

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Agroindustria Alimentaria
Ingeniería en Agroindustria Alimentaria



Proyecto Especial de Graduación
**Caracterización de α -S caseínas en leche de cabra de diferentes razas
de importancia comercial.**

Estudiante

Sara Elizabeth Ventura Montes

Asesores

José Luis Vargas Bográn M.Sc.

Cristina Chuck-Hernández Ph.D.

Víctor Hugo Urrutia-Baca Ph.D.

Honduras, noviembre 2023

Autoridades

SERGIO ANDRÉS RODRÍGUEZ ROYO

Rector

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

ADELA M. ACOSTA MARCHETTI

Directora Departamento de Agroindustria Alimentaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Contenido

Índice de Cuadros.....	4
Índice de Figuras.....	5
Índice de Anexos.....	6
Resumen	7
Abstract.....	8
Introducción.....	9
Materiales y Métodos.....	12
Ubicación del Estudio.....	12
Muestra de Estudio.....	12
Colección y Preparación de la Muestra	12
Análisis Proximales.....	12
Perfil Electroforético	12
Aislamiento de α S1-CN	14
Método 1: Punto Isoeléctrico y Solubilidad en Urea.....	14
Método 2: Sensibilidad en Cloruro de Calcio.....	15
Método 3: Fraccionamiento Del Complejo α s1- K Caseína	16
Análisis Estadístico	17
Resultados y Discusión.....	18
Análisis Proximales.....	18
Perfil Electroforético	19
Método de Separación de α s1-CN	25
Conclusiones	28
Recomendaciones.....	29
Referencias.....	30

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Resultados para los análisis de pH, densidad, humedad, y proteína cruda de las muestras de leche de cabra.	18
Cuadro 2 Resultados para los análisis de pH, densidad, humedad, y proteína cruda de las muestras de leche de cabra según la raza.	18
Cuadro 3 Rangos de pesos moleculares registrados para cada proteína expresados en kDa.....	21
Cuadro 4 Tabla resumen para el porcentaje de concentración relativa de caseínas presentes en leche de cabra de dos diferentes razas.	22
Cuadro 5 Porcentaje de concentración relativa de β -LG y α -LA presentes en leche de cabra de dos diferentes razas.....	25

Índice de Figuras

Figura 1 SDS- PAGE análisis de leche caprina pertenecientes a la raza Alpina.....	20
Figura 2 Categorización de las concentraciones relativas de α s-1 CN contenidas en muestras de leche caprina pertenecientes a raza Alpina Francesa y Saanen.....	24
Figura 3 Análisis electroforéticos de resultados para método1 y 2 de aislamiento aplicado.	26
Figura 4 SDS-PAGE análisis del resultado del método de aislamiento de α s1-CN.....	27

Índice de Anexos

Anexo A Método 1 de aislamiento de α S1-CN: punto isoeléctrico y solubilidad en urea.....	34
Anexo B Método 2 de aislamiento de α S1-CN: Sensibilidad en Cloruro de Calcio.....	35
Anexo C Método 3 de aislamiento de α S1-CN: Fraccionamiento del complejo α s1- κ caseína.....	36
Anexo D Concentración relativa de α S1-CN expresada en % en base a un 100% del total de proteínas para cada muestra de leche evaluada	37

Resumen

La industria láctea caprina ha experimentado un notable crecimiento en los últimos años, pero, los rendimientos, especialmente en la producción de quesos, siguen siendo bajos. Esta situación se puede atribuir bioquímicamente a un contenido reducido de α S1-caseínas en la leche de cabra, una proteína que forma parte integral del complejo de caseínas. Identificamos las proteínas en muestras de leche de cabra de raza Alpina Francesa (n=50) y Saanen (n=36) mediante perfiles electroforéticos. Estos análisis permitieron ser la base para una cuantificación de abundancias relativas expresados en porcentajes de alfa S1-Caseínas (α S1-CN), alfa S2-Caseínas (α S2-CN), Beta-Caseínas (β -CN) y Beta-Lactoglobulina (β -LG). Además, se evaluaron tres métodos de aislamiento de α S1-CN. Los datos se analizaron mediante una prueba normalidad Shapiro-Wilk ($p > 0.05$) y una prueba t Student ($p < 0.05$) para muestras independientes. Los datos mostraron una distribución normal y no reflejaron diferencias estadísticas en los contenidos de α S1-CN y α S2-CN entre razas, mientras que los contenidos de β -CN resultaron mayores para las razas Alpina Francesa y β -LG en razas Saanen. El método de aislamiento basado en el fraccionamiento con urea y precipitación mediante punto isoeléctrico logró dicho aislamiento donde observamos una sola banda correspondiente a la proteína de interés y porcentaje de recuperación del 50%. Los resultados obtenidos servirán como pauta para futuras investigaciones en los que se vinculen los rendimientos queseros con la abundancia de α S1-CN, mientras que el aislado de dicha proteína promueve investigaciones sobre su funcionalidad y actividad biológica.

Palabras clave: aislamiento, cuantificación relativa, proteínas, α S1-CN.

Abstract

The goat dairy industry has experienced a significant growth in recent years, but, yields, especially in cheese production, remain low. This situation can be biochemically attributed to a reduced content of α S1-caseins in goat milk, a protein that is an essential part of the casein complex. Proteins were identified from the French Alpine (n=50) and Saanen (n=36) goat milk samples by electrophoretic profiles. These analyses served as a basis for quantifying relative abundances expressed as percentages of α S1-Caseins (α S1-CN), α S2-Caseins (α S2-CN), Beta-Caseins (β -CN), and Beta-Lactoglobulin (β -LG). In addition, three methods to isolate α S1-CN were evaluated. The data was analyzed using a Shapiro-Wilk normality test ($p > 0.05$) and a t-Student test ($p < 0.05$). The data showed a normal distribution and did not reflect statistical differences in α S1-CN and α S2-CN contents between breeds, whereas β -CN contents were higher in French Alpine breeds, and β -LG contents were higher in Saanen breeds. In addition, we evaluated three methods to isolate α S1-CN. We analyzed the data using a Shapiro-Wilk normality test ($p > 0.05$) and a Student's t-test ($p < 0.05$). The data showed a normal distribution and did not reflect statistical differences in α S1-CN and α S2-CN contents between breeds, whereas β -CN contents were higher in French Alpine breeds, and β -LG contents were higher in Saanen breeds. On the other hand, the isolation method based on fractionation with urea and precipitation through the isoelectric point achieved successful isolation, where it was observed a single band corresponding to the protein of interest and a recovery value of 50%. The results obtained will serve as a guide for future research relating cheese yield to the abundance of α S1-CN, while the isolation of this protein promotes the investigation of its functionality and biological activity.

Keywords: isolation, goat milk proteins, relative quantification, α S1-casein.

Introducción

A lo largo de los años se ha evidenciado el crecimiento de ganadería caprina en los sectores rurales de la población, sin embargo, este ha sido un rubro que ha existido en nuestras civilizaciones desde tiempos antiguos, siendo las cabras (genus *Capra*) y los ovinos (genus *Ovis*), de las primeras especies de ganado en ser domesticadas. Mediante el proceso de domesticación y cría estable de rebaños de ovejas y cabras surgieron nuevas tecnologías para la conservación de un nuevo producto: la leche, con el cual se desarrollaron los primeros quesos, mantequillas y fermentos lácticos (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 2023)

Hoy en día el sector caprino lechero forma parte de la industria láctea mundial, que incluye la leche de vaca, oveja, búfalo y camello y sus productos (Pirisi et al., 2007). La producción mundial total de leche de cabra se estimó en 21 millones de toneladas en el año 2020. Además, para el mismo año, se reportó una producción mundial de queso de leche de cabra que superó las 500 mil toneladas (FAO, 2021). Durante la década de 2010 a 2020, Europa y África reportaron la mayor producción de leche de queso de cabra (39.8% y 39.4%, respectivamente), seguido del continente asiático (16.3%), y América (4.5%). Dentro de la región latinoamericana, los dos principales productores de leche de cabra son México y Brasil con producciones estimadas mayores a 150 mil toneladas. Si bien esta ha sido una industria que ha experimentado un crecimiento gradual, los niveles productivos aún no se asemejan a los obtenidos en productos lácteos de origen bovino, lo que mantiene sus tasas de crecimiento en desventaja. Se estima que solo el 2% de la industria de productos lácteos mundial, es de origen caprino (Park, 2017).

Además de los factores socioeconómicos, aspectos bioquímicos, especialmente el bajo contenido de α S1-CN, limitan el crecimiento y rendimiento de la industria del queso de cabra (Skeie, 2014). El estudio de esta proteína ha provocado interés para los investigadores debido a la evidencia de relación existente en el contenido de α S1-CN y los rendimientos en quesos de leche de cabra (Guo et al., 2004; Johansson et al., 2015) . En principio, se debe recordar que la proteína de la leche se

compone principalmente de cuatro caseínas α S1, α S2, β y κ (α S1-CN, α S2-CN, β -CN y κ -CN) además de las proteínas del suero, las cuales proporcionan aminoácidos esenciales para los seres humanos (Song et al., 2020). La caseína es el principal componente proteínico insoluble de la leche y representa aproximadamente entre el 75 y 80% de la fracción proteica total de la leche (Bhat et al., 2016), en leche de cabra, este representa el 77% (Jensen R.G., 1995). Diversos estudios destacan la fuerte influencia genética sobre la presencia de α S1-CN en leche de cabra, estas alteraciones son llamadas "variantes alélicas". Al menos 17 variantes de α S1-CN han sido encontradas, y se ha identificado que las expresiones cuantitativas pueden ser designadas como "tipo nulo o bajo" a cantidades ≥ 0 g/L, y las "tipo alto" para valores ≥ 3.5 g/L (Boulanger et al., 1984; Martin et al., 1999).

Al investigar las propiedades tecnológicas de la leche de cabra con diferentes contenidos de α S1-caseína, Ciafarone y Addeo (1948) y Salem et al. (2009), demostraron que los tipos bajos tienen un tiempo de coagulación más corto y una resistencia más débil a los tratamientos térmicos que los tipos altos. Por lo tanto, cuando la leche de cabra se juzga con fines tecnológicos, la mejor firmeza de la cuajada obtenida en la leche de alto tipo parece digna de consideración. En la leche de tipo alto la mayor cantidad de α S1-CN se asoció con una mayor cantidad de caseína total, lo que aumentó el rendimiento quesero de la leche de cabra (Ricordeau et al., 1967). Por ello, algunos estudios de interés buscan aumentar la expresión de dicha proteína, al ser este un factor que se encuentra directamente relacionado con rendimientos en la elaboración de quesos.

En consecuencia, a la importancia del estudio de la α S1-CN, la presente investigación explora la fracción proteica de leche de dos diferentes razas de cabra, partiendo de una caracterización general de la leche, en la cual se incluye el análisis de proteína cruda y perfil electroforético para la identificación de las proteínas presentes en las muestras, así como el desarrollo de un protocolo de aislamiento de α S1-CN, prioritario para continuar el estudio de dichas moléculas. Es relevante mencionar que actualmente no existe un método de aislamiento publicado, por lo que este nuevo protocolo permitirá identificar la raza con mayor producción de α S1-CN y además, ahondar en el

estudio de esta fracción. El estudio del aislamiento de proteínas, como la α S1-CN, proporciona directrices para futuras investigaciones y beneficia a los productores lácteos, debido a su impacto en la producción y la salud humana. A continuación, se presentan los objetivos:

Identificar las proteínas α S-CN, β -CN, α -LA, y β -LG en muestras de leche de cabra de las dos razas más importantes para fines comerciales (Saanen y Alpina Francesa).

Cuantificar de manera relativa las α S1-CN en muestras de leche de cabra de las dos razas más importantes para fines comerciales (Saanen y Alpina Francesa).

Desarrollar un método para el aislamiento de α S1-CN en muestras de leche de cabra.

Materiales y Métodos

Ubicación del Estudio

El estudio se desarrolló en el Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, en el Centro de Investigación y Desarrollo de Proteínas (CIDPRO), localizado en el estado de Nuevo León, México.

Muestra de Estudio

Se utilizaron 86 muestras de leche de cabra de las cuales 50 corresponden a la raza Alpina, 36 Saanen. Todas pertenecientes al Rancho Cabrío, S.P.R de R.L, ubicado en Linares, Nuevo León, México.

Colección y Preparación de la Muestra

Las muestras de leche fueron trasladadas en hieleras con hielo hasta las instalaciones del Centro de Investigación y Desarrollo de Proteínas (CIDPRO) ubicado dentro de las instalaciones del Instituto Tecnológico de Monterrey, donde se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Análisis Proximales

Se determinó pH, densidad, humedad y proteína cruda para cada una de las muestras realizando pruebas por triplicado. El análisis de densidad se ejecutó haciendo uso de un picnómetro con termómetro en vidrio de borosilicato con capacidad de 25 mL. Humedad se ejecutó con el método gravimétrico propuesto por los Métodos Oficiales AOAC. El contenido de proteína cruda se estimó utilizando un volumen de muestra 500 µl, con el método Micro-Kjeldahl aplicando un factor de conversión (6.38) de acuerdo con el método 991.20 (Association of Official Analytical Chemists [AOAC], 1994).

Perfil Electroforético

El procedimiento para la preparación de gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico electroforesis (SDS-PAGE) descrito por Laemmli (1970), fue ejecutado con leves modificaciones en los volúmenes de soluciones y muestras. El gel de apilamiento se preparó a una concentración de acrilamida del 5%, mientras que el gel de separación fue elaborado a un 15%. Para la preparación de

las muestras se realizó una dilución 1:3 de la muestra de proteína en agua destilada. El volumen de la dilución se mezcló con un volumen igual de tampón de carga el cual contiene 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, 0.004% azul bromofenol y 0.125 M Tris HCl. Las muestras se sometieron a tratamiento térmico durante 5 min en un baño de agua hirviendo antes de ser aplicadas al gel, posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Tras la polimerización del gel, se aplicaron 16 μ l de solución en cada carril del gel. Además, se utilizó el marcador BIO-RAD Precision Plus Protein™ como referencia del peso de las proteínas. Para cada análisis realizado, se le fue aplicada una carga de 150V durante dos horas. Seguidamente, la tinción se llevó a cabo mediante la inmersión de los geles en azul de coomassie (100ml/gel) durante una hora a temperatura ambiente y en agitación constante. Previo al proceso de desteñido se realizaron enjuagues en agua para eliminar el exceso de azul coomassie. El desteñido de los geles se realizó en dos etapas, la primera mediante inmersión en solución decolorante uno la cual contía etanol absoluto (45%), agua destilada (45%) y ácido acético (10%). El proceso tuvo una duración de una hora en agitación constante a temperatura ambiente. Seguidamente se realizó la segunda etapa, la cual consiste en lavados en una segunda solución decolorante, conteniendo concentraciones diferentes de metanol (7%), agua destilada (88%) y ácido acético (5%). El número de lavados en la segunda solución decolorante varió de dos a tres por gel, o hasta lograr una visualización de las bandas. Los geles fueron almacenados en soluciones de ácido acético al 5% en refrigeración a 4 °C. La captura de imagen de los geles se realizó haciendo uso del equipo iBright Imaging System. Finalmente se realizó un análisis de imagen mediante el software GelAnalyzer 19.1 (www.gelanalyzer.com) por Istvan Lazar Jr., PhD y Istvan Lazar Sr., PhD, CSc. Para cada análisis se realizó una calibración en función del volumen de banda y movilidad relativa (Rf) sobre el marcador de peso molecular, estos valores sirvieron como referencia para determinar los datos para cada muestra. Las concentraciones relativas de la abundancia de α s1-CN, α s2-CN, β -CN y β -LG fueron expresadas en porcentajes con respecto al 100% de proteínas obtenidas en cada muestra de leche.

Aislamiento de α S1-CN

Diversos métodos fueron aplicados a una misma muestra de leche de cabra, descongelada, sin desgrasar, sin pasteurizar. Los resultados para cada método fueron revelados a través de análisis electroforético SDS-PAGE con una concentración al 15% acrilamida (misma metodología utilizada para determinación de perfil electroforético). El porcentaje de recuperación de proteína fue calculado en el método efectivo para el aislamiento, mediante el uso de la Formula 1.

$$\% \text{ recuperación} = \frac{\text{ug de } \alpha\text{S1-CN aislada}}{\text{ug de } \alpha\text{S1-CN contenida en la muestra inicial}} \times 100 \quad [1]$$

Método 1: Punto Isoeléctrico y Solubilidad en Urea.

Se siguió el protocolo realizado por Hipp et al. (1952), el cual propone el aislamiento de α S-CN a partir de precipitación de caseínas por punto isoelectrico y su fraccionamiento en α , β y κ CN mediante soluciones acuosas de urea, incluyendo algunas modificaciones: la muestra se centrifugó a 9661 rpm 4 °C durante 30 min con el objetivo de descremar y obtener una fracción clarificada de carbohidrato y proteína. Una vez extraído, se acidificó el pH de la fracción a 4.46 con 1 N de HCl a fin de obtener una precipitación de las micelas de caseínas por medio de punto isoelectrico, posteriormente se centrifugó a 8000 rpm durante 30 min a 4 °C a fin de precipitar y separar las micelas de caseína. El sobrenadante fue descartado y el precipitado fue diluido en 6.6 M de urea con el fin de solubilizar el complejo de α -CN (Swaisgood y Brunner, 1973), seguidamente, la solución fue diluida en agua destilada hasta alcanzar una concentración 4.6 M urea. Cuando la concentración de urea se redujo a 4.6 M por la adición de agua, la α -CN se tornó insoluble (Hipp et al., 1952). Por consiguiente, la α -CN fue removida sometiendo la solución resultante a centrifugación durante 20 min a 3500 rpm a 25 °C o temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se mantuvo el precipitado, el cual se redisolvió en una solución 6.6 M urea y 0.15 M NaCl con el fin de purificar la α -CN. Finalmente, se diluyó la concentración de urea a 4.6 M añadiendo agua destilada. Dicha solución se centrifugó a las mismas especificaciones del paso anterior. Una vez extraído el precipitado, se suspendió de nuevo en

4.7 M urea y centrifugado a 3500 rpm durante 30 minutos a 25 °C o temperatura ambiente eliminando las impurezas y trazas de β -CN (Hipp et al., 1952). La solución resultante fue dializada durante 24 horas en agua bidestilada y agitación constante, en una membrana de diálisis de celulosa Spectra/Por® con MWCO de 6000 - 8000 daltons; esto con el fin de realizar una separación molecular en el que los compuestos de bajo peso molecular se difunden a través de la membrana mientras que los pesos moleculares más altos, como las proteínas, quedan retenidos por la membrana, esto resultó en una solución purificada de agua y α S1-CN.

Método 2: Sensibilidad en Cloruro de Calcio

Se ejecutó el protocolo realizado por Thekkilaveedu et al. (2020), con algunas modificaciones sobre las especificaciones de las centrifugaciones. Este método induce el fraccionamiento de las α , β y κ CN por medio de adición de CaCl_2 mediante el cual, las caseínas α S y β sensibles al calcio fueron precipitadas (Atamer et al., 2017). A una muestra de leche descongelada y descremada le fue añadido CaCl_2 (>95%) seco, hasta alcanzar una concentración 1.5 M en la solución, seguidamente se ajustó su pH a 5.0 con 1M ácido láctico. En consecuencia, las micelas de caseína se precipitaron de la leche descremada por proceso de acidificación utilizando ácido láctico a una concentración molar específica (1.0 mol/L) como agente acidificante (Thekkilaveedu et al., 2020). Seguidamente, se centrifugó a 5365 rpm durante 10 min a 20 °C, a fin de separar el precipitado (identificado como fracciones de caseína α y β) y el sobrenadante (fracción κ). Las α -caseínas fueron separadas mediante extracción en frío a través de centrifugación a 5365 rpm por 10 min a 4 °C. La extracción en frío del precipitado se justifica debido a que la hidrofobicidad de la β -caseína disminuye a una temperatura fría, lo cual separa de la fracción abundante de β -caseína en la porción sobrenadante, la cual se precipita en condiciones acidificadas (Thekkilaveedu et al., 2020). Finalizada la centrifugación, se retiró el sobrenadante conteniendo β -caseínas y se conservó el precipitado conteniendo las α -caseínas el cual fue, seguidamente, re suspendido en agua para ser analizado en gel de electroforesis con la metodología previamente descrita.

Método 3: Fraccionamiento Del Complejo α 1- K Caseína

Se llevó a cabo el protocolo descrito por Gehrke et al. (1966), para el aislamiento de α S1-CN. Los fundamentos para la separación química de α S- caseína incluyen el fraccionamiento de caseína en urea, a partir de precipitación por punto isoeléctrico y fraccionamiento en α S1- κ , β y κ caseína. Algunos ajustes fueron realizados para logra escalarlo a volúmenes bajos de muestra (10 ml iniciales de muestra). La temperatura para cada proceso de centrifugación fue de 4 °C. Se llevó a cabo el protocolo descrito por Gehrke et al. (1966), para el aislamiento de α S1-CN.

Originalmente, una muestra de leche, sin pasteurizar fue descremada por medio de centrifugación a 9661 rpm durante 25 min. La fracción descremada fue extraída a fin de extraer las caseínas mediante el ajuste de pH a 4.6 con 1N HCl. Las caseínas precipitadas fueron separadas mediante centrifugación a 6000 rpm durante 20 min. Una vez descartado el sobrenadante, el precipitado de caseínas fue disperso en una solución de urea al 6.6 M; posteriormente se diluyó a urea 4.5 M y se reajustó a un pH de 4.6. Esta solución se mantuvo durante una noche en refrigeración a 4 °C y luego centrifugada a 3000 rpm durante 30 min a fin de fraccionar el complejo α 1-K. Este procedimiento con solución de urea se repitió una vez más sobre el precipitado obtenido de la centrifugación. Una vez realizada la segunda centrifugación, se descartó el sobrenadante y se agregó agua destilada al precipitado, posteriormente se ajustó el pH a 8.5 con 0.01M NaOH. Una vez alcanzado este valor, se reajustó a pH 7 con 0.01 M HCl. Seguidamente, se añadió 3M de CaCl_2 a fin de alcanzar una solución 0.2M en base al volumen inicial. Al agregar CaCl_2 , el complejo α - κ se divide, la κ -caseína y la α -caseína forman rápidamente un precipitado, la κ -caseína forma polímeros que permanecen en el sobrenadante (Waugh y Hippel, 1956). Manteniendo un pH de 7, se procedió a centrifugar la solución a 3000 rpm durante 30 min. Este proceso fue repetido una vez con el precipitado obtenido de la centrifugación. Seguidamente se le agregó agua destilada al precipitado obtenido y se ajustó el pH a 8.5 añadiendo 0.01M NaOH. Posteriormente se agregó la cantidad necesaria de 1.5M de oxalato de potasio ($\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$) para alcanzar una solución 0.5M, partiendo del

volumen inicial. Tras la adición de oxalato de potasio, el calcio de las micelas es eliminado, liberando así la caseína (Waugh y Hippel, 1956). Posteriormente, el pH fue ajustado nuevamente a 8.5 y centrifugado a 10,000 rpm por 40 min. El sobrenadante obtenido fue guardado y el proceso fue repetido con el precipitado. Finalmente, los sobrenadantes fueron mezclados y dializados en agua bidestilada durante seis horas.

Análisis Estadístico

Los datos se presentaron como valores medios con desviación estándar calculada. Los resultados obtenidos de las diferentes concentraciones de caseínas para cada muestra se analizaron con el fin de evaluar diferencias estadísticas entre razas para cada proteína, por lo tanto, se realizó una prueba *t* de Student con un nivel de significancia $P < 0.05$ para comparación de muestras independientes. Además, se realizaron análisis de normalidad para las fracciones $\alpha S1$ -CN en muestras de leche de cabra para las razas Alpina y Saanen, los resultados mostrados fueron evaluados mediante la prueba de Shapiro-Wilk ($p > 0.05$). Dichos análisis fueron ejecutados haciendo uso del programa "Statistical Analysis Software" SAS 9.4®. Debido a la escasez en la cantidad de muestras para las muestras de razas Nubian y Toggenburg, el análisis estadístico se realizó solamente para las razas Saanen y Alpina.

Resultados y Discusión

Análisis Proximales

Los valores obtenidos para los análisis proximales de pH, densidad, humedad y proteína cruda en las muestras de leche de cabra se muestran en el Cuadro 1 para todas las muestras evaluadas, mientras que el Cuadro 2 presenta los resultados de acuerdo con las razas evaluadas. Los valores de pH obtenidos en este estudio (Cuadro 1 y 2) coinciden con los rangos documentados en los valores medios de pH, los cuales van de 6.5 a 6.9 para leche de cabra (Bhattarai, 2014; Y. W. Park et al., 2007). Las mediciones de pH según la raza presentaron resultados similares a los obtenidos por Yousif (2006) quien reportó valores de 6.72 ± 0.06 en leche de raza Saanen. De igual manera los resultados de pH para las muestras de raza Alpina Francesa coincidieron con los reportados por Wu et al. (2020) el cual fue de 6.7 (Cuadro 2).

Cuadro 1

Resultados para los análisis de pH, densidad, humedad, y proteína cruda de las muestras de leche de cabra.

Parámetro	pH	Densidad (g/mL)	Humedad (%)	Proteína cruda (%) Base Húmeda
Valor	6.70 ± 0.23	1.06 ± 0.02	88.11 ± 0.34	3.8 ± 0.67

Cuadro 2

Resultados para los análisis de pH, densidad, humedad, y proteína cruda de las muestras de leche de cabra según la raza.

Raza	pH	Densidad (g/mL)	Humedad (%)	Proteína cruda (%) Base húmeda
Alpina Francesa (n=50)	6.72 ± 0.21	1.06 ± 0.02	88.23 ± 1.30	3.85 ± 0.80
Saanen (n=36)	6.67 ± 0.22	1.05 ± 0.03	88.42 ± 1.66	3.67 ± 0.47

Evaluaciones de densidad obtenidas por Shuvarikov et al. (2021) para muestras de leche de cabras fueron de 1.0285 ± 0.97 g/cm³ en razas Alpina y 1.0281 ± 0.60 g/cm³ para razas Saanen; aunque

los valores obtenidos en este estudio fueron de 1.06 y 1.05 g/mL en las mismas razas respectivamente, las desviaciones estándar reportadas son menores a 0.03 (Cuadro 2) en comparación a los valores del estudio de Shuvarikov et al. (2021) lo cual refleja un dato mayor acertado para este parámetro.

Un parámetro relevante en la composición química de la leche de cabra es el contenido de humedad. Se ha registrado que la leche de cabra está constituida por un 87% de agua (Haenlein, 2001; Shuvarikov et al., 2021). Sin embargo, Yousif (2006) reportó en su estudio que las muestras de leche de cabras Saanen están constituidas por un 88.22% de agua. En otro estudio elaborado por Lešić et al. (2021), se documentaron valores de humedad de 88.4% en raza Saanen, coincidiendo con los valores obtenidos para este estudio (Cuadro 2); sin embargo, no se logró evidenciar la misma coincidencia para la raza Alpina, ya que los valores obtenidos en el estudio fueron de 85%, mientras que los análisis obtenidos en el presente estudio mostraron un porcentaje mayor (3%) de humedad para dicha raza.

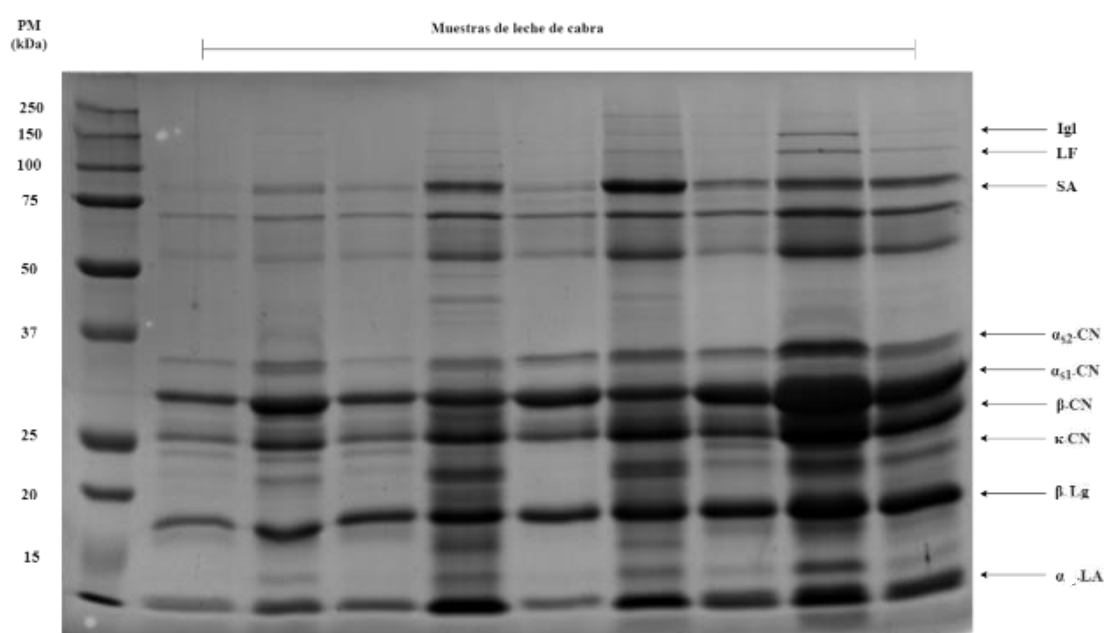
Los valores de proteína cruda para la raza Saanen obtenidos en el estudio fueron mayores a los reportados por Jenness (1980) en Australia y Nigeria entre la década de los 60's y 80's, cuyos contenidos se encontraban entre 3.07 y 3.39%. Sin embargo, un reciente estudio realizado en Moscú reveló medias cercanas a las obtenidas, presentando porcentajes de proteína de 3.55 ± 0.03 en razas Saanen y 3.72 ± 0.10 en raza Alpina (Shuvarikov et al., 2021). Esto concuerda con los diversos estudios que indican que la leche caprina contiene en promedio un 3.5% de proteína cruda (Haenlein, 2001; Rafiq et al., 2016, 2016) Sin embargo, se sabe que las variaciones de estos valores, así como la composición de la leche en general, dependen de las estaciones, etapas de lactancia, dieta del animal, raza, entre otros aspectos. Por ello, se presenta un rango de porcentaje de proteína cruda para leche caprina que va desde 2.49 a 5.06% (Amigo y Fontecha, 2011). Al igual que en este estudio, Lešić et al. (2021) revela que, en promedio, el contenido de proteína cruda fue mayor en razas Alpina en comparación con la raza Saanen.

Perfil Electroforético

Para la caracterización de las proteínas se realizó un perfil electroforético de cada muestra de leche de cabra. En la Figura 1 se muestra un gel típico de electroforesis en el cual se analizaron nueve muestras de leche correspondientes a la raza Alpina, las cuales fueron incluidas en el estudio. Este mismo análisis fue utilizado para cuantificar de manera relativa las caseínas previamente identificadas.

Figura 1

SDS- PAGE análisis de leche caprina pertenecientes a la raza Alpina.



Nota. PM: marcador molecular con sus respectivos pesos moleculares expresados en kDa. Los siguientes nueve carriles corresponden a diferentes muestras de leche de cabra, Igl: Inmunoglobulina G, LF: Lactoferrina, SA: Seroalbúmina, α_1 -CN: α_1 -caseína, α_2 -CN: α_2 -caseína, β -CN: β -caseína, κ -CN: κ -caseína, β -LG: β -lactoglobulina; α -LA: alfa lactoalbúmina

Las proteínas identificadas incluyen en su mayoría Seroalbúminas, caseínas y β -lactoglobulinas, siendo las principales proteínas de interés para el estudio la α_2 -CN, α_1 -CN, β -CN y β -LG. Se logró apreciar una separación evidente entre las proteínas de bajo y alto peso molecular, lo que permite una fácil identificación de las caseínas con respecto a las proteínas del suero. Una caracterización de la leche de cabra realizada por Salem et al. (2009) reportó que proteínas como la seroalbúmina y la lactoferrina, mostraron marcadas diferencias en las movilidades de migración de

las distintas proteínas. Además, se observó que la β -LG en la leche de cabra era más rápida, mientras que α -LA tenía una movilidad de migración más lenta en el gel que las proteínas de la leche de vaca. Este resultado muestra las diferencias entre pesos moleculares. Debido a los bajos pesos moleculares de la α -LA (<13 kDa), se obtuvieron limitados datos de dicha proteína en el presente estudio, siendo identificada únicamente en 18 muestras de entre los 86 perfiles electroforéticos obtenidos. Esto indica que una mayor concentración de acrilamida en la composición del gel de separación podría revelar la identificación de esta proteína en todas las muestras evaluadas. Los pesos moleculares para las proteínas de cada muestra de leche se identificaron a través del análisis de imagen, los resultados sobre los rangos entre los que se ubicaban las proteínas evaluadas se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3

Rangos de pesos moleculares registrados para cada proteína expresados en kDa.

Proteína	α 2-CN	α 1-CN	β -CN	κ -CN	β -LG	α -LA
Peso molecular (kDa)	33- 36	27-30	24-26	21-24	16-18	11-13

Los pesos moleculares obtenidos en este estudio se asemejan a los reportados por Dos Santos et al. (2018), donde se registran pesos de 12.34 KDa para α -LA, 16.50 para β -LG y 30.18 para α 1-CN. Variaciones en la movilidad de las proteínas se debe a los polimorfismos genéticos de cada proteína, por lo cual los pesos registrados en este estudio son expresados en rangos.

Por otro lado, se obtuvo un reporte de áreas relativas a partir de las 50 muestras de leche pertenecientes a la raza Alpina y 36 correspondientes a la raza Saanen. Con estos valores se realizó una evaluación de medias con el fin de identificar diferencias estadísticas de dichos valores entre las razas. El Cuadro 4 muestra una tabla resumen de los promedios obtenidos por raza y su diferencia de medias.

Cuadro 4

Tabla resumen para el porcentaje de concentración relativa de caseínas presentes en leche de cabra de dos diferentes razas.

Raza	α s-2 CN (%)	α s-1 CN (%)	β -CN (%)	κ -CN (%)	Fracción total de caseína en base a 100% de proteínas
Alpina (n=50)	6.11 \pm 2.97 ^a	24.73 \pm 6.86 ^a	16.02 \pm 5.14 ^a	4.03 \pm 2.83	50.89
CV (%)	48.67	27.73	32.08	70.31	
Saanen (n=36)	5.38 \pm 3.00 ^a	24.44 \pm 5.85 ^a	12.90 \pm 4.51 ^b	3.96 \pm 2.38	46.68
CV (%)	55.76	23.93	34.94	60.15	

Nota. ^{ab} Medias seguidas por diferente letra en la misma columna son estadísticamente diferentes (P < 0.05).

Los resultados de los análisis estadísticos revelan que no existen diferencias significativas en la abundancia de las proteínas α s1-CN y α s2-CN entre las razas Alpina y Saanen, sin embargo, se presentaron mayores concentraciones de β -CN en la leche de cabra de la raza Alpina, superando en un 3.12% la media obtenida en muestras de raza Saanen. Por otro lado, se observaron diferencias significativas en el contenido de β -LG con una media de 29.20% en leche de cabras Saanen, superando en un 8.42% el contenido de esta proteína en la leche de cabra de la raza Alpina.

Los porcentajes obtenidos de α s1-CN en este estudio (24%), indican altos porcentajes de la presencia de esta proteína de acuerdo a lo descrito por Boulanger et al. (1984) donde señala que en la leche de cabra, el contenido de α s1-CN oscila entre el 0 y el 25% dependiendo la presencia de polimorfismos en el gen que codifica esta proteína. Esto representa una ventana de variabilidad considerablemente alta para una comparación del contenido de α s1-CN entre muestras. Adicionalmente, la igualdad estadística de estos resultados entre razas, contradicen los expuestos por Maga et al. (2009) y , donde se expone que las muestras de leche producidas por cabras Saanen suelen tener cantidades bajas de α s1-CN en comparación con la cantidad encontrada en la leche producida por cabras Alpina.

El interés de estos resultados radica en la oposición de los mismos ante los diversos estudios que revelan una predisposición genética sobre la poca producción de α S1-CN en las razas Saanen y Alpina (Grosclaude et al., 1994; Trujillo et al., 1998). Además de contradecir a los estudios que indican que la β -caseína es el componente mayoritario de la fracción de caseína en la leche de cabra (Jensen R.G., 1995; Nayik et al., 2022; Park, 2017; Salem et al., 2009, 2009, 2009).

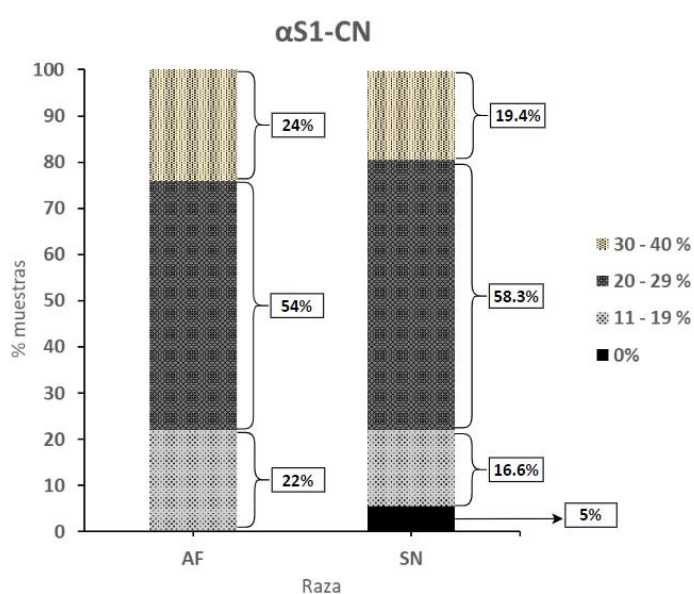
La identificación de expresiones altas de α S1-CN en las muestras de leche evaluadas en el estudio, proyectan afectos positivos y provechosos para la elaboración de productos lácteos. En un estudio de comparación de la composición de la leche, las propiedades queseras y las características texturales del queso en leche de cabra elaborado por Pirisi et al. (1994), se evidencia que la leche procedente de animales con un alto contenido de α S1-CN era más rica en materia seca, grasa y caseína y tenía un tamaño medio de micela menor. Mientras que otros estudios mostraron que esta leche tenía mejores propiedades de coagulación del cuajo y sólidos totales en el queso, además que la recuperación de grasa y el rendimiento bruto fueron significativamente mayores (Grosclaude et al., 1994; Pirisi et al., 1994).

Obtenidos la cuantificación relativa de cada una de las proteínas de la caseína, se realizó una sumatoria de estas fracciones, obteniendo la representación porcentual de todo el complejo de caseínas. Este resultado se comparte mediante el cuadro 4, el cual muestra que, de las proteínas presentes en las muestras de leche, las caseínas representan un 50.89% en razas Alpina Francesa y un 46.68% en Saanen, dichos resultados menores incluso a un 60%, resultan ser inferiores a los esperado, ya que, los estudios indican que la caseína generalmente representa entre un 70 a 80% del total de proteínas (Ceballos et al., 2009) siendo en cabras un contenido de caseína alrededor del 77%. Las razones que podrían explicar el bajo contenido de caseínas en las muestras analizadas radican sobre el efecto de factores genéticos, fisiológicos (Shi et al., 2015) y medioambientales (Kędzierska-Matysek et al., 2014), los cuales influyen directa e indirectamente sobre la composición de la leche. Estos factores son igualmente atribuidos como respuesta a las variaciones entre los porcentajes de proteína

representada por α -1 CN. En las muestras analizadas para el estudio, se encuentran contenidos de α -1 CN que oscilan entre el 0 - 40%. La Figura 2 revela un gráfico de barras apiladas en el cual se representa una categorización de la abundancia de dicha proteína mediante rangos según las razas estudiadas.

Figura 2

Categorización de las concentraciones relativas de α -1 CN contenidas en muestras de leche caprina pertenecientes a raza Alpina Francesa y Saanen.



Los hallazgos mostraron que un 5% de las muestras correspondientes a la raza Saanen no mostraron presencia de la proteína, en contraste, todas las muestras de leche de la raza Alpina Francesa expresaron la proteína, con contenidos superiores al 11%. Fue evidente que el mayor porcentaje de las muestras analizadas poseían contenidos de α -1 CN que representaban entre un 20 – 29% del total de proteínas presentes, estando presente en un 54% de las muestras de la raza Alpina Francesa y en un 58.3% en Saanen (Los niveles bajos de α 1-caseína en la leche de cabra dan lugar a micelas de caseína más grandes, con poros más hidratados que las micelas de caseína de la leche de vaca (Haenlein, 2001; Moatsou et al., 2004). Como consecuencia, el yogur y el queso de cabra tienen una estructura de gel menos densa que sus homólogos elaborados con leche de vaca (Prosser, 2021).

El Cuadro 5 muestra las concentraciones relativas para las proteínas del suero β -LG y α -LA. Los contenidos de β -LG fueron significativamente fueron estadísticamente significativos entre razas, siendo mayor el contenido de esta en razas Saanen, representando el 29.19% de entre todas las proteínas, mientras que para la raza Alpina Francesa representó un dato menor en un 9%. Al obtener una sumatoria de los contenidos representados por la fracción de proteína de suero, estas representan porcentajes del 31% en razas Alpina Francesa y 41% para raza Saanen, estos valores representativos son inferiores a los reportados Amigo y Fontecha (2011) donde indican porcentajes mayores al 40% en β -LG y mayores a 15% en el contenido de α -LA.

Cuadro 5

Porcentaje de concentración relativa de β -LG y α -LA presentes en leche de cabra de dos diferentes razas.

Raza	β -LG (%)	α -LA (%)	Fracción total de β -LG y α -LA en base a 100% de proteínas
Alpina (n=50)	20.78 \pm 7.51 ^a	10.22 \pm 5.80	31.00
CV (%)	36.14	56.80	
Saanen (n=36)	29.19 \pm 9.94 ^b	12.26 \pm 8.04	41.45
CV (%)	34.07	65.60	

Nota. ^{ab} Medias seguidas por diferente letra en la misma columna son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

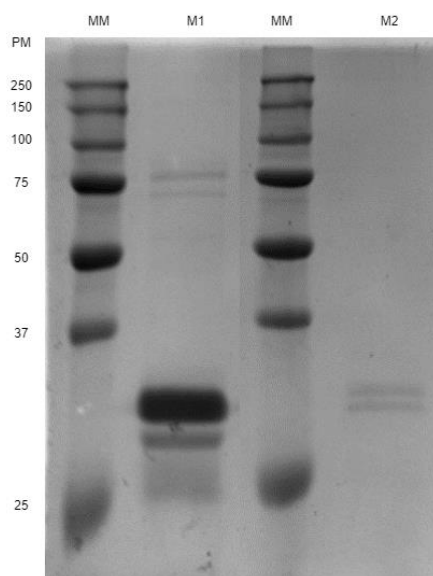
Método de Separación de α S1-CN

La implementación de tres diferentes métodos reveló diversos resultados en la búsqueda del aislamiento α S1-CN. Para la ejecución del Método 1, fue implementado una desnaturalización y separación de proteínas mediante punto isoeléctrico y solubilidad de las caseínas en urea, resultando en una separación de las proteínas del suero y las caseínas, lo cual reveló un aislado de todo el complejo de caseínas (α S1, β y κ). El Método 2 involucró un fraccionamiento de las proteínas mediante la sensibilidad de estas en diferentes concentraciones de cloruro de calcio. Este procedimiento resultó en el aislamiento de α S1-CN y β -CN debido a la sensibilidad de estas proteínas al compuesto, sin

embargo, no se obtuvo un aislado efectivo de α S1-CN a pesar de la aplicación de extracción en frío, lo que supondría un separación de la β -CN por el aumento en la hidrofobicidad de la proteína (Thekkilaveedu et al., 2020). Este resultado puede verse influenciada por la existente dependencia de cada fracción con respecto a la concentración de calcio aplicada en el proceso de fraccionamiento, ya que esta variación de la concentración de CaCl_2 influye en la pureza y recuperación de cualquier fracción de caseína (Atamer et al., 2017). Los resultados para los métodos uno y dos se muestran en la Figura 3, en el que se revelan las proteínas resultantes a través de un análisis electroforético. Debido a que la metodología implementada no involucraba el aislamiento de la α S1-CN pura, este derivó en la búsqueda de un tercer método el cual incluyera todos los factores de influencia descritos.

Figura 3

Análisis electroforéticos de resultados para Método 1 y 2 de aislamiento aplicado.



Nota. PM: pesos moleculares correspondientes al marcador molecular, MM: Marcador molecular, M1: método 1, M2: método 2.

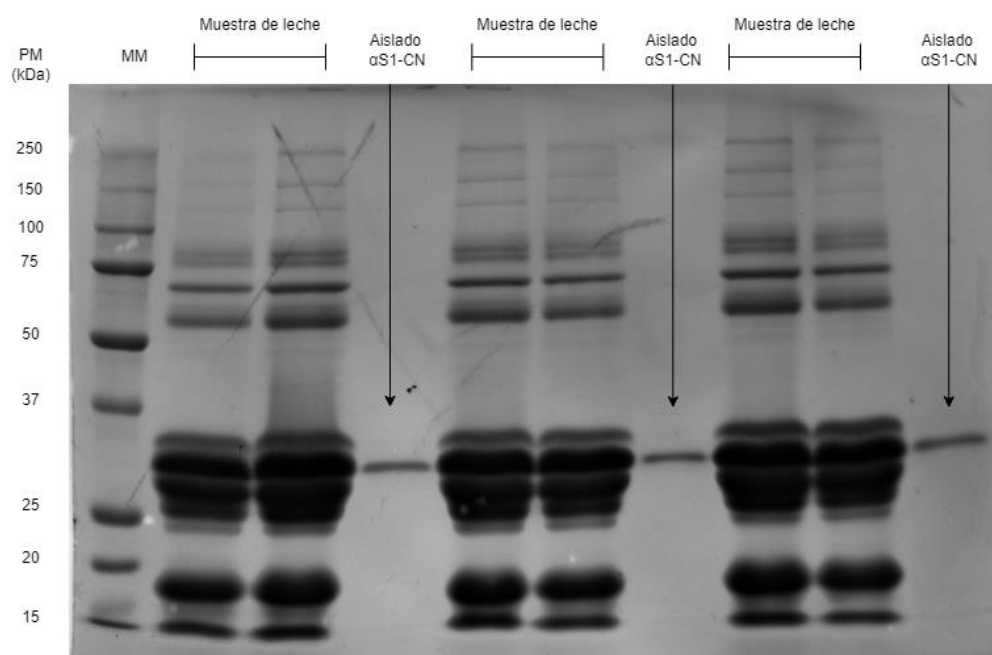
El protocolo de aislamiento de α S1-CN en el cual se obtuvieron los resultados esperados fue el Método 3 (M3), en el cual se realizó un fraccionamiento del complejo α S1- κ caseína, utilizando oxalato de potasio lo cual afectó la estabilidad iónica de las caseínas, desencadenando una separación de las fracciones y resultando en el aislamiento de la α S1-CN. Figura 4 muestra el análisis

electroforético que evidencia la eficacia del método utilizado, al demostrar la sola presencia de α 1-CN

una comparación entre la muestra de leche descremada, revelando las proteínas presentes y su resultado luego de la aplicación del M3 de aislamiento de dicha proteína.

Figura 4

SDS-PAGE análisis del resultado del método de aislamiento de α 1-CN.



Nota. Carril 1: marcador molecular con sus respectivos pesos moleculares expresados en kDa. Los carriles segundo, tercero, quinto, sexto, octavo y noveno corresponden una misma muestra de leche de cabra.

Como se muestra en el gel electroforético, se aisló de manera definitiva la α 1-CN, sin embargo, esta no fue aislada en su totalidad. La intensidad de la banda del aislado frente a las bandas de α 1-CN en las muestras de leche es menor, por lo que se aplicó la Formula 1, obteniendo un porcentaje de recuperación del 50%, siendo este resultado menor, en comparación al 90% obtenido por Gehrke et al. (1966) con el mismo método de aislamiento.

Conclusiones

La aplicación de análisis electroforéticos en muestras de leche de cabra en razas Alpina Francesa y Saanen permitió una identificación de las proteínas presentes, así como el análisis de las proteínas de interés para el estudio.

Los resultados obtenidos mediante el análisis de imagen de los geles electroforéticos fueron la pauta con la cual se realizó una cuantificación relativa de las proteínas α S1-CN en cada muestra de leche, identificándose una nula variación en el contenido de esta proteína entre razas.

El aislamiento de la α S1-CN en leche de cabra resultó eficaz mediante el método de fraccionamiento del complejo α S1- κ caseína a través de la solubilidad en urea, punto isoeléctrico y centrifugación en frío.

Recomendaciones

Realizar un análisis de correlación de los rendimientos queseros en leche de cabra correspondientes a las razas Alpina Francesa y Sanen, categorizando según los contenidos α S1-CN.

Investigar la relación existente entre los estadios de lactancia y los contenidos de α S1-CN en muestras de leche caprina, a fin de identificar las etapas en las que se evidencie una mayor expresión de la proteína.

Explorar las actividades biológicas procedentes de péptidos derivados del aislado de la α S1-CN a fin de identificar potenciales características beneficiosas para la salud humana.

Referencias

- Amigo, L. y Fontecha, J. (2011). Milk | Goat Milk, 82, 484–493. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00313-7>
- Association of Official Analytical Chemists. (1994). *Nitrogen(Total) in Milk - Kjeldahl Methods*. 991.20. http://www.aocofficialmethod.org/index.php?main_page=product_info&products_id=1704
- Atamer, Z., Thienel, K., Holder, A., Schubert, T., Boom, R. y Hinrichs, J. (2017). Isolation of casein protein fractions. *Advances in Food Science and Human Nutrition*, 1(1), 1–7. <https://doi.org/10.23977/afshn.2017.11001>
- Bhat, M. Y., Dar, T. A. y Singh, L. R. (2016). Casein Proteins: Structural and Functional Aspects. Publicación en línea avanzada. <https://doi.org/10.5772/64187>
- Boulanger, A., Grosclaude, F [F.] y Mahé, M. F. (1984). Polymorphisme des caséines $\alpha(s1)$ et $\alpha(s2)$ de la chèvre (*Capra hircus*) [Not Available]. *Genetique, selection, evolution*, 16(2), 157–176. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-16-2-157>
- Ceballos, L. S., Morales, E. R., La Torre Adarve, G. de, Castro, J. D., Martínez, L. P. y Sampelayo, M. R. S. (2009). Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(4), 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.10.020>
- Ciafarone, N.; Addeo, F. (1948). *Composizione della caseina e proprieta del latte di capra* (Vergaro núm. 11:17), 11.
- Dos Sandos, A. S., Meurer, V. M., Costa, F. F., Paiva, M., Fogaça, G., Do Egito, A. S., Furtado, M. M. y Martins, M. F. (2018). Major goat milk protein: separation and characterization by “lab-on-a-chip” microfluidic electrophoresis. *Boletim Do Centro De Pesquisa De Processamento De Alimentos*, 35(2). <https://doi.org/10.5380/bceppa.v35i2.60308>
- Gehrke, C. W., Chun, P. y Oh, Y. H. (1966). Isolation and Polyacrylamide Gel-Urea Electrophoretic Characterization of α S1 -Casein. *Separation Science*, 1(4), 431–442. <https://doi.org/10.1080/01496396608049458>
- Grosclaude, F [F.], MARTIN, P., Ricordeau, G., REMEUF, F., VASSAL, L. y Bouillon, J. (1994). Du gène au fromage : le polymorphisme de la caséine alphas1 caprine, ses effets, son évolution. *INRAE Productions Animales*, 7(1), 3–19. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.1994.7.1.4153>
- Guo, M., Park, Y. W., Dixon, P. H., Gilmore, J. A. y Kindstedt, P. S. (2004). Relationship between the yield of cheese (Chevre) and chemical composition of goat milk. *Small Ruminant Research*, 52(1-2), 103–107. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(03\)00247-5](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(03)00247-5)
- Haenlein, G. F. (2001). Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research. *Journal of Dairy Science*, 84(9), 2097–2115. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74655-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74655-3)
- Hipp, N. J., Groves, M. L., Custer, J. H. y McMeekin, T. L. (1952). Separation of α -, β - and γ -Casein. *Journal of Dairy Science*, 35(3), 272–281. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(52\)93702-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(52)93702-8)

- Jenness, R. (1980). Composition and Characteristics of Goat Milk: Review 1968–1979. *Journal of Dairy Science*, 63(10), 1605–1630. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(80\)83125-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(80)83125-0)
- Jensen R.G. (1995). Handbook of Milk Composition. Publicación en línea avanzada. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384430-9.X5000-8>
- Johansson, M., Högberg, M. y Andrén, A. (2015). Relation Between α S1-Casein Content and Coagulation Properties of Milk from Swedish Dairy Goats. *The Open Food Science Journal*, 9(1), 1–4. <https://doi.org/10.2174/1874256401509010001>
- Kędzierska-Matysek, M., Litwińczuk, Z., Koperska, N. y Barłowska, J. (2014). Content of macro- and microelements in goat milk in relation to the lactation stage and region of production. *Journal of Elementology*. Publicación en línea avanzada. <https://doi.org/10.5601/jelem.2013.18.4.549>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lešić, T., Pleadin, J., Bilandžić, N., Frizbegović, J., Jelušić, V., Tanković, S., Kudumija, N. y Vulić, A. (2021). Chemical composition and fatty acid profile of Alpine and Saanen goat milk from Bosnia and Herzegovina. *Veterinarska Stanica*, 52(1), 13–21. <https://doi.org/10.46419/vs.52.1.12>
- Maga, E. A., Daftari, P., Kültz, D. y Penedo, M. C. T. (2009). Prevalence of alphas1-casein genotypes in American dairy goats. *Journal of Animal Science*, 87(11), 3464–3469. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-1854>
- Martin, P., Ollivier-Bousquet, M. y Grosclaude, F [François] (1999). Genetic polymorphism of caseins: a tool to investigate casein micelle organization. *International Dairy Journal*, 9(3-6), 163–171. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00055-2](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00055-2)
- Moatsou, G., Samolada, M., Panagiotou, P. y Anifantakis, E. (2004). Casein fraction of bulk milks from different caprine breeds. *Food Chemistry*, 87(1), 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.10.020>
- Nayik, G. A., Jagdale, Y. D., Gaikwad, S. A., Devkatte, A. N., Dar, A. H. y Ansari, M. J. (2022). Nutritional Profile, Processing and Potential Products: A Comparative Review of Goat Milk. *Dairy*, 3(3), 622–647. <https://doi.org/10.3390/dairy3030044>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2021). *Crops and livestock products*. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2023). *Pequeños rumiantes*. FAO.
- Park, Y. W. (2017). Goat Milk - Chemistry and Nutrition, 26, 42–83. <https://doi.org/10.1002/9781119110316.ch2.2>
- Pirisi, A., Colin, O., Laurent, F., Scher, J. y Parmentier, M. (1994). Comparison of milk composition, cheesemaking properties and textural characteristics of the cheese from two groups of goats with a high or low rate of α S1-casein synthesis. *International Dairy Journal*, 4(4), 329–345. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(94\)90030-2](https://doi.org/10.1016/0958-6946(94)90030-2)

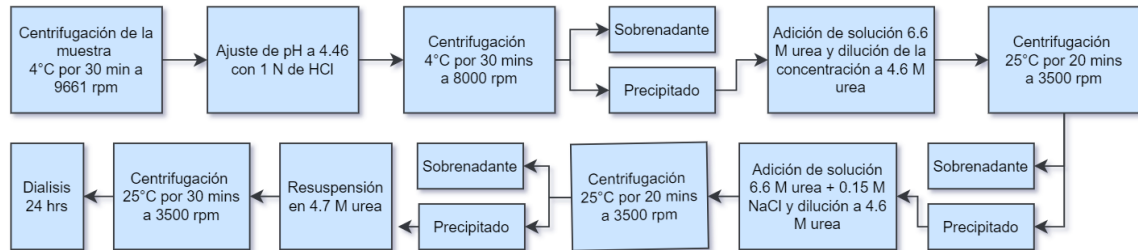
- Pirisi, A., Lauret, A. y Dubeuf, J. P. (2007). Basic and incentive payments for goat and sheep milk in relation to quality. *Small Ruminant Research*, 68(1-2), 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.009>
- Prosser, C. G. (2021). Compositional and functional characteristics of goat milk and relevance as a base for infant formula. *Journal of Food Science*, 86(2), 257–265. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15574>
- Rafiq, S., Huma, N., Pasha, I., Sameen, A., Mukhtar, O. y Khan, M. I. (2016). Chemical Composition, Nitrogen Fractions and Amino Acids Profile of Milk from Different Animal Species. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 29(7), 1022–1028. <https://doi.org/10.5713/ajas.15.0452>
- Ricordeau, G., Mocquot, G., Bouillon, J., Blanc-Patin, E., Jeunet, R. y Portmann, A. (1967). Influence des variations saisonnières de la composition du lait de chèvre sur le rendement en fromage. Conséquences pratiques pour la sélection. *Annales De Zootechnie*, 16(2), 165–181. <https://doi.org/10.1051/animres:19670203>
- Salem, S. A., El-Agamy, E. I., Salama, F. A., Abu-Soliman y NH (2009). Isolation, molecular and biochemical characterization of goat milk casein and its fractions. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 11, 29–35. <https://www.redalyc.org/pdf/939/93913000008.pdf>
- Shi, H [Hengbo], Zhu, J., Luo, J., Cao, W., Shi, H [Huaiping], Yao, D., Li, J., Sun, Y., Xu, H., Yu, K. y Loo, J. J. (2015). Genes regulating lipid and protein metabolism are highly expressed in mammary gland of lactating dairy goats. *Functional & Integrative Genomics*, 15(3), 309–321. <https://doi.org/10.1007/s10142-014-0420-1>
- Shuvarikov, A. S., Pastukh, O. N., Zhukova, E. V. y Zheltova, O. A. (2021). The quality of milk of goats of Saanen, Alpine and Nubian breeds. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 640(3), 32031. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/640/3/032031>
- Skeie, S. B. (2014). Quality aspects of goat milk for cheese production in Norway: A review. *Small Ruminant Research*, 122(1-3), 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.07.012>
- Song, N., Chen, Y., Luo, J., Huang, L., Tian, H., Li, C. y Loo, J. J. (2020). Negative regulation of α S1-casein (CSN1S1) improves β -casein content and reduces allergy potential in goat milk. *Journal of Dairy Science*, 103(10), 9561–9572. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18595>
- Swaigood, H. E. y Brunner, J. R. (1973). The caseins. *C R C Critical Reviews in Food Technology*, 3(4), 375–414. <https://doi.org/10.1080/10408397309527148>
- Thekkilaveedu, S., Krishnaswami, V., Mohanan, D. P., Alagarsamy, S., Natesan, S. y Kandasamy, R. (2020). Lactic acid-mediated isolation of alpha-, beta- and kappa-casein fractions by isoelectric precipitation coupled with cold extraction from defatted cow milk. *International Journal of Dairy Technology*, 73(1), 31–39. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12646>
- Trujillo, A. J., Jordana, J., Guamis, B., Serradilla, J. M. y Amills, M. (1998). Revisión: E1 polimorfismo del gen de la caseína α 1 caprina y su efecto sobre la producción, la composición y las propiedades tecnológicas de la leche y sobre la fabricación y la maduración del queso. *Food Science and Technology International*, 4(4), 217–235. <https://doi.org/10.1177/108201329800400401>
- Waugh, D. F. y Hippel, P. H. von (1956). κ -Casein and the Stabilization of Casein Micelles. *Journal of the American Chemical Society*, 78(18), 4576–4582. <https://doi.org/10.1021/ja01599a017>

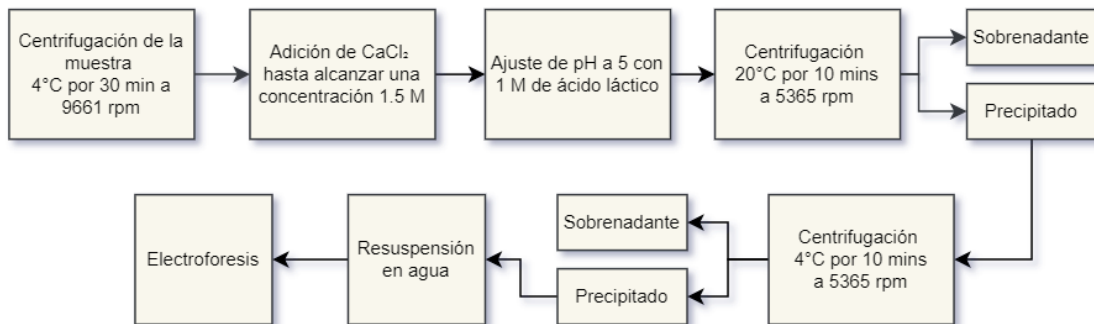
Yousif, A. (2006). *Milk composition of Nubian and Saannen goats* [Master's dissertation].
<https://core.ac.uk/download/pdf/71669687.pdf>

Anexos

Anexo A

Método 1 de aislamiento de α S1-CN: punto isoeléctrico y solubilidad en urea.



Anexo B*Método 2 de aislamiento de α S1-CN: Sensibilidad en Cloruro de Calcio.*

Anexo D

Concentración relativa de α S1-CN expresada en % en base a un 100% del total de proteínas para cada muestra de leche evaluada

Concentración relativa de α S1-CN (%)					
Raza	Muestra	Abundancia	Raza	Muestra	Abundancia
Alpina	3	33.1	Saanen	1	28.9
	12	22.81		2	27.89
	15	19.39		4	20.59
	16	20.33		6	23.24
	18	14.5		8	31.97
	20	26.6		14	23.66
	22	24.38		17	22.82
	24	19.48		21	26.72
	25	22.25		26	21
	28	20.53		29	22.99
	42	28.96		30	12.2
	43	21.9		32	21.84
	45	12.4		33	20.45
	46	27.77		36	19.14
	49	32.69		39	21.32
	54	20.6		47	24.61
	57	34.36		51	21.08
	61	14.63		55	32.07
	62	11.73		59	23.23
	65	35.51		69	32.52
	66	22.81		72	30
	67	22.01		73	28.42
	68	24.91		78	28.67
	74	18.76		84	31.62
	76	34.36		86	14.43
	77	12.03		97	18.17
	79	26.75		104	29.52
	81	29.6		105	33.07
	88	26.31		109	35.48
	82	23.98		111	27.27
90	34.76	114	22.5		
91	15.28	115	19.62		
92	27.68	116	12.93		
96	21.86	117	20.99		
98	24.6				
100	15.09				
101	30.22				

	102	25.52
	103	23.89
	106	25.54
	107	22.9
	112	36.73
	113	32.08
	5	33.1
	11	39.64
	13	30.05
	40	26.12
	44	28.49
	93	16.81
	94	20.85