



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE CIENCIA ANIMAL Y DE LOS ALIMENTOS

Trabajo presentado para la superación de los 15 créditos del Módulo Trabajo Fin de Master del
Máster Oficial en Calidad de Alimentos de Origen Animal

**Estudio de los efectos del polimorfismo genético de la β -caseína sobre las propiedades de
coagulación enzimática de la leche**

Isabel Trinidad Llactahuamani Huillca

31 /Agosto/ 2021

Declaro ser la autora de este Trabajo Fin de Máster que se presenta para obtener el grado de Maestría en Calidad de Alimentos de Origen Animal en la Universidad Autónoma de Barcelona, España. Este trabajo no ha sido presentado antes para obtener ningún grado o examen en cualquier otra universidad.

Isabel Trinidad LLactahuamani Huilca

Bellaterra, 31 de agosto de 2021.

Antonio José Trujillo Mesa, Catedrático de Universidad y Bibiana Juan Godoy, Profesora Agregada del Departament de Ciència Animal i dels Aliments, de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona,

INFORMAN:

Que el trabajo realizado de investigación titulado “**Estudio de los efectos del polimorfismo genético de la beta-caseína sobre las propiedades de coagulación enzimática de la leche**” ha sido realizado bajo nuestra supervisión dentro del módulo Trabajo de Fin de Máster del Máster Oficial de Calidad de Alimentos de Origen Animal de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Y para que así conste firman el presente documento en Bellaterra a 31 de agosto de 2021.

Dra. Bibiana Juan Godoy

Dr. Antonio-José Trujillo Mesa

Agradecimientos

Agradezco el apoyo financiero brindado por el gobierno peruano a través del PRONABEC. También agradezco a mis tutores del TFM, profesores de los diferentes cursos, amigos y compañeros a quienes les deseo lo mejor de la vida.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis multifactorial de varianza
β -CN	Beta caseína
BCM-7	β -casomorfino-7
β -Lg	Beta-Lactoglobulina
CF ₃₀	Firmeza de la cuajada a los 30 min
CN	Caseína
ES	Extracto seco
κ -CN	Kappa caseína
min	Minutos
RCF	Tasa de agregación micelar
RCT	Tiempo de coagulación

ÍNDICE

Resumen	7
Abstract	8
1. INTRODUCCIÓN	9
2. MATERIALES Y MÉTODOS	11
2.1. OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA LECHE	11
2.2. COMPOSICIÓN DE LAS LECHEs	11
2.3. PROPIEDADES DE COAGULACIÓN ENZIMÁTICA	11
2.4. RENDIMIENTO Y EXTRACTO SECO DE LA CUAJADA	11
2.5. SINÉRESIS.....	12
2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	12
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
3.1. INFORMACIÓN DE LOS ANIMALES USADOS PARA LA RECOLECCIÓN DE LECHE	13
3.2. COMPOSICIÓN DE LAS LECHEs	14
3.3. PROPIEDADES DE COAGULACIÓN ENZIMÁTICA	15
3.4. RENDIMIENTO Y EXTRACTO SECO DE LA CUAJADA	18
3.5. SINÉRESIS	19
4. CONCLUSIONES	20
5. BIBLIOGRAFÍA	21

RESUMEN

En este trabajo se evaluaron las propiedades de coagulación enzimática de leche de vaca Frisona medidas con el equipo Optigraph (tiempo de coagulación, RCT; tasa de agregación micelar, RCF; y firmeza de la cuajada a los 30 min, CF₃₀) así como rendimiento quesero, extracto seco y sinéresis de las cuajadas, comparando leche con la variante genética β -caseína (CN) A2A2 con leche control (mezcla de β -CN A1A2, A1A1 y A2A2). El estudio se realizó en leches desnatada y entera estandarizada al 3,5% de grasa, procedentes de 3 granjas.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en RCT debido al genotipo de la β -CN ni al contenido de grasa. El RCF fue superior en leche entera control que en desnatada. La influencia del genotipo de la β -CN sobre la RCF fue diferente en función de la granja. Las cuajadas de leche entera presentaron mayor firmeza que las correspondientes de leche desnatada. Las cuajadas de leches A2 también presentaron una mayor firmeza que las procedentes de leche control. El rendimiento y extracto seco de las cuajadas fue superior en leche entera que en desnatada, mientras que en leche desnatada se encontró mayor rendimiento en leche A2 que en control. Los resultados de sinéresis fueron similares entre las cuajadas de leche entera y desnatada. En ambas leches, las cuajadas procedentes de la leche A2 presentaron mayor sinéresis que sus homólogas elaboradas con leche control.

Los resultados de coagulación y propiedades de la cuajada indican que es posible elaborar derivados lácteos de coagulación enzimática a partir de leche A2A2, sin grandes diferencias con la leche control.

ABSTRACT

In this work, the enzymatic coagulation properties of Friesian cow's milk measured with the Optigraph device (coagulation time, CT; micellar aggregation rate, RCF; and curd firmness at 30 min, CF₃₀) were evaluated. In addition, potential cheese yield, total solids and curd syneresis were measured, comparing milk with genetic variant β -casein (CN) A2A2 to control milk (mix of β -CN A1A2, A1A1 and A2A2). The study was carried out for skimmed and whole milk standardized to 3.5% of fat, from 3 farms.

No statistically significant differences were found in RCT due to β -CN genotype or fat content. RCF was higher in whole than in skimmed control milks. The influence of β -CN genotype in RCF was influenced by farm. Curds from whole milks presented greater firmness than those from skimmed milks. The curd from A2 milk also presented greater firmness than that corresponding from control milk.

The yield and total solids of curds were higher in whole than in skimmed milk. In skimmed milk, A2 milk had higher potential cheese yield than control milk. The syneresis results were similar between curds from whole and skimmed milks. In both milks, A2 curds presented higher syneresis than control curds.

Coagulation results and curd properties indicate that it is possible to elaborate rennet coagulation dairy products from A2A2 milk, without great differences with control milk.

1. INTRODUCCIÓN

La leche de vaca es un alimento muy apreciado en la dieta humana por los nutrientes esenciales que contiene, entre los que se encuentran proteínas, carbohidratos, minerales y vitaminas (Marko et al., 2021). Las proteínas se pueden clasificar en caseínas (CN), que corresponden al 80% de las proteínas de la leche, y proteínas del suero (20%). Hay cuatro tipos diferentes de CN, α_{S1} (39-46% del total de CN), α_{S2} (8-11% del total de CN), β -CN (25-35% del total de CN) y κ -CN (8-15% del total de CN) (Jensen et al., 2012b). La β -CN es la segunda caseína más abundante de las proteínas de la leche bovina y consta de 209 residuos de aminoácidos (Daniloski et al., 2021), después de la α_{S1} . Actualmente se han identificado doce variantes genéticas de β -CN: A1, A2, A3, B, C, D, E, F, H1, H2, I y G, siendo los más frecuentes el A1 y A2 (Marko et al., 2021). Estas variantes genéticas están bien caracterizadas y se distinguen por la presencia de histidina (A1) o prolina (A2) en la posición 67 de su cadena polipeptídica.

Los β -casomorfos (BCM) son péptidos de tipo opioide (longitud de cadena de 4 a 11 aminoácidos) que se liberan de la β -CN de la leche humana o bovina durante procesos tecnológicos y/o digestión enzimática en el sistema gastrointestinal (Mayer et al., 2021). Durante la proteólisis gastrointestinal de la β -CN A1 en humanos da como resultado la liberación de β -casomorfo-7 (BCM-7), que también da como resultado el aumento de la permeabilidad del intestino (llamado “intestino permeable” causada por varias afecciones, que incluyen estrés, úlceras de estómago y colitis ulcerosa). Algunas personas pueden tener mayor predisposición a los efectos fisiológicos de estos péptidos liberados de variantes genéticas específicas de β -CN (Asledottir et al., 2017). Por el contrario, la β -CN A2 no suele producir tanto BCM-7 debido a su diferente composición y metabolismo (Marko et al., 2021). No obstante, recientes estudios han indicado que incluso la leche A2 β -CN puede permitir la liberación de BCM-7, pero menos fácil y abundantemente en comparación con la leche A1 β -CN (Asledottir et al., 2017, 2018).

Actualmente, debido a una mayor producción de BCM-7, se considera que la variante A1 β -CN puede estar asociada con la intolerancia a la leche y algunos problemas gastrointestinales tras la digestión (Asledottir et al., 2017). Cabe señalar que la magnitud de los efectos sistémicos de BCM-7 depende del grado de absorción y puede aumentar si la integridad de la barrera del epitelio intestinal se ve comprometida (Kay et al., 2021).

Recientemente, De Gaudry et al. (2019) concluyeron que la evidencia basada en ensayos clínicos y estudios epidemiológicos proporcionaba solo una certeza moderada de los efectos adversos para la salud digestiva de la β -CN A1 en comparación con la β -CN A2 (Kay et al., 2021).

Antiguamente todo el ganado poseía la variante genética A2 β -CN, sin embargo, la que prevalece en la actualidad es la variante genética A1 β -CN debido a la mutación de un solo aminoácido en los rebaños lecheros europeos hace miles de años (Sebastiani et al., 2020). Además, a menos que se especifique lo contrario, la mayor parte de la leche disponible comercialmente contiene una mezcla de β -caseína A1 y A2, que puede surgir de vacas heterocigotas A1A2 o de la mezcla de leche de vacas A1A1 y A2A2 (Kay et al., 2021).

La leche de razas europeas como la Holstein-Frisona contiene principalmente β -CN A1 (Tailford et al., 2003), mientras que la β -CN A2 se detecta comúnmente en la leche de las razas Guernsey y Jersey (Bell et al., 2006).

Las propiedades de coagulación de la leche se consideran buenos indicadores de la calidad de sus derivados (Bittante, 2011). Sin embargo, estas propiedades se pueden ver afectadas por varios factores, como los polimorfismos genéticos de las proteínas de la leche (Ikonen et al., 1999). Varios estudios han confirmado la evidencia de una contribución genética a la coagulación de la leche, indicando que las variantes B de κ -CN, β -CN y β -LG son favorables para la coagulación de la leche (Ikonen et al., 1997, 1999; Wedholm et al., 2006; Hallén et al., 2007, 2008). Una investigación realizada por Jensen et al. (2012a) acerca de las propiedades de coagulación de la leche, mostró que la leche proveniente de vacas A2A2 mostraba geles menos consistentes (menor espesor del gel) en comparación a la coagulación de la leche proveniente de vacas heterocigotas (A1A2 o de la mezcla de leche de vacas A1A1 y A2A2).

Este trabajo tiene como objetivo evaluar las propiedades de coagulación enzimática de leches desnatadas y enteras con fenotipo de β -CN A2A2, comparándola con una leche control mezcla de los fenotipos β -CN A2A1, A1A1 y A2A2.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Obtención y tratamiento de la leche

Se obtuvo leche de tres granjas catalanas diferentes: La Caballería (Manlleu), Can Barrina (Santa Cecilia de Voltregà) y Compte Isern (Vic), de dos producciones diferentes. De cada granja se recolectó leche de vacas Frisona individualizadas, genotipadas para la β -CN como A2A2 (leche A2) y A2A1, A1A1 y A2A2 (leche control) en un periodo de abril a julio. La información genética de los animales usados para cada producción y granja fue facilitada por FEFRIC (Federació Frisona de Catalunya) y se encuentra en la Tabla 1. La leche cruda se atemperó a 50 °C para su desnatado, obteniendo leche desnatada por un lado y leche entera por el otro, la cual se obtuvo después de mezclar la leche desnatada con su respectiva nata hasta obtener una estandarización al $3,5 \pm 0,2\%$ de grasa. Las muestras fueron puestas en refrigeración (4 °C) hasta su análisis.

2.2. Composición de las leches

Las leches fueron analizadas para extracto seco (ES) mediante desecación en estufa a 102 °C hasta peso constante (IDF, 2010). El pH se valoró mediante un pH-metro (GLP 21 modelo 2001; Crison Instruments SA, Alella). El nitrógeno total se valoró por digestión Kjeldahl (IDF, 2014) y la proteína se obtuvo multiplicando el nitrógeno total por 6,38. La determinación del contenido de grasa de la leche se realizó según el método de Gerber (IDF, 2018).

2.3. Propiedades de coagulación enzimática

Las leches fueron atemperadas a 32 °C y se añadió 0,03% de enzima coagulante (cuajo líquido, actividad de cuajo 1:10000; Quimosina $80 \pm 5\%$, Laboratorios Arroyo, Santander, España). La coagulación se llevó a cabo a 32 °C durante 30 min. Las propiedades de coagulación [tiempo de coagulación (RCT), tasa de agregación micelar (RCF) y firmeza de la cuajada a los 30 min (CF₃₀)] se evaluaron por quintuplicado mediante el sistema Optigraph (Ysebaert Inc., Frepillon, Francia). Este dispositivo mide la cantidad de luz adsorbida por la leche mientras coagula. Los cambios son analizados en tiempo real por una computadora que los convierte en datos directamente utilizables (Zamora et al., 2007).

2.4. Rendimiento potencial quesero y extracto seco de la cuajada

El rendimiento quesero potencial de las leches se estimó por triplicado mediante la técnica descrita por Macheboeuf et al. (1993). Las leches (300 ml) se calentaron a 32 °C y se añadió 0,03% de la

enzima coagulante. La coagulación se llevó a cabo en tubos de centrífuga en un baño a 32 °C durante 30 min por triplicado. Posteriormente los tubos con el coágulo se centrifugaron a $13.000 \times g$ durante 15 min a 10 °C (Sigma 4K15, Postfach, Alemania). El rendimiento potencial quesero fue expresado en gramos de cuajada por cien gramos de leche. El porcentaje de extracto seco (ES) de la cuajada se determinó por triplicado por método de desecación en estufa a 102 °C (IDF, 2004).

2.5. Sinéresis

La sinéresis de la cuajada se evaluó por triplicado mediante el método descrito por Marshall (1982). La leche (50 ml) se coaguló a 32 °C durante 30-35 min en vasos de precipitados de 50 ml mediante la adición de 0,03% (v/v) de enzima. La coagulación se realizó a 32 °C después de la adición del cuajo. La cuajada se cortó con una espátula transversalmente y alrededor de los lados del vaso de precipitados dejándola reposar a temperatura ambiente. Pasada una hora, se colocó una rejilla de plástico sobre la superficie de la cuajada para retenerla durante el vertido del suero. La sinéresis se midió pesando la cantidad de suero extraído.

2.6. Análisis estadístico

Los datos se procesaron mediante análisis multifactorial de varianza (ANOVA) utilizando el diseño de bloques aleatorios diseño factorial de R Commander (Rcmdr, Fox & Bouchet-Valat, 2020), teniendo en cuenta ambos genotipos de β -CN (A2 y control), granja y su interacción. La comparación de medias para leche A2 y control se realizó mediante la prueba de Tukey, basándose en un nivel de significación de $P < 0,05$. El experimento se repitió en dos ocasiones independientes.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Información de los animales usados para la recolección de leche

Tal y como puede observarse en la Tabla 1, la recolección de leche se realizó teniendo en cuenta las variantes genéticas individuales de cada vaca, para homogenizar al máximo posible los dos tipos de leche, minimizando las diferencias que podrían deberse a otras proteínas diferentes a la β -CN. De igual forma, se intentó que los animales usados para cada tipo de leche presentaran similar número y días de lactación, tal y como puede observarse en la Tabla 2.

Tabla 1. Información genética de las vacas usadas para recolectar la leche de las distintas granjas.

Granjas ¹	Leche ²	β -CN			κ -CN						β -Lg		
		A1A1	A1A2	A2A2	AA	AB	BB	BE	AE	EE	AA	AB	BB
C 1	A2			29	8	7	1				3	10	3
	Cont.	5	24		2	5		7	1	1	4	9	3
B 1	A2			70	20	33	17				36	25	9
	Cont.	12	45		14	14	5	10	11	1	25	28	5
I 1	A2			28	10	13	5				12	13	3
	Cont.	1	30		4	11	7	7	2		10	16	5
C 2	A2			22	9	13	6				5	16	8
	Cont.	2	15		3	4	2	10	8	2	4	13	12
B 2	A2			66	18	33	15				31	25	10
	Cont.	9	47	6	16	17	7	7	12	1	27	30	6
I 2	A2			34	10	18	6				11	19	4
	Cont.		33		4	12	7	8	2		12	16	5

¹C = La Caballería, B = Can Barrina, I = Compte Isern, 1= Primera producción, 2 = Segunda producción. ² A2 = Leche variante β -CN A2A2, Cont. = Leche variante β -CN A1A1, A1A2 y A2A2.

Tabla 2. Información de los animales usados para la recolección de leche de cada granja.

Granjas ¹	Leche ¹	Litros de leche	N° de lactación	Días de lactación
C1	Cont.	8050	1,69	119,19
	A2	8460	1,69	116,38
B1	Cont.	5700		173
	A2	7000		179,44
I1	Cont.	7750	1,07	159,9
	A2	7000	1	140,75
C2	Cont.	4550	2,24	125,71
	A2	5950	1,64	145,77
B2	Cont.		167,32	1,76
	A2		183,11	1,45
I2	Cont.		1,27	156,08
	A2		1,27	150,34

¹C = La Caballeria, B = Can Barrina, I = Compte Isern, 1= Primera producción, 2 = Segunda producción. ² A2 = Leche variante β -CN A2A2, Cont. = Leche variante β -CN A1A1, A1A2 y A2A2.

3.2 Composición de las leches

En la Tabla 3 se puede observar los valores de grasa y proteína de las leches de partida, antes de proceder a su desnatado y estandarización.

Tabla 3. Contenidos en proteína y grasa de las leches recién llegadas de las granjas.

Granja ¹	Leche ²	Proteína (%)	Grasa (%)
C	Control	3,29 $\pm$ 0,12 ^a	3,92 $\pm$ 0,32 ^{ab}
	A2	3,33 $\pm$ 0,03 ^a	4,20 $\pm$ 0,52 ^a
B	Control	2,98 $\pm$ 0,16 ^b	3,55 $\pm$ 0,06 ^{bc}
	A2	3,15 $\pm$ 0,02 ^{ab}	3,50 $\pm$ 0,00 ^{bc}
I	Control	2,99 $\pm$ 0,20 ^b	3,32 $\pm$ 0,09 ^c
	A2	3,03 $\pm$ 0,08 ^b	3,55 $\pm$ 0,06 ^{bc}

¹C = La Caballeria, B = Can Barrina, I = Compte Isern, ² A2 = Leche variante β -CN A2A2, Cont. = Leche variante control (β -CN A1A1 y A1A2) y A2A2. ^aMedia del mismo parámetro seguido de distinta letra subscrita es significativamente diferente ($P \leq 0,05$).

Los valores de proteína de las leches estuvieron entre 2,98 y 3,33%, observándose valores ligeramente más elevados en la granja C que en la granja I. Lo mismo ocurrió con el % de grasa, encontrando valores mínimos y máximos entre 3,32 y 4,20%. Ambos valores, tanto proteína como grasa fueron los esperados para una leche de vaca (Holodova et al., 2019).

La leche A2 presentó ligeramente mayor % de grasa que la leche control en las granjas C y I. Ng-Kwai-Hang et al. (1984) describieron que la β -CN afecta al contenido de grasa de la leche, sin embargo, no observaron diferencias en el contenido de grasa ni proteína entre los distintos genotipos. McLean et al. (1984) tampoco encontraron asociación entre los genotipos de β -CN y el contenido de grasa y leche. No obstante, Marko et al. (2020) describió un mayor contenido de proteína en leche A2A2 comparado con A1A2, y un mayor contenido de grasa en leches A2A2 comparado con A1A1 y A1A2.

Tabla 4. Resultados pH y ES (media $\pm$ desviación estándar) de las leches enteras y desnatadas.

Granja ¹	Leche ²	pH		ES (%)	
		E	D	E	D
C	Control	6,71 $\pm$ 0,04	6,65 $\pm$ 0,13	12,50 $\pm$ 0,05 ^a	9,37 $\pm$ 0,07 ^b
	A2	6,69 $\pm$ 0,00	6,63 $\pm$ 0,15	12,34 $\pm$ 0,30 ^a	9,40 $\pm$ 0,02 ^b
B	Control	6,73 $\pm$ 0,04	6,78 $\pm$ 0,00	12,36 $\pm$ 0,06 ^a	9,02 $\pm$ 0,03 ^b
	A2	6,75 $\pm$ 0,02	6,74 $\pm$ 0,02	12,44 $\pm$ 0,32 ^a	9,04 $\pm$ 0,03 ^b
I	Control	6,74 $\pm$ 0,03	6,73 $\pm$ 0,04	12,25 $\pm$ 0,14 ^a	9,08 $\pm$ 0,02 ^b
	A2	6,61 $\pm$ 0,16	6,61 $\pm$ 0,21	12,27 $\pm$ 0,13 ^a	9,03 $\pm$ 0,01 ^b

¹C = La Caballeria, B = Can Barrina, I = Com Isern, ²A2 = Leche variante β -CN A2A2, Cont. = Leche variante β -CN A1A1, A1A2 y A2A2. E = Leche entera (3,5% grasa), D= Leche desnatada. ^{ab}Media del mismo parámetro con diferente superíndice es significativamente diferente (P<0,05)

El valor medio de pH en las leches fue de 6,7 $\pm$ 0,07 (Tabla 4), siendo el valor esperado para leche de vaca (Guillaume et al., 2004, Frizzarin et al., 2021). Las leches enteras mostraron un ES mayor a las leches desnatadas, con una media de 12,4 $\pm$ 0,17 y 9,16 $\pm$ 0,03 respectivamente, debido a su diferencia del contenido en grasa. Los valores de los parámetros se encuentran dentro del rango esperado para leche desnatada y entera de acuerdo con Burke et al. (2018). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el valor de pH ni ES entre las leches A2 y control (Tabla 4).

3.3 Propiedades de coagulación enzimática

Los resultados obtenidos de las características de coagulación enzimática de las leches utilizando el equipo Optigraph se pueden observar en la Tabla 5. El valor medio de RCT en leches entera y desnatada fue de 4,37 $\pm$ 2,40 y 4,19 $\pm$ 2,33, respectivamente, no existiendo diferencias significativas entre ambas, aunque los valores fueron superiores en leche entera. Kaushik et al.

(2015) y Zamora et al. (2007) también describieron un aumento del RCT con el aumento de grasa, encontrando mayor RCT en leche entera que en leche desnatada. Tampoco se observaron diferencias significativas debido al genotipo de la β -CN, aunque los valores de la leche A2 fueron ligeramente superiores a la leche control (Tabla 5). Estos resultados concuerdan con los encontrados por Pulsen et al. (2013) quienes describieron que el RCT está claramente influenciado por las variantes genéticas de la caseína, encontrando una mayor RCT en leche de vacas Holstein danesas y Sueca Roja A2 comparado con leche A1. Hallén et al. (2007) también describieron un menor tiempo de coagulación en leche con fenotipo de β -CN A1A2 comparado con A2A2 en vacas de las razas Sueca Roja y Holstein. Jensen et al. (2012b) también observaron en leche de vacas danesas de la raza Holstein-Frisona y Jersey, que las leches con fenotipo A2A2 presentaban mayor RCT que leches con otros fenotipos (A1, B o I). Ketto et al. (2017) también describió mejores propiedades de coagulación en leches con β -CN A1 comparadas con A2.

Tabla 5. Resultados (media $\pm$ desviación estándar) generales de propiedades de coagulación mediadas con Optigraph de las leches.

Leche ¹	RCT (min)	RCF (mA/min)	CF ₃₀ (mA)
Entera			
Control	4,05 $\pm$ 2,38	2, 82 $\pm$ 1,74 ^y	12,46 $\pm$ 0,82 ^{by}
A2	4,68 $\pm$ 2,41	2,70 $\pm$ 1,36	14,59 $\pm$ 1,26 ^{ay}
SE²			
Granja		*	
Genotipo			***
Granja * Genotipo			
Desnatada			
Control	4,08 $\pm$ 2,33	1,89 $\pm$ 0,70 ^{bz}	10,95 $\pm$ 0,75 ^{bz}
A2	4,31 $\pm$ 2,33	2,48 $\pm$ 0,80 ^a	12,70 $\pm$ 1,29 ^{az}
SE²			
Granja			**
Genotipo		**	***
Granja * Genotipo		**	***

¹A2 = Leche variante β -CN A2A2, Cont. = Leche variante β -CN A1A1, A1A2 y A2A2. ²SE = Significancia estadística: *** $P \leq 0,001$; ** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$. ^{ab}Media de los parámetros y tipo de leche (entera o desnatada) seguido de letras diferentes son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$). ^{yz}Media para el mismo parámetro y genotipo de leche (A2 o control) seguido de letras diferentes son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$). RCT= Tiempo de coagulación, RCF= Tasa de agregación micelar, CF₃₀ = Firmeza de la cuajada a los 30 min.

El valor medio de RCF para leche entera y desnatada fue de $2,76 \pm 1,55$ y $2,18 \pm 0,75$, respectivamente. Los valores fueron superiores en la leche entera, siendo estadísticamente significativo en la leche control.

En leche desnatada, la leche A2 presentó mayor RCF que la leche control, no obstante, no hubo diferencias significativas debido al genotipo de la β -CN en leche entera (Tabla 5). Contrariamente, en un estudio sobre la influencia de las variantes genéticas sobre las propiedades de coagulación enzimática de la leche, se describió que las leches con genotipo β -CN A2A2 presentaban menor RCF, junto con α_{s1} -CN BB y κ -CN AA para vacas Holstein-Frisona y Jersey (Jensen et al., 2012b). Pulsen et al. (2013) también describieron un menor RCF en leche entera A2 comparado con A1 para vacas Holstein y Jersey danesas.

Dado que el factor granja resultó significativo para RCF ($P \leq 0,05$) en leche entera, al analizarlo individualmente por granja (Tabla 6), en la granja B, la leche A2 presentó mayor valor de RCF que la leche control; no obstante, en las otras dos granjas, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, el resultado fue al contrario, teniendo la leche A2 menor RCF que la leche control, coincidiendo con los resultados descritos por los otros autores antes mencionados (Jensen et al., 2012b; Pulsen et al., 2013).

Tabla 6. Resultados (media $\pm$ desviación estándar) de la tasa de agregación micelar (RCF, mA/min) de leche entera por granja.

¹ Granjas	Fenotipo	
	Control	A2
C	$3,40 \pm 1,85$	$3,12 \pm 1,80$
B	$1,69 \pm 0,19^b$	$2,24 \pm 0,36^a$
I	$3,39 \pm 2,03$	$2,76 \pm 1,48$

¹C = La Caballeria, B = Can Barrina, I = Compte Isern, A2 = Leche variante β -CN A2A2, Cont. = Leche variante control (β -CN A1A1, y A1A2) y A2A2. ^{ab}Media seguida de superíndice diferente es significativamente diferentes ($P < 0,05$).

La media de CF₃₀ fue de $13,53 \pm 1,04$ en leche entera y $11,83 \pm 1,02$ en leche desnatada, siendo claramente superior en la primera. Esto significa que la leche entera mostró mayor firmeza que la leche desnatada. Estos resultados son similares a los obtenidos por Malacarne et al. (2008) quienes observaron que las leches semidesnatadas tenían menor firmeza de cuajada en comparación a la firmeza de cuajada de leche entera.

En ambas leches, la cuajada procedente de la leche A2 mostró mayor firmeza a los 30 min que la correspondiente de la leche control. Estos resultados son contrarios a los descritos por Hallén et al. (2007), los cuales encontraron mayor firmeza de cuajada en leche A1A2 comparado con A2A2 o A1A1 para vacas Holstein y Roja suecas. Jensen et al. (2012b) también describieron menor firmeza de la cuajada en leche con fenotipo para la β -CN A2A2. Por otro lado, Lodes et al. (1996) no encontraron ningún efecto significativo del polimorfismo de la β -CN con la firmeza de la cuajada. Aunque en leche desnatada el factor granja resultó significativo ($P \leq 0,01$) para CF₃₀, en todas las granjas la cuajada de la leche A2 presentó mayor firmeza que la correspondiente de la leche control (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados (media $\pm$ desviación estándar) de la firmeza de la cuajada (CF₃₀, mA) procedente de la leche desnatada por granja.

¹ Granjas	Fenotipo	
	Control	A2
C	11,65 $\pm$ 0,65 ^b	12,40 $\pm$ 0,17 ^a
B	10,54 $\pm$ 0,30 ^b	13,81 $\pm$ 1,58 ^a
I	10,66 $\pm$ 0,70 ^b	11,88 $\pm$ 0,77 ^a

¹C = La Caballeria, B = Can Barrina, I = Compte Isern, A2 = Leche variante β -CN A2A2, Cont. = Leche variante β -CN A1A1, A1A2 y A2A2. ^{ab}Media seguida de superíndice diferente es significativamente diferentes ($P < 0,05$).

3.4. Rendimiento y extracto seco de las cuajadas

El valor de rendimiento potencial quesero para las leches entera y desnatada fue de 20,13 $\pm$ 2,6 y 14,96 $\pm$ 2,91, respetivamente, siendo mayor en leche entera. Estos resultados coinciden con los encontrado por Czyżak-Runowska et al. (2020), Martins-Bessa et al. (2003) y Wedholm et al. (2006), quienes mostraron que el rendimiento quesero mejora con el aumento de la concentración de grasa láctea en la leche.

En la leche entera no hubo diferencias de rendimiento quesero debido al genotipo de la β -CN. No obstante, en leche desnatada, la leche A2 presentó mayor rendimiento quesero que la leche control (Tabla 8). Ng-Kwai-Hang et al. (1984) describió un ligero incremento del rendimiento quesero en el genotipo A2 respecto al genotipo β -CN A1.

Las cuajadas de leche entera presentaron un ES mayor a las de la leche desnatada (Tabla 8). En ningún caso se observaron diferencias entre leche A2 y control.

3.5. Sinéresis

El valor de sinéresis de las cuajadas fue ligeramente superior en leche desnatada que en leche entera, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Estos resultados concuerdan con los observados por Métais et al. (2006) quienes describieron mayor capacidad de retención de agua en cuajadas elaboradas con leche entera. En ambas leches, las cuajadas procedentes de la leche A2 presentó mayor sinéresis que las correspondientes de la leche control (Tabla 8), indicando una menor capacidad de retención de agua. Estos resultados difieren de los encontrados por Hallen et al (2007) quienes describieron una mayor capacidad de retención de agua en leche desnatada A2A2 comparada con A1A2.

Tabla 8. Rendimiento potencial quesero, extracto seco (ES) y sinéresis de las cuajadas (media $\pm$ desviación estándar) obtenidos de las leches enteras y desnatadas.

¹ Leche	Rendimiento (%)	ES (%)	Sinéresis (g)
Entera			
Control	20,71 $\pm$ 2,5 ^y	32,82 $\pm$ 1,33 ^y	6,81 $\pm$ 1,6 ^b
A2	19,55 $\pm$ 2,7	31,44 $\pm$ 4,60 ^y	8,58 $\pm$ 1,7 ^a
<i>SE</i> ²			
Granja	*		
Genotipo			**
Granja * Genotipo			
Desnatada			
Control	12,89 $\pm$ 1,06 ^{bz}	26,93 $\pm$ 0,89 ^z	7,26 $\pm$ 1,52 ^b
A2	17,02 $\pm$ 4,77 ^a	27,53 $\pm$ 1,94 ^z	9,66 $\pm$ 2,21 ^a
<i>SE</i> ²			
Granja			
Genotipo	***		***
Granja * Genotipo	***	***	

¹A2 = Leche variante β -CN A2A2, Cont. = Leche variante β -CN A1A1, A1A2 y A2A2. ²SE = Significancia estadística: *** $P \leq 0,001$; ** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$. ^{ab}Media para el mismo parámetro y tipo de leche (entera o desnatada) seguido de letras diferentes es significativamente diferente ($P \leq 0,05$). ^{yz}Media para el mismo parámetro y genotipo de leche (A2 o Cont) seguido de letras diferentes es estadísticamente diferente ($P \leq 0,05$).

4. CONCLUSIONES

La leche entera presentó mayor rendimiento potencial quesero, mayor ES debido a la grasa, mayor firmeza de la cuajada y una ligera menor sinéresis comparado con la leche desnatada.

El genotipo de la β -CN influyó en algunas propiedades de coagulación enzimática y características de la cuajada, según el tipo de leche. La cuajada procedente de la leche con fenotipo β -CN A2 presentó mayor firmeza que la leche control. Esto podría deberse a la mayor sinéresis observada en las cuajadas elaboradas con leche A2, lo cual significaría una menor retención de agua, lo que podría incrementar la firmeza de la cuajada. En general, las diferencias encontradas en leche A2 respecto a la leche control, son muy pequeñas, y algunas solo se observan en leche desnatada pero no en leche entera, indicando la posibilidad de elaborar derivados lácteos de coagulación enzimática a partir de los dos tipos de leche.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Asledottir, T., Le, T. T., Petrat-Melin, B., Devold, T. G., Larsen, L. B., & Vegarud, G. E. (2017). Identification of bioactive peptides and quantification of β -casomorphin-7 from bovine β -casein A1, A2 and I after ex vivo gastrointestinal digestion. *International Dairy Journal*, 71, 98-106. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.03.008>
- Asledottir, T., Le, T. T., Poulsen, N. A., Devold, T. G., Larsen, L. B., & Vegarud, G. E. (2018). Release of β -casomorphin-7 from bovine milk of different β -casein variants after ex vivo gastrointestinal digestion. *International Dairy Journal*, 81, 8-11. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.12.014>
- Fox, J., Buchet – Valat, M. (2020). Rcmdr: R Commander. R package version 2.7- 1. <https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Misc/Rcmdr/>.
- Bell, S. J., Grochoski, G. T., & Clarke, A. J. (2006). Health implications of milk containing β -casein with the A 2 genetic variant. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(1), 93-100. <https://doi.org/10.1080/10408390591001144>
- Bittante, G. (2011). Modeling rennet coagulation time and curd firmness of milk. *Journal of Dairy Science*, 94(12), 5821-5832. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4514>
- Burke, N., A. Zacharski, K., Southern, M., Hogan, P., P. Ryan, M., & C. Adley, C. (2018). The Dairy Industry: Process, Monitoring, Standards, and Quality. Editorial: IntechOpen. *Descriptive Food Science*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80398>
- Czyżak-Runowska, G., Wójtowski, J. A., Gogół, D., Wojtczak, J., Skrzypczak, E., & Stanisławski, D. (2020). Properties of rennet cheese made from whole and skimmed summer and winter milk on a traditional polish dairy farm. *Animals*, 10(10), 1-12. <https://doi.org/10.3390/ani10101794>
- Daniloski, D., Cunha, N. M. D., McCarthy, N. A., O’Callaghan, T. F., McParland, S., & Vasiljevic, T. (2021). Health-related outcomes of genetic polymorphism of bovine β -casein variants: A systematic review of randomised controlled trials. *Trends in Food Science and Technology*, 111(February), 233-248. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.073>
- De Gaudry, D. K., Lohner, S., Schmucker, C., Kapp, P., Motschall, E., Horrlein, S., Roger, C., & Meerpohl, J. J. (2019). Milk a1 p-casein and health-related outcomes in humans: A systematic review. *Nutrition Reviews*, 77(5), 278-306. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy063>
- Frizzarin, M., Gormley, I. C., Berry, D. P., Murphy, T. B., Casa, A., Lynch, A., & McParland, S. (2021). Predicting cow milk quality traits from routinely available milk spectra using statistical machine learning methods. *Journal of Dairy Science*, 104(7), 7438-7447. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19576>

- Guillaume, C., Gastaldi, E., Cuq, J. L., & Marchesseau, S. (2004). Effect of pH on rennet clotting properties of CO₂-acidified skim milk. *International Dairy Journal*, 14(5), 437-443. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.10.002>
- Hallén, E., Allmere, T., Näslund, J., Andrén, A., & Lundén, A. (2007). Effect of genetic polymorphism of milk proteins on rheology of chymosin-induced milk gels. *International Dairy Journal*, 17(7), 791-799. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.09.011>
- Hallén, E., Wedholm, A., Andrén, A., & Lundén, A. (2008). Effect of β -casein, κ -casein and β -lactoglobulin genotypes on concentration of milk protein variants. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 125(2), 119-129. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0388.2007.00706.x>
- Holodova, L. V., Novoselova, K. S., Ignatyeva, L. A., Mikhalev, E. V., & Onegov, A. V. (2019). Comparative analysis of dairy cows' productivity depending on their origin and perspectives of further stock breeding in the herd. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 315(2), 1755-1315. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/315/2/022089>
- Ikonen, T., Ojala, M., & Syväoja, E. L. (1997). Effects of composite casein and β -lactoglobulin genotypes on renneting properties and composition of bovine milk by assuming an animal model. *Agricultural and Food Science in Finland*, 6(4), 283-294. <https://doi.org/10.23986/afsci.72791>
- Ikonen, T., Ojala, M., & Ruottinen, O. (1999). Associations between Milk Protein Polymorphism and First Lactation Milk Production Traits in Finnish Ayrshire Cows. *Journal of Dairy Science*, 82(5), 1026–1033. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75323-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75323-3)
- IDF (2004). ISO 5534 / IDF 238: 2004 - Cheese and processed cheese - Determination of the total solids content (Reference method). International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica.
- IDF (2010). ISO 6731 / IDF 021: 2010 - Milk, cream and evaporated milk - Determination of total solids content (Reference method). International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica.
- IDF (2014). ISO 8968-1 / IDF 020-1: 2014 - Milk and milk products - Determination of nitrogen content - Part 1: Kjeldahl principle and crude protein calculation. International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica.
- IDF (2018). ISO 19662 / IDF 238: 2018 - Milk - Determination of fat content - Acido-butyrometric (Gerber method). International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica.
- Jensen, H. B., Holland, J. W., Poulsen, N. A., & Larsen, L. B. (2012a). Milk protein genetic variants and isoforms identified in bovine milk representing extremes in coagulation properties. *Journal of Dairy Science*, 95(6), 2891-2903. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5346>
- Jensen, H. B., Poulsen, N. A., Andersen, K. K., Hammershøj, M., Poulsen, H. D., & Larsen, L. B. (2012b). Distinct composition of bovine milk from Jersey and Holstein-Friesian cows with

- good, poor, or noncoagulation properties as reflected in protein genetic variants and isoforms. *Journal of Dairy Science*, 95(12), 6905-6917. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5675>
- Ketto, I. A., Knutsen, T. M., Øyaas, J., Heringstad, B., Ådnøy, T., Devold, T. G., & Skeie, S. B. (2017). Effects of milk protein polymorphism and composition, casein micelle size and salt distribution on the milk coagulation properties in Norwegian Red cattle. *International Dairy Journal*, 70, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.10.010>
- Kay, S. I. S., Delgado, S., Mittal, J., Eshraghi, R. S., Mittal, R., & Eshraghi, A. A. (2021). Beneficial Effects of Milk Having A2 β -Casein Protein: Myth or Reality? *The Journal of Nutrition*, 151(5), 1061-1072. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa454>
- Kaushik, R., Sachdeva, B., Arora, S., & Gupta, C. (2015). Effect of fat content on sensory and physico-chemical properties of laboratory-pasteurised calcium- and vitamin D-fortified mixture of cow and buffalo milk. *International Journal of Dairy Technology*, 68(1), 135-143. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12166>
- Lodes, A., Krause, I., Buchberger, J., Aumann, J., Klostermeyer, H. (1996). Document details - The influence of genetic variants of milk proteins on the compositional and technological properties of milk. 1. Casein micelle size and the content of non-glycosylated κ -casein. *Milchwissenschaft*, 51 (7), pp. 368-373. Cited 43 times.
- Macheboeuf, D., Coulon, J. B., & D'Hour, P. (1993). Effect of Breed, Protein Genetic Variants and Feeding on Cows' Milk Coagulation Properties. *Journal of Dairy Research*, 60(1), 43-54. <https://doi.org/10.1017/S0022029900027333>
- Malacarne, M., Summer, A., Formaggioni, P., Franceschi, P., Sandri, S., Pecorari, M., Vecchia, P., & Mariani, P. (2008). Dairy maturation of milk used in the manufacture of Parmigiano-Reggiano cheese: Effects on physico-chemical characteristics, rennet-coagulation aptitude and rheological properties. *Journal of Dairy Research*, 75(2), 218-224. <https://doi.org/10.1017/S0022029908003221>
- Marko, R., Uros, G., Branislav, V., Milan, M., Danijela, K., Vlado, T., & Zoran, S. (2020). Beta-Casein Gene Polymorphism in Serbian Holstein-Friesian Cows and Its Relationship with Milk Production Traits. *Acta Veterinaria*, 70(4), 497-510. <https://doi.org/10.2478/acve-2020-0037>
- Marko, R., Uros, G., Branislav, V., Milan, M., Danijela, K., Vlado, T., & Zoran, S. (2021). Beta-Casein Gene Polymorphism in Serbian Holstein-Friesian Cows and Its Relationship with Milk Production Traits. *Acta Veterinaria*, 70(4), 497-510. <https://doi.org/10.2478/acve-2020-0037>
- Marshall, R. (1982). An improved method for measurement of the synesis of curd formed by rennet action on milk. *Journal of Dairy Research*, 49(2), 329-336. doi: 10.1017/S0022029900022433

- Martins-Bessa, A., Cardoso, L., Costa, T., Mota, R., Rocha, A., Montenegro, L., & Vatsos, I. N., Angelidis, P. (2003). Effect of whey fat content on the properties and yields of whey cheese and serum. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 85(1), 3-11.
- Mayer, H. K., Lenz, K., & Halbauer, E.-M. (2021). “A2 milk” authentication using isoelectric focusing and different PCR techniques. *Food Research International*, 147(June), 1873-7145. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110523>
- Métais, A., Cambert, M., Riaublanc, A., & Mariette, F. (2006). Influence of fat globule membrane composition on water holding capacity and water mobility in casein rennet gel: A nuclear magnetic resonance self-diffusion and relaxation study. *International Dairy Journal*, 16(4), 344-353. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.03.011>
- McLean, D. M., E. R. B. Graham, R. W. Ponzoni, and H. A. McKenzie. 1984. Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. *Journal Dairy Res.* 51: 531-546.
- Ng-Kwai-Hang, K. F., Hayes, J. F., Moxley, J. E., & Monardes, H. G. (1984). Association of Genetic Variants of Casein and Milk Serum Proteins with Milk, Fat, and Protein Production by Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 67(4), 835-840. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81374-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81374-0)
- Poulsen, N. A., Bertelsen, H. P., Jensen, H. B., Gustavsson, F., Glantz, M., Lindmark Månsson, H., Andrén, A., Paulsson, M., Bendixen, C., Buitenhuis, A. J., & Larsen, L. B. (2013). The occurrence of noncoagulating milk and the association of bovine milk coagulation properties with genetic variants of the caseins in 3 Scandinavian dairy breeds. *Journal of Dairy Science*, 96(8), 4830-4842. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6422>
- Sebastiani, C., Arcangeli, C., Ciullo, M., Torricelli, M., Cinti, G., Fisichella, S., & Biagetti, M. (2020). Frequencies evaluation of β -Casein gene polymorphisms in dairy cows reared in central Italy. *Animals*, 10(2), 1-7. <https://doi.org/10.3390/ani10020252>
- Tailford, K. A., Berry, C. L., Thomas, A. C., & Campbell, J. H. (2003). A casein variant in cow's milk is atherogenic. *Atherosclerosis*, 170(1), 13-19. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(03\)00131-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(03)00131-X)
- Wedholm, A., Larsen, L. B., Lindmark-Månsson, H., Karlsson, A. H., & Andrén, A. (2006). Effect of protein composition on the cheese-making properties of milk from individual dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89(9), 3296-3305. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72366-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72366-9)
- Zamora, A., Ferragut, V., Jaramillo, P. D., Guamis, B., & Trujillo, A. J. (2007). Effects of ultra-high pressure homogenization on the cheese-making properties of milk. *Journal of Dairy Science*, 90(1), 13-23. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)72604-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)72604-8)