

## Structure, properties and genetic of milk caseins: a review

### *Estructura, propiedades y genética de las caseínas de la leche: una revisión*

### *Estrutura, propriedades e genética das caseínas do leite: uma revisão*

Jonathan Padilla Doval <sup>1\*</sup> Qco, MSc. [✉ ORCID](#), Juan Carlos Zambrano Arteaga <sup>2</sup> Qco, MSc, PhD. [ORCID](#)

\* Autor de correspondencia.

<sup>1</sup> Grupo de Investigación Cuidados de la Salud e Imágenes Diagnósticas, Facultad de Ciencias de la Salud, Fundación Universitaria Navarra - UNINAVARRA, Neiva, Colombia.

<sup>2</sup> Grupo de Investigación en Bioquímica y Estudios Genéticos - BIOGEN. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Nariño - UDENAR, Ciudadela Universitaria Torobajo, San Juan de Pasto, Colombia.

#### Fecha correspondencia:

Recibido: abril 26 de 2021.

Aceptado: diciembre 13 de 2021.

#### Forma de citar:

Padilla Doval J, Zambrano Arteaga JC. Estructura, propiedades y genética de las caseínas de la leche: una revisión. CES Med. Zootec. 2021; 16(3): 62-95. <https://dx.doi.org/10.21615/cesmvz.5231>

#### Open access

[© Derecho de autor](#)

[Licencia creative commons](#)

[Ética de publicaciones](#)

[Revisión por pares](#)

[Gestión por Open Journal System](#)

DOI: 10.21615/cesmvz.5231

ISSNe 1900-9607

[Publica con nosotros](#)

## Abstract

Milk is an essential food for humans and one of the reasons of its importance lies in the content of milk proteins. The most frequent proteins in this precious liquid are caseins ( $\alpha_{s1}$ -casein,  $\alpha_{s2}$ -casein,  $\beta$ -casein and  $\kappa$ -casein), which are a source of amino acids for the diet of mammals in their first days of life. In milk, caseins are made up of molecular aggregates of proteins of varying sizes called micelles. The objective of this review is to present an overview of the structure, properties and genetics of dairy caseins and their relation with human health. From this review, it was established that  $\alpha_{s1}$  and  $\alpha_{s2}$  caseins are found together with  $\beta$ -casein, forming the micellar nucleus and interacting with calcium ions, to form and maintain stable the micelle. Animals genetically characterized with some variants of these proteins are associated with a yield in milk volume. For its part,  $\kappa$ -casein is associated with an increase in the yield and quality of cheeses, hence its economic importance, while the most common forms of  $\beta$ -casein in dairy cattle are A1 and A2.  $\beta$ -casein A2 does not have negative effects on human health; on the contrary, it has been associated with lowering

properties of cholesterol and triacylglycerides. However, the A1 variant of  $\beta$ -casein produces a bioactive peptide called  $\beta$ -casomorphin-7 (BCM-7), which may play an unclear etiological role in the development of some diseases in humans, such as: ischemic heart disease, type 1 diabetes mellitus, sudden infant death syndrome (SIDS), neurological disorders, such as autism and schizophrenia.

**Keywords:** *beta-casein; genomic wide association studies; kappa-casein; micelles; milk proteins.*

## Resumen

La leche es un alimento esencial para los humanos y una de sus importancias radica en el contenido de proteínas lácteas. Las proteínas más frecuentes en este preciado líquido son las caseínas ( $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\alpha_{s2}$ -caseína,  $\beta$ -caseína y  $\kappa$ -caseína), las cuales son fuente de aminoácidos para la dieta de los mamíferos en sus primeros días de vida. En la leche, las caseínas, están formadas por agregados moleculares de proteínas de tamaños variables denominados micelas. El objetivo de esta revisión es presentar un panorama general de la estructura, propiedades y genética de las caseínas lácteas y su relación con la salud humana. A partir de esta revisión, se pudo establecer, que las  $\alpha_{s1}$  y  $\alpha_{s2}$  caseínas se encuentran en conjunto con la  $\beta$ -caseína, formando el núcleo micelar, interactuando con los iones de calcio, para formar y mantener la micela estable. Animales caracterizados genéticamente con algunas variantes de estas proteínas, se asocian con un rendimiento en el volumen de leche. La  $\kappa$ -caseína, por su parte, está asociada con un aumento en el rendimiento y calidad de los quesos, de ahí su importancia económica, mientras que las formas más comunes de  $\beta$ -caseína en razas de ganado lechero son A1 y A2. La  $\beta$ -caseína A2 no presenta efectos negativos a la salud humana, por el contrario, ha sido asociada con propiedades reductoras de colesterol y triacilglicéridos. Sin embargo, la variante A1 de la  $\beta$ -caseína produce un péptido bioactivo denominado  $\beta$ -casomorfina-7 (BCM-7), que puede desempeñar un papel etiológico poco claro en el desarrollo de algunas enfermedades en humanos, tales como: enfermedad isquémica del corazón, diabetes mellitus tipo 1, síndrome de muerte súbita infantil (SIDS), desórdenes neurológicos, como autismo y esquizofrenia.

**Palabras clave:** *beta-caseína; estudios de asociación del genoma completo; kappa-caseína; micelas; proteínas de la leche.*

## Resumo

O leite é um alimento essencial para o ser humano e uma de suas principais característica é o teor de proteínas do leite. As proteínas mais frequentes neste líquido são as caseínas

( $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\alpha_{s2}$ -caseína,  $\beta$ -caseína e  $\kappa$ -caseína), que são uma fonte de aminoácidos para a dieta dos mamíferos nos primeiros dias de vida. As caseínas no leite são constituídas por agregados moleculares de proteínas de variados tamanhos, chamados micelas. O objetivo desta revisão é apresentar uma visão geral da estrutura, propriedades e genética das caseínas lácteas e sua relação com a saúde humana. A partir desta revisão, foi estabelecido que as caseínas  $\alpha_{s1}$  e  $\alpha_{s2}$  são encontradas em conjunto com a  $\beta$ -caseína, formando o núcleo micelar, interagindo com os íons cálcio, para formar e manter a micela estável. Animais geneticamente caracterizados com algumas variantes dessas proteínas estão associados com o rendimento da produção de leite. Por sua vez, a  $\kappa$ -caseína está associada ao aumento do rendimento da produção e da qualidade dos queijos, por isso sua importância econômica, enquanto as formas mais comuns de  $\beta$ -caseína em bovinos leiteiros são A1 e A2. A B-caseína A2 não tem efeitos negativos na saúde humana, pelo contrário, tem sido associada a propriedades redutoras do colesterol e dos triacilglicéridos. No entanto, a variante A1 da  $\beta$ -caseína produz um peptídeo bioativo denominado  $\beta$ -casomorfina-7 (BCM-7), que pode desempenhar uma função etiológico ainda desconhecida no desenvolvimento de algumas doenças em humanos, tais como: doença isquêmica do coração, diabetes mellitus tipo 1, síndrome da morte súbita infantil (SMSL), distúrbios neurológicos, como autismo e esquizofrenia.

**Palavras-chave:** *beta-caseína; estudo de associação ampla do genoma; kappa-caseína; micelas; proteínas do leite.*

## Introducción

La leche es una emulsión compuesta de 87,7% de agua, 3,3 - 3,5% de proteína, 4,9% de lactosa, 3,4% de grasa, 0,70% de minerales y 3,36% de componentes menores<sup>(1,2,3)</sup>. Según lo anterior, la leche bovina es una fuente importante de nutrientes que incluye proteínas de alta calidad, carbohidratos y micronutrientes en particular, esenciales para el crecimiento de los terneros lactantes y uno de los alimentos básicos más completos de la nutrición humana. La leche de origen animal y sus derivados, cubren aproximadamente el 20% de las necesidades energéticas, 25% de las necesidades proteicas y el 50% de los requerimientos de calcio de la población humana<sup>(4,5)</sup>, de ahí la importancia del consumo de este alimento tanto en niños como en adultos.

Por otra parte, la calidad composicional de la leche incluye un conjunto de parámetros importantes en la industria láctea, ya que de esto depende su destino, sea para producir leche entera o para producir derivados lácteos como queso, yogur, mantequilla y muchos otros productos. Por esta razón, muchas razas de ganado ovino, caprino y principalmente bovino, han

sido mejoradas genéticamente para aumentar la producción lechera y para mejorar su calidad composicional<sup>(6,7)</sup>. La proteína láctea, específicamente la caseína, ha sido mejorada, a partir, de la selección de animales genéticamente superiores, lo que ha aumentado los rendimientos en la producción de quesos y leches ácidas<sup>(8,9)</sup>. Estos avances en mejoramiento genético, han beneficiado a la industria alimentaria, obteniendo el máximo beneficio, cuando se emplea como materia prima, leche de buena calidad, con valores de proteína y grasa elevados.

Un gran número de investigaciones han sido realizadas sobre la variabilidad genética de las proteínas de la leche. Estos estudios comenzaron hace más de seis décadas, mediante la identificación de las principales variantes de la  $\beta$ -lactoglobulina bovina ( $\beta$ -LG)<sup>(10)</sup>. Posteriormente se intensificaron los estudios, descubriendo varios polimorfismos importantes en caseínas de la leche de especies y razas bovinas<sup>(11,12)</sup>. Las variantes genéticas pueden resultar en cambios de nucleótidos, inserciones y deleciones. En la actualidad existen 40 variantes: 9  $\alpha_{s1}$ -CN, 4  $\alpha_{s2}$ -CN, 13  $\beta$ -CN, 14  $\kappa$ -CN en el género *Bos*: *Bos taurus* (taurino), *Bos indicus* (cebú), *Bos grunniens* (yak) y *Bos javanicus* (banteng de Bali)<sup>(12,13,14,15)</sup>. El objetivo de esta revisión es presentar un panorama general de la estructura, propiedades y genética de las caseínas lácteas y su relación con la salud humana.

## Proteínas de la leche

Las proteínas de la leche se dividen en tres grupos principales, clasificándose en función de su solubilidad a pH 4,6 (punto isoeléctrico de la caseína) en: 1) Caseínas, 2) Proteínas del suero y 3) Proteínas que forman parte de la membrana del glóbulo graso. Estas últimas representan solamente el 1% del total de las proteínas de la leche, mientras que las proteínas del suero constituyen aproximadamente el 14% y están compuestas por  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG),  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -LA), inmunoglobulinas (IgG), glicomacropéptidos (GMP), albúmina sérica bovina (BSA) y proteínas menores, como: lactoperoxidasa, lisozima y lactoferrina<sup>(16,17,18)</sup>, siendo estas proteínas un problema ambiental en la industria quesera, ya que pueden ser vertidas en cursos de agua alterando su calidad y afectando negativamente el equilibrio de los ecosistemas acuáticos. El restante de las proteínas (80% aproximadamente), corresponde a las caseínas, siendo su composición variable de acuerdo al tipo de raza lechera (Tabla 1)<sup>(19,20)</sup> y son estas últimas proteínas las que definen la calidad de la leche.

**Tabla 1.** Porcentaje de proteína y caseína de diferentes razas bovinas lecheras\*.

<i>Raza</i>	<i>Proteína (%)</i>	<i>Caseína (%)</i>
Holstein-Friesian	3,40	2,66
Pardo suizo	3,70	2,89
Simmental	3,59	2,81
Alpine Grey	3,56	2,78
Charolais	3,74	-
Jersey	3,92	-
Ayrshire	3,53	-
Guernsey	3,91	-

\*Adaptado de: Margariños, (2001) <sup>(23)</sup>; Pacheco *et al.* (2015) <sup>(22)</sup>; Gottardo *et al.* (2017) <sup>(21)</sup>.

Las caseínas son un tipo de fosfoproteínas que constituyen uno de los principales componentes proteicos de la leche <sup>(24)</sup>; un litro de leche bovina contiene de 25 - 32 gramos de proteína <sup>(20,25)</sup>. Las caseínas se sintetizan exclusivamente en la glándula mamaria y se encuentran en su mayor parte, formando agregados multimoleculares conocidos como “micelas de caseína” en leche líquida <sup>(26)</sup>. Las micelas de caseína, son fuente nutricional de calcio, fósforo y aminoácidos, que ayudan a satisfacer los requisitos de crecimiento y energía en las crías de los mamíferos. En humanos, tanto niños como adultos consumen leche y derivados lácteos, por lo cual, los productos lácteos son ampliamente comercializados, y quizá por esta razón, las caseínas son probablemente el sistema de proteínas alimentarias mejor caracterizado, lo que ha permitido una amplia producción de productos lácteos de consumo masivo en la alimentación humana.

## Caseínas de la leche bovina

Las caseínas son las proteínas más abundantes de la leche y representan entre el 78 - 80% <sup>(27,28,29)</sup> de las proteínas lácteas con un contenido en leche de 24 - 28 g/L <sup>(28,30)</sup> y para la leche de origen bovino, se clasifican en cuatro tipos: alfa s1, alfa s2, beta y kappa en una proporción molar media de 3:0, 8:3:1, respectivamente (Tabla 2) <sup>(31)</sup>.

En la leche humana, las caseínas están compuestas principalmente por  $\beta$ -caseína y  $\kappa$ -caseína, también hay  $\gamma$ -caseína, que es un producto de la degradación de la  $\beta$ -caseína <sup>(32)</sup> y  $\lambda$ -caseína derivada de la  $\alpha_{s1}$ -caseína. Las características estructurales de estas proteínas conjugadas con calcio y fósforo, permiten formar estructuras micelares estables, dándole excelentes

propiedades fisicoquímicas a la leche, las cuales permiten su fácil transformación en diversos productos lácteos. Una de esas propiedades es su fácil desnaturalización a pH ácido, durante la producción de leches ácidas.

**Tabla 2.** Tipos de caseínas y su contenido en la leche bovina\*.

<i>Tipo de caseína</i>	<i>Abreviatura</i>	<i>Proporción relativa (%)</i>	<i>Contenido en leche (g/L)</i>
$\alpha_{s1}$ -Caseína	$\alpha_{s1}$ -CN	39 – 46	12 - 15
$\alpha_{s2}$ -Caseína	$\alpha_{s2}$ -CN	8 – 11	3 - 4
$\beta$ -Caseína	$\beta$ -CN	25 – 35	9 - 11
$\kappa$ -Caseína	$\kappa$ -CN	8 - 15	3 - 4
$\gamma$ -Caseína	$\gamma$ -CN	4	1,4

\* Adaptado de: Rijnkels, (2002) <sup>(31)</sup>; Farrell Jr *et al.* (2006) <sup>(27)</sup>; Livney, (2010) <sup>(30)</sup>; Barbosa *et al.* (2012) <sup>(28)</sup>.

## Historia y nomenclatura de las caseínas

Debido a su fácil disponibilidad y relativa facilidad de separación y aislamiento, las proteínas de la leche se han estudiado desde el inicio de la química de las proteínas. El primer artículo de investigación sobre proteínas de la leche (cuajada), fue publicado por Berzelius en 1814. El término caseína (del latín *caseus*, “queso”), se utilizó por primera vez en 1830 por Brocconnet, es decir, antes de que el término "proteína" fuera introducido en 1838 por Mulder, quien realizó investigaciones sobre proteínas de la leche <sup>(33)</sup>.

La preparación de la caseína de la leche por precipitación isoeléctrica fue mejorada y estandarizada por Hammarsten (1883) <sup>(34)</sup>. La caseína isoeléctrica se consideró inicialmente como homogénea, pero la primera evidencia de que es heterogénea fue publicada por Osborne & Wakeman (1918) <sup>(35)</sup>, seguida de evidencia adicional de heterogeneidad, que sugería que la caseína isoeléctrica en realidad consiste de tres proteínas,  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -caseínas. La fracción de  $\alpha$ -caseína resuelta por electroforesis de flujo libre se separó posteriormente en fracciones sensibles al calcio ( $\alpha_s$ -) e insensibles al calcio ( $\kappa$ -), y la fracción de  $\alpha$ -caseína se resolvió aún más en dos proteínas distintas, ahora conocidas como  $\alpha_{s1}$  y  $\alpha_{s2}$ -caseínas.

Posteriormente, las caseínas lácteas del género *Bos* fueron definidas originalmente por el Comité de la Asociación Estadounidense de Ciencia Lechera sobre Nomenclatura, Clasificación y Metodología de las Proteínas de la Leche<sup>(36)</sup>, como aquellas fosfoproteínas que precipitan de la leche desnatada cruda por acidificación a pH 4,6<sup>37</sup> a 20 °C. La propuesta de este Comité fue sugerir un sistema de nomenclatura flexible, que permita la incorporación de nuevos descubrimientos en lugar de sugerir prematuramente un sistema rígido de nomenclatura. En un informe posterior<sup>(38)</sup>, el Comité distinguió las caseínas según su movilidad electroforética relativa en poliacrilamida o en geles de almidón, en presencia de urea y con o sin mercaptoetanol. Sin embargo, en un previo reporte, se recomendó que se descartara el uso de la electroforesis como base para la clasificación de las caseínas y se identificaran de acuerdo con la homología de sus estructuras primarias en las siguientes familias:  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseína. A partir de esto, se recomendó a los investigadores, no asignar letras de variantes genéticas específicas a nuevas variantes de caseínas, hasta que se pueda establecer su homología en la secuencia de aminoácidos<sup>(39)</sup>. En la actualidad, no se han realizado cambios en cuanto a la nomenclatura, sin embargo, se han desarrollado investigaciones encaminadas a identificar nuevas variantes genéticas de las caseínas, usando marcadores de ADN principalmente en razas lecheras bovinas.

En la leche bovina y en la leche de otras especies domesticadas, existen cuatro tipos de caseínas, conocidas como: alfa  $s_1$  ( $\alpha_{s1}$ ), alfa  $s_2$  ( $\alpha_{s2}$ ), (el sufijo indica que son sensibles al calcio, es decir, que pueden precipitar al asociarse con éste), beta ( $\beta$ ) y kappa ( $\kappa$ ), respectivamente<sup>(18,40,41)</sup>, mientras que las llamadas  $\gamma$ -caseínas (gamma caseínas), son fragmentos de la  $\beta$ -caseína producidos por proteólisis escindida por la plasmina. Es importante resaltar que todos los tipos de caseínas tienen variantes genéticas, producidas por sustitución de nucleótidos y en algunos casos por delección en el ADN<sup>(26,32)</sup>. Además, todos los tipos de caseínas se agrupan formando estructuras micelares, estableciendo así un sistema coloidal altamente estable en la leche.

## Propiedades moleculares de las caseínas

Las caseínas son proteínas bastante pequeñas, con una masa molecular de 20 - 25 kDa (Tabla 3), lo que probablemente contribuye significativamente a su alta estabilidad<sup>(42)</sup>. En general, las caseínas tienen una alta hidrofobicidad superficial debido a sus estructuras abiertas, lo que les confiere gran flexibilidad y una estructura fácilmente desnaturizable y, por lo tanto, se han descrito como “reomórficas”, es decir, que las moléculas de caseína en solución, son suficientemente flexibles para adoptar estructuras según el ambiente al que estén sometidas, tales como el calor o la urea y son susceptibles a la acción de las enzimas<sup>(43)</sup>.

Los residuos de aminoácidos hidrofóbicos, polares y polares con carga, no se distribuyen uniformemente en la molécula, sino que se concentran en zonas hidrofóbicas o hidrofílicas, lo que les confiere a sus estructuras, un fuerte carácter anfipático y una gran hidrofobicidad superficial, responsable de sus propiedades espumantes y emulsificantes, y hace que las caseínas sean fácilmente susceptibles a la proteólisis, siendo esto importante para la digestibilidad, en la maduración del queso y en la producción de hidrolizados de proteínas para aplicaciones dietéticas. Además, la hidrofobicidad de las caseínas, explica por qué sus hidrolizados tienen una alta propensión al sabor amargo, que causa defectos sensoriales en muchos tipos de queso <sup>(44)</sup>. El punto isoeléctrico de todas las caseínas está alrededor de 4,4 y 5,8, lo que favorece su precipitación bajo condiciones de acidez. Así, las propiedades moleculares de las caseínas facilitan procesos industriales para obtener productos con valor agregado, de ahí su importancia en la selección de leches con características deseables y de la optimización de los procesos industriales para la elaboración de productos lácteos de buena calidad.

**Tabla 3.** Propiedades moleculares de las caseínas de la leche bovina\*.

<i>Tipo de caseína</i>	<i>Variante genética</i>	<i>Peso molecular (Da)</i>	<i>Aminoácidos</i>	<i>Punto isoeléctrico</i>	<i>Carga a pH 6,6</i>
$\alpha_{s1}$ -Caseína ( $\alpha_{s1}$ -CN)	B	23615	199	4,44 - 4,76	-21
	C	23542			
$\alpha_{s2}$ -Caseína ( $\alpha_{s2}$ -CN)	A	25226	207		-15
	A1	24023			
$\beta$ -Caseína ( $\beta$ -CN)	A2	23983	209	4,83 - 5,07	-12
	B	24092			
$\kappa$ -Caseína ( $\kappa$ -CN)	A	19037		5,45 - 5,77	
	B	19006	169	5,3 - 5,8	-3

\* Adaptado de: Farrell Jr *et al.* (2004) <sup>(13)</sup> y Broyard & Gaucheron, (2015) <sup>(45)</sup>

## Estructuras micelares de caseína

Las caseínas, junto con el fosfato de calcio, forman agregados de miles de moléculas de proteínas individuales, conocidas como estructuras micelares de caseína en la leche líquida <sup>(46)</sup>. Estas estructuras son termoestables y altamente hidratadas, lo que significa que, de cada 4,5 g

de micelas de caseínas, 3,5 g son de agua y 1 g de proteína <sup>(47)</sup>. Por lo tanto, aunque las caseínas constituyen aproximadamente el 2,5% del peso total de la leche, las micelas ocupan alrededor del 10% de su volumen <sup>(48)</sup>, exhibiendo una estructura porosa muy voluminosa. Las micelas de caseína pueden calentarse o enfriarse moderadamente sin una agregación o alteración significativa de sus estructuras básicas. Sin embargo, las caseínas se desestabilizan fácilmente por tratamiento con enzimas proteolíticas o por acidificación; conllevando a la coagulación de la leche, que es la base en la elaboración de una gran variedad de quesos y leches ácidas. Durante este proceso, las caseínas se desnaturalizan por el rompimiento de interacciones débiles entre los residuos de aminoácidos de la estructura proteica o por el rompimiento de enlaces covalentes, que conducen a una subsecuente exposición de sus estructuras hidrofóbicas al medio acuoso, lo que obliga a que moléculas de caseínas se agreguen unas con otras formando el coágulo.

### **Tamaño y composición micelar de las caseínas**

Cada micela de caseína está formada por un 92% de caseína y un 8% de sales inorgánicas, principalmente fosfato cálcico coloidal, que le confiere importantes propiedades fisicoquímicas de interés funcional a la leche. La composición nativa de las micelas de caseína, depende de su tamaño. Varios estudios han demostrado que las micelas más pequeñas son relativamente ricas en  $\kappa$ -caseína y bajas en  $\beta$ -caseína, mientras que los contenidos de  $\alpha_s$ -caseínas parecen ser independientes del tamaño <sup>(49)</sup>. La  $\kappa$ -caseína es predominante en la superficie de la micela, la  $\beta$ -caseína está presente principalmente en el interior y las  $\alpha_s$ -caseínas se encuentran en toda la estructura micelar. En cualquier tipo de leche, hay un rango de diámetros de micelas de caseínas de 50 a 500 nm (promedio 150 nm) <sup>(46)</sup> (Tabla 4).

Los tamaños de las micelas nativas están determinados por la cantidad de superficie que se puede estabilizar por la  $\kappa$ -caseína disponible, por lo tanto, cuanto mayor es la proporción de  $\kappa$ -caseína presente en la proteína total, más pequeñas son las micelas <sup>(50)</sup>, y esto es una ventaja, ya que las micelas pequeñas retienen mayor cantidad de sólidos al momento de la coagulación mejorando así la firmeza del coágulo y, por ende, la calidad del queso.

**Tabla 4.** Características fisicoquímicas de las micelas de caseínas\*.

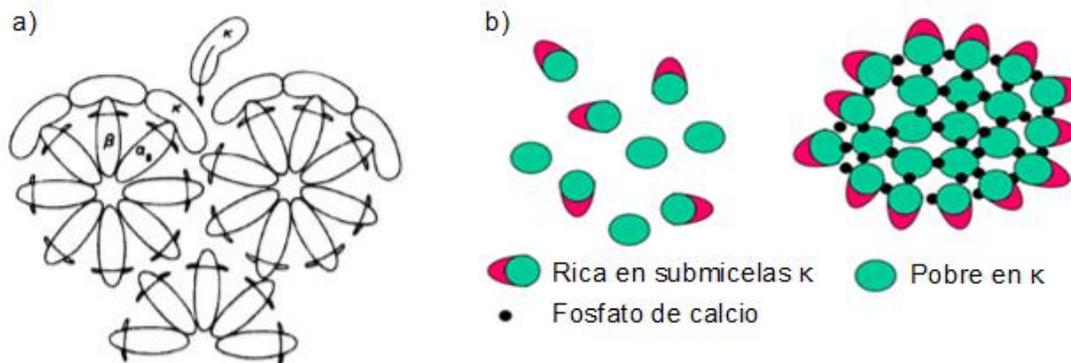
<i>Característica</i>	<i>Valor</i>	<i>Característica</i>	<i>Valor</i>
Diámetro	150 nm (rango 50 - 500 nm)	Voluminosidad	4,4 cm <sup>3</sup> .g <sup>-1</sup>
Área de superficie	8×10 <sup>-10</sup> cm <sup>2</sup>	Peso molecular (hidratado)	1,3×10 <sup>9</sup> g.mol <sup>-1</sup>
Volumen	2,1×10 <sup>-15</sup> cm <sup>3</sup>	Peso molecular (deshidratado)	5×10 <sup>8</sup> g.mol <sup>-1</sup>
Densidad (hidratada)	1,0632 g.cm <sup>-3</sup>	Número de cadena peptídica	5×10 <sup>3</sup>
Masa	2,2×10 <sup>-15</sup> g	Número de partículas/mL de leche	10 <sup>14</sup> - 10 <sup>16</sup>
Contenido de agua	63%	Superficie de micelas/mL de leche	5×10 <sup>4</sup> cm <sup>2</sup>
Hidratación	3,7 g H <sub>2</sub> O.g <sup>-1</sup>	Distancia libre media	240 nm

\* Adaptado de: Fox & Brodtkorb, (2008) <sup>(46)</sup> y Broyard & Gaucheron, (2015) <sup>(45)</sup>.

## Modelos estructurales de las micelas de caseína

La estructura de las micelas de caseína, ha sido estudiada ampliamente durante muchos años, y esto ha sido importante para comprender sus reacciones, que han sido fundamentales para muchos procesos lácteos como la producción de quesos, estabilidad de leches esterilizadas, condensadas y reconstituidas.

Varios modelos sobre la estructura micelar de las caseínas han sido planteados. El primer modelo fue propuesto por Waugh (1971) <sup>(51)</sup>, quién describe a la micela como una estructura tipo roseta, muy similar a la de una micela clásica de jabón; en este modelo, se propone que las regiones polares de  $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\beta$ -caseína y  $\kappa$ -caseína están orientadas hacia el exterior de la submicela para reducir la repulsión electrostática entre los grupos vecinos cargados y cada micela está rodeada por una monocapa de moléculas de  $\kappa$ -caseína, proporcionando una envoltura a la estructura micelar (Figura 1a).



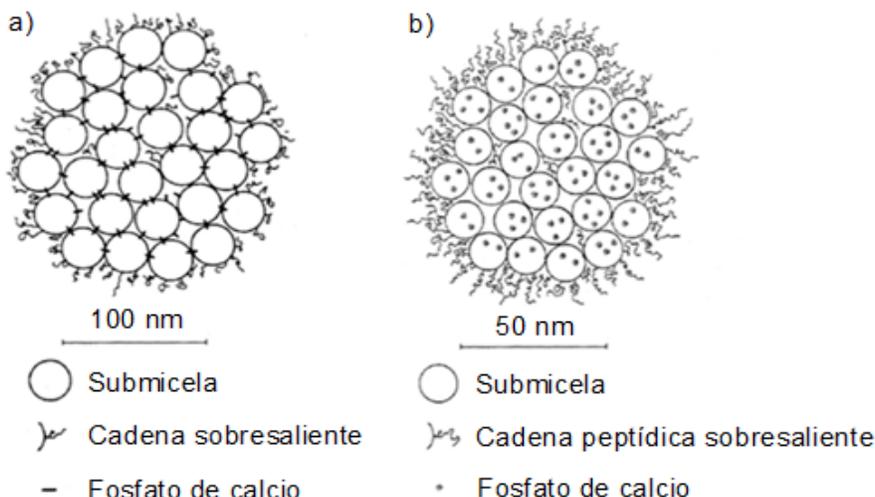
**Figura 1. a)** Modelo de micelas de caseína de Waugh, (1971) <sup>(51)</sup>. **b)** Modelo de micelas de caseína de Schmidt, (1982) <sup>(52)</sup>.

Otro modelo fue propuesto por Schmidt (1982) <sup>(52)</sup>, quien sugirió que las caseínas se agregan primero, a través de interacciones hidrofóbicas en subunidades de 15 a 20 moléculas cada una, formando submicelas. El patrón de interacción es tal que produce una variación en el contenido de  $\kappa$ -caseína de estas estructuras. Aquellas submicelas ricas en  $\kappa$ -caseína se agregan en la superficie de la estructura micelar formada, mientras que las submicelas pobres o totalmente deficientes en  $\kappa$ -caseína, se ubican en el interior de dicha estructura. En este modelo se establece que la unión entre las submicelas interiores se da con la interacción de fosfato de calcio coloidal (PCC), generando así una micela total con una capa superficial rica en  $\kappa$ -caseína (Figura 1b).

Walstra & Jenness (1984) <sup>(53)</sup>, propusieron que la región hidrofílica del C-terminal de la  $\kappa$ -caseína sobresale de la superficie, formando una capa de 5 a 10 nm de espesor, dando a las micelas una apariencia “peluda”. Esta capa vellosa es responsable de la estabilidad de las micelas, a través de importantes contribuciones a la estabilización estérica y al potencial zeta (20 mV), dada su naturaleza electrostática. Además, se propuso que las submicelas están unidas mediante moléculas de PCC (Figura 2a).

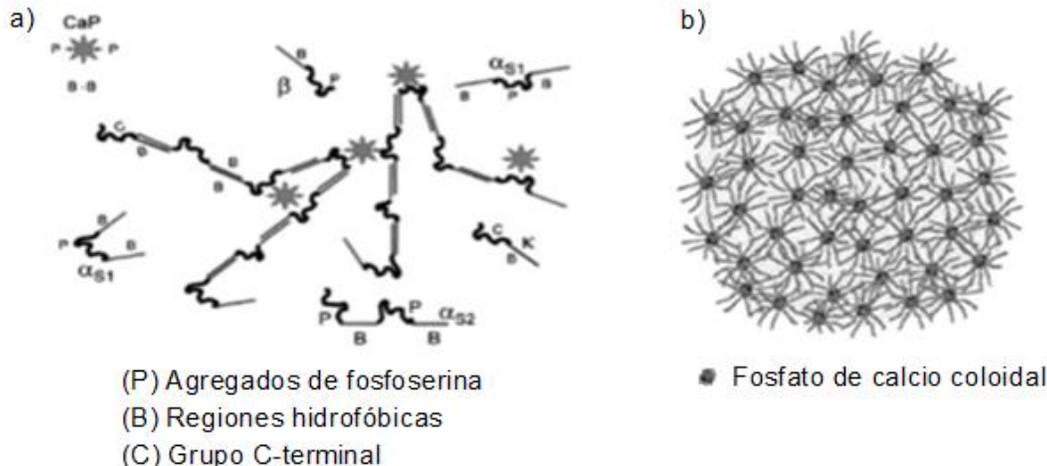
Sin embargo, este modelo fue modificado por Walstra *et al.* (1999) <sup>(54, 55)</sup>, quienes propusieron que, en lugar de vincular las submicelas como lo proponen Walstra & Jenness (1984) <sup>(53)</sup>, el PCC está ubicado dentro de las submicelas, que se mantienen unidas mediante interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y PCC (Figura 2b). Walstra (1999) <sup>(54)</sup>, además sugirió que cuando se forman submicelas en la glándula mamaria, al principio contienen poco o

ningún PCC. Posteriormente, el PCC se deposita en las submicelas, lo que reduce su carga negativa, su tamaño y conduce al autoensamblaje de las estructuras micelares.



**Figura 2. a)** Modelo de micelas de caseína de Walstra & Jenness, (1984) <sup>(53)</sup>.  
**b)** Modelo de micelas de caseína de Walstra *et al.* (1999) <sup>(55)</sup>.

El modelo de unión dual, definido por Horne (2002) <sup>(56)</sup>, propone que  $\alpha_{s1}$ -caseína tiene dos regiones hidrofóbicas y una hidrofílica, que incluye el grupo de fosfoserina, y que puede vincular dos moléculas vecinas de  $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\alpha_{s2}$ -caseína o  $\beta$ -caseína, a través de las secuencias hidrofóbicas y a una tercera molécula que puede ser  $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\alpha_{s2}$ -caseína o  $\beta$ -caseína, integrada a través de nanocristales de PCC unidos a residuos de serina. La  $\alpha_{s2}$ -caseína tiene dos grupos hidrofóbicos y dos grupos fosfoserina y puede unirse a  $\alpha_{s1}$ -caseína, a través de cualquier tipo de grupo y así extender la red. La  $\beta$ -caseína, con un solo grupo hidrofóbico y un grupo fosfoserina, puede unirse a  $\alpha_{s1}$ -caseína o  $\alpha_{s2}$ -caseína, ya sea hidrofóticamente o mediante PCC. La  $\kappa$ -caseína tiene una región N-terminal hidrofóbica, pero no posee fosfoserina, por lo que interactúa hidrofóticamente con las otras caseínas, pero al hacerlo, no puede extender la red, conllevando a un cese en el crecimiento de las micelas (Figura 3a).



**Figura 3. a)** Modelo de doble enlace de la estructura micelar de Horne, (2002) <sup>(56)</sup>.  
**b)** Modelo de nanocluster De Kruif & Holt, (2003) <sup>(57)</sup>.

El modelo más reciente de micelas de caseína es el nanocluster, propuesto por De Kruif & Holt (2003) <sup>(57)</sup>. En este modelo, el PCC se dispersa como pequeños puntos en una matriz proteica homogénea (un nanogel) y desde cuya superficie se extiende la región C-terminal de la  $\kappa$ -caseína, formando así una capa “peluda” (Figura 3b). La base del modelo de nanocluster se fundamenta en la idea de que las caseínas fosforiladas se unen a los nanoclusters en crecimiento a fin de evitar la formación de estructuras calcificadas en la glándula mamaria. Las colas de proteínas que sobresalen de los nanoclusters se asocian con otras proteínas, a través de una colección de interacciones débiles para formar una matriz proteica homogénea.

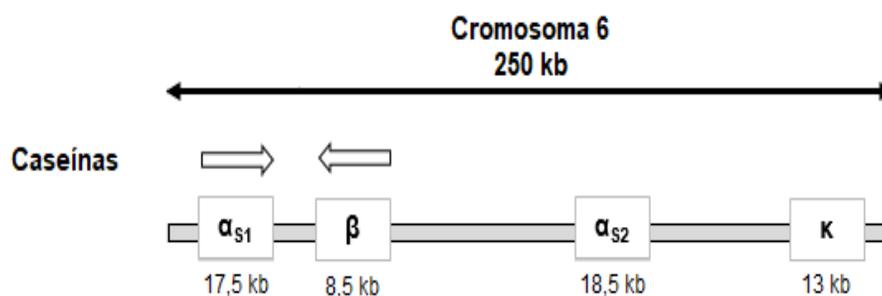
Si bien, se ha realizado un sinnúmero de estudios para explicar la verdadera estructura de la micela de caseína, ésta aún no es comprendida con suficiente minucia, por lo que se debe aunar esfuerzos para ampliar el conocimiento sobre la estructura micelar de las caseínas y su aprovechamiento en la industria láctea.

El estudio de la estructura de las caseínas y de las micelas que estas forman, es fundamental para un mejor entendimiento de las propiedades fisicoquímicas de la leche y de sus derivados. La composición de aminoácidos, sus niveles jerárquicos estructurales (estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria), les confieren una alta solubilidad por su carácter aniónico a pH neutro, principalmente por las cadenas laterales de los aminoácidos de fosfoserina, ácido glutámico y otros, pero su solubilidad se reduce progresivamente a medida que se disminuye el pH hasta valores iguales o cercanos al punto isoeléctrico, como consecuencia de la elevada

proporción de aminoácidos apolares en las estructuras globulares de las proteínas, que promueven la agregación proteica. Todo inicia cuando las proteínas pierden cargas negativas, al reaccionar con el ion hidronio  $[H_3O^+]$ , presente en el medio ácido, perdiéndose interacciones electrostáticas entre las cadenas polipeptídicas, conllevando a una desnaturalización de las caseínas y a su vez a una desestabilización de las micelas, que conduce a una agregación de las mismas, lo cual se ve reflejado en la formación de partículas sólidas en la leche.

## Clasificación y genética de las caseínas

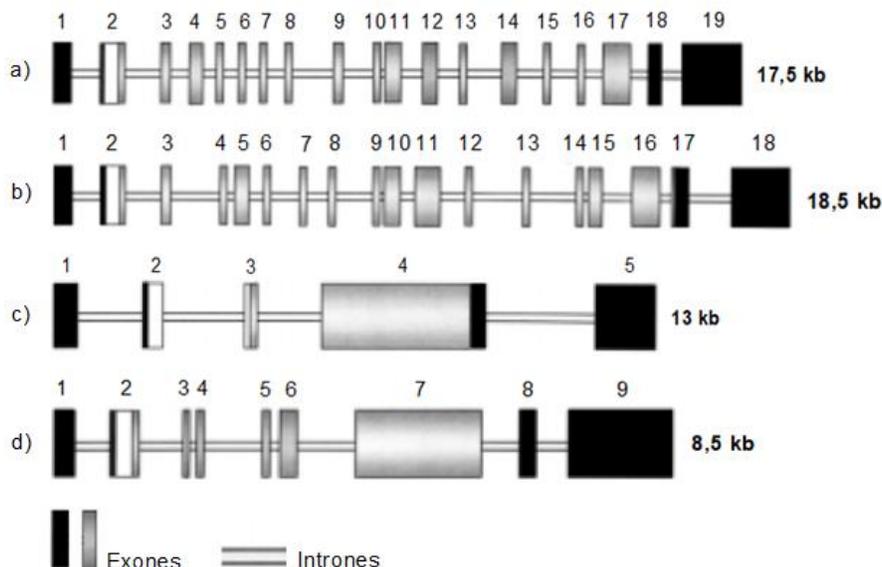
Las caseínas son codificadas por una familia de genes que cubren una región genómica de 250 kb, situada en el cromosoma 6 (6q31) en el ganado bovino <sup>(31)</sup>. Los genes que codifican las caseínas lácteas, están organizados en el siguiente orden: CSN1S1, CSN2, CSN1S2 y CSN3, los tres primeros, se encuentran dentro de un locus que cubre una región de 140 kb, mientras que el gen que codifica para  $\kappa$ -caseína, se encuentra en una región de 95 - 120 kb. En un estudio realizado por Zhou *et al.* (2019) <sup>(58)</sup>, fueron identificadas 16 regiones genómicas en BTA6 (87,19 - 87,21 Mbp) que se asociaron con  $\alpha_{s1}$ -CN,  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta$ -CN,  $\kappa$ -CN,  $\beta$ -LG, índice de caseína y rendimiento de proteína. Este segmento incluyó el grupo de genes de caseína que contiene los genes CSN1S1, CSN1S2, CSN2 y CSN3, que codifican la caseína  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ , respectivamente (Figura 4).



**Figura 4.** Genes organizados de las caseínas.

Adaptado de: Caroli *et al.* (2009) <sup>(12)</sup>.

Los genes de caseínas contienen muchos exones pequeños y una baja proporción entre exones e intrones (Figura 5). Además, poseen múltiples copias de repetición denominadas transposones <sup>(59)</sup>.



**Figura 5.** Genes que codifican las caseínas lácteas: **(a)** Gen CSN1S1 de la  $\alpha_{S1}$ -caseína **(b)** Gen CSN1S2 de la  $\alpha_{S2}$ -caseína **(c)** Gen CSN3 de la  $\kappa$ -caseína **(d)** Gen CSN2 de la  $\beta$ -caseína.

Adaptado de: Martin *et al.* (2002)<sup>(60)</sup>; Echeverri & López, (2011)<sup>(61)</sup>.

## Descubrimiento de las variantes genéticas de las caseínas en bovinos

Las investigaciones sobre la variabilidad genética de las proteínas de la leche comenzaron hace más de 60 años mediante la detección de las principales variantes de  $\beta$ -LG bovina<sup>(10)</sup>. Los primeros estudios se basaron en el polimorfismo proteico. Con los adelantos técnicos en biología y molecular, se intensificaron los estudios sobre la genética de las caseínas, descubriendo varios polimorfismos importantes en especies y razas bovinas<sup>(11,12)</sup>. Las variantes genéticas pueden resultar en cambios de nucleótidos, deleciones e inserciones de nucleótidos. En la actualidad existen 40 variantes: 9 del gen CSN1S1 (A, B, C, D, E, F, G, H, I), 4 del gen CSN1S2 (A, B, C, D), 13 del gen CSN2 (A1, A2, A3, A4, B, C, D, E, F, G, H1, H2, I) y 14 para el gen CSN3 (A, A1, B, B2, C, D, E, F1, F2, G1, G2, H, I, J) en el género *Bos*, es decir, *Bos taurus* (bovino taurino), *Bos indicus* (cebú), *Bos grunniens* (yak) y *Bos javanicus* (banteng de Bali)<sup>(15,40,62)</sup> (Tabla 5). Es importante considerar que la genética es un factor que interviene en la variabilidad en cuanto a la cantidad y composición de las proteínas de la leche, como cualquier carácter cuantitativo genético, con heredabilidades moderadas. Las diferentes variantes genéticas de las caseínas son controladas por genes autosómicos, los cuales se transmiten desde los padres a la descendencia en forma mendeliana.

**Tabla 5.** Distribución y descubrimiento de las variantes genéticas de las caseínas presentes en bovinos.

<i>Tipo de caseína</i>	<i>Gen</i>	<i>Variantes genéticas</i>	<i>Raza/especie</i>	<i>Autor/Año</i>
$\alpha_{S1}$ -caseína	CSN1S1	A	Holstein-Friesian, Red Danish, German Red, Kostroma	Thompson <i>et al.</i> (1962) <sup>(63)</sup>
		B	<i>Bos indicus</i> , Holstein, Siboney de Cuba	Thompson <i>et al.</i> (1962) <sup>(63)</sup> Kishore, (2013) <sup>(64)</sup> Molee, (2015) <sup>(65)</sup> Acosta, (2016) <sup>(66)</sup>
		C	Holstein	Molee, (2015) <sup>(65)</sup>
		E	<i>Bos grunniens</i>	Grosclaude <i>et al.</i> (1976) <sup>(67)</sup>
		F, G, H	<i>Bos taurus</i>	Erhardt, (1993) <sup>(68)</sup> Mariani <i>et al.</i> (1993) <sup>(69)</sup> Mahé <i>et al.</i> (1999) <sup>(70)</sup>
		I	<i>Bos taurus</i> y <i>Bos indicus</i>	Lühken <i>et al.</i> (2009) <sup>(71)</sup>
$\alpha_{S2}$ -caseína	CSN1S2	A	Holstein, Siboney de Cuba	Molee, (2015) <sup>(65)</sup> Acosta, (2016) <sup>(66)</sup>
		D	<i>Bos taurus</i>	Whitney, (1988) <sup>(72)</sup> Acosta, (2016) <sup>(66)</sup>
$\beta$ -caseína	CSN2	A1	Holstein-Friesian	Farrell <i>et al.</i> (2004) <sup>(13)</sup> Molee, (2015) <sup>(65)</sup> Ristanic, (2020) <sup>(73)</sup>
		A2	Holstein-Friesian	Farrell <i>et al.</i> (2004) <sup>(13)</sup> Oleński, (2012) <sup>(74)</sup> ; Molee, (2015) <sup>(65)</sup> ; Ristanic, (2020) <sup>(73)</sup>
		B	Holstein, Siboney de Cuba	Farrell <i>et al.</i> (2004) <sup>(13)</sup> ; Molee, (2015) <sup>(65)</sup> ; Acosta, (2016) <sup>(66)</sup>
$\kappa$ -caseína	CSN3	A	Frieswal, Gyr, <i>Bos taurus</i>	Kemenes, (1999) <sup>(75)</sup> ; Alipanah <i>et al.</i> (2007) <sup>(76)</sup> ; Deb, (2014) <sup>(77)</sup> ; Shaidullin, (2020) <sup>(78)</sup>
		B	Frieswal, Jersey, <i>Bos taurus</i>	Gorodetskiĭ y Kaledin, (1987) <sup>(79)</sup> ; Farrell <i>et al.</i> (2004) <sup>(13)</sup> ; Alipanah <i>et al.</i> (2007) <sup>(76)</sup> ; Deb, (2014) <sup>(77)</sup> ; Zepeda, (2015) <sup>(80)</sup> ; Shaidullin, (2020) <sup>(78)</sup>
		C	Gris alpino, Pardo italiano, Holstein iraní	Di Stasio y Merlin, (1979) <sup>(81)</sup> ; Mariani, (1983) <sup>(82)</sup> ; Molavi, (2014) <sup>(83)</sup>
		E	Holstein iraní	Molavi, (2014) <sup>(83)</sup>
		G	Yakutian, Black Pied bovino, Yak, Bison europeo, Búfalo	Sulimova <i>et al.</i> (1996) <sup>(84)</sup> ; Prinzenberg <i>et al.</i> (2008) <sup>(85)</sup>

## $\alpha_{s1}$ -caseína (gen CSN1S1)

La  $\alpha_{s1}$ -caseína es la proteína mayoritaria de las micelas de caseína (39 - 46%), codificada por el gen CSN1S1. Está compuesta por 199 aminoácidos, de los cuales ocho son residuos de serina fosforilados en las cadenas laterales, y posee una masa molecular de 23,62 kDa <sup>(42)</sup>. El gen CSN1S1 tiene una extensión de aproximadamente 17,5 kb, se encuentra ubicado en el cromosoma 6 y está conformado por 19 exones y 18 intrones (Figura 5a). Estudios recientes, identificaron nueve variantes genéticas del gen CSN1S1 (A, B, C, D, E, F, G, H, I) <sup>(12)</sup>.

Para el gen CSN1S1, el alelo más común es B, seguido de C. Estas formas de alelos se pueden encontrar en todas las razas de ganado. Estudios de asociación realizados en animales caracterizados genéticamente para esta proteína, evidenciaron que los individuos CSN1S1 BB tenían un rendimiento en volumen de leche significativamente mayor que los animales CSN1S1 BC <sup>(86)</sup>. Estas observaciones indican la existencia de una fuerte asociación entre el alelo B y una mayor producción lechera. Sin embargo, otros estudios realizados no encontraron asociaciones significativas entre los genotipos de CSN1S1 con producción lechera en vacas de raza Holstein, ya que el alelo B se encuentra próximo a la fijación; este hecho podría haber sido consecuencia de la fuerte presión de selección ejercida sobre dichas razas durante el último siglo. Por esta razón se ha hecho difícil llevar a cabo estudios de asociación entre los genotipos de CSN1S1 y los caracteres de producción lechera <sup>(86,87)</sup>.

En cuanto a su estructura espacial, la  $\alpha_{s1}$ -caseína está formada por un dominio hidrofóbico en el extremo C-terminal (100 - 199), compuesto mayoritariamente por hojas plegadas beta y por un dominio hidrofílico en el extremo N-terminal (1 - 99). Además, la  $\alpha_{s1}$ -caseína precipita por la unión del calcio (sensible al calcio) a sus residuos de fosfoserina en las concentraciones de proteína y calcio que se encuentran en la mayoría de las leches <sup>(42,88)</sup>.

## $\alpha_{s2}$ -caseína (gen CSN1S2)

La  $\alpha_{s2}$ -caseína es codificada por el gen CSN1S2, contiene 207 aminoácidos, representa entre el 8 y 11% del total de la caseína de la leche, posee una masa molecular de 25,23 kDa. El gen CSN1S2 se encuentra ubicado en el cromosoma 6 y está conformado por 18 exones y 17 intrones (Figura 5b). Según Caroli *et al.* (2009) <sup>(12)</sup>, el gen CSN1S2 posee cuatro variantes genéticas (A, B, C, D). Además, tiene 2 moléculas de cisteína en las posiciones 36 y 40 <sup>(27,89)</sup>. La  $\alpha_{s2}$ -CN es más hidrofílica que la  $\alpha_{s1}$ -CN, ya que tiene tres zonas polares y sólo una región no polar con aminoácidos hidrofóbicos y carga neta positiva, y al igual que la  $\alpha_{s1}$ -caseína precipita en presencia de iones calcio <sup>(88)</sup>.

## **κ-caseína (gen CSN3)**

La κ-caseína es una proteína codificada por el gen CSN3, está conformada por 169 aminoácidos<sup>(13)</sup>, representa entre el 8 y 15% del total de la caseína de la leche, se encuentra en la superficie de la estructura micelar<sup>(52)</sup>, y posee un peso molecular de 19 kDa. La κ-caseína no es sensible a la presencia de calcio, pero puede interactuar con las caseínas insolubles a este ion y las estabiliza para iniciar la formación del estado coloidal estable<sup>(88)</sup>.

El gen CSN3 tiene una extensión de aproximadamente 13 kb, se encuentra ubicado en el cromosoma 6 y está conformado por 5 exones y 4 intrones<sup>(90)</sup> ([Figura 5c](#)). Se han reportado 14 variantes genéticas (A, A1, B, B2, C, D, E, F1, F2, G1, G2, H, I, J) para el gen CSN3 bovino<sup>(12)</sup>. Los alelos A y B son los más frecuentes, corresponden a regiones variables en los codones 136 y 148 del tercer exón; la variante A contiene treonina en el codón 136 (ACC) y ácido aspártico en el 148 (GAT), mientras que la variante B contiene isoleucina (ATC) y alanina (GCT) en los mismos sitios antes señalados<sup>(91)</sup>.

Algunos estudios sugieren que el gen CSN3 explica hasta el 25% de la varianza fenotípica total de la concentración de las proteínas lácteas en la raza Holstein-Friesian<sup>(32,92)</sup>. La variante A del gen CSN3 es la más común en la mayoría de las razas lecheras con excepción de la Jersey<sup>(93)</sup>, en la que el alelo de mayor frecuencia es el B. Cada alelo confiere características específicas en los animales que los poseen; el alelo A se asocia a una mayor producción de leche<sup>(94)</sup> y a un mayor tiempo de coagulación y el alelo B ha sido asociado a una menor edad al primer parto en las vacas jóvenes que los poseen y con una disminución en el porcentaje de grasa<sup>(59)</sup>. Además, la variante alélica B se ha asociado con un aumento en el rendimiento y calidad de los quesos, en comparación con la variante alélica A, de tal manera que los productos elaborados con leche proveniente de animales BB, poseen un mayor contenido proteico, que resulta en una cuajada más firme, en un menor tiempo de coagulación y cerca del 5 a 10% más en el rendimiento quesero, lo que hace que estas características sean de gran importancia para la industria láctea<sup>(95,96,97)</sup> y para el mejoramiento genético de las razas de ganado bovino.

La leche derivada de animales homocigóticos AA, tiene menor porcentaje de κ-caseína, y como consecuencia de esto, una mayor proporción de micelas grandes. Por el contrario, la leche de animales homocigóticos BB, presenta mayor proporción de κ-caseína y micelas más pequeñas, provocando la formación de un cuajo más firme y una mayor retención de sólidos<sup>(59)</sup>.

El gen CSN3 tiene una secuencia nucleotídica que determina sus interacciones y su funcionalidad en la proteína codificada, tales como la interacción con las caseínas sensibles al

ion calcio para formar las micelas; su capacidad para interactuar con el medio acuoso gracias a su estructura anfipática y la secuencia de aminoácidos específica donde actúa la quimosina para la reacción de proteólisis, que permite la eliminación selectiva del dominio polar, dando inicio a la coagulación de las micelas. Al no ser sensible al ion calcio, cuando se agrega quimosina, esta actúa sobre la  $\kappa$ -caseína, fraccionándola en dos partes, la hidrofílica y la hidrofóbica. Al separarse la fracción hidrofílica, esta, ya no cumple la función de estabilización de las micelas, lo que provoca la precipitación de las demás caseínas. Este proceso es más eficiente en leches con  $\kappa$ -caseína tipo B, considerando que es una proteína más hidrofóbica, por la presencia de dos residuos de aminoácidos apolares adicionales, que en leches con  $\kappa$ -caseína tipo A que posee dos residuos de aminoácidos polares en las mismas posiciones de la cadena polipeptídica.

### **$\beta$ -caseína (gen CSN2)**

La  $\beta$ -caseína es una proteína codificada por el gen CSN2, está compuesta por 209 aminoácidos<sup>(13,98)</sup>, y constituye aproximadamente el 37% del total de la caseína de la leche<sup>(29)</sup>. Es la más hidrofóbica de todas las caseínas<sup>(99)</sup>, posee un peso molecular de 26,6 kDa y forma junto con las  $\alpha$ -caseínas, el núcleo en la micela que interactúa con los iones de calcio<sup>(52,88)</sup>. El gen CSN2 se encuentra ubicado en el cromosoma 6 y está conformado por 9 exones y 8 intrones (Figura 5d) y es el más polimórfico dentro de los genes que codifican para las caseínas, con 13 variantes genéticas (A1, A2, A3, A4, B, C, D, E, F, G, H1, H2, I) (Tabla 6)<sup>(13,40,62)</sup>, siendo los más frecuentes: A1, A2, A3, B y C<sup>(100,101,102)</sup>.

Al final de la década de 1990, algunas investigaciones sugirieron que el consumo de leche de vaca que contenga la variante A1 de la  $\beta$ -caseína es un factor de riesgo de diabetes mellitus tipo 1<sup>(103)</sup>, cardiopatía isquémica, aterosclerosis, autismo, esquizofrenia, síndrome de muerte súbita del lactante (SIDS) y alteraciones neurológicas<sup>(104,105,106)</sup>. Se ha determinado que la variante A1 de la  $\beta$ -caseína produce el péptido bioactivo beta-casomorfina-7 (BCM-7)<sup>(107)</sup> mediante el proceso de digestión con enzimas pancreáticas, este heptapéptido atraviesa las microvellosidades intestinales y sistémicamente conduce al desarrollo de estas enfermedades<sup>(105)</sup>. Por esta razón, existe un creciente interés mundial en el consumo de leche tipo A2. Por lo cual, es importante realizar investigaciones encaminadas a conocer la genética de las vacas y toros y su relación directa con la calidad sanitaria de la leche, que conduzca al consumo de productos lácteos inocuos para la salud humana. Sin embargo, también es importante desarrollar investigaciones que indaguen con mayor profundidad el desarrollo de enfermedades a causa del consumo de leche que contenga  $\beta$ -caseína A1, ya que las investigaciones en este tema son escasas y no hay suficiente claridad sobre la patogenia causada por el consumo de esta proteína.

**Tabla 6.** Cambios en la secuencia de aminoácidos de las variantes de la  $\beta$ -caseína\*.

<i>Cambio en la secuencia de aminoácidos</i>														
<i>Variantes de la <math>\beta</math>-caseína</i>	<b>18</b>	<b>25</b>	<b>35</b>	<b>36</b>	<b>37</b>	<b>67</b>	<b>72</b>	<b>88</b>	<b>93</b>	<b>106</b>	<b>117</b>	<b>122</b>	<b>137</b>	<b>138</b>
A1	Ser-P	Arg	Ser-P	Glu	Glu	His	Glu	Leu	Gln	His	Gln	Ser	Leu	Pro
A2						Pro								
A3										Gln				
B						His						Arg		
C			Ser		Lys	His								
D	Lys													
E				Lys										
F						His								Leu
G						His						Leu		
H1		Cys						Ile						
H2							Glu		Leu					Glu
I									Leu					

\* Adaptado de: Farrell *et al.* (2004) <sup>(13)</sup>.

De acuerdo con la variabilidad genética del gen CSN2, se ha identificado que las vacas portadoras de los alelos A1 y A2 en su genotipo, producen mayor porcentaje de proteína y mayor producción de leche <sup>(8,94)</sup>. Además, el alelo A1 ha sido asociado con un alto porcentaje de lactoalbúmina en leche, mientras que los alelos A2 y A3 han sido relacionados con un aumento en el porcentaje de proteína y en el caso particular del alelo A2, confiere propiedades reductoras de colesterol y triglicéridos en la leche <sup>(8)</sup>. Así mismo, el alelo B se asocia a un mayor porcentaje de proteína en la fracción de caseínas, mayor producción de leche y grasa <sup>(108)</sup> y el alelo C se relaciona con una mejor firmeza del coágulo de la leche y mayor producción de proteína <sup>(109)</sup>.

La  $\beta$ -caseína A2 se ha originado desde hace más de 10.000 años y no se han identificado efectos negativos sobre la salud humana. Sin embargo, hace aproximadamente unos 8.000 años, se produjo una mutación natural de un solo gen, en ganado Holstein, lo que resultó en la producción de la proteína  $\beta$ -caseína A1 en esta raza <sup>(110)</sup>. Lentamente, esta variante genética se ha ido convirtiendo en una de las variantes alélicas más frecuentes en razas bovinas lecheras, debido a la fuerte selección genética de estos animales. En la posición 67 de la cadena peptídica,

de la  $\beta$ -caseína, la prolina en la variante A2, se sustituye por histidina en la variante A1 <sup>(111,112)</sup>. La variante A1 es más común en las razas lecheras populares en todo el mundo, como son la Holstein-Friesian, Red Danish, Ayrshire, Shorthorn y otras, mientras que la variante A2 es más frecuente en las razas *Bos taurus*: Jersey, Guernsey, Charolais, Limusina, razas *Bos indicus*, leche humana y otros (ovejas, cabras, burros, yaks, camellos, búfalos, etc). Las leches de vacas Holstein-Friesian, contiene principalmente  $\beta$ -caseína A1. La raza Holstein (la raza de vaca lechera más común en Australia, el norte de Europa y los Estados Unidos) comprende las formas A1 y A2 de  $\beta$ -caseínas en cantidades aproximadamente iguales. Más del 50% de la raza Jersey lleva la variante de  $\beta$ -caseína A2, y más del 90% de la raza Guernsey tiene la misma variante genética <sup>(111)</sup>.

Algunas empresas de productos lácteos, han clasificado la leche como tipo A1 o tipo A2, a partir de pruebas de genotipificación del gen CSN2 en vacas y sementales, garantizando una eficiente selección. A partir de esto, las compañías The A2 Milk Company, Dairy Farmers, Norco y otras, tienen su marca registrada como leche A2, la cual es vendida principalmente en Australia, Nueva Zelanda, Reino Unido y otros países desarrollados <sup>(113)</sup>. Según lo descrito anteriormente, es importante desarrollar estrategias que busquen disminuir la frecuencia del alelo A1 de la  $\beta$ -caseína como, por ejemplo, inseminación de vacas con semen de toros sementales con genotipo A2A2, el cual ya viene registrado en algunos catálogos comerciales, la genotipificación de los animales en los hatos lecheros para la identificación de los alelos A1 y A2 y posterior descarte en procesos de selección de animales con genotipo A1A1, crianza de animales de razas cuyo genotipo reportado sea el A2A2, tales como Jersey, Guernsey o razas *Bos indicus* y por último, realizar la clasificación de la leche como tipo A1 y A2, para su respectiva clasificación y comercialización.

## Genómica de las caseínas de la leche

Los estudios de asociación del genoma completo (GWAS, Genomic wide association studies) se han utilizado ampliamente, para determinar la arquitectura genética de rasgos cuantitativos en ganado lechero <sup>(58)</sup>. La composición de la proteína de la leche es un rasgo complejo que está influenciado por factores genéticos, no genéticos y su interacción, que incluyen la raza, el hato, la etapa de lactancia, entre otros factores. Algunos estudios han demostrado que la composición de las proteínas de la leche bovina es hereditaria, con estimaciones de heredabilidad que van desde 0,26 a 0,80. Así la heredabilidad para  $\alpha_{s1}$ -CN,  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta$ -CN,  $\kappa$ -CN son 0,47; 0,73; 0,26 y 0,63 respectivamente en ganado Holstein-Friesian <sup>(114)</sup>. En los últimos años, se han detectado varios loci de características cuantitativas (QTL, quantitative trait loci) para composición de proteínas de la leche, utilizando mapeo de QTL y análisis de genes

candidatos <sup>(115,116)</sup>. Schopen *et al.* (2011) <sup>(114)</sup>, realizaron una investigación sobre GWAS, identificando regiones del genoma bovino asociadas con la composición de proteína de la leche en los cromosomas 5, 6, 11 y 14. En el cromosoma 6 (BTA6), identificaron regiones genómicas asociadas a un aumento en leche, de las proteínas  $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\alpha_{s2}$ -caseína,  $\beta$ -caseína y  $\kappa$ -caseína, en BTA5 a la  $\alpha$ -lactoalbúmina y en BTA11 a la  $\beta$ -lactoglobulina. Además, identificaron regiones genómicas con efecto significativo sobre las fracciones de las proteínas de la leche: regiones genómicas en BTA13 y BTA22 con efectos sobre  $\alpha_{s1}$ -caseína; regiones genómicas en los BTA: 1, 9, 10, 17, 19 y 28 con efectos sobre  $\alpha_{s2}$ -caseína; en BTA6 con efecto sobre  $\beta$ -caseína y en BTA13 y BTA21 con efectos sobre  $\kappa$ -caseína <sup>(114)</sup>.

En otro estudio realizado por Zhou *et al.* (2019) <sup>(58)</sup>, se identificaron un total de 21 regiones genómicas en el cromosoma BTA1, asociadas con  $\alpha_{s1}$ -CN,  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta$ -CN,  $\kappa$ -CN,  $\beta$ -LG, índice de caseína y rendimiento de proteína, usando el Illumina BovineSNP50 Bead Chip en ganado Holstein chino. Además, fueron identificadas un total de 13 regiones genómicas en BTA13, las cuales están asociadas con  $\alpha_{s1}$ -CN,  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta$ -CN y rendimiento de proteína. En BTA18, un total de 14 regiones genómicas que igualmente fueron asociadas con  $\alpha_{s1}$ -CN,  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\kappa$ -CN, rendimiento de proteína y porcentaje de proteína. Así mismo, Scarcia *et al.* (2017) <sup>(117)</sup>, ubicaron 11 regiones genómicas que fueron asociadas con  $\beta$ -CN y que comprenden una longitud de 47,72 a 47,85 Mbp en BTA21, que contiene el gen SLC25A21, el cual codifica una proteína que participa en el metabolismo de los aminoácidos.

Pegolo *et al.* (2018) <sup>(118)</sup>, realizaron un GWAS, con una población de 1011 vacas de raza Pardo Suizo, las cuales fueron genotipificadas con el Illumina BovineSNP50 v.2 Bead Chip. En el estudio analizaron 37568 SNP, de los cuales identificaron 170 SNP en los BTA6 y BTA11, involucrados en varias funciones fisiológicas, tales como transporte de iones, señalización neuronal y hormonal asociadas a la formación, estructura y función de las micelas, dando una visión novedosa de los mecanismos reguladores que controlan la síntesis y secreción de proteínas de la leche en la glándula mamaria bovina. Este tipo de estudios son importantes, ya que muestran que la selección para fracciones de proteína individuales de la leche, podría ser más efectiva que la selección basada en proteína total, especialmente en programas de mejoramiento genético destinados a mejorar las propiedades nutricionales y tecnológicas de la leche.

Como se evidencia en las anteriores investigaciones, la selección genómica es una herramienta de gran utilidad en la actualidad, ya que permite realizar procesos de selección de bovinos en menor tiempo usando valores estimados de cría genómicos (GEBV, del inglés Genomic Estimated Breeding Value), además los microchips genómicos de alta densidad, permiten

genotipificar animales para múltiples marcadores genéticos, desde 10.000 hasta 800.000 SNP, incluyendo las variantes de los genes de las caseínas y asociar dichas variantes a diferentes rasgos fenotípicos <sup>(119)</sup>. El notable progreso de la genómica ha permitido la selección de animales superiores con una alta confiabilidad, ha logrado controlar los efectos negativos de la depresión endogámica y ha conllevado a avances económicos efectivos en la eficiencia de la producción de alimentos. Así mismo, el intercambio de millones de datos genómicos de referencia entre países ha permitido un aumento de la confiabilidad en las evaluaciones genómicas, logrando grandes avances en el progreso genético. Sin embargo, se debe ampliar la información genómica de características que involucren el contenido de caseínas en la leche, estabilidad micelar, mecanismos de ensamblaje, formación y crecimiento micelar, genes de regulación de las caseínas, entre otros, que permitan un mejor aprovechamiento tecnológico de la industria lechera.

## Conclusiones

El estudio de la estructura micelar de las caseínas, sus propiedades y la genética de estas proteínas, es fundamental para un mejor entendimiento, aprovechamiento y control de su funcionalidad en los procesos complejos de la industria láctea, que permite cada vez mejorar y crear nuevos productos para el consumo humano. El contenido y la composición de las proteínas lácteas, influyen directamente sobre las propiedades tecnológicas de la leche y, por lo tanto, son importantes para la industria del queso y de otros productos de la industria lechera. La coagulación de la leche, la estructura y firmeza de la cuajada y el rendimiento del queso están directamente relacionados con el contenido de caseína, principalmente de  $\kappa$ -CN.

El incremento en la producción y el consumo de leche y derivados lácteos, implica nuevos retos para la producción primaria, en la industria lechera y consecuentemente para la salud humana. Esto significa que se debe producir leche y productos lácteos inocuos, para evitar alergias alimentarias y desarrollo de patologías asociadas al consumo de estos alimentos, por lo cual se requieren más investigaciones que permitan generar nuevo conocimiento para esclarecer mecanismos aun no conocidos sobre la intolerancia al consumo de estos alimentos en un porcentaje significativo de la población.

Las tecnologías de secuenciación genómica y de genotipado, y las nuevas herramientas estadísticas han impulsado el desarrollo de la selección genómica y el uso de marcadores moleculares como herramientas de gran utilidad, ya que permite realizar procesos de selección de animales en menor tiempo, usando valores estimados de cría genómicos (GEBV) y puede además, facilitar la selección usando variables específicas, tales como el contenido de  $\kappa$ -caseína,

$\beta$ -caseína o  $\alpha$ -caseína, haciendo la selección más efectiva que la selección animal clásica, basada en variables generales, especialmente en programas de mejoramiento genético encaminados a mejorar y optimizar el valor nutricional de la proteína de la leche en relación con la salud humana y, al mismo tiempo, maximizar los beneficios económicos para la industria láctea.

## Referencias

1. Guetouache M, Guessas B, Medjekal S. Composition and nutritional value of raw milk. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research* 2014; 2 (10): 115 - 122.
2. Fox PF, Uniacke-Lowe T, McSweeney PL, Mahony JA. *Dairy chemistry and biochemistry*. 2da ed. Switzerland: Springer; 2015.
3. Shashank CG, Rishi KP, Garima G, Taruneet K, Manish KK. A1 and A2 beta casein: Twin faces of milk. *J Pharmacogn Phytochem* 2018; 7 (4): 221-224.
4. Hernández R. Caracterización, diagnóstico y corrección de alteraciones en las características físico-químicas de la leche. Tesis de Doctorado. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Universidad Agraria de la Habana. Cuba, 2003. 5 p.
5. Reinhardt TA, Lippolis JD, Nonnecke BJ, Sacco RE. Bovine milk exosome proteome. *J Proteom* 2012; 75 (5): 1486-1492.
6. Miluchová M, Gábor M, Trakovická A. Analysis of genetic structure in Slovak Pinzgau cattle using five candidate genes related to milk production traits. *Genetika* 2014; 46 (3): 865-875.
7. Girata JG. Estudio zootécnico de la neoporosis bovina: análisis teórico de orientación para los ganaderos de Santander y Boyacá. Monografía, Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente, Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Bucaramanga, 2016. 58 p.
8. Wedholm A, Larsen L, Lindmark-Månsson H, Karlsson A, Andrén A. Effect of protein composition on the cheese making properties of milk from individual dairy cows. *J. Dairy Sci* 2006; 89: 3296-3305.
9. Solarte CE, Rosero CY, Eraso YM, Zambrano GL, Barrera DC, *et al*. Polimorfismo de las fracciones caseínicas de la leche en bovinos Holstein del Trópico Alto de Nariño. *Livestock Res Rural Dev* 2011; 23 (6): 1-11.

10. Aschaffenburg R, Drewry J. Genetics of the  $\beta$ -lactoglobulins of cows' milk. *Nature* 1957; 180: 376-378.
11. Formaggioni P, Summer A, Malacarne M, Mariani P. Milk protein polymorphism: Detection and diffusion of the genetic variants in *Bos* genus. *Ann Fac Med Vet Un Parma* 1999; 19: 127-165.
12. Caroli M, Chessa S, Erhardt GJ. Milk protein polymorphisms in cattle: effect on animal breeding and human nutrition. *J Dairy Sci* 2009; 92 (11): 5335-5352.
13. Farrell Jr HM, Jimenez-Flores R, Bleck GT, Brown EM, Butler JE, *et al.* Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk-Sixth Revision. *J Dairy Sci* 2004; 87 (6): 1641-1674.
14. Clemens RA. Milk A1 and A2 peptides and diabetes. In: *Milk and milk products in human nutrition*. Karger Publishers 2011; 67: 187-195.
15. Petrat B, Andersen P, Rasmussen JT, Poulsen NA, Larsen LB, *et al.* In vitro digestion of purified  $\beta$ -casein variants A1, A2, B, and I: Effects on antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory capacity. *J Dairy Sci* 2015; 98: 1-12.
16. McLachlan CN. Beta-casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses. *Med Hypotheses* 2001; 56 (2): 262-272.
17. Walzem R, Dillard C, German J. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2002; 42 (4): 353-375.
18. Rahimi Z, Gholami M, Rahimi Z, Yari K. Evaluation of beta-casein locus for detection of A1 and A2 alleles frequency using allele specific PCR in native cattle of Kermanshah, Iran. *Biharean Biologist* 2015; 9 (2): 85-87.
19. Phadungath C. Casein micelle structure: a concise review. *Songklanakarin J Sci Technol* 2005; 27 (1): 201-212.
20. Sulimova G, Azari M, Rostamzadeh J, Abadi M, Lazebny O.  $\kappa$ -casein gene (CSN3) allelic polymorphism in Russian cattle breeds and its informative value as a genetic marker. *Genetika* 2007; 43 (1): 88-95.

21. Gottardo P, Penasa M, Righi F, López-Villalobos N, Cassandro M, *et al.* Fatty acid composition of milk from Holstein-Friesian, Brown Swiss, Simmental and Alpine Grey cows predicted by mid-infrared spectroscopy. *Ital J Anim Sci* 2017; 16 (3): 380-389.
22. Pacheco V, Parra G, López L, Moreno V, Sifuentes A. Milk composition and its relationship with weaning weight in Charolais cattle. *R Bras Zootec* 2015; 44 (6): 207-212.
23. Margariños H. Producción higiénica de la leche cruda: una guía para la pequeña y mediana empresa. Guatemala, Guatemala: Organización de Estados Americanos OEA 2001. 7 p.
24. Goulding DA, Fox PF, O'Mahony JA. Milk proteins: An overview. In M. Boland, & H. Singh (Eds.). *Milk proteins* 2020; 21-98.
25. Pal S, Woodford K, Kukuljan S, Ho S. Milk intolerance, beta-casein and lactose. *Nutrients* 2015; 7: 7285-7297.
26. Calvo M. Caseínas. Curso de Química Bioquímica de los alimentos. Universidad de Zaragoza, España 2017; [acceso: 09 de mayo de 2018]. URL: <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/proteins/caseina.html>.
27. Farrell Jr HM, Malin EL, Brown EM, Qi PX. Casein micelle structure: what can be learned from milk synthesis and structural biology? *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2006; 11: 135-147.
28. Barbosa RS, Fischer V, Ribeiro ME, Zanela MB, Stumpf MT, *et al.* Electrophoretic characterization of proteins and milk stability of cows submitted to feeding restriction. *Pesq Agropec Bras* 2012; 47: 621-628.
29. Kaskous S. A1- and A2-Milk and their effect on human health. *J Food Eng Technol* 2020; 9 (1): 15 - 21. Doi.org/10.32732/jfet.2020.9.1.15.
30. Livney YD. Milk proteins as vehicles for bioactives. *Curr Opin. Colloid Interface Sci* 2010; 15: 73-83.
31. Rijnkels M. Multispecies comparison of the casein gene loci and evolution of the casein gene family. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2002; 7: 327-345.

32. Ostersen S, Foldaber J, Hermansen J. Effects of stage of lactation, milk protein genotype and body condition at calving on protein composition and renneting properties of bovine milk. *J Dairy Res* 1997; 64: 207-219.
33. Huppertz T, Fox PF, Kelly AL. The caseins: Structure, stability, and functionality. *Proteins in Food Processing* 2018; 3: 49-92.
34. Hammarsten O. Zur Frage, ob das Casein ein einheitlicher Stoff sei. *Z Phys Chem* 1883; 7: 227-273.
35. Osborne TB, Wakeman AJ. Some new constituents of milk: third paper. A new protein, soluble in alcohol. *J Biol Chem* 1918; 33 (2): 243-251.
36. Jenness R, Larson BL, McMeekin TL, Swanson AM, Whitnah CH, *et al.* Nomenclature of the proteins of bovine milk. *J Dairy Sci* 1956; 39: 536-541.
37. Kern L, Fabre O, Scher J, Petit J. Chemical fractionation of caseins by differential precipitation: Influence of pH, calcium addition, protein concentration and temperature on the depletion in  $\alpha$ - and  $\beta$ -caseins. *Int J Food Sci Technol* 2020; 55: 542-552.
38. Whitney RM, Brunner JR, Ebner KE, Farrell Jr HM, Josephson RV, *et al.* Nomenclature of the proteins of cow's milk: Fourth revision. *J Dairy Sci* 1976; 59: 795-815.
39. Swaisgood HE, Larson BL, Kalan EB, Brunner JR, Morr CV, *et al.* Methods of gel electrophoresis of milk proteins. 1ra ed. USA: Am Dairy Sci Assoc; 1975.
40. Franzoi M, Niero G, Visentin G, Penasa M, Cassandro M, *et al.* Variation of detailed protein composition of cow milk predicted from a large Database of mid-infrared spectra. *Animals* 2019; 9 (176): 2-14.
41. Rehan F, Ahemad N, Gupta M. Casein nanomicelle as an emerging biomaterial-A comprehensive review. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 2019; 179: 280-292. [Doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.03.051](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.03.051)
42. Schlimme E, Buchheim W. Proteínas lácteas: caseínas, proteínas del suero y proteínas minoritarias. En: *La leche y sus componentes. Propiedades químicas y físicas*. Acribia. Zaragoza, Spain 2002; 33-75.

43. Holt C, Sawyer L. Caseins as rheomorphic proteins. Interpretation of primary and secondary structures of  $\alpha$ s1,  $\beta$ -and  $\kappa$ -caseins. *J Chem Soc. Faraday Trans* 1993; 89: 2683-2692.
44. Fox PF, Kelly AL. The caseins. En: Yada RY. *Proteins in Food Processing*. 1ra ed. USA: Woodhead Publishing Limited; 2004. p. 29-71.
45. Broyard C, Gaucheron F. Modifications of structures and functions of caseins: a scientific and technological challenge. *Dairy Sci & Technol* 2015; 95: 831-862.
46. Fox PF, Brodtkorb A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. *Int Dairy J* 2008; 18 (7): 677-684.
47. Jeurnink TJ, De Kruif CG. Changes in milk on heating: viscosity measurements. *J Dairy Res* 1993; 60: 139-50.
48. Dalgleish DG, Corredig M. The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annu Rev Food Sci Technol* 2012; 3: 449-467.
49. Marchin S, Putaux J, Pignon F, Léonil J. Effects of the environmental factors on the casein micelle structure studied by cryo transmission electron microscopy and small angle X-ray scattering/ultrasmall angle X-ray scattering. *J Chem Phys* 2007; 126: 045-101.
50. Delacroix-Buchet A, Lefier D, Nuits-Petit V. Polymorphisme de la caséine  $\kappa$  de trois races bovines francaises et aptitude a la coagulation. *Lait* 1993; 7: 61-72.
51. Waugh DF. Formation and structure of casein micelles. In *Milk Proteins*. McKenzie HA, ed., Academic Press, New York. *Chem Mol Biol* 1971; 2: 3-85.
52. Schmidt DG. Association of caseins and casein micelle structure. En: Fox PF. *Developments in Dairy Chemistry*. 1ra ed. United Kingdom: Applied Science Publishers; 1982. p. 63-110.
53. Walstra P, Jenness R. *Dairy Chemistry and Physics*. 1ra ed. USA: John Wiley & Sons; 1984.
54. Walstra P. Casein sub-micelles: ¿do they exist? *Int Dairy J* 1999; 9: 189-192.
55. Walstra P, Geurts T, Noomen A, Jellma A, Van Boekel. *Dairy technology: Principles of milk properties and processes*. 1ra ed. USA: Marcel Dekker; 1999.

56. Horne DS. Caseins, micellar structure. En: Roginski R, Fuquay J and Fox PF. Encyclopedia of dairy sciences. 1ra ed. United Kingdom: Academic Press; 2002. p. 1902-1909.
57. De Kruif C, Holt C. Casein micelle structure, functions and interactions. En: Fox PF, McSweeney PL. Advanced Dairy Chemistry. 3ra ed. USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2003. p. 233-276.
58. Zhou C, Li C, Cai W, Liu S, Yin H, *et al.* Genome-Wide Association Study for Milk Protein Composition Traits in a Chinese Holstein Population Using a Single-Step Approach. *Front Genet* 2019; 10: 72.
59. Requena FD, Aguera EI, Requena F. Milk of casein of genetic in the Frison bovine. *Rev electrón vet* 2007; 8 (1): 1-9.
60. Martin P, Szymanowska M, Zwierzchowski L, Leroux C. The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milks. *Reprod Nutr Dev* 2002; 42: 433-459.
61. Echeverri J, López A. Marcadores moleculares en producción bovina. Grupo de Investigación BIOGEM, Departamento de Producción Animal, Facultad Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. 2011. p. 93.
62. Kamiński S, Cieślińska A, Kostyra E. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *J Appl Genet* 2007; 48 (3): 189-198.
63. Thompson MP, Kiddy CA, Pepper L, Zittle CA. Variations in the  $\alpha$ s-casein fraction of individual cow's milk. *Nature* 1962; 195: 1001-1002.
64. Kishore A, Mukesh M, Sobti RC, Mishra BP, Sodhi M. Variations in the regulatory region of alpha S1-casein milk protein gene among tropically adapted Indian native (*Bos Indicus*) cattle. *ISRN Biotechnol* 2013; 1-10.
65. Molee A, Poompramun C, Mernkrathoke P. Effect of casein genes - beta-LGB, DGAT1, GH, and LHR - on milk production and milk composition traits in crossbred Holsteins. *Genet Mol Res* 2015; 14 (1): 2561-2571.
66. Acosta A, Sanz A, Ronda R, Osta R, Rodellar C, *et al.* Efecto de polimorfismos genéticos en la producción de leche del ganado Siboney de Cuba. *Rev Salud Anim* 2016; 38 (3): 142-148.

67. Grosclaude F, Mahé MF, Mercier JC, Bonnemaire J, Teissier JH. Polymorphisme des lactoprotéines de bovines Népalais. I. Mise en évidence, chez le yak, et caractérisation biochimique de deux nouveaux variants:  $\beta$ -Lactoglobuline D<sup>yak</sup> et caséine  $\alpha$ 1-E. *Ann Genet Sel Anim* 1976; 8: 461-479.
68. Erhardt G. A new  $\alpha$ 1-casein allele in bovine milk and its occurrence in different breeds. *Anim Genet* 1993; 24: 65-66.
69. Mariani P, Anghinetti A, Serventi P, Fossa E. Frazionamento della caseina mediante RP-HPLC: Sulla osservazione di alcuni latti individuali caratterizzati da una bassa proporzione di  $\alpha$ 1-caseina in vacche di razza Bruna. *Ind Latte* 1993; 29: 75-85.
70. Mahé MF, Miranda G, Queval R, Bado A, Zafindrajaona, *et al.* Genetic polymorphism of milk proteins in African *Bos taurus* and *Bos indicus* populations. Characterization of variants  $\alpha$ 1-Cn. H and  $\kappa$ -Cn. *J Genet Sel Evol* 1999; 31: 239-253.
71. Lühken G, Caroli A, Ibeagha E, Erhardt G. Characterization and genetic analysis of bovine  $\alpha$ 1-casein I variant. *Anim Genet* 2009; 40: 479-485.
72. Whitney R: Proteins of milk; in Wong NP, Noble P (eds): *Fundamentals of dairy chemistry*. Van Nostrand Reinhold New York 1988; 56: 81-169.
73. Ristanic M, Glavinic U, Vejnovic B, Maletic M, Kirovski D, *et al.* Beta-casein gene polymorphism in Serbian Holstein-Friesian cows and its relationship with milk production traits. *Acta Veterinaria-Beograd* 2020; 70 (4): 497-510. Doi: 10.2478/acve-2020-0037
74. Oleński K, Cieślińska A, Suchocki T, Szyda J, Kamiński S. Polymorphism in coding and regulatory sequences of beta-casein gene is associated with milk production traits in Holstein-Friesian cattle. *Animal Sci Papers and Reports* 2012; 30 (1): 5-12.
75. Kemenes PA, Regitano LC, Rosa AJ, Packer IU, Razook AG, *et al.* k-Casein, b-lactoglobulin and growth hormone allele frequencies and genetic distances in Nelore, Gyr, Guzará, Caracu, Charolais, Canchim and Santa Gertrudis cattle. *Genet Mol Biol* 1999; 22: 539-541.
76. Alipanah M, Klashnikova L, Rodionov G. K-casein genotypic frequencies in Russian breed Black and Red Pied cattle. *Iran J Biotechnol* 2007; 3: 191-194.

77. Deb R, Singh U, Kumar S, Singh R, Sengar G, *et al.* Genetic polymorphism and association of kappa-casein gene with milk production traits among Frieswal (HF × Sahiwal) cross breed of Indian origin. *IJVR* 2014; 15 (4): 406-408.
78. Shaidullin R, Sharafutdinov G, Moskvicheva A, Faizov T, Yuldashbaev Y. Inheritance of allelic variants of the kappa-casein gene by cows. *Bio Web of Conferences* 2020; 17: 00059.
79. Gorodetskiĭ SI, Kaledin AS. Nucleotide sequence of the cDNA of kappa casein in cows. *Genetika* 1987; 23: 596-604.
80. Zepeda JL, Alarcón B, Ruíz A, Núñez R, Ramírez R. Polymorphism of three milk protein genes in Mexican Jersey cattle. *Electron J Biotechnol* 2015; 18 (1): 1-4.
81. Di Stasio L, Merlin P. Polimorfismi biochimici del latte nella razza bovina Grigio Alpina. *Riv Zoot* 1979; 2: 64-67.
82. Mariani P. Sulla presenza di una terza k-caseina nel latte di vacche di razza Bruna. *Sci Tecn Latt Cas* 1983; 34: 174-181.
83. Molavi Z, Shadkhast M, Moshtaghi H, Habibian S, Reza H. Polymorphism of  $\kappa$ -Casein Gene in Iranian Holsteins. *Iran J Biotech* 2014; 12 (1): 12118.
84. Sulimova GE, Badagueva IN, Udina IG. Polymorphism of the  $\kappa$ -casein gene in subfamilies of the Bovidae. *Genetika (Moskva)* 1996; 32: 1576-1582.
85. Prinzenberg EM, Jianlin H, Erhardt G. Genetic variation in the  $\kappa$ -casein gene (CSN3) of chinese yak (*Bos grunniens*) and phylogenetic analysis of CSN3 sequences in the genus *Bos*. *J Dairy Sci* 2008; 91: 1198-1203.
86. Lin C, Mcallister A, Ng-Kwai-Hang K, Hayes J. Effects of milk protein loci on first lactation in dairy cattle. *J Dairy Sci* 1986; 69 (3): 704-711.
87. Gonyon D, Mather R, Hines H, Haelein G, Arave C, *et al.* Associations of bovine blood and milk polymorphisms with lactation traits: Holstein. *J Dairy Sci* 1987; 70: 2585-2598.
88. Phoebe X. Studies of casein micelle structure: the past and the present. Eastern Regional Research Center, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture 2007; 87: 363-383.

89. De Kruif C. Caseins. En: Aalbersberg WY, Hamer WY, Jasperse RJ, De Jongh P, De Kruif CG, *et al.* Progress in Biotechnology, volume 23. 1ra ed. United Kingdom: Elsevier Science; 2003. p. 219-269.
90. Barbosa SB, Araújo II, Martins MF, Silva EC, Jacopini LA, *et al.* Genetic association of variations in the kappa-casein and  $\beta$ -lactoglobulin genes with milk traits in girolando cattle. Rev Bras Saúde Prod Anim 2019; 20: 1-12.
91. Eigel WN, Butler JE, Ernstrom CA, Farrell HM, Halwarkar VR, *et al.* Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision. J Dairy Sci 1984; 67: 1599 -1631.
92. Bobe G. Milk protein genotypes explain variation of milk protein composition. Iowa State University Animal Industry Report 2004; 35-38.
93. Ng-Kwai-Hang K, Grosclaude F. Genetic polymorphism of milk proteins. Advanced Dairy Chemistry 2003; 1: 739-816.
94. Miciński J, Klupczyński J, Mordas W, Zabłotna R. 2007. Yield and composition of milk from Jersey cows as dependent on the genetic variants of milk proteins. Pol J Food Nutr Sci 2007; 57 (3): 95-99.
95. Tsiaras AM, Bargouli GG, Banos G, Boscós CM. Effect of kappa-casein and beta-lactoglobulin loci on milk production traits and reproductive performance of Holstein cows. J Dairy Sci 2005; 88: 327-334.
96. Naranjo J, Posso A, Cárdenas H, Muñoz J. Detección de variantes alélicas de la kappa-caseína en bovinos Hárton del Valle. Acta agro 2007; 56 (1): 26-32.
97. Berezkina G, Kislyakova E, Vorobyeva SL, Shkarupa KE. Assessment of bulls by capcasein in the conditions of the Udmurt Republic. Bio Web of Conferences 2020; 17: 00073.
98. Brooke S, Dwyer K, Woodford K, Kost N. Systematic review of the gastrointestinal effects of A1 compared with A2  $\beta$ -casein. Adv Nutr 2017; 8: 739-748.
99. Aoki T, Yamada N, Kako Y. Relation between colloidal calcium phosphate cross-linkage and release of  $\beta$ -casein from bovine casein micelles on cooling. Agric Biol Chem 1990; 54: 2287-2292.

100. Keating AF, Smith TJ, Ross RP, Cairns MT. A note on the evaluation of a beta-casein variant in bovine breeds by allele-specific PCR and relevance to  $\beta$ -casomorphin. *Irish J Agr Food Res* 2008; 47: 99-104.
101. Clemens R, Pressman P. A1/A2 milk and  $\beta$ -Casomorphins: The Resurgence of controversy. *Food Technol Magazine* 2018; 72 (12): 1-4.
102. Inhofer C. A2 milk also interesting for Bavarian cow farmers? *LKV J Animal Owners in Bavaria* 2019; 4: 42-43.
103. Chia JS, McRae JL, Enjapoori AK, Lefevre CM, Kukuljan S, *et al.* Dietary cow's milk protein A1 beta-casein increases the incidence of T1D in NOD Mice. *Nutrients* 2018; 10: 1291.
104. Elliott RB, Harris DP, Hill JP, Bibby NJ, Wasmuth HE. Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus and cow milk: casein variant consumption. *Diabetologia* 1999; 42 (3): 292 - 296. Doi: 10.1007/s001250051153
105. Jaiswal KP, De S, Sarsavan A. Review on bovine beta-casein (A1, A2) gene polymorphism and their potentially hazardous on human health. *IJPAES* 2014; 3 (1): 1-12.
106. Sun Z, Zhang Z, Wang X, Cade R, Elmir Z, *et al.* Relation of beta-casomorphin to apnea in sudden infant death syndrome. *Peptides* 2003; 24 (6): 937-943.
107. Bekuma A, Galmessa U. A1 Beta casein: Devil in the milk-A short communication. *Approaches in Poultry. Dairy and Vet Sci J* 2019; 7 (1): 606-608.
108. Heck JM, Schennink A, Van Valenberg HJ, Bovenhuis H, Visker MH, *et al.* Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. *J Dairy Sci* 2009; 92: 1192-1202.
109. Jakob E. Unterschiede zwischen labtrüßiger und normalgerinnender Milch unter besonderer Berücksichtigung der Casein fraktion. *Schweizerische Milchwirtschaftliche Forschung* 1992; 15: 27-29.
110. Pasin G. A2 milk facts: What is A2 milk? California Dairy Research Foundation, USA 2017; [acceso: 21 de abril de 2021]. <https://cdrf.org/2017/02/09/a2-milk-facts/>.

111. Banerjee S. A2 milk: The unknown story about a milk protein. *Act Sci Nutrit Health* 2018; 2 (3): 28-31.
112. Nguyen DD, Solah VA, Buseti F, Smolenski G, Cooney T. Application of ultra-high performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (Orbitrap™) for the determination of beta-casein phenotypes in cow milk. *Food Chemistry* 2019; (19): 31651-6.
113. Prasanta B, Binoy C, Deep P, Chandra P. A1 and A2 milk & its impact on human health. *Int J Sci Nat* 2016; 7: 1-5.
114. Schopen GC, Visker MH, Koks PD, Mullaart E, Van Arendonk JA, *et al.* Whole-genome association study for milk protein composition in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2011; 94: 3148-3158.
115. Sanchez M, Govignon-Gion A, Croiseau P, Fritz S, Hozé C, *et al.* Within-breed and multi-breed GWAS on imputed whole-genome sequence variants reveal candidate mutations affecting milk protein composition in dairy cattle. *Genet Select Evolut* 2017; 49: 68.
116. Viale E, Tiezzi F, Maretto F, De Marchi M, Penasa M, *et al.* Association of candidate gene polymorphisms with milk technological traits, yield, composition, and somatic cell score in Italian Holstein-Friesian sires. *J Dairy Sci* 2017; 100: 7271-7281.
117. Scarcia P, Palmieri L, Agrimi G, Palmieri F, Rottensteiner H. Three mitochondrial transporters of *Saccharomyces cerevisiae* are essential for ammonium fixation and lysine biosynthesis in synthetic minimal medium. *Mol Genet Metab* 2017; 122: 54-60.
118. Pegolo S, Mach N, Ramayo Y, Schiavon S, Bittante G, *et al.* An integration of GWAS, pathway and network analyses reveals novel mechanistic insights into the synthesis of milk proteins in dairy cows. *Sci Rep* 2018; 8: 566.
119. Ibtisham F, Zhang L, Xiao M, An L, Ramzan MB, *et al.* Genomic selection and its application in animal breeding. *Thai J Vet Med* 2017; 47 (3): 301-310.