en los últimos años. Aunque una pequeña parte de la leche de oveja se destina al consumo como leche líquida o yogur, prácticamente la totalidad se emplea en la elaboración de queso.

Uno de los problemas que tiene planteada la industria quesera es el de mejorar la aptitud tecnológica de la materia prima. Se conoce que muestras de leche, aún con el mismo contenido en caseínas, presentan un comportamiento distinto frente al cuajo, así como considerable variación en el rendimiento en queso.

Por otra parte, estudios realizados en leche de vaca demuestran que existen determinadas variantes genéticas de las proteínas lácteas que inciden en las propiedades tecnológicas de la leche relacionadas con el proceso de elaboración del queso. El conocimiento de las características de las proteínas de la leche es un aspecto de importancia relevante, tanto desde el punto de vista de optimización de la tecnología quesera como de la selección y mejora ganadera. Sin embargo, son muy escasos los datos existentes al respecto en leche de oveja y prácticamente nulos en relación a las razas nacionales.

Por ello se planteó la realización de este trabajo que tiene como objetivo principal:

**"el estudio de la posible influencia del polimorfismo de las proteínas de leche de oveja de las razas Manchega y Segureña en la aptitud tecnológica de la leche en relación con el proceso de elaboración del queso".**

El logro de este objetivo, además de contribuir al conocimiento básico de las proteínas de leche de oveja puede aportar información de gran utilidad como criterio adicional de selección del ganado ovino lechero.

El presente trabajo se llevó a cabo mediante estudio de muestras individuales de leche de oveja de distintas razas y rebaños, con objeto de evitar la influencia de factores derivados de la consanguinidad, y en diferentes estados de lactación.

En una primera fase se estudiaron los polimorfismos de las seroproteínas y caseínas mediante diferentes técnicas electroforéticas de alta resolución incluyendo entre ellas la electroforesis bidimensional y la inmunotransferencia.

La segunda parte del trabajo se realizó en una serie de muestras de leche, procedentes de ovejas previamente fenotipadas para las caseínas y  $\beta$ -lactoglobulinas, y en ellas se estudiaron las características de composición así como las características del coágulo y el rendimiento quesero.

En una última etapa se realizó un estudio estadístico de los resultados obtenidos para determinar el efecto del polimorfismo de las proteínas lácteas ovinas sobre la aptitud quesera de la leche.

### **3 . MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. MUESTRAS DE LECHE**

Se han estudiado un total de 494 muestras individuales de leche de oveja de las razas Manchega y Segureña.

Por otra parte, para análisis de apoyo, se utilizaron muestras de leche de vaca, oveja y cabra, así como leches del mercado líquidas y en polvo.

##### A. Leche de oveja de raza Manchega

Las muestras de leche de oveja de raza Manchega se obtuvieron de 182 animales pertenecientes a dos rebaños: el de la Estación Experimental del CENSYRA en Valdepeñas (Ciudad Real), y el de la finca "La Poveda" del Centro Experimental del CSIC en Arganda del Rey (Madrid).

Del rebaño de Valdepeñas se estudió la leche de 113 ovejas al principio de la lactación; de ellas se seleccionaron 44 hembras cuya leche se estudió en fases sucesivas de la lactación. El total de muestras analizadas de este grupo fue de 237.

Del rebaño de Arganda del Rey se estudió la leche de 69 ovejas en dos puntos de la lactación. En una paridera posterior 15 de estos animales suministraron nuevamente muestras en ordeños efectuados en distintos momentos de la lactación. El total de muestras analizadas de este rebaño fue de 194.

##### B. Leche de oveja de raza Segureña

Las 50 ovejas de raza Segureña que proporcionaron las muestras pertenecen al rebaño del Centro de Selección Rodríguez Penalva en Huéscar (Granada).

Inicialmente se tomó una muestra de leche de cada oveja al principio de la lactación. Posteriormente se seleccionaron 13 ovejas cuya leche se estudió de nuevo aproximadamente hacia la mitad del ciclo de lactación.

Con el fin de minimizar el efecto del número de lactación, en ambas razas se seleccionaron ovejas representativas de diversas lactaciones (desde el número 1 al 9).

La toma de muestras de leche de oveja fue realizada por personal experimentado mediante ordeño manual.

Las muestras de leche fresca se transportaron en envases de plástico manteniéndose en refrigeración a 4°C hasta el momento de su procesamiento en el laboratorio; el tiempo que permanecieron las muestras en refrigeración fue siempre inferior a 24 h.

### **3.2. ANÁLISIS DE COMPOSICIÓN FÍSICO-QUÍMICA**

#### **3.2.1. DETERMINACIÓN DEL pH**

El pH de cada muestra se ha determinado en un volumen de leche previamente homogeneizado, siguiendo el método del Ministère de l'Agriculture de Francia (1974). La lectura del pH se realizó con un pH-metro Orion mod. 601 I.

#### **3.2.2. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA GLOBAL**

El contenido en grasa, proteínas, lactosa y extracto seco total de las muestras se ha medido con equipos instrumentales automatizados como describen Juárez y Martínez-Castro (1978).

##### **A. Principio del método**

En la leche están presentes constituyentes con grupos funcionales definidos: los hidroxilo de la lactosa, los enlaces peptídicos de las proteínas y los grupos carbonilo de las uniones éster de los triglicéridos o grasa; estos grupos presentan absorciones específicas en la región infrarroja del espectro a 9,60, 6,46 y 5,73  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

## **B. Equipos instrumentales**

Se utilizaron los equipos Milko-Scan mod. 203 (Foss Electric) y Multispec mod. M (Shields Instruments).

Estos equipos constan esencialmente de los siguientes elementos básicos:

- Un homogeneizador y bomba para la toma de muestra.
- Un espectrofotómetro infrarrojo de doble haz modificado para conseguir cambios rápidos en la longitud de onda y así obtener resultados de los componentes grasa, proteína y carbohidratos por separado.
- Una unidad de control que, en base a un calibrado previo convierte la señal del espectrofotómetro en una lectura directa en tantos por ciento, para ser expuesta en una pantalla de lectura o transferida a un sistema de impresión.

## **C. Ajuste del cero óptico y calibrado**

Antes de la realización de una serie de análisis se procede al ajuste del cero en los canales de grasa, proteínas y lactosa, utilizando agua en la cubeta. Esta lectura se comprueba periódicamente a fin de que la variación máxima sea de  $\pm 0,02$ .

Para el calibrado se utilizaron dos series de muestras de distinto tipo: esterilizadas y crudas. En el primer caso, mediante mezcla de leche entera, desnatada y concentrada, cuya composición se había determinado por los procedimientos de referencia (Gerber, Kjeldahl y determinación de azúcares reductores, para la grasa, proteínas y lactosa, respectivamente), se dispuso de un intervalo de concentraciones de 3,5 a 7,6 % de grasa, 5,0 a 5,9 % de proteínas, 4,0 a 5,5 % de lactosa y 14,4 a 19,4 % de sólidos totales. En el segundo caso se analizaron leches crudas de vaca, oveja y cabra, con objeto de lograr un intervalo de concentraciones próximo al antes citado.

### **3.2.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN CALCIO**

Se ha determinado el contenido en calcio de las muestras individuales de leche por espectrofotometría de absorción atómica según el método descrito por Juárez y Martínez-Castro (1979).

#### **A. Preparación de la muestra**

A 5 ml de leche se le adicionan 50 ml de ácido tricloroacético (ATC) al 24% y se añade agua desionizada hasta 100 ml.

Se agita durante media hora a intervalos de 5 min y a continuación se filtra a través de papel Whatman nº 40.

Para el análisis del calcio en leche de oveja, la dilución final, previa lectura en absorción atómica llevada a cabo en el suero ácido obtenido, fue de 1 a 20. Además se adicionó lantano (500 µg/ml) a la dilución final de medida, con objeto de acomplejar los iones interferentes. En los ensayos realizados se utilizó una disolución de tricloruro de lantano al 5% preparada a partir de óxido de lantano (5,86 gr), 5 ml de agua desionizada, 25 ml de HCl concentrado y, finalmente, agua desionizada hasta un volumen de 100 ml.

#### **B. Composición de las disoluciones patrón**

Con objeto de atenuar en lo posible la influencia de la matriz, las disoluciones patrón preparadas contenían, además de Calcio, los elementos Na, K y Mg en proporciones similares a las presentes en leche.

Se partió de una serie de disoluciones comerciales (Titri-sol, Merck) conteniendo 1,000 gr/ml de cada uno de los elementos minerales mayoritarios en leche: Na, K, Ca y Mg. A partir de ellas se prepararon, por dilución, 6 disoluciones patrón, para la realización de la curva de calibrado, cuya composición fue la que se indica en la tabla 3.1.

### C. Equipo instrumental

El espectrofotómetro de absorción atómica usado fue un Beckman mod. 1248, provisto de compensador de deuterio, integrador y memoria analógica, mechero Autolam Burner II y registrador potenciométrico Houston de 100 mV. Las características de la lámpara de cátodo hueco usada para el análisis de calcio, así como los parámetros de absorción atómica son los siguientes:

Longitud de onda (nm): 422,7

Características de la llama (Kg/cm<sup>2</sup>):

Aire: 1,60

Acetileno: 0,75

Características de la lámpara de cátodo hueco:

Referencia: Beckman 909592

Intensidad máxima (mA): 10

**Tabla 3.1. Composición de las disoluciones patrón.**

Solución <sup>(a)</sup>	Contenido en mg/l			
	Na	K	Ca	Mg
1	0,6	2	2	0,2
2	0,9	3	3	0,3
3	1,2	4	4	0,4
4	1,5	5	5	0,5
5	2,1	7	7	0,7
6	3,0	10,0	10,0	1,0

(a) Cada disolución patrón contenía, además, 1,2% de ATC y 500 ppm de lantano (Brooks y col., 1970).

### 3.3. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS LÁCTEAS

#### 3.3.1. MÉTODOS DE PRECIPITACIÓN QUÍMICA

##### 3.3.1.1. OBTENCIÓN DE CASEÍNAS Y SEROPROTEÍNAS

La obtención de las fases sérica y caseínica de cada muestra individual se ha realizado mediante precipitación a pH 4,6 según el método de Aschaffenburg y Drewry (1959).

Se ha ideado un sistema rápido para la separación de la fracción caseínica y seroproteíca a partir de pequeños volúmenes de leche, utilizando tubos tipo Eppendorf y un rotor de centrifuga específico para los mismos (rotor tipo 18.1 con capacidad de 24 tubos, de la centrifuga mod. J-21 B de Beckman). El modo de operar es el siguiente:

- 1º. Se toman con pipeta automática 0,6 ml de leche, previamente homogeneizada.
- 2º. Se añaden 0,3 ml de ácido acético al 10% y se agita; a continuación se añaden 0,3 ml de acetato sódico 1 M y se agita nuevamente.
- 3º. Se deja reposar durante 15 min a 30°C en un baño termostatzado.
- 4º. Las muestras se centrifugan a 5000 g durante 15 min a 5°C. Tras esta centrifugación la leche queda perfectamente separada en 3 fases: la grasa en la parte superior, un sobrenadante (que contiene las seroproteínas) en la parte media y un precipitado blanco (que contiene las caseínas) en la parte inferior.
  - Se mantienen durante 30 min en un recipiente con hielo picado para que la capa de grasa se endurezca y se pueda eliminar con una espátula.
  - El sobrenadante se recoge con pipeta automática y se filtra; para una mayor automatización del proceso de filtrado, se prepararon los filtros en el laboratorio rellenando puntas de la misma pipeta usada anteriormente con lana de vidrio.
  - El precipitado se lava 3 veces con agua acidulada a pH 4,6 con ácido acético al 10%. Para ello, en cada lavado se añade a cada Eppendorf 1 ml de agua acidulada, se mezcla y a continuación se centrifuga a 5000 g durante 15 min a 5°C, eliminando el sobrenadante por decantación.

Cuando fue necesaria la obtención de mayores cantidades de caseínas y seroproteínas se partió de 10 ml de leche, utilizando material de laboratorio y centrífuga adecuado a este volúmen. En este caso, el desnatado de la leche se realiza mediante centrifugación a 2000 g durante 30 min a 20°C, eliminando la capa de grasa después de reposo en baño de hielo durante 30 min. Para la acidificación de la leche se ajustan las cantidades de aditivos para llevar las muestras a pH 4,6. El suero se filtra; las caseínas se lavan cada vez con 10 ml de agua acidulada y a continuación se congelan y liofilizan.

Las caseínas y seroproteínas obtenidas se han utilizado para los análisis posteriores.

### 3.3.1.2. OBTENCIÓN DE $\beta$ -LACTOGLOBULINAS

Se han obtenido las distintas variantes de  $\beta$ -Lg de leche de oveja siguiendo el método de aislamiento de Fox (1967), mediante el cual las  $\beta$ -Lg permanecen en la fracción soluble tras la precipitación con ácido tricloroacético (ATC). En la figura 3.1 se muestra un esquema del procedimiento seguido para la obtención de las lactoglobulinas.

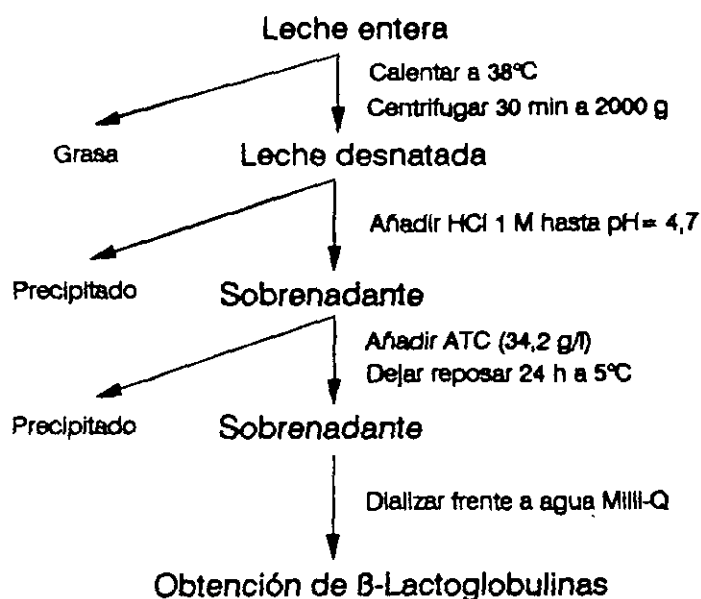


Figura 3.1. Esquema del procedimiento de obtención de  $\beta$ -Lactoglobulinas, Fox (1967).

### **3.3.2. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS**

Se han aplicado técnicas cromatográficas a escala preparativa con el fin de separar las diversas fracciones caseínicas. Se ensayaron dos tipos de cromatografía con diferentes principios de fraccionamiento: la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía de afinidad.

#### **3.3.2.1. FRACCIONAMIENTO DE LAS CASEÍNAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO**

El fraccionamiento de las caseínas ovinas mediante cromatografía de intercambio iónico se realizó siguiendo una modificación del método de Mercier y col. (1968).

##### **A. Preparación de la celulosa y relleno de la columna**

Se partió de 21 g de DEAE-celulosa D-8382 (Sigma) que se suspendieron en agua desionizada y fue filtrada y lavada con NaCl 0,25 N y NaOH 0,25 N hasta pH neutro y con HCl 0,25 N hasta pH ácido. Finalmente se lavó con agua hasta que el filtrado quedó libre de HCl. A continuación se acondicionó añadiendo 6 ml de tampón imidazol-HCl 0,02 M, pH= 7,4 por cada gramo de celulosa húmeda. Como germicida, se añadió azida sódica al 0,01%. Se ajustó el pH a 7,4 con HCl 1 N ó NaOH 1 N y tras 30 min se filtró a vacío a través de papel Whatman nº 40. Este tratamiento fue repetido hasta que el pH del filtrado se igualó al del tampón original. A continuación se relleno con ella una columna de vidrio de Pharmacia (52 x 2,5 cm) hasta una altura de 30 cm, y se equilibró con 2 l de tampón imidazol-HCl 0,02 M, pH= 7,0.

##### **B. Preparación de la caseína**

Se partió de 0,5 g de caseína isoeléctrica liofilizada, que se disolvieron en 5 ml de tampón imidazol-HCl 0,02 M, conteniendo urea 3,3 M y 0,1% de 2-mercaptoetanol. Esta solución se dializó a través de una membrana Spectra/Por nº 1, frente a 500 ml del

mismo tampón, durante 24 h a 4°C.

### **C. Fraccionamiento**

Inmediatamente antes de su uso, se pasó a través de la columna 1 l de tampón cromatográfico (imidazol-HCl 0,02 M, conteniendo urea 3,3 M y 0,1% de 2-mercaptoetanol). A continuación se aplicó la solución de caseína en la parte superior de la columna; cuando ésta ya había penetrado en la celulosa, se hicieron pasar 150 ml de tampón cromatográfico, seguidos por un gradiente continuo de NaCl de 0 a 0,3 M en 1,5 l de tampón. La separación se efectuó a temperatura ambiente con flujo de 5 ml/min (bomba peristáltica Büchler). A la salida de la columna se determinó la absorbancia a 280 nm utilizando un detector Uvicord LKB M-2138 y un registro LKB M-2210. El eluido se recogió en fracciones de 10 ml con un colector de fracciones Redirac mod. 2112 de LKB. Una vez reunidas las fracciones según el perfil cromatográfico, se dializaron exhaustivamente (Spectra/Por nº 1), se liofilizaron y se caracterizaron mediante electroforesis.

#### **3.3.2.2. FRACCIONAMIENTO DE LAS CASEÍNAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD**

Se ha empleado la cromatografía de afinidad para aislar las fracciones caseínicas que contienen grupos tiol ( $\kappa$ -CN y  $\alpha_{s2}$ -CN). Salvo leves modificaciones, se ha seguido el método de Dall'Olio y col. (1990).

##### **A. Preparación de la sefarosa y relleno de la columna**

Se ha utilizado una tiol-sefarosa 4B activada (Sefarosa-glutation-2dipiridildisulfuro, Pharmacia). Se partió de 5 g de la citada agarosa como producto seco que se suspendieron en 30 ml del tampón cromatográfico (Tris-HCl 0,01 M, pH= 7,0 conteniendo urea 7 M, NaCl 0,3 M y EDTA 1 mM); a continuación se equilibró en 1 l de tampón filtrando a través de una placa de vidrio fritado.

Con esta papilla se rellenó una columna de 0,8 x 30 cm (Pharmacia). La columna se dejó en reposo toda la noche para el buen empaquetamiento del lecho.

### **B. Preparación de la caseína**

Se pesaron 30 mg de la fracción caseínica y se disolvieron en 1,5 ml de tampón cromatográfico añadiendo 12 mg de 1,4 ditiotreitól (DTT) para reducir los puentes disulfuro. La caseína así reducida se sometió a elución mediante cromatografía de filtración en gel, a través de una columna de Sephadex G-25, para eliminar el DTT; como eluyente se utilizó el mismo tampón de disolución de la muestra previamente filtrado por una membrana filtrante (HVLP type, Millipore) de tamaño de poro 0,45  $\mu\text{m}$ . Finalmente se obtuvieron 25 ml de eluido de proteína.

### **C. Fraccionamiento**

En la figura 3.2 se muestra un esquema de las reacciones que tienen lugar durante el fraccionamiento cromatográfico y la regeneración de la columna.

El fraccionamiento de las caseínas se realizó en una cámara fría a 4°C.

El eluido proteico se sometió a la cromatografía covalente aplicándolo en la parte superior del lecho mediante una jeringa y haciéndolo penetrar en el gel de afinidad mediante succión con una bomba peristáltica (Peristaltic Pump P-3 de Pharmacia) regulando el flujo a 10 ml/h. El detector a 280 nm, colector de fracciones y registro de cromatograma fue el mismo que el utilizado para el fraccionamiento mediante cromatografía de intercambio iónico.

Para la elución de las proteínas covalentemente unidas a la sefarosa se emplearon 20 ml del tampón Tris-HCl, pH= 8,0, conteniendo 25 mM de L-cisteína.

La regeneración del gel de la columna se realizó con 2,2'-di-

piridil disulfuro 1,5 mM en tampón Tris-HCl a pH= 8,0.

El eluido cromatográfico se reunió en dos fracciones que se dializaron exhaustivamente (Spectra/Por nº 1) y se liofilizaron. Posteriormente se caracterizaron mediante electroforesis e isoelectroenfoque.

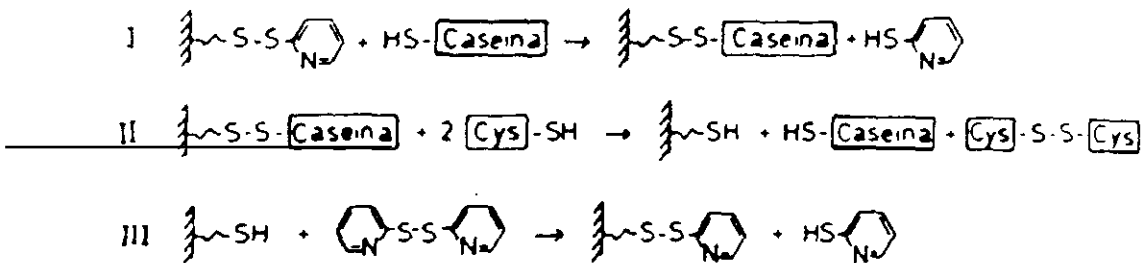


Figura 3.2. Esquema de las reacciones que tienen lugar durante el fraccionamiento cromatográfico de las caseínas que contienen grupos tiol mediante cromatografía de afinidad (I y II) y la regeneración de la columna (III).

### 3.4. ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN PROTEICA

La heterogeneidad de las proteínas lácteas se ha estudiado mediante métodos electroforéticos e inmunoquímicos. En el primer caso se describen los *métodos de separación* de las proteínas basados en técnicas electroforéticas (electroforesis, isoelectroenfoque, electroforesis bidimensional), los *métodos de tinción* y *métodos de secado* de placas, así como los *métodos de medida* de las bandas. Los métodos inmunoquímicos aplicados se basan en técnicas de inmunotransferencia.

Las distintas técnicas electroforéticas utilizadas tienen como fin la separación en un campo eléctrico de sustancias anfóteras, como son las proteínas, en función de su carga neta (electroforesis nativa), su peso molecular (electroforesis en presencia de agentes desnaturalizantes), su punto isoeléctrico

(isoelectroenfoque), o mediante la combinación de dos técnicas diversas (electroforesis bidimensional).

Se ha utilizado la electroforesis zonal y el gel de poliacrilamida como soporte inerte; éste se obtiene por copolimerización de dos moléculas, acrilamida y bisacrilamida, en presencia de un iniciador de la reacción que es el persulfato amónico y un catalizador, la tetrametiletilendiamina (TEMED). El polímero obtenido se caracteriza por la presencia de poros debidos a enlaces cruzados N,N' de la bisacrilamida.

La composición del gel se define por la terminología de Hjerten mediante los parámetros T y C, generalmente expresados en porcentaje, que resultan de las siguientes ecuaciones:

$$T = \frac{\text{g acril.} + \text{g bisacril.}}{100} \qquad C = \frac{\text{g bisacril.}}{\% T}$$

### 3.4.1. ELECTROFORESIS (EF)

#### 3.4.1.1. ELECTROFORESIS DE LAS CASEÍNAS

##### *Electroforesis en gel de poliacrilamida*

La EF de las caseínas en gel de poliacrilamida (PAGE) se ha realizado a pH alcalino, siguiendo el método de Ramos y col. (1977). La composición del gel, definida por los parámetros de Hjerten es de T= 7,7% y C= 2,6% conteniendo urea 4,79 M.

Las placas, de dimensiones 180 x 60 x 0,75 mm con 15 pocillos para las muestras, se han polimerizado en el formador de geles de la cubeta mod. SE 400 de Hoefer.

Las muestras de caseína remanentes en los tubos tipo Eppendorf tras la obtención por el *sistema rápido* (descrito en el apartado 3.3.1.1) se han disuelto en 1 ml de urea 7 M; de esta solución se toman 100  $\mu$ l y se añaden 600  $\mu$ l de urea 7 M. Para las

electroforesis, se mezclaron a partes iguales la última dilución proteica y una solución de colorante de seguimiento, que es la habitualmente usada para las electroforesis de carrera vertical (azul de bromofenol al 0,05% y glicerol al 40% mezclados en proporción 1:10). En cada pocillo se inyectaron 10  $\mu$ l de la solución de muestra así preparada.

Las fuentes de alimentación han sido ISCO mod. 490 y Hoefer PS500XT. La electroforesis se programa a intensidad constante de 10 mA hasta que la muestra penetra en el gel y 20 mA hasta el final de la carrera, siendo la duración total de la misma de 2 h 30 min aproximadamente.

#### *Electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida*

Se ha realizado la EF discontinua de las caseínas en gel de poliacrilamida (disc-PAGE) siguiendo la técnica a pH alcalino (pH= 8,8) y pH ácido (pH= 4,0), como describen Chianese y col. (1990a). La composición en el gel de concentración es de T= 3,1% y C= 6,4% conteniendo urea 4,5 M y en el gel de resolución de T= 6,6% y C= 2,4% conteniendo urea 8,8 M.

Para la preparación de los geles se utilizó el formador de geles Gel Slab Casting Apparatus GSC-2 de Pharmacia, que permite polimerizar 2 geles simultáneamente de dimensiones 180 x 140 x 0,7 mm ó 180 x 200 x 0,7 mm con 14 pocillos para las muestras en cada placa. Las electroforesis a pH alcalino se realizaron indistintamente en estos dos tamaños; en las electroforesis a pH ácido se utilizaron solo las de menores dimensiones.

Las muestras se prepararon mezclando 50  $\mu$ l de una solución de caseína al 1,5% en urea 9 M conteniendo 1% de 2-mercaptoetanol y 50  $\mu$ l de la solución habitual de colorante de seguimiento. Se inyectaron 10  $\mu$ l de las soluciones de muestra así preparadas en cada pocillo.

El equipo de electroforesis utilizado consta de cubeta vertical Gel Electrophoresis Apparatus GE 2/4 LS (Pharmacia),

donde es posible realizar simultáneamente la carrera de 2 placas, un baño termostático Multitemp (LKB) y una fuente de alimentación Electrophoresis Power Supply EPS 500/400 (Pharmacia).

Las electroforesis se programaron a voltaje constante. Cuando se utilizaron las placas de menor superficie se aplicaron 200 V y el tiempo total de carrera fue de 6 h para la electroforesis en medio alcalino y 150 V durante 20 h para la electroforesis en medio ácido; cuando se utilizaron las placas de mayores dimensiones (solo en la EF a pH alcalino) se programaron 150 V durante aproximadamente 12 h.

#### *Electroforesis en gel de poliacrilamida-agarosa*

Se ha realizado la EF de las caseínas a pH alcalino (pH= 8,8) utilizando como soporte un gel de poliacrilamida-agarosa (PAAGE). La preparación del gel se ha efectuado siguiendo el procedimiento de Uriel (1966) modificado por Gripon (1975). La composición del gel es: acrilamida -bisacrilamida - agarosa (5% - 0,16% - 0,8%)

Los geles, de dimensiones 250 x 120 x 0,7 mm, polimerizan horizontalmente entre dos placas de vidrio, una de ellas de las mismas dimensiones que el gel que se prepara y otra de mayores dimensiones, ambas separadas por cuatro pequeñas piezas de vidrio que le confieren a la placa el espesor deseado.

Las muestras se preparan mezclando 100  $\mu$ l de agarosa fundida y 100  $\mu$ l de una solución de caseína al 1,5% en urea 9 M conteniendo 1% de 2-mercaptoetanol. La aplicación de la muestra (20  $\mu$ l) se realiza en pocillos excavados sobre el gel en el margen del mismo más cercano al polo negativo.

El equipo utilizado, de la firma LKB, consta de una cámara para electroforesis horizontal Multiphor 2117, un baño termostático Multitemp y una fuente de alimentación EPS 500/400. La temperatura se mantiene constante a 10°C. El paso de la corriente eléctrica en el gel se asegura por la presencia del tampón de

migración situado en los reservorios laterales de la cámara electroforética que se comunican con el gel mediante una esponja.

La duración de la carrera electroforética fue de 3 h 30 min a voltaje constante de 200 V.

### ***Electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida en presencia de SDS***

Para conocer los pesos moleculares de las caseínas, se realizó la EF discontinua en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (disc-PAGE SDS) siguiendo la técnica de Laemmli (1970).

Se empleó un equipo de electroforesis PhastSystem (Pharmacia), dotado de una unidad de separación y control y una unidad de revelado. Se utilizaron geles comerciales (PhastGel Homogeneous 20. Gel de concentración: T= 7,5% y C= 3%. Gel de resolución: T= 20% y C= 2%) y tiras de tampón comerciales (PhastGel SDS Buffer Strips) de Pharmacia.

Las caseínas liofilizadas se disolvieron al 1% en urea 7 M; 25  $\mu$ l de esta solución de caseína se disolvieron en 475  $\mu$ l de tampón de la muestra (Tris-HCl 10 mM, 2% de SDS y 5% de 2-mercaptoetanol, pH= 8,0) y se calentaron, para desnaturalizarlas, a 100°C durante 5 min. Las muestras se aplicaron automáticamente en el extremo catiónico del gel, utilizando el aplicador de 8 pocillos (PhastGel Sample Applicator 8/1, Pharmacia). Se siguieron las condiciones electroforéticas del manual de instrucciones del equipo (Pharmacia, nota de aplicación nº 111).

La determinación de las masas relativas ( $M_r$ ) se ha realizado por interpolación en una curva de calibrado  $P_m/R_f$  obtenida a partir de una mezcla patrón que contiene: Fosforilasa b (94000 daltons), Albúmina (67000 daltons), Ovoalbúmina (43000 daltons), Anhidrasa carbónica (30000 daltons), Inhibidor de tripsina (20100 daltons),  $\alpha$ -lactalbúmina (14400 daltons).

### 3.4.1.2. ELECTROFORESIS DE LAS PROTEÍNAS DE SUERO

#### *Electroforesis en gel de poliacrilamida*

Se ha realizado la EF de las proteínas de suero en gel de poliacrilamida (PAGE) bajo condiciones alcalinas (pH= 8,6) siguiendo el método de Hillier (1976). La composición del gel es de T= 9,4% y C= 4,25%.

Para la polimerización de los geles y la carrera electroforética se utilizaron placas de idénticas dimensiones y el mismo equipo que se han descrito en el apartado 3.4.1.1. (EF nativa continua de las caseínas en gel de poliacrilamida), así como las mismas condiciones eléctricas. En cada pocillo se inyectaron 5  $\mu$ l de la solución de seroproteínas lácteas y 5  $\mu$ l de la solución habitual de colorante de seguimiento.

La duración aproximada de la electroforesis fue de 3 h.

#### *Electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida en presencia de SDS*

La separación electroforética de las proteínas de suero desnaturalizadas se ha realizado en geles discontinuos de poliacrilamida en presencia de SDS (disc-PAGE SDS) aplicando la técnica de Laemmli (1970). Se han utilizado geles preparados en el laboratorio de composición T= 4% y C= 2,7% en el gel de concentración y T= 15% y C= 2,7% en el gel de resolución.

Se empleó el mismo equipo de electroforesis vertical que en el caso de la EF nativa de las seroproteínas.

Las muestras se prepararon mezclando en proporción 2:1 el tampón desnaturalizante (el mismo que se utiliza para desnaturalizar las muestras de caseínas) y la solución seroproteica, sometiendo la mezcla a 100°C durante 5 min.

Se utilizaron las placas y el equipo que se describen para la EF nativa de las seroproteínas. Se inyectaron en cada pocillo 20  $\mu$ l de la solución de muestra más 5  $\mu$ l de azul de bromofenol al 0,05% como colorante de seguimiento. Las condiciones eléctricas

fueron de 15 mA constante durante toda la carrera cuya duración aproximada fue de 3 h 30 min.

La determinación de las masas relativas ( $M_r$ ) se realizó del mismo modo que en el apartado 3.4.1.1. (EF de las caseínas en presencia de SDS).

### **3.4.2. ISOELECTROENFOQUE (IEF)**

#### **3.4.2.1. ISOELECTROENFOQUE DE LAS CASEÍNAS**

El isoelectroenfoque de las caseínas se ha realizado en geles de poliacrilamida de distintos espesores y diversos gradientes de pH. Estos geles, preparados en el laboratorio, incluían urea en su composición.

#### **ISOELECTROENFOQUE EN GELES FINOS**

El IEF de las caseínas en gel de poliacrilamida de 1 mm de espesor y composición T= 5% y C= 3%, se ha realizado siguiendo el método de Addeo y col. (1984).

#### **A. Preparación de los geles de poliacrilamida con urea**

##### **A.1. Reactivos para la producción de geles y el isoelectroenfoque**

- Solución madre de acrilamida-bisacrilamida

Acrilamida .....	29,0 g
N,N'- metilenbisacrilamida .....	0,9 g
Urea .....	42,0 g
Agua destilada .....	hasta 100 ml

Esta solución se filtra y se añaden 2 g de Amberlita MB 3. Se conserva en un frasco de cristal de color topacio a 4°C durante aproximadamente 4 semanas.

- Solución de gel

Se prepara mezclando las siguientes cantidades de aditivos, anfólitos y solución madre de gel:

5,95 ml de solución madre de gel

26,95 ml de solución de urea 7,8 M

1,75 ml de solución de anfólitos \*

(\*) Se ensayaron diversos gradientes de pH en las placas (2,5-7; 2,5-8; 2,5-10) que se consiguieron con la mezcla de distintos anfólitos en la proporción que se indica:

Gradiente 2,5-7: anfólitos de pH 2,5-4, 3,5-5 y 5-7 en proporción 0,47:0,88:1.

Gradiente 2,5-8 (a): anfólitos de pH 2,5-4, 4-6 y 6-8 en proporción 1:1:0,92.

Gradiente 2,5-8 (b): anfólitos de pH 2,5-4, 4-6 y 5-8 en proporción 1:1:0,92.

Gradiente 2,5-8 (c): anfólitos de pH 2,5-4, 4-6,5, 4,5-5, 4,5-8 y 6-8 en proporción 0,5:0,83: 1:0,66:0,33.

Gradiente 2,5-10 (a): anfólitos de pH 2,5-4, 3,5-10 y 5-7 en proporción 0,55:1:0,66.

Gradiente 2,5-10 (b): anfólitos de pH 2,5-4, 3,5-10 y 5-7 en proporción 0,5:1:0,5.

La solución se homogeneiza y se desgasifica a vacío durante 5 min.

- Soluciones catalíticas: TEMED

Persulfato amónico al 1%

- Soluciones electrolíticas: Ánodo  $H_3PO_4$  1 M

Cátodo NaOH 1 M

## **A.2. Polimerización de los geles**

Los geles, de dimensiones 260 x 125 x 1 mm son polimerizados en un molde formado por dos placas de vidrio de 1 mm separadas por una junta de goma de caucho y otra placa de vidrio de 3 mm de espesor que le confiere firmeza al conjunto, todo ello sujeto con pinzas.

Inmediatamente antes de verter la solución de gel en la unidad de polimerización se añaden las soluciones catalíticas: 35  $\mu$ l de TEMED y 700  $\mu$ l de persulfato amónico al 1%.

El molde se rellena por la parte superior introduciendo la solución polimerizante con una jeringa. La polimerización ocurre en 40 min aproximadamente a temperatura ambiente. El molde se abre con ayuda de una espátula y los reactivos no polimerizados se eliminan por absorción con papel de filtro.

#### **B. Preparación de la muestra**

Las muestras de caseína liofilizada se disuelven en urea 9 M hasta una concentración del 1,5% y se le añade 1% de 2-mercaptoetanol.

#### **C. Isoelectroenfoque**

Se ha utilizado un equipo de LKB compuesto por: una cámara de electroforesis horizontal Multiphor 2117, un baño termostático Multitemp II 2219 y una fuente de alimentación Macrodrive 5 2297, de potencia constante.

Las placas de IEF se colocan sobre la cámara en la que previamente se habrán depositado unas gotas de agua destilada.

Las tiras de los electrodos (Electrode Strips 2,5 x 6,5 x 230 mm, Pharmacia) se empapan en las correspondientes soluciones electrolíticas anódica y catódica y se colocan en el gel a una distancia de 9,5 cm entre ellas.

Las condiciones eléctricas máximas durante toda la carrera, incluida la prefocalización son de 1200 V, 16 W y 150 mA, manteniendo constante la temperatura de la cámara a 12°C.

Previa a la focalización se realiza una prefocalización en ausencia de muestras durante 1 h. Una vez realizado el preenfoco, se inyectan con pipeta automática en los aplicadores de muestra (papel Whatman nº 1, 10 x 5 mm) 8  $\mu$ l de cada solución de muestra y se colocan en el gel a 5 mm del ánodo en sentido longitudinal presionando ligeramente; después de 1 h de focalización de la muestra se retiran los aplicadores, siendo el tiempo total de focalización de 2 h 15 min.

## ISOELECTROENFOQUE EN GELES ULTRAFINOS

El IEF de las caseínas en geles ultrafinos (UTLIEF) se ha realizado en placas de 0,2 mm de espesor y composición T= 5% C= 3%. Se ha aplicado el método de Krause (1989) modificando el gradiente de pH de los geles para conseguir mejor resolución en la zona de focalización de las distintas fracciones caseínicas.

### A. Preparación de los geles de poliacrilamida con urea

#### A.1. Reactivos para la producción de geles y el isoelectroenfoque

##### - Solución madre de acrilamida-bisacrilamida

Acrilamida .....	4,85 g
N-N'- metilenbisacrilamida .....	0,15 g
Urea .....	48,05 g
Glicerol (87% p/p) .....	12,22 g
Agua destilada .....	hasta 100 ml

Desionizar agitando con 2 g de Amberlita MB 3 durante 30 min. Filtrar por membrana de 0,45  $\mu$ m. Se conserva en un frasco de cristal de color topacio a 4°C durante aproximadamente 4 semanas.

##### - Solución de gel

Se prepara mezclando las siguientes cantidades de aditivos, anfólitos y solución madre de gel:

9,0 ml de solución madre de gel
24 mg de $\beta$ -alanina
100 $\mu$ l de anfólito pH 2,5-4
100 $\mu$ l de anfólito pH 4-5
100 $\mu$ l de anfólito pH 4-4,5
100 $\mu$ l de anfólito pH 4,5-5
100 $\mu$ l de anfólito pH 4-6
100 $\mu$ l de anfólito pH 5-8

La solución se homogeneiza y se desgasifica a vacío durante 2-3 min.

##### - Soluciones catalíticas: TEMED

Solución de persulfato amónico al 40%

- Soluciones electrolíticas: Ánodo  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1 M  
Cátodo NaOH 0,5 M
- Eter de petróleo

### **A.2. Polimerización de los geles**

Los geles, de dimensiones 265 x 125 x 0,2 mm, polimerizan sobre una película plástica (GelBond PAG Film de Pharmacia) en el equipo UltraMould 2217-200 Gel Casting Unit de LKB.

Inmediatamente antes de verter la solución de gel en la unidad de polimerización, se añaden 10  $\mu\text{l}$  de cada una de las soluciones catalíticas. La polimerización ocurre aproximadamente en 60 min a temperatura ambiente.

### **B. Preparación de la muestra**

La muestra se prepara del mismo modo que se indicó en el apartado B) del Isoelectroenfoco de caseínas en geles finos.

### **C. Isoelectroenfoco**

El equipo utilizado ha sido el mismo que se describe en el apartado C) de Isoelectroenfoco de las caseínas en geles finos.

El termostato de refrigeración se gradúa a 12°C. Se depositan unas gotas de éter de petróleo en el centro de la cámara electroforética sobre la que se deposita el gel con cuidado para evitar la formación de burbujas y enjugando el exceso de éter con papel de filtro.

Las tiras de electrodos (Electrofocusing Electrode Strips, Pharmacia) se empapan con las soluciones electrolíticas correspondientes, se cortan para ajustarlas a la longitud del gel y se colocan en las posiciones previstas (9,5 cm de distancia entre ellas).

El enfoque se realiza en las condiciones que se indican en la tabla 3.2. Una vez realizado el preenfoco (fase 1), se ponen con pipeta automática en los aplicadores de muestra (papel

Whatman nº 1, 10 x 5 mm) 10  $\mu$ l de cada una de las soluciones de muestra, se colocan en el gel a 5 mm del ánodo en sentido longitudinal y se presiona ligeramente. Los aplicadores de muestra se extraen cuidadosamente tras 60 min de enfoque de la muestra.

**Tabla 3.2. Condiciones eléctricas programadas para IEF de caseínas en geles ultrafinos.**

Fase	Tiempo (min)	Tensión (V)	Intensidad (mA)	Potencia (W)
1. Preenfoque	25	2000	15	4
2. Enfoque de la muestra	60	2000	15	4
3. Enfoque final	90	3000	5	20

### ISOELECTROENFOQUE EN EQUIPO AUTOMATIZADO

Se ha realizado el IEF de las caseínas en la unidad de separación de un equipo automático de EF (PhastSystem, Pharmacia) con geles no comerciales de composición T= 5% y C= 3%, siguiendo el método de Moio y col. (1989b).

#### A. Preparación de los geles de poliacrilamida con urea

##### A.1. Reactivos para la producción de geles y el isoelectroenfoque

- Solución madre de gel. Se prepara del mismo modo que la solución madre de gel para el isoelectroenfoque de caseínas en geles finos (apartado A.1. del IEF de caseínas en geles finos).

- Solución de gel. Se prepara mezclando en un tubo de ensayo las siguientes cantidades de aditivos, anfólitos y solución madre de gel:

340  $\mu$ l de la solución madre de gel

1540  $\mu$ l de urea 7,8 M

100  $\mu$ l de la solución de anfólitos\*

(\*) Se ensayaron dos gradientes de pH en las placas que se consiguieron con la mezcla de distintos anfólitos en la proporción que se indica.

Gradiente 2,5-6,5: anfólitos de pH 2,5-4,5 y 4-6,5 en proporción

1:1.

Gradiente 2,5-10: anfólitos de pH 2,5-4 y 3,5-10 en proporción 0,25:1.

- Soluciones catalíticas. Las mismas que se indican en el apartado A.1. del IEF de caseínas en geles finos.

### A.2. Polimerización de los geles

Se siguió el método para la preparación de dos geles de dimensiones 50 x 41 x 0,45 mm. Los geles polimerizan sobre una película plástica GelBond PAG Film. Inmediatamente antes de introducir la solución de gel en la unidad de polimerización, se añaden 2  $\mu$ l de TEMED y 40  $\mu$ l de persulfato amónico y se lleva a un agitador de tubos. En la fig. 3.3 se muestra el modo de ensamblaje de los moldes de polimerización así como el relleno de los mismos. La polimerización ocurre a temperatura ambiente en 30 min, aproximadamente. El molde se abre con ayuda de una espátula y los reactivos no polimerizados se eliminan por absorción con papel de filtro.

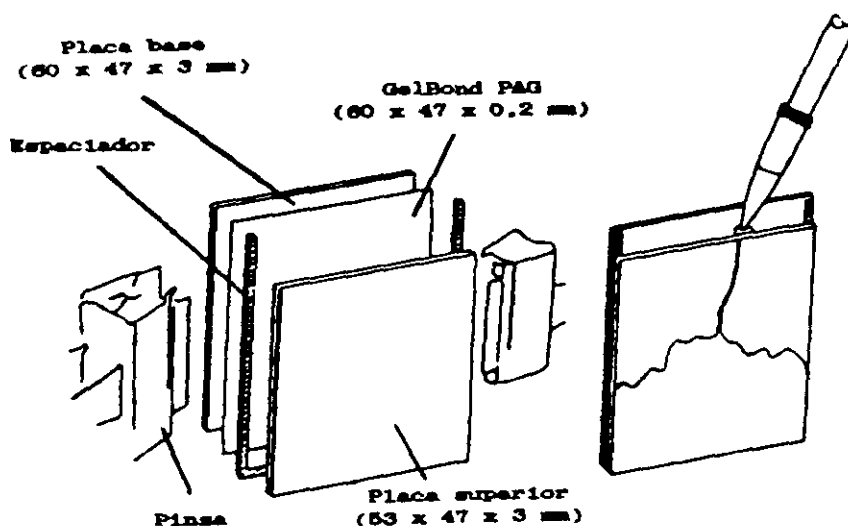


Figura 3.3. Modo de ensamblaje y relleno de los moldes de polimerización para carrera en equipo PhastSystem.

## B. Preparación de la muestra

Las muestras de caseína liofilizada se disuelven en urea 7,8 M hasta una concentración del 1% y se añade 0,1% de 2-mercaptoetanol.

## C. Electroenfoque

El enfoque isoeléctrico se lleva a cabo en el equipo PhastSystem con electrodos que se aplican directamente sobre el gel. Se programaron las condiciones eléctricas que se detallan en la tabla 3.3.

**Tabla 3.3. Condiciones eléctricas programadas para IEF de caseínas en equipo automatizado.**

Fase	Tensión (V)	Intensidad (mA)	Potencia (W)	T <sup>a</sup> (°C)	Voltios/hora
1. Preenfoque	200	2	3,5	8	80
2. Enfoque de la muestra	200	2	2,5	8	15
3. Enfoque	1200	5	3,5	8	500

El aplicador de muestras (PhastGel Sample Applicator 8/1, Pharmacia) desciende después de 80 Vh y asciende después de 15 Vh adicionales (total 95 Vh). Se aplica 1  $\mu$ l de cada solución de muestra en la superficie del gel con el aplicador de muestra en la ranura anódica.

### 3.4.2.2. ISOELECTROENFOQUE DE LAS PROTEÍNAS DE SUERO

#### ISOELECTROENFOQUE EN GELES FINOS

El IEF de las proteínas de suero se ha realizado en placas de poliacrilamida con anfólitos de pH de 3,5-9,5 (LKB Ampholine PAGplates) de dimensiones 245 x 110 x 1 mm. La composición de los geles es de T= 5% y C= 3%. Se ha seguido el procedimiento descrito por Ruiz-Martínez y Santillana-López (1986).

### **A. Reactivos para el isoelectroenfoque**

- Soluciones electrolíticas: Ánodo  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1 M  
Cátodo NaOH 1 M
- Aceite de parafina

### **B. Preparación de la muestra**

La muestra a ensayar es la fracción de nitrógeno soluble a pH 4,6.

### **C. Procedimiento**

Se ha utilizado el mismo equipo de EF horizontal que el descrito para el IEF de las caseínas en geles finos.

Las placas de poliacrilamida se colocan sobre la cubeta refrigerada ( $12^\circ\text{C}$ ) en la que previamente se ha extendido una fina capa de aceite de parafina. Las tiras de los electrodos (Electrofocusing Strips, Pharmacia), previamente humedecidas en las soluciones electrolíticas correspondientes, se sitúan sobre el gel a una distancia de unos 9,5 cm. entre ellas.

Las muestras se aplican sobre papeles Whatman 3MM (5 x 10 mm) colocados en sentido transversal a 5 mm de distancia del cátodo. El volumen aplicado es de 7,5  $\mu\text{l}$ .

Las condiciones eléctricas de la carrera son 1500 V, 50 mA y 10 W. No se realiza preenfoco. Transcurridos 30 min se retiran los papeles Whatman en los que se aplicó la muestra. El enfoque de las proteínas se completa a las 2 h desde el comienzo del experimento.

### **ISOELECTROENFOQUE EN GELES ULTRAFINOS**

El IEF de las seroproteínas en geles ultrafinos (UTLIEF) se ha realizado en placas de 0,2 mm de espesor y composición T= 5% y C= 3%, siguiendo el método de Krause (1991).

En síntesis, el modo de operar es el mismo que el descrito para el IEF de caseínas en geles ultrafinos en el apartado

3.4.2.1., modificando la preparación del gel que no incluye  $\beta$ -alanina y el gradiente de pH (2,5-7) que se consigue con la mezcla de 3 anfólitos:

- Anfólito pH 2,5-4,5: 0,25 ml
- Anfólito pH 4-6,5: 0,20 ml
- Anfólito pH 6-7: 0,20 ml

Los parámetros eléctricos aplicados son los que se detallan en la tabla 3.4.

**Tabla 3.4. Condiciones eléctricas programadas para IEF de seroproteínas en geles ultrafinos.**

Fase	Tiempo (min)	Tensión (V)	Intensidad (mA)	Potencia (W)
1. Preenfoque	30	2500	15	4
2. Enfoque de la muestra	60	2500	15	4
3. Enfoque final	60	2500	5	20
	40	2500	6	20
	30	2500	7	25

#### ISOELECTROENFOQUE EN EQUIPO AUTOMATIZADO

Se ha realizado el IEF de las seroproteínas en equipo automático de EF horizontal (PhastSystem, Pharmacia) utilizando placas de poliacrilamida de composición T= 5% y C= 3% (PhastGel IEF 4-6,5, Pharmacia); se han seguido las condiciones de separación y tinción que se indican en el manual del equipo.

Las condiciones eléctricas programadas para la separación son las que se exponen en la tabla 3.5.

**Tabla 3.5. Condiciones eléctricas programadas para IEF de seroproteínas en equipo automatizado.**

Fase	Tensión (V)	Intensidad (mA)	Potencia (W)	Tª (°C)	Voltios/hora
1. Preenfoque	2000	25	2	20	80
2. Enfoque de la muestra	2000	25	2	20	40
3. Enfoque final	2000	25	4	20	540

Se aplicó 1  $\mu$ l de cada solución seroproteica en la superficie del gel con el aplicador de muestras de 8 pocillos en la ranura catódica.

### **3.4.2.3. ISOELECTROENFOQUE DE LECHE ENTERA**

Se ha realizado el IEF de las muestras de leche de oveja siguiendo el método de Bovenhuis y Verstege (1989) para detección de variantes genéticas en proteínas de leche de vaca. La separación y tinción se realizan en las respectivas unidades del quipo automatizado de electroforesis PhastSystem, Pharmacia.

#### **A. Preparación de las placas**

Se utilizaron placas comerciales (PhastGel IEF 4-6,5, Pharmacia). Antes de su uso, las placas se incubaron durante una noche en 100 ml de urea 8 M conteniendo 1% de Tritón X-100. Después de la incubación, los geles se equilibraron durante 15 min en una solución de urea 8 M conteniendo 0,8% de Tritón X-100 y 16% (p/v) de anfólitos portadores de gradiente de pH 2,5-4,5 (0,62% p/v) y 4-6,5 (0,83% p/v) mezclados en la proporción 1:1. El exceso de líquido de la superficie se eliminó con aire comprimido.

#### **B. Preparación de la muestra**

Se mezclan 100  $\mu$ l de leche entera y 500  $\mu$ l de una solución de urea 8 M conteniendo 3% de 2-mercaptoetanol. A continuación la mezcla se incuba durante 15 min a temperatura ambiente.

#### **C. Isoelectroenfoque**

El isoelectroenfoque se ha llevado a cabo en la unidad de separación del equipo PhastSystem. Se programaron las condiciones eléctricas que se detallan en la tabla 3.6.

En cada calle se aplicó de modo automático con el aplicador de muestras de 8 pocillos 1  $\mu$ l de la solución de muestra en la

ranura anódica del gel.

**Tabla 3.6. Condiciones eléctricas programadas para IEF de leche entera.**

Fase	Tensión (V)	Intensidad (mA)	Potencia (W)	Tª (°C)	Voltios/hora
1. Preenfoque	2000	25	2	20	80
2. Enfoque de la muestra	2000	25	2	20	40
3. Enfoque final	2000	25	4	20	540

### **3.4.3. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (EF-2D)**

#### **3.4.3.1. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DE LAS CASEÍNAS**

##### *1ª dimensión EF - 2ª dimensión IEF*

La EF-2D de las caseínas, disc-PAGE a pH alcalino (descrita en el apartado 3.4.1.1. EF discontinua en gel de poliacrilamida) en primera dimensión, seguida de IEF (como se detalla en el apartado 3.4.2.1. IEF de las caseínas en geles finos, gradiente de pH 2,5-8) en segunda dimensión, se ha realizado según el procedimiento de Di Luccia y col. (1986).

Para la separación electroforética se han inyectado 30  $\mu$ l de la solución de muestra; después de la carrera en primera dimensión se separa, mediante corte con bisturí, la calle del gel en la que se ha realizado el fraccionamiento de la proteína, que se somete a un primer lavado con agua destilada y seguidamente se deja equilibrar durante 15 min en una solución de urea 9 M conteniendo 1% de 2-mercaptoetanol. A continuación la tira de gel se deposita en la parte alcalina del gel de focalización y es sometida a migración. La carrera isoelectroforética se completa a las 3 h 30 min.

### 3.4.3.2. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DE LAS PROTEÍNAS DE SUERO

#### *1ª dimensión EF - 2ª dimensión IEF*

Se ha realizado la EF-2D de las seroproteínas acoplando la EF nativa como primera dimensión al gel de IEF en segunda dimensión.

En la primera etapa las proteínas se separaron mediante electroforesis nativa según el método de Hillier (descrito en el apartado 3.4.1.2, EF nativa de las seroproteínas), inyectando en el pocillo 30  $\mu$ l de la muestra a la que se aplica la técnica bidimensional. En una segunda etapa las proteínas se sometieron al enfoque isoeléctrico en geles ultrafinos (como se especifica en el apartado 3.4.2.2.), incrementando en este último caso el tiempo de carrera que fue de 3 h.

El modo de operar es el mismo que se describe para la EF-2D de las caseínas, salvo en la preparación de la tira del gel de primera dimensión, que solo requiere un lavado en agua destilada.

#### *1ª dimensión IEF - 2ª dimensión EF SDS*

Se ha seguido la técnica de Trieu-Cuot y Gripon (1981) para EF-2D.

El IEF en primera dimensión se ha realizado en placas ultrafinas (gel de Krause) como se describe en el apartado 3.4.2.2. (IEF en geles ultrafinos). Para la separación en primera dimensión se han aplicado en el gel de isoelectroenfoco 20  $\mu$ l de la muestra. Después de la carrera de focalización, se corta con bisturí la parte de gel (incluido soporte plástico GelBond PAG Film), en la que se ha realizado el fraccionamiento isoelectroforético, se lava en agua destilada y a continuación se equilibra durante 20 min en el tampón de la muestra para SDS vertical.

La segunda dimensión se realiza sometiendo la tira de IEF a una EF vertical en un sistema discontinuo de PAGE SDS como se

detalla en la sección correspondiente del apartado 3.4.1.2., estableciendo en el gel de concentración 3 pocillos para las muestras: uno central de mayor capacidad donde se introduce el gel de primera dimensión equilibrado, y dos laterales para muestras de referencia.

La EF se completa en 5 h.

## **MÉTODOS DE TINCIÓN**

Se describen brevemente los métodos de tinción empleados para cada tipo de colorante.

### **A. TINCIÓN CON AZUL COOMASSIE G-250**

**Método de Blakesley y Boezy (1977).** Con este método de tinción se tiñeron las placas de PAAGE de caseínas, las placas de PAGE de seroproteínas y las placas de IEF de caseínas en geles finos. **Método de Krause (1992).** Con este método de tinción se tiñeron las placas de IEF en geles ultrafinos.

### **B. TINCIÓN CON AZUL COOMASSIE R-250**

**Método de Winter y Anderson (1977).** Con este método se tiñeron las placas de PAGE de caseínas y los geles de disc-PAGE SDS de seroproteínas así como las placas de IEF de seroproteínas en geles finos.

### **C. TINCIÓN CON AZUL COOMASSIE R-350**

La tinción con azul Coomassie R-350 es la que se ha utilizado habitualmente para teñir las placas en la unidad de tinción del equipo PhastSystem. Los métodos de tinción aplicados para las placas de disc-PAGE SDS de caseínas así como las placas de IEF de seroproteínas y caseínas en equipo automatizado son los que se describen en el manual de usuarios del equipo, nota de aplicación nº 200.

El método de tinción para IEF de leche entera, propuesto por

Bovenhuis y Verstege (1989), consiste en una modificación del que se describe en el manual. La solución de tinción se prepara con 0,03% PhastGel Blue R en 30% de metanol y 10% de ácido acético en agua destilada, añadiendo 0,1% (p/v) de sulfato de cobre. La fijación de proteínas se realiza durante 10 min; la tinción y la última decoloración (25 min) se realizan a 37°C.

## **MÉTODOS DE SECADO**

### **A. Secado en equipo secador de placas**

Los geles de electroforesis se han secado en secador de placas. Para ello se han utilizado equipos específicos, como el Slab Dryer mod. 443 de Bio-Rad, y el Gel Slab Dryer de Pharmacia. El gel se coloca entre dos hojas de papel de celofán empapadas en agua destilada, evitando atrapar burbujas de aire. El secado se ha hecho a vacío (80 mm Hg) a 60°C durante 3 h 30 min.

### **B. Secado a temperatura ambiente**

Las placas de electroenfoque se han secado a temperatura ambiente. Los geles finos se colocan entre dos hojas de papel de celofán, empapadas en agua destilada, o se cubren solo de una de éstas si el gel va provisto de un soporte plástico (geles comerciales), evitando atrapar burbujas de aire. Así el secado se completa a las 48 h. Los geles ultrafinos se secan al aire (2 a 3 h) o con un secador de pelo (10 a 15 min).

## **MÉTODOS DE MEDIDA**

Los geles secos se analizaron por densitometría para determinar los porcentajes relativos de los componentes proteícos presentes. Se utilizaron dos equipos densitométricos:

- Equipo Shimadzu formado por un densitómetro de doble longitud de onda (Chromato Scanner Cs-930) y un sistema integrador con impresión gráfica (Data Recorder DR-2).

- Densitómetro Ultroskan (LKB), conectado a un ordenador Appel II, utilizando un programa de cálculo Gelscan (LKB 4).

Las placas teñidas con azul Coomassie G-250, R-250 y R-350, se han medido a 600 nm, y las teñidas con nitrato de plata a 450 nm.

#### **3.4.4. INMUNOTRANSFERENCIA**

Se han aplicado métodos inmunoquímicos para la identificación de bandas electroforéticas, utilizando inmunosueros específicos anticaseínas y antiseroproteínas lácteas. La técnica de inmunotransferencia se ha realizado como describen Chianese y col. (1992).

##### **3.4.4.1. INMUNOSUEROS**

Como anticuerpos primarios se utilizaron inmunosueros anticaseínas cedidos por el Dr. Moio (Facultad de Industrias Agrarias. Universidad de Nápoles) e inmunosueros comerciales antiseroproteínas lácteas.

Los inmunosueros anticaseínas individuales ( $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ -CN) habían sido obtenidos por inmunización de conejos siguiendo el procedimiento que describen Moio y col. (1989a).

Los inmunosueros antiseroproteínas lácteas son: anti  $\beta$ -lactoglobulina bovina (Laboratorios Nordic), antiseroproteínas lácteas ovinas (Sigma) y anti $\alpha$ -lactoalbúmina humana (Sigma); estos 3 inmunosueros habían sido desarrollados en conejo y, para su reconstitución se siguieron las pautas indicadas en los correspondientes prospectos comerciales.

Como anticuerpos secundarios se han utilizado los inmunosueros desarrollados en cabra o cerdo contra Ig de conejo marcados con peroxidasa (Goat peroxidase conjugated anti-rabbit IgG, Bio-Rad; Swine peroxidase conjugated anti-rabbit Ig, Dako).

### 3.4.4.2. METODOLOGÍA

#### A. Reactivos para la inmunotransferencia

- Membrana de nitrocelulosa (NC): TransBlot Transfer Medium 0,45  $\mu\text{m}$ , Bio-Rad.
- Papel Whatman 3 MM
- Solución tampón fosfato (PBS): NaCl 4,5% y Na H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 M, pH= 7,0. La solución PBS fue utilizada también diluída en proporción 1:4 en agua destilada
- Solución de lavado (WB):
  - Solución PBS ..... 200 ml
  - Tritón X-100 ..... 2 ml
  - Gelatina en láminas (cola de pescado) ..... 10 g
  - Agua destilada ..... hasta 1000 ml
- Solución de revelado:
  - Diaminobencidina ..... 50 g
  - Tampón Tris-HCl 0,1 M pH= 7,5 ..... 10 ml
  - NiCl<sub>2</sub> al 1% ..... 6 ml
  - Agua destilada ..... hasta 100 ml
- Peróxido de hidrógeno (Perhidrol 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Merck)

#### B. Fases de la inmunotransferencia

El "inmunoblotting" se desarrolla en tres fases: transferencia, incubación y revelado.

#### Transferencia

Las proteínas, separadas en el gel de electroenfoque mediante la técnica bidimensional, o en el de electroforesis monodimensional, son transferidas por capilaridad a la membrana de NC.

Dos membranas de NC, de las mismas dimensiones que el gel, se equilibran en solución PBS diluída durante aproximadamente 10 min. La primera membrana de NC se deposita sobre el gel de

poliacrilamida durante aproximadamente 2 min y después se elimina. La segunda membrana se adhiere cuidadosamente al gel evitando la formación de burbujas de aire; sobre ésta se aplica un folio de papel Whatman también equilibrado en la solución PBS diluída y, por último, 3 folios del mismo papel Whatman secos; el tiempo de contacto es de 20 min.

### **Incubación**

La fase de incubación se realiza sometiendo la membrana de NC a los procesos de lavado, incubaciones y acondicionamiento que se detallan a continuación:

Proceso	Vol. de solución	Tiempo
Lavado	50 ml de solución WB	3 x 10 min
1ª Incubación	75 $\mu$ l de antisuero en 50 ml de solución WB	1 h
Lavado	50 ml de sol. WB	3 x 10 min
2ª Incubación	25 $\mu$ l de sol. de peroxidasa en 50 ml de solución WB	45 min
Lavado	50 ml de solución WB	10 min
Acondicionamiento	50 ml de solución de PBS diluída	2 x 10 min

Los inmunosueros anticaseínas y antiseroproteínas lácteas se utilizan como anticuerpos primarios en la primera incubación; las inmunoglobulinas conjugadas con peroxidasa constituyen los anticuerpos secundarios en la segunda incubación.

### **Revelado**

La puesta en evidencia de las bandas ocurre con la adición a la membrana de NC de 50 ml de solución de revelado y 200  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno.

### **3.5. APTITUD A LA COAGULACIÓN**

La aptitud de la leche a la coagulación se ha determinado en base a dos criterios: las características del coágulo que produce sometida a la acción del cuajo y el rendimiento en queso.

#### **3.5.1. DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL COÁGULO**

Los criterios de control habitualmente utilizados para seguir el fenómeno de la coagulación y definir las características del coágulo son el tiempo de coagulación, la velocidad de formación del coágulo y la elasticidad máxima.

Estos parámetros, expresión de transformaciones físico-químicas complejas y progresivas, se han determinado mediante sistemas de viscosimetría de torsión, adaptando la técnica de la tromboelastografía al estudio del coágulo lácteo (Frentz y Dreuilhe, 1965).

##### **3.5.1.1. EQUIPOS DE MEDIDA**

###### **TROMBOELASTÓGRAFO**

###### **A. Descripción del equipo**

El tromboelastógrafo utilizado ha sido el Thrombelastograph D (Hellige). El esquema de un canal del tromboelastógrafo se muestra en la figura 3.4.

El aparato consta de dos partes:

1.- El tromboelastógrafo propiamente dicho, formado por dos cubetas de acero inoxidable, movidas por un dispositivo mecánico que les imprime oscilaciones periódicas alrededor de su eje vertical. La rotación de estas cubetas es de  $4^{\circ}45'$  en cada sentido; la duración del periodo total de oscilación de 10" comprende un tiempo de detención de 1" en cada extremo. Las dos cubetas se mantienen a una temperatura constante de  $32^{\circ}\text{C}$ .

En cada cubeta se sumerge un cilindro explorador de acero inoxidable. Este cilindro está suspendido de un hilo de torsión unido a un espejo plano que, a través de un sistema óptico,

refleja un haz luminoso sobre una escala graduada y un papel fotográfico. La verticalidad y la inercia del hilo de torsión están determinadas por un amortiguador de aletas sumergido en aceite de parafina.

2.- El dispositivo óptico permite enviar un haz de luz sobre el espejo plano de cada unidad de exploración. La luz reflejada se escinde en dos haces: uno se registra sobre la escala graduada en forma de señal luminosa de color; el otro penetra en el quimógrafo y se registra en una banda de papel fotográfico enrollado que se desplaza a una velocidad constante de 2 mm/min.

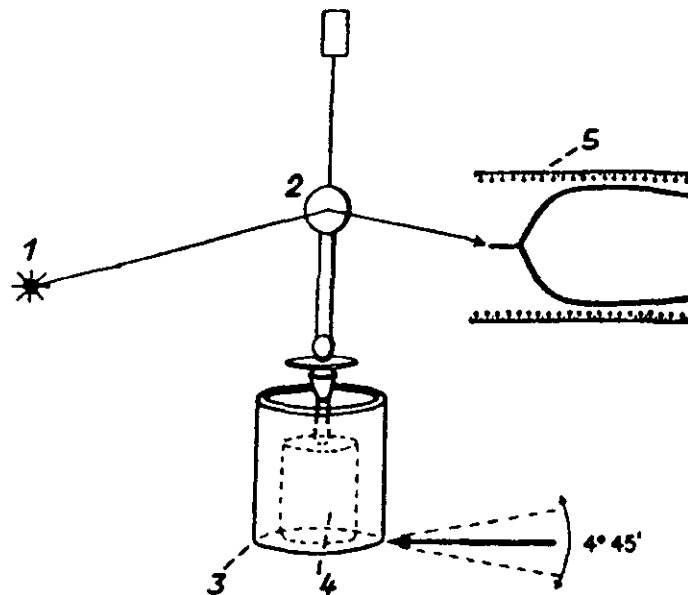


Figura 3.4. Esquema de un canal del tromboelastógrafo. 1: Foco luminoso; 2: Espejo; 3: Cubeta; 4: Cilindro explorador; 5: Papel fotográfico.

## **B. Preparación de la muestra y ejecución del ensayo**

La muestra de leche se atempera a 32°C, se adiciona un 4% (v/v) de CaCl<sub>2</sub> al 2% y posteriormente 0,4% (v/v) de cuajo animal (Chr. Hansen, Fuerza= 1:150000) preparado en disolución al 2,5%. De esta mezcla se toman con una jeringa 0,8 ml que se depositan en cada cubeta.

Cuando se inocula el cuajo a la leche se pone en marcha el equipo. Las cubetas con la muestra se introducen en los correspondientes portacubetas del instrumento y a continuación se hacen descender los cilindros exploradores para ponerlos en contacto con el medio coagulable. La inmersión debe realizarse lentamente para no modificar bruscamente la estructura tridimensional que inicia su génesis y evolución.

El análisis se completa a los 40 min después de la adición del cuajo.

## **FORMÓGRAFO**

### **A. Descripción del equipo**

El formógrafo utilizado (Formagraph tipo 20, Foss Electric) se compone de un módulo de servicio para la preparación de los ensayos y un módulo de registro en el que se registran los gráficos.

El módulo de servicio (en el que se incluye la unidad de bomba) tiene 4 funciones básicas:

- Calentamiento de la cubeta con las muestras de leche (32°C).
- Facilitar la adición del cuajo a las muestras de leche gracias a un sistema de cucharillas adosadas para que esta operación sea realizada simultáneamente en las muestras a analizar.
- Mantener constante la temperatura de la muestra durante el ensayo haciendo circular agua caliente en el módulo de registro.
- Puesta en marcha de los módulos de registro, es decir, el

encendido ON/OFF.

El módulo de registro reconoce 10 canales a la vez. Un esquema de un canal de la unidad de registro se muestra en la figura 3.5. Cada canal está formado por un péndulo explorador con contrapeso y un sistema óptico contíguo. El soporte de la cubeta portamuestras en la unidad de registro consiste en una placa de aluminio que se mueve horizontalmente, de izquierda a derecha, con una amplitud de movimiento de 1,4 mm cada 15 seg. Este sistema de oscilación de muestras es común a todos los canales, impresionando el papel fotográfico.

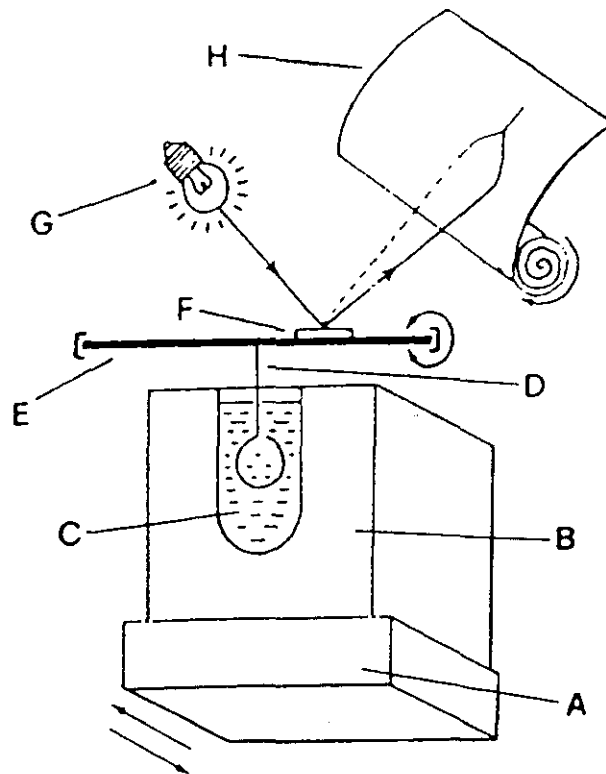


Figura 3.5. Esquema de un canal de la unidad de registro del formógrafo. A: Placa movible; B: Cubeta de aluminio; C: Muestra de leche; D: Péndulo; E: Eje conectado al péndulo; F: Espejo; G: Lámpara; H: Papel fotográfico.

### **B. Preparación de la muestra y ejecución del ensayo**

Las muestras ensayadas fueron leche en polvo entera comercial preparada en disolución al 20% con y sin adición de 4% (v/v)  $\text{CaCl}_2$  al 2% (p/v), así como leche cruda de vaca, oveja y cabra sin adición de  $\text{CaCl}_2$ .

El módulo de servicio, con las cubetas portamuestras sobre él, deberá conectarse media hora antes de comenzar los análisis, de modo que se atempere todo el sistema.

Se pipetea exactamente 10 ml de leche en cada pocillo y se dejan durante 10 min para que alcancen la temperatura deseada. A continuación se añade el cuajo animal (Chr. Hansen, Fuerza= 1:150000) disuelto en tampón acético-acetato sódico 0,4 M pH= 5,0; esta adición se realiza mediante el sistema de dosificación simultánea, depositando en cada cucharilla 0,2 ml -medidos con pipeta automática de volumen fijo- de la solución de cuajo apropiada a cada tipo de muestra (las concentraciones fueron del 0,125% al 0,75% p/v). Inmediatamente después de la adición del cuajo, se agitan las muestras moviendo el mezclador arriba y abajo lentamente 4-5 veces, evitando la formación de espuma y burbujas en la superficie. Entonces se conecta el módulo de registro accionando el interruptor correspondiente. Continuar el proceso de mezcla otras 4-5 veces y dejar el mezclador "gotear". Colocar la cubeta portamuestras sobre su soporte en la unidad de registro y bajar la palanca para poner en contacto cada muestra con su péndulo correspondiente.

Después de 40 min de la adición del cuajo finaliza el análisis, procediéndose a la limpieza de los péndulos exploradores; para ello se intercalan las dos cubetas de enjuague como indican las instrucciones del equipo.

#### **3.5.1.2. PARÁMETROS TROMBODINAMOGRÁFICOS**

Para el estudio de la evolución del coágulo se han determinado los parámetros tiempo de coagulación ("r"), velocidad de

coagulación ("v") y elasticidad máxima del coágulo ("Am") obtenidos a partir de los diagramas viscosimétricos. En la figura 3.6 se muestra una representación esquemática de los parámetros trombodinamográficos.

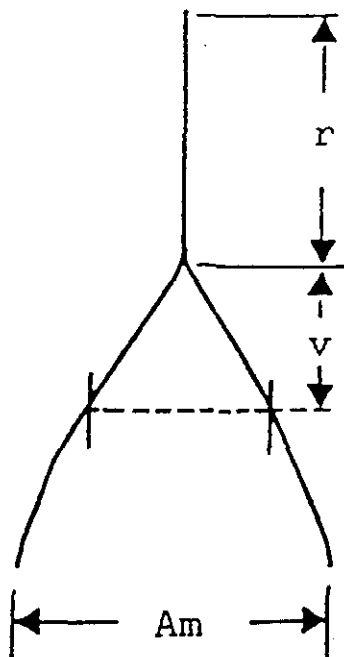


Figura 3.6. Representación esquemática de los parámetros trombodinamográficos. r: tiempo de coagulación; v: velocidad de coagulación; Am: Amplitud máxima.

#### Parámetro "r"

Es un parámetro cronométrico que mide en milímetros la longitud de la parte rectilínea del trazo hasta que la apertura de los brazos de la gráfica es de 1 mm. Como el papel rota a razón de 2 mm/min, dividiendo el nº de mm entre 2 se obtiene el valor "r" en minutos. Correspondería al tiempo de coagulación.

### **Parámetro "v" ó "K<sub>20</sub>"**

Es también un parámetro cronométrico y es definido arbitrariamente como la distancia medida entre el final de la "r" y el eje transversal de un trazo realizado en el punto en que la gráfica adquiere una amplitud de 20 mm. Sería una expresión de la velocidad con que el coágulo adquiere una consistencia determinada. Representa, pues, la velocidad de coagulación.

### **Parámetro "Am"**

Corresponde a la medida en milímetros de la amplitud máxima de los brazos de la curva. Así se obtiene la expresión numérica de la oscilación del sistema explorador y, en consecuencia, una función directa de las propiedades dinámicas máximas del coágulo. Representa la consistencia máxima que alcanza el coágulo.

## **3.5.2. DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO QUESERO**

El rendimiento quesero es la expresión matemática de la cantidad de queso obtenida a partir de una determinada cantidad de leche (generalmente 100 l ó 100 Kg). Para su determinación se han fabricado quesos a escala semipiloto y escala de laboratorio.

### **3.5.2.1. FABRICACION DE QUESOS A ESCALAS SEMIPILOTO Y LABORATORIO**

Se han fabricado a escala semipiloto y escala de laboratorio paralelamente 13 quesos: 3 de ellos puros de leche de vaca, oveja y cabra, respectivamente y, los 10 restantes tipo Ibérico, con mezclas ternarias en la proporción establecida de leche de vaca, oveja y cabra.

En las elaboraciones a escala de laboratorio se realizaron los ensayos por duplicado, coagulando la leche en un vaso de precipitados y manteniendo la temperatura del proceso mediante un baño termostatzado. Para las fabricaciones a escala semipiloto se utilizó una quesería mod. FT 20 de Armfield que consta de

cuba, de 10 l de capacidad, y consola con mandos para control del movimiento de la paleta homogeneizadora, control de temperatura y registro de pH. Un esquema del procedimiento seguido para la elaboración de los quesos se muestra en la figura 3.7, diferenciándose fundamentalmente el proceso a ambas escalas en los tratamientos ulteriores de la cuajada desuerada.

En las fabricaciones se partió de leche pasteurizada, empleando 10 l en las realizadas a escala semipiloto y 200 ml en aquéllas a escala de laboratorio.

- A la llegada al laboratorio la leche se filtra y se pasteuriza (72°C/15 seg). La pasteurización se llevó a cabo en un pasteurizador mod. FT 43 de Armfield.

- La leche se atempera a 32°C, temperatura a la que permanecerá hasta el final de la coagulación.

- A continuación se añade el cultivo iniciador en dosis de 0,05 g/l de leche; este "starter" es una mezcla de bacterias lácticas mesófilas (*S. lactis* 70%, *S. cremoris* 30%) de adición directa a cuba (EZAL. Mezcla RAO21. Capacidad 50 U, 1 U=  $5 \times 10^{11}$  ufc/g. Lacto-Labo. Grupo Rhône-Poulenc).

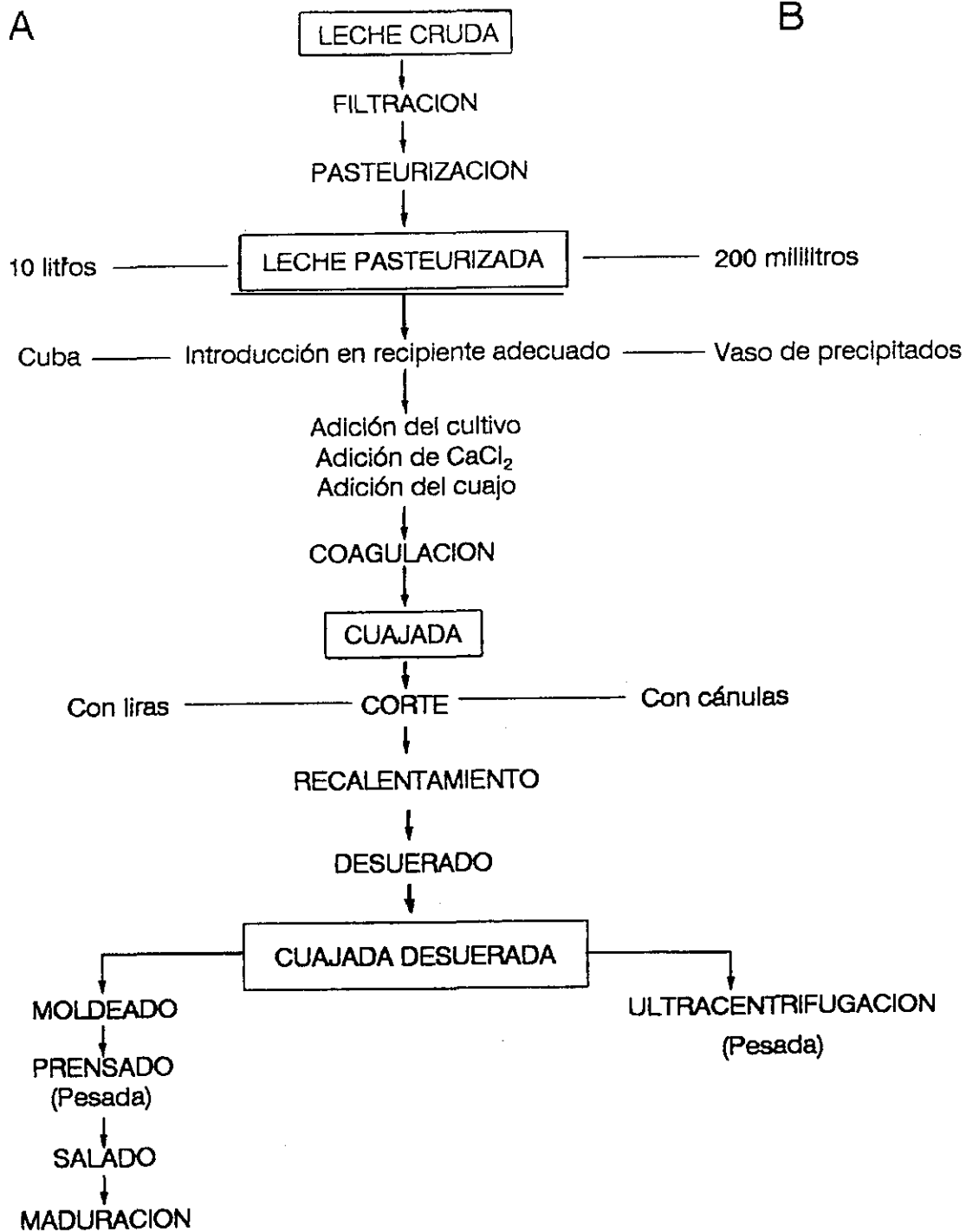
- Después de 35 min se añade cloruro cálcico en dosis de 0,025 g/l de leche y se homogeneiza durante 5 min.

- Posteriormente se le añade el cuajo animal (Chr. Hansen, Fuerza= 1:150000) en dosis de 0,05 g/l de leche, coagulando en 1 h.

- Transcurrido este tiempo se procede al corte de la cuajada (con liras de cuchillas horizontales y verticales para la cuajada contenida en la cuba, mientras que la del vaso de precipitados se corta con un sistema de dos cánulas de acero inoxidable); el grano final es de tamaño de grano de maíz.

- Los granos de cuajada se someten a un recalentamiento a 33°C durante 10 min. A continuación se procede al desuerado y entonces las fabricaciones siguen dos rutas distintas:

a) Para los quesos fabricados a escala semipiloto, se



**Figura 3.7. Esquema del procedimiento seguido para la fabricación de quesos a escala semipiloto (A) y escala de laboratorio (B).**

realiza un moldeado introduciendo los granos de cuajada en un molde provisto de paño de algodón. Posteriormente se procede a prensado en prensa manual con un peso de 5 Kg/pieza de queso; los quesos pesaron aproximadamente 1,5 Kg.

b) Para los elaborados a escala de laboratorio se realiza una ultracentrifugación (15000 g, 15 min, 5°C), eliminando el suero resultante por decantación.

#### **3.5.2.2. ELABORACIÓN DE QUESOS A PARTIR DE LECHE INDIVIDUALES**

Para la determinación del rendimiento quesero a partir de leches individuales se han fabricado quesos de pequeño tamaño siguiendo con algunas modificaciones el método de Thomasow y Voss (1976). Un esquema del proceso seguido se muestra en la figura 3.8.

El procedimiento de elaboración es básicamente el descrito en el apartado anterior para las fabricaciones a escala de laboratorio, salvo las modificaciones que a continuación se apuntan:

- La leche no se pasteuriza, con lo cual no es necesaria la adición del cultivo iniciador.

- El cloruro cálcico se añade en dosis de 0,8 g/l de leche y se homogeneiza durante 10 min.

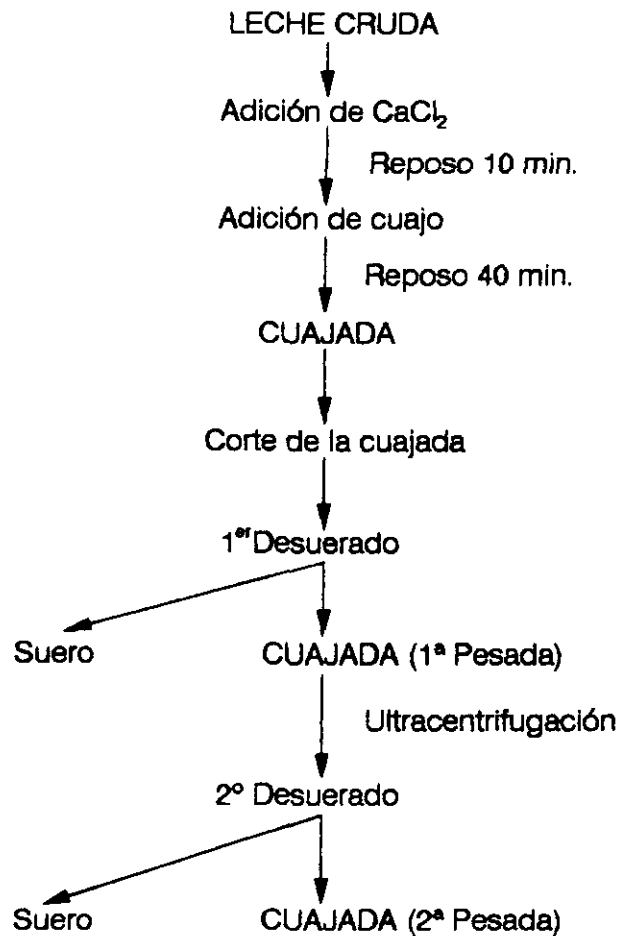
- El cuajo animal (Chr. Hansen, Fuerza 1:150000) se inocula en dosis de 0,01 g/l de leche, coagulando en 40 min.

#### **3.5.2.3. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS**

Los resultados del rendimiento quesero se expresan en porcentaje (Kg de queso obtenidos a partir de 100 l ó 100 kg de leche).

En las fabricaciones paralelas a escalas semipiloto y laboratorio se pesa el queso obtenido a la salida de la prensa, y después de la ultracentrifugación, respectivamente.

En las elaboraciones a partir de leches individuales se hace referencia al peso del producto obtenido antes y después de la ultracentrifugación de la cuajada, suponiendo una aproximación de estos datos al rendimiento que se obtendría en una planta quesera antes y después de la fase de prensado.



**Figura 3.8. Esquema del proceso seguido para la elaboración de quesos a partir de leches individuales.**

### 3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el tratamiento estadístico de los resultados se utilizaron los siguientes métodos:

- Análisis de conglomerados, para clasificar las muestras en grupos homogéneos en función de unos parámetros previamente definidos. Se aplicó una técnica de agrupamiento no jerárquica conocida como el algoritmo de las K-medias (MacQueen, 1967), mediante la cual se asigna cada muestra al grupo con vector de medias o centroide más próximo. Se ha utilizado la distancia Euclídea con las variables estandarizadas.

- Análisis de varianza, para contrastar las diferencias de los valores medios en las variables analizadas en grupos de población previamente establecidos. Cuando se compararon 2 valores medios se utilizó el "Test de la t de Student". Cuando se compararon más de dos valores medios se utilizó el procedimiento de comparación múltiple de medias o "Test de Student-Newman-Keuls".

- Análisis de regresión, para estudiar la dependencia entre las variables analizadas previamente determinadas.

Para estos análisis se utilizó el paquete estadístico BMDP (Dixon, 1988) con los siguientes programas: BMDP KM para el análisis de conglomerados; BMDP 3D y BMDP 7D para el análisis de varianza en el caso de comparación de 2 ó mas de 2 valores medios, respectivamente; BMDP 1R para el análisis de regresión. Estos programas fueron ejecutados en el ordenador VAX 9200 del Centro Técnico de Informática del CSIC.

#### ***4 . RESULTADOS Y DISCUSIÓN***

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. POLIMORFISMO DE LAS PROTEÍNAS DE LECHE DE OVEJA

En este apartado se recogen los resultados obtenidos de la aplicación de técnicas electroforéticas, inmunoquímicas y cromatográficas al estudio de la heterogeneidad de las caseínas y seroproteínas de leche de oveja de las razas Manchega y Segureña.

#### 4.1.1. FRACCIÓN CASEÍNICA DE LA LECHE DE OVEJA

##### 4.1.1.1. ELECTROFORESIS. INMUNOTRANSFERENCIA

Para el estudio de la fracción caseínica de leche de oveja se han aplicado los siguientes tipos de electroforesis:

- Electroforesis a pH alcalino

En gel de poliacrilamida: Continua (PAGE)

Discontinua (disc-PAGE)

En gel de poliacrilamida-agarosa (PAAGE)

- Electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida a pH ácido (disc-PAGE a pH ácido)

#### *Electroforesis a pH alcalino. Inmunotransferencia*

En la figura 4.1 se muestran los electroforegramas de 10 muestras de caseína de leche de oveja analizadas mediante PAGE continua (fig. 4.1.a) y discontinua (fig. 4.1.b). El esquema general de migración electroforética en gel de poliacrilamida muestra dos zonas bien diferenciadas: una de menor movilidad, representada por las  $\beta$ -CN ( $\beta_2$ -CN y  $\beta_1$ -CN) y otra de mayor movilidad representada por el complejo  $\alpha_s$ -CN. Esta migración electroforética es similar a la que ocurre al analizar la leche de otros rumiantes ya que la  $\beta$ -CN presenta una carga neta inferior a la de la  $\alpha_s$ -CN.

La distinta migración de las  $\beta$ -CN se debe a que la  $\beta_1$ -CN contiene un grupo fosfato adicional -con respecto a la  $\beta_2$ -CN-, lo

que origina la mayor movilidad anódica.

Mediante PAGE la banda más importante de la  $\kappa$ -CN migra muy unida a la  $\beta$ 1-CN. Sin embargo, si se utiliza como soporte el gel de poliacrilamida-agarosa (PAAGE) la  $\kappa$ -CN ovina se resuelve como una banda intermedia entre las  $\beta$ -CN y las  $\alpha_s$ -CN (figura 4.2).

Chianese y col. (1990a) mediante comparación de los perfiles electroforéticos obtenidos a partir de muestras de caseínas con y sin adición de quimosina demuestran la migración similar de la  $\kappa$  y la  $\beta$ 1-CN en gel de poliacrilamida. Dall'Olio y col. (1990) han comprobado que efectivamente la  $\kappa$ - y la  $\beta$ -CN presentan la misma movilidad electroforética en gel de almidón a pH 8,6, si bien en este tipo de geles la banda más importante de la  $\kappa$ -CN queda muy unida a la  $\beta$ 2-CN.

Solamente mediante PAGE en sistemas continuos, en 6 de las muestras analizadas se observó una banda separada de la  $\beta$ 1-CN que tentativamente podría identificarse con la  $\beta$ 0-CN que otros autores (King, 1966; Richardson y Creamer, 1976; Rossi y Clementi, 1984) observan en el electroforegrama de caseínas de leche de oveja de diferentes razas. Sin embargo, cuando se prepararon nuevamente las muestras o en muestras de leche del mismo animal analizadas en fases sucesivas de la lactación no se observó la citada banda, por lo que cabría esperar que fuese la  $\kappa$ -CN que sólo en algunas muestras o bajo determinadas condiciones de preparación de las mismas tiende a definirse y separarse de la  $\beta$ 1. Un caso similar es el que describe King (1969) en análisis realizados en seroproteínas de leche de oveja; este autor atribuye las variaciones de la  $\alpha$ -La y SA al modo de preparación de la muestra. Por ello, es preciso cerciorarse de que los nuevos perfiles electroforéticos se repiten en sucesivos análisis de la misma muestra e incluso en posteriores tomas de muestra del mismo animal en la misma y en otras lactaciones.

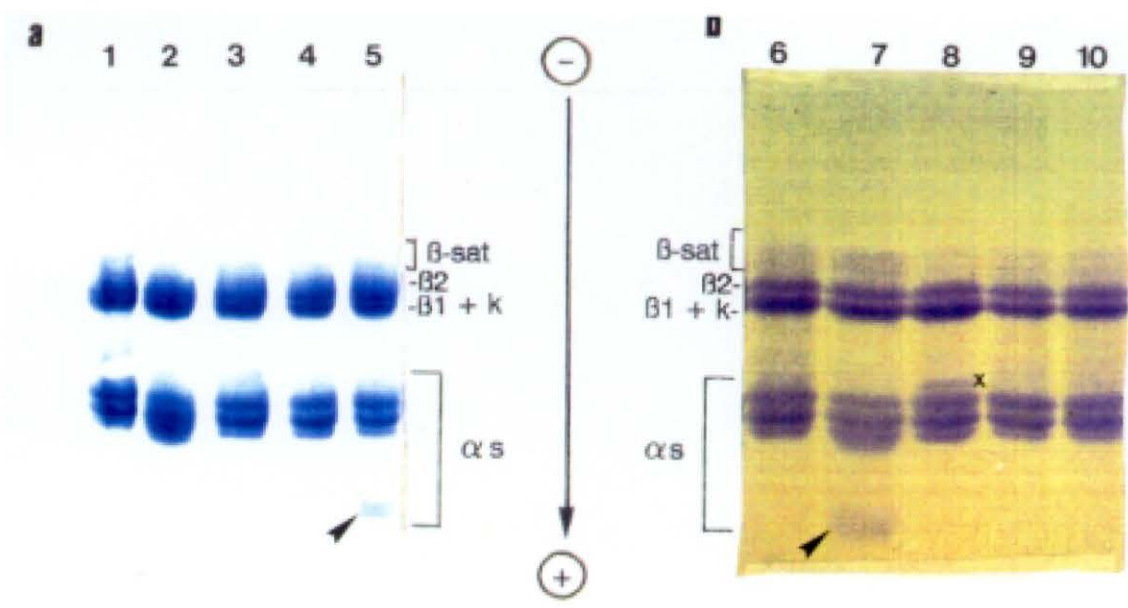


Figura 4.1. PAGE a pH alcalino de 10 muestras de caseínas de leche de oveja. (a) Sistema continuo. (b) Sistema discontinuo. 1 y 9: tipo T1. 2: tipo Q2. 3, 4, 6 y 10: tipo T2. 5: tipo C. 7: tipo S. 8: tipo Q1.

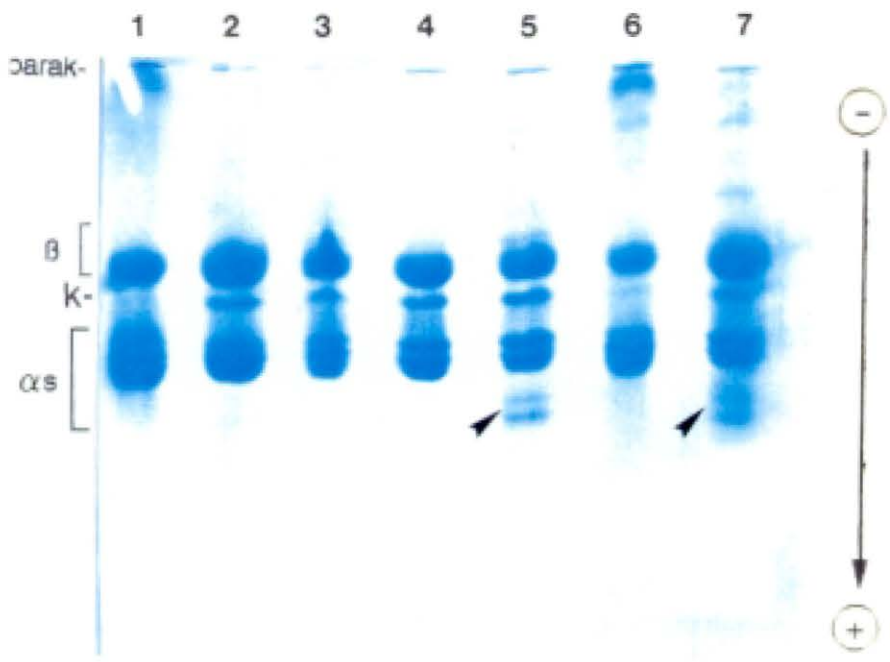


Figura 4.2. PAAGE a pH alcalino de 7 muestras de caseínas de leche de oveja. 1 y 6: caseínas tratadas con quimosina. 2 y 4: tipo T. 3: tipo Q2. 5 y 7: tipo C.

En la figura 4.3 se representa el esquema de los 7 perfiles electroforéticos diferentes observados del análisis de la totalidad de las muestras, agrupando los electroforegramas en aquellos que contienen el complejo  $\alpha_s$ -CN con 3 bandas (T1, T2 y T3), 4 bandas (Q1 y Q2), 5 bandas (C) y 6 bandas (S) numerando las bandas principales que diferencian los electroforegramas. Estos 7 patrones electroforéticos fueron los fenotipos caseínicos de referencia en los restantes análisis.

El número de bandas del complejo  $\alpha_s$  de cada tipo caseínico ha servido de pauta para la denominación de los mismos: Tres bandas= tipos T, Cuatro bandas= tipos Q, Cinco bandas= tipo C y Seis bandas= tipo S. Se ha estimado más correcto, por ahora, establecer esta nomenclatura, un tanto arbitraria, y que no induce a confusión por similitud con aquella que ya está aceptada para las caseínas de leche de vaca dado que en esta especie ya se conocen las secuencias de aminoácidos de las distintas caseínas y sus variantes genéticas (Eigel y col., 1984). Este mismo criterio parece ser el adoptado por otros autores para la descripción de los distintos fenotipos caseínicos de leche de oveja (Di Stasio, 1983; Chianese y col. 1990a, 1992b). En cambio, bajo nuestro punto de vista, la terminología sugerida por El-Negoumi y Burfening (1972) y Arave y col. (1973), con letras mayúsculas y superíndices (de modo similar a una terminología genética referida a parejas de alelos), sería menos correcta ya que las variaciones electroforéticas de las caseínas ovinas aún no se han explicado claramente desde el punto de vista genético.

El complejo  $\alpha_s$ -CN en la mayoría de las muestras se resuelve en 3 bandas, que Richardson y Creamer (1976) denominan  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ - y  $\alpha_{s3}$ - CN en orden de movilidad electroforética creciente. Posteriormente Dall'Olio y col. (1989) mediante electroforesis en gel de almidón a pH ácido demuestran la existencia de  $\alpha_{s1}$ -CN y  $\alpha_{s2}$ -CN en este grupo de bandas. Chianese y col. (1990a, 1992b) lo corroboran mediante electroforesis bidimensional e inmunotransfe-

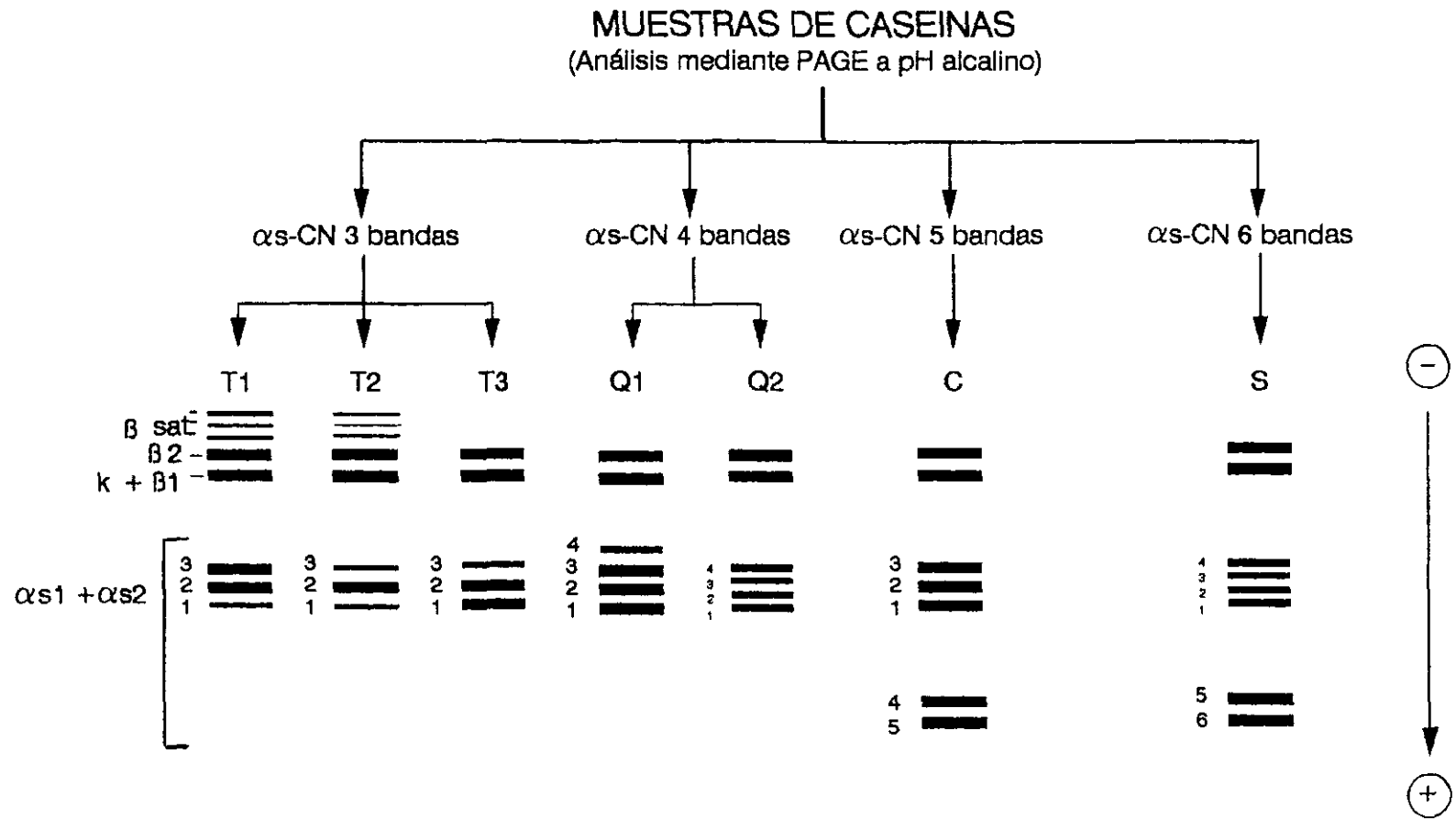


Figura 4.3. Esquema de los diagramas electroforéticos observados del análisis de caseínas de leche de oveja mediante disc-PAGE a pH alcalino. Se representan las principales bandas que diferencian cada fenotipo.

rencia. Las diferencias de intensidad de las bandas que integran el complejo  $\alpha_g$  ya fueron apuntadas por Richardson y Creamer (1976), asociándolas a diferencias de intensidad en las  $\beta$ -CN y sugiriendo la causa genética. Sin embargo en nuestro estudio las diferencias de intensidad en el complejo  $\alpha_g$ -CN resultaron estar más relacionadas con la presentación de las  $\beta$ -CN satélite como ya sugirieron Chianese y col. (1990a, 1992b). Los resultados obtenidos en cuanto a la asociación de las  $\alpha_g$ -CN con las  $\beta$ -CN satélite confirmarían la hipótesis postulada por Grosclaude (1979) según la cual los loci que codifican las principales caseínas están situados muy próximos en el mismo cromosoma y que la segregación no es independiente. En la fig. 4.3 las caseínas cuyo complejo  $\alpha_g$ -CN se presenta con 3 bandas se han representado en los esquemas T1, T2 y T3 que se distinguen fundamentalmente por la intensidad de las bandas del citado complejo y la presencia (T1, T2) o no (T3) de las satélite de las  $\beta$ -CN. Es posible que el tipo T1 en que la banda más móvil del complejo  $\alpha_g$ -CN aparece muy débilmente sea análogo al que Chiofalo y Micari (1987) describen como  $\alpha_g$ - 2 bandas en ovejas de razas autóctonas sicilianas, constituyendo en una de estas poblaciones más del 50% de las muestras estudiadas; este razonamiento sería lógico si se tiene en cuenta que la resolución que se consigue mediante electroforesis en gel de almidón (como la que aplican estos autores) es bastante inferior a la obtenida en gel de poliacrilamida (Ramos, 1987).

En 2 de las muestras analizadas se observó además una banda (marcada con una cruz en la calle 8, fig. 4.1.b) de menor movilidad que las de los tipos de  $\alpha_g$ -CN definidos anteriormente. Este fenotipo, que hemos denominado Q1 (figura 4.3), lo describen por primera vez Chiofalo y Micari (1987) y, posteriormente Chianese y col. (1992b). Dall'Olio y col. (1990) comprueban que las bandas intermedias entre la  $\beta$ - y las  $\alpha_g$ -CN observadas en muestras que no contienen la variante Welsh constituyen parte de

la fracción  $\alpha_{s2}$ -CN.

En algunas muestras, el complejo  $\alpha_s$ -CN queda resuelto como 4 bandas difusas (calles 2 y 7, fig. 4.1; calle 3, fig. 4.2). Este tipo de perfil Q2 (fig. 4.3); por la zona de migración de las bandas se prevee que sea una forma heterogénea de la  $\alpha_{s1}$ -CN ovina. Este perfil podría ser semejante al que Di Stasio (1983) describe en leche de oveja de raza Massa; este autor realiza los análisis electroforéticos en gel de almidón en el cual, como se ha señalado anteriormente, la resolución es inferior; sin duda, la utilización de diferentes soportes electroforéticos implica dificultades de interpretación en la comparación de electroforegramas.

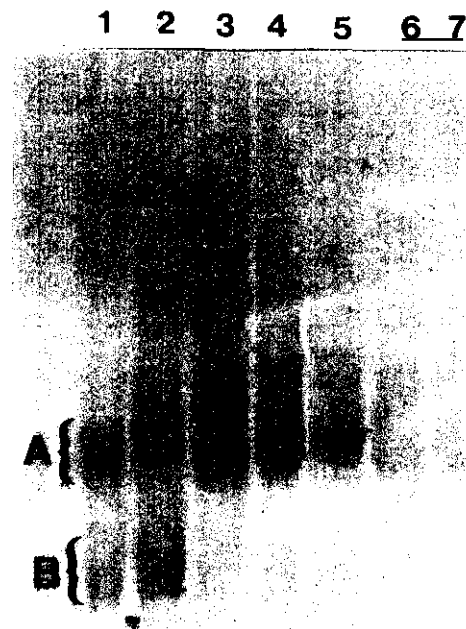
En determinadas muestras se observaron 2 bandas de movilidad anódica superior al complejo de las  $\alpha_s$ -CN (flechas en las fig. 4.1 y 4.2); cuando se repiten los análisis de las muestras o se preparan de nuevo se continúa observando dicho diagrama y, además se vuelve a obtener a partir de la leche del mismo individuo en fases sucesivas de la lactación y en diferentes lactaciones. Dada su extraordinaria rapidez electroforética se ha llamado caseína super-rápida (CN-SR) y, por su posición en la placa se intuyó que se trataría de una variante de  $\alpha_s$ -CN.

A partir de separaciones electroforéticas y posterior inmunotransferencia se comprobó que, efectivamente, existen 2 grupos de bandas distribuidos en sendas zonas del gel que reaccionan positivamente con el inmunosuero anti $\alpha_{s2}$ -CN (figura 4.4); se observa una zona más lenta (zona A) y otra más rápida (zona B). La zona A muestra una microheterogeneidad en individuos distintos en base a la movilidad electroforética de las bandas que la componen; esta microheterogeneidad de la  $\alpha_{s2}$ -CN puede ser debida a los distintos grados de fosforilación de esta caseína ovina por analogía con su homóloga bovina. Las zonas A y B se presentarían simultáneamente solo en muestras que contienen la caseína  $\alpha_s$ -SR (calles 1 y 2, fig. 4.4). Estos resultados sugieren

la posibilidad de existencia de una nueva variante de  $\alpha_{s2}$ -CN en leche de oveja que se estudiará con más profundidad en apartados posteriores y que, en principio, hemos denominado  $\alpha_{s2}$ -SR. El diagrama con las bandas más rápidas se ha observado asociado al complejo de caseínas  $\alpha_{s1}$  con 3 y 4 bandas dando lugar a los perfiles tipos C y S, respectivamente en la fig. 4.3.

El perfil electroforético conteniendo las bandas de marcada migración anódica que se presenta en determinadas muestras no había sido descrito anteriormente en otras razas ovinas. Moio y col. (1989a) y Chianese y col. (1990c) describen un electroforegrama similar mediante disc-PAGE a pH alcalino en caseínas de leche de cabra de la región italiana de la Campaña.

En la figura 4.5. se muestran los densitogramas correspondientes a cada uno de los fenotipos descritos.



**Figura 4.4. Inmunotransferencia de 7 muestras de caseínas de leche de oveja separadas mediante disc-PAGE a pH alcalino (ver fig. 4.1.b) e incubadas con inmunosuero anti $\alpha_{s2}$ -CN. 1: tipo S. 2: tipo C. 3: tipo Q2. 4: tipo Q1. 5: tipo T2. 6: tipo T3. 7: tipo T1.**

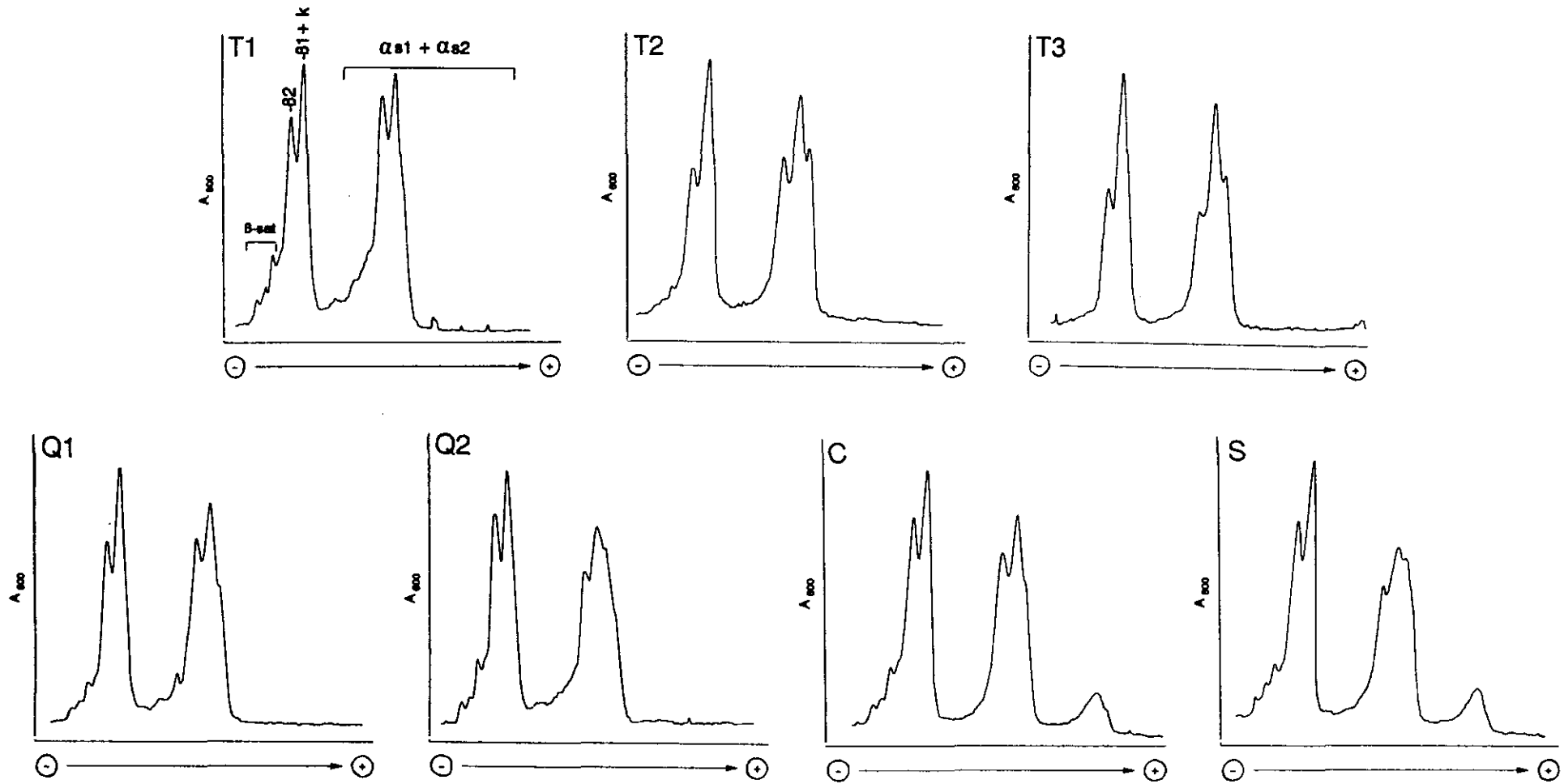


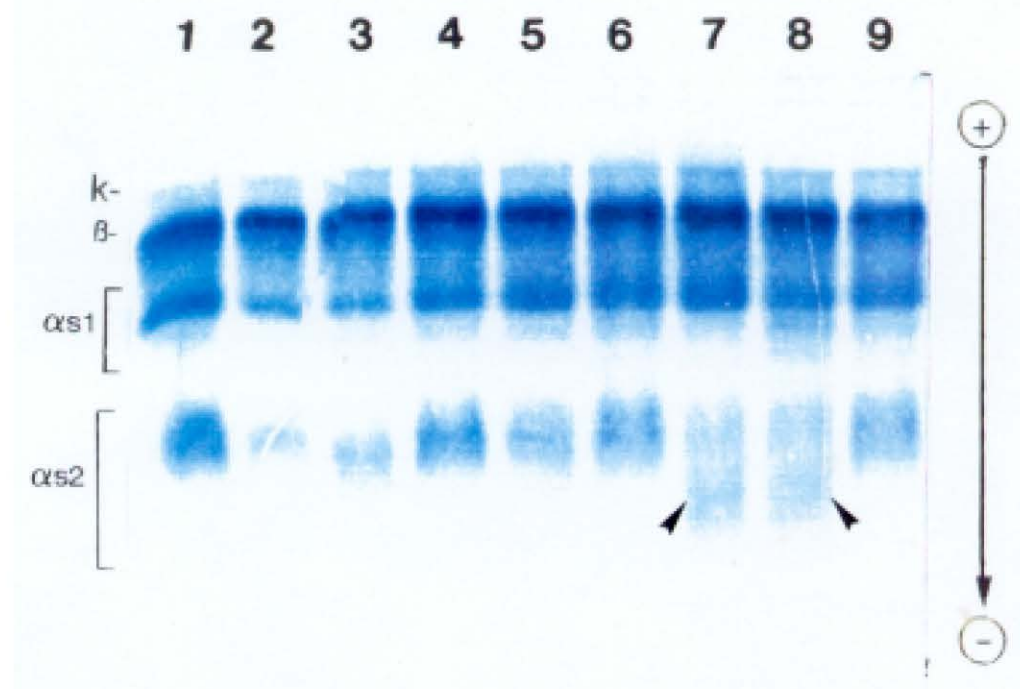
Figura 4.5. Densitogramas de los 7 perfiles electroforéticos de caseínas de leche de oveja cuyo esquema se muestra en la fig. 4.3.

### **Electroforesis a pH ácido.**

En la figura 4.6 se muestra un electroforegrama de 9 muestras de caseína de leche de oveja analizadas mediante disc-PAGE a pH ácido.

El diagrama electroforético difiere del que se obtiene bajo condiciones alcalinas. Como se observa en la fig. 4.6 la banda más lenta es la  $\kappa$ -CN (esto se ha comprobado mediante comparación con los electroforegramas obtenidos de la aplicación de muestras de caseína tratada con quimosina, resultados no mostrados); a continuación migran las  $\beta$ -CN, aunque posiblemente en esta zona se sitúan igualmente otras bandas relacionadas con la  $\kappa$ -CN; posteriormente se observan las  $\alpha_{s1}$ -CN y, por último, la  $\alpha_{s2}$ -CN que es la fracción más rápida.

En la zona de las  $\alpha_{s1}$ -CN, cabe destacar la banda que se observa en las muestras con caseínas tipo Q2 (5, 6 y 9) ó S (8).



**Figura 4.6. Disc-PAGE a pH ácido de 9 muestras de caseínas de leche de oveja.**

1: tipo T1. 2: tipo T3. 3: tipo T2. 4: tipo Q1. 5, 6 y 9: tipo Q2. 7: tipo C. 8: tipo S.

En la zona de las  $\alpha_{s2}$ -CN se observan diferencias en la intensidad y movilidad electroforética en los tipos T1, T2 y T3. Las caseínas tipo T1 (calle 1) presentan una mayor intensidad electroforética relativa que las tipo T2 (calle 3), y éstas superior a las de tipo T3 (calle 2); estas intensidades diferentes se atribuirían a un mayor o menor contenido de esta fracción en los citados tipos de caseínas. En cuanto a la movilidad electroforética, se aprecia tipo T1 < tipo T3 < tipo T2. Las muestras tipo Q1 (calle 4) presentan una intensidad muy manifiesta en esta zona, igual o incluso superior a la de las caseínas T1. Por otra parte, las muestras 7 y 8 (caseínas tipo C y S, respectivamente) presentan dos franjas en la zona de las  $\alpha_{s2}$ -CN diferenciándose claramente del resto de las muestras aquella de mayor movilidad (flechas en la figura); esto sugiere nuevamente la posibilidad de que en estas muestras exista una variante de  $\alpha_{s2}$ -CN.

Dall'Olio y col. (1989) aplicaron la electroforesis a pH ácido para separar la  $\alpha_{s1}$ - y la  $\alpha_{s2}$ -CN de leche de oveja de raza Sopravissana; la distribución de las distintas fracciones es similar a la descrita anteriormente, salvo para la  $\kappa$ -CN que, según estos autores, queda unida a la banda más lenta de la  $\alpha_{s1}$ -CN; esto puede ser atribuido a que el pH de la carrera en este ensayo es bastante inferior (1,7) al que hemos utilizado en nuestras experiencias (4,0) lo que probablemente origina cambios en la movilidad electroforética de alguna fracción caseínica.

### *Consideraciones generales sobre la técnica de electroforesis aplicada al análisis de caseínas de leche de oveja*

De los resultados obtenidos se puede concluir que las técnicas electroforéticas utilizadas son complementarias. Así mediante PAGE a pH alcalino, tanto en la versión continua como discontinua se resuelven las  $\beta$ -CN (las dos principales,  $\beta_1$  y  $\beta_2$  y las  $\beta$ -satélite) y el complejo  $\alpha_s$ -CN. De las técnicas electroforéticas empleadas, la PAGE continua a pH alcalino es la más rápida, y unida al sistema rápido de obtención de las caseínas aporta unos resultados cualitativos fiables en tiempos de análisis relativamente cortos, con lo que la combinación de estas dos técnicas es recomendable para análisis de muestreo de un gran número de caseínas. Los resultados obtenidos son similares y en determinadas fracciones (las de mayor movilidad) más resolutivos a los que se consiguen mediante la técnica discontinua en que, debido a los largos tiempos de carrera, las fracciones más rápidas tienden a la difusión en el gel. Sin embargo, la discontinuidad del gel permite una mejor separación de las fracciones y, además, el menor voltaje aplicado tiende a minimizar el efecto borde en las placas.

La electroforesis en gel de poliacrilamida-agarosa a pH alcalino ha permitido la separación de la  $\kappa$ -CN, fracción que queda solapada en parte por la  $\beta$ -CN mediante PAGE en medio alcalino. Otras ventajas de los geles de poliacrilamida-agarosa comparados con los de poliacrilamida son: más fácil manejo, disminución del riesgo de toxicidad (es menor la proporción de acrilamida) y posibilidad de analizar más muestras por placa. Sin embargo, la preparación de los geles es tediosa pues la agarosa fundida tiende a solidificarse rápidamente cuando la temperatura de la mezcla polimerizante es inferior a 50°C. Además la aplicación de la muestra es difícil por lo que se requiere experiencia para conseguir resultados cuantitativos fiables.

La electroforesis a pH ácido permite separar la  $\alpha_{s1}$ - y la

$\alpha_{s2}$ -CN, que en sistemas alcalinos migran en idéntica posición. Esta técnica presenta el inconveniente de que los tiempos de preparación del gel y de carrera son largos. En el primer caso porque la polimerización de los geles de poliacrilamida en ambiente ácido ocurre muy lentamente con los reactivos catalíticos empleados; sin embargo, una modificación del sistema de catálisis podría inducir a cambios en las propiedades del gel. En el segundo caso, aparte del tiempo de preelectroforesis (para evitar los artefactos que podría causar el exceso de iones persulfato), las caseínas migran más lentamente ya que la constante de disociación a pH ácido está más próxima a su punto isoeléctrico y son menos las moléculas cargadas.

#### 4.1.1.2. ISOELECTROENFOQUE

Para el estudio del polimorfismo de las caseínas de leche de oveja se han aplicado las siguientes variantes de la técnica de isoelectroenfoque:

- Isoelectroenfoque en geles finos (IEF ó PAGIF)
- Isoelectroenfoque en geles ultrafinos (UTLIEF)
- Isoelectroenfoque en equipo automatizado

En la figura 4.7 se muestra un esquema de la migración isoelectroforética general de las distintas fracciones caseínicas de leche de oveja, y se representa asimismo la diferencia de intensidad con que suelen presentarse en los isoelectroforegramas. Desde el ánodo, en primer lugar, se observan 3 bandas correspondientes a la  $\alpha_{s1}$ -CN, a continuación 2 bandas de la  $\beta$ -CN ( $\beta_1$  y  $\beta_2$ ), le siguen las 3 bandas satélite de la  $\beta$ -CN ( $\beta$ -sat), la  $\kappa$ -CN que en la práctica se solapa con la banda de migración más catódica de la  $\beta$ -sat y, finalmente las bandas que definen la  $\alpha_{s2}$ -CN. Esta migración es similar a la que Chianese y col. (1990a, 1992b) describen para las caseínas ovinas en geles finos de IEF.

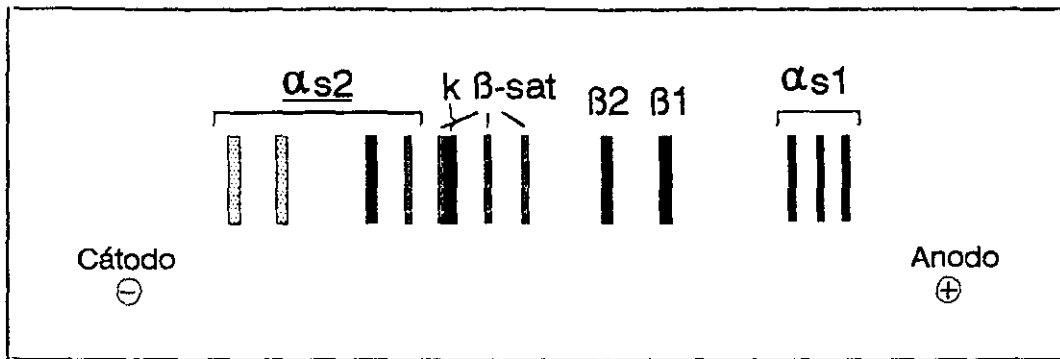


Figura 4.7. Esquema de la migración isoelectroforética general de las distintas fracciones caseínicas de leche de oveja.

Como posteriormente se explicará, las diferencias en la resolución y separación de las bandas dependen del tipo de gel empleado (dimensiones, espesor, gradiente de pH, mezcla de anfólitos empleados para establecer el gradiente de pH, concentración de los distintos anfólitos). Mediante enfoque isoelectroforético se observaron nuevamente diferencias entre los tipos de caseínas ya definidos por electroforesis.

A continuación se exponen los resultados más relevantes obtenidos con cada uno de los tipos de geles ensayados, confrontando con los datos que aportan otros autores.

#### *Isoelectroenfoque en geles finos*

Los distintos gradientes de pH probados en los geles de isoelectroenfoque han puesto en evidencia, en mayor o menor medida, una u otra fracción caseínica o varias de ellas simultáneamente.

En placas con gradiente de pH 2,5-8 (anfólitos de pH 2,5-4, 4-6 y 6-8 en proporción 1:1:0,92), como se muestra en la figura

4.8, la resolución y separación de las  $\alpha_{s1}$ -CN es notable, observándose diferencias tanto en la intensidad como en el número de bandas que componen esta fracción. En la muestra de la calle 4, que pertenece al tipo predefinido Q2, se aprecia 1 banda adicional (marcada con un círculo en la figura 4.8), respecto al esquema general de 3 bandas, en la zona de migración de las  $\alpha_{s1}$ -CN; esto indicaría que estos tipos de caseínas constituyen una variante de la  $\alpha_{s1}$ -CN, lo que confirma los resultados obtenidos mediante PAGE a pH alcalino para los tipos caseínicos Q2. En las restantes fracciones caseínicas (salvo algunas bandas de  $\alpha_{s2}$ -CN), aunque la separación es aceptable, se resuelven como una banda ancha y difusa en el gel.

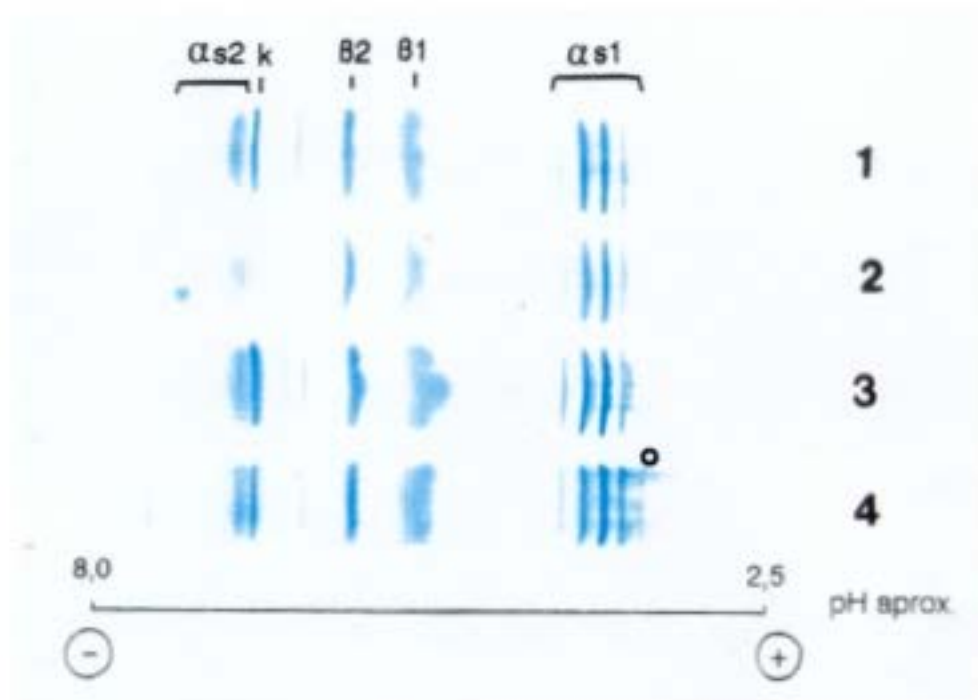


Figura 4.8. IEF de 4 muestras de caseínas de leche de oveja. Gradiente de pH en el gel= 2,5-8. 1 y 2: tipo T1. 3: tipo T2. 4: tipo Q2.

En la figura 4.9 se muestran los isoelectroforegramas obtenidos en una placa de IEF con gradiente de pH 2,5-7 (anfólitos de pH 2,5-4, 3,5-5 y 5-7 en proporción 0,47:0,88:1). Si se compara con el caso anterior (fig. 4.8) se puede apreciar una menor separación de las bandas que definen la  $\alpha_{s1}$  y las  $\beta$ -CN principales. Sin embargo, es posible observar la banda adicional de la  $\alpha_{s1}$ -CN en los tipos caseínicos Q2 (calles 1 y 2, bandas marcadas con un círculo). En este tipo de geles es destacable la

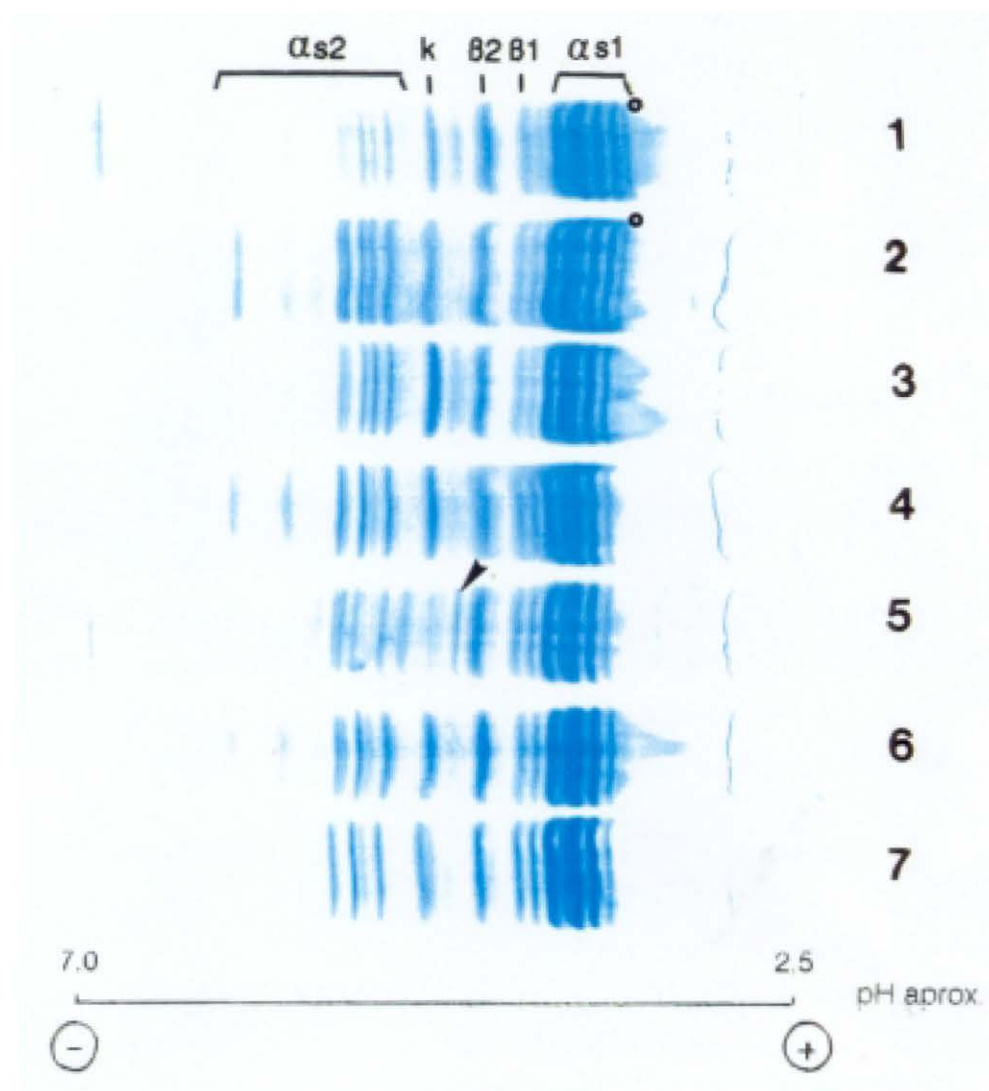


Figura 4.9. IEF de 7 muestras de caseínas de leche de oveja. Gradiente de pH en el gel= 2,5-7.

1 y 2: tipo Q2. 3: tipo T2. 4, 6 y 7: tipo T1. 5: tipo C.

óptima separación de las bandas que componen la  $\alpha_{s2}$ -CN. Se observa una banda adicional en la muestra de la calle 5 (flecha en la figura), que previamente había sido clasificada como tipo C con la variante de  $\alpha_{s2}$ -SR. Además se aprecian diferencias individuales en la intensidad de las bandas de migración más catódica que definen la  $\alpha_{s2}$ -CN (comparar muestras 3 y 4 en la figura). En este mismo gradiente de pH pero obtenido con los anfólitos de pH 2,5-4, 4-6 y 5-7 en proporción 1:2:2, Mauriello y col. (1990) han conseguido interesantes separaciones de la fracción  $\alpha_{s1}$ -CN ovina. Esto indicaría, como también se demostrará posteriormente, que para un mismo gradiente de pH en el gel los isoelectroforegramas resultantes son diferentes dependiendo de la mezcla de anfólitos empleada.

Por otra parte, con un determinado sistema de anfólitos -que demuestre ofrecer óptimas separaciones-, la variación en sus concentraciones se traduce en una modificación de la resolución. Este hecho se ha ensayado en el gradiente de pH 2,5-10 (mezcla de anfólitos 2,5-4, 5-7 y 3,5-10) como se muestra en la figura 4.10.a y b. Así una mayor proporción (del 25 al 29%) del anfólito de gradiente de pH 3,5-10 que refuerza el gradiente en toda la placa, parece ofrecer, en general, mejor resolución de todas las bandas salvo las de la zona de las  $\alpha_{s2}$ -CN. Las diferencias de intensidad que se observan en las  $\beta$ -CN satélite dan lugar a una variación individual similar a la observada en estas bandas mediante PAGE a pH alcalino y que permitió clasificar la población que presentaba 3 bandas en el complejo  $\alpha_s$ -CN en los tipos T1 (calles 3 y 4, fig. 4.10) donde las  $\beta$ -satélite se presentan bastante intensas, T2 (calles 1, 2 y 5, fig. 4.10) donde se observa menor intensidad y T3 (calles 7 y 8, fig. 4.10) en que prácticamente no se aprecian. El tipo Q2 definido electroforéticamente se presenta con 4 bandas para la  $\alpha_{s1}$ -CN también en este tipo de geles (banda variante marcada con un círculo en la calle 6, fig. 4.10).

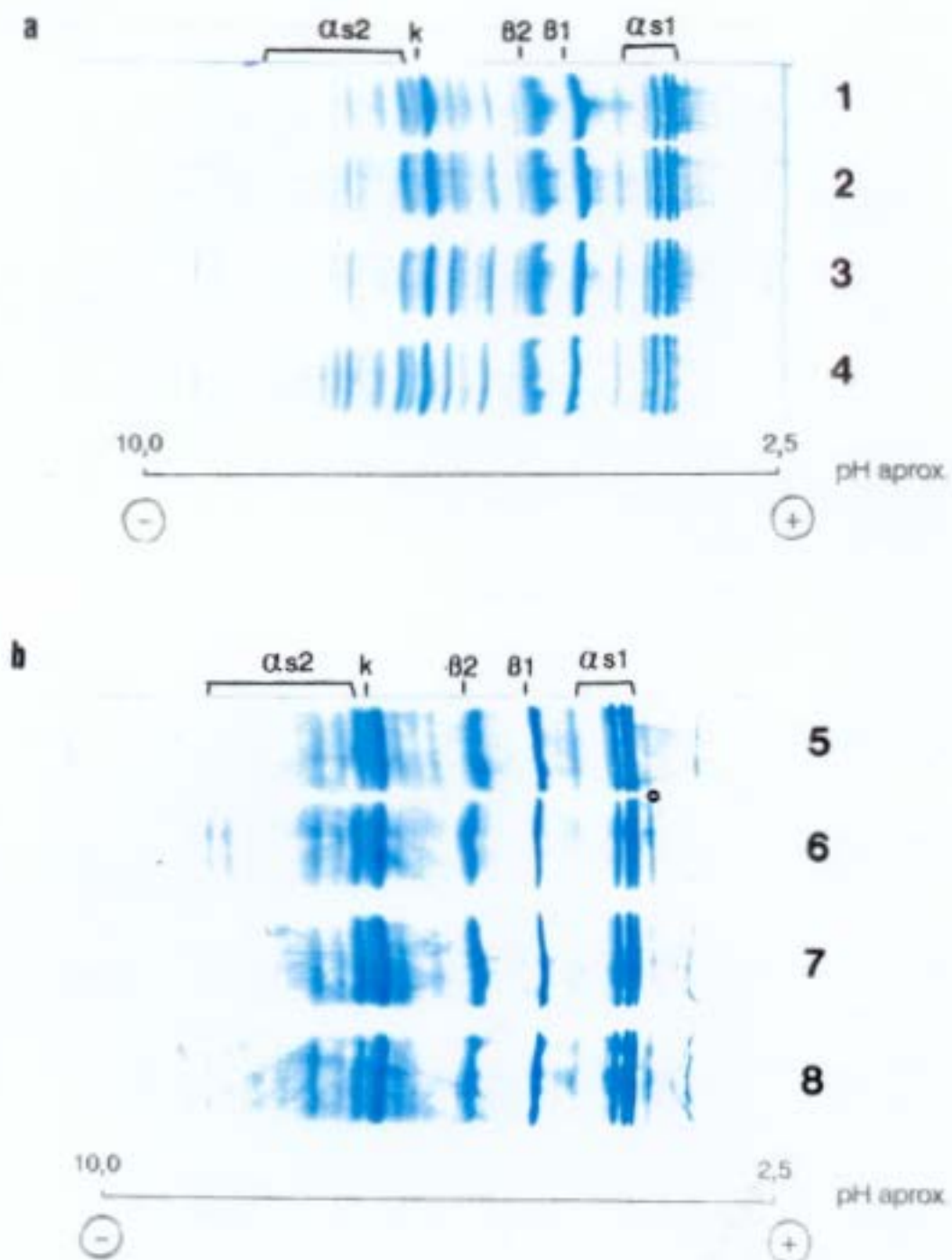


Figura 4.10. IEF de 8 muestras de caseínas de leche de oveja. Gradiente de pH en el gel = 2,5-10 conseguido con la mezcla de anfólitos de pH 2,5-4, 5-7 y 3,5-10 en proporción: (a) 0,55:0,66:1 y (b) 0,5:0,5:1. 1, 2 y 5: tipo T2. 3 y 4: tipo T1. 6: tipo Q2. 7 y 8: tipo T3.

En la figura 4.11 se representan las curvas densitométricas de caseínas tipo T1, T2, T3 y Q2 obtenidas a partir de un gel de IEF como el que se muestra en la fig. 4.10.b. En general, en el gradiente de pH 3,5-10, obtenido con la mezcla de anfólitos 2,5-4, 5-7 y 3,5-10 (siempre que los anfólitos parciales estén aproximadamente en la misma proporción y el total en igual o superior a aquellos), se consiguen resoluciones bastante aceptables para todas las fracciones caseínicas ovinas. Así, Chianese y col. (1992b) mediante IEF en este gradiente de pH con los anfólitos citados en proporción 1:1:1 han obtenido buenas separaciones de las caseínas ovinas pre- y post-tratamiento con quimosina.

Como se apuntó anteriormente, para un mismo gradiente de pH en el gel los isoelectroforegramas presentan diferencias apreciables dependiendo de la mezcla de anfólitos empleada, aunque la variación sea solo en uno de ellos. Esto se ha comprobado en el caso del gradiente 2,5-8, sustituyendo el anfólito de pH 6-8 (fig. 4.8) por el de pH 5-8 (fig. 4.12). Las placas de IEF con gradiente de pH de 2,5-8 (anfólitos de pH 2,5-4, 4-6, 5-8 en proporción 1:1:0,92) aportaron interesantes resultados al analizar las muestras clasificadas como Q1, C y S que contienen variantes de  $\alpha_{s2}$ -CN. En el caso de las muestras tipo Q1 se aprecia una banda difusa (marcada con una cruz en las calles 6 y 9, fig. 4.12.b) de migración más catódica que las fracciones usuales de la  $\alpha_{s2}$ -CN, mientras que las bandas clásicas de definición de la  $\alpha_{s2}$ -CN quedan casi imperceptibles. En la calle 8 se presenta el isoelectroforegrama de una muestra tipo S, el más complejo de los estudiados y en el que se aprecian una serie de bandas variantes: una banda variante que focaliza muy cercana a la  $\kappa$ -CN (calle 8, flecha de mayor tamaño en la fig. 4.12.b), distinguiéndose también otra banda muy próxima a la  $\beta$ -satélite central (calle 8, flecha de menor tamaño en la fig. 4.12.b), pudiendo estar ambas bandas implicadas en la definición

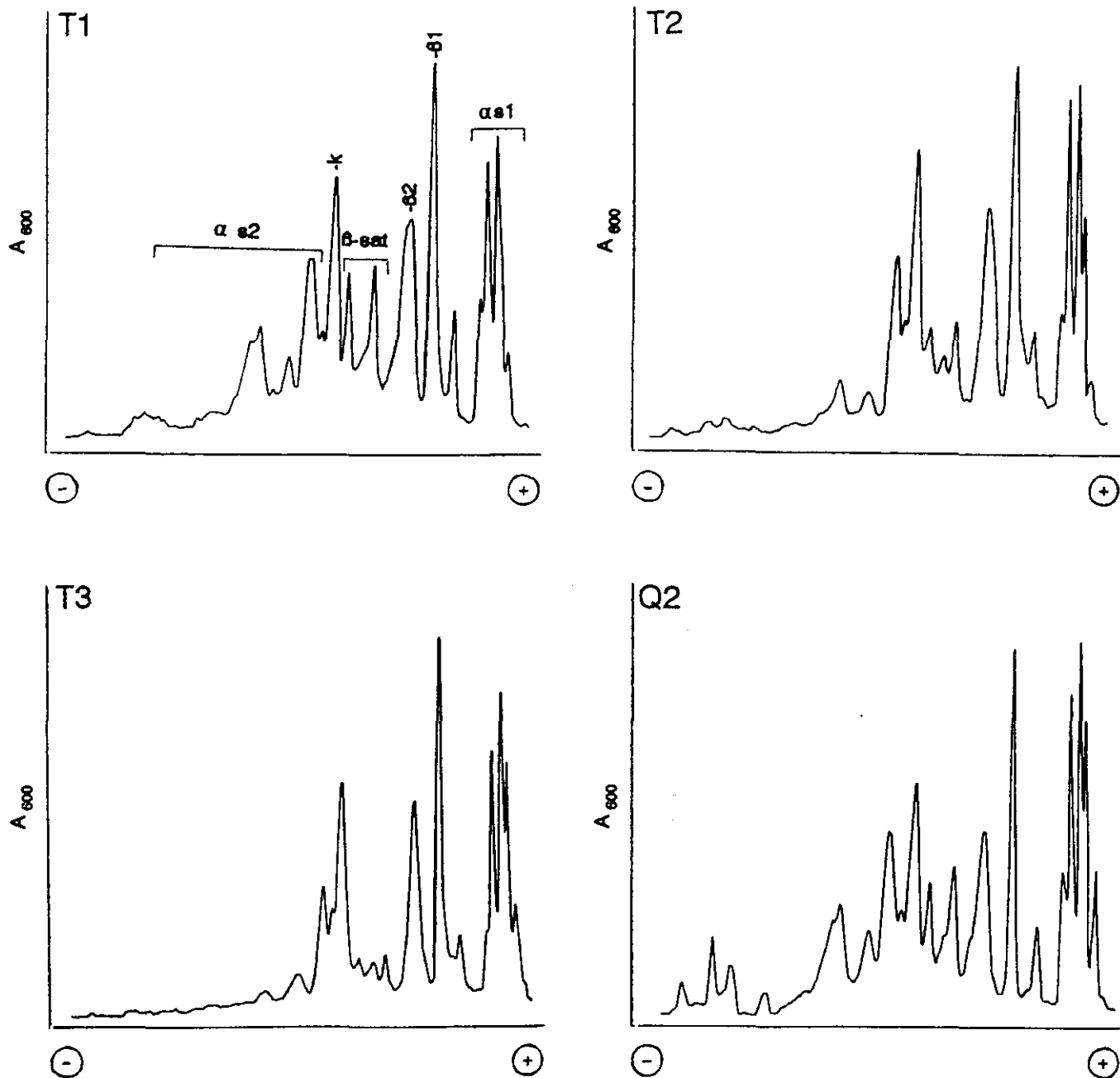


Figura 4.11. Densitogramas de 4 muestras de leche de oveja (predefinidas como T1, T2, T3 y Q2) obtenidos a partir de un gel como el que se muestra en la fig. 4.10.b.

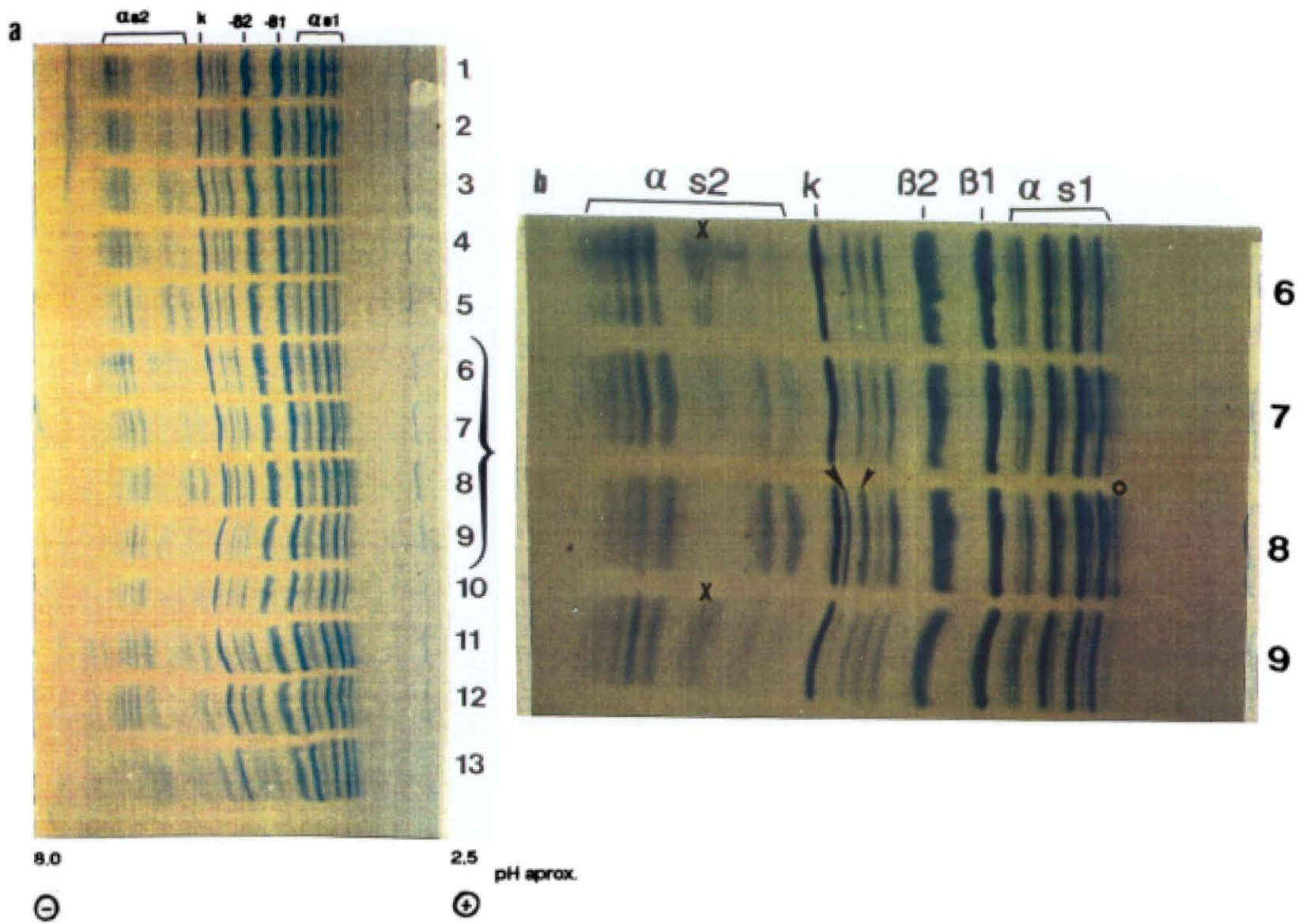


Figura 4.12. (a) IEF de 13 muestras de caseínas de leche de oveja. Gradiente de pH en el gel= 2,5-8. (b) Ampliación de imagen de las muestras 6, 7, 8 y 9 de la fig. 4.12.a. 1, 2, 3, 4 y 7: tipo T1. 5, 10, 11 y 12: tipo T2. 6 y 9: tipo Q1. 8: tipo S. 13: tipo T3.

isoelectroforética de la  $\alpha_{s2}$ -SR; por otra parte, esta muestra de la calle 8, dado que pertenece al grupo denominado S, exhibe además 4 bandas en la zona de las  $\alpha_{s1}$ -CN (calle 8, círculo en la fig. 4.12.b), característica que diferencia igualmente a las caseínas Q2.

Si el gradiente de pH se consigue mezclando varios anfólitos que refuercen el pH a intervalos muy estrechos la resolución de las bandas se incrementa en los geles de isoelectroenfoque. Esto se ha ensayado con un gel de gradiente de pH 2,5-8 obtenido con la mezcla de 5 anfólitos: pH 2,5-4, pH 4,5-5,4, pH 4-6,5, pH 5-8, pH 6-8 en proporción 0,5:1:0,83:0,66:0,33. En estas condiciones isoelectroforéticas las caseínas de leche de oveja migran según el modelo esquematizado que se representa en la figura 4.13. Cuando 7 muestras de caseínas, representantes de cada patrón electroforético, se aplicaron en un gel preparado con la citada mezcla de anfólitos, se obtuvieron los isoelectroforegramas que se recogen en la figura 4.14. En este tipo de placas se consiguió la mayor definición de las bandas que caracterizan las  $\beta$ -CN principales. Además se observaron diferencias en los tipos de caseínas preestablecidos mediante PAGE a pH alcalino, como se expone en los apartados siguientes.

1º.- En las muestras clasificadas como T1, T2 y T3 (calles 1, 3 y 2 respectivamente en la fig. 4.14) las diferencias se basan en:

- \* la intensidad relativa de las bandas que componen la  $\alpha_{s1}$ -CN,
- \* la intensidad relativa de las bandas satélite de las  $\beta$ -CN y,
- \* la presentación de las bandas correspondientes a la  $\alpha_{s2}$ -CN.

A continuación se explican detalladamente los resultados obtenidos con ayuda del esquema de la fig. 4.13.

A) Para las muestras T1 (calle 1): en la  $\alpha_{s1}$ -CN la banda "A" es de menor intensidad que la "B" y la "C"; las bandas "d" y "e" de la  $\alpha_{s1}$  así como las  $\beta$ -satélite se presentan marcadamente en su respectiva zona de focalización; para la  $\alpha_{s2}$ -CN

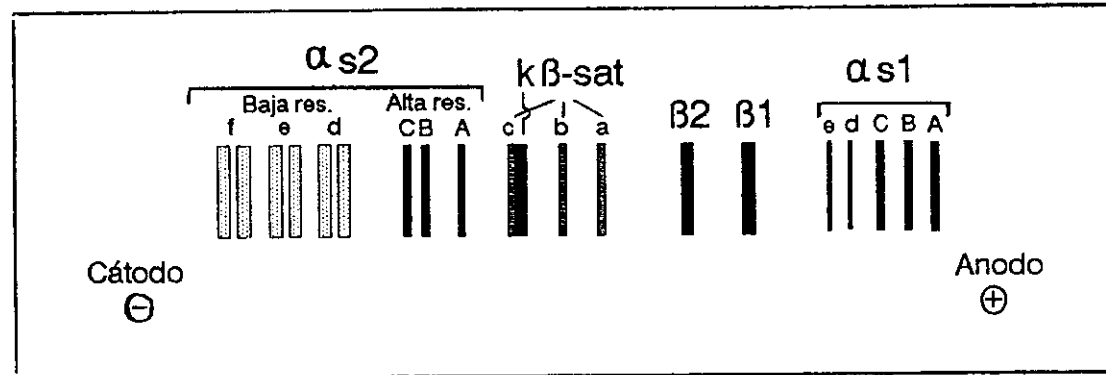


Figura 4.13. Esquema de la migración isoelectroforética de las distintas fracciones caseínicas de leche de oveja en geles de gradiente de pH 2,5-8. Las bandas de cada fracción que presentan más intensidad se han designado con letras mayúsculas y las de menor intensidad con letras minúsculas. (Alta res.: alta resolución. Baja res.: Baja resolución).

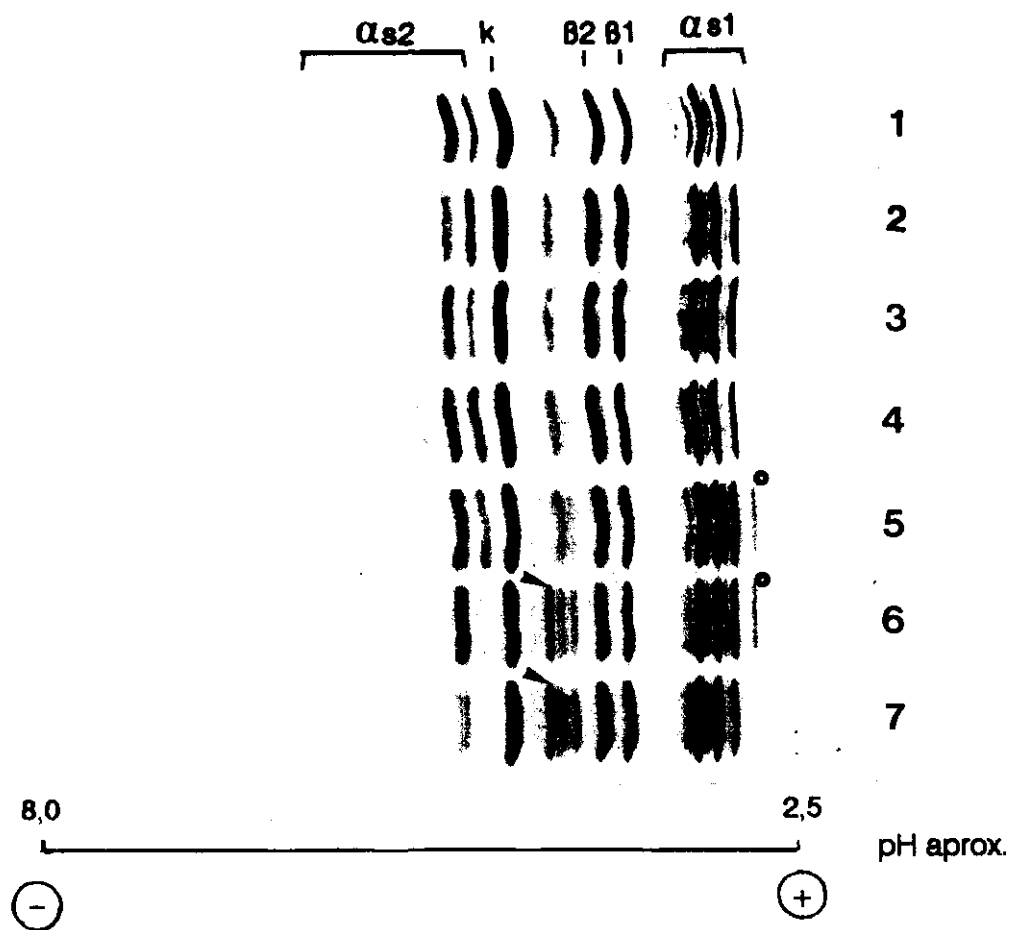


Figura 4.14. IEF de 7 muestras de caseínas de leche de oveja representantes de los tipos predefinidos electroforéticamente. Gradiente de pH en el gel= 2,5-8.  
 1: tipo T1. 2: tipo T3. 3: tipo T2. 4: tipo Q1. 5: tipo Q2. 6: tipo S. 7: tipo C.

se muestran muy intensas las bandas "B" y "C", existiendo los 3 subgrupos de migración más catódica ("d", "e" y "f") de baja resolución.

- B) En las caseínas tipo T3 (calle 2): la banda menos intensa de la  $\alpha_{s1}$ -CN es la "C"; las bandas "d" y "e" de la  $\alpha_{s1}$  y las  $\beta$ -satélite apenas se aprecian; todas las bandas de  $\alpha_{s2}$ -CN (salvo la banda "A" del grupo de alta resolución) aparecen con una intensidad relativa muy escasa, desapareciendo prácticamente los subgrupos "e" y "f" de baja resolución.
- C) En las muestras tipo T2 (calle 3): las tres bandas principales que componen la  $\alpha_{s1}$ -CN son prácticamente de igual intensidad, o si acaso superior en la banda "B"; las bandas "d" y "e" de la  $\alpha_{s1}$  y las  $\beta$ -CN satélite ofrecen una intensidad intermedia entre los dos tipos anteriores; del grupo de alta resolución de la  $\alpha_{s2}$ -CN, es la banda "B" la más intensa y, del grupo de baja resolución el tercer subgrupo se anula y los otros dos aparecen débilmente.

2º.- En las muestras clasificadas como Q2 y S (calles 5 y 6 respectivamente, fig. 4.14) se observan 4 bandas en el área de migración de la  $\alpha_{s1}$ -CN; la banda adicional de migración más anódica (marcada con un círculo en la fig. 4.14), presenta su pI en la zona de pH más ácido del electroforegrama. Esta banda aparece débilmente en todos los tipos de muestras, pero sólo en el S y Q2 alcanza una intensidad similar a las bandas A, B y C de la  $\alpha_{s1}$ -CN.

3º.- En las muestras clasificadas como S y C (calles 6 y 7 respectivamente, fig. 4.14) también se distinguen 2 bandas más respecto al modelo esquemático (fig. 4.13): una de ellas, de pronunciada intensidad, se sitúa muy próxima a la banda satélite central de la  $\beta$ -CN (flecha en la figura) y la otra aparece muy débilmente situándose vecina a la  $\kappa$ -CN. Además en ambos tipos

caseínicos la banda "A" del grupo de alta resolución de las  $\alpha_{s2}$ -CN se presenta con menor intensidad que en el resto de los modelos caseínicos, lo que posiblemente indica una heterogeneidad fenotípica para la caseína  $\alpha_{s2}$  en estos tipos de muestras.

Los diagramas densitométricos correspondientes a cada tipo de caseínas analizadas en geles de IEF como el que se muestra en la figura 4.14 se presentan en la figura 4.15, y en la tabla 4.1 los porcentajes relativos de cada fracción caseínica obtenidos a partir de las medidas densitométricas. La figura 4.16 ilustra los resultados numéricos de la tabla 4.1.

**Tabla 4.1. Porcentajes relativos de cada fracción caseínica, para los distintos fenotipos de caseína, obtenidos a partir de las medidas densitométricas de los isoelectroforegramas que se presentan en la figura 4.16.b.**

Fenotipo de caseína	Fracción caseínica				
	$\alpha_{s1}$	$\alpha_{s2}$	$\beta$ -sat	$\beta_1 + \beta_2$	$\kappa$
T1	33,3	18,3	7,4	20,4	15,5
T2	38,9	15,3	6,5	23,3	11,9
T3	35,2	14,3	5,2	25,2	14,2
Q1	32,9	18,6	6,1	24,7	14,9
Q2	35,7	13,8	6,5	22,8	14,3
C	31,0	18,4	7,3	22,3	14,7
S	36,4	21,9	5,1	23,1	13,1

Entre las caseínas clasificadas como  $\alpha_s$  con 3 bandas (tipos T1, T2 y T3) se observa que el mayor porcentaje de  $\alpha_{s2}$ -CN lo presenta el tipo T1, seguido del T2 y a continuación el T3. Este hecho corrobora las diferencias de intensidad que se observaban en esta fracción mediante disc-PAGE a pH ácido; además, como confirman los porcentajes de las  $\beta$ -satélite, el tipo T1 muestra el mayor porcentaje relativo, seguido del T2 y con la menor cantidad el T3, diferencias ya advertidas al analizar las muestras mediante PAGE y disc-PAGE a pH alcalino.

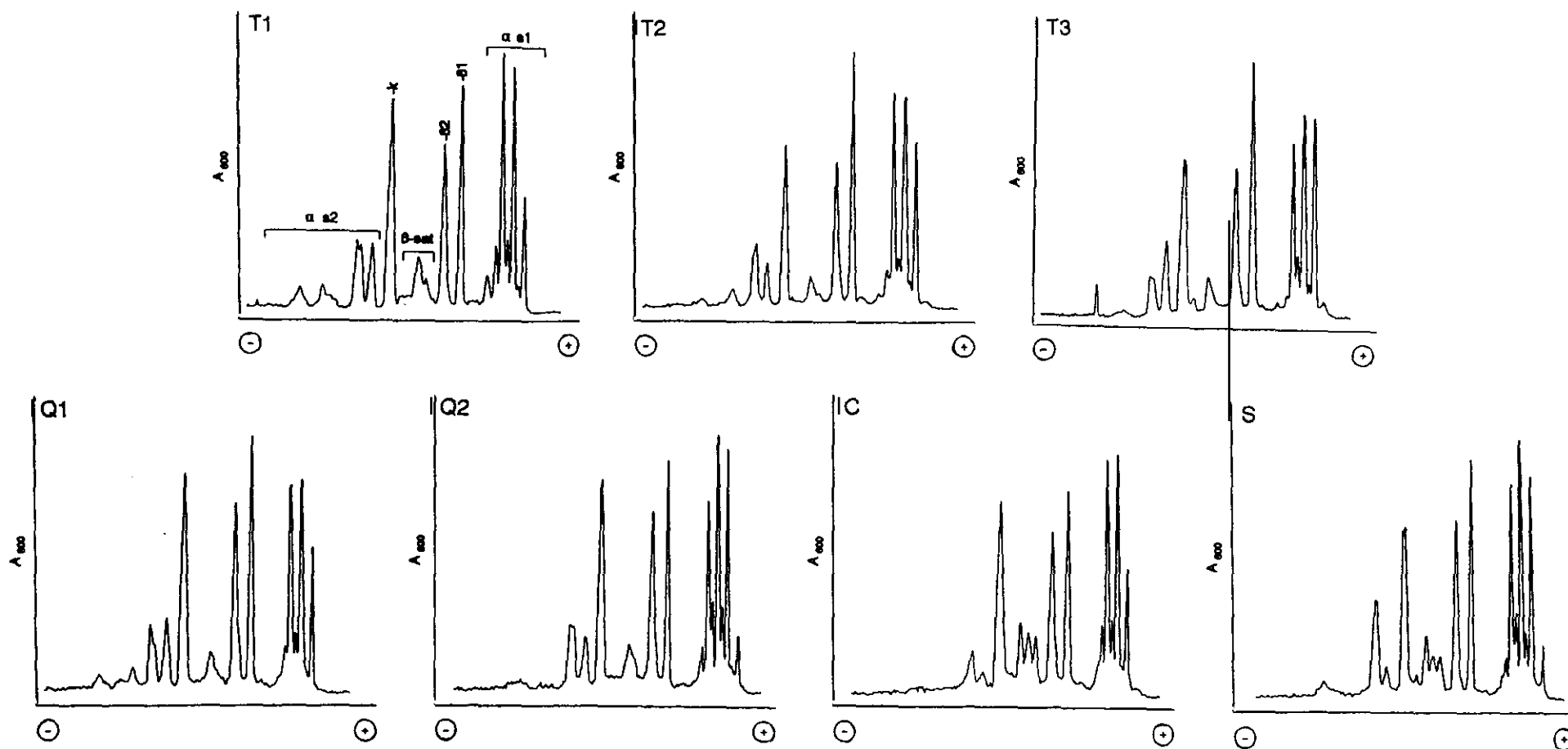


Figura 4.15. Densitogramas de las 7 muestras de caseínas de leche de oveja que se presentan en la fig. 4.14.

Las caseínas Q1, C y S presentan los mayores porcentajes relativos de  $\alpha_{s2}$ -CN; es posible que la heterocigosis de la  $\alpha_{s2}$ -CN en los 3 tipos caseínicos citados se traduzca en una mayor proporción de esta caseína, lo que confirmaría los resultados cualitativos observados mediante disc-PAGE a pH ácido.

Por el contrario, el tipo Q2 presenta el menor porcentaje de  $\alpha_{s2}$ -CN con lo cual un aumento de bandas en la zona de la  $\alpha_{s1}$ -CN implicaría un detrimento cuantitativo de la caseína  $\alpha_{s2}$ .

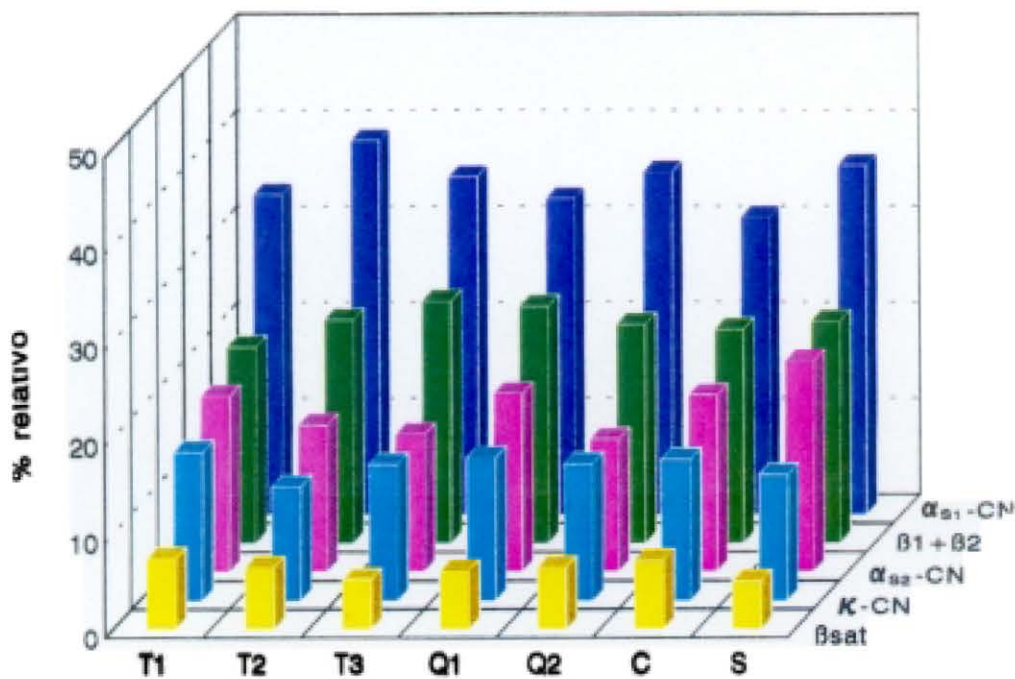


Figura 4.16. Histogramas representativos del contenido en cada fracción caseínica según los distintos tipos de caseínas de leche de oveja (recogido en la tabla 4.1).

### Isoelectroenfoque en geles ultrafinos

En la figura 4.17 se muestran los isoelectroforegramas de 7 muestras de caseínas analizadas mediante UTLIEF en gel con gradiente de pH 2,5-8.

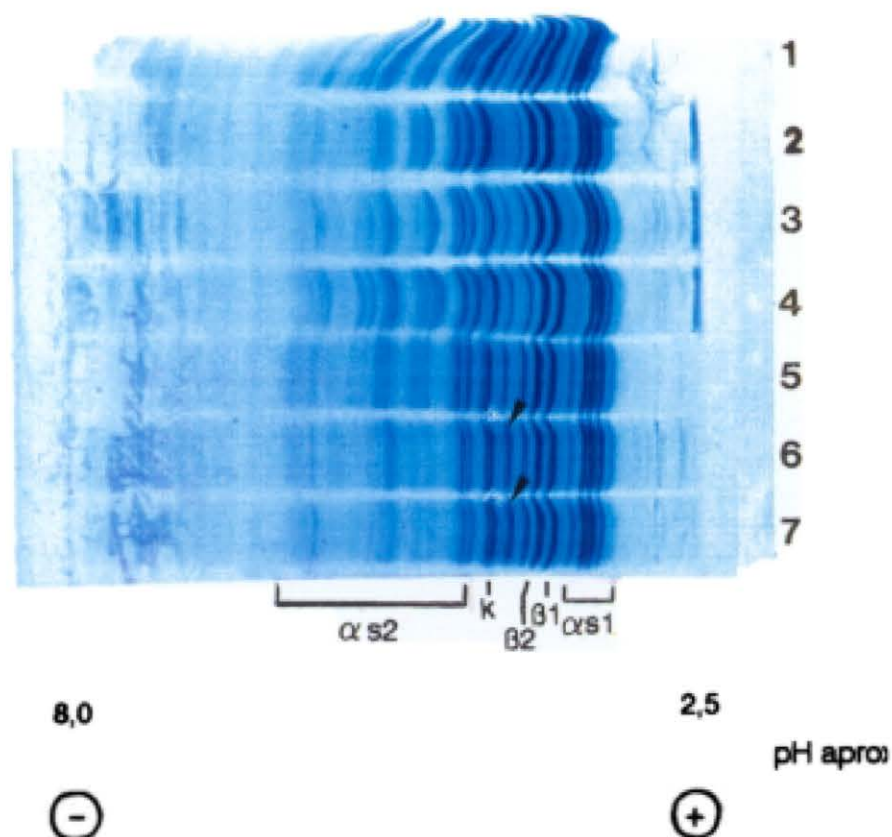


Figura 4.17. UTLIEF de 7 muestras de caseínas de leche de oveja. Gradiente de pH en el gel= 2,5-8.

1: tipo T1. 2: tipo T3. 3: tipo T2. 4: tipo Q1. 5: tipo Q2. 6: tipo S. 7: tipo C.

La disminución del espesor en estas placas unido al empleo de 6 anfólitos de estrecho intervalo de pH para establecer el gradiente da lugar a una resolución muy superior a la que se

obtiene en los geles de 1 mm de espesor como fue demostrado por Seibert y col. (1985) para leche de vaca. Este aumento de resolución unido a la utilización del método de tinción de Krause (1989), de alta sensibilidad, han permitido la obtención de resultados muy satisfactorios.

En estas condiciones se han separado caseínas que solo difieren en 0,03 unidades de pH. La tabla 4.2 recoge los puntos isoeléctricos de las bandas que definen cada fracción caseínica. La presencia de urea en los geles da lugar a un punto isoeléctrico (pI aparente) superior al real (pI). Según algunos autores, debe aplicarse una corrección (Josephson, 1972; Trieu-Cuot y Gripon, 1981); sin embargo, no existe un método eficaz para estimar cómo puede actuar la urea en cada tipo de anfólitos y modificar el pH. La adición de  $\beta$ -alanina en estos geles incrementa la linealidad del gradiente de pH en el gel.

Si se conoce cómo ocurre la migración en geles finos de similar gradiente de pH, las dificultades de interpretación del complicado isoelectroforegrama quedan solventadas en gran medida. La figura 4.18 muestra el esquema de migración en geles ultrafinos de gradiente de pH 2,5-8 observando que presenta algunas semejanzas con el que se obtiene en geles finos de igual gradiente de pH (fig. 4.13) por lo que los detalles ya especificados en éstos no se repetirán en la descripción.

Cabe destacar que se han conseguido resolver las 3 bandas ("a", "b" y "c") que componen la  $\beta$ -CN satélite, ya que la banda "c" en los geles finos no se separa de la  $\kappa$ -CN.

La banda que focaliza muy unida a la banda "b" de la  $\beta$ -CN satélite en las muestras tipos C y S (banda marcada con una flecha en las calles 6 y 7, fig. 4.17) es una de las principales que definen la  $\alpha_{s2}$ -CN super-rápida; se localiza a una distancia aproximada de 2,5 cm del ánodo y se ha calculado un pI aparente de 4,14.

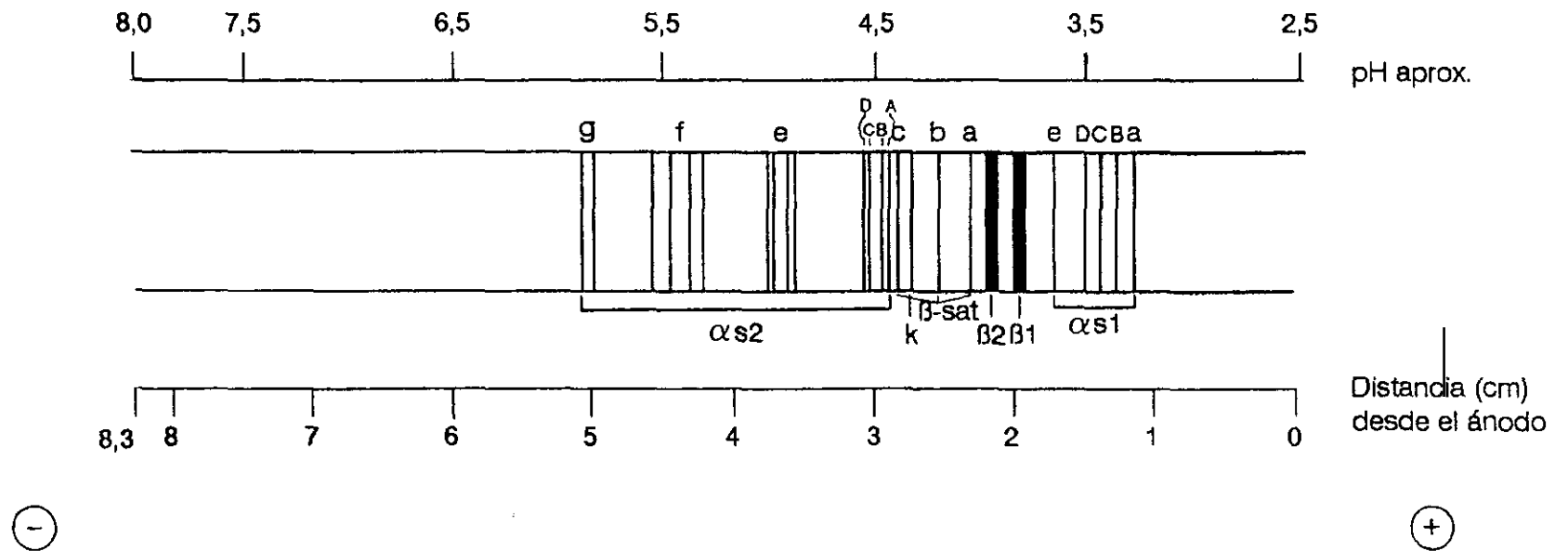


Figura 4.18. Esquema de la migración isoelectroforética de las distintas fracciones caseínicas de leche de oveja en geles ultrafinos de gradiente de pH 2,5-8. (Se ha asignado a cada banda una letra que se corresponde con la que se especifica en la tabla 4.2)

Tabla 4.2. Posición que ocupan en un gel ultrafino de isoelectroenfoque de gradiente de pH 2,5 - 8 (ver fig. 4.18) las bandas que definen las fracciones caseínicas y pI aparente de las mismas. (Las bandas correspondientes a cada fracción se han designado con las mismas letras con que se representan en la fig. 4.18).

Fracción caseínica	Banda	Posición en el gel (distancia en cm desde el ánodo)	pI aparente
$\alpha$ s1	a	1,20	3,29
	B	1,30	3,36
	C	1,40	3,43
	D	1,50	3,49
	e	1,70	3,62
$\beta$ 2		1,90 - 2,00	3,76 - 3,82
$\beta$ 1		2,10 - 2,20	3,89 - 3,96
$\beta$ -sat	a	2,30	4,02
	(*)	2,50	4,14
	b	2,55	4,19
	c	2,85	4,39
$\kappa$		2,75	4,32
$\alpha$ s2	A	2,90	4,42
	B	2,95	4,45
	C	3,05	4,52
	D	3,10	4,55
	e	3,55 - 3,80	4,85 - 5,02
	f	4,20 - 4,60	5,28 - 5,55
	g	5,00 - 5,10	5,81 - 5,88

(\*) Banda principal que define la caseína SR en geles de isoelectroenfoque monodimensional.

### *Isoelectroenfoque en equipo automatizado*

El IEF de caseínas en equipo automatizado se realizó en geles preparados en el laboratorio con gradientes de pH 2,5-10 y 2,5-6,5.

En geles con gradiente de pH 2,5-10 (mezcla de anfólitos de pH 2,5-4 y 3,5-10 en proporción 0,4:1) se obtiene una resolución bastante satisfactoria, pero el electroforegrama resulta ser demasiado estrecho ya que las bandas se concentran en una zona próxima al ánodo que representa el 14,5% de la distancia ánodo-

cátodo de la placa. En cambio, Moio y col. (1989b) en idénticas condiciones analíticas han conseguido separaciones óptimas de las parax-CN y las  $\gamma$ -CN ovinas y bovinas (zona de pH comprendido entre 7 y 9).

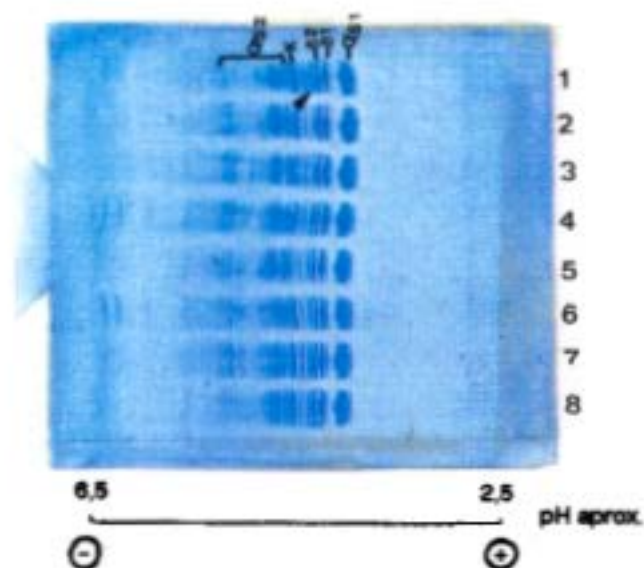


Figura 4.19. IEF de 8 muestras de caseínas de leche de oveja en equipo automatizado. Dimensiones de la placa: 50 x 41 x 0,45 mm. Gradiente de pH en el gel= 2,5-6,5. 1: tipo S. 2-8: tipo Q2.

En la figura 4.19 se muestra cómo en geles con gradiente de pH 2,5-6,5 (mezcla de anfólitos de pH 2,5-4,5 y 4-6,5 en proporción 1:1) se consigue un mayor desplazamiento del diagrama electroforético, que en este caso ocupa aproximadamente 1/3 de la distancia ánodo-cátodo de la placa situándose en la parte central de la misma. La resolución que se consigue es muy alta, incluso en la complicada zona de la  $\alpha_{s2}$ -CN. El electroforegrama resultante es semejante al que se obtiene en geles ultrafinos con la ventaja de conseguir un gradiente muy estable mezclando sólo dos

anfólitos. Se observa que todas las muestras representadas en la fig. 4.19 contienen 4 bandas definiendo la  $\alpha_{s1}$ -CN debido a que son tipos Q2 (calles 2 a 8) y S (calle 1). Las 3 bandas satélite de la  $\beta$ -CN se aprecian con distinta intensidad en las muestras 4, 5 y 6 con las consiguientes diferencias en la  $\alpha_{s2}$ -CN, con lo cual, en estas caseínas Q2 cabría establecer tres subtipos en combinación con los tipos T1, T2 y T3. Además se puede apreciar la banda super-rápida de la  $\alpha_{s2}$ -CN en el tipo caseínico S (calle 1, flecha en la figura).

De todo lo anterior se puede deducir que el isoelectroenfoque de las caseínas en equipo automatizado con placas preparadas en el laboratorio ofrece las mayores ventajas en cuanto a resolución de bandas y economía de tiempo (en aproximadamente 20 min se efectúa la carrera) y reactivos (sobre todo anfólitos comerciales, dado su elevado precio: solo es necesario añadir un 15,71% de anfólitos, en relación con los geles finos, para analizar el mismo número de muestras por ambos procedimientos), con lo cual su uso es aconsejable para realizar análisis de rutina de elevado número de muestras.

### ***Consideraciones generales sobre la técnica de isoelectroenfoque aplicada al análisis de caseínas de leche de oveja***

El isoelectroenfoque de las caseínas de leche de oveja ha reportado buenos resultados tanto en separación como en resolución de las distintas fracciones, con todos los geles empleados: geles finos, geles ultrafinos y microgeles (en este último caso, cuando se emplea el equipo automatizado de EF). Además de aportar resultados de interés de una propiedad físico-química (punto isoeléctrico) de las proteínas que integran la fracción caseínica, ha contribuido a confirmar con mayor detalle la heterogeneidad de las caseínas ovinas.

La elección de las placas a utilizar es un compromiso que se

ha de establecer en base a la facilidad de interpretación del electroforegrama (IEF en geles finos), la mayor resolución de las bandas (IEF en geles ultrafinos, IEF en equipo automatizado) o el menor tiempo de análisis y economía del proceso (IEF en equipo automatizado). La tendencia es a economizar tanto los tiempos como el material de los experimentos por lo que la utilización del equipo automatizado con placas preparadas en el laboratorio se presenta como la más interesante en el futuro para la detección de variantes genéticas, siempre que se conozca *a priori* cómo ocurre la migración isoelectroforética de la mezcla de proteínas a analizar.

El gradiente de pH a ensayar en las placas de electroenfoque es un parámetro que se debería de considerar en base a la fracción caseínica que se pretenda evaluar. Los resultados obtenidos demuestran que existe un gradiente óptimo para analizar cada fracción caseínica individualmente; el gradiente de pH 2,5-8, conseguido con la mezcla de anfólitos de estrecho intervalo de pH, además de su alta repetibilidad, parece ser el indicado para evidenciar simultáneamente las 4 caseínas ovinas cuantitativamente más importantes presentes en leche cruda.

#### **4.1.1.3. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL. INMUNOTRANSFERENCIA**

Con objeto de estudiar en profundidad el origen de cada banda electroforética y realizar una clara separación e identificación de las distintas fracciones caseínicas se ha ensayado la técnica de electroforesis bidimensional seguida de inmunotransferencia. Para ello se han elegido dos caseínas previamente clasificadas como Q1 y S que, dados los resultados obtenidos mediante otras técnicas electroforéticas, presumiblemente presentan polimorfismo en la fracción  $\alpha_{s2}$ -CN.

En la figura 4.20 se representa el análisis mediante electroforesis bidimensional (1ª dim. disc-PAGE a pH alcalino - 2ª dim. PAGIF grad. pH 2,5-8) de las dos muestras de caseínas

citadas anteriormente. En la figura 4.21 se muestra la inmunotransferencia acoplada a un gel bidimensional de las mismas características que el de la fig. 4.20.

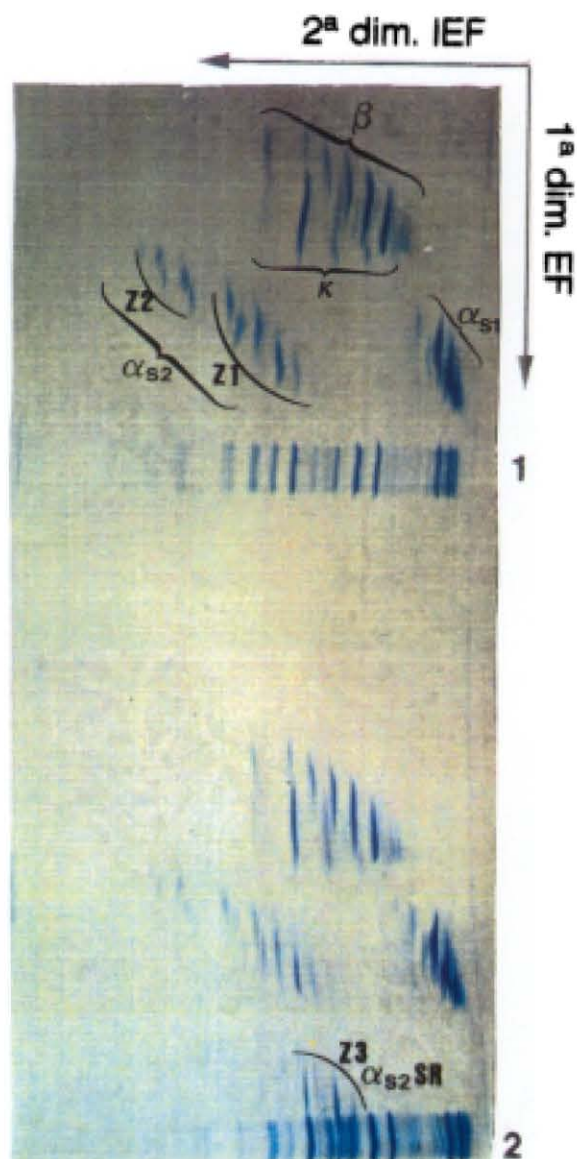


Figura 4.20. EF-2D de dos muestras de caseínas de leche de oveja. 1ª dim. disc-PAGE a pH alcalino - 2ª dim. IEF (grad. de pH 2,5-8). 1: tipo Q1. 2: tipo S.

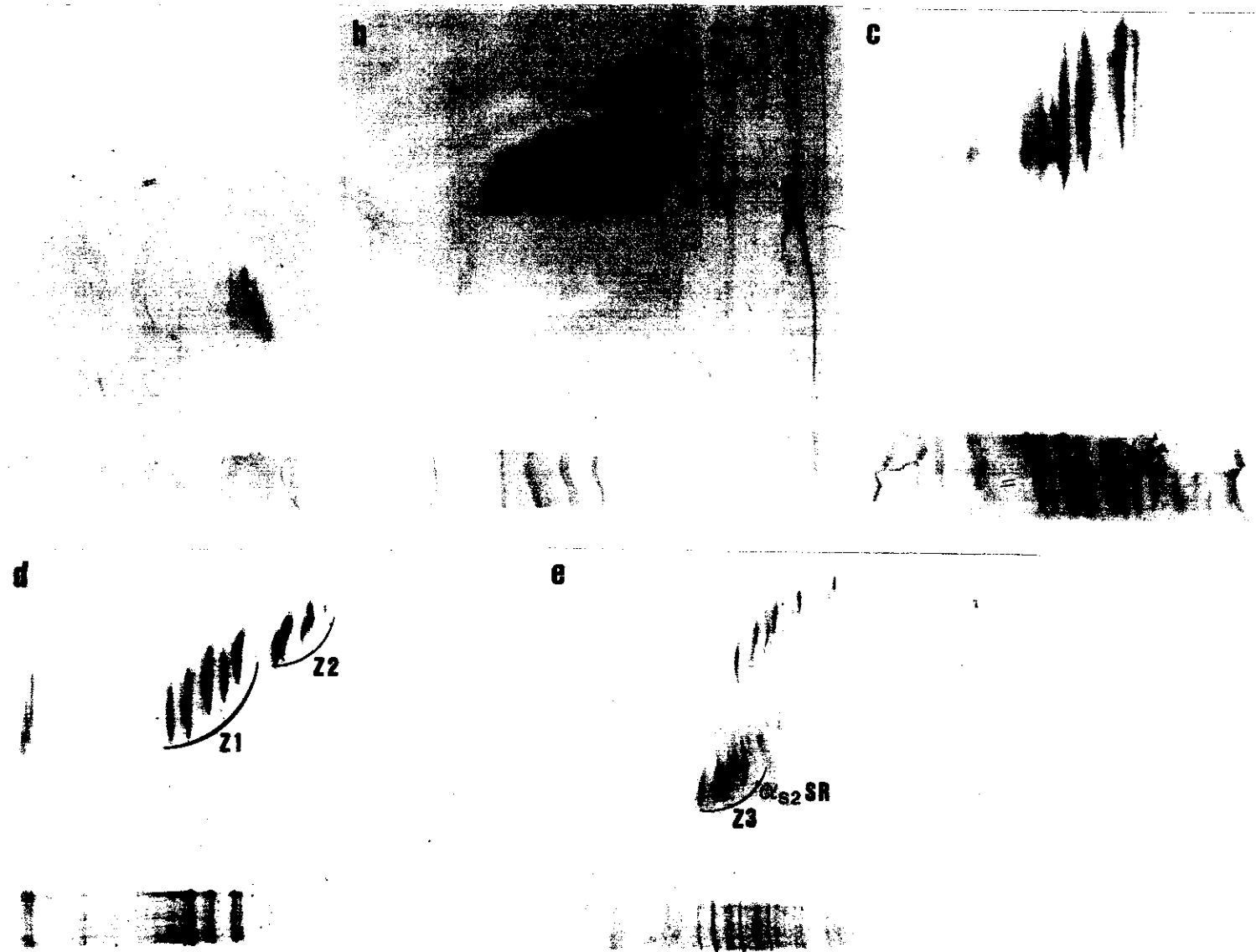


Figura 4.21. Inmunotransferencia de las caseínas ovinas separadas mediante EF-2D (ver fig. 4.20) e incubadas con inmunosuero (a) anti $\alpha_{s1}$ -, (b) anti $\beta$ -, (c) anti $\kappa$ - y (d) anti $\alpha_{s2}$ -CN en una muestra con caseína tipo Q1 (ver calle 1, fig. 4.20) y (e) anti $\alpha_{s2}$ -CN en una muestra con caseína tipo S (ver calle 2, fig. 4.20).

La  $\alpha_{s1}$ -CN está definida por tres bandas mayoritarias y dos minoritarias siendo de éstas últimas la de localización más cercana al ánodo aquélla que se transforma en mayoritaria en muestras tipo Q2 ó S (calle 2, fig. 4.20). Mediante inmunotransferencia acoplada a un isoelectroenfoque bidimensional el suero anti $\alpha_{s1}$ -CN ha reaccionado con 5 bandas (figura 4.21.a).

Las  $\beta$ -CN están representadas por dos bandas mayoritarias que definen las  $\beta$ -principales ( $\beta 1$  y  $\beta 2$  en orden de pI creciente) y tres bandas minoritarias que corresponden a las  $\beta$ -satélite. El suero anti $\beta$ -CN ha reaccionado en el gel de isoelectroenfoque con 5 bandas, correspondiendo a las dos  $\beta$ -CN principales y a las  $\beta$ -CN satélite (figura 4.21.b).

Las bandas implicadas en la  $\kappa$ -CN también se extienden ampliamente en el gel de electroenfoque distinguiendo fundamentalmente 5 componentes: 1 mayoritario y 4 minoritarios (3 de ellos focalizan más cercanos al ánodo y 1 focaliza más cercano al cátodo mediante isoelectroenfoque). El suero antik-CN ha identificado 5-6 bandas mayoritarias y otras minoritarias que se mezclan entre las anteriores o focalizan en posición más cercana al ánodo (figura 4.21.c). Los resultados obtenidos en este estudio podrían indicar un polimorfismo no genético debido a distinto grado de glicosilación de las cadenas peptídicas, similar a lo que sucede en leche de vaca (Robitaille y col., 1990). En la bibliografía consultada los distintos autores han formulado diversas hipótesis sobre la causa de la heterogeneidad de la  $\kappa$ -CN ovina. Alais y Jollès (1967) mediante cromatografía de intercambio iónico y posterior caracterización mediante electroforesis identificaron para la  $\kappa$ -CN ovina 3 componentes mayoritarios y varios minoritarios. Mercier y col. (1968) mediante cromatografía de intercambio iónico lograron separar dos fracciones de  $\kappa$ -CN ovina y aducen la posibilidad de que sean 2 variantes genéticas o bien 2 fracciones de una misma variante. Soulier y col. (1975) mediante cromatografía sobre DEAE-celulosa

han separado 5 fracciones distintas de  $\kappa$ -CN ovina que se diferencian por el grado de glicosilación y fosforilación de las cadenas peptídicas; estos mismos autores proponen una regulación hormonal para la fijación de los restos glucídicos en el polipéptido, con lo cual es factible que exista una variación a lo largo del periodo de lactación. Addeo y col. (1992) mediante FPLC ("Fast Protein Liquid Chromatography") han separado 2 fracciones identificadas como  $\kappa$ -CN en análisis posteriores mediante IEF; en el isoelectroforegrama correspondiente estas bandas muestran igual intensidad por lo que estos autores sugieren un posible polimorfismo genético para la  $\kappa$ -CN ovina.

El análisis bidimensional de las caseínas  $\alpha_{s2}$  muestra tres zonas de migración de distinto nivel electroforético, designadas en la fig. 4.20 como  $Z_1$  (zona central),  $Z_2$  (migración más cercana al cátodo, en ambas dimensiones) y  $Z_3$  (focalización más anódica, en ambas dimensiones), todas delimitadas por 5-6 componentes. La zona  $Z_1$  se ha comprobado que se presenta en todas las muestras analizadas, mientras que las  $Z_2$  y  $Z_3$  determinarían los diagramas variantes. La  $Z_2$  se presenta en muestras tipo Q1 (calle 1, fig. 4.20). La zona  $Z_3$  representa la migración bidimensional de  $\alpha_{s2}$ -SR (calle 2, fig. 4.20); este diagrama es semejante al que obtienen Chianese y col. (1992a) del análisis bidimensional de la nueva variante de  $\alpha_{s2}$ -CN caprina. Como se demostró mediante las técnicas monodimensionales, las bandas que integran la zona  $Z_1$  presentan una intensidad variable de unos individuos a otros (mayor en las que sólo contienen esta zona y menor en aquellas muestras en que la  $\alpha_{s2}$  se reparte entre dos zonas); en las caseínas que incluyen dos zonas de migración de los componentes de la  $\alpha_{s2}$  se observa que ambas presentan la misma intensidad; esto prueba nuevamente la heterogeneidad de esta fracción caseínica para los tipos Q1 y C ó S. La inmunotransferencia a partir de separaciones bidimensionales en geles de isoelectroenfoque ha permitido caracterizar las bandas que definen los

diagramas variantes de la  $\alpha_{s2}$ -CN (zonas Z2 y Z3 respectivamente en las fig. 4.21.d. y 4.21.e.). En este tipo de geles se han identificado de forma óptima las diversas variantes de  $\alpha_{s2}$ -CN. Las muestras que contienen una sola de estas zonas se considerarían como individuos homocigotos y, las que contienen dos zonas serían heterocigotos para esta caseína.

El inmunosuero anti $\alpha_{s2}$ -CN mostró una débil afinidad hacia la fracción  $\alpha_{s1}$ -CN. Esta reactividad cruzada puede atribuirse bien al alto nivel de homología en la estructura primaria de las zonas hidrofílicas de ambas fracciones caseínicas, especialmente en la parte fosforilada de la proteína (Mercier y col., 1971; Brignon y col., 1977), o bien a una contaminación del antígeno con  $\alpha_{s1}$ -CN, aunque la pureza de la preparación fue controlada mediante determinación de la secuencia de aminoácidos.

Es sabido que las caseínas de leche de distintas especies de rumiantes presentan una alta homología estructural con determinantes antigénicos comunes (Jennes, 1982). Por ello es posible el empleo de inmunosueros anticaseínas de leche de vaca para la identificación de caseínas de leche de oveja, tal y como se ha realizado en este estudio.

### ***Consideraciones generales sobre la técnica de electroforesis bidimensional aplicada a análisis de caseínas de leche de oveja***

De los resultados obtenidos se puede concluir que mediante electroforesis bidimensional (1ª dim. EF - 2ª dim. IEF) los componentes caseínicos se extienden en distintas áreas del gel de segunda dimensión, obteniendo una separación de los mismos mucho más clara que en una sola dimensión. En particular la EF-2D ha sido útil para distinguir entre la  $\alpha_{s1}$ -y la  $\alpha_{s2}$ -CN que, debido a su múltiple fosforilación, son mediante otras técnicas electroforéticas difíciles de separar o resolver las bandas que los componen. La técnica de inmunotransferencia acoplada a separacio-

nes bidimensionales ha permitido la identificación de las bandas que integran cada fracción caseínica.

#### 4.1.1.4. FRACCIONAMIENTO DE LAS CASEÍNAS MEDIANTE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

##### CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

Para la elución mediante cromatografía de intercambio iónico se escogió una caseína que contiene la  $\alpha_{s2}$ -SR como representante de la mayor complejidad caseínica en las muestras estudiadas.

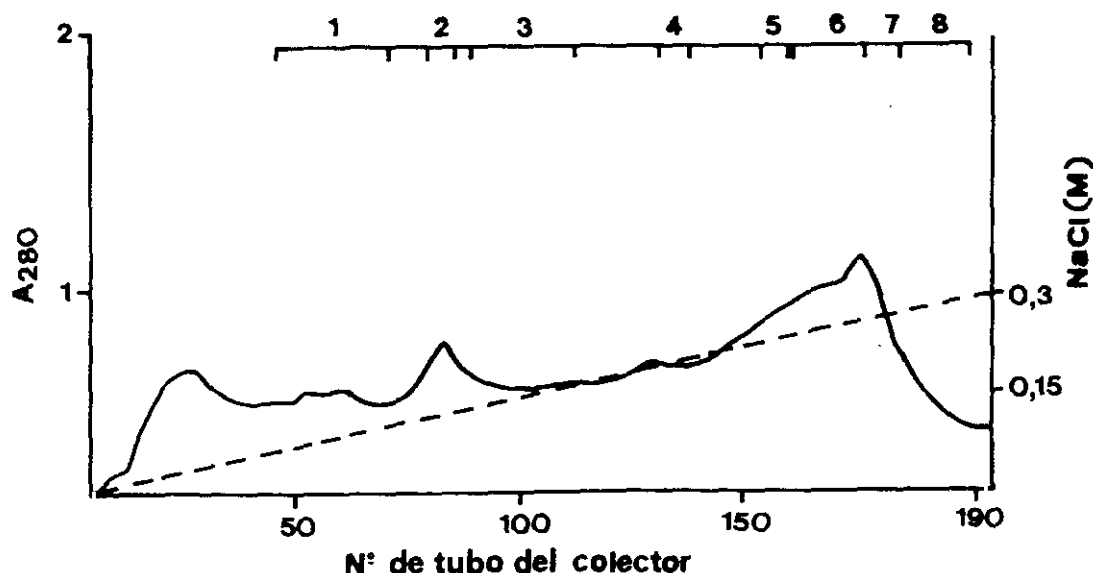


Figura 4.22. Fraccionamiento ( $A_{280}$  del eluido) de caseína ovina en una columna de DEAE-celulosa, mediante un gradiente de 0 a 0,3 M de NaCl en tampón imidazol-HCl 0,02 M pH= 7, conteniendo urea 3,3 M y 0,1% de 2-Mercaptoetanol. El eluido se reunió en 7 fracciones como se indica en la parte superior de la figura.

La figura 4.22 muestra el perfil cromatográfico obtenido de la elución de la mencionada caseína ovina; atendiendo a este cromatograma se seleccionaron 8 fracciones que se dializaron

exhaustivamente y se liofilizaron; posteriormente se caracterizaron mediante PAGE (figura 4.23.a), disc-PAGE SDS (figura 4.23.b.) y UTLIEF (figura 4.23.c). De los electro- e isoelectroforegramas se identificaron las fracciones tal y como se indica en la tabla 4.3.

**Tabla 4.3. Identificación de las fracciones obtenidas en el aislamiento de caseína ovina mediante cromatografía de intercambio iónico. Las fracciones (F1-F8) se seleccionaron como se muestra en la fig. 4.22.**

Fracción cromatográfica	Identificación	
	PAGE - UTLIEF	disc-PAGE SDS
F1	$\kappa + \beta\text{-sat}$	$\kappa + \beta$
F2	$\beta\text{-sat} + \beta_1 + \kappa$	$\beta + \kappa$
F3	$\beta_2 + \beta_1 + \kappa$	$\beta + \kappa$
F4	$\beta_2 + \beta_1 + \alpha_{s2}$	$\beta + \text{bandas X}^*$
F5	$\alpha_{s2} + \alpha_{s1}$	$\alpha_{s1} + \alpha_{s2} + \text{bandas X}^*$
F6	$\alpha_{s1} + \alpha_{s2}$	$\alpha_{s2} + \alpha_{s1} + \text{bandas X}^*$
F7	$\alpha_{s1}$	$\alpha_{s1}$
F8	$\alpha_{s1}$	$\alpha_{s1}$

(\*) Bandas con elevada masa relativa. (Ver figura 4.23.b.)

Mediante PAGE y UTLIEF la identificación de las fracciones fue inmediata, dados los análisis previos realizados para el estudio del polimorfismo genético de las caseínas.

La electroforesis en presencia de agentes desnaturalizantes (disc-PAGE SDS) permite la separación de las proteínas en base a su masa relativa ( $M_r$ ). Mediante esta técnica las caseínas ovinas según Dall'Olio y col. (1989) se separan en 4 bandas correspondiendo de menor a mayor  $M_r$  a:  $\kappa$ -CN,  $\beta$ - +  $\kappa$ -CN,  $\alpha_{s1}$ -CN y  $\alpha_{s2}$ -CN. Sin embargo, como se muestra en la fig. 4.23.b en este caso las dos bandas intermedias que señalan Dall'Olio y col. (1989) no muestran una clara separación y, por comparación con el electroforegrama obtenido a partir de una caseína tratada con quimosina ( $C_Q$  en la fig. 4.23.b), parece ser que el  $\kappa$ -CN en estas condiciones migra mayoritariamente en la zona de menor  $M_r$ . En las fracciones 4, 5 y 6, fundamentalmente, se presentan dos bandas de

alta  $M_r$  (aprox. 70000) que se han denominado bandas X (flecha en la fig. 4.23.b) y, aunque en el patrón de proteína de partida se detectan con dificultad, hay que señalar que mediante la técnica cromatográfica empleada en todas las fracciones caseínicas ha ocurrido una concentración importante; en la F4, F5 y F6 eluye la  $\alpha_{s2}$ -SR como se comprobó mediante PAGE y UTLIEF (flechas en las fig. 4.23.a y c). Conviene destacar que en PAGE SDS las caseínas se comportan de modo anómalo, migrando en la zona próxima a la anhidrasa carbónica ( $M_r$  aprox. 30000). Cheeseman y Jeffcoat (1970) encontraron que la unión del SDS a las proteínas bovinas individuales varía entre 0,9 g SDS/g de para- $\kappa$ -CN y 3,4 g SDS/g de  $\beta$ -CN. Esto haría que las caseínas compitiesen por unirse al SDS o interaccionasen entre sí, y justificaría su comportamiento en PAGE SDS (Basch y col., 1985). Por todo lo anteriormente expuesto es posible que las que se han denominado bandas X correspondan a la  $\alpha_{s2}$ -SR que pudiera presentarse con una  $M_r$  bastante superior a la  $\alpha_{s2}$  normal, o bien serían agregados formados por unión del SDS a diversas caseínas. Serán necesarios estudios posteriores para confirmar estas hipótesis. Tutta y col. (1991) han analizado caseínas de leche de cabra mediante electroforesis bidimensional (PAGE a pH alcalino en primera dimensión seguida de PAGE SDS en segunda dimensión) observándose en los diagramas electroforéticos bandas de elevado peso molecular; sin embargo, estos autores no hacen referencia a las mismas en la discusión de sus resultados.

De este análisis se concluye que, mediante cromatografía de intercambio iónico, utilizando un gradiente de concentración salina, la elución es: 1º  $\kappa$ -CN; 2º  $\beta$ -CN; 3º  $\alpha_{s2}$ -CN; 4º  $\alpha_{s1}$ -CN.

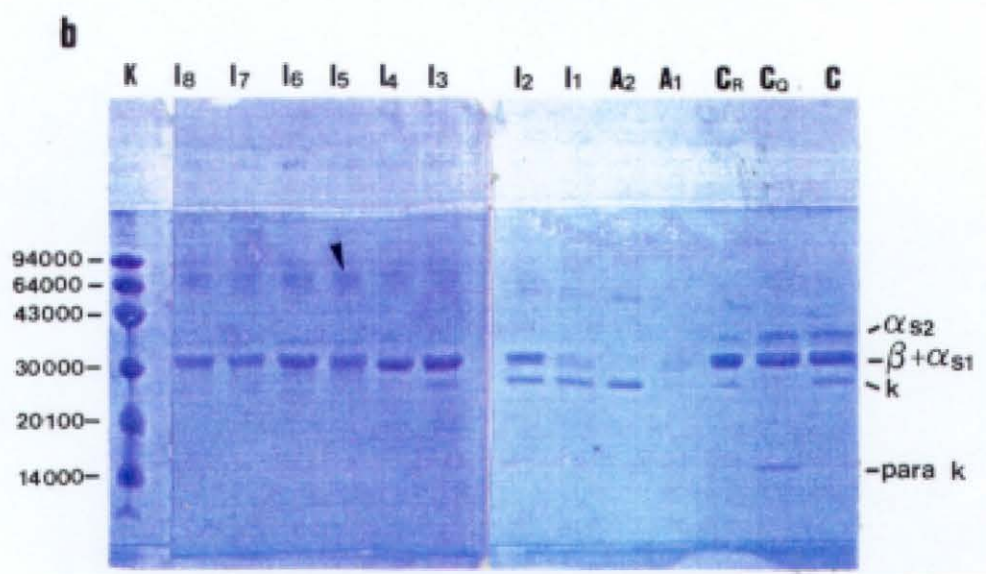
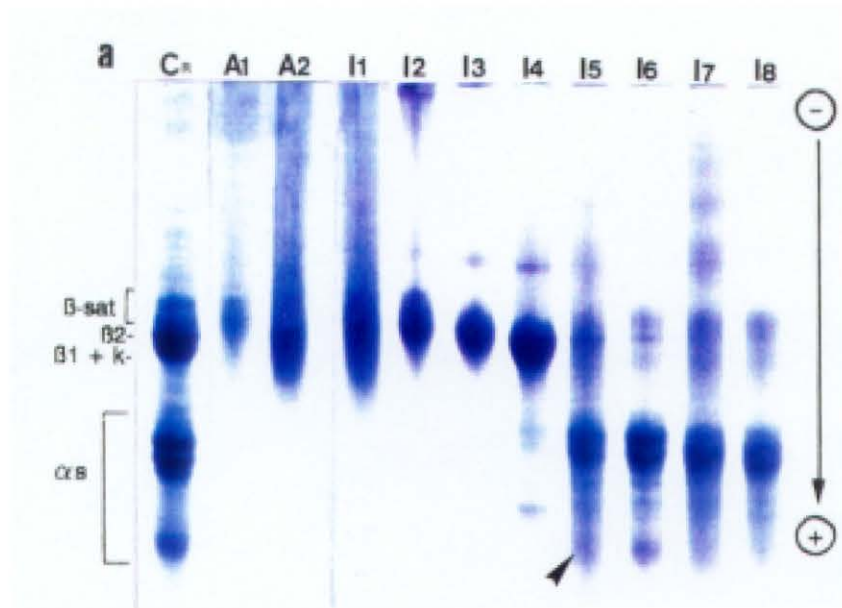


Figura 4.23. Caracterización de las fracciones caseínicas de leche de oveja obtenidas por cromatografía de intercambio iónico y afinidad mediante PAGE a pH alcalino (4.23.a), disc-PAGE SDS (4.23.b) y UTLIEF (4.23.c). C<sub>0</sub>: caseína ovina. C<sub>R</sub>: caseína ovina de referencia. C<sub>0</sub>: caseína ovina tratada con quimosina. I<sub>1</sub>-I<sub>7</sub>: fracciones obtenidas mediante cromatografía de intercambio iónico y agrupadas como se muestra en la fig. 4.22. A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>: fracciones obtenidas mediante cromatografía de afinidad y agrupadas como se muestra en la fig. 4.25. K: kit de calibración de pesos moleculares.

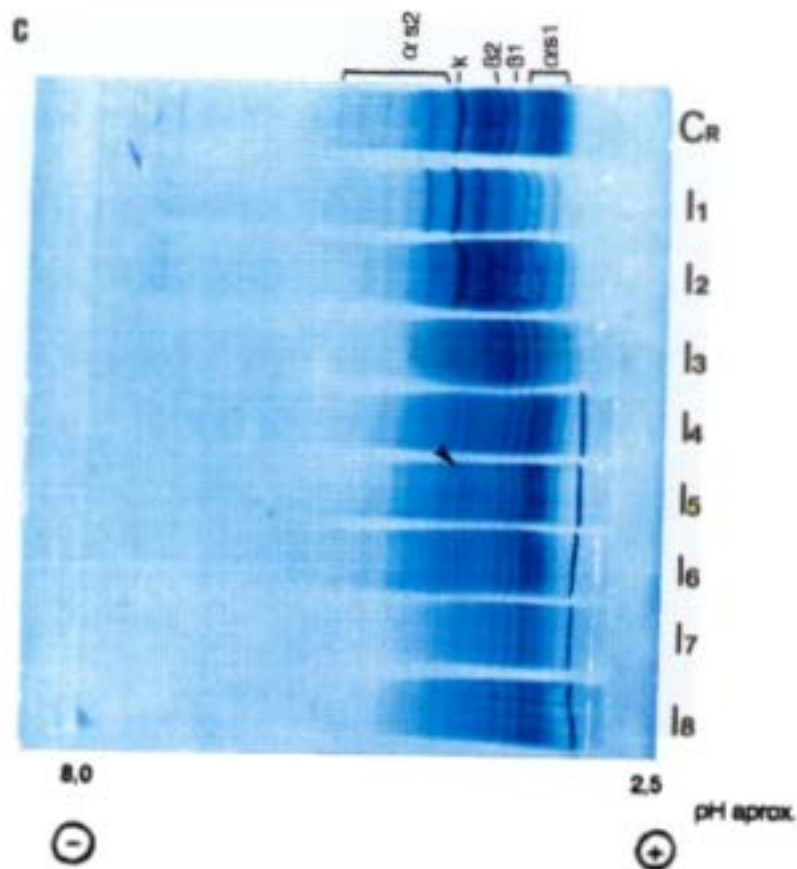


Figura 4.23. (Continuación)

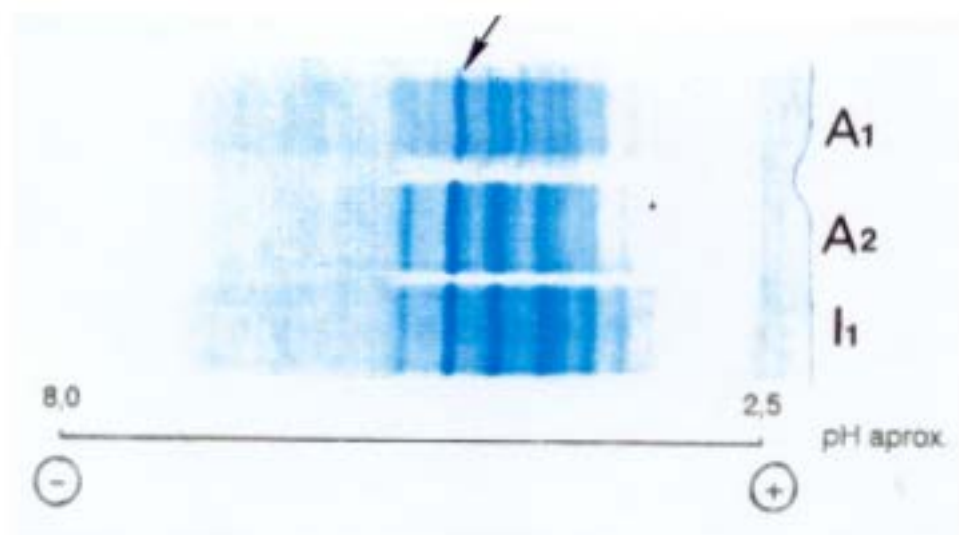


Figura 4.24. IEF de las fracciones caseínicas ( $\beta$  y  $\kappa$ ) obtenidas mediante cromatografía de afinidad a partir de la F1 obtenida mediante cromatografía de intercambio iónico.  $I_1$ : fracción 1 obtenida mediante cromatografía de intercambio iónico (ver fig. 4.22).  $A_1$  y  $A_2$ : fracciones obtenidas mediante cromatografía de afinidad (ver fig. 4.25).

La  $\alpha_{s2}$ -CN eluye bastante próxima a la  $\beta$ -CN; esto podría demostrar que estas proteínas presentan algunas características comunes; de hecho, Bonsing y Mackinlay (1987) han postulado una teoría según la cual las  $\alpha_{s2}$ -CN se generaron a partir de una duplicación del gen que codifica la  $\beta$ -CN para posteriormente evolucionar a una familia de proteínas con capacidad superior para transportar el fosfato cálcico.

Por otra parte, se ha comprobado que las propiedades físico-químicas de la caseína super-rápida están muy relacionadas con las de la  $\alpha_{s2}$ -CN dado que los tiempos de retención son similares en el fraccionamiento mediante cromatografía iónica.

#### **CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD**

Con el objetivo de separar de forma independiente la  $\beta$ -,  $\kappa$ -,  $\alpha_{s1}$ - y  $\alpha_{s2}$ -CN se utilizó la cromatografía de afinidad partiendo de las fracciones F1 ( $\beta$ -sat y  $\kappa$ -CN) y F5 ( $\alpha_{s1}$ - y  $\alpha_{s2}$ -CN) obtenidas mediante cromatografía de intercambio iónico.

A partir de la F1 se separaron eficazmente dos fracciones, como se observa en el cromatograma resultante (figura 4.25), siendo el perfil de elución semejante al que obtienen Nijhuis y Klostermeyer (1975) a partir de caseínas de leche de vaca; de acuerdo con estos autores el eluido se reunió en dos fracciones que contienen respectivamente  $\beta$ -CN y  $\kappa$ -CN como lo demuestran los electro- e isoelectroforegramas correspondientes (figuras 4.23.a, 4.23.b y 4.24). Así se comprobó que una de las bandas de  $\beta$ -CN satélite (la de focalización más catódica) tiene un pI similar al de la banda mayoritaria de  $\kappa$ -CN (flecha en la fig. 4.24); además se demuestra que la  $\kappa$ -CN mediante IEF queda resuelta en 5 bandas siendo una de ellas mayoritaria y 4 minoritarias (calle A2, fig. 4.24). Estos resultados coinciden con los que se expusieron en el apartado de EF bidimensional.

A partir de la F5 se separaron igualmente 2 fracciones resultando un cromatograma similar al obtenido a partir de la F1.

Las dos fracciones se identificaron como  $\alpha_{s1}$ - y  $\alpha_{s2}$ -CN conteniendo esta última la  $\alpha_{s2}$  de movilidad común y la  $\alpha_{s2}$ -SR. Estos argumentos confirman que también por esta técnica cromatográfica que la nueva variante de  $\alpha_{s2}$  presenta las mismas propiedades que la  $\alpha_{s2}$  de movilidad común ya que ambas eluyen en la misma fracción mediante cromatografía de afinidad.

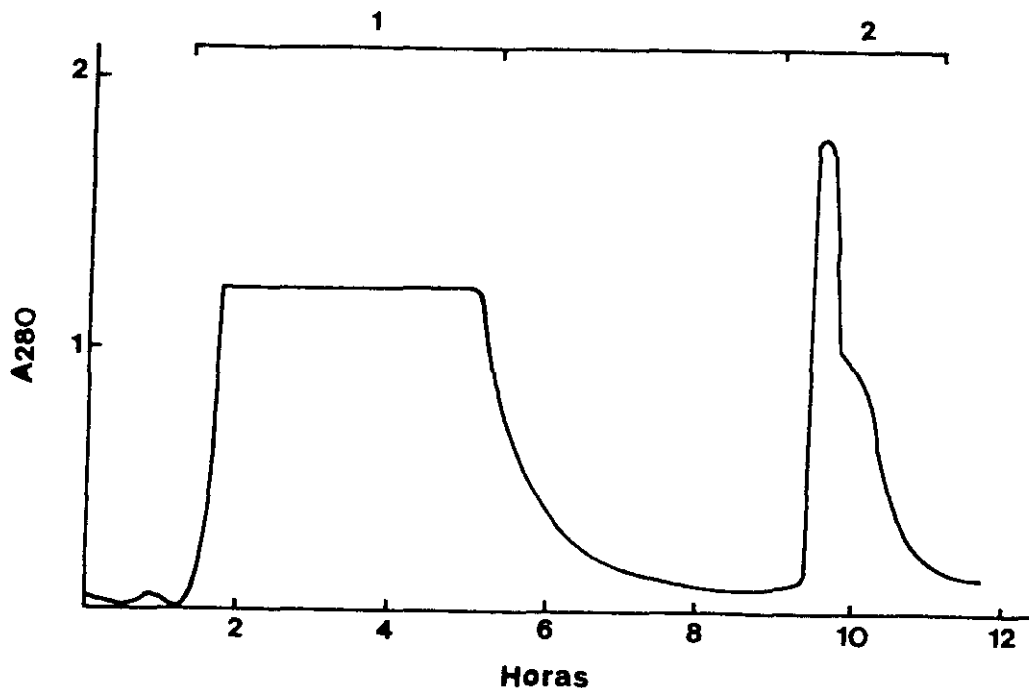


Figura 4.25. Fraccionamiento ( $A_{280}$  del eluido) de la fracción F1 (obtenida mediante cromatografía de intercambio iónico) en una columna de tiol-sefarosa 4B activada. La fracción 1 eluye mediante un tampón Tris-HCl 0,1 M pH= 7 conteniendo Urea 7 M, NaCl 0,3 M y EDTA 1 mM; la fracción 2 eluye mediante un tampón Tris-HCl pH= 8 conteniendo Urea 7 M, NaCl 0,3 M, EDTA 1 mM y L-Cys 25 mM.

Boisnard y Petrissant (1985) analizaron la secuencia completa del ARNm de la  $\alpha_{s2}$ -CN ovina demostrando la existencia de dos especies diferentes de ARNm  $\alpha_{s2}$ -CN, una de las cuales se caracteriza por la delección de un segmento de 27 nucleótidos que codifican los aminoácidos 34-42; sin embargo, no se ha descrito hasta ahora ninguna variante de  $\alpha_{s2}$ -CN de leche de oveja que corresponda al ARNm detectado por Boisnard y Petrissant. Por ello, surge la posibilidad de que la nueva  $\alpha_{s2}$ -CN SR sea realmente una variante genética debido a una delección en la secuencia de aminoácidos.

Por otra parte, la denominada variante C de la  $\alpha_{s2}$ -CN bovina se compone de dos fracciones de distinta movilidad electroforética y que se diferencian químicamente porque la más rápida en las posiciones 129 y 131 presentan dos grupos fosfato unidos a la Ser (Mahe, 1981).

De las consideraciones anteriores se deduce que serán necesarios análisis posteriores para dilucidar si la nueva  $\alpha_{s2}$ -CN SR ovina se diferencia de la de movilidad normal por sustitución de aminoácidos o/y por distinto grado de fosforilación.

#### **4.1.1.5. DISTRIBUCIÓN DE FENOTIPOS**

De acuerdo con los resultados hasta ahora expuestos, se deduce que solo existe polimorfismo en la fracción  $\alpha_s$ -CN en la leche de oveja de razas Manchega y Segureña.

No se han encontrado variantes de  $\beta$ -CN descritas en leche de oveja de razas extranjeras (Arave y col., 1973; Rossi y Clementi, 1984; Chiofalo y Micari, 1987; Thomas y col., 1989). Tampoco se han observado variantes en la fracción  $\kappa$ -CN, sugeridas por Mercier y col. (1968) y Addeo y col. (1992).

En ningún caso se ha encontrado la variante Welsh descrita por vez primera en ovejas de esta raza inglesa (King, 1966), y que posteriormente ha sido descrita en caseínas de leche de otras

razas ovinas: Stavropol Merino, Meat-type Merino, Improved Wallach y Tsigaya (Mácha y Horák, 1972); Columbia, Hampshire, Rambouillet, Targhee así como la F<sub>1</sub> derivada de diversos cruces entre las anteriores (Arave y col., 1973); Sarda y Massese (Russo y col., 1981); Massa y Biella (Di Stasio, 1983); Barbaresca-Siciliana y Siciliana-Pinzirita (Chiofalo y Micari, 1987); Border-Leicester x Merino (Thomas y col., 1989); Altamurana (Mauriello y col., 1990).

Repasando la clasificación racial de los ovinos, resulta interesante señalar que la Manchega y Segureña pertenecen al denominado grupo cirtoide (perfil subconvexo y extremidades desnudas y finas); estas razas se formaron a partir de los ovinos ibéricos primitivos con influencia del tipo *Ovis aries ligeriensis* (Aparicio, 1960). Hasta la fecha, la denominada variante Welsh no ha sido descrita en razas que presenten un perfil etnológico similar al de las razas estudiadas en este trabajo. Por ello, se podría especular con la posibilidad de que la variante caseínica Welsh e incluso otras variantes de proteínas lácteas estén estrechamente relacionadas con los genogrupos ovinos.

La tabla 4.4 recoge el número de observaciones y los porcentajes obtenidos para cada fenotipo por razas y rebaños. Los tipos caseínicos (T1, T2, T3, Q1, Q2, C y S) se describieron en el apartado correspondiente a EF a pH alcalino.

De acuerdo con los resultados de López-Gálvez y col. (1990), el fenotipo más frecuente es el de 3 bandas en las dos razas objeto de estudio; el perfil más común es el T1. En la práctica totalidad de las restantes razas ovinas de cuyos datos se dispone en la bibliografía también ha resultado más abundante el fenotipo de 3 bandas para la  $\alpha_s$ -CN.

Se observa que las caseínas estudiadas de leche de oveja Segureña presentan una menor variabilidad que las de leche de oveja Manchega, sin observar en ninguna muestra los fenotipos Q1,

C ó S, que representan las variantes de  $\alpha_{s2}$ -CN. Respecto a la raza Manchega, se observa que existen diferencias entre los rebaños estudiados, siendo el de Valdepeñas el que presenta la mayor heterogeneidad en la fracción caseínica con individuos representativos de cada tipo caseínico. Es de destacar que los fenotipos que contienen la  $\alpha_{s2}$ -SR representan en el rebaño de Valdepeñas el 1,8% del total de las muestras analizadas, mientras que en el de Arganda del Rey se eleva hasta el 13%.

Los diferentes resultados observados por razas pueden ser atribuidos por una parte al menor número de muestras analizadas de leche de oveja Segureña así como a posibles variaciones raciales debidas a factores genéticos, como ya se ha comprobado para las caseínas de leche de vaca (Storry y col., 1983; McLean y col., 1984) y de oveja (King, 1966; Di Stasio, 1983; Chiofalo y Micari, 1987). Sin embargo Vallejo y col. (1989) han demostrado la proximidad filogenética de las razas Manchega y Segureña.

En los rebaños estudiados, la población de machos reproductores representa aproximadamente el 10% de la explotación, por lo que es posible que en ciertos grupos sea más abundante un determinado carácter. Las diferencias entre rebaños de una misma raza han sido constatadas para las caseínas bovinas por McLean y col. (1984). Conviene destacar que la inseminación artificial que ya se está aplicando de forma habitual en ganado vacuno provoca una reducción de estas variaciones genéticas. En el futuro es probable que se apliquen también este tipo de técnicas de reproducción en ganado ovino, pudiendo ocurrir una disminución de la heterogeneidad en estas proteínas lácteas.

Tabla 4.4. Distribución de los fenotipos de caseínas (observados mediante PAGE a pH alcalino) en leche de oveja de las razas Manchega y Segureña.

RAZA	REBAÑO	Nº DE MUESTRAS	FENOTIPOS DE CASEÍNAS																					
			as-CN 3 bandas				as-CN 4 bandas				as-CN 5 bandas				as-CN 6 bandas									
			T1		T2		T3		Total (%)		Q1		Q2		Total (%)		C		Total (%)		S		Total (%)	
			N	%	N	%	N	%			N	%	N	%			N	%			N	%		
Segureña		50	39	78,0	9	18,0	--	--	96,0	--	--	2	4,0	4,0	--	--	0,0	--	--	--	--	--		
Manchega	I	113	52	46,0	38	33,6	8	7,1	86,7	2	1,8	11	9,7	11,6	1	0,9	0,9	1	0,9	0,9	--	--		
	II	69	21	30,4	25	36,2	7	10,2	76,8	--	--	7	10,2	10,2	9	13,0	13,0	--	--	--	--	--		
	I + II	182	73	40,1	63	34,6	15	8,3	83,0	2	1,1	18	9,9	11,0	10	5,5	5,5	1	0,5	0,5	--	--		

N: Número de muestras

Rebaño I: procedente de Valdepeñas (Ciudad Real)  
 Rebaño II: procedente de Arganda del Rey (Madrid)

#### 4.1.2. FRACCIÓN SEROPROTEICA DE LA LECHE DE OVEJA

##### 4.1.2.1. APLICACIÓN DE TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS MONODIMENSIONALES

Para el estudio de la fracción seroproteica de leche de oveja se han aplicado las siguientes técnicas electroforéticas monodimensionales:

- Electroforesis en gel de poliacrilamida a pH alcalino (PAGE)
- Isoelectroenfoque en geles finos (IEF ó PAGIF)
- Isoelectroenfoque en geles ultrafinos (UTLIEF)
- Isoelectroenfoque en equipo automatizado

En la figura 4.26 se muestran los electroforegramas obtenidos mediante PAGE a pH 8,6 a partir de 9 muestras de seroproteínas de leche de oveja representativas de los distintos fenotipos de  $\beta$ -Lg junto a las correspondientes  $\beta$ -Lg aisladas mediante precipitación con ácido tricloroacético (ATC). El electroforegrama es el característico de la fracción seroproteica de leche de oveja presentando en orden de movilidad creciente las bandas correspondientes a: seroalbúmina (SA),  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -La) y, por último, la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) que se resuelve como la fracción más rápida del diagrama electroforético. En algunas muestras de seroproteínas se observó una zona de baja resolución entre la SA y la  $\alpha$ -La. Muestras conteniendo la  $\beta$ -Lg B (calles 2, 3 y 4),  $\beta$ -Lg A (calles 6, 7 y 8) y  $\beta$ -Lg AB (calles 10, 11 y 12) se encuentran representadas a la derecha de las correspondientes variantes de  $\beta$ -Lg aisladas (calles 1, 5 y 9). Se observa que la  $\beta$ -Lg B es sensiblemente más lenta que la A, presentándose ambas muy próximas en estas condiciones analíticas, por lo que esta técnica es inadecuada para la separación de las dos variantes de lactoglobulinas ovinas, lo cual está de acuerdo con los resultados obtenidos por Storry y col. (1983).



Figura 4.26. PAGE a pH alcalino de 9 muestras de seroproteínas de leche de oveja.  
 1, 5 y 10:  $\beta$ -Lg B, A y AB, respectivamente, aisladas por precipitación con ATC.  
 2, 3 y 4:  $\beta$ -Lg B. 6, 7 y 8:  $\beta$ -Lg A. 10, 11 y 12:  $\beta$ -Lg AB

De los datos disponibles en la bibliografía se deduce que el pH de carrera es fundamental en la EF en medio alcalino ya que dependiendo de este parámetro la presentación del diagrama electroforético de las seroproteínas ovinas es diverso. Bell y McKenzie (1967) demostraron que mediante EF a pH 7,6 el electroforegrama característico de la fracción seroproteica se define en tres zonas correspondiendo la más rápida a la SA, la intermedia a la  $\alpha$ -La y la más lenta a la  $\beta$ -Lg, resolviendo además las variantes A y B de lactoglobulina ovina. Chiofalo y Micari (1987) determinaron que mediante electroforesis a pH 8,6 es posible resolver las variantes de  $\alpha$ -La, y la electroforesis a pH 7,0 es adecuada para resolver las variantes de  $\beta$ -Lg. Thomas y col. (1989) lograron separar las dos variantes de  $\beta$ -Lg ovina mediante EF a pH 9.

En la figura 4.27 se presentan los isoelectroforegramas de 14 muestras de seroproteínas de leche de oveja analizadas mediante isoelectroenfoque en gel fino de gradiente de pH 3,5-9,5. El isoelectroforegrama es el característico de las seroproteínas ovinas presentando en orden de pI creciente: SA,  $\alpha$ -La y  $\beta$ -Lg. La  $\beta$ -Lg se resuelve en una zona del gel de pH comprendido entre 5,5 y 6,5 siendo la  $\beta$ -Lg B de punto isoeléctrico superior (6,20) que la A (5,87). La  $\beta$ -Lg B tiene un residuo más de His y uno menos de Tyr que la variante A (Bell y McKenzie, 1964); esta sustitución le confiere una mayor carga positiva a la  $\beta$ -Lg B que da lugar a una diferencia apreciable en el punto isoeléctrico entre las dos variantes. Para la fenotipización se escogieron los alelos que presentan similar intensidad después de la tinción, como señala Erhardt (1989) descartando las posibles dudas que pueden presentar las muestras como las de la calle 1, 10 y 11 (figura 4.27).

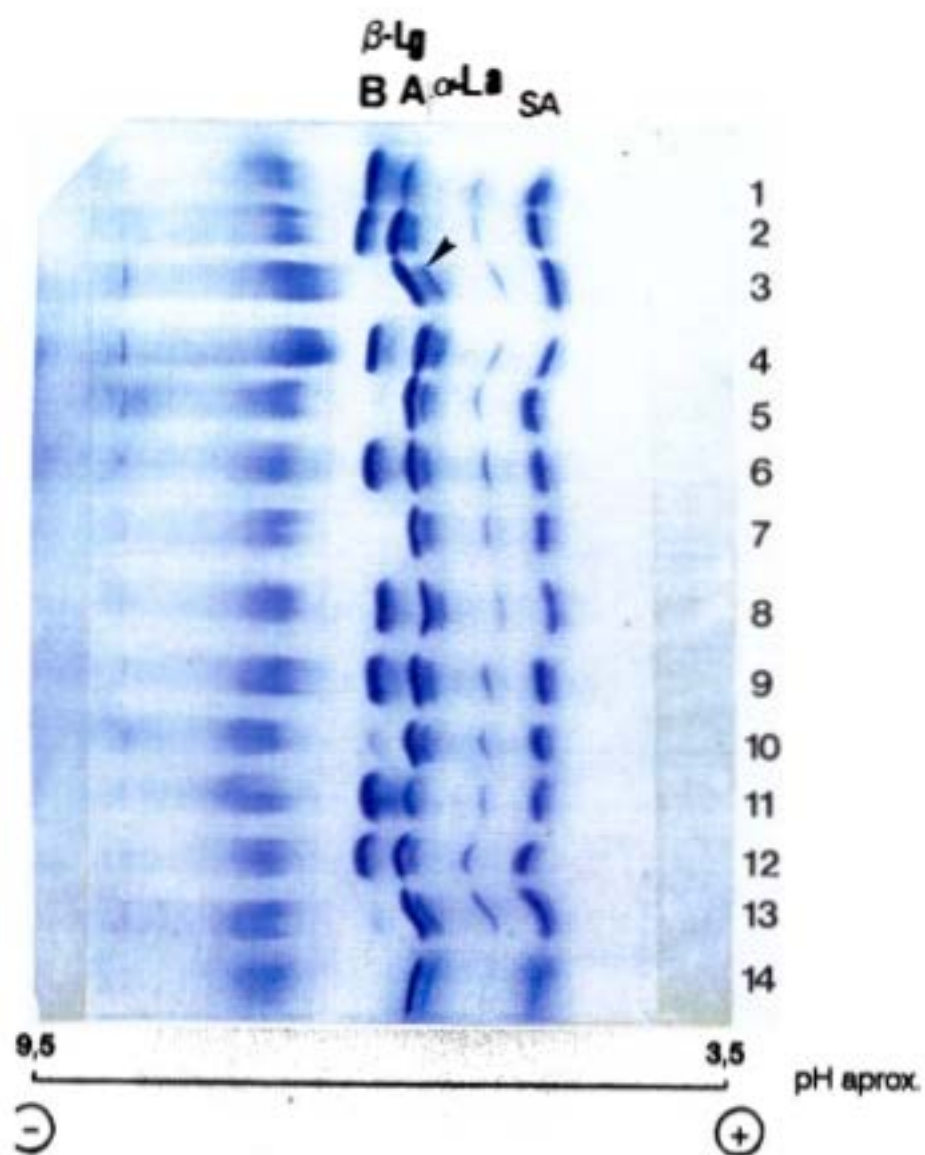


Figura 4.27. IEF de 14 muestras de seroproteínas de leche de oveja. Gradiente de pH en el gel= 3,5-9,5.  
 1 y 11:  $\beta$ -Lg B. 2, 4, 6, 8, 9 y 12:  $\beta$ -Lg AB. 3, 5, 7, 10, 13 y 14:  $\beta$ -Lg A.

En la mayoría de las muestras de seroproteínas portadoras del alelo  $\beta$ -Lg<sup>A</sup> se observó una banda muy próxima a la  $\beta$ -Lg A (flecha en la figura 4.27). Su pI parece ser muy similar al que Erhardt (1989) describe para la variante C de  $\beta$ -Lg ovina; sin embargo no se podría asignar como tal variante dado que la intensidad relativa con que se presenta es siempre menor que la de las variantes A y B y, además la existencia de muestras tipo ABC (calles 2, 4, 6, 8, 9 y 12, fig. 4.27) portadoras de tres alelos para el carácter  $\beta$ -Lg sería contradictoria a la teoría de la herencia genética de las proteínas lácteas siguiendo las leyes de Mendel. Dada la localización de esta banda en el gel de electroenfoque (pI~ 5,54), muy próxima a la  $\beta$ -Lg A y que además se comporta como una  $\beta$ -Lg tras el aislamiento por el método de Fox, López-Gálvez y col. (1991) la han denominado banda satélite de la  $\beta$ -Lg ó  $\beta$ -Lg satélite ( $\beta$ -Lg sat). Mediante cromatoenfoque Fernández-Esplá y col. (1993) han logrado separar la  $\beta$ -Lg satélite sugiriendo que la  $\beta$ -Lg A ovina consta de 2 componentes. El origen de esta proteína es aún incierto y serán necesarios análisis posteriores para determinar la secuencia de aminoácidos de la  $\beta$ -Lg sat. Un caso similar pudiera ser el de la  $\beta$ -Lg Dr descrita en leche de vaca (Bell y col., 1970) cuya composición aminoacídica es idéntica a la  $\beta$ -Lg A bovina diferenciándose en que contiene grupos carbohidrato unidos a la cadena polipeptídica.

En la figura 4.28 se muestran los densitogramas correspondientes a 3 muestras de seroproteínas con distintos fenotipos de  $\beta$ -Lg analizadas mediante isoelectroenfoque en geles finos.

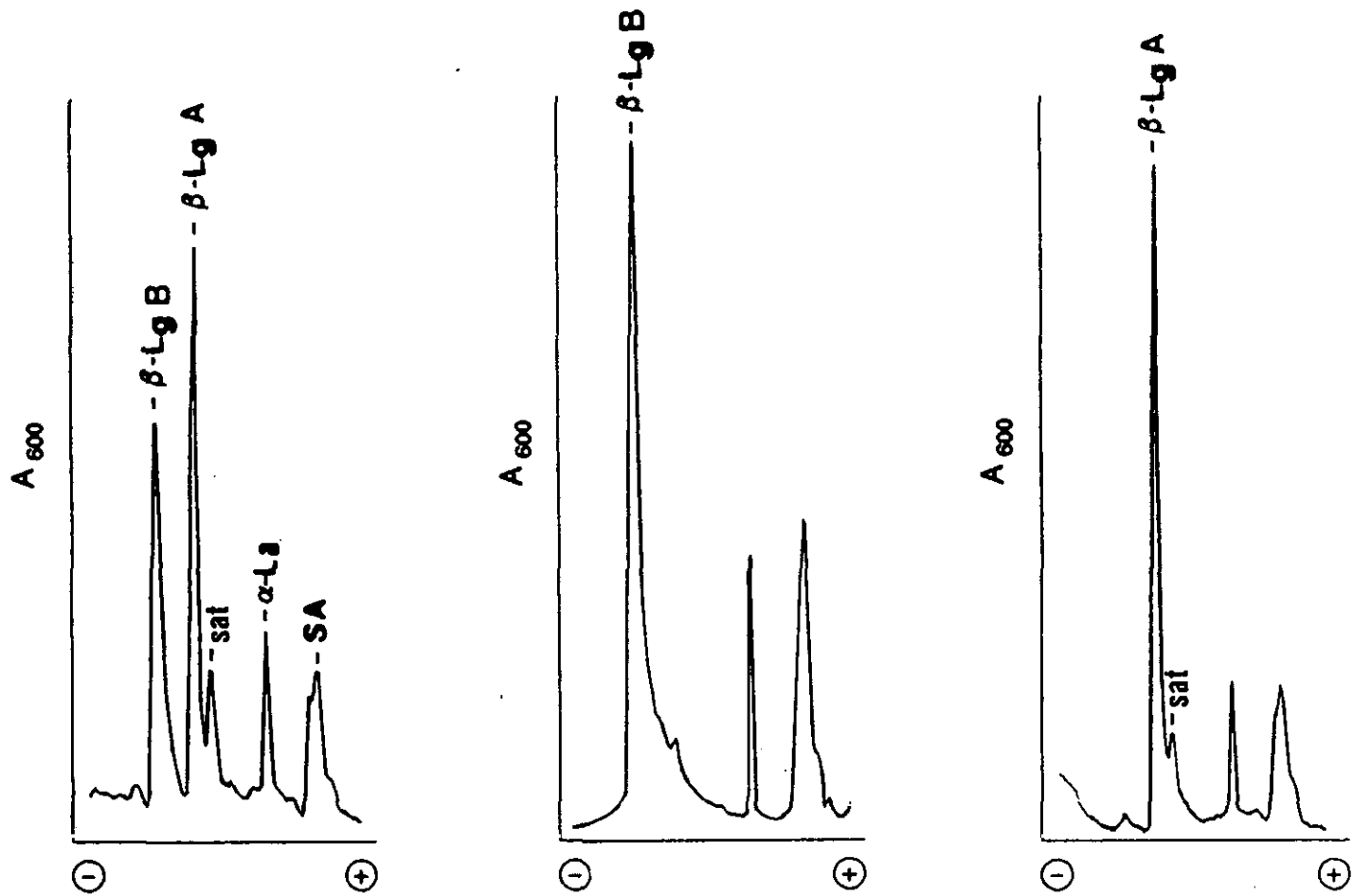


Figura 4.28. Densitogramas obtenidos a partir de un gel de IEF de 3 muestras de seroproteínas de leche de oveja conteniendo distintos fenotipos de  $\beta$ -Lg: (a)  $\beta$ -Lg AB, (b)  $\beta$ -Lg B y (c)  $\beta$ -Lg A.

Al reducir el espesor de los geles de IEF y estrechar el gradiente de pH se consigue una mayor resolución y separación de las bandas proteicas (Seibert y col., 1985). Esto se ha ensayado en geles ultrafinos (UTLIEF) de gradiente de pH 2,5-7 (figura 4.29). En este tipo de geles las bandas que definen las principales seroproteínas lácteas ovinas son de menor a mayor pI:  $\alpha$ -La,  $\beta$ -Lg sat,  $\beta$ -Lg A,  $\beta$ -Lg B y SA. La  $\beta$ -Lg A se resuelve como 2 bandas bien definidas, tanto en individuos hetero- (calle 1) como homocigotos (calle 8). La  $\beta$ -Lg B se resuelve como 3 bandas en los individuos heterocigotos (calle 1) y dos en los homocigotos (calle 9); las bandas correspondientes a la  $\beta$ -Lg B son siempre algo más débiles que las correspondientes a la variante A. La caracterización mediante UTLIEF de las distintas  $\beta$ -Lg aisladas por el método de Fox ( $\beta$ -Lg AB, calle 4;  $\beta$ -Lg A, calle 5;  $\beta$ -Lg B, calle 6) da lugar siempre a una banda principal de mayor intensidad para cada alelo acompañadas de otras bandas minoritarias.

Comparando con geles finos de isoelectroenfoque, el mayor número de bandas observado en la fracción  $\beta$ -Lg en los geles ultrafinos, así como el cambio posicional de la SA se debe al empleo de urea en este tipo de placas ya que se ha demostrado que la urea como agente disociante da lugar a una serie de isómeros configuracionales que ocasionan cambios en el pI de las proteínas (Morr, 1967). En el laboratorio se ensayó el isoelectroenfoque con geles ultrafinos de igual gradiente de pH preparados con y sin adición de urea a la solución madre de acrilamida-bisacrilamida; en aquéllos que no contenían urea en su composición se observó un electroforegrama similar al que se obtiene en los geles finos, si bien, debido al menor espesor de las placas ultrafinas cabe destacar un aumento en la resolución de las bandas que definen cada fracción seroproteica. Sin embargo, la adición de urea ha permitido detectar un cierto grado de microheterogeneidad individual de las  $\beta$ -Lg ovinas.

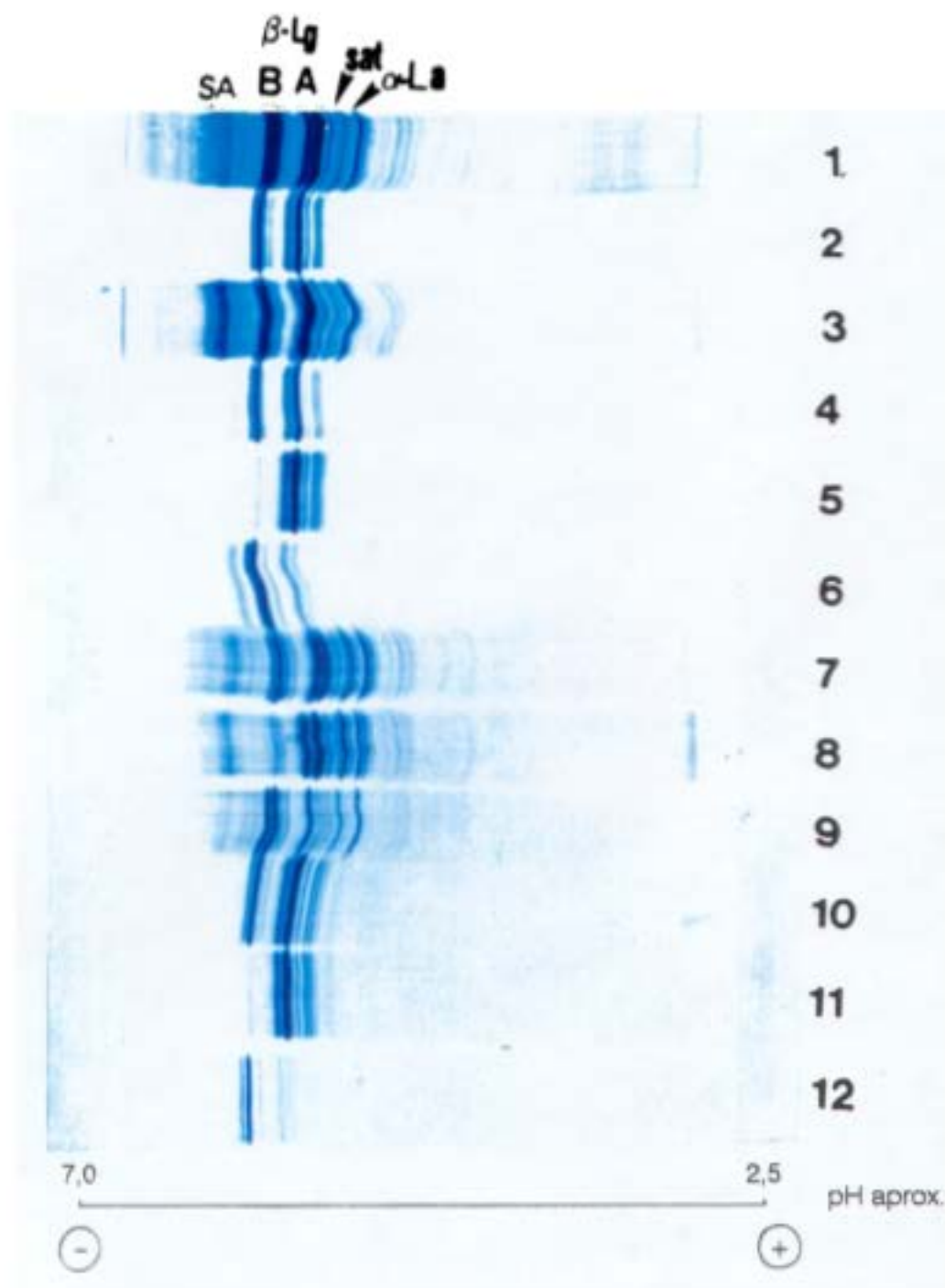


Figura 4.29. UTLIEF de 5 muestras de seroproteínas de leche de oveja y 7 muestras de  $\beta$ -Lg aisladas mediante precipitación con ATC. Gradiente de pH en el gel= 2,5-7.

1, 3 y 7: seroproteínas que contienen la variante AB de la  $\beta$ -Lg; 2, 4 y 10:  $\beta$ -Lg AB aislada.

8: seroproteína que contiene la variante A de la  $\beta$ -Lg; 5 y 11:  $\beta$ -Lg A aislada.

9: seroproteína que contiene la variante B de la  $\beta$ -Lg; 6 y 12:  $\beta$ -Lg B aislada.

Por otra parte, se ha utilizado el equipo automatizado de electroforesis para isoelectroenfoque de las proteínas lácteas ovinas. De los ensayos realizados, los microgeles comerciales disponibles para isoelectroenfoque con gradiente de pH 4-6,5 presentaron las características idóneas para la detección de variantes de  $\beta$ -Lg en leche de oveja.

#### **4.1.2.2. APLICACIÓN DE TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS BIDIMENSIONALES. INMUNOTRANSFERENCIA**

Se han aplicado dos versiones sobre la electroforesis bidimensional, combinando las siguientes técnicas electroforéticas:

- Electroforesis a pH alcalino seguida de isoelectroenfoque en geles ultrafinos (1ª dim. PAGE - 2ª dim. IEF en geles ultrafinos).

- Isoelectroenfoque en geles ultrafinos seguida de electroforesis en presencia de agentes desnaturizantes (1ª dim. IEF en geles ultrafinos - 2ª dim. disc-PAGE SDS).

La electroforesis bidimensional (1ª dim. PAGE seguida de 2ª dim. IEF en geles ultrafinos) ha permitido identificar el origen de cada banda. En la figura 4.30 se presenta el perfil bidimensional de tres muestras de seroproteínas de leche de oveja representantes de los fenotipos B (calle 1), A (calle 2) y AB (calle 3) de  $\beta$ -lactoglobulina. Mediante esta técnica bidimensional, las  $\beta$ -Lactoglobulinas se resuelven de distinto modo en muestras homo- o heterocigotas para dicha proteína. Así en muestras que contienen la  $\beta$ -Lg AB (calle 3), se resuelven 6 bandas correspondiendo 2 (de aproximadamente igual intensidad) a la variante A y 3 bandas (siendo una de ellas más intensa) a la variante B y, por último, la banda satélite de la  $\beta$ -Lg que sería la más rápida en el diagrama de primera dimensión.

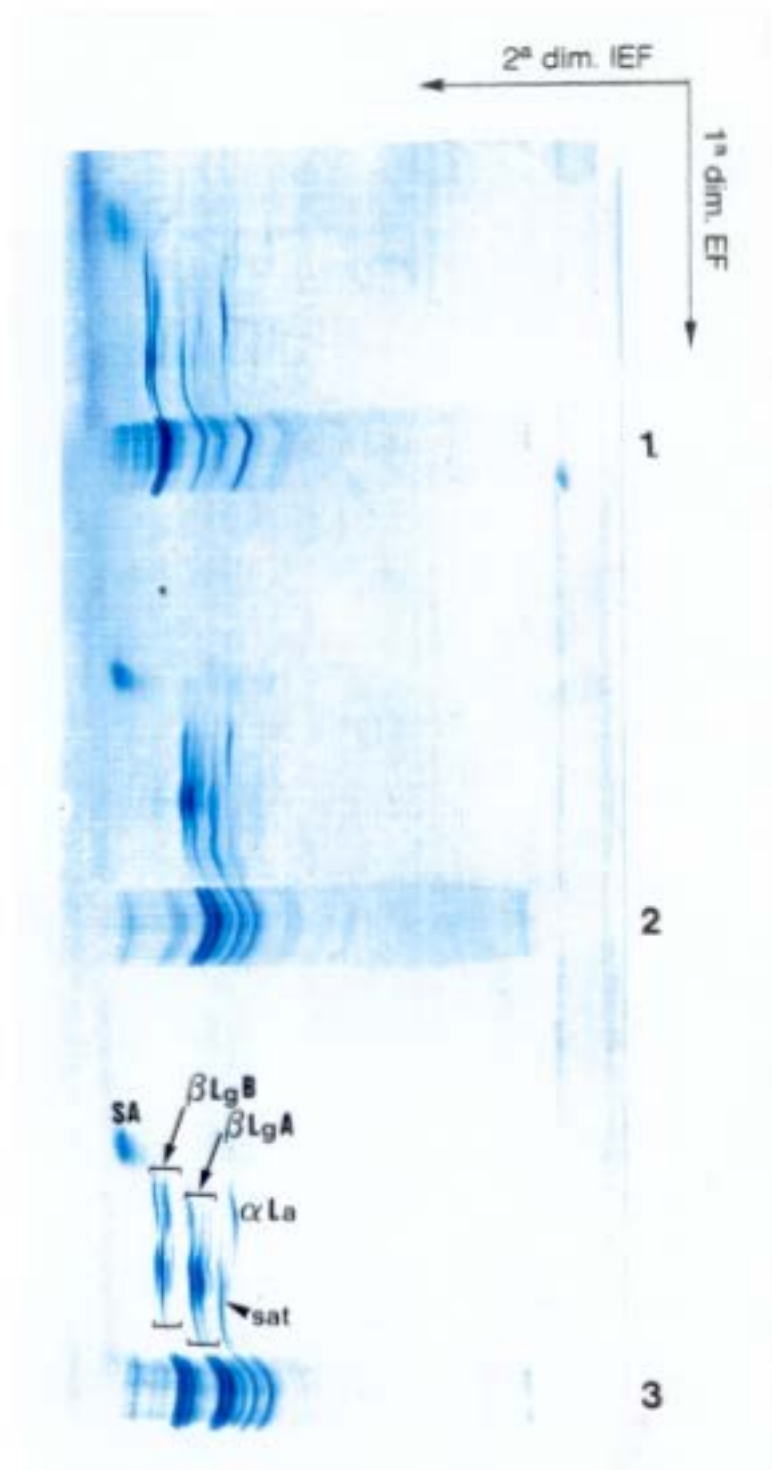


Figura 4.30. EF-2D (1ª dim. EF a pH alcalino - 2ª dim. UTLIEF) de 3 muestras de seroproteínas de leche de oveja conteniendo distintos fenotipos de  $\beta$ -Lg.  
 1:  $\beta$ -Lg B. 2:  $\beta$ -Lg A. 3:  $\beta$ -Lg AB.

Comparando con el isoelectroforegrama monodimensional, las 3 bandas que resultan en la zona de la  $\beta$ -Lg B corresponden a una banda central (la de mayor intensidad en el diagrama bidimensional) y dos laterales; estas últimas resultan respectivamente de la suma de intensidades de 2 bandas situadas en distintos niveles de movilidad electroforética, siendo aquéllas más lentas las que se obtienen en la zona de resolución difusa del diagrama electroforético monodimensional (fig. 4.26). Las dos bandas correspondientes a la  $\beta$ -Lg A que se observan en el perfil isoelectroforético se corresponden con una banda más cercana al ánodo y otra banda de mayor migración catódica; esta última se obtiene de la suma de intensidades de 2 bandas, una de ellas de movilidad electroforética relativa similar a la  $\alpha$ -La. En muestras que se presentan en estado de homocigosis para la  $\beta$ -Lg, ya sean AA (calle 2) ó BB (calle 1) sólo se resuelven dos bandas para cada variante en la zona de las  $\beta$ -lactoglobulinas.

La  $\alpha$ -La mediante la separación bidimensional, queda dividida en 1 banda mayoritaria y otras minoritarias no muy bien definidas que pueden quedar solapadas en la técnica isoelectroforética por alguna banda  $\beta$ -Lg A. Aunque estas bandas se resuelven mediante isoelectroenfoco en geles ultrafinos de modo semejante a las que Erhardt y col. (1989) describen para la  $\alpha$ -La, no se podrían considerar como variantes genéticas debido a la distinta intensidad con que se presentan en el diagrama bidimensional; por otra parte, mediante electroforesis a pH 8,6 no se observó polimorfismo para la citada proteína.

La SA queda resuelta en 2 bandas principales y otras colaterales de menor intensidad que revelan ligeras diferencias en sus movilidades electroforéticas.

Las técnicas más resolutivas para determinar el origen de las bandas son aquellas que combinan la electroforesis bidimensional con la inmunotransferencia. Mediante incubación con suero antiseroproteínas lácteas ovinas, resulta una reacción evidente

de todas las fracciones transferidas a la membrana (figura 4.31.a), incluso algunas no detectables en la placa de partida con el método de tinción empleado, y que aparecen en la zona de pH más alcalino pudiendo corresponder a parte de la fracción proteosa-peptona dada la similitud con los diagramas monodimensionales obtenidos mediante PAGE a pH alcalino por Mati y col. (1991).

La incubación con inmunosuero anti $\beta$ -Lg (figura 4.31.b) ha reaccionado con las bandas que definen ambas variantes de  $\beta$ -Lg así como con la denominada banda satélite, e incluso de otra banda cuyo origen electroforético sería el mismo que la anterior. El empleo de inmunosuero anti $\beta$ -Lg de leche de vaca para la detección de  $\beta$ -Lg de leche de oveja está garantizado ya que los determinantes antigénicos de proteínas homólogas de diferentes especies de rumiantes son idénticos (Johke y col., 1964).

La incubación con suero anti $\alpha$ -La (figura 4.31.c) muestra una reacción con 4 bandas: una banda mayoritaria en el centro; otra de menor intensidad de migración más catódica de difícil apreciación en el diagrama bidimensional, pero que parece estar muy próxima e incluso llegar a solaparse con alguna banda de la  $\beta$ -Lg A; y, otras dos bandas de focalización a pH más ácido que la banda principal y aún de mucha menor intensidad y que se corresponderían con aquella que se obtiene en el perfil bidimensional que se muestra en la figura 4.32 en la zona de peso molecular de la  $\alpha$ -La. Debido a la similitud de la  $\alpha$ -La de distintas especies (Mao y Bremel, 1990), es posible el empleo de inmunosuero anti $\alpha$ -La humana para la detección de  $\alpha$ -La ovina, como se ha realizado en esta experiencia.

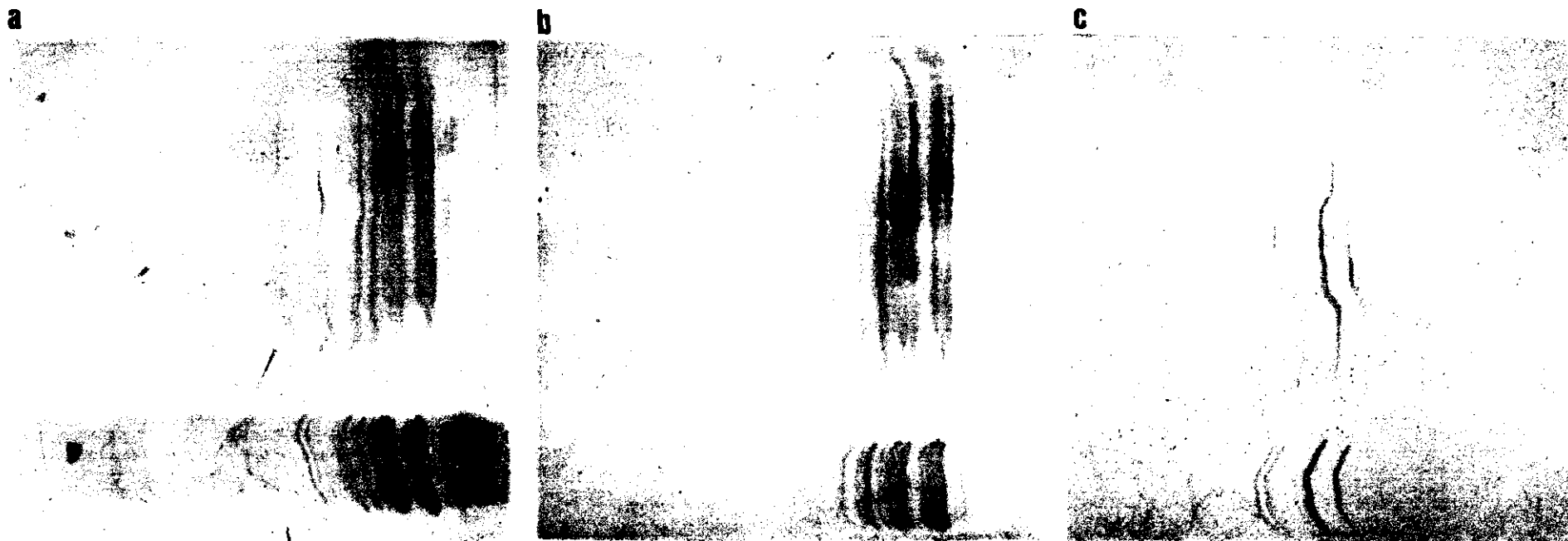


Figura 4.31. Inmunotransferencia de las seroproteínas ovinas separadas mediante EF-2D (ver figura 4.30) e incubadas con inmunosuero (a) antiseroproteínas lácteas (b) anti $\beta$ -Lg y (c) anti  $\alpha$ -La.

Con el fin de estudiar más profundamente el origen de cada una de las bandas de isoelectroenfoque, se realizó la electroforesis bidimensional, con IEF como primera dimensión seguida de disc-PAGE SDS en segunda dimensión. En la figura 4.32 se presenta el diagrama de migración en un gel bidimensional de las citadas características. A continuación se exponen las características de cada seroproteína que se presenta en el gel de PAGE SDS, de mayor a menor  $M_r$ :

- La SA se presenta como la fracción más pesada ( $M_r$  aprox. 67000).

- Ambas variantes de  $\beta$ -Lg se obtienen en el mismo nivel de peso molecular ( $M_r$  aprox. 18000).  $M_r$  similares se han descrito para las  $\beta$ -Lg de leche de vaca (Bell y McKenzie, 1964) y de oveja (Bell y McKenzie, 1967) confirmando la hipótesis de que estas proteínas están formadas por dos cadenas de  $P_m \sim 18000 \pm 500$  daltons. La denominada banda satélite de la  $\beta$ -Lg (ver flecha en la figura) parece ser algo más pesada ( $M_r$  aprox. 20000); una  $M_r$  similar ha sido detallada para la  $\beta$ -Lg Dr bovina (Bell y col., 1970).

- La  $\alpha$ -La es la proteína más ligera del patrón de proteína ( $M_r$  aprox. 14400), obteniéndose una banda mayoritaria y otra banda de menor intensidad que se localizaría en una zona más cercana al ánodo en el gel de focalización.

- Se observan además otras bandas no identificadas pudiendo corresponder las de mayor  $M_r$  a inmunoglobulinas ( $P_m$  superior a 153000 daltons: Eigel y col., 1984) y el resto a otras proteínas menores del suero. Mediante este tipo de análisis bidimensional Mati y col. (1991) han identificado 3 fracciones de proteosapeptona de  $M_r$  12000, 18000 y 20000, respectivamente.

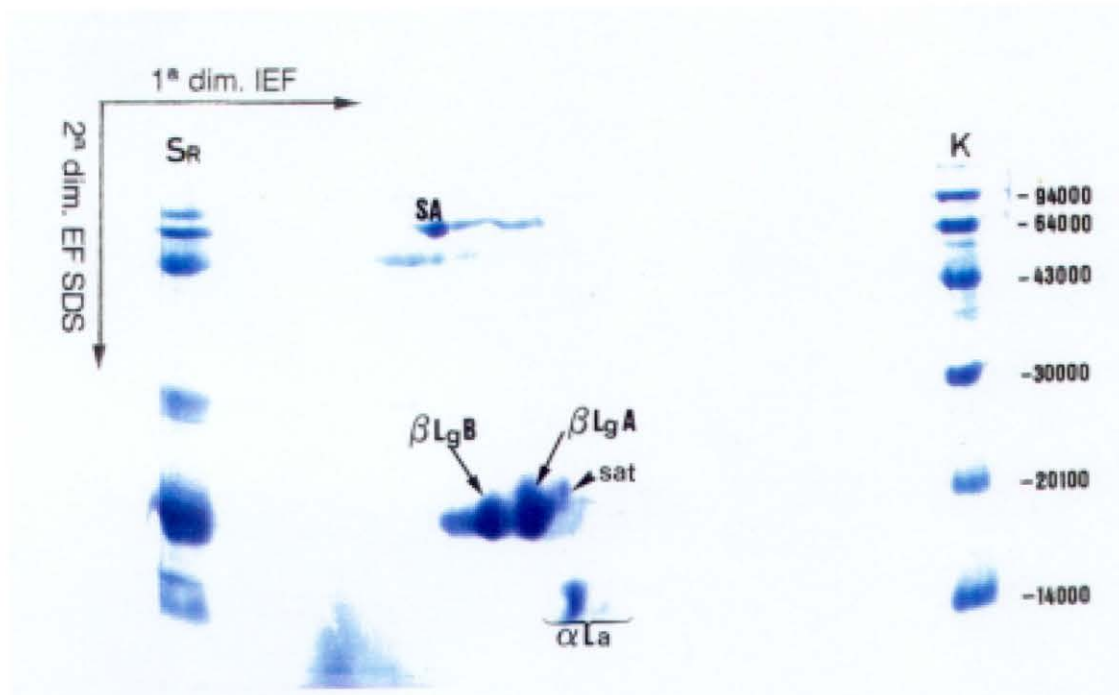


Figura 4.32. EF-2D (1ª dim. UTLIEF - 2ª dim. EF SDS) de una muestra de seroproteínas de leche de oveja con el fenotipo AB de β-Lg. S<sub>R</sub>: seroproteína ovina de referencia. K: Kit de calibración de pesos moleculares.

### ***Consideraciones sobre las técnicas electroforéticas aplicadas al análisis de seroproteínas lácteas ovinas***

La electroforesis en gel de poliacrilamida a pH 8,6 es inadecuada para la separación de las variantes de  $\beta$ -Lg.

De las técnicas ensayadas, el IEF (gradiente de pH 3,5-9,5) en placas comerciales es la más rápida, sencilla, de resultados reproducibles y, junto con el sistema rápido de obtención de seroproteínas permite una clasificación rápida de las muestras de leche de oveja en base al fenotipo de  $\beta$ -Lg. Otra ventaja adicional del uso de estos geles sería la menor toxicidad ya que se evita el contacto con soluciones neurotóxicas de acrilamida. Un inconveniente sería el precio de la placa, que encarece este tipo de análisis.

El isoelectroenfoque en geles ultrafinos presenta óptimos resultados en cuanto a resolución de bandas; en el caso de adición de urea a este tipo de geles, para la interpretación de los resultados, se debe tener en cuenta el efecto disociante de este agente.

Presenta grandes posibilidades el isoelectroenfoque en equipo automatizado con geles comerciales de pH 4-6,5, evitando el gasto adicional que supone la compra de los microgeles si se logran preparar placas de características semejantes en el laboratorio.

Las técnicas electroforéticas más resolutivas han sido las bidimensionales ya que mediante la combinación de dos versiones electroforéticas ha sido posible la separación de las seroproteínas lácteas ovinas en base a distintas propiedades físico-químicas de las mismas (carga neta-punto isoeléctrico; punto isoeléctrico-masa relativa).

La inmunotransferencia acoplada a geles bidimensionales ha permitido determinar el origen de bandas no identificables mediante otros métodos.

#### 4.1.2.3. DISTRIBUCIÓN DE FENOTIPOS

De los resultados obtenidos se deduce que en las muestras de seroproteínas analizadas de las razas Manchega y Segureña existe polimorfismo genético en la fracción  $\beta$ -Lg. No se ha encontrado polimorfismo en la fracción  $\alpha$ -La. Chiofalo y Micari (1987) describen las variantes A y B para esta fracción seroproteica en leche de oveja de las razas Comisana, Barbaresca-Siciliana y Siciliana-Pinzirita siendo la frecuencia génica de la  $\alpha$ -La B muy baja (0,012, 0,005 y 0,004 respectivamente en las razas estudiadas). Anteriormente, Stambekov y col. (1974) aportaron frecuencias algo más altas para la  $\alpha$ -La B (0,225) en ovejas Latvian Darkheaded.

En la tabla 4.5 se muestra la distribución de fenotipos de  $\beta$ -Lg así como las frecuencias génicas observadas para cada alelo de  $\beta$ -Lg en las seroproteínas de leche de oveja Manchega y Segureña.

En las seroproteínas lácteas analizadas de las distintas razas y rebaños, para la  $\beta$ -Lg el fenotipo más abundante es el AA y el alelo más frecuente es el A, siendo la frecuencia génica semejante en los tres grupos étnicos estudiados. Frecuencias génicas similares fueron obtenidas por Amigo (1989) en  $\beta$ -Lg de leche de oveja Manchega. Dada la función biológica de la  $\beta$ -Lg (Conti y col., 1986) es lógico que no existan diferencias ni entre rebaños de la misma raza ni aún entre razas próximas filogenéticamente como es el caso de la Manchega y Segureña (Vallejo y col., 1989). Chiofalo y col. (1986) han detectado diferencias en la distribución de fenotipos de  $\beta$ -Lg en 5 rebaños de raza Comisana, pero el número de muestras estudiado de cada grupo fue muy reducido.

En la mayoría de las razas ovinas hasta ahora estudiadas se ha descrito como más frecuente el alelo A de  $\beta$ -Lg: Blackface, Cheviot, Clun Forest, Dorset Horn, Finish Landrace, Merino, Soay, Suffolk y Welsh (King, 1969); Latvian Darkheaded (Stambekov

y col. (1974); Stavropol Merino, Mutton Merino, Tsigaya e Improved Wallach (Mácha y Novackova, 1974); Massese (Russo y col., 1981); Barbaresca-Siciliana (Chiofalo y Micari, 1987); Hyfer y Border-Leicester x Merino (Thomas y col., 1989); Merinoland, Black Faced, East Friesian, Pleven, Tsigaja y Black Razka (Erhardt, 1989). En otras razas se han descrito los alelos A y B con idéntica frecuencia: Wiltshire Horn (King, 1969); Comisana (Chiofalo y col., 1986); Siciliana-Pinzirita (Chiofalo y Micari, 1987). En muy pocas razas ovinas ha resultado más frecuente el alelo B: Romanov (Mácha y Novackova, 1974); Tajik (Aliev y Koloteva, 1975) y Rhön Sheep (Erhardt, 1989).

No se ha encontrado en este estudio la variante C de  $\beta$ -Lg ovina descrita por vez primera en leche de ovejas de raza Tajik (Aliev y Koloteva, 1975) y más recientemente en la raza Merinoland y en la F<sub>1</sub> Hungarian Merino x Pleven (Erhardt, 1989).

**Tabla 4.5. Distribución de fenotipos de  $\beta$ -Lg y frecuencias génicas observadas para los alelos de  $\beta$ -Lg en leche de oveja de las razas Manchega y Segureña.**

Raza	Rebaño	Nº de muestras	Fenotipo de $\beta$ -Lg						Frecuencia génica	
			AA		BB		AB		A	B
			N	%	N	%	N	%		
Segureña		50	25	50,00	8	16,00	17	34,00	0,670	0,330
Manchega	I	113	53	46,90	11	9,73	49	43,36	0,686	0,314
	II	69	34	49,27	5	7,25	30	43,48	0,710	0,290
	I + II	182	87	47,80	16	8,79	79	43,40	0,695	0,305

Rebaño I: procedente de Valdepeñas (Ciudad Real)

Rebaño II: procedente de Arganda del Rey (Madrid)

#### 4.1.3. ESTUDIO CONJUNTO DE LAS CASEÍNAS Y SEROPROTEÍNAS DE LECHE DE OVEJA MEDIANTE ISOELECTROENFOQUE

Se ha ensayado un método para la fenotipización conjunta de caseínas y seroproteínas de leche de oveja. Dada la alta resolución del isoelectroenfoque y las grandes ventajas del equipo automatizado de electroforesis se aplicó el método propuesto por Bovenhuis y Verstege (1989) para fenotipización de las proteínas de leche de vaca.

El empleo de placas comerciales de gradiente de pH 4-6,5 hizo posible una óptima separación de las  $\beta$ -Lg ovinas; sin embargo no se llegó a evidenciar la  $\alpha$ -La. Para las caseínas, el gradiente de pH 4-6,5 puede ser el óptimo, como ya se describió en el apartado correspondiente, sin embargo es importante la mezcla de anfólitos a emplear para conseguir dicho gradiente. En este caso solo se evidenció la fracción  $\beta$ -CN quedando las otras caseínas muy tenues en el gel, o bien solapadas con alguna seroproteína ( $\beta$ -Lg satélite). Eigel y col. (1984) y Vegarud y col. (1989) han demostrado que las  $\beta$ -CN y  $\beta$ -Lg bovinas presentan pI's muy próximos; Bech y Munk (1988) comprobaron mediante IEF en gel de agarosa que estas dos proteínas se solapan. Sin embargo Seibert y col. (1985) han conseguido excelentes separaciones de las caseínas y seroproteínas bovinas simultáneamente mediante IEF en geles ultrafinos (0,1 mm).

Será necesario poner a punto este método de isoelectroenfoque en equipo automatizado para la fenotipización mediante un solo análisis de las proteínas de leche de oveja. Para ello habrá que ensayar la incubación de placas con anfólitos de distintos gradientes de pH, aplicación de distintas concentraciones de muestra, etc.

Esta técnica se presenta muy prometedora para el "screening" de gran número de muestras ya que la rapidez y la resolución que se pueden conseguir son difícilmente superables. Por otra parte es de destacar la sencillez de preparación de la muestra ya que

sólo consiste en una dilución de la leche entera. A estas ventajas habrá que añadir los cortos tiempos de separación y, además, la economía del experimento si las placas se preparan en el laboratorio. En el futuro es posible que estas técnicas o similares sean de aplicación rutinaria en la industria u otro tipo de centros que se dediquen al procesado o control de calidad de la leche.

#### **4.2. APTITUD QUESERA DE LA LECHE DE OVEJA**

Para el estudio de la aptitud quesera de la leche de oveja se seleccionaron ovejas de las razas Manchega y Segureña productoras de leche conteniendo los distintos fenotipos de caseínas y seroproteínas identificados en el capítulo anterior. Las muestras se recogieron en distintos periodos de la lactación. En la tabla 4.6 se exponen los datos del muestreo efectuado para estimación de la aptitud quesera de la leche de oveja.

En estas muestras se realizaron las siguientes determinaciones:

- pH
- Composición química global: contenido en grasa, proteína, lactosa, extracto seco total (EST)
- Contenido en calcio
- Composición proteica (caseínas y proteínas de suero)
- Características del coágulo
- Rendimiento quesero.

Tabla 4.6. Datos de las muestras de leche de oveja seleccionadas para el estudio de la aptitud quesera.

RAZA	REBAÑO	O	N	DÍAS DE LACTACIÓN*	FENOTIPO $\beta$ -Lg			FENOTIPO CASEÍNA						
					N - AA	N - AB	N - BB	N - T1	N - T2	N - T3	N - Q1	N - Q2	N - C	N - S
Segureña		13	13	41 - 68 62,07	4	5	4	9	3	--	--	1	--	--
Manchega	I	44	124	49 - 143 95,98	72	42	10	49	42	11	6	13	--	3
	II	67	68	19 - 68 53,07	32	33	3	23	21	11	--	7	6	--
Total			205	19 - 143 80,38	108	80	17	81	66	22	6	21	6	3

O: Número de ovejas que proporcionaron las muestras

N: Número de muestras

(\*) Intervalo de días  
Valor medio

Rebaño I: procedente de Valdepeñas (Ciudad Real)  
Rebaño II: procedente de Arganda del Rey (Madrid)

#### 4.2.1. COMPOSICIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA LECHE DE OVEJA

##### 4.2.1.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA GLOBAL Y pH

En la tabla 4.7 se recogen los resultados obtenidos (valores medio, máximo y mínimo y desviación estándar) del análisis de las características de composición físico-química de las muestras de leche de oveja de raza Manchega. El amplio intervalo de variación observado en la composición química de la leche (grasa, proteínas, lactosa, EST y contenido en calcio) es debido principalmente al estado de lactación, ya que se analizaron muestras de leche comprendidas entre los días 19 y 143 de la lactación. Gallego y col. (1983) y Caja (1991) han comprobado que el contenido en grasa y proteínas de la leche de oveja Manchega aumenta a partir de la primera semana de lactación a la vez que disminuye la producción láctea. Además conviene destacar que los análisis se efectuaron sobre muestras individuales lo que da lugar a una mayor variabilidad, que queda solapada al estudiar leches de gran mezcla. El resto de los factores que influyen en la composición láctea (condiciones climáticas, alimentación, raza y explotación del rebaño) se fijaron en límites bastante estrechos por lo que se puede considerar que su efecto no es significativo.

**Tabla 4.7. Características de composición físico-química de las muestras de leche de oveja Manchega**

	N	V. medio	V. mínimo	V. máximo	D. E.
Grasa (%)	160	7,43	2,10	11,69	2,48
Proteínas (%)	160	5,75	3,65	8,60	0,85
Lactosa (%)	93	4,37	1,44	4,97	0,46
EST (%)	159	19,05	11,83	23,97	2,34
Calcio (mg/l)	192	2,15	0,97	3,20	0,31
pH	182	6,69	6,00	7,41	0,19

N: Número de muestras

D.E.: Desviación estándar

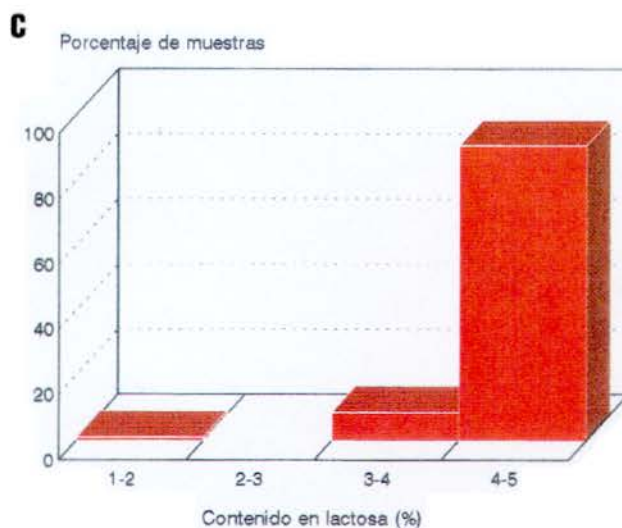
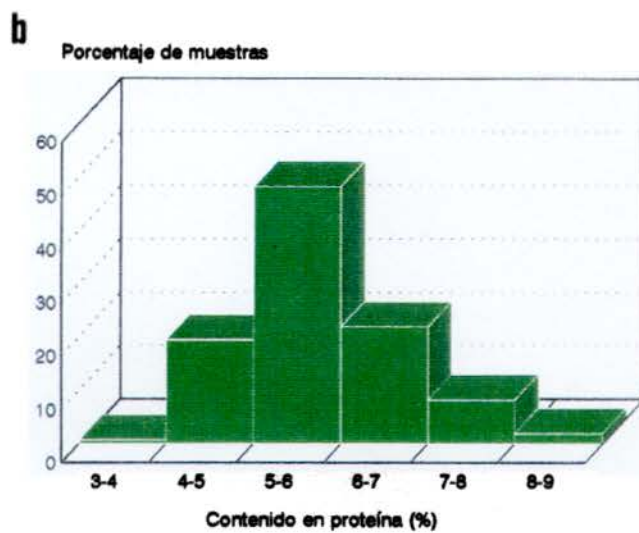
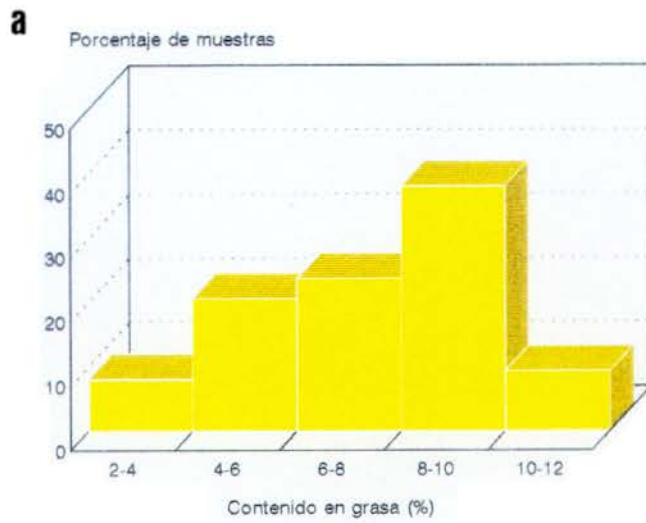
Los valores medios de contenido en grasa, proteínas, lactosa y EST son bastante próximos a los obtenidos por Juárez y col.

(1984) en muestras de leche de gran mezcla de ovejas de raza Manchega. En cambio son algo superiores a los dados por Gallego y col. (1983) en análisis de muestras de leche individuales de ovejas de raza Manchega obtenidas por ordeño mecánico e igualmente más altos a los aportados por Manfredini y col. (1992) en muestras de leche individuales de ovejas de las razas Sarda, Delle Langue y Massese.

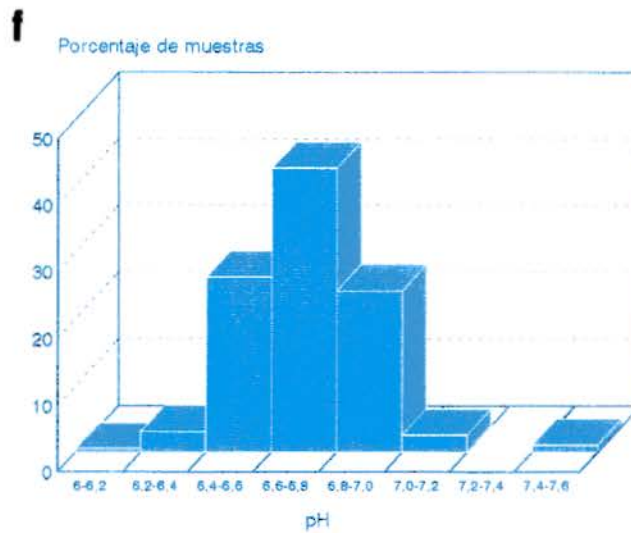
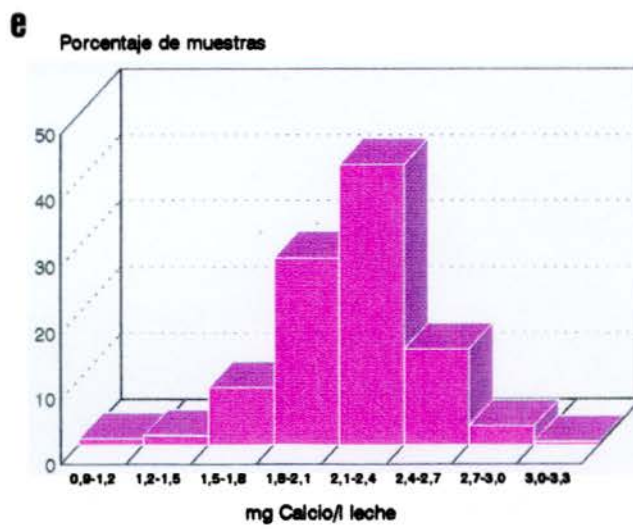
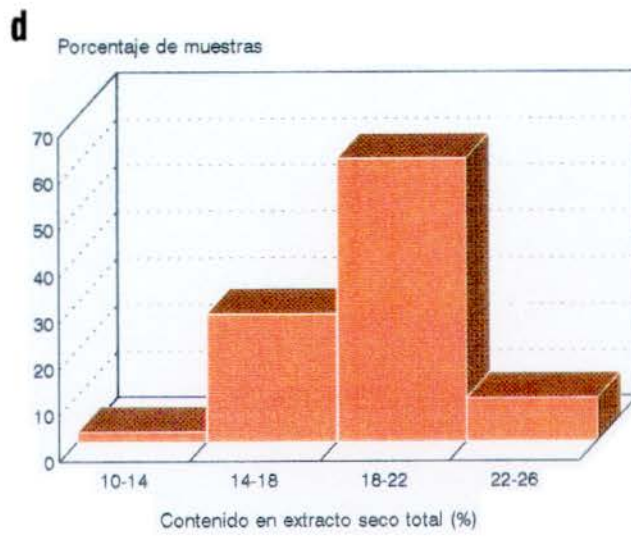
El contenido en calcio es bastante similar al reportado por Mišić y Petrović (1976) para leche de oveja de raza Pramenka en distintos estados de lactación. Sin embargo es algo superior al dado por Juárez y col. (1984) para leche de ovejas manchegas y por Storry y col. (1983) para ovejas de razas Friesland y Suffolk.

Los resultados medios del pH son semejantes a los descritos en la bibliografía tanto para razas extranjeras (resultados recopilados por Anifantakis, 1986) como para la raza Manchega (Juárez y col., 1984). Conviene destacar, en cambio, que los valores mínimo y máximo se alejan de los normales y son indicativos de leches acidificadas (debido fundamentalmente a proliferación de microorganismos) en el caso de aproximación al valor mínimo,  $\text{pH} < 6,4$ , o bien de leches alcalinas (posiblemente procedente de ovejas afectadas de mamitis subclínica: Ledda y Arrizza, 1974) cuando el pH de la leche alcanza valores superiores a 6,8.

En la figura 4.33 se presenta la distribución de muestras para los resultados obtenidos de composición físico-química. Salvo para el contenido en lactosa (quizás debido a que es el componente lácteo que presenta menos variación cuantitativa), las gráficas muestran una distribución normal, con una mayoría de muestras que se concentran en la zona central de los histogramas. Estos resultados confirman que el muestreo se ha realizado con leches que abarcan un amplio intervalo de composición físico-química.



**Figura 4.33. Distribución de las muestras de leche de oveja de raza Manchega analizadas según el contenido en grasa (4.33.a), proteína (4.33.b), lactosa (4.33.c), EST (4.33.d), calcio (4.33.e) y según el pH determinado (4.33.f).**



**Figura 4.33. (Continuación)**

En la leche de oveja Segureña se estudió la composición global de las 50 muestras utilizadas para el análisis de las variantes genéticas. Los valores medios ( $\pm$  desviación típica) en porcentaje para las variables grasa, proteínas, y EST fueron:  $3,54 \pm 0,88$ ,  $4,99 \pm 0,39$  y  $14,41 \pm 1,07$ . Puede observarse la menor riqueza en composición y el estrecho margen de variación frente a las muestras estudiadas de raza Manchega, lo que se justifica considerando que en estas muestras de leche de oveja Segureña el valor medio correspondiente al periodo de lactación fue de 28 días.

#### 4.2.1.2. COMPOSICIÓN PROTEICA

En la tabla 4.8 se recogen los porcentajes relativos (expresados en valores medio, máximo y mínimo y desviación estándar) de las principales fracciones caseínicas (obtenidos mediante PAGE a pH alcalino) y seroproteicas (obtenidos mediante IEF) de las muestras de leche de oveja estudiadas.

**Tabla 4.8. Porcentajes relativos de las principales fracciones caseínicas (estimados mediante PAGE a pH alcalino) y seroproteicas (estimados mediante IEF) de las muestras de leche de oveja.**

	N	V. medio	V. mínimo	V. máximo	D. E.
$\alpha_s$ -CN (%)	104	54,81	29,40	76,90	8,95
$\beta$ -CN + $\kappa$ -CN (%)	104	44,13	23,00	70,30	8,75
$\beta$ -Lg (%)	104	65,87	42,50	84,40	8,06
$\alpha$ -La (%)	104	8,19	2,40	14,60	2,77
SA (%)	104	24,62	7,60	47,10	6,94

N: Número de muestras

D.E.: Desviación estándar

Los resultados obtenidos para las distintas fracciones caseínicas son semejantes a los citados por Carić y Djorjević

(1971) en leche de oveja (sin especificar la raza estudiada) y por Velev (1986) en la raza Stara Zagora; sin embargo, estos autores evalúan por separado la  $\kappa$ - y la  $\beta$ -CN. Las publicaciones científicas de los últimos años sobre aplicación de métodos electroforéticos al estudio de las caseínas ovinas han cambiado la concepción sobre la migración electroforética de la  $\kappa$ -CN en gel de poliacrilamida a pH alcalino y, de hecho, se ha demostrado que esta fracción migra muy unida a la  $\beta$ -CN (Dall'Olio y col., 1990) y que lo que se estimaba como  $\kappa$ -CN realmente corresponde en su mayor parte a las denominadas bandas satélite de la  $\beta$ -CN (Chianese y col. 1990a, 1992b).

En este estudio, ha resultado como fracción caseínica mayoritaria la  $\alpha_s$ . Carić y Djordjević (1971) han señalado además que los valores mínimos para la  $\alpha_s$ -CN y los máximos para la  $\beta$ -CN se alcanzan en la cuarta semana después del parto.

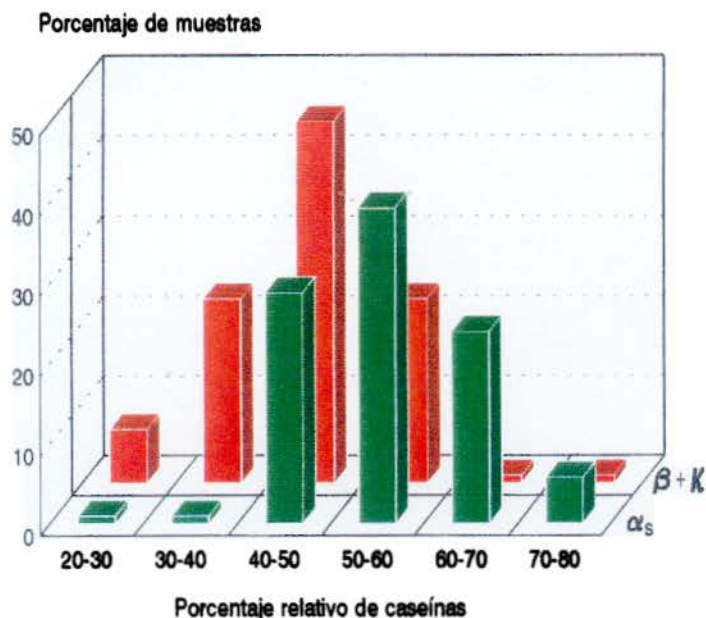


Figura 4.34. Distribución de las muestras de leche de oveja analizadas según el porcentaje relativo de caseínas.

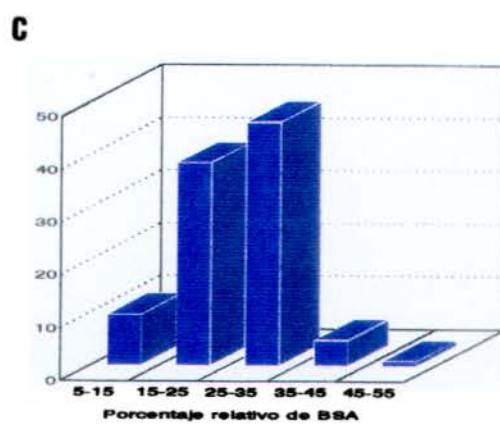
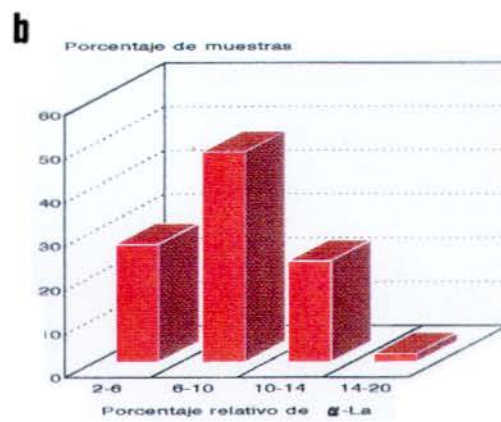
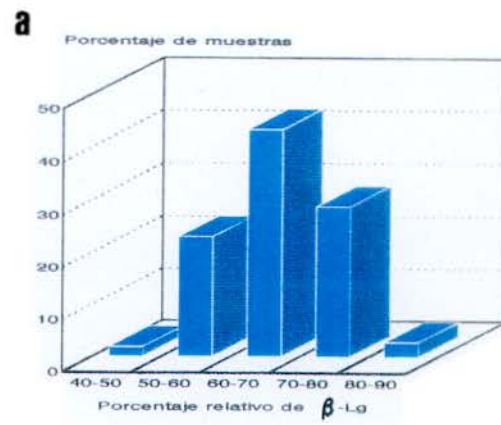


Figura 4.35. Distribución de las muestras de leche de oveja analizadas según el porcentaje relativo de  $\beta$ -Lg (4.35.a),  $\alpha$ -La (4.35.b) y SA (4.35.c).

Los valores medios evaluados para las distintas fracciones seroproteicas de este estudio son muy próximos a los obtenidos por Dilanian (1969), si bien lo que dicho autor estima como Ig (inmunoglobulinas) realmente incluía también la SA e incluso es probable que los valores citados en este estudio para la SA incluyan parte de la fracción inmunoglobulínica.

Las figuras 4.34 y 4.35 representan la distribución de muestras según el porcentaje relativo de caseínas y seroproteínas, respectivamente. Los histogramas indican que el estudio de la aptitud quesera de la leche de oveja se ha realizado con muestras que abarcan un amplio intervalo de composición proteica aunque la mayoría de las muestras se concentran en la zona correspondiente a los valores medios de cada fracción proteica. Para Ng-Kwai Hang y col. (1987) las variaciones en la concentración de las proteínas mayoritarias en leche de vaca ( $\alpha_s$ -CN,  $\beta$ -CN,  $\kappa$ -CN,  $\beta$ -Lg,  $\alpha$ -La, SA e Ig) son debidas a la estación de la paridera, el régimen nutricional de la vaca, estado de lactación, edad de la vaca y estado de salud, aparte de la influencia que ejercen las variantes genéticas.

#### **4.2.2. CARACTERÍSTICAS DEL COÁGULO DE LA LECHE DE OVEJA**

Las características del coágulo obtenido por acción del cuajo de las leches individuales de oveja se han determinado mediante tromboelastografía obteniendo unos registros gráficos o tromboelastogramas tipo campana. Para definir las características del coágulo se han calculado, a partir de los tromboelastogramas resultantes, los parámetros "r" (tiempo de coagulación), "v" (velocidad de coagulación) y "Am" (amplitud máxima).

Por otra parte los parámetros de coagulación se han determinado también con un formógrafo, equipo semiautomático especialmente diseñado para la determinación de las características del coágulo lácteo.

#### 4.2.2.1. DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL COÁGULO MEDIANTE TROMBOELASTOGRAFÍA

En la figura 4.36 se muestran 4 tromboelastogramas que representan los gráficos de la máxima variabilidad obtenidos del análisis de la totalidad de las muestras de leche de oveja. En general, el coágulo de leche de oveja se diferencia del obtenido en condiciones similares con leche de vaca (Frentz y Dreuilhe, 1975; Schaar, 1984; Politis y Ng-Kwai-Hang, 1988b) o cabra (Jiménez-Pérez y col., 1991a) en una mejor aptitud para la coagulación que se refleja en menor tiempo de coagulación, velocidad de coagulación más rápida y elasticidad del coágulo superior.

En la tabla 4.9 se recogen los resultados obtenidos (valores medios, máximo y mínimo y desviación estándar) para los parámetros "r", "v" y "Am" (obtenidos mediante tromboelastografía) de las muestras de leche de oveja.

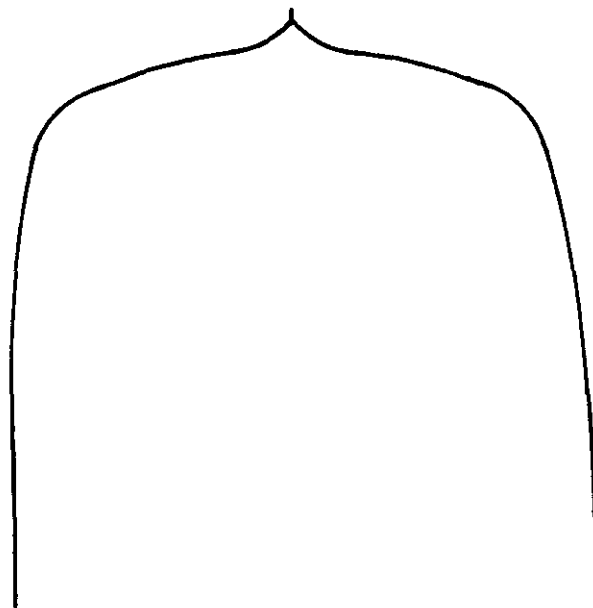
**Tabla 4.9. Características del coágulo (parámetros "r", "v" y "Am", estimados mediante tromboelastografía) de las muestras de leche de oveja.**

	N	V. medio	V. mínimo	V. máximo	D. E.
"r" (minutos)	187	3,41	0,00	17,00	2,12
"v" (minutos)	186	3,10	1,00	11,55	1,76
"Am" (milímetros)	193	61,22	30,00	79,00	9,20

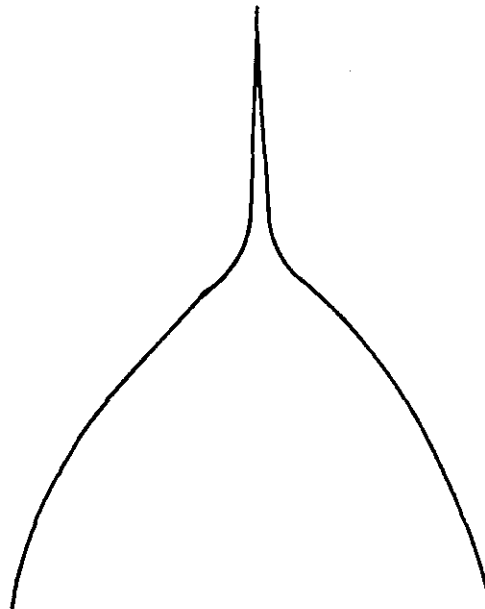
N: Número de muestras

D.E.: Desviación estándar

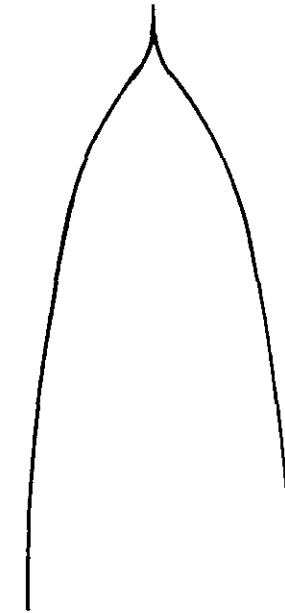
La gran diversidad de gráficas de coagulación obtenidas han permitido realizar una clasificación de las leches en base a los parámetros estimados.



$r = 1,5 \text{ min.}$   
 $v = 1,5 \text{ min.}$   
 $Am = 77 \text{ mm.}$



$r = 9 \text{ min.}$   
 $v = 11,5 \text{ min.}$   
 $Am = 62 \text{ mm.}$



$r = 2 \text{ min}$   
 $v = 9 \text{ min}$   
 $Am = 35 \text{ mm}$



$r = 37,5 \text{ min}$   
 $v = \text{—}$   
 $Am = 4 \text{ mm}$

Figura 4.36. Tromboelastogramas obtenidos del análisis de 4 muestras de leche de oveja.

A) Según tiempo de comienzo de la coagulación (parámetro "r"):

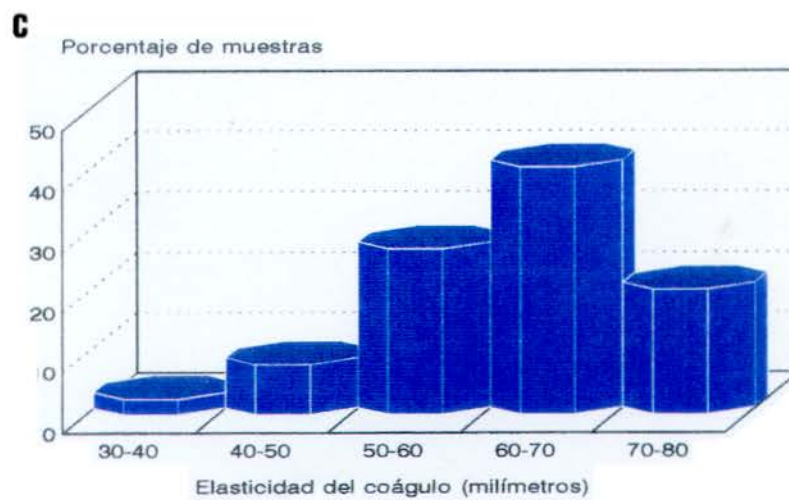
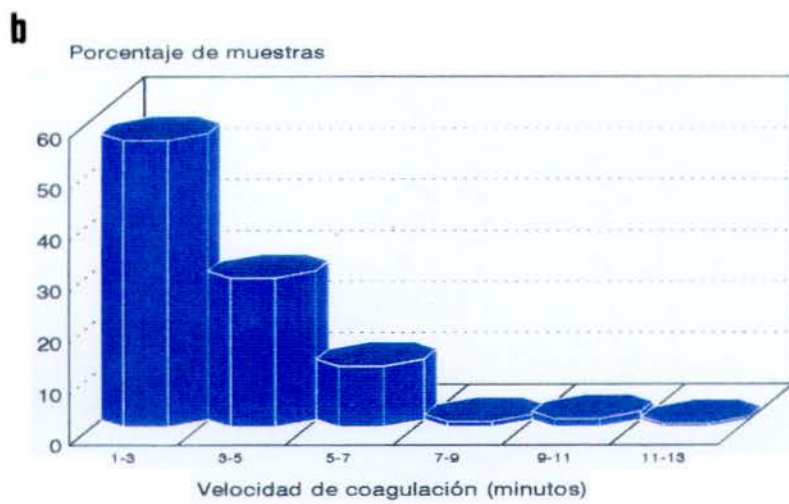
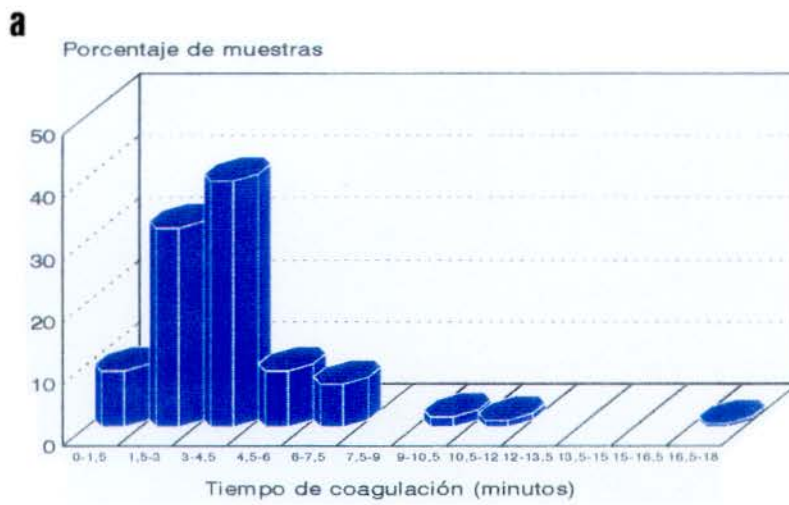
1. Comienzo muy rápido: 0-1,5 minutos
2. Comienzo rápido: 1,5-3 minutos
3. Comienzo normal: 3-4,5 minutos
4. Comienzo tardío: 4,5-12 minutos
5. Comienzo muy tardío: > 12 minutos
6. Campanas que indican coagulación anormal: no es posible medir el parámetro "r".

B) Según velocidad de coagulación (parámetro "v"):

1. Velocidad normal: 1-3 min
2. Velocidad algo lenta: 3-5 min
3. Velocidad lenta: 5-9 min
5. Velocidad muy lenta: > 9 min
6. Campanas que indican coagulación anormal: no es posible medir el parámetro "v".

C) Según elasticidad del coágulo (parámetro "Am"):

1. Campana muy amplia: > 75 mm
2. Campana amplia: 70-75 mm
3. Campana de apertura media: 50-70 mm
4. Campana estrecha: 40-50 mm
5. Campana muy estrecha: < 40 mm
6. Campanas que indican coagulación anormal:
  - a) Se abren y se estrechan al final
  - b) Se abren, posteriormente se estrechan y al final vuelven a abrirse.
  - c) No es posible medir el parámetro "Am".



**Figura 4.37. Distribución de las muestras de leche de oveja según los valores obtenidos para los parámetros "r" (4.37.a), "v" (4.37.b) y "Am" (4.37.c).**

La figura 4.37 representa la distribución de muestras según los valores obtenidos para los parámetros "r" (fig. 4.37.a), "v" (fig. 4.37.b) y "Am" (fig. 4.37.c). Con respecto al tiempo de coagulación la mayoría de las muestras se concentran en la zona de 3-4,5 min, clasificadas como normales en cuanto a comienzo de formación del gel. La velocidad de coagulación de las muestras analizadas está comprendida entre 1 y 12 min, con una mayoría de muestras en la zona de 1 a 2 min (velocidad normal de formación del coágulo). Para la amplitud máxima la distribución de las muestras abarca el espacio comprendido entre 30 y 80 mm, siendo el intervalo más frecuente el de 60-70 mm (campana de apertura media).

Los resultados demuestran una gran variabilidad en los tromboelastogramas. Esta diversidad puede atribuirse al análisis de leches individuales, estado de lactación, contenido en células somáticas, composición caseínica y pH, como ya ha sido constatado para leche de vaca (Zannoni y col., 1981; Schaar, 1984; Grandison y col., 1984; Okigbo y col., 1985a; Politis y Ng-Kwai-Hang, 1988b).

La influencia del pH sobre las características de coagulación ha sido objeto de numerosas investigaciones. Okigbo y col. (1985b) señalaron que el pH afecta a los parámetros "r" y "Am"; según Okigbo y col. (1985c) este efecto se aminora cuando la cantidad de enzima añadida es superior a 0,03 unidades de renina/ml y un ajuste del pH a 6,3, especialmente cuando sea leche con pobres propiedades de coagulación. Politis y Ng-Kwai-Hang (1988b) han demostrado un aumento de 3,52 y 3,41 min respectivamente en los parámetros "r" y "v" y una disminución de 9,45 mm en el "Am" por cada unidad de incremento de pH en leche.

En leche de oveja Manfredini y col. (1992) han demostrado que los tres parámetros de coagulación se hallan correlacionados significativamente ( $p < 0,001$ ) con otros importantes parámetros como son el pH, contenido en células somáticas y proteínas del

suero, ejerciendo cada uno de ellos una influencia bien definida en el proceso quesero. El fenómeno parece lógico ya que en la leche fresca el pH ejerce una función primordial en importantes mecanismos relacionados con la ionización de las caseínas y la distribución del calcio y el fosfato entre las micelas y el suero (Lenoir y Schneid, 1990).

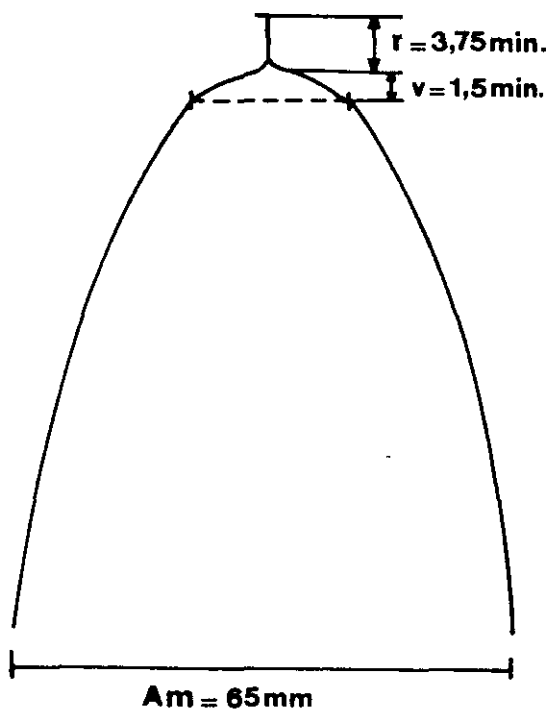


Figura 4.38. Tromboelastograma característico de leche de oveja.

Dado el amplio número y variedad de composición de las muestras analizadas se podría concluir que el tromboelastograma promediado de leche de oveja (determinado como valor medio de los parámetros calculados en la totalidad de los tromboelastogramas obtenidos bajo las condiciones analíticas establecidas en estas experiencias), sería aquel cuyo  $r = 3,75$  min,  $v = 1,5$  min y  $A_m = 65$  mm (figura 4.38). Las gráficas que se alejan de estos valores en uno u otro sentido serían indicativas de leches de características más o menos adecuadas para la coagulación. En particular, el incremento en el tiempo de coagulación y la baja elasticidad del coágulo son indicativas de leches alcalinas, debidas a estadios tardíos de la lactación o, más posiblemente leches mamíticas (Robertson, 1983; Tervala y Antila, 1985; Manfredini y col., 1992). Por ello, realizando el análisis viscosimétrico de las muestras de leche se puede deducir su aptitud a la coagulación, variable de importancia fundamental para la industria quesera; de hecho en leche de vaca, Aleandri y col. (1989) han demostrado una relación significativa entre la elasticidad máxima del coágulo (estimada mediante el parámetro "Am") y el rendimiento quesero. En la actualidad este tipo de análisis se realizan de forma sistemática en las grandes queserías de algunos países. Su aplicación sería válida para detectar leches anómalas debido a enfermedades de los animales, tratamientos con antibióticos, fraudes importantes por aguado, etc.. Incluso se ha utilizado como método para determinar la capacidad de sinéresis del coágulo, la temperatura de conservación de la leche o los tratamientos térmicos sufridos por la misma (Tarodo de la Fuente y col., 1969; Robertson, 1983).

#### **4.2.2.2. EMPLEO DEL FORMÓGRAFO PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL COÁGULO**

Dada la automatización, posibilidad de analizar un mayor número de muestras por hora, y precisión del formógrafo en comparación con el tromboelastógrafo, la utilización del Formagraph (Foss Electric) se ha estimado interesante para la determinación de las características del coágulo, sobre todo en aquellas situaciones en que se realiza el análisis de gran número de muestras de leche. Es el caso de las queserías donde se procesan a diario numerosas muestras de distintos productores e interesa la automatización y rapidez de los sistemas de análisis y control de aptitud a la coagulación, del mismo modo que se determinan los parámetros de composición química global. De hecho, de la bibliografía se desprende que desde hace algunos años este tipo de equipos se está utilizando en algunas queserías de Italia para control de calidad de la leche destinada a la fabricación de varios tipos de queso como son el Parmigiano-Reggiano (Zannoni y Annibaldi, 1981; Zannoni y col., 1981) y el Grana (Losi y Mariani, 1984).

Durante la realización de esta Tesis se adquirió un Formagraph (Foss Electric) para determinar las características de coagulación de la leche. Inicialmente se efectuó la validación analítica del equipo comparando los resultados con los que se obtienen en las mismas condiciones en el tromboelastógrafo. En una segunda fase se procedió a establecer las condiciones óptimas para el análisis de las características del coágulo de leche de gran mezcla de vaca, oveja y cabra. Por último, se realizó un estudio sobre el método a aplicar en el caso de análisis de leches individuales de oveja.

## VALIDACIÓN DEL FORMÓGRAFO. COMPARACIÓN CON LOS VALORES DEL TROMBOELASTÓGRAFO

Para validar el formógrafo y comprobar las características técnicas referentes a repetibilidad, se diseñó una experiencia consistente en analizar durante 3 días seguidos una muestra de leche (preparada a partir de leche entera en polvo reconstituida al 20%) mediante dos ensayos:

Ensayo A: sin adición de  $\text{CaCl}_2$  a la leche.

Ensayo B: con adición de  $\text{CaCl}_2$  a la leche.

Se empleó una solución de cuajo preparada al 0,75%.

Los ensayos se realizaron por duplicado. Por otra parte, para comprobar las diferencias de los valores que se obtienen en los dos equipos viscosimétricos, el ensayo A se repitió además en el tromboelastógrafo.

Para el tratamiento estadístico de los resultados se consideraron atípicos ("outliers") los valores no contenidos en el intervalo:

$$[Q_{25\%} - 1,5IQ, Q_{75\%} + 1,5IQ],$$

siendo IQ el intervalo intercuartílico (diferencia entre el tercer cuartil,  $Q_{75\%}$ , y el primer cuartil,  $Q_{25\%}$ ).

En la tabla 4.10 se muestran los resultados obtenidos (expresados en valores medio, máximo y mínimo, desviación estandar y coeficiente de variación) para cada uno de los tres parámetros en los tres días en que se realizó la experiencia, así como los resultados globales para los dos ensayos (Ensayo A: sin adición de  $\text{CaCl}_2$ . Ensayo B: con adición de  $\text{CaCl}_2$ ).

Comparando los valores globales de ambos ensayos, se observa que la adición de  $\text{CaCl}_2$  a la leche se traduce en una disminución importante de los valores correspondientes a los parámetros "r" (5,74 a 2,78) y "v" (2,36 a 1,20) mientras que no se produce modificación apreciable en el valor del parámetro "Am". Marçais (1965) y Tarodo de la Fuente y col. (1969) observaron este mismo efecto en los parámetros de coagulación en relación con la adición de  $\text{CaCl}_2$  a la leche.

Tabla 4.10. Resultados obtenidos sobre la precisión del equipo Formagraph

(A) Ensayo sin adición de  $\text{CaCl}_2$  a la leche

	Parámetro "r"				Parámetro "v"				Parámetro "Am"			
	Día 1	Día 2	Día 3	Global	Día 1	Día 2	Día 3	Global	Día 1	Día 2	Día 3	Global
V. Medio	5,49	5,85	5,86	5,74	2,51	2,24	2,34	2,36	58,21	58,50	58,21	58,31
V. Mínimo	5,25	5,75	5,50	5,25	1,75	2,00	2,00	1,75	56,00	57,00	56,00	56,00
V. Máximo	5,75	6,00	6,25	6,25	3,25	2,75	2,50	3,25	59,00	59,50	60,00	60,00
D.E.	0,14	0,13	0,17	0,22	0,39	0,23	0,18	0,30	0,77	0,67	0,99	0,82
C.V. (%)	2,46	2,15	2,95	3,90	15,36	10,19	7,48	12,69	1,30	1,14	1,70	1,40
N	18	20	19	57	19	19	17	55	17	20	19	56

(B) Ensayo con adición de  $\text{CaCl}_2$  a la leche

	Parámetro "r"				Parámetro "v"				Parámetro "Am"			
	Día 1	Día 2	Día 3	Global	Día 1	Día 2	Día 3	Global	Día 1	Día 2	Día 3	Global
V. Medio	2,86	2,69	2,78	2,78	1,23	1,15	1,24	1,20	62,08	53,60	62,03	59,09
V. Mínimo	2,50	2,50	2,50	2,50	1,00	1,00	0,75	0,75	58,00	43,00	57,00	43,00
V. Máximo	3,25	3,00	3,00	3,25	2,00	1,50	1,50	2,00	63,50	61,00	64,00	64,00
D.E.	0,19	0,16	0,14	0,18	0,30	0,19	0,24	0,30	1,51	5,40	1,91	5,32
C.V. (%)	6,73	5,95	5,12	6,45	24,65	16,35	19,06	20,43	2,44	10,08	3,07	9,00
N	19	20	19	58	20	20	20	60	19	20	18	57

"r": min; "v": min; "Am": mm  
 D.E.: Desviación estándar  
 C.V.: Coeficiente de variación  
 N: Número de muestras

Las especificaciones técnicas del Formagraph indican que la precisión del equipo se cifra en un coeficiente de variación  $\leq 2\%$ , sin especificar el parámetro calculado. En el ensayo A los coeficientes de variación calculados para el parámetro "Am" son inferiores al 2% y para el parámetro "r" próximos a ese valor, mientras que los coeficientes de variación correspondientes al parámetro "v" son más altos que las cifras dadas por la casa comercial; por ello es posible que la precisión del equipo esté calculada en origen para el parámetro "Am" o el "r".

Se observa que los coeficientes de variación para el ensayo A son en todos los casos inferiores a los del ensayo B. Por esto, si bien en quesería es una práctica habitual la adición de  $\text{CaCl}_2$  a la leche para mejorar las características de coagulación de la misma, para evaluar la evolución del coágulo de la leche mediante Formagraph sería preferible evitar esta adición. En cambio, en otros equipos viscosimétricos se hace necesaria esta adición de  $\text{CaCl}_2$  pues, como se demuestra en la figura 4.39 y a partir de los resultados expuestos en la tabla 4.11, en una experiencia realizada en el tromboelastógrafo sin adición de este agente químico, se observaron importantes diferencias en los parámetros de coagulación con respecto a los obtenidos en el mismo ensayo en el Formagraph. A la vista de los valores medios globales obtenidos de las experiencias realizadas en ambos equipos se deduce que mediante Formagraph se obtienen valores superiores para los parámetros "r" (5,74 frente a 4,46) y "Am" (58,31 frente a 21,67), mientras que se obtienen valores inferiores para el parámetro "v" (2,36 frente a 26,37). El hecho de que las medidas más pequeñas en los equipos viscosimétricos empleados provoquen un mayor coeficiente de variación y, por tanto, menor precisión en los ensayos puede ser debido a la falta de exactitud en las mediciones; éstas se realizan manualmente con regla graduada (precisión máxima de 0,5 mm) y, ello da lugar a un error que se acentúa en el caso de las medidas más pequeñas.

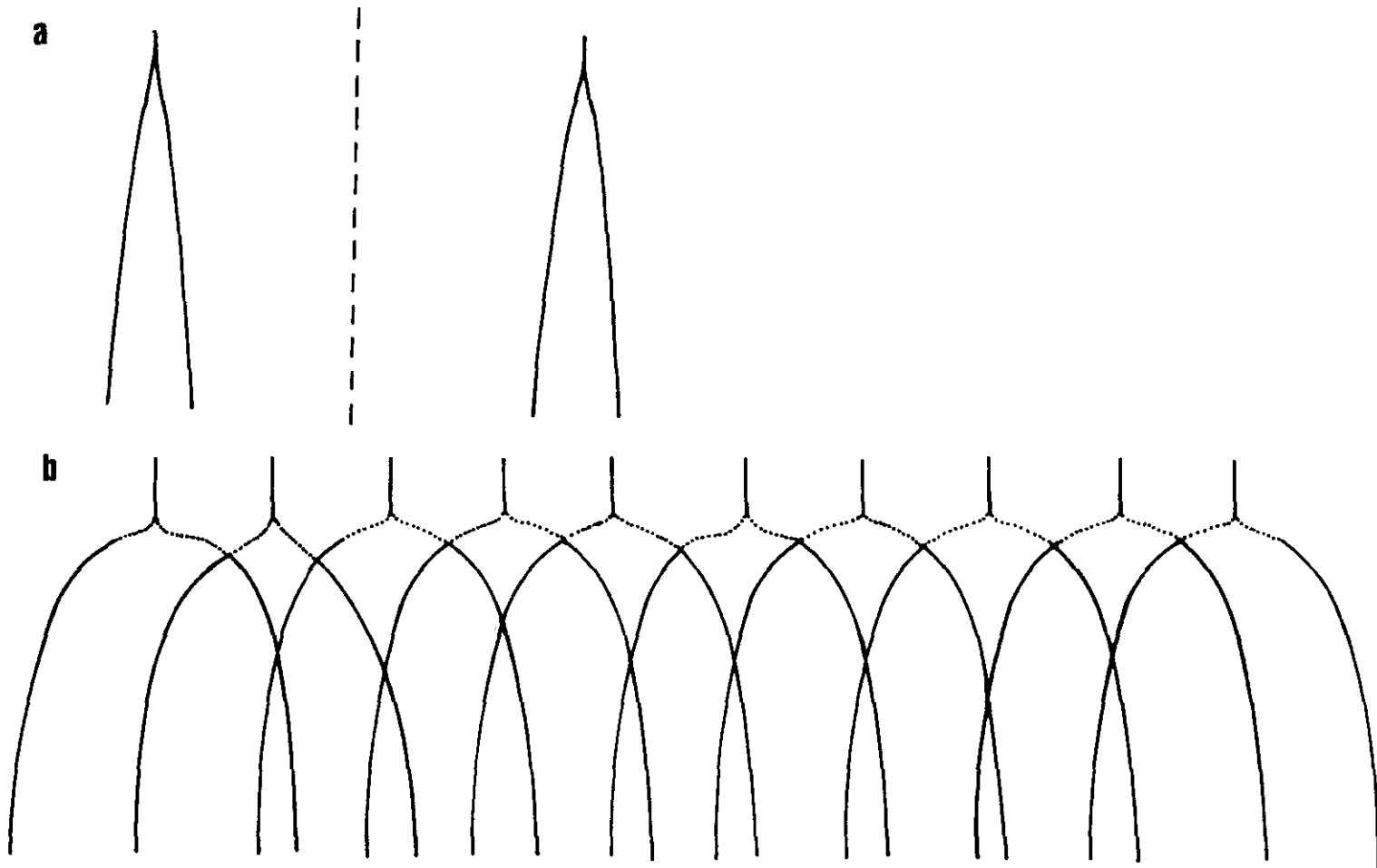


Figura 4.39. Gráficos obtenidos a partir de leche de vaca en una misma experiencia en el Tromboelastógrafo (4.39.a) y en el Formagraph (4.39.b).

Tabla 4.11. Resultados obtenidos del ensayo en el equipo Tromboelastógrafo sin adición de  $\text{CaCl}_2$  a la leche.

	Parámetro "r"				Parámetro "v"				Parámetro "Am"			
	Día 1	Día 2	Día 3	Global	Día 1	Día 2	Día 3	Global	Día 1	Día 2	Día 3	Global
V. Medio	3,44	5,63	4,31	4,46	25,25	27,75	27,25	26,37	24,13	20,63	20,25	21,67
V. Mínimo	2,75	5,50	3,50	2,75	22,00	26,50	27,00	22,00	22,50	18,50	17,50	17,50
V. Máximo	4,00	5,75	5,25	5,75	28,00	29,00	27,50	29,00	26,00	23,50	23,00	26,00
D.E.	0,66	0,14	0,94	1,18	2,75	1,77	0,35	2,28	1,89	2,53	3,18	2,96
C.V. (%)	19,11	2,56	21,89	25,06	10,91	6,37	1,30	8,65	7,82	12,26	15,68	13,68
N	4	4	4	12	4	2	2	8	4	4	4	12

"r": min; "v": min; Am: mm  
D.E.: Desviación estándar  
C.V.: Coeficiente de variación  
N: Número de muestras

## **PUESTA A PUNTO DE LA METODOLOGÍA A APLICAR PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL COÁGULO DE LECHE MEDIANTE FORMÓGRAFO A PARTIR DE LECHE DE GRAN MEZCLA DE VACA, OVEJA Y CABRA**

En la bibliografía consultada existen referencias sobre el empleo del Formagraph para la determinación de las características del coágulo de leche de distintas especies, ya sea a partir de leche de gran mezcla (Aleandri y col., 1989) o de leches individuales (Okigbo y col., 1985a; VandenBerg y col., 1990; Manfredini y col. 1992). Sin embargo, no existe un criterio uniforme en cuanto a las condiciones analíticas en estos experimentos ya que, generalmente, los distintos autores realizan sus ensayos tomando como base la tecnología de elaboración de un queso determinado. Esto es lógico, ya que cuando se pretenden evaluar las características de coagulación de una muestra de leche determinada, las condiciones experimentales se intentan aproximar, en la medida de lo posible, a las de la coagulación real que tendrá lugar en la cuba de cuajar (temperatura de coagulación, tiempo total desde adición del cuajo hasta el fin de la coagulación, etc). Por otra parte, para este tipo de ensayos conviene, utilizando un cuajo de una determinada fuerza, estandarizar la cantidad de cuajo necesaria para obtener un coágulo de características medibles mediante un viscosímetro adecuado. Por ello, en los trabajos científicos es imprescindible indicar detalladamente las condiciones analíticas exactas para evitar interpretaciones erróneas (Storry y Ford, 1982b).

En la tecnología de elaboración de los quesos semiduros autóctonos españoles elaborados a partir de leche de oveja (como el Queso Manchego) o de mezcla de vaca, oveja y cabra (como el Queso Ibérico), la coagulación tiene lugar en aproximadamente 40 min a temperaturas de 30-32°C.

Teniendo en cuenta estos antecedentes se procedió a la puesta a punto de la metodología a aplicar para el análisis de las características del coágulo de leche de distintas especies.

Para ello se diseñó una experiencia consistente en determinar, mediante el Formagraph, esas características a partir de leche de gran mezcla de vaca, oveja y cabra ensayando dos concentraciones de cuajo y fijando la temperatura del equipo en 32°C. Las soluciones de cuajo se prepararon a las siguientes concentraciones:

- Para la leche de vaca: 0,75 y 0,5%
- Para la leche de oveja y cabra: 0,125 y 0,25%

En la tabla 4.12 se muestran los resultados obtenidos (expresados en valores medio, máximo y mínimo, desviación estandar y coeficiente de variación) para cada parámetro de coagulación según las distintas concentraciones de cuajo añadidas a la leche de cada especie.

Los resultados obtenidos en esta experiencia, en particular los referentes a coeficientes de variación en los tres parámetros estimados, parecen indicar que las concentraciones de cuajo más idóneas para el análisis de las características de coagulación en muestras de leche cruda de gran mezcla de las distintas especies ensayadas son:

- Leche de vaca: 0,50%
- Leche de oveja: 0,125%
- Leche de cabra: 0,125%

Tabla 4.12. Resultados obtenidos del análisis mediante formógrafo de las características de coagulación de leche de gran mezcla de distintas especies con dos concentraciones de cuajo. (Los números entre corchetes indican la concentración, en tanto por ciento, de cuajo añadida)

(A) Leche de vaca

	[0,50]			[0,75]		
	"r"	"v"	"Am"	"r"	"v"	"Am"
V. Medio	6,63	4,38	46,37	4,80	3,80	49,10
V. Mínimo	6,25	4,00	45,00	4,75	3,50	48,00
V. Máximo	7,00	4,50	47,00	5,00	4,25	50,00
D.E.	0,32	0,25	0,95	0,11	0,33	0,89
C.V. (%)	4,83	5,71	2,05	2,29	8,68	1,81
N	4	4	4	5	5	5

(B) Leche de oveja

	[0,125]			[0,25]		
	"r"	"v"	"Am"	"r"	"v"	"Am"
V. Medio	14,15	1,90	69,70	6,80	1,05	71,00
V. Mínimo	14,00	1,75	69,50	6,75	1,00	70,00
V. Máximo	14,50	2,00	70,00	7,00	1,25	72,00
D.E.	0,22	0,14	0,27	0,11	0,11	0,70
C.V. (%)	1,55	7,37	0,39	1,62	10,48	0,99
N	5	5	5	5	5	5

(C) Leche de cabra

	[0,125]			[0,25]		
	"r"	"v"	"Am"	"r"	"v"	"Am"
V. Medio	10,95	3,85	43,90	5,00	2,10	45,60
V. Mínimo	10,50	3,75	42,00	5,00	2,00	40,00
V. Máximo	11,25	4,00	45,00	5,00	2,50	48,00
D.E.	0,33	0,14	1,14	0,00	0,22	3,20
C.V. (%)	3,01	3,64	2,60	0,00	10,48	7,02
N	5	5	5	5	5	5

"r": min; "v": min; "Am": mm  
D.E.: Desviación estándar  
C.V.: Coeficiente de variación  
N: Número de muestras

## **EMPLEO DEL FORMÓGRAFO PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL COÁGULO DE LECHE DE OVEJA INDIVIDUALES**

A la vista de los resultados expuestos hasta ahora sobre la utilización del formógrafo y tromboelastógrafo para la apreciación de la evolución del coágulo se puede llegar a la conclusión de que los dos equipos viscosimétricos ensayados (tromboelastógrafo y formógrafo), aunque están basados en el mismo principio, dan lugar a valores distintos para los parámetros a estudiar. Esto es debido a las diferencias existentes entre ambos instrumentos: volumen y número de muestras a analizar por ensayo, modo de dosificación y mezcla del cuajo, así como la pieza que se introduce en la leche para detectar la evolución de la elasticidad. Estas diferencias dan lugar a que, en idénticas condiciones experimentales, las campanas que se obtienen a partir del formógrafo son más amplias que las obtenidas con el tromboelastógrafo.

Por todo lo anteriormente expuesto, cuando se utilizó la misma metodología que en el tromboelastógrafo para el análisis de muestras individuales de leche de oveja se obtuvieron unas gráficas deformadas en las que resultó imposible la medida de los parámetros de coagulación. Por ello, para los análisis en el formógrafo se estimó conveniente por una parte no adicionar  $\text{CaCl}_2$  a la leche y, por otra, disminuir la cantidad de cuajo empleada.

A partir de las experiencias realizadas con leche de gran mezcla de oveja, se llegó a la conclusión de que la concentración de cuajo más idónea para determinación de las características del coágulo en leche de esta especie era del 0,125%. Sin embargo, cuando se analizaron leches de oveja individuales, la adición de solución de cuajo a la concentración antes citada resultó excesiva, ya que la mayoría de los coágulos se rompieron durante la ejecución del ensayo, con la consiguiente retracción del coágulo que dió lugar a una disminución de la campana. Esto se debe a que las características peculiares de composición físico-

química y microbiológica de las leches individuales influyen de modo importante en el comportamiento de las mismas durante la coagulación, hecho que se solapa cuando se analizan leches de gran mezcla. Por ello, para el análisis de leches individuales es posible que, no solo en el caso de la leche de oveja sino también en la de las demás especies, se deba disminuir la cantidad de cuajo a añadir con respecto a la citada anteriormente para leches de gran mezcla. El efecto de la concentración de cuajo empleada para la evaluación de leche mediante Formagraph ha sido estudiado por McMahon y Brown (1982) quienes demuestran que en el intervalo de 1 a 0,185 Unidades de Renina/ml se produce una progresiva disminución de los parámetros "r" y "Am" y un aumento de "v".

Después de realizar varias pruebas en las que analizaron leches de oveja individuales mediante formógrafo, disminuyendo progresivamente la concentración de cuajo añadida a las mismas, se llegó a la conclusión de que, la concentración de cuajo adecuada para obtener unos diagramas viscosimétricos medibles (figura 4.40) debería ser del 0,0625%.

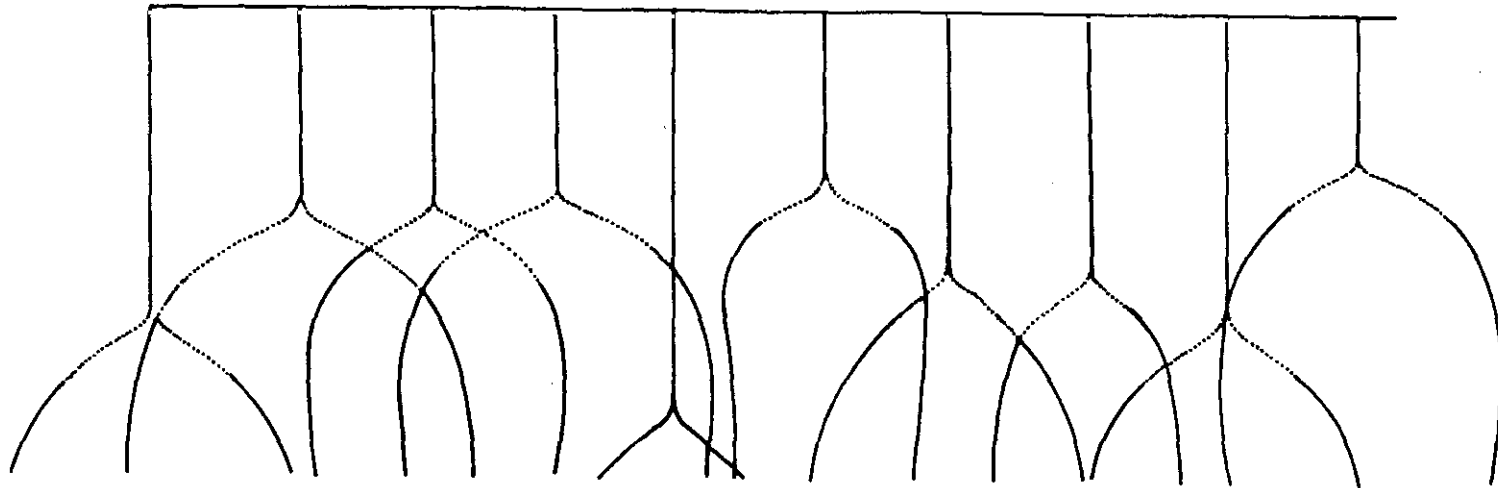


Figura 4.40. Gráficos obtenidos en el Formagraph a a partir de leches individuales de oveja. Cuajo al 0,0625%.

#### **4.2.3. RENDIMIENTO QUESERO DE LECHE DE OVEJA**

Dado el escaso volumen de leche obtenido por ordeño de cada oveja individual (aproximadamente 200 - 500 ml), para la determinación del rendimiento quesero de la leche de oveja se elaboraron quesos de pequeño tamaño (aproximadamente 280 g de peso medio) mediante un método a escala de laboratorio. Sin embargo, antes de realizar los análisis seriados, se procedió a una validación del método de elaboración empleado, determinando la desviación a los valores de rendimiento reales que se obtendrían en una planta quesera; para ello se compararon los valores de rendimiento obtenido a escala de laboratorio y escala semipiloto con muestras de leche de vaca, oveja y cabra.

##### **4.2.3.1. COMPARACIÓN DE LOS RENDIMIENTOS QUESEROS OBTENIDOS A ESCALA SEMIPILOTO Y ESCALA DE LABORATORIO**

Para comparar los rendimientos queseros obtenidos mediante elaboración de quesos a escala semipiloto y escala de laboratorio se partió de leche de gran mezcla de vaca, oveja y cabra; se elaboraron 13 quesos, cada uno de ellos con distintos porcentajes de leche de cada una de las especies, a escala semipiloto y escala de laboratorio aplicando la misma metodología en ambos casos.

En la tabla 4.13 se recogen los rendimientos queseros (Kg queso/100 l leche) obtenidos a escala semipiloto y escala de laboratorio, así como la diferencia que resulta de restar el rendimiento a escala de laboratorio menos el obtenido a escala semipiloto.

Los resultados del test estadístico de comparación de 2 medias a partir de muestras relacionadas (t-Student) ponen de manifiesto que los rendimientos queseros obtenidos a escala de laboratorio son superiores a los obtenidos a escala piloto (diferencia media= 4,772).

**Tabla 4.13. Rendimientos queseros obtenidos en 13 quesos elaborados a escala semipiloto y escala de laboratorio y diferencias positivas entre ambos.**

Queso n°	Rto. E. sp. (%)	Rto. E. lab. (%)	Diferencia
1	12,70	18,400	5,700
2	16,45	22,325	5,875
3	14,96	19,875	4,915
4	12,90	17,050	4,150
5	14,02	16,950	2,930
6	13,42	17,950	4,030
7	15,72	19,175	3,455
8	13,28	18,875	5,595
9	15,24	19,375	4,135
10	13,41	16,850	3,440
11	12,70	16,450	3,750
12	11,20	17,200	6,000
13	21,10	29,100	8,000

Rto. E. sp.: Rendimiento quesero obtenido a escala semipiloto

Rto. E. lab.: Rendimiento quesero obtenido a escala de laboratorio

A partir de las diferencias de los rendimientos queseros obtenidos en las dos escalas ensayadas, se realizó un análisis de regresión, obteniendo la ecuación:

$$\text{Rto. E. lab.} = 0,736 + 1,279 \text{ Rto. E. sp.}$$

con un coeficiente de correlación  $R = 0,931$ , lo que supone que el 86,7% ( $R^2 \times 100$ ) de las variaciones del rendimiento a escala de laboratorio quedaría explicada por el modelo ajustado.

En la figura 4.41 se representan los valores del rendimiento a escala de laboratorio en función de los rendimientos a escala semipiloto y la recta de regresión calculada.

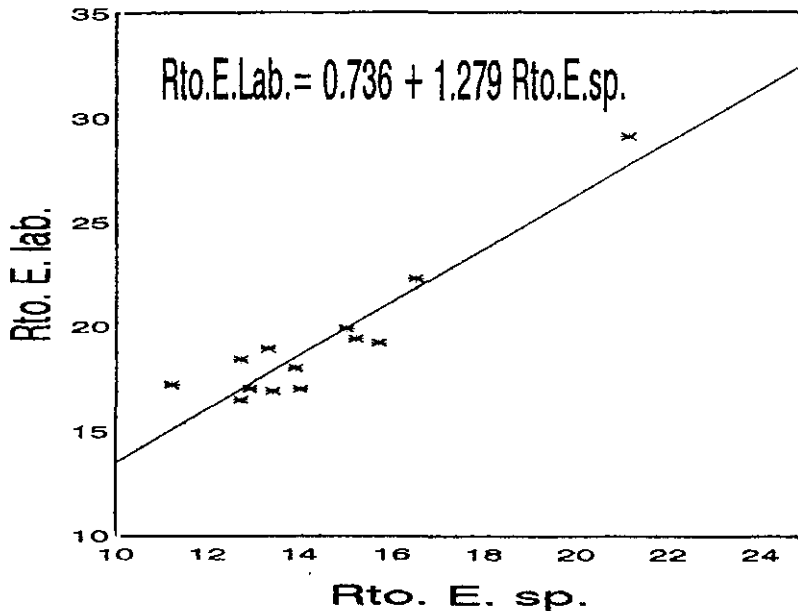


Figura 4.41. Recta de regresión calculada según los valores de rendimiento quesero determinado mediante metodología a escala de laboratorio en función del rendimiento quesero determinado mediante metodología a escala semipiloto. E. lab.: escala semipiloto. E. sp.: escala semipiloto.

#### 4.2.3.2. RENDIMIENTOS QUESEROS DE LAS LECHEs INDIVIDUALES

En la tabla 4.14 se recogen los resultados expresados en porcentaje (valores medio, máximo y mínimo y desviación estándar) de los rendimientos queseros obtenidos antes y después del prensado (por aproximación al rendimiento en cuajada obtenido antes y después de la ultracentrifugación), referidos a peso de leche (Kg queso/100 Kg leche), a partir de las muestras de individuales de leche de oveja.

**Tabla 4.14. Rendimientos queseros obtenidos antes y después de prensa a partir de las muestras individuales de leche de oveja.**

	N	V. medio	V. mínimo	V. máximo	D. E.
Rto. APP (%)	142	48,55	27,35	65,45	7,45
Rto. DPP (%)	142	28,71	15,45	42,50	6,43

N: Número de muestras

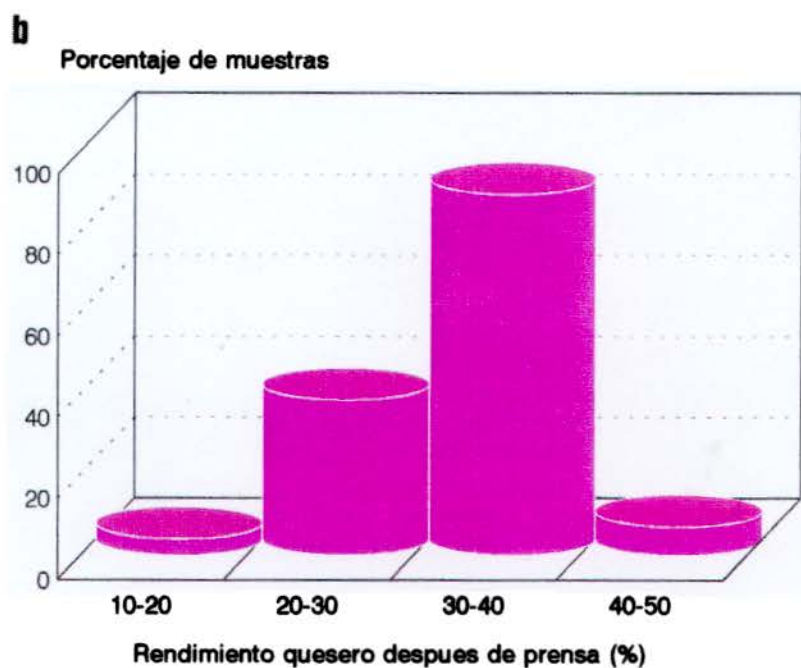
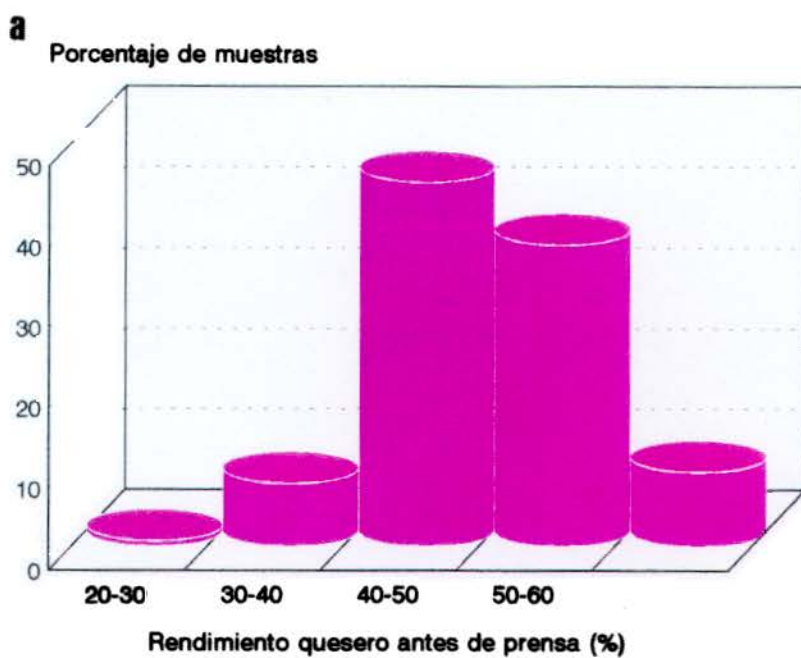
D.E.: Desviación estándar

APP: Antes de prensa referido a peso de leche

DPP: Después de prensa referido a peso de leche

A la vista de los resultados expuestos se observa que los rendimientos queseros obtenidos con leche de oveja son, como era de esperar, superiores a los que se obtienen con leche de vaca (Aleandri y col., 1989) o cabra (Jiménez-Pérez y col., 1991a). La sinéresis media que tiene lugar en el queso (obtenida como una aproximación del volumen de suero expulsado por la cuajada tras la ultracentrifugación) es de un valor medio del 38,03% (27,58% - 43,51%).

La figura 4.42 representa la distribución de muestras según los rendimientos queseros (Kg queso/100 l leche) obtenidos antes (fig. 4.42.a) y después (fig. 4.42.b) de la prensa. Se observa que las muestras de leche seleccionadas son representativas de un amplio intervalo de valores de rendimientos queseros; esta variabilidad está directamente relacionada con la composición química (dependiente en gran medida del periodo de lactación) y el pH de la leche. Por otra parte, esta variabilidad en el rendimiento se puede correlacionar en parte con las características del coágulo. Las relaciones entre las variables estudiadas se han analizado mediante diversos tratamientos estadísticos y se expondrán en el apartado 4.3.



**Figura 4.42. Distribución de las muestras de leche de oveja analizadas según el rendimiento queso obtenido antes (4.42.a), y después (4.42.b) de prensa.**

### 4.3. ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Para el tratamiento estadístico de los resultados referentes a la aptitud quesera de la leche de oveja, se confeccionó una tabla o matriz de datos con 205 filas (muestras analizadas) y 33 columnas (variables estudiadas). Los datos de las muestras analizadas son los que se recogieron en la tabla 4.6. Las variables estudiadas en estas muestras fueron:

- Días de lactación
- Composición físico-química: pH y contenido en grasa, proteínas, lactosa, extracto seco total y calcio.
- Contenido (porcentaje relativo) en cada una de las fracciones seroproteicas:  $\beta$ -Lg (A, B, satélite, total);  $\alpha$ -La; BSA.
- Contenido (porcentaje relativo) en cada una de las fracciones caseínicas:  $\beta$ - +  $\kappa$ -CN ( $\beta_2$ ,  $\beta_1+\kappa$ ,  $\beta$ -sat, total);  $\alpha_s$ -CN ( $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\alpha_{s3}$ ,  $\alpha_s$  SR, total). La denominación  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\alpha_{s3}$  se refiere a las bandas electroforéticas según movilidad electroforética:  $\alpha_{s3} < \alpha_{s2} < \alpha_{s1}$  (Richardson y Creamer, 1976).
- Parámetros de coagulación: "r", "v", "Am".
- Rendimiento quesero (Kg queso/100 Kg leche):
  - Rto. APP (antes de prensa, referido a peso de leche)
  - Rto. DPP (después de prensa, referido a peso de leche)

#### 4.3.1. APLICACIÓN DEL ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS

La aplicación del algoritmo de las K-medias a las muestras se realizó utilizando las siguientes variables: pH, contenido en calcio, parámetros de coagulación ("r", "v", "Am"), y rendimiento quesero (Rto. APP y Rto. DPP). Se consideraron únicamente 2 grupos (K= 2). El empleo del programa BMDPKM dió como resultado la formación de 2 grupos con 53 y 85 observaciones respectivamente, con eliminación previa de aquellas muestras con datos incompletos en las variables utilizadas.

En la tabla 4.15 se recogen los valores medios y la

desviación estándar de las variables estimadas en el análisis de conglomerados en los dos grupos obtenidos, así como el resultado del test de comparación de los dos valores medios (t-Student), usando el programa BMDP3D de la serie BMDP.

A la vista de estos resultados se pone de manifiesto que el grupo primero (formado por 53 muestras) tiene rendimientos superiores a los del segundo grupo (formado por 85 muestras), y por ello al grupo 1 se le ha denominado "Grupo de alto rendimiento" y al grupo 2 "Grupo de bajo rendimiento".

**Tabla 4.15. Diferencias entre los grupos de alto (Grupo 1) y bajo rendimiento (Grupo 2) para las variables estimadas en el análisis de conglomerados.**

Variable	Grupo 1 (53 muestras)		Grupo 2 (85 muestras)		Diferencias significativas (p<0,05)
	V. Medio	D.E.	V. Medio	D.E.	
pH	6,61	0,17	6,79	0,11	Si
Calcio (mg/l)	220,48	31,94	221,25	28,78	No
"r" (min)	3,19	1,68	3,66	1,94	No
"v" (min)	2,18	1,06	3,32	1,70	Si
"Am" (mm)	67,77	6,80	60,45	7,17	Si
Rto. APP (%)	55,08	5,29	43,99	4,95	Si
Rto. DPP (%)	34,87	3,85	24,51	3,95	Si

D.E.: Desviación estándar

Comparando los valores medios obtenidos para cada variable en ambos grupos se observa que:

- El grupo de alto rendimiento presenta valores de pH inferiores (más próximos al pH óptimo de la leche cruda) que los del grupo de bajo rendimiento. Marziali y Ng-Kwai-Hang (1986a) han demostrado en leche de vaca que el rendimiento en queso se correlaciona negativamente con el incremento de pH de la leche

cruda en el intervalo 6-7; el fenómeno parece lógico ya que en la leche fresca el pH ejerce una función primordial en importantes mecanismos relacionados con la ionización de las caseínas y la distribución del calcio y el fosfato entre las micelas y el suero (Lenoir y Schneid, 1990).

- La velocidad de coagulación (parámetro "v") presenta valores inferiores en el grupo 1. La amplitud máxima del coágulo (parámetro "Am") presenta valores superiores en el grupo 1. Aleandri y col. (1989) han demostrado en leche de vaca que el parámetro "Am" está relacionado positivamente con el rendimiento quesero (dentro de un determinado intervalo de contenido en grasa) siendo un indicador de las propiedades de agregación de las caseínas de la leche.

- Como se ha indicado, los rendimientos queseros calculados son, en todos los casos, superiores en el grupo 1 que en el grupo 2.

- No existen diferencias significativas en cuanto a los valores medios de contenido en calcio y el tiempo de coagulación (parámetro "r").

En la tabla 4.16 se recogen los resultados obtenidos (valor medio y desviación estándar) de las restantes variables analizadas, así como el resultado del test de comparación de medias en los grupos de alto y bajo rendimiento.

En el grupo de alto rendimiento el valor medio determinado para el periodo de lactación es de aproximadamente 108 días, lo que implica que son muestras de leche recogidas en el 4º mes de lactación. En cambio, las muestras que integran el grupo 2 se recolectaron principalmente al final del 2º mes de lactación.

Tabla 4.16. Comparación de valores medios para las variables analizadas en los grupos de muestras de alto (Grupo 1) y de bajo rendimiento (Grupo 2).

Variable	Grupo 1			Grupo 2			Diferencias significativas (p<0,05)
	N	V. Medio	D.E.	N	V. Medio	D.E.	
Periodo lactación (días)	53	108,85	26,71	81	61,94	20,70	Si
Grasa (%)	48	8,71	1,43	73	5,76	1,79	Si
Proteínas (%)	48	6,42	0,75	73	5,17	0,54	Si
Lactosa (%)	41	4,33	0,31	12	4,57	0,28	Si
EST (%)	47	20,62	1,57	73	17,41	1,87	Si
$\beta$ -Lg A (% rel.)	37	40,54	12,80	64	39,78	12,19	No
$\beta$ -Lg B (% rel.)	37	17,63	20,45	64	22,47	17,35	No
$\beta$ -Lg sat (% rel.)	37	8,38	8,90	64	3,83	5,15	Si
Total $\beta$ -Lg (% rel.)	37	66,56	8,09	64	66,08	7,58	No
$\alpha$ -La (% rel.)	37	7,15	3,03	64	8,78	2,49	Si
SA (% rel.)	37	23,76	6,55	64	24,70	6,60	No
$\beta$ -CN sat (% rel.)	37	0,96	2,12	64	0,67	1,80	No
$\beta$ 2-CN (% rel.)	36	27,36	6,48	56	23,29	8,44	Si
$\beta$ 1- + $\kappa$ -CN (% rel.)	36	18,71	4,43	56	21,16	4,36	Si
Total $\beta$ - + $\kappa$ -CN (% rel.)	37	46,90	7,55	64	43,31	11,42	No
$\alpha$ s1-CN (% rel.)	26	6,33	2,06	42	8,33	3,24	Si
$\alpha$ s2-CN (% rel.)	26	20,29	3,73	42	24,11	4,58	Si
$\alpha$ s1- + $\alpha$ s2-CN (% rel.)	35	26,83	8,22	53	31,34	8,51	Si
$\alpha$ s3-CN (% rel.)	35	24,98	3,96	53	23,48	6,43	No
$\alpha$ s-CN SR (% rel.)	37	0,14	0,82	64	0,15	0,65	No
Total $\alpha$ s-CN (% rel.)	37	52,07	7,65	64	55,65	11,58	No

N: Número de muestras  
D.E.: Desviación estándar

El estado de lactación influye directamente en la composición química de la leche. Por ello, en el grupo de alto rendimiento se observaron valores medios superiores para el contenido en grasa (8,71 frente a 5,76), proteínas (6,42 frente a 5,17) y extracto seco total (20,62 frente a 17,41), mientras que para el contenido en lactosa los valores fueron inferiores. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios realizados sobre la composición química de la leche de oveja a lo largo de la lactación; en leche de oveja de raza Lacaune de gran mezcla (datos recopilados por Assenat, 1991) se observa que la composición química hacia la mitad del sexto mes de lactación es semejante a la observada en este estudio en el grupo de alto rendimiento.

En este estudio se ha demostrado una correlación positiva entre el rendimiento quesero (Rto. DPP) de leche de oveja y el contenido en grasa ( $R= 0,804$ ) y el estado de lactación ( $R= 0,789$ ).

En cuanto al contenido en caseínas individuales, se ha observado que las caseínas  $\beta$  y  $\kappa$  parecen estar muy implicadas en el rendimiento quesero. Se han observado para la  $\beta_2$ -CN unos valores medios superiores en el grupo de alto rendimiento; en cambio, para la  $\beta_1$ - +  $\kappa$ -CN los valores medios son superiores en el grupo de muestras de bajo rendimiento. Para las  $\alpha_s$ -CN, en aquellos casos en que las diferencias resultaron significativas se observa que para las de alto rendimiento los porcentajes relativos son inferiores que para el grupo de bajo rendimiento.

Referente al contenido de seroproteínas individuales la comparación de los valores medios para ambos grupos demuestran que el contenido en  $\beta$ -Lg satélite es mayor en las muestras que presentan alto rendimiento; esta proteína está muy relacionada con la  $\beta$ -Lg A (López-Gálvez y col, 1991) con lo cual se presupone una influencia positiva de este alelo de  $\beta$ -Lg en el rendimiento quesero de la leche de oveja. La  $\alpha$ -La presenta valores algo

inferiores en el grupo de alto rendimiento, lo cual puede tener relación directa con la disminución de lactosa en las fases finales de la lactación (Mahieu y col., 1977).

La relación entre la composición de la leche y el rendimiento quesero de la misma ha sido estudiada por diversos autores. Así Marziali y Ng-Kwai-Hang (1986a) han demostrado que el rendimiento en queso se correlaciona positivamente con el contenido en grasa, lactosa, caseína total,  $\alpha_s$ -CN,  $\beta$ -CN,  $\kappa$ -CN,  $\alpha$ -La y  $\beta$ -Lg.

#### **4.3.2. INFLUENCIA DEL POLIMORFISMO DE LAS PROTEÍNAS LÁCTEAS EN LA APTITUD QUESERA DE LECHE DE OVEJA.**

Para el estudio de la influencia de los polimorfismos genéticos de las proteínas lácteas en la aptitud quesera de la leche de oveja se agruparon las muestras según los fenotipos de  $\beta$ -lactoglobulina, estimados mediante IEF, y de caseínas (referidos al número de bandas electroforéticas de  $\alpha_s$ -caseínas) estimados mediante PAGE. Así, resultaron 3 grupos de muestras para los fenotipos de  $\beta$ -lactoglobulina (AA; BB; AB), y 3 grupos de muestras para los fenotipos de caseína (3 bandas; 4 bandas; 5-6 bandas, englobando este último grupo aquellas caseínas que presentaron la  $\alpha_{s2}$ -CN SR).

##### **4.3.2.1. INFLUENCIA DE LAS PROTEÍNAS DE SUERO**

En la tabla 4.17 se recogen los valores medios obtenidos para las variables analizadas en los grupos establecidos según los fenotipos de  $\beta$ -Lg. En esta misma tabla se indica el resultado del test de comparación de múltiples medias (Test de Student Newman Keuls) mediante aplicación del programa 7D de la serie BMDP.

En las muestras seleccionadas para el estudio de la aptitud quesera pertenecientes a cada uno de los tres fenotipos de  $\beta$ -Lg

no se observaron diferencias significativas como consecuencia del periodo de lactación, con lo cual, se garantiza la no influencia de este factor, de importancia fundamental, como se ha visto anteriormente, en la composición láctea.

En la composición química resultaron significativamente distintos en los 3 grupos los valores medios correspondientes al contenido en proteínas, siendo la leche caracterizada por el fenotipo BB de  $\beta$ -Lg aquella con mayor proporción de proteínas en leche. Para el EST resultaron superiores los valores medios calculados para los grupos homocigóticos (AA y BB) en comparación con el heterocigoto (AB). En cuanto al contenido en calcio, los valores medios calculados fueron superiores para las muestras del grupo  $\beta$ -Lg BB seguidas de las AA y, por último las AB.

Como es lógico, en los fenotipos AA y BB resultaron superiores respectivamente, los valores medios calculados para el porcentaje relativo de la  $\beta$ -Lg A y  $\beta$ -Lg B mientras que el fenotipo heterocigoto presentó los resultados intermedios. Por otra parte, el contenido en  $\beta$ -Lg sat resultó significativamente superior en las leches  $\beta$ -Lg AA. En las leches que contienen el alelo B de  $\beta$ -Lg se observó además una mayor proporción relativa de  $\beta$ -Lg total (73,8 y 71,35% respectivamente para los grupos  $\beta$ -Lg BB y AB), siendo los valores medios significativamente diferentes de los determinados en el grupo  $\beta$ -Lg AA (60,7%). Los valores medios de  $\alpha$ -La y SA, en cambio, son superiores en leches  $\beta$ -Lg AA que en las que contienen la variante B.

Según estos resultados, en leche de oveja las proporciones relativas de las seroproteínas más importantes,  $\alpha$ -La y  $\beta$ -Lg, estarían a favor de la  $\alpha$ -La en leches  $\beta$ -Lg AA y a favor de la  $\beta$ -Lg en leches  $\beta$ -Lg BB ó AB. En leche de vaca estas relaciones se presentarían más bien a la inversa, de modo que  $\alpha$ -La/ $\beta$ -Lg es superior en leches  $\beta$ -Lg BB (Aaltonen y Antila, 1987; VandenBerg y col., 1990). También en leche de vaca, Marziali y Ng-Kwai-Hang (1986) observaron una relación positiva entre el rendimiento

quesero y el contenido en  $\alpha$ -La; según Kroeker y col. (1985) el contenido en  $\alpha$ -La está positivamente correlacionado con el contenido en caseínas de la leche.

En cuanto a los porcentajes relativos de las distintas fracciones caseínicas, solo se encontraron diferencias significativas en el contenido en  $\beta$ 1 +  $\kappa$ -CN, claramente inferior en el fenotipo AA mientras que el heterocigoto presentaría los valores medios superiores.

En leche de vaca, Aaltonen y Antila (1987) no encuentran relación entre los fenotipos de  $\beta$ -Lg y el contenido en proteína o caseína. En cambio, según Ng-Kwai-Hang y Monardes (1990) la leche de vaca que contienen la variante A de  $\beta$ -Lg se caracterizaría además por un mayor contenido en proteínas. Morini y col. (1982) y Schaar y col. (1985) establecieron una correlación entre la variante B de  $\beta$ -Lg y un incremento en el contenido en caseína; sin embargo, las leches que contienen la citada variante B presentarían un menor contenido de  $\beta$ -Lg total en leche (Mariani y col., 1984; Kristiansen, 1990). Mc Lean y col. (1984) encontraron diferencias significativas entre los fenotipos de  $\beta$ -Lg en relación con el contenido en en grasa, sólidos totales, proteína total, caseínas y seroproteínas totales,  $\beta$ -Lg y  $\alpha_{s2}$ -CN.

En leche de oveja de raza Manchega, Amigo (1989) ha demostrado que las leches  $\beta$ -Lg BB contienen más  $\beta$ 2-CN, mientras que las AA y AB presentaron un contenido superior en  $\alpha_{s1}$ -CN. En este estudio, en que se han analizado dos razas y un mayor número de muestras, se han encontrado valores semejantes a los de Amigo (1989), pero las diferencias no han sido significativas.

Por otra parte, como se observa en la tabla 4.17, las leches que contienen la  $\beta$ -Lg AA presentan las mejores propiedades de coagulación, que se asocian en gran parte al pH medio de estas leches (6,6) que, como se indicó anteriormente, está incluido en el intervalo de pH's óptimos para la coagulación; por ello, para el citado fenotipo se obtuvieron los valores medios significati-

vamente más bajos para el parámetro "r" y superiores para el "Am". En leche de vaca, Marziali y Ng-Kwai-Hang (1986b) han demostrado idéntico efecto; en cambio, Liberatori y col. (1990) y Rahali y Menard (1991) encuentran que el alelo B de  $\beta$ -Lg se asocia con mejores características lactodinamográficas.

En cuanto al rendimiento quesero es importante destacar que tanto antes como después de prensa se obtienen valores medios superiores con leches clasificadas como  $\beta$ -Lg AA, constituyendo la variante B la más desfavorable para quesería; este hecho ya se intuyó a partir del análisis de conglomerados. En cambio, para leche de vaca, Schaar y col. (1985) y VandenBerg y col. (1990) obtienen rendimientos superiores con leches  $\beta$ -Lg B; Graham y col. (1986) sostienen además que la leche conteniendo la variante B es preferible para la transformación en queso ya que se requieren tiempos menores para el corte de la cuajada.; por otra parte, Rahali y Menard (1991) han demostrado que la cuajada BB retiene más elementos constitutivos nobles de la leche (fundamentalmente, materias nitrogenadas y materia grasa).

Estos resultados se resumirían en que la leche con  $\beta$ -Lg AA sería la más adecuada para la fabricación de queso ya que, aunque el contenido en proteínas y en  $\beta$ -Lg se presenta más bajo que en los otros fenotipos, se han obtenido rendimientos queseros superiores. Según Losi y col. (1975) para quesería es aconsejable utilizar leche con un contenido más bien bajo en  $\beta$ -Lg.

Tabla 4.17. Comparación de los valores medios obtenidos para las variables analizadas en las muestras de leche agrupadas según los fenotipos de  $\beta$ -lactoglobulina.

Variable	Fenotipo de $\beta$ -lactoglobulina								
	AA			BB			AB		
	N	V. Medio	D.E.	N	V. Medio	D.E.	N	V. Medio	D.E.
Periodo lactación (días)	107	83,76	29,19	17	74,12	24,44	78	76,82	28,95
Grasa (%)	87	7,64	1,97	9	7,70	1,45	65	7,07	2,50
Proteínas (%)	87	5,89 <sup>a</sup>	0,90	9	6,16 <sup>b</sup>	0,70	65	5,48 <sup>c</sup>	0,74
Lactosa (%)	55	4,38	0,35	6	4,50	0,20	32	4,32	0,62
EST (%)	86	19,37 <sup>a</sup>	2,19	9	19,62 <sup>a</sup>	1,24	65	18,51 <sup>b</sup>	2,57
$\beta$ -Lg A (% rel.)	54	48,90 <sup>a</sup>	10,79	5	19,54 <sup>b</sup>	3,96	46	32,73 <sup>c</sup>	4,56
$\beta$ -Lg B (% rel.)	54	2,68 <sup>a</sup>	4,51	5	54,48 <sup>b</sup>	4,05	46	36,59 <sup>c</sup>	4,57
$\beta$ -Lg sat (% rel.)	54	9,11 <sup>a</sup>	7,98	5	1,00 <sup>b</sup>	1,38	46	2,03 <sup>b</sup>	3,05
Total $\beta$ -Lg (% rel.)	54	60,70 <sup>a</sup>	6,61	5	73,80 <sup>b</sup>	3,72	46	71,35 <sup>b</sup>	5,35
$\alpha$ -La (% rel.)	54	9,73 <sup>a</sup>	2,47	5	5,70 <sup>b</sup>	2,54	46	6,61 <sup>b</sup>	1,97
SA (% rel.)	54	27,72 <sup>a</sup>	6,38	5	21,02 <sup>b</sup>	2,76	46	21,26 <sup>b</sup>	6,11
$\beta$ -CN sat (% rel.)	54	1,23	2,59	5	0,00	0,00	46	0,49	1,40
$\beta$ 2-CN (% rel.)	52	24,64	7,30	4	27,47	1,82	40	24,94	8,92
$\beta$ 1- + $\kappa$ -CN (% rel.)	52	18,97 <sup>a</sup>	3,99	4	19,72 <sup>a,b</sup>	5,03	40	21,52 <sup>b</sup>	4,77
Total $\beta$ - + $\kappa$ -CN (% rel.)	54	44,34	7,74	5	43,08	10,11	46	45,14	12,45
$\alpha$ s1-CN (% rel.)	41	7,28	2,48	4	6,35	1,30	27	7,92	3,72
$\alpha$ s2-CN (% rel.)	41	22,53	5,05	4	21,15	2,48	27	22,66	4,26
$\alpha$ s1- + $\alpha$ s2-CN (% rel.)	48	29,47	7,74	4	27,50	3,20	40	29,47	9,86
$\alpha$ s3-CN (% rel.)	48	25,32	4,77	4	24,42	4,91	40	22,95	6,40
$\alpha$ s-CN SR (% rel.)	54	0,03	0,19	5	0,00	0,00	46	0,28	1,03
Total $\alpha$ s-CN (% rel.)	54	54,59	7,98	5	56,20	10,42	46	54,92	10,04
pH	102	6,66 <sup>a</sup>	0,17	15	6,68 <sup>a,b</sup>	0,12	79	6,73 <sup>b</sup>	0,22
Calcio (mg/l)	108	216,87 <sup>a,b</sup>	30,36	17	323,30 <sup>a</sup>	34,80	81	210,54 <sup>b</sup>	30,89
"r" (min)	96	3,59	2,27	16	3,40	2,81	76	3,22	1,71
"v" (min)	95	2,74 <sup>a</sup>	1,49	16	3,95 <sup>b</sup>	2,57	76	3,35 <sup>b</sup>	1,77
"Am" (mm)	101	62,67 <sup>a</sup>	9,53	17	58,79 <sup>b</sup>	10,41	76	59,82 <sup>b</sup>	8,14
Rto. APP (%)	72	50,57 <sup>a</sup>	7,28	10	44,04 <sup>b</sup>	9,10	61	46,86 <sup>b</sup>	6,66
Rto. DPP (%)	72	30,00 <sup>a</sup>	6,14	10	26,15 <sup>b</sup>	7,10	61	27,54 <sup>b</sup>	6,40

N: Número de muestras  
D.E.: Desviación estándar

Medias de cada variable con diferentes superíndices indican valores medios significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.2.2. INFLUENCIA DE LAS CASEÍNAS

En la tabla 4.18 se recogen los valores medios obtenidos para las variables analizadas en los grupos establecidos según los fenotipos de  $\alpha_s$ -CN. En esta misma tabla se indica el resultado del test de comparación de múltiples medias (Test de Student Newman Keuls) mediante aplicación del programa 7D de la serie BMDP.

En las muestras seleccionadas para el estudio de la aptitud quesera pertenecientes a cada uno de los tres fenotipos de  $\alpha_s$ -CN no se observaron diferencias significativas como consecuencia del periodo de lactación, con lo cual, se garantiza la no influencia de este factor, de importancia fundamental, como se ha visto anteriormente, en la composición láctea.

Los valores medios relativos a composición química han demostrado ser superiores en grasa y EST en los fenotipos de  $\alpha_s$ -CN con 4 bandas, siendo inferiores en los tipos caseínicos de 5-6 bandas y encontrándose valores intermedios para los de 3 bandas. Para el contenido en proteínas los resultados más favorables se obtuvieron para los fenotipos de 3 y 4 bandas.

No se han encontrado valores medios significativamente distintos en el porcentaje relativo de las distintas seroproteínas en los grupos de los distintos fenotipos de  $\alpha_s$ -CN. En cambio, y como ocurría en el caso explicado en el apartado anterior, se han determinado valores medios significativamente distintos para el porcentaje relativo de  $\beta_1 + \kappa$ -CN siendo inferior en los fenotipos de  $\alpha_s$  con 4 bandas que, como se explicará posteriormente presentaron las mejores aptitudes para quesería. Merece señalar que en la leches con el fenotipo AA de  $\beta$ -Lg (como se ha visto, el más apto para fabricación de queso) también se obtuvieron los valores medios inferiores para esta pareja de fracciones caseínicas. En leche de vaca, McLean y col. (1984) han descrito un efecto significativamente distinto para los genotipos de  $\alpha_{s1}$ -CN en cuanto al contenido en leche de  $\alpha_{s1}$  y  $\kappa$ -CN, sin encontrar

correlaciones con las restantes caseínas ni seroproteínas individuales ni con la composición química; Ng-Kwai-Hang y col. (1987) han demostrado un efecto de las variantes de  $\alpha_{s1}$ -CN bovina en las concentraciones en leche de  $\alpha_s$ -CN y  $\beta$ -Lg.

El rendimiento quesero ha demostrado ofrecer valores medios superiores en las leches que contienen la  $\alpha_s$ -CN tipificada a 4 bandas, si bien solamente en el rendimiento calculado después de prensa los valores medios en los tres grupos resultaron significativamente diferentes siendo el grupo de  $\alpha_s$ -CN con 4 bandas aquel que presentó las mejores características para quesería, y el de 5-6 bandas sería el fenotipo más desfavorable para esta transformación láctea.

**Tabla 4.18. Comparación de los valores medios obtenidos para las variables analizadas en las muestras de leche agrupadas según los fenotipos de  $\alpha$ -caseína.**

Variable	Fenotipo de $\alpha$ -caseína								
	3 bandas			4 bandas			5-6 bandas		
	N	V. Medio	D.E.	N	V. Medio	D.E.	N	V. Medio	D.E.
Periodo lactación (días)	167	80,20	28,94	26	85,35	29,33	9	66,78	23,39
Grasa (%)	131	7,36 <sup>a,b</sup>	2,12	22	8,22 <sup>a</sup>	2,26	8	6,06 <sup>b</sup>	2,44
Proteínas (%)	131	5,75 <sup>a</sup>	0,89	22	5,95 <sup>a</sup>	0,60	8	5,10 <sup>b</sup>	0,59
Lactosa (%)	76	4,35	0,49	15	4,47	0,22	2	4,30	0,31
EST (%)	130	18,99 <sup>a,b</sup>	2,31	22	19,90 <sup>a</sup>	2,16	8	17,36 <sup>b</sup>	2,57
$\beta$ -Lg A (% rel.)	85	40,86	13,14	13	40,18	9,85	7	35,44	3,84
$\beta$ -Lg B (% rel.)	85	20,30	19,11	13	14,47	17,43	7	28,43	12,94
$\beta$ -Lg sat (% rel.)	85	5,46	7,03	13	7,45	7,96	7	4,24	5,56
Total $\beta$ -Lg (% rel.)	85	66,36	7,57	13	62,09	10,91	7	68,11	6,82
$\alpha$ -La (% rel.)	85	8,01	2,74	13	9,32	2,94	7	7,97	2,74
SA (% rel.)	85	24,40	6,63	13	26,44	9,63	7	23,16	4,23
$\beta$ -CN sat (% rel.)	85	0,76	2,13	13	1,84	2,23	7	0,00	0,00
$\beta$ 2-CN (% rel.)	78	24,95	7,87	12	27,10	6,51	6	19,63	8,56
$\beta$ 1- + $\kappa$ -CN (% rel.)	78	20,64 <sup>a</sup>	4,61	12	17,17 <sup>b</sup>	3,32	6	18,45 <sup>a,b</sup>	2,26
Total $\beta$ - + $\kappa$ -CN (% rel.)	85	44,84	10,57	13	45,94	6,24	7	39,11	8,94
$\alpha$ s1-CN (% rel.)	64	7,51	3,05	3	6,07	0,67	5	7,76	2,75
$\alpha$ s2-CN (% rel.)	64	22,66	4,78	3	20,93	1,35	5	21,34	3,91
$\alpha$ s1- + $\alpha$ s2-CN (% rel.)	81	29,64	8,93	5	25,50	2,54	6	29,20	5,71
$\alpha$ s3-CN (% rel.)	81	24,12	5,85	5	25,56	2,33	6	24,97	4,20
$\alpha$ s-CN SR (% rel.)	85	0,00 <sup>a</sup>	0,00	13	0,00 <sup>a</sup>	0,00	7	2,09 <sup>b</sup>	1,95
Total $\alpha$ s-CN (% rel.)	85	54,37	10,83	13	53,00	6,86	7	56,17	8,10
pH	162	6,69	0,19	25	6,69	0,14	9	6,70	0,19
Calcio (mg/l)	170	214,75	31,86	27	220,83	28,39	9	217,16	31,51
"r" (min)	155	3,44	2,16	24	2,49	2,02	9	2,86	1,50
"v" (min)	154	3,16	1,81	24	2,65	1,54	9	3,11	1,45
"Am" (mm)	158	61,01	9,37	27	63,72	8,02	9	57,22	7,75
Rto. APP (%)	115	48,35	7,49	21	51,05	7,27	7	43,92	4,08
Rto. DPP (%)	115	28,50 <sup>a,b</sup>	6,37	21	31,24 <sup>a</sup>	6,20	7	23,61 <sup>b</sup>	5,06

N: Número de muestras  
D.E.: Desviación estándar

Medias de cada variable con diferentes superíndices indican valores medios significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

## **5. CONCLUSIONES**

## 5. CONCLUSIONES

1. Se ha detectado una nueva variante de  $\alpha_{s2}$ -caseína ovina en leche de oveja de raza Manchega, que se ha identificado mediante electroforesis bidimensional e inmunotransferencia. Dada la mayor movilidad, mediante electroforesis a pH alcalino, respecto a las otras caseínas se ha denominado  $\alpha_{s2}$  Super-rápida. La frecuencia calculada para esta variante ha resultado ser del 6%.

2. La electroforesis en gel de poliacrilamida a pH alcalino y el isoelectroenfoque han permitido una clasificación de las muestras de leche, en base al electroforegrama resultante, en siete tipos, que se diferencian por el número y la intensidad de bandas en la zona de las  $\alpha_s$ -caseínas.

3. Las caseínas de leche de oveja Segureña han mostrado menor heterogeneidad que las de la raza Manchega. No se ha encontrado la variante Welsh de  $\alpha_s$ -caseína en ninguna de las dos razas estudiadas.

4. Se ha observado polimorfismo genético en la fracción  $\beta$ -lactoglobulina con dos variantes: A y B. La frecuencia genotípica fue de 0,670 para la variante A y 0,330 para la variante B en la raza Segureña y 0,695 para la variante A y 0,305 para la variante B en la raza Manchega.

5. De las técnicas electroforéticas monodimensionales utilizadas para el análisis de proteínas de leche de oveja, el isoelectroenfoque ha proporcionado la mejor resolución y separación tanto en el caso de las caseínas como en el de las proteínas de suero. La electroforesis bidimensional y posterior inmunotransferencia ha permitido la identificación de las bandas que integran las distintas fracciones caseínicas y seroproteicas.

6. El estudio de los parámetros de coagulación, en las condiciones analíticas establecidas, ha permitido clasificar las muestras de leche en grupos atendiendo a los valores de tiempo de coagulación, velocidad de coagulación y elasticidad de cuajada. La mayoría de las muestras se hallan comprendidas en el intervalo de 3-4,5 min para el tiempo de coagulación, 55,9% en el intervalo de 1-3 min para la velocidad de coagulación y 39,57% en el intervalo 60-70 mm para la elasticidad máxima del coágulo.

7. El estado de lactación fue el factor que afectó en mayor medida la clasificación de las muestras en relación al rendimiento en queso, debido a su influencia en la composición de la leche. El contenido en calcio no afectó el rendimiento en queso, pero éste fue mayor para valores de pH de pH próximos a 6,6. Con respecto a las características del coágulo, el tiempo de coagulación fue independiente del rendimiento mientras que la velocidad de coagulación presentó valores inferiores y la elasticidad máxima del coágulo valores superiores en las muestras de mayor rendimiento.

8. Las muestras de leche con el fenotipo  $\beta$ -Lg AA presentaron mejores características de coagulación y mayor rendimiento quesero en comparación con las de los fenotipos AB y BB.

9. Las muestras de leche con el fenotipo  $\alpha_s$ -CN 4 bandas presentaron mayor rendimiento quesero en comparación con las de los fenotipos de 3, 5 y 6 bandas.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- AALTONEN, M.L.; ANTILA V. (1987). Milk renneting properties and the genetic variants of proteins. *Milchwissenschaft* 42, 490-492.
- ADDEO, F.; STINGO, C.; CHIANESE, L.; PETRILLI, P.; SCUDIERO, A. (1984). Riconoscimento del latte bovino nel formaggio Pecorino. *Il Latte* 9, 37-44.
- ADDEO, F.; MAURIELLO, R.; DI LUCCIA, A. (1988). A gel electrophoretic study of caprine casein. *Journal of Dairy Research* 55, 413-421.
- ADDEO, F.; MAURIELLO, R.; MOIO, L.; LAEZZA, P.; CHIANESE, L.; DI LUCCIA, A. (1992). Ovine casein variant identification using electrophoretic, immunochemical and chromatographic techniques. *Milchwissenschaft* 47, 283-287.
- AHMED, N.S.; HELAL, F.R.; ASKER, A.A.; MOFI, A.A.; HAGGAG, S. (1984). Relationships among some constituents and properties of ewe's milk. *Egyptian Journal of Food Science* 12, 155-157.
- ALAIS, C.; JOLLÉS, P. (1961). Étude comparée des caséino-glicopeptides formés par l'action de la présure sur les caséines des laits de vache, brevis et de chèvre. II. Étude de la partie nonpeptidique. *Biochimica et Biophysica Acta* 51, 315-322.
- ALAIS, C.; JOLLÉS, P. (1967). Isolation, purification and analysis of two  $\kappa$ -casein-like fractions from sheep casein. *Journal of Dairy Science* 50, 1555-1561.
- ALEANDRI, R.; SCHNEIDER, J.C.; BUTTAZZONI, L.G. (1989). Evaluation of milk for cheese production based on milk characteristics and Formagraph measures. *Journal of Dairy Science* 72, 1967-1975.
- ALEANDRI, R.; BUTTAZZONI, L.G.; SCHNEIDER, J.C.; CAROLI, A.; DAVOLI, R. (1990). The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-producing ability. *Journal of Dairy Science* 73, 241-255.
- ALIEV, G.A.; KOLOTEVA, R.S. (1975). Geneticheskoe raznoobrazie beta-laktoglobulina V moloke ovets. *Animal Breeding Abstracts* 43, 3340.
- AMBROSOLI, R.; DI STASIO, L.; MAZZOCCO, P. (1988). Content of  $\alpha_{s1}$ -casein and coagulation properties in goat milk. *Journal*

*of Dairy Science* 71, 24-28.

- AMIGO, L. (1989). Estudio de la fracción proteica de leche de oveja, cabra, vaca. Criterios analíticos para la determinación de mezclas de leche en quesos. *Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias.*
- ANIFANTAKIS, E.M. (1986). Comparison of the physico-chemical properties of ewes' and cows' milk. *Bulletin of the IDF* 202, 42-53.
- APARICIO, G. (1960). "Zootecnia Especial. Etnología Comparada". Ed. Córdoba. Córdoba.
- ARAVE, C.W.; GILLET, T.A.; PRICE, D.A.; MATTHEWS, D.H. (1973). Polymorphism in casein of sheep milk. *Journal of Animal Science* 36, 241-244.
- ASCHAFFENBURG, R.; DREWRY, J. (1955). Occurrence of different  $\beta$ -lactoglobulins in cow's milk. *Nature* 176, 218-219
- ASCHAFFENBURG, R.; DREWRY, J. (1959). New procedure for the routine determination of the various non-casein proteins of milk. *Proceedings of the 15th International Dairy Congress, London, 3*, 1631-1637.
- ASKAR, A.A.; HELAL, F.R.; AHMED, N.S.; HOFI, A.A.; HAGGAG, S. (1984). Effect of seasonal variations on physical properties, gross composition, nitrogen distribution, rennin coagulation time and heat stability of Egyptian ewe's milk. *Egyptian Journal of Food Science* 12, 143-148.
- ASSENAT, L. (1991). Leche de oveja. Composición y propiedades. "Leche y Productos lácteos. Vaca, oveja y cabra". 277-313.
- BAKER, C.M.A.; MANWELL, C. (1977). Heterocigosity of the sheep: polymorphism of "malic enzyme", isocitrate dehydrogenase (NADP+), catalase and esterase. *Australian Journal of Biological Sciences* 30, 127-140.
- BASCH, J.J.; DOUGLAS, F.W.Jr.; PROCINO, L.C.; HOLSINGER, V.H.; FARRELL, H.M.Jr. (1985). Quantitation of caseins and whey proteins of processed milks and whey proteins concentrates, application of gel electrophoresis, and comparison of Harland-Ashworth procedure. *Journal of Dairy Science* 68, 23-31.
- BECH, A.M.; MUNK, K.S. (1988). Studies on bovine milk protein polymorphism by electrofocusing in agarose gels containing 7 M urea. *Milchwissenschaft* 43, 230-232.

- BELL, K.; MCKENZIE, H.A. (1964).  $\beta$ -Lactoglobulins. *Nature* 204, 1275-1279.
- BELL, K.; MCKENZIE, H.A. (1967). The whey proteins of ovine milk:  $\beta$ -Lactoglobulins A and B. *Biochimica et Biophysica Acta* 147, 123-134.
- BELL, K.; MCKENZIE, H.A.; MURPHY, W.H.; SHADOW, D.C. (1970).  $\beta$ -Lactoglobulin Droughtmaster: a Unique Protein Variant. *Biochimica et Biophysica Acta* 214, 427-436.
- BLAKESLEY, R.W.; BOEZY, J.A. (1977). A new staining technique for proteins in polyacrilamide gels using Coomassie Brilliant Blue G-250. *Analytical Biochemistry* 82, 580-582.
- BOISNARD, M.; PETRISSANT, G. (1985). Complete sequence of ovine  $\alpha_{s2}$ -casein messenger RNA. *Biochimie* 67, 1043-1051.
- BONSING, J.; MACKINLAY, A.G. (1987). Recent studies on nucleotide sequences encoding the caseins. *Journal of Dairy Research* 54, 447-461.
- BOVENHUIS, H.; VERSTEGE, A.J.M. (1989). Improved method for phenotyping milk protein variants by isoelectric focusing using PhastSystem. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 43, 447-451.
- BRIGNON, G.; RIBADEAU-DUMAS, B.; MERCIER, J.C.; PÉLISSIER, J.P.; DAS, B.C. (1977). Complete aminoacid sequence of bovine  $\alpha_{s2}$ -casein. *FEBS Letters* 76, 274-279.
- BROOKS, I.B.; LUSTER, G.A.; EASTERLY, D.G. (1970). A procedure for the rapid determination of the major cations in milk by atomic absorption spectrophotometry. *Atomic Absorption Newsletter* 9, 93-94.
- CAJA, G. (1991). El concepto de calidad de la leche en España. El concepto de calidad de la leche de vaca y oveja en la CEE y en España. *Publicaciones de la FESLAC: Serie informes* 5, 57-68.
- CARIĆ, M.; DJORDJEVIĆ, J. (1971). The microelectrophoretic study of caseins. *Milchwissenschaft* 26, 487-489.
- CARRIEDO, J. A.; SAN PRIMITIVO, F. (1989). Mejora genética de la producción láctea. *Ovis* 3, 53-75.
- CHEESEMAN, G.C.; JEFFCOAT, J. (1970). The interaction of bovine milk caseins with the detergent sodium dodecil sulfate. 1. The relationship between the composition and teh size of the

protein-detergent aggregate. *Journal of Dairy Research* 37, 245-257.

CHIANESE, L.; MAURIELLO, R.; MOIO, L.; INTORCIA, N.; ADDEO, F. (1990a). Heterogeneity of sheep's casein by gel electrophoresis and immunological techniques. *Proceedings of the 23rd International Dairy Congress, Montreal, 1, 18.*

CHIANESE, L.; MAURIELLO, R.; MOIO, L.; INTORCIA, N.; CAMPUS, R.; ADDEO, F. (1990b). Casein characterization in the Sarda ovine race. *Proceedings of the 44th SIS Vet. National Congress. Stresa.*

CHIANESE, L.; D'ACIERNO, C.; MAURIELLO, R.; NIZZA, A.; DI MEO, C.; LUONGO, D. (1990c). Milk casein composition in caprine breed reared in Campania. *Zootecnica e Nutrizione Animale* 16, 419-425.

CHIANESE, L.; MAURIELLO, R.; INTORCIA, N.; MOIO, L.; ADDEO, F. (1992a). New  $\alpha_{s2}$ -casein variant from caprine milk. *Journal of Dairy Research* 59, 299-305.

CHIANESE, L.; MAURIELLO, R.; MOIO, L.; INTORCIA, N.; ADDEO, F. (1992b). Determination of ovine casein heterogeneity using gel electrophoresis and immunochemical techniques. *Journal of Dairy Research* 59, 39-47.

CHIOFALO, L.; MICARI, P.; GIRMENIA, A.M. (1986). Genetic polymorphism of locus  $\beta$ -lactoglobulin in Comisana sheep reared in Sicily. *Zootecnica e Nutrizione Animale* 12, 73-80.

CHIOFALO, L.; MICARI, P. (1987). Present knowledge on the variants of the milk proteins in the sheep populations reared in Sicily. Experimental observations. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* 58, 104-114.

CONTI, A.; GODOVAC-ZIMMERMANN, J.; PIRCHNER, F.; LIBERATORI, J.; BRAUNITZER, G. (1986). Pig  $\beta$ -lactoglobulin I (*Sus scrofa domestica*, *Artyodactyla*). The primary structure of the major component. *Biologische Chemie Hoppe-Seyler* 367, 871-878.

CORRADINI, C.; BERGAMASCHI, E. (1974). Effect of genetic variants on casein behaviour in enzymatic process. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* 25, 187-201.

DALGLEISH, G.; BRINKHUIS, J.; PAYENTS, T.A.J. (1981). The coagulation of different sized casein micelles by rennet. *European Journal of Biochemistry* 119, 257-261.

DALL'OLIO, S.; DAVOLI, R.; BOSI, P. (1989). Electrophoretic

research on milk proteins in sheep of the Sopravissana breed. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* 58, 104-114.

DALL'OLIO, S.; DAVOLI, R.; RUSSO, V. (1990). Affinity chromatography of ovine casein. *Journal of Dairy Science* 73, 1707-1711.

DAVOLI, R.; DALL'OLIO, S.; RUSSO, V. (1985). Polimorfismo delle proteine del latte nella razza ovina delle Langue. *Atti VI Congresso Nazionale ASPA*, 349.

DILANIAN, Z.H. (1969). Properties of cow's, ewe's and buffaloes' milk in the Socialist Sovietic Republic of Armenia. *Bulletin of the IDF*, part 4.

DI LUCCIA, A.; MAURIELLO, R.; ADDEO, F. (1986). Identification of caprine casein variants by electrophoretic techniques. *Protides of the Biological Fluids* 34, 903-905.

DI STASIO, L. (1983). New phenotypes of  $\alpha_s$ -casein in sheep. *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics* 14, 229-232.

DIXON, W.J. (1988). *BMDP Statistical Software Manual*. University of California Press, Los Angeles.

EIGEL, W.N.; BUTLER, J.E.; ERNSTROM, C.A.; FARRELL, H.M. Jr.; HARWALKAR, V.R.; JENNESS, R.; WHITNEY, R. McL. (1984). Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision. *Journal of Dairy Science* 67, 1599-1631.

EL-NEGOUMI, A.M. (1972). Effect of polymorphic composition of calcium caseinate soils on their stability to rennin. *Journal of Dairy Research* 39, 373-379.

EL-NEGOUMI, A.M.; BURFENING, P.J. (1972). Polymorphic composition of ewe's casein and whey proteins. *Journal of Dairy Science* 55, 673.

EMMONS, D.B. (1988). Cheese yield. *Annual Sessions IDF, Budapest*. F-Doc 156.

ERHARDT, G. (1989). Evidence for a third allele at the  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -Lg) locus of sheep milk and its occurrence in different breeds. *Animal Genetics* 20, 197-204.

ERHARDT, G.; GODOVAC-ZIMMERMANN, J.; CONTI, A. (1989). Isolation and complete primary sequence of a new ovine wild-type  $\beta$ -lactoglobulin C. *Biologische Chemie Hoppe-Seyler* 370, 757-762.

- ESPEJO-DÍAZ, M. (1989). Sistemas de producción. Objetivos de la mejora genética. *Ovis* 3, 9-19.
- FEAGAN, J.T.; BAILEY, L.F.; HEHIR, A.F.; McLEAN, D.M.; ELLIS, N.J.S. (1972). Coagulation of milk proteins. I. Effect of genetic variants of milk proteins on rennet coagulation and heat stability of normal milk. *Australian Journal of Food Dairy Technology* 27, 129-134.
- FERNÁNDEZ-ESPLÁ, M.D.; LÓPEZ-GÁLVEZ, G.; RAMOS, M. (1993). Isolation of ovine  $\beta$ -lactoglobulin genetic variants. Heterogeneity of  $\beta$ -lactoglobulin A. *Chromatographia*. (Enviado para publicación).
- FOSS ELECTRIC, A/S. Formagraph. Manual de instrucciones.
- FOX, K.K.; HOLSINGER, V.H.; POSATI, L.P.; PALLANSCH, M.J. (1967). Separation of  $\beta$ -lactoglobulin from other milk serum proteins by trichloroacetic acid. *Journal of Dairy Science* 50, 1363-1367.
- FOX, F.P. (1982). "Developments in Dairy Chemistry". Ed. F.P. Fox. Applied Science Publishers. London & New York.
- FOX, F.P. (1992). "Advanced Dairy Chemistry. I. Proteins". Ed. F.P. Fox. Elsevier Applied Science. London & New York.
- FRENTZ, R.; DREUILHE, M. (1965). Application de la thrombélastographie de Hartert a l'étude de la coagulation du lait. *Le Lait* 45, 489-508.
- GALLEGO, L.; MOLINA, M.P.; TORRES, A.; CAJA, G. (1983). Evolución de la cantidad y composición de leche de ovejas de raza Manchega desde el parto. *III Symposium Internacional de Ordeño Mecánico de pequeños rumiantes, Valladolid*. Ed. Server-Cuesta 285-300.
- GAYE, P.; HUE-DELAHAIE, D.; MERCIER, J.C.; SOULIER, S.; VILOTTE, J.L.; FURET, J.P. (1986). Ovine  $\beta$ -lactoglobulin messenger RNA: nucleotide sequence and mRNA levels during functional differentiation of the mammary gland. *Biochimie* 68, 1097-1107.
- GIBSON, P. (1989). Altering milk composition through genetic selection. *Journal of Dairy Science* 72, 2815-2825.
- GODOVAC-ZIMMERMANN, J.; CONTI, A.; LIBERATORI, J. BRAUNITZER, G. (1985). The amino-acid sequence of  $\beta$ -lactoglobulin II from horse colostrum (*Equus caballus*, *Perissodactyla*):  $\beta$ -lactoglobulins are retinol-binding proteins.

*Biologische Chemie Hoppe-Seyler* 366, 601-608.

- GODOVAC-ZIMMERMANN, J.; BRAUNITZER, G. (1987). Modern aspects of the primary structure and function of  $\beta$ -lactoglobulins. *Milchwissenschaft* 42, 294-297.
- GRAHAM, E.R.B.; MCLEAN, D.M.; ZVIEDRANS, P. (1986). Effect of milk proteins genotypes on cheesemaking. *Proceedings of the 22nd International Dairy Congress, The Hague*, 86.
- GRANDISON, A.S.; FORD, G.D.; OWEN, A.J.; MILLARD, D. (1984). Chemical composition and coagulation properties of rennetes Friesian milk during the transition from winter rations to spring grazing. *Journal of Dairy Research* 51, 69-78.
- GRIPON, J.C.; DESMAZEAUD, M.J.; LE BARS, D. BERGÈRE, J.L. (1975). Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. II. Influence de la presure commerciale. *Le Lait* 55, 502-516.
- GROSCLAUDE, F. (1979). Polymorphism of milk proteins: some biochemical and genetical aspects. *Proceedings of the 16th International Conference on Animal Bloods Groups and Biochemical Polymorphism, Leningrad* 1, 54-92.
- GROSCLAUDE, F. (1988). Genetic polymorphism in the main milk proteins in cattle. Relationship with milk yield, composition and suitability for cheese production. *Productions Animales, INRA* 1, 5-17.
- HILLIER, R.M. (1976). The quantitative measurement of whey proteins using polyacrilamide-gel electrophoresis. *Journal of Dairy Research* 43, 259-265.
- JAKOB, E.; PUHAN, Z. (1986). Differences between slow-renneting and normal-renneting milk, with particular reference to the casein fraction. *Schweizerische Milchwirtschaftliche Forschung* 15, 27-29.
- JAKOB, E.; PUHAN, Z. (1992). Technological properties of milk as influenced by genetic polymorphism of milk proteins. A review. *International Dairy Journal* 2, 157-178
- JENNES, R. (1982). "Developments in Dairy Chemistry". Ed. P.F. Fox. Applied Science Publishers. New York.
- JIMÉNEZ-PÉREZ, S; GOICOECHEA, A.; ROMERO, C.; FALAGÁN, A.; GONZÁLEZ, C. (1991). Technological aptitude and cheese yield of goat's milk. *Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel* 13, 83-88.

- JOHKE, T.; HAGEMAN, E.C.; LARSON, B.L. (1964). Some immunological relationships of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in milk from various species. *Journal of Dairy Science* 47, 28-31.
- JOSEPHSON, R.V. (1972). Isoelectric focusing of bovine milk caseins. *Journal of Dairy Science* 55, 1535-1543.
- JUÁREZ, M.; MARTÍNEZ-CASTRO, I. (1978). Ensayos de utilización del equipo Milko-Scan 203 para la determinación de grasa, proteínas, lactosa y sólidos de la leche. *Revista Española de Lechería* 110, 203-212.
- JUÁREZ, M.; MARTÍNEZ-CASTRO, I. (1979). Determinación de sodio, potasio, calcio, magnesio, hierro, cobre, zinc y manganeso en leche del mercado, por espectrofotometría de absorción atómica. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* 19, 45-54.
- JUÁREZ, M.; RAMOS, M. (1984). Dairy products from ewe's and goat's milk. *Dairy Industries International* 49, 20-24.
- JUÁREZ, M.; RAMOS, M.; GOICOECHEA, A.; JIMÉNEZ-PÉREZ, S. (1984). Main components, nitrogen fractions and mineral elements of Manchega ewe's milk. *Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel* 8, 143-146.
- JUÁREZ, M. (1985). Composición y factores de variabilidad de la leche. *Alimentación, Equipos y Tecnología* 4, 47-56.
- KING, J.W.B. (1966). The casein of sheep's milk. *Polymorphisme biochimique des animaux, INRA, París*, 427-431.
- KING, J.W.B. (1969). The distribution of sheep  $\beta$ -lactoglobulins. *Animal Production* 11, 53-57.
- KOLDE, H.J.; BRAUNITZER, G. (1983). The primary structure of ovine  $\beta$ -lactoglobulin. 1. Isolation of the peptides and sequence. *Milchwissenschaft* 38, 18-20.
- KRAUSE, I. (1989). Reference Method for the detection of cow's milk casein in cheeses made from ewe's milk. *Working Paper Introduced by the German Delegation, April, 12th*. (Publicado en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas el 20-3-92).
- KRAUSE, I. (1991). Modification of the Reference Method for the detection of milk whey proteins in ewe's milk cheese. *Working Paper Introduced by the German Delegation, April, 12th*.

- KROEKER, E.M.; NG-KWAI-HANG, K.F.; HAYES, J.F.; MOXLEY, J.E. (1985). Effect of  $\beta$ -lactoglobulin variants and environmental factors on variation in the detailed composition of bovine milk serum proteins. *Journal of Dairy Science* 68, 1637-1641.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- LEDDA, A.; ARRIZZA, S. (1974). Relationships between California Mastitis Test and cell count of ewes' milk. I. Relationships between CMT and direct leucocyte count. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* 25, 112-119.
- LENOIR, J.; SCHNEID, N. (1990). La aptitud de la leche a la coagulación por el cuajo. "El queso". Ed. Omega. Barcelona. 126-136.
- LIBERATORI, J.; TAMBONE, C.; FINZI, A.V.; BOLLA, P.; CAROLI, A.; BARDIN, M.G. (1990). Piedmontese cow milk: protein composition and clotting aptitude evaluation. *Proceedings of the 23rd International Dairy Congress, Montreal, 1, 61.*
- LÓPEZ-GÁLVEZ, G.; AMIGO, L.; RAMOS, M.; JUÁREZ, M. (1990). Polimorfismo genético en proteínas lácteas de diferentes razas. *Proceedings of the 23rd International Dairy Congress, Montreal, 1, 33.*
- LÓPEZ-GÁLVEZ, G.; AMIGO, L.; RAMOS, M.; JUÁREZ, M. (1991). Estudio de las variantes genéticas de seroproteínas de leche de oveja mediante técnicas electroforéticas. XX Reunión Científica del GCTA, San Sebastian.
- LOSI, G.; CAPELLA, P.; CASTAGNETTI, G.B.; GRAZIA, L.; ZAMBONELLI, C.; MARIANI, P.; RUSSO, V. (1973). Effect of genetic variants of  $\kappa$ -casein on the formation and characteristics of curd. *Scienza e Tecnologia degli Alimenti* 3, 373-374.
- LOSI, G.; CASTAGNETTI, G.B.; MORINI, D. (1975). Importance of genetic variants of milk proteins for the dairy industry. *Il Mondo del Latte* 29, 727-739.
- LOSI, G.; MARIANI, P. (1984). Technological importance of milk protein polymorphism in manufacturing Grana cheese. *L'Industria del Latte* 20, 23-53.
- MÁCHA, J.; HORÁK, F. (1972). Studies in the polymorphism of protein in ewe's milk. *Acta Universitatis Agriculturae, Facultas Agronomica, Brno, Cechoslovenia* 20, 113.

- MÁCHA, J.; NOVACKOVA, I. (1974). Geneticky polymorfismos beta-laktoglobulinu V mléce ovci. *Zivocisna Vyroba* 19, 883-888.
- MÁCHA, J.; DVORÁK, J.; MAŠKOVÁ, V.; VILIŠOVÁ, H. (1974). Study of differences in the genetic polymorphous types of milk and this curdling capacity. *Acta Universitatis Agriculturae, Facultas Agronomica, Brno, Cechoslovenia* 22, 739-746.
- MacQUEEN, J.B. (1967). Some methods for classification and analysis of multivariate observations. *Proceedings of 5th Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability 1, Berkeley, CA. University of California Press*, 281-297.
- MAHE, M.F. (1981). Analyse biochimique de deux variants de caseine bovine. *Tesis Doctoral. Centre D'Orsay. Universidad de Paris-Sud*.
- MAHIEU, H.; LE JAOUEN, J.C.; LUQUET, F.M.; MOUILLET, L. (1977). Étude de la composition et de la contamination de laits des espèces laitières bovines, ovines et caprines. *Le lait* 57, 287-300.
- MANFREDINI, M.; TASSINARI, M.; ZARRI, M.C. (1992). Physico-chemical characteristics and coagulation properties of milk from individual ewes. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* 43, 113-125.
- MAO, F.C.; BREMEL, R.D. (1991). Enzyme-linked immunosorbent assays for bovine  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in serum and tissue culture media. *Journal of Dairy Science* 74, 2946-2951.
- MAPA (1991). "Manual de Estadística Agraria". Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- MARÇAIS, M.H. (1965). Emploi de la thrombélastographie pour l'étude de la coagulation du lait. *Le Lait* 45, 241-250.
- MARIANI, P.; LOSI, G.; RUSSO, V.; CASTAGNETTI, G.B.; GRAZIA, L.; MORINI, D.; FOSSA, E. (1976). Caseification tests made with milk characterized by variants A and B of  $\kappa$ -casein in the production of Parmigiano-Reggiano cheese. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* 27, 208-227.
- MARIANI, P.; LEONI, M. (1985). Milk coagulation time in relation to genetic variants of  $\beta$ - and  $\kappa$ -casein. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma* 5, 185-195.
- MARZIALI, A.S.; NG-KWAI-HANG, K.F. (1986a). Relationships between

- milk protein polymorphism and cheese yielding capacity. *Journal of Dairy Science* 69, 1193-1201.
- MARZIALI, A.S.; NG-KWAI-HANG, K.F. (1986b). Effects of milk composition and genetic polymorphism on coagulation properties of milk. *Journal of Dairy Science* 69, 1793-1798.
- MARZIALI, A.S.; NG-KWAI-HANG, K.F. (1986c). Effects of milk composition and genetic polymorphism on cheese composition. *Journal of Dairy Science* 69, 2533-2542.
- MATI, A.; GIRARDET, J.M.; XENAKIS, D.; LINDEN, G. (1991). Isolation and characterization of proteose-peptone hydrophobic fractions of cow's, ewe's and goat's milk. *Le Lait* 71, 259-273.
- MAURIELLO, R.; ADDEO, F.; PIERAGOSTINI, E.; BUFANO, G. (1990). Casein polymorphism in Altamura sheep breed. *Scienza e Tecnica Lattiero-casearia* 41, 357-364.
- MCLEAN, D.M.; SCHAAR, J. (1989). Effect of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\kappa$ -casein genetic variants and concentration on syneresis of gels from renneted heated milk. *Journal of Dairy Research* 56, 297-301.
- MCMAHON, D.J.; BROWN, R.J. (1982). Evaluation of Formagraph for comparing rennet solutions. *Journal of Dairy Science* 65, 1639-1642.
- MERCIER, J.C.; MAUBOIS, J.L.; POZNANSKI, S.; RIBADEAU-DUMAS, B. (1968). Fractionnement préparatif des caséines de vache et de brebis par chromatographie sur D.E.A.E. cellulose en milieu urée et 2-mercaptoéthanol. *Bulletin de la Société de Chimie Biologique* 50, 521-530.
- MERCIER, J.C.; GROSCLAUDE, F.; RIBADEAU-DUMAS, B. (1971). Primary structure of bovine  $\alpha_{s1}$ -casein. Complete sequence. *European Journal of Biochemistry* 23, 41-51.
- MERCIER, J.C.; GAYE, P.; SOULIER, S.; HUE-DELAHAIE, D.; VILOTTE, J.L. (1985). Construction and identification of recombinant plasmids carrying cDNAs coding for ovine  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\kappa$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin. Nucleotide sequence of  $\alpha_{s1}$ -casein cDNA. *Biochimie* 67, 959-971.
- MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE DE FRANCIA (1974). Contrôle de la qualité des produits laitiers. Tomo 1: "Analyse physique et chimique".
- MIŠIĆ, D.; PETROVIĆ, D. (1976). Main compositional characte-

ristics of ewes' milk in the Rtjanj pasture area with particular regards to minerals. *Radovi Poljoprivrednog Fakulteta Univerziteta u Sarajevu* 24, 603-612. (Tomado de DSA 38, 7515).

MOCQUOT, C.; ALAIS, C.; CHEVALIER, R. (1954). Abnormalities in the rennet coagulation of milk. *Annales Technologie Agricole* 3, 1-44.

MOIO, L.; CHIANESE, L.; DI LUCCIA, A.; MAURIELLO, R.; STINGO, C.; ADDEO, F. (1989a). Identification of casein variants by immunoblotting. *Electrophoresis forum'89, München*. Ed. B.J. Radola. 475-478.

MOIO, L.; DI LUCCIA, A.; ADDEO, F. (1989b). Fast isoelectric focusing of milk proteins on small ultrathin polyacrylamide gels containing urea. *Electrophoresis* 10, 533-535.

MORINI, D.; LOSI, G.; CASTAGNETTI, G.B.; MARIANI, P. (1979). Properties of ripened cheese in cheesemaking experiments with milk characterized by  $\kappa$ -casein variants A and B. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* 30, 243-262.

MORINI, D.; CASTAGNETTI, G.B.; CHIAVARI, C.; GRAZIA, L.; LOSI, G.; DAVOLI, R.; BOSI, P. (1982). Caseification tests carried out with milk characterized by variants A and B of  $\beta$ -lactoglobulin in the production of Parmigiano-Reggiano. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* 33, 475-492.

MORR, C.V. (1967). Effect of urea upon the physical properties of  $\beta$ -lactoglobulins A and B. *Journal of Dairy Science* 50, 1752-1759.

NG-KWAI-HANG, K.F.; HAYES, J.F.; MOXLEY, J.E.; MONARDES, H.G. (1987). Variations in milk proteins concentrations associated with genetic polymorphism and environmental factors. *Journal of Dairy Science* 70, 563-570.

NG-KWAI-HANG, K.F. (1990). Protein composition of milk and cheesemaking. *Modern Dairy* 2, 14-15.

NG-KWAI-HANG, K.F.; MONARDES H.G. (1990). Association between genetic polymorphism and milk production and composition. *Proceedings of the 23rd International Dairy Congress, Montreal*, 1, 65.

NIJHUIS, H.; KLOSTERMEYER, H. (1975). Partial fractionation of whole casein by affinity chromatography. *Milchwissenschaft* 30, 530-531.

- NÚÑEZ, M.; MEDINA, M.; GAYA, P. (1989). Ewes' milk cheese: technology, microbiology and chemistry. *Journal of Dairy Research* 56, 303-321.
- OKIGBO, L.M.; RICHARDSON, G.H.; BROWN, R.J.; ERNSTROM, C.A. (1985a). Variation in coagulation properties of milk from individual cows. *Journal of Dairy Science* 68, 822-839.
- OKIGBO, L.M.; RICHARDSON, G.H.; BROWN, R.J.; ERNSTROM, C.A. (1985b). Effects of pH, calcium chloride, and chymosin concentration on coagulation properties of abnormal and normal milk. *Journal of Dairy Science* 68, 2527-2533.
- OKIGBO, L.M.; RICHARDSON, G.H.; BROWN, R.J.; ERNSTROM, C.A. (1985c). Interactions of calcium, pH, temperature, and chymosin during milk coagulation. *Journal of Dairy Science* 68, 3135-3142.
- PAGNACCO, G.; CAROLI, A. (1987). Effect of casein and  $\beta$ -lactoglobulin genetic variants on renneting properties of milks. *Journal of Dairy Research* 54, 479-485.
- PHARMACIA-LKB, A/S. PhastSystem: Users Manual. Separation Technique File. Development Technique File.
- POLITIS, I.; NG-KWAI-HANG, K.F. (1988a). Association between somatic cell count of milk and cheese-yielding capacity. *Journal of Dairy Science* 71, 1720-1727.
- POLITIS, I.; NG-KWAI-HANG, K.F. (1988b). Effects of somatic cell count and milk composition on the coagulation properties of milk. *Journal of Dairy Science* 71, 1740-1746.
- PYNE, G.T. (1962). Some aspects of the physical chemistry of the salts of milk. *Journal of Dairy Research* 29, 101-130.
- RAHALI, V.; MENARD, J.L. (1991). Effect of genetic variants of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\kappa$ -casein on milk composition and cheesemaking aptitude. *Le Lait* 71, 275-297.
- RAMOS, M.; MARTÍNEZ-CASTRO, I.; JUÁREZ, M. (1977). Detection of cow's milk in Manchego cheese. *Journal of Dairy Science* 60, 870-877.
- RAMOS, M. (1987). Electroforesis y técnicas relacionadas. Estado actual. *Boletín Informativo del GCTA* 8, 5-13.
- RAMPILLI, M.; CAROLI, A.; BOLLA, P.; PIRLO, G. (1988). Relationships of milk protein genotypes with casein composition and rennetability of milk during lactation.

- REINBOLD, R.S. (1990). Factors that affect cheese yield. *Modern Dairy* 69, 10-11.
- REMEUF, F.; LENOIR, J. (1986). Relationships between the physico-chemical characteristics of goat's milk and its rennetability. *Bulletin of the International Dairy Federation* 202, 68-72.
- RIBADEAU-DUMAS, B. (1988). Structure and variability of milk proteins. "Milk Proteins. Nutritional, clinical, functional and technological aspects". Ed. Barth & Schlimme. New York. 112-123.
- RICHARDSON, B.C.; CREAMER, L.K. (1976). Comparative micelle structure. V. The isolation and characterization of the major ovine caseins. *New Zealand Journal of Dairy Science Technology* 11, 46-53.
- ROBERTSON, N.H. (1983). The effect of certain characteristics of milk on its rennetability and on the rate of syneresis. *Miles annual cheesemakers symposium, Cape Town*, 1-18.
- ROBITAILLE, G.; MONARDES, H.; LÉGARÉ, M.; NG-KWAI-HANG, K.F. (1990). N-acetylneuraminic content of bovine  $\kappa$ -casein. *Proceedings of the 23rd International Dairy Congress, Montreal*, 1, 298.
- ROBITAILLE, G.; NG-KWAI-HANG, K.F.; MONARDES, H. (1991). Variation of N-acetyl-neuraminic acid content of bovine  $\kappa$ -casein. *Journal of Dairy Science* 58, 107-114.
- RODRÍGUEZ, E.; MARTÍN, R.; GAECÍA, T.; HERNÁNDEZ, P.E.; SANZ, B. (1990). Detection of cows' milk in ewes' milk and cheese by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of Dairy Research* 57, 197-205.
- ROSSI, J.; CLEMENTI, F. (1984). Polimorfismo genetico delle caseine del latte di pecora: rilievi preliminari in allevamenti locali. *Annali della Facoltà di Agraria* 38, 101-108.
- RUIZ-MARTÍNEZ, E.; SANTILLANA-LÓPEZ, I. (1986). Determinación de mezclas de leche de vaca, cabra y oveja por isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida. *Alimentaria* 171, 55-64.
- RUSSO, V.; DAVOLI, R.; MIGLIORI, L. (1981). Polimorfismo genetico delle proteine del latte nelle pecore di razza Sarda e

Massese. *Zootecnica e Nutrizione Animale* 6, 421-428.

RUSSO, V.; DAVOLI, R. (1983). Polimorfismo delle proteine del latte ovino e caprino. *Convenio Nazionale SIPAOC* 5, 541.

SÁNCHEZ-BELDA, A.; SÁNCHEZ-TRUJILLANO, M.C. (1986). "Razas Ovinas Españolas (2ª ed.). Publicaciones de Extensión Agraria. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.

SARTORE, G.; DI STASIO, L. (1984). Prospects for the selection of dairy cattle on the basis of frequencies of specific genetic variants. *L'Industria del Latte* 20, 55-56.

SCHAAR, J. (1984). Effects of kappa-casein genetic variants and lactation number on the renneting properties of individual milk. *Journal of Dairy Research* 51, 397-406.

SCHAAR, J.; HANSSON, B.; PETERSON, H.E. (1985a). Effects of genetic variants of  $\kappa$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin on cheesemaking. *Journal of Dairy Research*. 52, 429-437.

SEIBERT, B.; ERHARDT, G.; SENFT, B. (1985). Procedure for simultaneous phenotyping of genetic variants in cow's milk by isoelectric focusing. *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics* 16, 183-191.

SHERBON, J.W.; LEDFORD, R.A.; REGENSTEIN, J.; THOMPSON, M.P. (1967). Variants of milk proteins and their possible relation to milk properties. *Journal of Dairy Science* 50, 951.

SOULIER, S.; RIBADEAU-DUMAS, B.; DENAMUR, R. (1975). Purification des caséines  $\kappa$  de brevis. *European Journal of Biochemistry* 50, 445-452.

STAMBEKOV, S. Zh.; SHAPIRO, Y.U.O.; MANDRUSOVA, E.E.; ROMANYUK, N.A. (1974). Polymorphism of milk proteins in Latvian Darkheaded ewes. *Sbornik Rabot Leningradskii Veterinarnyi Institut* 35, 125-126. (Tomado de DSA 39, 1100).

STORRY, J.E.; FORD, G.D. (1982a). Development of coagulum firmness in renneted milk-a two-phase process. *Journal of Dairy Research* 49, 343-346.

STORRY, J.E.; FORD, G.D. (1982b). Some factors affecting the post clotting development of coagulum strength in renneted milk. *Journal of Dairy Research* 49, 469-477.

STORRY, J.E.; GRANDISON, A.S.; MILLARD, D.; OWEN, A.J.; FORD, G.D. (1983). Chemical composition and coagulation properties

of renneted milks from different breeds and species of ruminant. *Journal of Dairy Research* 50, 215-229.

TARODO DE LA FUENTE, B.; ALAIS, C.; FRENTZ, R. (1969). Etude de la coagulation du lait par la présure et de la synérèse du coagulum par la méthode thrombélastographique. *Le Lait* 49, 400-416.

TERVALA, H.L.; ANTILA, V.; SYVÄJÄRVI, J.; LINDSTRÖM, U.B. (1983) Variations of the renneting properties of milk. *Meijertieteellinen Aikakauskirja* 41, 24-33.

TERVALA, H.L.; ANTILA, V.; SYVÄJÄRVI, J. (1985). Factors affecting the renneting properties of milk. *Meijertieteellinen Aikakauskirja* 43, 16-25.

THOMAS, A.S.; DAWE, S.T.; WALKER, R.A. (1989). Milk protein polymorphism in Hyfer and Border Leicester X Merino sheep. *Milchwissenschaft* 44, 686-688.

THOMASOW, J.; VOSS, E. (1976). Methods for the determination of the firmness of milk coagulum. *Bulletin of the IDF* 99, 1-7.

TRIEU-CUOT, P.; GRIPON, J.C. (1981). Electrophoretic and two-dimensional electrophoresis of bovine caseins. *Journal of Dairy Research* 48, 303-310.

TUTTA, C.; CURIONI, A.; PERUFFO, A.D.B. (1991). A two-dimensional electrophoretic method for the study of caprine  $\alpha_{s1}$ - and  $\alpha_{s2}$ -casein polymorphism. *Journal of Dairy Research* 58, 247-250.

URIEL, J. (1966). Méthode d'électrophorèse dans des gels d'acrylamide-agarose. *Bulletin de la Société de Chimie Biologique* 48, 969-982.

VALLEJO, M.; SÁNCHEZ-GARCÍA, L.; IGLESIAS, A. (1989). Anotaciones filogenéticas de las razas ovinas autóctonas españolas. *AYMA* 29, 151-157.

VANDEBERG, G.; ESCHER, J.T.M.; BOVENHUIS, H.; DE KONING, P.J. (1990). Genetic variants of milk proteins (I). Composition of bulk milk and whey. Genetic variants of milk proteins (II). Processing properties of bulk milk. *Proceedings of the 23rd International Dairy Congress, Montreal*, 1, 79.

VANDEWEGHE, J. (1990). El rendimiento quesero. Predeterminación y medida. "El queso". Ed. Omega. Barcelona. 425-432.

VEGARUD, G.E.; MOLLAND, T.S.; BROVOLD, M.J.; DEVOLD, T.G.;

ALESTRØM, P.; STEINE, T.; ROGNE, S.; LANGSRUD, T. (1989). Rapid separation of genetic variants of caseins and whey proteins using urea-modified gels and fast electrophoresis. *Milchwissenschaft* 44, 689-691.

VEGARUD, G.E.; ALESTRØM, P.; HENRIKSEN, B.O.; LIEN, S.; ROGNE, S.; STEINE, T.; ØYAAS, J.; LANGSRUD, T. (1990). Genetic variants of milk proteins and the influence on quality of raw milk and cultures milk products. *Proceedings of the 23rd International Dairy Congress, Montreal*, 1, 91.

VELEV, S. (1986). Nitrogen composition and casein fractions of milk from native Stara Zagora sheep. *Zhivotnov dni Nauki* 23, 9-12.

WINTER, A.; EK, K.; ANDERSON, U. (1977). Analytical electrofocusing in thin layers of polyacrylamide gels. *LKB-Produkter AB. Application Note* 250, 1-13.

ZANNONI, M.; ANNIBALDI, S. (1981). Standardization of the renneting ability of milk by Formagraph. I. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* 32, 79-94.

ZANNONI, M.; MONGARDI, M.; ANNIBALDI, S. (1981). Standardization of the renneting ability of milk by Formagraph. Note II. Data processing. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* 32, 153-164.