

POLIMORFISMO GENÉTICO DE LA β -LACTOGLOBULINA EN LA LECHE DE VACAS HOLSTEIN Y CRIOLLO LECHERO TROPICAL

GENETIC POLIMORPHISM OF β -LACTOGLOBULIN IN COW'S MILK OF HOLSTEIN AND TROPICAL MILKING CRIOLLO

Martín A. Meza-Nieto^{1,2}, Aarón F. González-Córdova¹, Carlos M. Becerril-Pérez³, Felipe J. Ruíz-López⁴, Pablo Díaz-Rivera³, Belinda Vallejo-Cordoba^{1*}

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Carretera a La Victoria, Km. 0.6, Hermosillo, Sonora. 83000. México (vallejo@ciad.mx). ²Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICYTA). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Abasco 600 Col. Centro, Pachuca, Hidalgo. 43600. México. ³Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba. Carretera Federal México-Veracruz, Km. 348, Amatlán de los Reyes, Veracruz. 94946. México. ⁴INIFAP Km 1. Carretera a Colón. Ajuchitlán, Colón, Querétaro. 76280. México.

RESUMEN

Las variantes genéticas (A y B) de la β -lactoglobulina en la leche se han asociado con propiedades tecnológicas importantes en el procesamiento de lácteos. Los objetivos de este estudio fueron determinar las variantes genéticas y estimar las frecuencias fenotípicas de la β -lactoglobulina (β -LG), en leche de vacas Holstein y Criollo Lechero Tropical (CLT), así como evaluar el efecto de los fenotipos en la concentración total de β -LG. El fenotipo se determinó en 382 muestras de leche de vacas Holstein y 64 de CLT. Las variantes genéticas identificadas por electroforesis capilar en zona libre fueron A y B, con genotipos AA, AB y BB. Las frecuencias genotípicas (0.14, 0.33 y 0.53 en CLT; 0.19, 0.57 y 0.24 en Holstein) se compararon usando la prueba de Chi-cuadrada (χ^2) y fueron diferentes ($p \leq 0.01$) entre ambas razas. La concentración total de la β -LG en leche fue mayor ($p \leq 0.05$) cuando estuvo presente el alelo A. La concentración total de la β -LG de acuerdo con el fenotipo siguió el orden AB > AA > BB para ambas razas; estas diferencias fueron significativas en vacas CLT. El análisis de los resultados sugiere que las características fisicoquímicas y tecnológicas de la leche de vacas CLT podrían ser diferentes a las de las vacas Holstein.

Palabras clave: β -lactoglobulina A, β -lactoglobulina B, polimorfismo.

ABSTRACT

The genetic variants (A and B) of the β -lactoglobulin in cow's milk has been associated with important technological properties in dairy processing. The objectives of this study were to determine the genetic variants and to estimate the phenotypic frequencies of β -lactoglobulin (β -LG) in cow's milk of Holstein and Tropical Milking Criollo (TMC), as well as to evaluate the effect of the phenotypes on the total concentration of β -LG. The phenotype was determined in 382 milk samples of Holstein and 64 of TMC. The genetic variants identified by capillary electrophoresis in free zone were A and B, with genotypes AA, AB and BB. The genotypic frequencies (0.14, 0.33 and 0.53 in TMC; 0.19, 0.57 and 0.24 in Holstein) were compared using the Chi-squared test (χ^2) and were different ($p \leq 0.01$) in the two breeds. The total concentration of β -LG in milk was higher ($p \leq 0.05$) when the allele A was present. The total concentration of β -LG according to the phenotype followed the order AB > AA > BB for both breeds; these differences were significant in TMC cows. The analysis of the results suggests that the physical-chemical and technological characteristics of TMC cow's milk could be different from those of the Holstein cows.

Key words: β -lactoglobulin A, β -lactoglobulin B, polymorphism.

INTRODUCTION

In milk there are two types of proteins that represent 3.0 to 3.5 % of the dry matter; of this 80 % are insoluble caseins with an isoelectric pH of 4.6 and the rest are soluble serum proteins at the same

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: Marzo, 2009. Aprobado: Diciembre, 2009.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 44: 531-539. 2010.

INTRODUCCIÓN

En la leche hay dos tipos de proteínas que representan 3.0 a 3.5 % de la materia seca; de ésta 80 % son caseínas insolubles con un pH isoelectrónico de 4.6 y el resto son proteínas séricas solubles al mismo pH (Tienstra *et al.*, 1992; de Jong *et al.*, 1993). Las caseínas de la leche, así como las globulinas, se consideran polimórficas ya que sus variantes genéticas presentan sustitución o eliminación de un aminoácido a lo largo de la cadena polipeptídica (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1990). Se han identificado diversas variantes de las proteínas α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína, β -caseína, κ -caseína, α -lactoglobulina y β -lactoalbúmina.

La proteína sérica β -lactoglobulina (β -LG) presenta tres variantes genéticas principales, A, B y C (Paterson *et al.*, 1995a). La variante A difiere de la B en dos aminoácidos, ácido aspártico y valina en la posición 64 y 118 que son sustituidos por glicina y alanina (Bell *et al.*, 1981). La variante C se genera por la sustitución de la glutamina por una histidina en la posición 59 de la variante B (Paterson *et al.*, 1995a). Las diferentes formas polimórficas de las proteínas de la leche bovina están controladas por genes autosómicos, los cuales son heredados de acuerdo con las leyes de Mendel (Baker y Maxwell, 1980; Creamer *et al.*, 1996; Ng-Kwai-Hang, 1998). Las variantes A y B de la β -LG se encuentran en vacas Holstein, Ayshire y Pardo Suizo (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1987; Paterson *et al.*, 1995a; Ng-Kwai-Hang y Kim, 1996), mientras que la variante C está en vacas Jersey, aunque con menor frecuencia que las A y B (Paterson *et al.*, 1995b).

La raza Criollo Lechero Tropical (CLT) derivó de poblaciones de bovinos introducidos a América durante la conquista y se utiliza en las tierras bajas de la vertiente del Golfo de México (Rosendo-Ponce y Becerril-Pérez, 2002). Este ganado muestra resistencia a plagas y enfermedades, por lo que se adapta a condiciones tropicales adversas; además, tiene alta fertilidad y buena capacidad para producir leche (De Alba y Kennedy, 1994; González-Cerón *et al.*, 2009). Sin embargo, no se encontraron estudios respecto a las variantes genéticas de las proteínas en leche de CLT.

La determinación del polimorfismo genético de las proteínas de la leche puede contribuir al mejoramiento de la producción y calidad de la leche, y de los productos lácteos (Ng-Kwai-Hang, 1998). En

pH (Tienstra *et al.*, 1992; de Jong *et al.*, 1993). The milk caseins, along with the globulins, are considered polymorphic, given that their genetic variants present substitution or elimination of an amino acid along the polypeptidic chain (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1990). Diverse variants have been identified of the proteins α_{s1} -casein, α_{s2} -casein, β -casein, κ -casein, β -lactoglobulin and α -lactoalbumin.

The serum protein β -lactoglobulin (β -LG) presents three principal genetic variants, A, B and C (Paterson *et al.*, 1995a). The A variant differs from B in two amino acids, aspartic acid and valine in position 64 and 118 which are substituted by glycine and alanine (Bell *et al.*, 1981). The variant C is generated by the substitution of the glutamine by a histidine in position 59 of the variant B (Paterson *et al.*, 1995a). The different polymorphic forms of the proteins of cow's milk are controlled by autosomic genes, which are inherited according to the laws of Mendel (Baker and Maxwell, 1980; Creamer *et al.*, 1996; Ng-Kwai-Hang, 1998). The variants A and B of the β -LG are found in Holstein, Ayshire and Brown Swiss cows (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1987; Patterson *et al.*, 1995a; Ng-Kwai-Hang and Kim, 1996), whereas the variant C is in Jersey cows, although with less frequency than the A and B (Paterson *et al.*, 1995b).

The breed Tropical Milking Criollo (TMC), derived from cattle populations introduced to America during the Conquest, is presently used in the low lands of the slope of the Gulf of Mexico (Rosendo-Ponce and Becerril-Pérez, 2002). This cattle shows resistance to pests and diseases, thus it adapts to adverse tropical conditions; furthermore, it has high fertility and good capacity for milk production (De Alba and Kennedy, 1994; González-Cerón *et al.*, 2009). However, no studies were found with respect to the genetic variants of the proteins in milk of TMC.

The determination of the genetic polymorphism of the proteins of milk may contribute to the improvement of the production and quality of milk, and of other dairy products (Ng-Kwai-Hang, 1998). In particular, variant B of the β -LG is associated to higher yield of cheese and lower milk production (Ng-Kwai-Hang, 1998). Therefore, it is important to determine the variants of β -LG in cow's milk. The objectives of this study were to determine the genetic variants and to estimate the phenotypic frequencies of β -LG in milk of Holstein and TMC cows, as well as to evaluate the effect of the phenotypes on the total concentration of β -LG.

particular, la variante B de la β -LG está asociada con un mayor rendimiento de queso y a una menor producción de leche (Ng-Kwai-Hang, 1998). Por tanto, es importante determinar las variantes de la β -LG en la leche bovina. Los objetivos de este estudio fueron determinar las variantes genéticas y estimar las frecuencias fenotípicas de la β -LG en leche de vacas Holstein y CLT, así como evaluar el efecto de los fenotipos en la concentración total de β -LG.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Se analizaron muestras de leche de 382 vacas Holstein de dos hatos ubicados en el estado de Querétaro, adscritos a la Asociación Holstein de México, y de 64 vacas CLT del campo experimental del Colegio de Postgraduados ubicado en Tepetates, Veracruz.

Las muestras de leche (100 mL) fue cantidades iguales de las ordeñas matutina y vespertina en vacas Holstein, y en las CLT sólo de la ordeña matutina. En cada muestra de leche fresca se adicionó bronopol 2-bromo-2-nitro1, 3 propanediol como conservador. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su análisis.

Reactivos

Los estándares de proteínas alfa-lactoalbúmina (α -LA; 85% pura), variante A de la β -LG (β -LG A; 100% pura) y variante B de la β -LG (β -LG B; 100% pura), y además bronopol 2-bromo-2nitro1, 3 propanediol, y el detergente Tween 20, fueron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA); amortiguador de boratos (0.3 M, pH 8.5) con polímero modificado de Bio-Rad Laboratorios (Hercules, CA, USA).

Preparación de las muestras

En un tubo de ensayo 5.0 mL de leche fueron acidificados (pH 4.6) con $90\ \mu\text{L}$ de HCl 4 N. La muestra fue centrifugada 15 min a 3000 g, el sobrenadante (suero) se filtró (Millipore $0.22\ \mu\text{m}$) hasta obtener por lo menos 1.5 mL del cual se tomó una alícuota de 1.0 mL y se diluyó con 4.0 mL (1:4) en solución amortiguadora para muestra (boratos 8.25 mM, 0.1 % Tween 20, pH 8.0). Se tomaron $200\ \mu\text{L}$ de suero diluido y se vertieron en un vial de plástico para su análisis por electroforesis capilar.

Determinación de fenotipos de variantes genéticas de la β -LG

La separación de las variantes genéticas de la β -LG se hizo en zona libre (ECZ) según Olguin-Arredondo y Vallejo-Cordoba

MATERIALS AND METHODS

Sampling

Milk samples were analyzed of 382 Holstein cows from two herds located in the state of Querétaro, ascribed to the Holstein Association of Mexico, and of 64 TMC cows from the experimental field of the Colegio de Postgraduados located at Tepetates, Veracruz.

The milk samples (100 mL) was equal amounts of the morning and evening milkings in the Holstein cows, and in the TMC only of the morning milking. In each fresh milk sample, bronopol 2-bromo-2-nitro1, 3 propanediol were added as preservative. The samples were stored at -20°C until their analysis.

Reagents

The standards of alfa-lactoalbumin (α -LA; 85% pure), variant A of β -LG (β -LG A; 100 % pure) and variant B of β -LG (β -LG B; 100 % pure) along with bronopol 2-bromo-2nitro1, 3 propanediol, and the detergent Tween 20, were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA); buffer of borates (0.3 M, pH 8.5) with modified polymer from Bio-Rad laboratories (Hercules, CA, USA).

Preparation of the samples

In a test tube, 5.0 mL of milk were acidified (pH 4.6) with $90\ \mu\text{L}$ of HCl 4N. The sample was centrifuged for 15 min at 3000 g, the supernatant (serum) was filtered (Millipore $0.22\ \mu\text{m}$) until at least 1.5 mL was obtained, from which an aliquot of 1.0 mL was taken and was diluted with 4.0 mL (1:4) in sample buffer (borates 8.25 mM, 0.1 % Tween 20, pH 8.0). Then $200\ \mu\text{L}$ of diluted serum were taken and poured into a plastic vial for its analysis by capillary electrophoresis.

Determination of phenotypes of genetic variants of the β -LG

The separation of the genetic variants of the β -LG was made in free zone (ECZ) according to Olguin-Arredondo and Vallejo-Cordoba (1999), by capillary electrophoresis (HP 3D, Hewlett-Packard, Wilmington, DE, USA), provided with an uncovered silica capillary (72 cm \times 50 mm inside diameter) with an effective length of 63.5 cm to the window. The samples were injected under pressure with N (50 mbar by 10 s). The capillary was maintained at a constant temperature of 40°C . The separation was made by applying 25 KV in a run buffer (borates 50.0 mM,

(1999), por electroforesis capilar (HP 3D, Hewlett-Packard, Wilmington, DE, USA), provisto de un capilar de sílice no recubierto (72 cm×50 mm diámetro interno) con una longitud efectiva de 63.5 cm a la ventana. Las muestras fueron inyectadas a presión con N (50 mbar por 10 s). El capilar se mantuvo a una temperatura constante de 40 °C. La separación se realizó aplicando 25 KV en una solución amortiguadora (boratos 50.0 mM, 0.1 % Tween 20, pH 8.0). La detección fue a 214 nm mediante un detector de arreglo de diodos (DAD). El capilar se lavó entre muestra con agua grado HPLC, solución capilar limpiadora (NaOH 0.1 M), agua HPLC y nitrógeno por 360 s cada una. Todas las soluciones se filtraron (0.22 μm). La identificación de la β-LG para determinar fenotipos en las muestras de leche se realizó adicionando estándares analíticos comerciales.

Cuantificación de proteínas séricas

Se construyeron curvas de calibración para cada una de las proteínas séricas identificadas, preparadas individualmente en solución amortiguadora (boratos 8.25 mM, 0.1 % Tween 20, pH 8.0). El estándar de la proteína α-LA se preparó a 0.1, 0.25, 0.50, 1.0 y 1.5 mg mL⁻¹, y las proteínas β-LG A o β-LG B a 0.1, 0.25, 0.75, 2.0 y 3.0 mg mL⁻¹ y cada una fue inyectada por duplicado.

Análisis estadístico

La comparación de las frecuencias fenotípicas y alélicas de las variantes genéticas de la β-LG en leche entre las dos razas, se realizó mediante un análisis de Chi-cuadrada (χ²). El efecto del fenotipo de la β-LG en la concentración total de la β-LG, β-LG A y β-LG B se estimó mediante un análisis de varianza (ANDEVA) con un modelo mixto. Para ambas razas se consideró el registro del padre de la vaca como un efecto aleatorio y el fenotipo como efecto fijo. También se consideró como efecto fijo, para vacas CLT, la variable año-estación y para vacas Holstein, la variable hato-año-estación. Las variables edad de la vaca y días en leche, en sus formas lineal y cuadrática, fueron usadas como covariables en el modelo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de variantes genéticas de β-LG

En la Figura 1 se presenta el patrón típico de separación de α-LA y de las variantes A y B de la β-LG en una muestra de leche. Se observaron patrones electroforéticos similares para las muestras de leche de vacas de ambas razas (Figura 1A). La identificación de las proteínas se verificó con el estándar respectivo.

0.1 % Tween 20, pH 8.0). The detection was to 214 nm by means of a diode arrangement detector (DAD). The capillary was washed between samples with water grade HPLC, capillary cleaning solution (NaOH 0.1 M), water HPLC and nitrogen for 360 s each one. All the solutions were filtered (0.22 μm). The identification of the β-LG to determine phenotypes in the milk samples was made by adding commercially available analytic standards.

Quantification of serum proteins

Calibration curves were constructed for each one of the serum proteins identified, individually prepared in buffer (borates 8.25 mM, 0.1 % Tween 20, pH 8.0). The standard of the protein α-LA was prepared at 0.1, 0.25, 0.50, 1.0 and 1.5 mg mL⁻¹, and the proteins β-LG A or β-LG B at 0.1, 0.25, 0.75, 2.0 and 3.0 mg mL⁻¹, and each one was injected by duplicate.

Statistical analysis

The comparison of the phenotypic and allelic frequencies of the genetic variants of the β-LG in milk between the two breeds was made through a Chi-squared (χ²) analysis. The effect of the phenotype of the β-LG in the total concentration of the β-LG, β-LG A and β-LG B was estimated through an analysis of variance (ANOVA) with a mixed model. For both breeds the record of the father of the cow was considered as a random effect and the phenotype as a fixed effect. Also considered as a fixed effect for TMC cows, was the variable year-season and for Holstein cows, the variable herd-year-season. The variables age of the cow and days in milk, in their linear and quadratic forms, were used as covariables in the model.

RESULTS AND DISCUSSION

Determination of genetic variants of β-LG

The typical pattern of separation of α-LA and of the variants A and B of the β-LG in a milk sample is shown in Figure 1. Similar electrophoretic patterns were observed for the milk samples of cows of both breeds (Figure 1A). The identification of the proteins was verified with the respective standard. A stronger signal in Figure 1 B showed the identity of the α-LA. Similarly, a stronger signal for the variants B and A of the β-LG confirmed the identity of the proteins (Figures 1C and 1D).

The difference in the migration time between the variant A and B of the β-LG is due to an extra negative

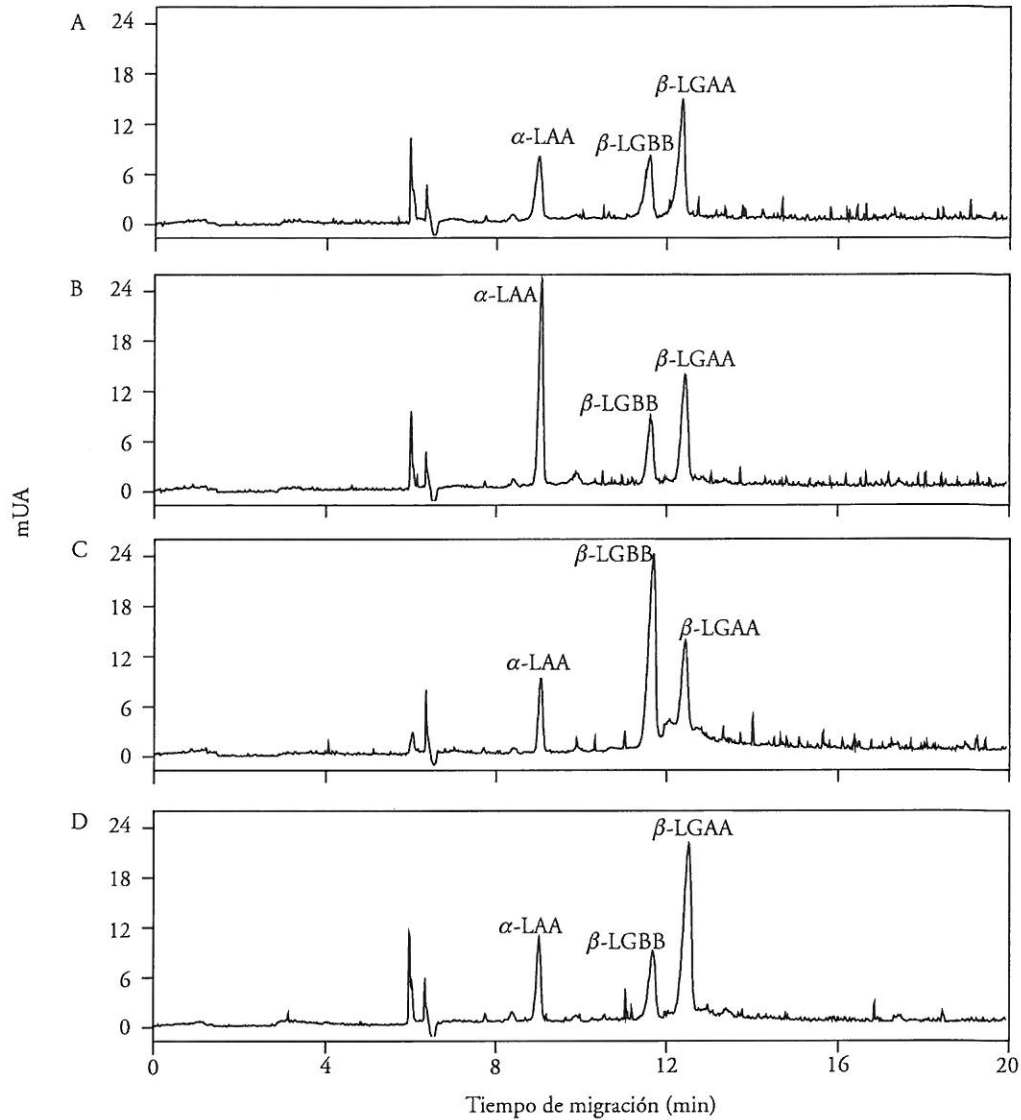


Figura 1. Electroferogramas típicos mostrando la separación de las variantes AA y BB de la β -lactoglobulina (β -LG) en una muestra de leche con fenotipo AB: A) leche con fenotipo AB; B) leche con fenotipo AB adicionado con estándar de α -lactoalbúmina (α -LA); C) leche con fenotipo AB adicionado con estándar de β -LG BB; D) leche con fenotipo AB adicionado con estándar de β -LG AA.

Figure 1. Typical electropherograms showing the separation of the variants AA and BB of the β -lactoglobulin (β -LG) in a milk sample with phenotype AB: A) milk with phenotype AB; B) milk with phenotype AB added with standard of α -lactoalbumin (α -LA); C) milk with phenotype AB added with standard of β -LG BB; D) milk with phenotype AB added with standard of β -LG AA.

Una mayor señal en la Figura 1B mostró la identidad de la α -LA. Así, una mayor señal para las variantes B y A de la β -LG confirmó la identidad de las mismas (Figuras 1C y 1D).

La diferencia en el tiempo de migración entre la variante A y B de la β -LG se debe a una carga extra negativa presente en la variante A, la cual es conferida por el ácido aspártico (Ng Kwai-Hang y Kim, 1996).

charge present in the variant A, which is conferred by the aspartic acid (Ng Kwai-Hang and Kim, 1996). The order of electrophoretic mobility of the dairy proteins was similar to previous reports (Paterson *et al.*, 1995a; Cattaneo *et al.*, 1996; Olguin-Arredondo and Vallejo-Cordoba, 1999).

The phenotypic and allelic frequencies of the variants of the β -LG in milk of Holstein and TMC

El orden de movilidad electroforética de las proteínas lácteas fue similar a reportes previos (Paterson *et al.*, 1995a; Cattaneo *et al.*, 1996; Olguin-Arredondo y Vallejo-Cordoba, 1999).

En el Cuadro 1 se presentan las frecuencias fenotípicas y alélicas de las variantes de la β -LG en leche de vacas Holstein y CLT. Hubo diferencias ($p \leq 0.01$) en las frecuencias fenotípicas entre las razas. El fenotipo AA de la β -LG se encontró con menor frecuencia en la leche de ambas razas, mientras que el fenotipo AB fue más frecuente en la leche de vacas Holstein. En leche de vacas CLT, el fenotipo BB de la β -LG presentó mayor frecuencia (Cuadro 1).

La mayor frecuencia encontrada para el fenotipo AB de la β -LG en la leche de vacas Holstein coincide con los resultados presentados por Aleandri *et al.* (1990), Hill (1993) y Olguin-Arredondo y Vallejo-Cordoba (1999). La frecuencia encontrada para el fenotipo BB de la β -LG (0.24) fue similar a la publicada por Paterson *et al.* (1995b) para leche de vacas Holstein; pero éstas fueron inferiores a las estimadas en estudios en Australia (MacLean *et al.*, 1984), Italia (Aleandri *et al.*, 1990), Canadá (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1990) y Nueva Zelanda (Hill, 1993).

La frecuencia encontrada en leche de vacas CLT del fenotipo AB de la β -LG (0.33) fue inferior a la observada en Holstein (MacLean *et al.*, 1984; Aleandri *et al.*, 1990; Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1990), Jersey (Paterson *et al.*, 1995b) y Polish Black-and-White (Strzalkowska *et al.*, 2002). Pero la frecuencia del fenotipo BB de la β -LG en leche de vacas CLT (0.53), fue superior a la estimada en Holstein (Hill, 1993; Olguin-Arredondo y Vallejo-Cordoba, 1999).

La frecuencia del alelo B de la β -LG fue superior a la del alelo A en las dos razas estudiadas (Cuadro 1). Estos resultados concuerdan con las frecuencias alélicas reportadas para leche de vacas Holstein (Van Eenennaam y Medrano, 1991; Hill, 1993; Caroli *et al.*, 2004). La frecuencia del alelo B (0.65) en CLT fue superior a las publicadas para vacas Holstein (Van Eenennaam y Medrano, 1991; Hill, 1993; Caroli *et al.*, 2004) y similar a la estimada en Polish Black-and-White (Strzalkowska *et al.*, 2002).

Concentración de las variantes genéticas de la β -LG en leche

En los Cuadros 2 y 3 se muestran los rangos de concentración de los fenotipos de la β -LG presente

Cuadro 1. Frecuencias fenotípicas y alélicas de las variantes de la β -lactoglobulina (β -LG) en leche de vacas Holstein y Criollo Lechero Tropical (CLT).

Table 1. Phenotypic and allelic frequencies of the variants of the β -lactoglobulin (β -LG) in milk of Holstein and Tropical Milking Criollo (TMC) cows.

Raza	Frecuencia fenotípica [†]			Frecuencia alélica [‡]	
	AA	AB	BB	A	B
Holstein	0.19	0.57	0.24	0.48	0.52
CLT	0.14	0.33	0.53	0.35	0.65

[†] AA: fenotipo AA de la β -LG; AB: fenotipo AB de la β -LG; BB: fenotipo BB de la β -LG ♦ AA: phenotype AA of β -LG; AB: phenotype AB of β -LG; BB: phenotype BB of β -LG.

[‡] A: alelo A de la β -LG; B: alelo B de la β -LG ♦ A: allele A of β -LG; B: allele B of β -LG.

cows are shown in Table 1. There were differences ($p \leq 0.01$) in the phenotypic frequencies between the breeds. The phenotype AA of the β -LG was found with lower frequency in the milk of both breeds, whereas the phenotype AB was more frequent in the milk of Holstein cows. In the milk of TMC cows, the phenotype BB of the β -LG was more frequent (Table 1).

The highest frequency found for the phenotype AB of the β -LG in the milk of Holstein cows coincides with the results presented by Aleandri *et al.* (1990), Hill (1993) and Olguin-Arredondo and Vallejo-Cordoba (1999). The frequency found for the phenotype BB of the β -LG (0.24) was similar to what was published by Paterson *et al.* (1995b) for milk of Holstein cows; but these were lower to those estimated in studies carried out in Australia (MacLean *et al.*, 1984), Italy (Aleandri *et al.*, 1990), Canada (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1990) and New Zealand (Hill, 1993).

The frequency found in milk of TMC cows of the phenotype AB of the β -LG (0.33) was lower than that observed in Holstein (MacLean *et al.*, 1984; Aleandri *et al.*, 1990; Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1990), Jersey (Paterson *et al.*, 1995b) and Polish Black-and-White (Strzalkowska *et al.*, 2002). But the frequency of the phenotype BB of the β -LG in milk of TMC cows (0.53) was higher than that estimated in Holstein (Hill, 1993; Olguin-Arredondo and Vallejo-Cordoba, 1999).

The frequency of the allele B of the β -LG was higher than that of allele A in the two breeds

en leche de vacas Holstein y CLT. La concentración de las variantes A y B de la β -LG para los tres fenotipos varió en ambas razas.

En los Cuadros 4 y 5 se presentan los valores promedio de las concentraciones totales de la β -LG, β -LG A y β -LG B en leche de vacas Holstein y CLT. El efecto de fenotipo en la concentración total de β -LG y de las variantes A y B fue significativo ($p \leq 0.05$). La concentración total de la β -LG de acuerdo con el fenotipo siguió el orden $AB > AA > BB$ (Cuadros 4 y 5). Sin embargo, las diferencias entre los fenotipos AB y AA sólo fueron significativas ($p \leq 0.05$) en la leche de CLT (Cuadro 5). Las variables hato-año-estación, año-estación y el registro del padre de la vaca, así como las covariables edad de la vaca y días

Cuadro 2. Rango de concentraciones de las variantes genéticas A y B de la β -lactoglobulina (β -LG) en leche de vacas Holstein.

Table 2. Concentration range of the genetic variants A and B of the β -lactoglobulin (β -LG) in milk of Holstein cows.

Fenotipo [†]	N	Variante de la β -LG (mg mL ⁻¹)	
		A	B
AA	65	2.53 a 7.87	0.00
AB	196	1.26 a 5.94	1.05 a 4.15
BB	89	0.00	2.45 a 7.71

[†] AA: fenotipo AA de la β -LG; AB: fenotipo AB de la β -LG; BB: fenotipo BB de la β -LG ♦ AA: phenotype AA of β -LG; AB: phenotype AB of β -LG; BB: phenotype BB of β -LG.

Cuadro 3. Rango de concentraciones de las variantes genéticas A y B de la β -lactoglobulina (β -LG) en leche de vacas Criollo Lechero Tropical.

Table 3. Concentration range of the genetic variants A and B of the β -lactoglobulin (β -LG) in milk of Tropical Milking Criollo cows.

Fenotipo [†]	N	Variante de la β -LG (mg mL ⁻¹)	
		A	B
AA	8	4.68 a 5.46	0.00
AB	21	2.30 a 5.90	1.50 a 4.75
BB	35	0.00	2.78 a 6.57

[†] AA: fenotipo AA de la β -LG; AB: fenotipo AB de la β -LG; BB: fenotipo BB de la β -LG ♦ AA: phenotype AA of β -LG; AB: phenotype AB of β -LG; BB: phenotype BB of β -LG.

studied (Table 1). These results agree with the allelic frequencies reported for milk of Holstein cows (Van Eenennaam and Medrano, 1991; Hill, 1993; Caroli *et al.*, 2004). The frequency of the allele B (0.65) in TMC was higher than those published for Holstein

Cuadro 4. Efecto del fenotipo en la concentración total de β -lactoglobulina, β -LG A y β -LG B en leche de vacas Holstein.

Table 4. Effect of the phenotype on the total concentration of β -lactoglobulin, β -LG A and β -LG B in milk of Holstein cows.

Fenotipo	Concentración β -LG	Concentración β -LG A [†]	Concentración β -LG B [‡]
	mg mL ⁻¹		
AA	5.96 ± 0.21 a		
AB	6.18 ± 0.16 a	3.66 ± 0.11 c	2.51 ± 0.07 d
BB	4.64 ± 0.18 b		

a,b: Medias en una columna con distinta letra son diferentes ($p \leq 0.05$); c,d: Medias en una hilera con distinta letra son diferentes ($p \leq 0.05$) ♦ a,b: Means in a column with a different letter are different ($p \leq 0.05$); c,d: Means in a row with a different letter are different ($p \leq 0.05$).

[†] β -LG A: variante A de la β -lactoglobulina ♦ β -LG A: variant A of β -lactoglobulin.

[‡] β -LG B: variante B de la β -lactoglobulina ♦ β -LG B: variant B of β -lactoglobulin.

Cuadro 5. Efecto del fenotipo en la concentración total de β -lactoglobulina, β -LG A y β -LG B en leche de vacas Criollo Lechero Tropical.

Table 5. Effect of the phenotype on the total concentration of β -lactoglobulin, β -LG A and β -LG B on milk of Tropical Milking Criollo cows.

Fenotipo	Concentración β -LG	Concentración β -LG A [†]	Concentración β -LG B [‡]
	mg mL ⁻¹		
AA	5.08 ± 0.46 b		
AB	6.79 ± 0.29 a	4.09 ± 0.17 d	2.69 ± 0.23 e
BB	4.01 ± 0.27 c		

a,b,c: Medias en una columna con distinta letra son diferentes ($p \leq 0.05$); d,e: Medias en una hilera con distinta letra son diferentes ($p \leq 0.05$) ♦ a,b,c: Means in a column with a different letter are different ($p \leq 0.05$); d,e: Means in a row with a different letter are different ($p \leq 0.05$).

[†] β -LG A: variante A de la β -lactoglobulina ♦ β -LG A: variant A of β -lactoglobulin.

[‡] β -LG B: variante B de la β -LG ♦ β -LG B: variant B of β -LG.

en leche en su forma lineal y cuadrática no mostraron efecto ($p > 0.05$) en la concentración de la β -LG.

Al comparar las concentraciones de las variantes A y B en el fenotipo AB (Cuadros 4 y 5), se encontró una concentración mayor ($p \leq 0.05$) para la primera independientemente de la raza. Estos resultados concuerdan con los publicados para leche con el fenotipo AB de vacas Ayrshire, Jersey, Brown Swiss y Canadiense (Ng-Kwai-Hang y Kim, 1996). Además, la concentración de β -LG fue mayor ($p \leq 0.05$) para el fenotipo AA en comparación con el BB, lo que coincide con la mayor concentración de β -LG observada cuando el fenotipo AA está presente (Cerbulis y Farrell, 1975; Feagan, 1979; Kroeker *et al.*, 1985).

Las concentraciones y proporciones relativas de las diferentes proteínas de la leche, son influenciadas por factores genéticos y ambientales (Ng-Kwai-Hang y Kim, 1996). En el presente estudio se encontró que el alelo A de la proteína se expresa más que el alelo B.

CONCLUSIONES

El fenotipo más frecuente en leche de vacas CLT fue BB, mientras que en Holstein fue AB. El alelo B fue más frecuente que el A en la leche de ambas razas. La concentración total de β -LG fue mayor cuando estuvo presente el alelo A, ya sea en los fenotipos AB o AA, aunque dichas diferencias fueron mayores en la leche de vacas CLT. Con base en los resultados de la presente investigación, la leche de vacas CLT podría presentar características fisicoquímicas y tecnológicas diferentes a la de Holstein.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo a los proyectos de investigación: "Conservación, mejora genética y aprovechamiento del ganado Criollo Lechero Tropical (CLT) en México" (SAGARPA-CONACYT), "Polimorfismo genético de las proteínas de la leche determinado por electroforesis capilar y espectrometría de masas: Impacto en la producción, composición y propiedades fisicoquímicas de la leche" (CONACYT Ciencia Básica G 26490-B) y "La proteómica como un campo emergente en la ciencia de la leche: Un nuevo enfoque para conocer y entender el comportamiento de las proteínas lácteas y sus interacciones (CONACYT Ciencia Básica 42340 Z)".

cows (Van Eenennaam and Medrano, 1991; Hill, 1993; Caroli *et al.*, 2004) and similar to what was estimated in Polish Black-and-White (Strzalkowska *et al.*, 2002).

Concentration of the genetic variants of the β -LG in milk

The concentration ranges of the phenotypes of β -LG present in milk of Holstein and TMC cows are shown in. The concentration of the variants A and B of the β -LG for the three phenotypes varied in both breeds.

The average values of the total concentrations of the β -LG, β -LG A and β -LG B in milk of Holstein and TMC cows are shown in Tables 4 and 5. The effect of phenotype on the total concentration of β -LG and of the variants A and B was significant ($p \leq 0.05$). The total concentration of the β -LG according to the phenotype followed the order AB > AA > BB (Tables 4 and 5). However, the differences between phenotypes AB and AA were only significant ($p \leq 0.05$) in the milk of TMC (Table 5). The variables herd-season, year-season and the record of the father of the cow, as well as the covariables age of the cow and days in milk in their linear and quadratic form did not show any effect ($p > 0.05$) in the concentration of β -LG.

When comparing the concentrations of the variants A and B in the phenotype AB (Tables 4 and 5), a higher concentration ($p \leq 0.05$) was found for the former independently of the breed. These results agree with those published for milk with the phenotype AB of Ayrshire, Jersey, Brown Swiss and Canadian cows (Ng-Kwai-Hang and Kim, 1996). Furthermore, the concentration of β -LG was higher ($p \leq 0.05$) for the phenotype AA with respect to BB, which coincides with the higher concentration of β -LG observed when the phenotype AA is present (Cerbulis and Farrell, 1975; Feagan, 1979; Kroeker *et al.*, 1985).

The concentrations and relative proportions of the different milk proteins are influenced by genetic and environmental factors (Ng-Kwai-Hang and Kim, 1996). In the present study it was found that the allele A of the protein is expressed more than the allele B.

LITERATURA CITADA

- Aleandri, R., L. Chianese, A. Di Leccia, P. Petelli, R. Mauriello, and G. Davoli. 1990. The effects of milk protein polymorphism on milk components and cheese producing ability. *J. Dairy Sci.* 73: 241-255.
- Baker, C. M., and C. Maxwell. 1980. Chemical classification of cattle. I. Breed groups. *Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.* 11: 127-150.
- Bell, K., H. A. McKenzie, and D. C. Shaw. 1981. Bovine β -lactoglobulin E, F and G of Bali (Banteng) cattle, *Bos (bibos) javanicus*. *Aust. J. Biol. Sci.* 34: 133-147.
- Caroli, A., S. Chessa, P. Bolla, E. Budelli, and G. C. Gandini. 2004. Genetic structure of milk protein polymorphisms effects on milk production traits in a local dairy cattle. *J. Anim. Breed. Genet.* 121: 119-127.
- Cattaneo, T. M. P., F. Nigro, P.M. Toppino, and V. Denti. 1996. Characterization ewe's milk by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatography A* 721: 345-349.
- Cerbulis, J., and H. M. Farrell. 1975. Composition of milk of dairy cattle. I. Protein, lactose and fat contents and distribution of protein fraction. *J. Dairy Sci.* 58: 817-827.
- Creamer, L. K., K. Alastair, and H. McGibbon. 1996. Some recent advances in the basic chemistry of milk proteins and lipids. *Int. Dairy J.* 6: 539-549.
- De Alba, J., and B. W. Kennedy. 1994. Genetic parameters of purebred and crossbred Milking Criollos in tropical Mexico. *Anim. Prod.* 58: 159-165.
- de Jong, N., S. Visser, and C. Olieman. 1993. Determination of milk proteins by capillary electrophoresis. *J. Chromatography A.* 652: 207-213.
- Feagan, J. T. 1979. Factors affecting protein composition of milk and their significance to dairy processing. *Aust. J. Dairy Technol.* 34: 77-87.
- González-Cerón, F., C. M. Becerril-Pérez., G. Torres-Hernández and P. Díaz-Rivera. 2009. Ticks infesting body regions of tropical milking criollo cattle in Veracruz, Mexico. *Agrociencia.* 43: 11-19.
- Hill, J. P. 1993. The relationship between β -lactoglobulin phenotypes and milk composition in New Zealand dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 76: 281-286.
- Krocker, E. M., K. F. Ng-Kwai-Hang, J. F. Hayes, and J. E. Moxley. 1985. Effect of β -Lactoglobulin variant and environmental factors on variation in the detailed composition of bovine milk serum proteins. *J. Dairy Sci.* 68: 1637-1641.
- McLean, D. M., E. R. B. Graham, R. W. Ponzoni, and H. A. McKenzie. 1984. Effects of milk protein genetic variants on milk production and composition. *J. Dairy Res.* 51: 531-546.
- Ng-Kwai-Hang, K. F., J. F. Hayes, J. E. Moxles, and H. G. Monardes. 1987. Variation in milk protein concentration association with genetic polymorphism and environmental factors. *J. Dairy Sci.* 70: 563-570.
- Ng-Kwai-Hang, K. F., H. G. Monardes, and J. F. Hayes. 1990. Association between genetic polymorphism of milk proteins and production traits during three lactations. *J. Dairy Sci.* 73: 3414-3420.
- Ng-Kwai-Hang, K. F., and S. Kim. 1996. Different amounts of β -lactoglobulin A and B in milk from heterozygous AB cows. *Int. Dairy J.* 6: 689-695.

CONCLUSIONS

The most frequent phenotype in milk of TMC cows was BB, whereas in Holstein it was AB. The allele B was more frequent than A in the milk of both breeds. The total concentration of β -LG was higher when the allele A was present, whether in the phenotypes AB or AA, although these differences were higher in the milk of TMC cows. Based on the results of this investigation, the milk of TMC cows could present physical-chemical and technological characteristics that are different from those of Holstein.

—End of the English version—

—*—

- Ng-Kwai-Hang, K. F. 1998. Genetic polymorphism of milk proteins: Relationships with production traits, milk composition and technological properties. *Can. J. Anim. Sci.* 78 (Suppl): 131-147.
- Olguin-Arredondo, H. A., and B. Vallejo-Cordoba. 1999. Separation and determination of β -lactoglobulin variants A and B in cow's milk by capillary free zone electrophoresis. *J. Capillary Electrophoresis and Microchip Technol.* 5/6: 145-149.
- Paterson, G. R., J. P. Hill, and D. E. Otter. 1995a. Separation of β -lactoglobulin A, B and C variants bovine whey using capillary zone electrophoresis. *J. Chromatography A* 700: 105-115.
- Paterson, G. R., D. E. Otter, and J. P. Hill. 1995b. Application of capillary electrophoresis in the identification of phenotypes containing the β -lactoglobulin C variant. *J. Dairy Sci.* 78: 2637-2644.
- Rosendo-Ponce, A., and C. M. Becerril-Pérez. 2002. Productive performance and genetic parameters in the tropical milking criollo cattle in Mexico. *Proc. 7th. World Congress on Genetics Applied to Livestock Production.* Montpellier, France. Communication 25-25.
- Strzalkowska, N., J. Krzyzewski, L. Zwierzchowski, and Z. Ryniewicz. 2002. Effects of k-casein and β -Lactoglobulin loci polymorphism, cow's age, stage of lactation and somatic cell count on daily milk yield and milk composition in Polish Black and White cattle. *Anim. Sci. Papers and Reports* 20: 21-35.
- Tienstra, P., J. A. M. Van Riel, and C. Olieran. 1992. Determination of g0st milk in cow milk with P/ACE TM capillary electrophoresis. *Capillary Electrophoresis.* Beckman. Netherlands Institute for Dairy Research (NIZO) pp: 832-833.
- Van Eenennaam, A. L., and Medrano, J. F. 1991. Differences in allelic protein expression in the milk of heterozygous kappa casein cows. *J. Dairy Sci.* 74: 1491-1496.
- Zikakis, J. P., G. F. W. Haenlin, H. C. Hines, R. E. Mather, and S. Tung. 1974. Gene frequencies of electrophoretically determined polymorphisms in Guernsey blood and milk. *J. Dairy Sci.* 57: 405-410.