

Detección Genética de la Kappa-Caseína en Diferentes Razas Bovinas

Esperanza Trujillo B. y David Noriega

Laboratorio de Genética Molecular

Departamento de Biología,

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, U. de A.

ABSTRACT

The bovine kappa casein is an important milk protein of 169 amino acids coded by a gene on chromosome 6, that express two important allelic variations, A and B. The B form determines quantitative and qualitative differences in the process of transformation of the milk in cheese, due to the formation of small micelles that contain a higher amount of casein that in turn allow the formation of a firm and dense clot that retains solids. In contrast, the A form produces larger micelles that retain a smaller amount of casein.

The present study contain the results obtained through molecular methodologies (PCR-RFLP) that allowed the identification of the allelic forms A and B at the DNA level, in a population of 222 animals (males and females) of the following races: Holstein, Jersey, Ayrshire and Norman. Among the four races analyzed, significant differences in the distribution of genotypic and allelic frequencies were detected, as follows : Holstein AA=0.48, AB=0.48, BB=0.04; Ayrshire AA=0.43, AB=0.37, BB=0.20; Jersey AA=0.00, AB=0.20, BB=0.80; Norman AA=0.00, AB=0.33, BB=0.67. Frequencies of the favorable allele B : Holstein= 0.28, Ayrshire= 0.38, Jersey= 0.90 y Norman= 0.83.

This study constitutes the first of this type in Colombia, and proposes the application of a reliable molecular methodology, of easy application and low cost, in reproductive programs for the improvement of bovine milk protein quality.

**RESUMEN**

La kappa-caseína bovina es una importante molécula láctea de 169 aminoácidos codificada por un gen localizado en el cromosoma 6, que presenta dos importantes variantes alélicas A y B.

La variante B determina diferencias cuantitativas y cualitativas en el proceso de transformación de la leche en queso, debido a la formación de micelas pequeñas que contienen mayor cantidad de caseína, formando un coágulo firme y denso que retiene sólidos. En contraste, la variante A produce micelas más grandes pero con menor cantidad de caseína.

El presente estudio, reporta los resultados obtenidos mediante metodologías moleculares (PCR-RFLP) que permitieron la identificación de las variantes alélicas A y B, en una población de 222 animales (machos y hembras) de las siguientes razas : Holstein, Jersey, Ayrshire y Normanda.

En las 4 razas analizadas se encontraron diferencias significativas en la distribución de las frecuencias genotípicas, de la siguiente manera: Holstein AA=0.48, AB=0.48, BB=0.04; Ayrshire AA=0.43, AB=0.37, BB=0.20 ; Jersey AA=0.00, AB=0.20, BB=0.80 y Normanda AA=0.00, AB=0.33, BB=0.67. Frecuencia del alelo favorable B: Holstein= 0.28, Ayrshire= 0.38, Jersey= 0.90 y Normando= 0.83.

Este trabajo constituye el primero de su tipo en Colombia y propone la aplicación de una metodología molecular confiable, de fácil aplicación y bajo costo, en los programas de reproducción para el mejoramiento de la calidad de la proteína láctea en bovinos.

Detección Genética de la Kappa-Caseína en Diferentes Razas Bovinas



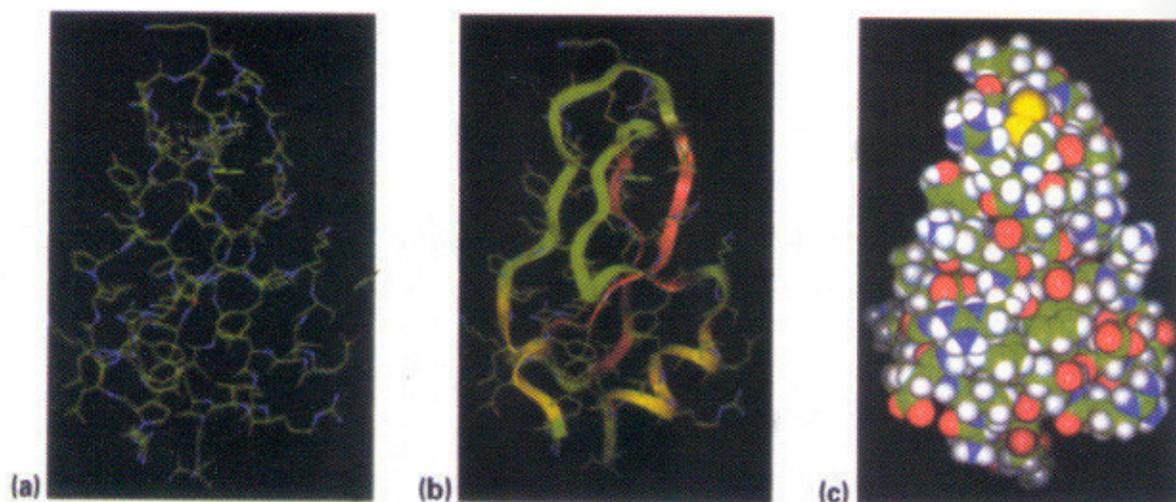
La kappa-caseína bovina es una importante molécula láctea de 169 aminoácidos, codificada por un gen localizado en el cromosoma 6, que presenta dos importantes variantes alélicas A y B. La variante B determina diferencias cuantitativas y cualitativas en el proceso de transformación de la leche en queso, debido a la formación de micelas pequeñas que contienen mayor cantidad de caseína, formando un coágulo firme y denso que retiene sólidos.

Introducción

El genoma bovino contiene aproximadamente 3 mil millones de pares de bases, empacadas en 30 pares de cromosomas, de las cuales se calcula que sólo el 10% contienen información útil traducible en proteínas (Barendse, 1994). Dentro de éstas secuencias ocurren mutaciones o cambios que generan otras formas heredables constituyéndose en polimorfismos, que pueden o no alterar las proteínas que codifican, y afectar en forma positiva o negativa las funciones de los

organismos. Una forma de analizar estos polimorfismos, es mediante la amplificación molecular de una región del gen, seguido de digestión con una enzima de restricción apropiada, metodología conocida como PCR-RFLP (Clark, 1992).

La intensificación de la explotación de características de producción ha llevado a la selección de animales que tengan una mayor y mejor calidad de las mismas, pero se ha realizado de manera lenta y difícil con base en



Estructura terciaria del BPTI. El inhibidor de la Tripsina pancreática bovina o BTPTI, se une a la Tripsina y le impide catalizar la hidrólisis peptídica.

a) Modelo esquelético que muestra las posiciones de los átomos, obtenido por difracción de rayos X.

b) Modelo de cinta del armazón.

c) Modelo de relleno especial, en el que se dan los radios de Van Der Waals de todos los átomos.

En a) y b) los enlaces disulfuro aparecen en amarillo.

apareamientos controlados que implican la evaluación de toros y vacas según su progenie.

Ahora la selección de las características en animales se realiza utilizando técnicas moleculares que rápidamente identifican los genotipos y evitan tener que esperar a la progenie del animal.

Proteínas Lácteas

En mamíferos una de las principales características de la leche es su alto contenido en proteínas, que determinan en gran medida el valor nutritivo y tecnológico de la misma. En Colombia, el 70% de la leche se produce en forma intensiva con base racial Holstein, un 20% con base racial Holstein y Cebuinos, un 8% Jersey y 2% criollos.

En la leche de los rumiantes existen 6 proteínas principales que constituyen el 90% del total de las proteínas de la leche, clasificadas en dos grupos de acuerdo con su solubilidad a pH 4.6 y a una

temperatura de 20°C (Kanamori y Kawaguchi, 1980).

El primer grupo lo constituyen las caseínas (CN): alfaS1, alfaS2, beta y kappa (Eigel y Butler, 1984), que se precipitan en estas condiciones de pH y temperatura y constituyen la fracción proteica mayoritaria de la leche.

El segundo grupo, proteínas séricas, permanecen solubles en las condiciones mencionadas, está conformado principalmente por a-Lactoalbúmina y b-Lactoglobulina (Eigel y Butler, 1984).

Las caseínas se agregan en partículas coloidales esféricas llamadas micelas, antes de ser secretadas por exocitosis; en peso seco, las micelas contienen aproximadamente un 94% de proteína y un 6% de iones calcio, fosfato, magnesio y citrato, sus características influyen notablemente en las propiedades tecnológicas de la leche

(Grosclaude,1988). La desestabilización de las micelas inicia el proceso de coagulación y gelificación de la leche, durante la fabricación del queso (Russo y Mariani, 1978 ; Schaar, 1984). La kappa-caseína es responsable de la estabilidad de las micelas y su hidrólisis modifica sus características fisicoquímicas (Grosclaude, 1988). El gen que la determina está localizado en el cromosoma 6 (Velmalá et al., 1999).

La kappa-caseína es una proteína de 169 aminoácidos y presenta dos importantes variantes: kappa-CN A y kappa-CN B (Neelin, 1964; Schmidt, 1964), determinadas por los alelos

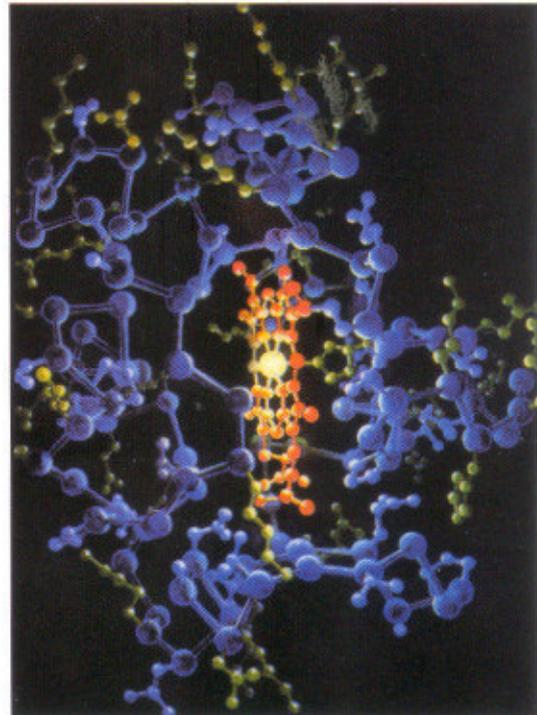
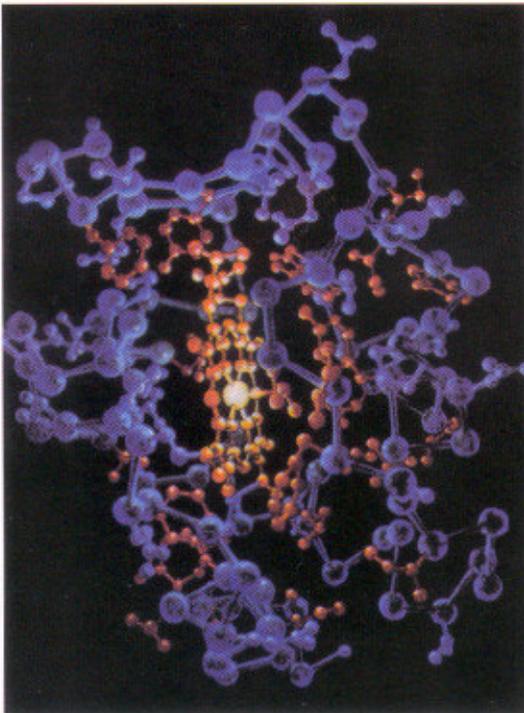
A y B (Grosclaude, 1988 ; Ikonen et al.,1996) y difieren en los aminoácidos 136 y 148 respectivamente, lo que permite distinguir las con las diferentes pruebas moleculares. La proteína B determina diferencias cuantitativas y cualitativas en el proceso de la transformación de leche en queso debido a la formación de micelas pequeñas que contienen mayor cantidad de caseína, forma un coágulo firme y denso que retiene sólidos (Russo y Mariani, 1978; Marzialli, 1986) incrementa en un 3% la cantidad total de proteína (Gibson y Rozzi, 1990), de esta manera mejora la calidad del queso y disminuye los costos de producción comparada con la variante A que produce micelas

Distribución de los residuos hidrófilos e hidrófobos en las proteínas globulares.

Estructura tridimensional de la proteína.

Izquierda: Obsérvese el modo en que los aminoácidos hidrófobos (que se indican en rojo) se agrupan alrededor del grupo hemo y en el interior de la molécula.

Derecha: En una perspectiva diferente de la misma molécula, se muestran en verde los residuos hidrófilos. Obsérvese que tienden a ubicarse en la superficie molecular.



más grandes y menor cantidad de caseína (Morini et al., 1975).

Los bovinos, tanto machos como hembras, presentan genotipos AA, BB y AB para kappa-caseína, el alelo B eleva la concentración de caseína en la leche (Van Ennénnan y Medrano, 1991) lo que es consistente con el efecto del genotipo BB que produce mayor cantidad que AB y éstos a su vez mayor cantidad que AA. (Ng-Kwai-Hang, 1987).

La estructura más aceptada en cuanto a la conformación de las micelas de caseína propone un núcleo compuesto por las caseínas alfa S1, alfa S2 y beta, que se encuentran asociadas una con otra en el interior de la micela e interactúan con el calcio y la kappa-caseína que predomina sobre la superficie de la micela proporcionando estabilidad (Schmidt, 1982).

En la K-CN (B) se reduce el tamaño de la micela, se aumenta su estabilidad térmica y se reduce el peligro de coagulación y gelificación durante los procesos de esterilización (Fox, 1982; Medrano et al., 1990; DiGregorio y Rando, 1991).

La kappa-caseína, tanto A como B, es cortada por la quimosina (localizada en el rumen del ternero) o por el cuajo en la fabricación del queso en dos segmentos: el macropéptido que va a la fracción soluble de las proteínas de la leche y la para-kappa caseína que conforma una malla que retiene sólidos (Marzially, 1986; Ikonen et al., 1999), por lo tanto formará una cuajada más firme y densa, de esta manera influye en la calidad del queso (Ojala et al., 1997).

Estas dos variantes A y B de kappa-CN están presentes en todas las razas bovinas estudiadas, pero el alelo A tiende a predominar en la mayor parte de ellas, con excepción de las razas Jersey y Normanda (Schlee y Rottmann, 1992).

Materiales y Métodos

Muestra Poblacional

En el presente estudio mediante PCR-RFLP se realizó la identificación molecular de las variantes alélicas A y B en una población de 222 animales (machos y hembras) de las siguientes razas (Tabla 1).

TABLA No. 1 Muestra Poblacional. Descripción del Número de Individuos Genotipados para K-CN en cada una de las Cuatro Razas Estudiadas.

RAZAS	No. ANIMALES
Hoistein	117
Jersey	60
Ayrshire	30
Normando	15
Total	222

Extracción de DNA

Se tomó una muestra de 7ml de sangre a cada animal, recolectada en tubos secos con EDTA, fue refrigerada hasta su procesamiento.

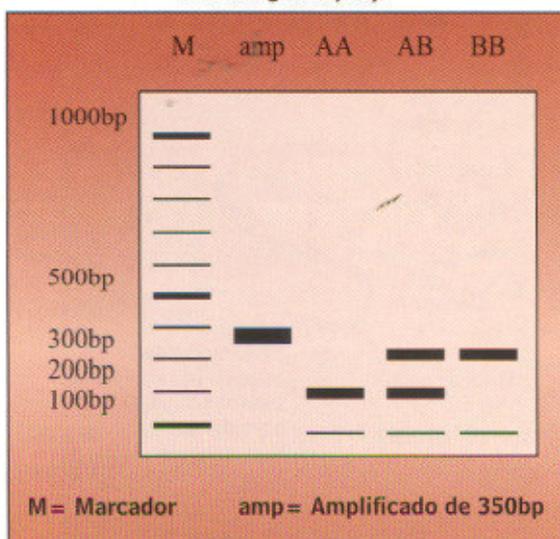
Amplificación de DNA por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se realizó la amplificación del segmento del Gen de kappa-caseína en un volumen total de 25 ml de mezcla de reacción usando el termociclador Perkin-Elmer Cetus, y 1 ul de DNA Genómico.

Reacción de Restricción

El fragmento amplificado fue sometido a restricción enzimática durante 4 horas a una temperatura de 37°C, para identificar, ya sea el gen A o el gen B. La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 20ml.

GRÁFICO # 1 Electroforesis en Gel de Agarosa (se observa el patrón de bandas que identifica los tres genotipos).



Electroforesis de DNA

Los fragmentos amplificados y cortados fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%, al cual se adicionó 0.7ml de Bromuro de Etidio (10mg/ml). Como resultado de la restricción se observan 2 segmentos de 266 y 84 pares de bases (pb) para el gen B y 3 segmentos de 134, 132 y 84 pares de bases (pb) para el gen A (los segmentos 134 y 132 se presentan como una sola banda intensa debido a sus pesos moleculares cercanos). En muestras de heterocigóticos AB se observan tres bandas: 266pb, 134/132pb y 84pb correspondientes a los fragmentos amplificados de cada gen A y B (Gráfico 1).

GRÁFICO # 2 Frecuencia del Genotipo AA de K-Caseína en las Cuatro Razas Estudiadas

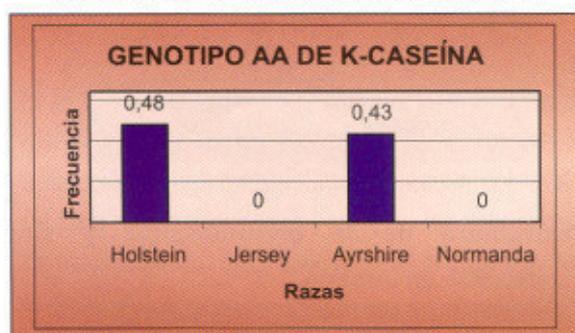
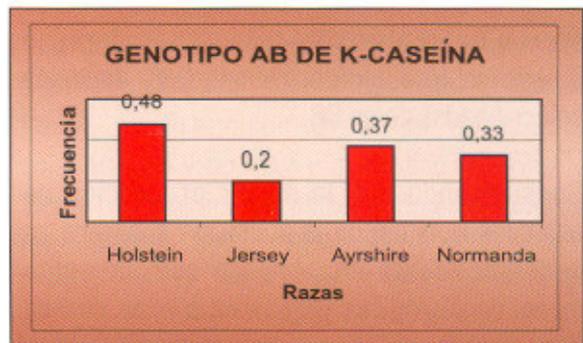


GRÁFICO # 3 Muestra la Frecuencia del Genotipo AB de K-Caseína en las Cuatro Razas Estudiadas



Resultados y Discusión

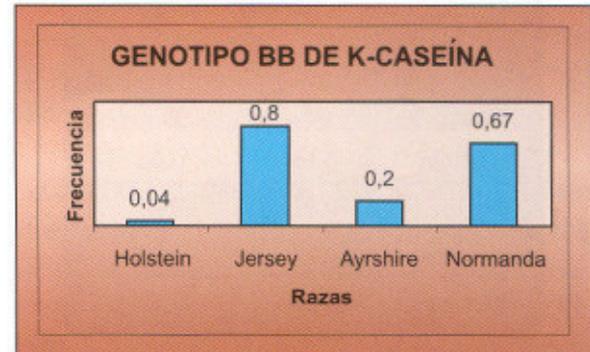
En las razas analizadas se encontraron diferencias significativas en la distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas, de la siguiente manera.

Frecuencias genotípicas Holstein de AA=0.48, AB=0.48 y BB=0.04; Ayrshire de AA=0.43, AB=0.37 y BB=0.20; Jersey de AA=0.00, AB=0.20 y BB=0.80 y Normanda de AA=0.00, AB=0.33, BB=0.67 (gráficos 2,3 y 4).

Frecuencias del alelo favorable B : Holstein 0.28, Ayrshire=0.38, Jersey=0.90, y Normanda= 0.83.

Como puede verse, el alelo B es mas frecuente en la raza Jersey y Normanda y casi ausente en las razas Holstein y Ayrshire. La baja frecuencia para el genotipo BB en animales Holstein, indica que

GRÁFICO # 4 Muestra la Frecuencia del Genotipo BB de K-Caseína en las Cuatro Razas Estudiadas



en ésta raza se ha incrementado el número de animales genotípicamente AA lo que podría ser corregido realizando cruces con toros ó directamente semen proveniente de animales seleccionados como BB.

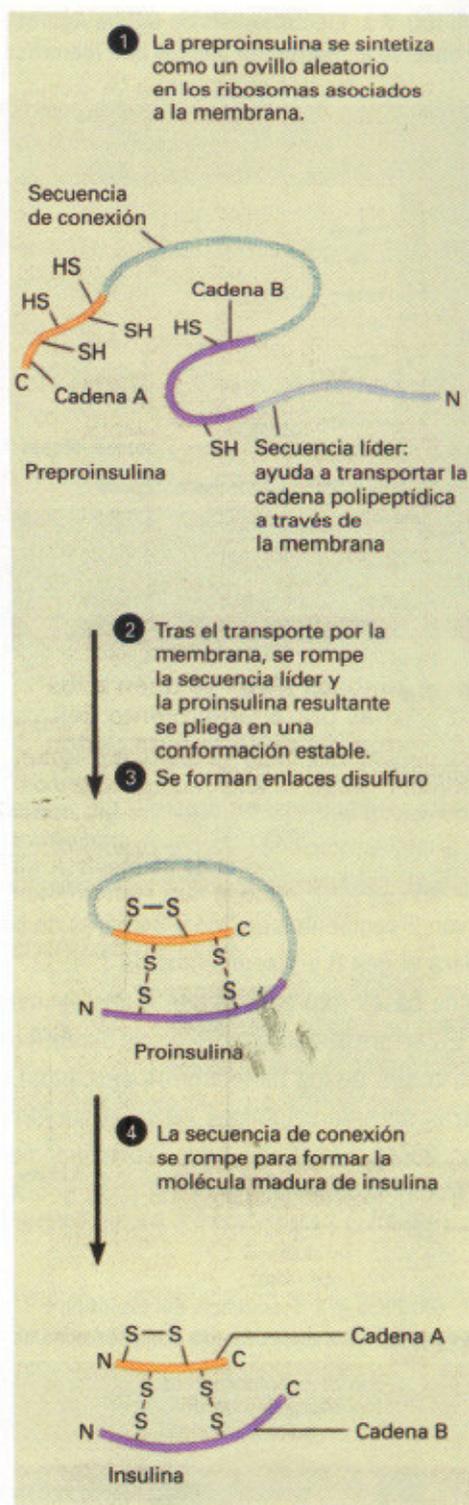
Considerando que la mayor proporción de animales Holstein de la población analizada es genotípicamente AA, implica que presenta menor contenido de caseínas en la leche, cuando se comparan con las otras tres razas estudiadas. En la raza Ayrshire, se observa un resultado similar al anterior en cuanto al genotipo desfavorable AA (gráfico 4),

TABLA No. 2 Frecuencias Genotípicas de Kappa-Caseína Reportadas en la Literatura de Estudios Realizados en California (USA) (Van Eenennaam y Medrano, 1991b) y los obtenidos en este Estudio en Antioquia (Colombia)

GENOTIPO AA		
RAZAS	USA	ANTIOQUIA
Hoistein	0.81	0.48
Jersey	0.00	0.00
Ayrshire	0.37	0.43
Normando	0.09	0.00

GENOTIPO AB		
RAZAS	USA	ANTIOQUIA
Hoistein	0.03	0.48
Jersey	0.19	0.20
Ayrshire	0.48	0.37
Normando	0.42	0.33

GENOTIPO BB		
RAZAS	USA	ANTIOQUIA
Hoistein	0.16	0.04
Jersey	0.81	0.80
Ayrshire	0.15	0.20
Normando	0.49	0.67



Estructura de la preproinsulina y su conversión en insulina.

En las muestras de razas Normanda y Jersey se observa un notable incremento en la frecuencia del genotipo BB lo que implicaría un mayor contenido de caseínas en la leche y por consiguiente una mayor concentración de sólidos totales, que permite aumentar la producción de quesos con mejor calidad y con menores costos de fabricación.

Conclusiones

En el presente estudio se encontró que las frecuencias genotípicas para kappa-caseína en las razas Holstein, Jersey, Ayrshire y Normando de las poblaciones bovinas, estudiadas en algunos hatos lecheros en Antioquia, son similares a las reportadas en estudios realizados en otros países (Tabla 2).

Las poblaciones analizadas de los ganados Holstein y Ayrshire presentaron un incremento en la frecuencia del genotipo AB, como consecuencia de cruces entre parentales heterocigóticos los cuales son previamente seleccionados por otros rasgos de producción.

De otro lado las muestras analizadas de Jersey y Normanda presentan una alta frecuencia del alelo B de kappa-caseína, lo que permite obtener leche de mejor calidad para la elaboración de queso ya que su contenido mayor de proteína y sólidos totales asociados con el alelo B determinan una mejor gelificación, y formación de una cuajada más firme y de mayor consistencia.

El presente estudio constituye el primero de su clase realizado en Colombia, y propone la aplicación de una metodología molecular confiable, de fácil aplicación y bajo costo, en los programas de mejoramiento de la calidad de la proteína láctea en bovinos.

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por la Cooperativa COLANTA. Agradecemos a los doctores Jenaro Pérez y Francisco Uribe su entusiasta colaboración y apoyo, y al médico veterinario Victor Londoño por su colaboración en la toma de las muestras.

Bibliografía

- BARENSE W.. A genetic linkage map of the bovine genome. *En: Nature Genetics*. 6 . (1994); p. 227-235.
- CLARK AJ. Prospects for the genetic engineering of milk. *En: J Cell Biochem*. 49 (1992); p. 121-127.
- DI GREGORIO P, Rando A. DNA polymorphism at the casein loci in sheep. *En: Animal Genetics* 22 (1991); p. 21-30.
- EIGEL WN, Butler JE. Nomenclature of proteins of cow's milk. Fifth revision. *En: J Dairy Sci* . Vol.67 (1984); p. 1599-1631.
- FOX PF. Heat induced coagulation of milk. *En: Developments in Dairy Chemistry*. Vol I , Appl. Sci. (1982); p. 189.
- GIBSON JP, Rozzi P. The use the K-Casin genotypes in Dairy Cattle breeding. Proc 4th World Congr Genet Appl Livest Prod. Edinburgh, Scotland. 1990.
- GROSCLAUDE F. Le polymorphisme génétique des principaux lactoproteins bovines. *En: INRA Prod Anim* 1(1988); p. 5-17.
- IKONENT, Ruottinen O, Erhardt G, Ojala M. Allele frequencies of the major milk proteins in the Finnish Ayrshire and detection of a new kappa-casein variant. *En: Anim Genet* 27 (1996); p. 179-181.

IKONEN T, Ahlfors K, Kempe R, Ojala M, Ruottinen O. Genetic parameters for the milk coagulation properties and prevalence of noncoagulating milk in Finnish dairy cows. En: J Dairy Sci . Vol. 82 (1999); p. 205-214.

KANAMORI M, Kawaguchi F. Attachment sites of carbohydrate moieties to peptide chain of bovine K-casein from normal milk. En: Agric Biol Chem 44 (1980); p. 1855.

MARZIALI AS. Effects of milk composition and genetic polymorphism on coagulation properties of milk. En: J Dairy Sci. 69 (1986); p. 1793-1798.

MEDRANO JF, Aguilar-Cordova E. Genotyping of bovine Kappa-casein loci following DNA sequence amplification. En: Biotechnology. 8 (1990); p. 144-146.

MORINI D, Losi GB, Castagnetti M. Linfluenza delle varianti genetiche della K-caseina sulla dimensioni delle micelle caseiniche. En: Sci Lech Latt Cas 26 (1975); p. 437.

NG-KWAI-HANG, KF. Variation in milk protein concentrations associated with genetic polymorphism and environmental factors. En: J Dairy Sci 70 (1987); p. 563.

NEELIN JM. Variants of K-casein revealed by improved starch gel electrophoresis. En: J Dairy Sci . 47 (1964); p. 506-509.

OJALA M, Famula TR, Medrano JF. Effects of milk protein genotypes on the variation for milk production traits of Holstein and Jersey cows in California. En: J. Dairy Sci. Vol. 80 (1997); p. 1776-1785.



RUSSO V, Mariani P. Polimorfismo delle proteine del latte e relazioni tra varianti genetiche e caratteristiche di interesse zootecnico tecnologico e caseario. En: Rev Zootec Veterin. 5 (1978); p. 1-31.

SCHMIDT DG. Variants of K-casein revealed by improved starch gel electrophoresis. En: Biochem Biophys Acta 90 (1964); p. 411-414.

SCHMIDT DG. Association of caseins and casein micelle structure. En: Develop Dairy Chemistry 1 (1982); p. 61.

SCHAAR J. Effects of K-casein genetic variants and lactation number of the renneting properties of individual milks . En: J Dairy Rev 51 (1984); p. 397.

SCHLEE P, Rottmann O. Identification of Bovine K-casein C using the polymerase chain reaction. En: J Anim Breed Genet 109 (1992); p. 153-155.

VAN EENENNAAM A, Medrano JF. Differences in allelic protein expression in the milk of heterozygous K-casein cow's . En: J Dairy Sci 74 (1991); p. 1491-1496.

———. Milk protein polymorphisms in California dairy cattle. En: J Dairy Sci 74 (1991); p. 1730-1742.

VELMALA R, Vilkki J, Elo K, Maki-Tanila A (1999). Casein haplotypes and their association with milk productions traits in the Finnish Ayrshire cattle. En: Anim Genet 26 (1991); p. 419-425.

