



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química --
Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

**EFFECTO DE LA PROTEÍNA SOLUBLE DE LA DIETA SOBRE EL NITRÓGENO
UREICO LÁCTEO Y SU RELACIÓN CON LA CASEÍNA DE LA LECHE**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Presenta:

Q. en A. Mariela Camacho Barrón

Dirigido por:

Dr. José Luis Romano Muñoz

SINODALES

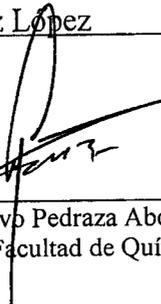
Dr. José Luis Romano Muñoz
Presidente

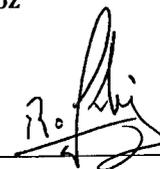
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Secretario

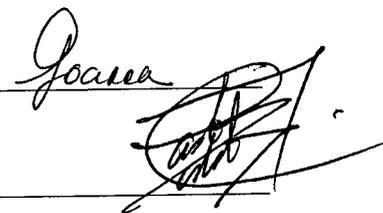
Dr. Eduardo Castaño Tostado
Vocal

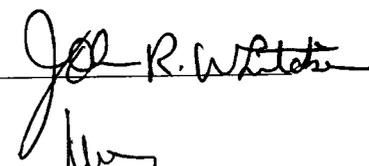
Dr. John R. Whitaker
Suplente

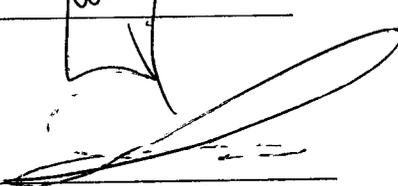
Dr. Felipe de Jesús Ruíz López
Suplente


M. en C. Gustavo Pedraza Aboytes
Director de la Facultad de Química










Dr. Sergio Quesada Aldana
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Santiago de Querétaro, Qro.
Julio, 2004
México

No. Adq. H69199

No. Título _____

Clas TS

C37.1277

C172e

Ej.1

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica Toxicológica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, en el Laboratorio de Nutrición Animal del Centro Nacional de Investigación en Fisiología y Mejoramiento Animal (CENIFyMA) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y en el Laboratorio de Análisis de Leche de la Asociación Holstein de México.

DEDICATORIAS

A Dios, por darme la oportunidad de estar aquí y por rodearme de personas maravillosas.

A mi madre, por ser ejemplo de paciencia, trabajo, amor y esfuerzo. Por ti aún sigo aquí.

A mi padre, mis hermanos Daniel y Raúl y mi tía María. Muchas gracias por su apoyo incondicional.

A mi sobrino Luis Fernando y a la hermana que jamás conocí (1981 †).

Al Dr. Eduardo Castaño, Dr. Roberto Iturralde, Víctor, Ericka, Edgar y Jaime. Porque sus palabras de aliento fueron determinantes en la consecución de este trabajo.

A Lucas, mi querida mascota. Fuiste un ejemplo de fidelidad, nobleza e inteligencia.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. José Luis Romano Muñoz, por su confianza y la oportunidad que me dió de trabajar con él. Por ser ejemplo de trabajo y por compartir sus conocimientos y gran experiencia conmigo.

A la Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Pifia, por todo su apoyo y por permitirme trabajar en el Laboratorio de Bioquímica Toxicológica.

Al Dr. Eduardo Castaño Tostado le agradezco su disponibilidad, interés y sus asesorías en el ámbito de la estadística. Porque además de ser mi profesor de la maestría, ha sido un amigo para mí. Gracias por palabras de aliento y la motivación que siempre me ha dedicado en los momentos en que más lo he necesitado. Muchas gracias.

Al Dr. Felipe Ruiz López, por su enorme apoyo para el desarrollo del presente trabajo, así como por sus atinados comentarios, sugerencias y observaciones.

Al Dr. John Whitaker, por ser ejemplo de profesionalismo y por su disposición para la revisión de la tesis. Gracias por el tiempo dispensado a mi persona.

Al Dr. Roberto Iturralde Sánchez mi más profunda gratitud por su confianza, paciencia y apoyo desde el inicio hasta la culminación del presente trabajo. Cualquier cantidad de palabras sería insuficiente para expresarle mi agradecimiento.

A mis compañeros y amigos de la maestría: Lidia, Erika, Antonio, Adriana, Abraham, Azucena, Bety, Félix, Zoraida y Pedro. Gracias por esos agradables momentos compartidos.

Mi más profunda estimación a mi amigo Víctor, gracias por tu tiempo, tus consejos y palabras de aliento. Por hacer agradables las largas jornadas de trabajo en el laboratorio. Gracias por tu invaluable amistad.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, Lily, Adriana, Víctor, Lulú y Ana Bertha. Gracias por su ayuda y por el excelente ambiente de trabajo que siempre reinó en el laboratorio.

Gracias a mi gran amiga Ericka por soportarme tantos años. Contigo he comprobado que no es necesario un lazo sanguíneo para ser hermano de otra persona. Gracias por tus consejos y por tantas cosas que hemos pasado juntas.

Al Dr. Luis Antonio Salazar Olivo, por esas charlas tan amenas tanto desde el punto de vista académico como personal. Gracias por sus enseñanzas y el tiempo dispensado a mi persona.

A mis tres amigos del CENIFyMA, Edgar, Jaime y Juan, por su apoyo y por brindarme su amistad.

A Ariadna, muchas gracias por tu gran disposición y por toda tu ayuda durante la recolección de la información de los establos y los análisis de las muestras de leche.

A los inspectores de la Asociación Holstein de México, por su invaluable apoyo durante la recolección de las muestras de leche en los establos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico otorgado para la realización de este trabajo de investigación.

A todo el personal de las tres instituciones en donde se efectuó este trabajo: la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química, el Centro Nacional de Investigación en Fisiología y Mejoramiento Animal y la Asociación Holstein de México, ya que de alguna forma u otra contribuyeron en el desarrollo y término del presente trabajo.

I. RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la proteína cruda (PCA) y proteína soluble del alimento (PSA), sobre la concentración de nitrógeno ureico en leche (NUL), y la relación de éste con la concentración de proteína cruda en leche (PCL) y caseína total de la leche en establos lecheros comerciales. Se utilizaron 216 vacas Holstein de primera lactancia provenientes de seis establos comerciales localizados en los estados de Querétaro, Guanajuato y Aguascalientes (dos establos por estado). La leche se colectó individualmente en cada establo el día del muestreo. Simultáneamente, fueron colectadas muestras del alimento ofrecido al ganado. De igual manera, se recabaron los datos de producción y días en leche de los animales muestreados. Fue realizado un muestreo por establo durante la estación de invierno. En las muestras de leche se analizó NUL (mg/dL), PCL (%), caseína total (g/L) y caseínas α y β . En las muestras de alimento se determinó la materia seca, PCA (%) y PSA (%). Fueron colectadas por separado muestras de leche para comparar entre dos métodos de análisis de NUL, espectrometría de infrarrojo (EIR) y el método de Berthelot (MBT). Previo a los análisis estadísticos, se verificó que los datos presentaran un comportamiento normal. El análisis estadístico de los datos comprendió su estudio por el método de los mínimos cuadrados, usando el procedimiento de modelos lineales y mixtos del JMP (versión 4.04) y la determinación de las medias de las variables de interés y sus diferencias por la prueba de Tukey. Todos los establos tuvieron el mismo porcentaje de PCA (17-18 %), excepto el establo Aguascalientes 6, con 15.3 % de PCA. Las concentraciones de PSA fueron variables entre establos (24.93 to 39.80 % PSA). De igual manera, la concentración de NUL fue variable en los establos en estudio (10 mg/dL a 19.32 mg/dL). Los resultados mostraron que la proteína de la dieta no tuvo efecto sobre la concentración de NUL ($p > 0.20$) y que existió una relación negativa entre PCL y NUL, y entre caseína y NUL ($p < 0.0001$). Los resultados de la comparación realizada del análisis de NUL por EIR y MBT mostraron una variación muy grande a valores extremos de NUL (441 % para concentraciones menores a 12.5 mg/dL y 35.8 % para concentraciones mayores de 20.6 mg/dL). El intervalo de concentraciones de 12.6-20.5 mg/dL tuvo un porcentaje de variación de 7 %.

Palabras clave: proteína de la dieta, nitrógeno ureico lácteo, caseína.

II. SUMMARY

The objective of this study was to evaluate the effect of feed crude protein (PCA) and feed soluble protein (PSA) respect to the milk urea nitrogen concentration (NUL), and the relationship of NUL with milk protein concentration (PCL) and milk casein in commercial dairy herds.

Two hundred and sixteen Holstein cows of first lactation were selected from six commercial dairy herds located at Queretaro, Guanajuato and Aguascalientes states (two farms each state). Milk samples were collected individually at every farm on the test day. Simultaneously, feed samples were collected. At the same time data for milk production and milk days were registered. Milk sampling was realized during winter season. Milk samples were analyzed for NUL (mg/dL), PCL (%), casein (g/L) and α and β caseins. Feed samples were analyzed for dry matter, PCA (%) and PSA (%). Additional milk samples were collected and used to compare between two methods of analysis of NUL, infrared spectrometry (EIR) and Berthelot's method (MBT). Data were assessed for normality prior to statistical analysis. Data were analyzed by least square analysis of variance using general linear models procedure and the mixed models procedure of JMP (ver 4.04). Tukey's test was applied to determine the statistical differences between means of interest variables. All farms had the same concentration of PCA (average: 17.89%), except Aguascalientes 6, with 15.3 % PCA. The PSA concentrations were variables between farms (24.93 to 39.80 % PSA). As same manner, NUL concentrations were different between farms (10 to 19.32 mg/dL). The used models showed that protein diet had no effect on NUL concentration ($p > 0.20$) and there was an inverse relation between PCL and NUL and between casein and NUL ($p < 0.0001$). The comparison of the analysis of NUL between EIR and MBT showed a very high variation of extreme values of NUL: 441 % for concentrations lower than 12.5 mg/dL and 35.8 % for higher than 20.6 mg/dL. Concentrations between 12.6 to 20.5 mg/dL had a 7 % of variation.

Key words: dietary protein, milk urea nitrogen, casein.

ÍNDICE GENERAL

I. RESUMEN	i
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
II. INTRODUCCIÓN	1
III. REVISIÓN DE LITERATURA	3
1. Generalidades de la leche	3
2. Importancia nutricional y tecnológica	4
3. Proteínas de la leche	4
3.1 Caseína	5
3.2 Caseína α_1	7
3.3. Caseína α_2	7
3.4 Caseína β	7
3.5 Caseína κ	7
3.6 Proteínas del suero lácteo	7
3.7 Fracción de nitrógeno no proteico de la leche	8
4. Factores que afectan la producción y composición de la leche	8
4.1 Factores genéticos	9
4.1.1 Raza	9
4.1.2 Ascendencia y diferencia entre individuos	10

4.2 Factores ambientales	11
4.3 Ciclo y período de lactación	12
4.4 Salud (mastitis)	14
4.5 Alimentación	16
4.6 Relación de la proteína de la dieta, el NUL y la producción de la leche	19
4.7 Relación de la proteína de la dieta, el NUL y la proteína de la leche	21
5. Cuantificación del nitrógeno ureico en la leche	22
5.1 Métodos de cuantificación del NUL	22
5.1.1 Método de cuantificación de NUL basado en la presión generada por el CO ₂	22
5.1.2 Métodos colorimétricos	23
5.1.3 Espectrometría de Infrarrojo (EIR)	24
5.1.4 Método estándar para cuantificar NUL	25
IV. JUSTIFICACIÓN	26
V. HIPÓTESIS	26
VI. OBJETIVOS	26
1. Objetivo general	26
2. Objetivos específicos	26
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	27
A. Materiales	27
1. Material Químico	27
2. Material Biológico	27

B. Métodos	27
1. Selección de establos	27
1.1 Origen del alimento y las muestras de leche	31
1.2 Manejo de las muestras	31
2. Análisis del alimento del ganado	31
2.1 Determinación de materia seca	31
2.2 Cuantificación de proteína cruda del alimento	32
2.3 Determinación de proteína soluble	32
3. Análisis de la leche	32
3.1 Cuantificación de proteína cruda y NUL	33
3.2 Extracción y cuantificación de caseína	33
3.2.1 Extracción de la caseína	33
3.2.2 Cuantificación de caseína por Bradford	33
3.2.3 Cuantificación de α y β caseína mediante electroforesis (UREA-PAGE) y densitometría	34
4. Análisis estadístico	34
4.1 Variables	35
4.1.1 Variables dependientes o de respuesta	35
4.1.2 Variables independientes o predictoras	35
4.2 Modelo de efectos fijos para determinar la relación entre NUL y la dieta	35
4.3 Modelo de efectos fijos para determinar la relación entre la concentración de PCL y la dieta	36
4.4 Modelo de efectos fijos para determinar la relación entre la concentración de caseína y la dieta	36
4.5 Modelo de efectos mixtos con un efecto anidado para determinar la relación entre la proteína en la leche y el NUL	37

4.6 Modelo de efectos mixtos con un efecto anidado para determinar la relación entre la caseína de la leche y el NUL	37
4.7 Modelo de efectos mixtos con un efecto anidado para determinar la relación entre la producción de la leche y su composición	38
5. Cuantificación del NUL mediante espectrometría de infrarrojo y el método enzimático de Berthelot	39
5.1 Determinación del número de muestras a analizar	39
5.2 Material Químico	39
5.3 Material Biológico	39
5.4 Metodología	39
5.4.1 Procedimiento para determinación de NUL mediante el kit No. 6374 (Bayer Diagnostics)	40
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
1. Alimento de los animales	41
1.1 Modelo de efectos fijos para determinar la relación entre NUL y la dieta	43
2. Análisis de la leche	45
2.1 Variables analizadas en la leche	45
2.2 Proporciones encontradas de α y β caseína	49
2.3. Relaciones encontradas entre las variables analizadas	52
2.3.1 Modelo de efectos fijos para determinar la relación entre PCL (%) y la dieta	52
2.3.2 Modelo de efectos fijos para determinar la relación entre la caseína (g/L) y la dieta	55
2.3.3 Modelo de efectos mixtos con un efecto anidado para determinar la relación entre PCL y el NUL	57

2.3.4 Modelo de efectos mixtos con un efecto anidado para determinar la relación entre la caseína (g/L) y el NUL	60
2.3.5 Modelo de efectos mixtos con un efecto anidado para determinar la relación entre la producción de leche y su composición	62
3. Resultados de la comparación del análisis de NUL entre espectrometría de Infrarrojo y el método de Berthelot	64
IX. CONCLUSIONES	71
X. LITERATURA CITADA	72
APÉNDICES	82

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO

1	Composición típica de la leche de vaca (<i>Bos taurus</i>)	3
2	Distribución de las principales sustancias nitrogenadas de la leche de vaca	5
3	Propiedades y contenido de las proteínas de la leche	6
4	Principales compuestos de la fracción de NNP de la leche	8
5	Valores promedio por raza estimados a través de asociaciones DHIA	9
6	Composición de leche de 5 razas lecheras en la región de Manitoba, Canadá	10
7	Escala lineal de células somáticas	14
8	Efecto de la mastitis sobre la composición de la leche	15
9	Recomendaciones generales para la alimentación del ganado lechero basadas en las Tablas del NRC (1989)	17
10	Transformación de los nutrimentos del alimento a los componentes de la leche	18
11	Valores de nitrógeno ureico y su relación con la proteína de la leche	20
12	Porcentaje de vacas en el establo de cada nivel de células somáticas después de la primer etapa de selección	29

13	Porcentaje de vacas en el establo de cada nivel de NUL después de la segunda etapa de selección	30
14	Procedimiento para la cuantificación de NUL en cada serie de tubos analizados	40
15	Resultados promedio del análisis del alimento consumido por el ganado y el nitrógeno ureico en la leche (NUL)	41
16	Correlaciones de las variables NUL, PCA y PSA	42
17	Resultados promedio de la leche analizada por establo	46
18	Proporciones de α y β caseína encontradas en los seis establos analizados	50
19	Correlaciones entre el nitrógeno ureico y las caseínas α y β	51
20	Parámetros del modelo para determinar la relación entre la producción de la leche y su composición	62
21	Comparación de los resultados de NUL obtenidos por espectrometría de Infrarrojo (EIR) y el método de Berthelot (MBT)	64
22	Resultados promedio del análisis realizado a los datos	66
23	Resumen de los resultados obtenidos después de la agrupación de los datos de NUL (<12.5 mg/dL, 12.6-20.5 mg/dL y > 20.6 mg/dL) analizados por EIR y MBT	68

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA

1	Curva de lactación	13
2	Evolución de la composición de la leche en el curso de la lactación	13
3	Sistema óptico de haz único con filtros IR específicos	24
4	Gel de electroforesis (UREA-PAGE) representativo donde se muestran las banda de α y β caseína analizadas en las muestras de leche.	49
5	Relación encontrada entre la concentración de proteína de la leche y el nitrógeno ureico lácteo (NUL). La proteína se midió en porcentaje y el NUL en mg/dL. Número de datos: 539	58
6	Relación encontrada entre la caseína de la leche y el nitrógeno ureico lácteo (NUL). La caseína se midió en g/L y el NUL en mg/dL. Número de datos: 213	61
7	Diagrama de dispersión de los resultados de NUL analizados por EIR y MBT	67

II. INTRODUCCIÓN

La leche es una secreción polifásica de las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos, que se produce tras el nacimiento de la cría. Es un líquido blanco y opaco, de sabor dulce y pH cercano a la neutralidad (Alaís, 1988; Wong et al., 1996).

La función natural de la leche es la de ser el alimento exclusivo de los mamíferos durante el período inicial de su existencia, cuando el desarrollo es rápido y no puede ser sustituida por otros alimentos. La gran complejidad química de la leche corresponde precisamente a esta necesidad (Alaís, 1988). Se le considera una buena fuente de vitaminas (A, B₂, B₆ y B₁₂), minerales (calcio, magnesio y fósforo), lípidos y una fracción nitrogenada proteica de alto valor biológico, constituida principalmente por la caseína (Speckmann et al., 1981). Además de la fracción nitrogenada proteica, existe la fracción de nitrógeno no proteico, constituida hasta en un 50 % por la urea (Emmons y Kertz, 1992; Harding, 1992), y cuantificada en la leche como nitrógeno ureico (NUL).

Aunado a su importancia nutricional, la leche es considerada en el ámbito industrial como una materia prima muy versátil, al transformarse en diversos alimentos domésticos e industriales, tales como queso y yoghurt (Cheftel et al., 1989; López, 1998). Debido a que la mayoría de estos productos basan su rendimiento en la caseína de la leche, resulta de suma importancia en la rentabilidad de la industria láctea, la producción de leche con elevadas proporciones de caseína. Por lo que es de gran interés el estudiar los factores que pueden afectar la síntesis de la fracción nitrogenada de la leche; específicamente la caseína.

Uno de los factores más importantes y relacionado directamente con la síntesis de la fracción nitrogenada de la leche es la dieta. Desbalances en la dieta del ganado lechero pueden provocar un incremento de la concentración de amoníaco en el rumen, el cual es transformado a urea en el hígado (Harris, 1996). La urea es formada a partir del amoníaco ruminal derivado del metabolismo de los microorganismos del rumen, o bien, a partir del catabolismo de las proteínas (Hernández, 1998; Moore y Varga, 1996); y puede ser cuantificada en el plasma o en la leche en forma de NUL, resultado que se ha pretendido utilizar como indicador de la eficiencia de las raciones alimenticias suministradas al ganado lechero.

Debido al alto costo energético que representa el ciclo metabólico de la urea, se ha especulado que puede disminuir la energía disponible para la síntesis de la leche y sus componentes (<http://www.dhia.psu.edu/mun.htm>). Godden et al. (2001) encontraron una asociación no lineal negativa significativa entre el nitrógeno ureico lácteo y los porcentajes de grasa y proteína total de la leche. Aunque el estudio presenta resultados valiosos, hasta el momento no se cuenta con información más contundente acerca de la relación entre el NUL y la proteína láctea, especialmente la caseína. La evaluación del factor dieta, en conjunto con otros factores que puedan influir en la composición de la fracción nitrogenada de la leche debe ser realizada, para que a partir de esos estudios se desprendan recomendaciones que permitan balancear de forma más eficiente las dietas proporcionadas al ganado lechero, y de esta manera optimizar la producción láctea, así como sus componentes y, en particular, la caseína.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

1. GENERALIDADES DE LA LECHE

La canasta básica está conformada por artículos de consumo indispensables en el régimen alimenticio de los mexicanos. La leche es uno de los alimentos de mayor importancia, ya que al consumirse provee de diferentes nutrimentos necesarios al organismo del ser humano. El origen del lácteo puede ser de ganado caprino o bovino, siendo este último el de mayor importancia para cumplir con las necesidades de la población.

La leche es un líquido complejo integrado por varios cientos de constituyentes. No obstante, los componentes de la leche son clasificados en siete grupos: proteínas, lípidos, carbohidratos, minerales, pigmentos y vitaminas, enzimas y componentes diversos (Vélez y Barbosa, 1997). En el Cuadro 1 se resume la composición típica de leche de vaca (*Bos taurus*) (Alaís, 1988).

Cuadro 1. Composición típica de la leche de vaca (*Bos taurus*)

Componente	Composición g/L
Agua	876.0
Lactosa	46.0
Lípidos	35.0
Proteínas	32.5
Caseína	27.0
Globulinas, albúminas	5.5
Nitrógeno no proteico	1.5
Sales	9.0
Componentes diversos (enzimas, gases disueltos)	Trazas

Adaptado de Alaís (1988)

2. IMPORTANCIA NUTRICIONAL Y TECNOLÓGICA

La leche y sus derivados constituyen un punto esencial de la alimentación humana, debido a la alta calidad de su proteína, basada en su perfil de aminoácidos y a que es el único alimento que se ingiere al nacer (Shaafsma y Steijins, 2000). Aunado a lo anterior, los productos lácteos son considerados alimentos altamente nutritivos, al contener una elevada proporción de nutrimentos en relación con la cantidad de energía que proporcionan, exceptuando la grasa (Speckmann et al., 1981).

El consumo de la leche puede ser en su forma líquida, o bien, como alguno de los diferentes y variados productos que pueden obtenerse a partir de ella después de sufrir una transformación tecnológica. El rendimiento de algunos de ellos dependen del contenido de la caseína de la leche, como es el caso particular del queso (Franke et al., 1988). No obstante, no solamente el contenido de caseína *per se* influye en el rendimiento de leche a queso, también las proporciones relativas de los componentes individuales de la caseína (caseína α , β y κ) y β -lactoglobulina juegan un papel muy importante en este aspecto, además de afectar las propiedades de coagulación y estabilidad al calor de la leche (Van Eenennaam y Medrano, 1991). Un incremento en la proporción de las caseínas α_s y β , aumenta el rendimiento del queso (Bobe et al., 1999) y la proporción relativa de κ caseína tiene un efecto sobre la estabilidad al calor de la leche (Kroeker et al., 1985). De igual forma, también influyen las variantes genéticas de cada una de estas proteínas. Por ejemplo, las variantes genéticas BB (tipo de variante genética de la proteína, heredada de cada progenitor) de β -lactoglobulina y κ caseína han sido asociadas con un mayor contenido de caseína total en la leche (Mackle et al., 1999; Van Eenennaam y Medrano, 1991).

3. PROTEÍNAS DE LA LECHE

Las proteínas de la leche incluyen la caseína, las proteínas del suero (lactoalbúminas y lactoglobulinas), las de la membrana de los glóbulos de grasa y las enzimas (Idolo et al., 1997). El contenido promedio de proteínas de la leche de una vaca sana es de 30-35 gramos por litro, lo que representa aproximadamente el 94-95 % del nitrógeno total de la leche (Alaís, 1988; Cheftel, 1989). Cerbulis y Farrell (1975) informaron que la proporción promedio del nitrógeno proteico presente en leche de vacas Holstein fue 95.10 %; 78.17% proveniente

de la caseína y 16.93 % de las proteínas del suero (Cuadro 2). Sin embargo, estas proporciones pueden variar en los intervalos de 68.7-83.7% y 12.4-26.3% para caseína y proteínas del suero, respectivamente (Cerbulis y Farrel, 1975; Palmquist, 1995).

Cuadro 2. Distribución de las principales sustancias nitrogenadas de la leche de vaca

Componente	Proporciones		
	Relativas		gramos/litro
Prótidos totales	100		32.0
Caseína entera	78	100	25.0
Caseína α_s		40	10.0
Caseína β		30	7.5
Caseína κ		15	3.8
Diversos		15	3.7
Proteínas del suero	17	100	5.4
β -lactoglobulina		50	2.70
α -lactoalbúmina		22	1.20
Globulinas		12	0.65
Sero-albúmina		5	0.25
Proteosas-peptonas		10	0.60
Sustancias nitrogenadas no proteicas	5		1.6

Adaptado de Alais (1988)

3.1 Caseína de la leche

La caseína es la principal proteína de la leche presente en forma de partículas globulares llamadas micelas, de 100 a 300 nm de diámetro. Aparentemente se encuentran compuestas de submicelas, con un diámetro 10 a 20 nm, que se mantienen juntas debido al fosfato de calcio (Vélez y Barbosa, 1997). Comprende cuatro familias de moléculas (α_{s1} , α_{s2} , β y κ), clasificadas con base en la homología de su estructura primaria (Wong et al., 1996). Presentan polimorfismo genético y sufren de modificaciones postraslacionales, como son la fosforilación y la glicosilación (Schaafsma y Steijns, 2000).

Las caseínas son fosfoproteínas que precipitan en la leche cruda a un pH de 4.6 a 20°C (Schaafsma y Steijns, 2000; Wong et al., 1996); y comprenden aproximadamente del 78-82% de la proteína total en la leche (Alaís, 1988; Palmquist, 1995; Wong et al., 1996). En el Cuadro 3 se muestran las propiedades y contenido de las proteínas de la leche, informándose que éstas presentan un carácter fuertemente ácido debido a la abundancia de ácido glutámico y aspártico, además de la presencia de radicales ácidos fuertes en la molécula, como es el caso del fosfórico (Cheftel, 1989); propiedades que le confieren su carácter electronegativo en los ensayos habituales, emigrando hacia el ánodo en el curso de la electroforesis, y haciendo posible su separación por cromatografía sobre cambiadores de iones, como la DEAE-celulosa (Alaís, 1988), así como por las técnicas de ultrafiltración, HPLC y más recientemente, por electroforesis capilar (Idolo et al., 1997; Vallejo, 1997).

Cuadro 3. Propiedades y contenido de las proteínas de la leche

Proteína	P.M.	A.A.	Enlace S-S	Grupos fósforo	% en leche descremada
Caseína α 1	23,614	199	0	8	
Caseína α 2	25,230	207	?	11	45-55
Caseína β	23,983	209	0	5	25-35
Caseína κ	19,023	169	?	1	8-15
α -lactoalbúmina	14,176	123	4	0	2-5
β -lactoglobulina	18,363	162	2	0	7-12
seroalbúmina	66,267	582	17	0	0.7-1.3
lactoferrina	90,000	700	-	-	0.2-0.8
lisozima	14,701	130	4	0	-
Inmunoglobulinas	-	-	-	-	1.35-2.8

P.M. = peso molecular; A.A. = aminoácidos; enlace S-S: enlaces disulfuro

Adaptado de Jenness (1985)

3.2 Caseína α 1

La caseína α 1 consta de 199 aminoácidos, con un peso molecular de 23,614 Da aunque éste puede variar entre 22,000 a 24,000 Da (Schaafsma y Steijns, 2000; Wong et al., 1996).

3.3 Caseína α 2

Es la más hidrófila de todas las caseínas, debido a que es la más fosforilada (10-13 residuos fosfoseril/mol) y la más rica en residuos catiónicos. La secuencia completa de aminoácidos consiste de 207 residuos, resultando con un peso molecular aproximado de 24,350 Da (Cheftel, 1989).

3.4 Caseína β

Es la caseína más hidrófoba y constituye aproximadamente el 30-35% del total de las caseínas. La β caseína A1-5P es una cadena polipeptídica individual con 209 residuos y con un peso molecular aproximado de 23,982 Da. Se conocen 7 variantes genéticas: A1, A2, A3, B, C, D y E (Cheftel, 1989).

3.5 Caseína κ

Constituye aproximadamente el 15 % del total de las caseínas, y es la única caseína que contiene cisteína. La principal κ caseína B-1P, consiste de 169 residuos de aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 19,023 Da. La κ caseína se presenta en forma polimérica, vía enlaces disulfuro (Wong et al., 1996).

3.6 Proteínas del suero lácteo

La glándula mamaria sintetiza las dos proteínas principales del lactosuero: la β -lactoglobulina y la α -lactoalbúmina, que contrariamente a las caseínas, no sufren modificaciones post-traduccionales, aunque poseen sitios potenciales de fosforilación. Su composición en aminoácidos es muy diferente de las caseínas: contienen menos ácido glutámico y prolina, pero son más ricas en los aminoácidos azufrados metionina y cisteína (Cheftel, 1989). Las principales propiedades de las proteínas del lactosuero se presentan en el Cuadro 3.

3.7 Fracción de nitrógeno no proteico de la leche

La fracción de nitrógeno no proteico (NNP) representa aproximadamente el 5-6% del nitrógeno total de la leche, como se muestra en el Cuadro 4 (Barbano y Lynch, 1992; Cerbulis y Farrel, 1975; DePeters y Ferguson, 1992), del cual la urea representa aproximadamente el 50 % (Emmons y Kertz, 1992; Harding, 1992).

Cuadro 4. Principales compuestos de la fracción de nitrógeno no proteico de la leche

Compuesto	% aproximado
Urea	48.0
Creatina	8.6
Creatinina	4.1
Ácido úrico	2.7
Ácido orótico	5.2
Ácido hipúrico	1.4
Péptidos	11.0
Amonio	3.1
Aminoácidos	15.1

Adaptado de Harding (1992)

4. FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA LECHE

La producción y composición de la leche se puede ver afectada por factores genéticos y medio ambientales, así como por la edad de los animales, el estado de lactación, el manejo de la ordeña, la salud de las vacas y la alimentación (DePeters y Cant, 1992; Troncoso, 1997). De todos estos elementos, dos pueden ser manejados en la práctica: la selección genética y/o el cambio de raza del ganado y la manipulación de la alimentación del ganado (Troncoso, 1997). A continuación se describe cada uno de estos factores, haciendo énfasis en la influencia que pueden tener sobre la fracción nitrogenada de la leche, y en particular, la caseína.

4.1 Factores Genéticos

La evidencia de variación genética en la composición de la leche puede ser dividida en tres fuentes: las diferencias por raza, por la ascendencia y las diferencias existentes entre individuos.

4.1.1 Raza

Existen diferencias importantes en la aptitud lechera (producción y composición de la leche) de las vacas pertenecientes a diferentes razas. Investigaciones realizadas en la Universidad de Pennsylvania, en conjunto con Asociaciones DHIA (por sus siglas en inglés, Dairy Herd Improvement Association) han mostrado resultados de la producción y composición de la leche de cada una de las principales razas lecheras (Cuadro 5). Resultados similares se encontraron en el área geográfica de Manitoba, Canadá (Cuadro 6), en un estudio llevado a cabo por un período de dos años, en donde además se monitoreó el porcentaje de caseína, las proteínas del suero y la lactosa (Jeness, 1985). Puede apreciarse claramente que la raza Holstein es la que presenta el menor porcentaje de los diferentes componentes de la leche, pero también es la que mayor producción tiene y cuyo precio/litro, es el más elevado.

Cuadro 5. Valores promedio por raza estimados a través de asociaciones DHIA

Raza	Leche lbs/día	Grasa %	Proteína %	SNG %	Precio USD /lb
Ayrshire	50.5	3.95	3.41	8.87	\$ 7.375
Holstein	64.4	3.74	3.27	8.80	\$ 9.034
Jersey	43.6	4.82	3.77	9.34	\$ 7.243
Brown Swiss	52.5	4.05	3.56	9.11	\$ 7.903
Guernsey	44.6	4.71	3.61	9.15	\$ 7.197

Fuente: University of Pennsylvania, Center for Animal Health and Productivity

(http://cahpwww.nbc.upenn.edu/mun/milk_protein.html, 2000)

SNG: Sólidos no grasos,

lbs/día: libras por día,

USD/lb: dólares por libra

Cuadro 6. Composición de leche de cinco razas lecheras en la región de Manitoba, Canadá

Raza	Sólidos totales, %	Grasa %	Caseína %	Proteína del suero, %	Lactosa %
Ayrshire	12.69	3.97	2.68	0.60	4.63
Holstein	11.91	3.56	2.49	0.53	4.61
Jersey	14.15	4.97	3.02	0.63	4.70
Brown Swiss	12.69	3.80	2.63	0.55	4.80
Guernsey	13.69	4.58	2.88	0.61	4.78

Adaptado de Reinart y Nesbitt (1956)

4.1.2 Ascendencia y diferencias entre individuos

Entre vacas de una misma raza sometidas a las mismas condiciones de manejo y alimentación, pueden existir diferencias significativas en cuanto a la composición de la leche. La misma observación puede hacerse en lo que se refiere a la cantidad de leche producida. Esto se debe principalmente a la genética que posee cada individuo, lo que puede mejorar su carácter lechero. La herencia es considerable para la materia nitrogenada y grasa (0.4-0.5), mientras que para la producción de leche (0.2-0.3), tiene menor influencia (Alaís, 1988; Dildey, 1989). En estudios referentes a la selección genética, se utiliza actualmente la prueba de descendencia (o "progeny test"), que consiste en la selección del reproductor según las aptitudes de sus hijos. La inseminación artificial permite la difusión del semen de los toros de alta calidad y por lo tanto, mejorar la aptitud lechera del ganado (Alaís, 1988).

En décadas anteriores, los esfuerzos de selección se centraban principalmente en la materia grasa de la leche. Actualmente, el interés gira en torno al contenido de proteína. Se ha llegado, por lo tanto, a una selección de los reproductores en función de la relación proteína/materia grasa. Con respecto a la fracción proteica de la leche, se sabe desde hace mucho tiempo que las proteínas de la leche exhiben variantes genéticas (Dyson et al., 1970). Las variantes genéticas se deben a modificaciones en el código genético, que a su vez producen cambios en la composición de aminoácidos y en la estructura de la proteína, resultando una nueva variante.

La diferencia entre las variantes genéticas está usualmente limitada a cambios en la composición de 1 ó 2 aminoácidos; también pueden ser debidos a la pérdida de varios aminoácidos o como resultado de modificaciones postraduccionales semejantes a la fosforilación y glicosilación (Matthews, 1998). La importancia que representan las variantes genéticas de las proteínas de la leche se basa en que algunas de ellas se han asociado con un mayor contenido de caseína total en la leche, tal es el caso de la variante BB de β -lactoglobulina y κ caseína (Mackle et al., 1999; Van Eenennaam y Medrano, 1991). Con base en lo anterior, puede pensarse que las variantes genéticas de las proteínas de la leche se proyectan a mediano plazo como un factor de selección del ganado lechero.

4.2 Factores ambientales

Variaciones estacionales en la composición de la leche son observadas generalmente en regiones cálidas. En verano, el contenido de grasa en promedio puede ser 0.4 % menor que en invierno, y para la proteína, 0.2% menor (Jenness, 1985). La variabilidad estacional de las concentraciones de grasa y proteína es el resultado del impacto de la temperatura ambiental. Cuando la temperatura se eleva más de 25°C, existe una disminución en la ingesta de alimento, lo que repercute directamente en la producción y composición de la leche (Chalupa y Galligan, 1989).

El efecto de la temperatura, más frecuentemente medido como efecto estacional sobre la fracción nitrogenada de la leche es difícil de describir, debido a que contiene los efectos confundidos del estado de lactación y de la nutrición. Sin embargo, se tienen referencias en donde de manera general se observa que a mayor temperatura existe un decremento del contenido de proteína total, así como la estabilidad de la cuajada producida con esta leche (DePeters y Cant, 1992; Szijarto et al., 1973). Resultados semejantes informaron Ng-Kwai-Hang et al. (1982) en un estudio efectuado durante casi dos años en 63 establos pertenecientes a la asociación DHIA de Quebec, tanto en el % de proteína, como en la proporción de caseína/proteína de la leche.

4.3 Ciclo y Período de Lactación

El ciclo de lactación se inicia después del parto y finaliza con el secado de la vaca (después de 10 meses, por lo general). La etapa de lactación se refiere al número de días que tiene la vaca en el ciclo de lactación, tomando como referencia el día del parto. Ambos factores son importantes porque la producción diaria de la leche y de sus principales componentes (lactosa, grasa y proteína), no evolucionan de la misma manera en el curso de la lactación.

En la Figura 1 se muestra el tipo de curva que sigue la producción de leche durante el ciclo de lactación. Generalmente, tras alcanzar el máximo de producción, que se sitúa después del segundo mes posparto, existe un decremento gradual de la producción. La nueva gestación tiene un efecto de reducción que se presenta alrededor del octavo mes (Alaís, 1988).

En referencia a la producción de los principales componentes de la leche, la curva de producción de la lactosa presenta un incremento rápido en el curso del primer mes, posteriormente permanece regularmente constante a lo largo de la lactación; mientras que las curvas de producción para grasa y proteína son diferentes, tal como se aprecia en la Figura 2. La concentración de grasa y proteína decrece rápidamente durante el primer mes y vuelve a remontarse a partir del quinto mes, cuando la producción láctea comienza a decrecer.

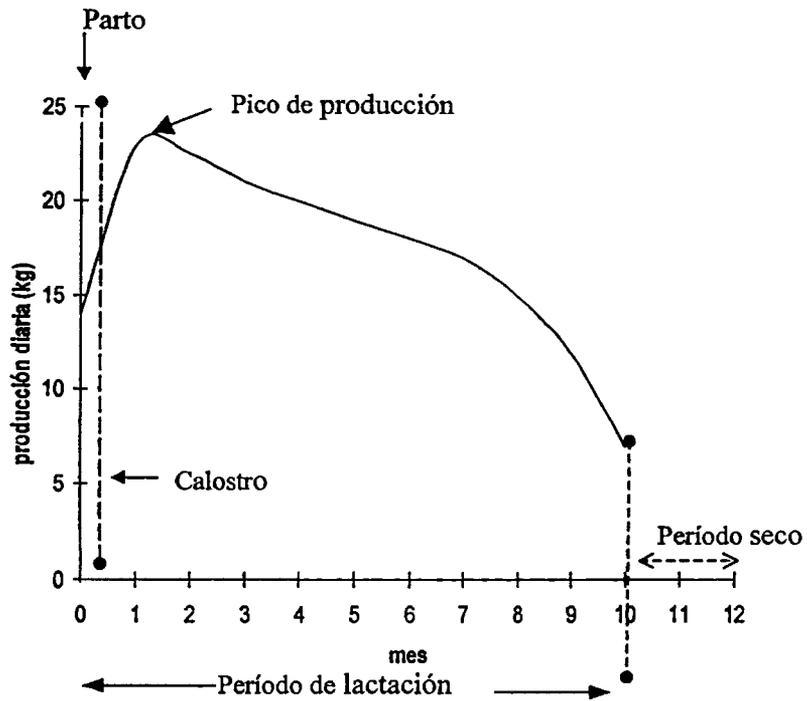


Figura 1. Curva de lactación
Adaptado de Alais (1988)

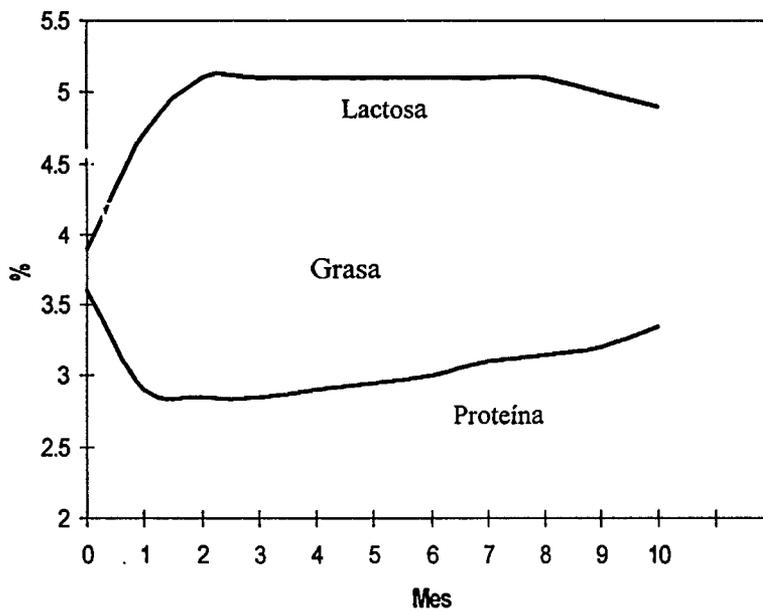


Figura 2. Evolución de la composición de la leche en el curso de la lactación
Adaptado de Alais (1988)

4.4 Salud (Mastitis)

La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria debida a un traumatismo o presencia de microorganismos infecciosos en el tejido de la ubre. La infección puede ser clínica o subclínica, dependiendo del grado de inflamación de la glándula. La gravedad de la inflamación se puede diagnosticar a través del número de células somáticas, que son un indicador de la intensidad de la respuesta inmune del organismo; las células somáticas son en su mayoría leucocitos (98-99%), y en menor proporción, células epiteliales (1-2 %). El número de células somáticas presentes en la leche de una ubre saludable, varía de 50,000 a 250,000 células/mL, dependiendo de la edad de la vaca (Philpot y Nickerson, 1991; Urech, et al., 1999). Para unificar criterios y hacer más fácil el uso de este parámetro, la DHIA de los Estados Unidos decidió crear una categorización empleada actualmente en varios países del mundo. Consta de 10 categorías que van del 0 al 9, y es nombrada comúnmente como Escala Lineal. En el Cuadro 7 pueden apreciarse los intervalos de células somáticas que comprende cada categoría de la Escala Lineal (Philpot y Nickerson, 1991).

Cuadro 7. Escala Lineal de células somáticas

Escala Lineal	Número de células somáticas (miles/mL)	
	Punto medio	Intervalo
0	12,500	0 a 17,000
1	25,000	18,000 a 34,000
2	50,000	35,000 a 70,000
3	100,000	71,000 a 140,000
4	200,000	141,000 a 282,000
5	400,000	283,000 a 565,000
6	800,000	566,000 a 1,130,000
7	1,600,000	1,131,000 a 2,262,000
8	3,200,000	2,263,000 a 4,525,000
9		más de 4,525,000

Adaptado de Philpot y Nickerson (1991)

La mastitis es una de las enfermedades más importantes y costosas del ganado lechero. Esto se debe a que afecta negativamente la producción láctea, así como su composición; lo cual acarrea serias pérdidas económicas tanto al sector ganadero como al industrial. Se han realizado numerosos estudios en donde se ha demostrado que a mayor número de células somáticas, la producción de leche disminuye significativamente (Jones et al., 1984; Ng-Kwai-Hang et al., 1984; Raubertas y Shook, 1982) produciéndose pérdidas en producción de 5-8 % en leche con menos de 400,000 células somáticas, hasta un 19-25 % en leche con más de 1,300,000 células somáticas (Philpot y Nickerson, 1991).

De igual forma, la mastitis presenta una gran influencia sobre la composición de la leche. En el Cuadro 8 puede apreciarse de forma general que el efecto de la mastitis sobre la composición de la leche es el disminuir los componentes más importantes e incrementar aquellos compuestos cuya presencia resulta indeseable.

Cuadro 8. Efecto de la mastitis sobre la composición de la leche

Componente	Efecto producido
Lactosa	Decremento
Proteína total	Decremento
Caseína	Decremento
Inmunoglobulinas	Incremento
Sólidos no grasos	Decremento
Sólidos totales	Decremento
Grasa	Decremento
Lipasa	Incremento

Adaptado de Philpot y Nickerson (1991)

Uno de los cambios más importantes debidos a la mastitis se presenta en la fracción proteica de la leche. Estudios en este rubro han demostrado que existe una relación inversa entre el número de células somáticas y la cantidad de caseína; es decir, que a mayor número de células somáticas, hay un decremento de la caseína total presente en la leche (Haenlein

et al., 1973; Verdi et al.,1987); lo cual afecta a la industria quesera al disminuir el rendimiento del queso (Barbano et al., 1991). Esto se debe a que la leche proveniente de vacas con mastitis clínica o subclínica exhibe una gran actividad proteolítica, lo cual se traduce en una proteólisis de α_s y β caseína, con la consecuente disminución de éstas y un incremento de la γ caseína, producto de la proteólisis de las dos anteriores (Urech et al., 1999; Verdi et al., 1987).

4.5 Alimentación

El uso eficiente de los alimentos para una óptima producción y composición de la leche a partir de vacas saludables, es uno de los objetivos principales de la ganadería lechera; de aquí que el contar con raciones bien balanceadas a lo largo del ciclo de lactación sea una base fundamental para lograr lo anterior.

De manera muy general, los nutrimentos suministrados a una vaca lechera son los siguientes:

- Agua
- Carbohidratos estructurales (fibra) y no estructurales (almidón, azúcares)
- Grasa
- Proteína Cruda (PCA)
 - proteína degradable (PDR)
 - proteína de sobrepaso (PNDR)
 - proteína soluble (PSA)
- Vitaminas y Minerales

Aunque las proporciones de algunos nutrimentos varían conforme a la producción y período de lactancia en el que se encuentran los animales, en el Cuadro 9 se presentan las recomendaciones generales para la alimentación del ganado lechero. Cada uno de ellos cumple con una función determinada en el metabolismo del rumiante para su mantenimiento, desarrollo, reproducción y producción. Hablando específicamente del aspecto productivo, en el Cuadro 10 se presenta la transformación que sufre cada uno de los nutrimentos proporcionados en la dieta, hasta llegar a formar parte de la composición de la leche (Van

Cuadro 9. Recomendaciones generales para la alimentación del ganado lechero basadas en las Tablas del NRC 1989

Nutrimento	Días en lactación		
	22-80	81-200	> 200
Proteína cruda (FCA), % MS	18	16	14
* proteína degradable (PDR) % de PCA	62	64	68
* proteína no degradable (PNDR) % de PCA	38	36	32
* proteína soluble (PSA) % de PCA	31	32	34
Grasa, % MS	5.5	5.0	3.0
Carbohidratos, % MS			
* Carbohidratos no estructurales (CNE)	38	36	34
* carbohidratos estructurales (fibra)			
- fibra ácido detergente (FAD)	19	21	24
- fibra neutro detergente (FND)	28	30	32
Vitaminas, UI/día			
* Vitamina A	100,000	50,000	50,000
* Vitamina D	25,000	20,000	20,000
* Vitamina E	800	600	400
Minerales, % MS			
* Calcio	0.90	0.70	0.60
* Fósforo	0.40	0.36	0.32
* Magnesio	0.30	0.25	0.20
* Potasio	1.00	0.90	0.90
* Sodio	0.30	0.20	0.20

% MS: porcentaje de materia seca

UI/día: unidades internacionales/día

Hutjens, 2004

Cuadro 10. Transformación de los nutrientes del alimento a los componentes de la leche

Nutriente	Alimento	Rumen	Intestino Delgado	Componente de la leche
Carbohidratos				
Celulosa	Forrajes	Ácido acético	-	Grasa
Hemicelulosa	Forrajes	Ácido acético	-	Grasa
Pectinas	Pulpa de cítricos	Ácido propiónico	-	Lactosa
Almidón				
-degradable en rumen-	Ensilado de maíz	Ácido propiónico	-	Lactosa
	Granos	Ácido propiónico	-	Lactosa
	Productos de papa	Ácido propiónico	-	Lactosa
-de sobrepaso-	Ensilado de maíz	-	Glucosa	Lactosa
	Ensilado de mazorca	-		
Azúcares	Forrajes	Ácido butírico	-	Grasa
	Remolacha de forrajes	Ácido propiónico	-	Lactosa
	Remolacha de azúcar	Ácido propiónico	-	Lactosa
Proteína				
-degradable en rumen-	Ensilado de pasto	Proteína microbiana, NH ₃	Aminoácidos	Proteína
	Soya	Proteína microbiana, NH ₃	Aminoácidos	Proteína
	Granos de malta	Proteína microbiana, NH ₃	Aminoácidos	Proteína
-de sobrepaso-	Soya integral	-	Aminoácidos	Proteína
	Granos de malta	-	Aminoácidos	Proteína
Grasa	Concentrados	-	Ácidos grasos	Grasa
			Glicéridos	Grasa

Adaptado de Van Duinkerken (1998)

Duinkerken, 1998). Las transformaciones principales se llevan a cabo en el rumen de la vaca, el cual es uno de los cuatro compartimentos del tubo digestivo de un rumiante. El rumen es un ecosistema abierto y continuo, que actúa como una cámara de fermentación predominantemente anaeróbica. Su temperatura es aproximadamente de 39-40°C, y el pH varía de 5.5 a 7.0. Se encuentra poblado de una gran cantidad de bacterias y protozoarios, y en menor proporción, hongos y levaduras; cuya presencia resulta indispensable en los rumiantes para degradar la mayoría de los nutrientes proporcionados (Yokoyama y Johnson, 1988); aquellos nutrientes que escapan a esta acción y se degradan hasta el intestino delgado, son llamados alimentos de sobrepaso (Chalupa, 1974).

4.6 Relación de la proteína de la dieta, el NUL y la producción de la leche

La alimentación tiene un efecto significativo en la producción de la leche. Diversos estudios demuestran que la producción de la leche se incrementa proporcionalmente con la cantidad de proteína cruda de la ración (Clay y Satter, 1979; Cressman et al., 1980; Chalupa, 1984; Holter et al., 1982; Leng y Nolan, 1984); sin embargo, existe un punto en el cual ya no se incrementa más la producción de leche y la relación puede volverse inversa (Chalupa, 1984; Ha y Kenelly, 1984). Esto puede deberse a un decremento de la energía disponible para la producción de leche; justificado por el metabolismo desarrollado para eliminar el exceso de nitrógeno en forma de urea (Chalupa, 1984; Oldham, 1984; <http://www.dhia.psu.edu/mun.htm>).

Este decremento de energía puede explicarse de la siguiente manera: las raciones altas en proteína cruda/proteína soluble, o bajas en carbohidratos fermentables, incrementan la concentración de amoníaco a nivel ruminal; amoníaco utilizado por los microorganismos para la síntesis de la proteína microbiana. Cuando la concentración de amoníaco ruminal excede esta capacidad, el amoníaco se absorbe a través de la pared ruminal, es transportado en el torrente sanguíneo y en el hígado es convertido a urea (Van Soest, 1994); la urea se equilibra posteriormente en los diferentes líquidos corporales como saliva, sangre y leche (Harris, 1996). El amoníaco también puede originarse cuando la proteína corporal o los aminoácidos absorbidos intestinalmente son catabolizados en el hígado (Harris, 1996).

Dado que la conversión de amoníaco a urea requiere de un gran aporte de energía (cada 100

gramos de proteína cruda no utilizada tiene un costo para una vaca lechera de 0.2 megacalorías), puede ocasionar que disminuya la energía disponible para la síntesis de la leche, (Moore y Varga, 1996; Hernández, 1998).

Después de una gran cantidad de estudios efectuados (Baker et al., 1995; Hutjens y Barmore, 1995; Hof et al., 1997; Shepers y Meijer, 1998; Trevaskis y Fulkerson, 1999), prácticamente se ha concluido que la concentración de urea en la leche puede utilizarse como un indicador confiable del balance proteico y energético de las raciones proporcionadas al ganado lechero. En el Cuadro 11 se resume la relación existente entre la concentración de NUL y el porcentaje de proteína de la leche respecto a la dieta suministrada.

Cuadro 11 Valores de nitrógeno ureico y su relación con la proteína de la leche

Proteína láctea (PCL), %	NUL, bajo (< 12 mg/dl)	NUL, óptimo (12-18 mg/dl)	NUL, alto (> 18 mg/dl)
Abajo de 3	Deficiencia de proteína Deficiente PDR o PSA	Deficiencia de proteína Deficiencia de carbohidratos en el rumen Deficiencia de aminoácidos	Exceso de proteína Exceso PDR o PSA Deficiencia de carbohidratos en el rumen Desbalance de aminoácidos
Arriba de 3.2	Aminoácidos adecuados Deficiente PDR o PSA Exceso de carbohidratos en rumen	Aminoácidos balanceados Carbohidratos balanceados en el rumen	Exceso de PDR o PSA Deficiencia de carbohidratos en el rumen

Adaptado de Hutjens y Barmore (1995)

NUL: Nitrógeno ureico lácteo; PDR: Proteína degradable; PSA: Proteína soluble;

Dependiendo de las concentraciones de NUL, así como del porcentaje de PCL serán las recomendaciones para el balance de la dieta del ganado lechero. Además de involucrar la con-

centración de PCA, también influyen las proporciones de PDR y PSA del alimento. La PDR se define como la parte de la proteína proporcionada en la dieta que es digerida por las bacterias en el rumen; por lógica, la PNDR o también llamada proteína no degradable en rumen o de sobrepaso, es aquella fracción de proteína que sobrepasa el rumen sin cambios y puede ser digerida en el intestino delgado (Stevenson, 1995). La PSA por otra parte, son aquellas que se solubilizan en el líquido ruminal y son más rápidamente y completamente degradadas que aquellas que son insolubles (Chalupa, 1984).

4.7 Relación de la proteína de la dieta, el NUL y la proteína de la leche

El aumentar la proteína del alimento por encima de las necesidades del animal, incrementa el nitrógeno de la leche, pero no mejora grandemente el contenido de proteína verdadera (Paimquist, 1995). De manera análoga que para el caso de la producción de la leche, se especula que se tiene menos energía disponible para la síntesis de los componentes de la leche; tal es el caso de la proteína.

Aunque no existe mucha información al respecto, algunos estudios efectuados han encontrado que no existe relación entre la proteína de la dieta y la proteína de la leche (De Peters y Ferguson, 1992; Jaquette et al., 1986); pero sí se ha observado un incremento en la fracción de nitrógeno no proteico (DePeters y Cant, 1992). Otras investigaciones encontraron una relación positiva entre la proteína de la leche y la proteína cruda de la ración (Emery, 1978); o con aminoácidos limitantes, como la lisina. También existen estudios en donde se ha obtenido una relación negativa entre la proteína de la leche y proteína de la dieta en exceso; en donde se ha concluido que conforme se incrementa la proteína cruda de la ración, el metabolismo del animal se vuelve ineficiente para convertir la proteína del alimento a proteína láctea (Cressman et al., 1980; Ha y Kenelly, 1984).

De esta revisión se puede sugerir que no existe una relación clara entre la proteína de la dieta y la proteína láctea. Una alternativa para monitorear la eficiencia de síntesis de la proteína de la leche, podría ser la cuantificación de urea en la leche, expresada como nitrógeno ureico (NUL). Como se mencionó anteriormente, la concentración de NUL puede utilizarse como un indicador del balance de las raciones proporcionadas al ganado, y por lo tanto, como un indicador indirecto de la proteína y la energía suministrada en la dieta.

Godden et al. (2001b) encontraron una asociación no lineal negativa significativa entre el nitrógeno ureico lácteo y los porcentajes de grasa y proteína total de la leche; pero dado que hasta el momento no se ha generado información suficiente de este parámetro, resulta importante el investigar el comportamiento de la composición y producción de leche con respecto a NUL.

5. CUANTIFICACIÓN DEL NITRÓGENO UREICO EN LA LECHE (NUL)

El nitrógeno ureico se define como el nitrógeno proveniente de la molécula de urea [NUL = 0.4667 X (Urea)], que constituye aproximadamente el 50 % de la fracción de nitrógeno no proteico de la leche (Emmons y Kertz, 1992; Harding, 1992). El NUL es medido rutinariamente en algunos laboratorios para evaluar la utilización del nitrógeno en particular y la dieta en general, proporcionada al ganado lechero (Jenkins et al., 2000). Existen varios métodos para su cuantificación y a continuación se describen los más utilizados.

5.1 Métodos de cuantificación del NUL

5.1.1 Método de cuantificación de NUL basado en la presión generada por el CO₂

El método se basa en la hidrólisis enzimática de la urea, a través de la cual se generan iones carbonato y amonio. Posteriormente se provoca un descenso del pH hasta generar dióxido de carbono (CO₂), mediante el cual se producen cambios de presión y que se relacionan directamente con la concentración de urea presente en la muestra a través de la siguiente ecuación:

$$\Delta P = \left[\frac{K_p R T V_f}{K_p V_g + R T [H_2O] V_f} \right] [\text{Urea}]$$

Donde:

ΔP = Cambio de presión

K_p = Constante de la ley de Henry

R = Constante universal de los gases

T = Temperatura absoluta

V_f = Volumen del líquido

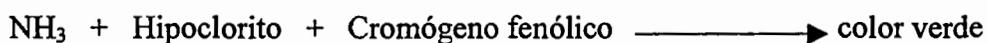
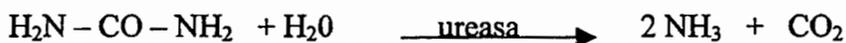
V_g = Volumen del gas

El método es confiable para la cuantificación del NUL, con una exactitud de ± 0.7 mg/dL en un intervalo de 0 a 30 mg/dL (Jenkins et al., 2000). Además, se ha demostrado que en este método no existe interferencia de la grasa láctea en la cuantificación del NUL, y el efecto de la proteína y lactosa de la leche es mínimo; menos del 2 % de cambio en la sensibilidad por cambio en peso/volumen en porcentaje (Jenkins et al., 1999).

5.1.2 Métodos colorimétricos

- Método del 1-4 paradimetil amino benzaldehído
- Método de diacetil monoxima
- Método de Berthelot

Los métodos más utilizados para la cuantificación del NUL son los colorimétricos. Algunos métodos son directos, basados en la medición de un complejo formado entre la urea y un reactivo específico; otros son métodos indirectos, basados en la medición de un producto derivado de la degradación de la urea (métodos enzimáticos). El método de Berthelot (uno de los dos métodos utilizados en el presente estudio para cuantificar NUL) se basa en una reacción enzimática, mediante la cual se libera amoníaco y CO_2 a partir de la molécula de urea. El amoníaco liberado se hace reaccionar con hipoclorito y un reactivo cromógeno fenólico (fenol-nitroprusiato de sodio) que produce un color verde. La absorbencia se detecta a una longitud de onda de 578 nm (570-620 nm), la cual es directamente proporcional a la concentración de urea en la muestra. Las reacciones efectuadas son las siguientes: (Bayer, 1996; [http://accurex biomedical.com/turea/htm](http://accurex_biomedical.com/turea/htm)):



La cuantificación del NUL a partir de los métodos químicos generan resultados de gran exactitud y precisión, debido a ello, recientemente se han desarrollado equipos automatizados para la cuantificación de NUL basados en el método de Berthelot, realizando una modificación a la reacción para mejorar la sensibilidad del método. Los resultados obteni-

dos con estos equipos son muy confiables, presentando desviaciones estándar menores a 0.5 y coeficientes de variación menores a 2 % en la exactitud. Para la precisión se tienen desviaciones estándar menores a 0.25 y coeficientes de variación menores a 2% al compararse con un método enzimático de referencia (<http://Bentleyinstruments.com>).

5.1.3 Espectrometría de Infrarrojo (EIR)

En la década de los 1970's se desarrollaron equipos automatizados basados en espectrometría de IR para estimar la concentración de grasa, proteína, lactosa y sólidos no grasos en la leche. Debido a que muestras individuales de las vacas son colectadas rutinariamente por las asociaciones DHIA, el uso de la tecnología de EIR ofreció un medio rápido y de bajo costo para medir los componentes de la leche. Los equipos con esta tecnología emplean la espectroscopía de infrarrojo medio con absorción específica por medio de un sistema óptico de haz único con filtros IR específicos (ver Figura 3). Por lo tanto, el análisis de la leche por medio del EIR se basa en la absorción de energía IR a longitudes de onda específicas de cada uno de los grupos funcionales de los diferentes compuestos de interés. Por ejemplo, los grupos carbonilo en los grupos funcionales éster de las moléculas de grasa se detectan a 3.48 nm y 5.723 nm, los enlaces peptídicos entre los aminoácidos de las moléculas de proteína se detectan a 6.465 nm y los grupos hidroxilo de la molécula de la lactosa a 9.610 nm (AOAC, 1997; Marshall, 1993).

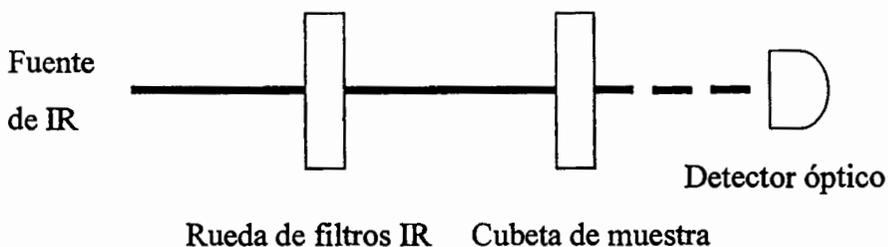


Figura 3. Sistema óptico de haz único con filtros IR específicos

En la década de los 1990's se inició la medición del NUL mediante la tecnología de EIR (Faust y Kilmer, 1996). Sin embargo, la longitud de onda a la cual se detectan los grupos funcionales del NUL, también detecta los grupos funcionales de otros componentes de la

leche, como la grasa, la proteína, la lactosa, y los citratos (Godden et al., 2000). Esto resulta en una menor exactitud y precisión en la cuantificación del NUL por EIR, demostrándose que el análisis por EIR puede subestimar o sobrestimar las concentraciones de NUL (Young, 2001). Debido a que la concentración de cada grupo de compuestos que crean interferencia en la medición del NUL varía entre vacas, el análisis por EIR puede hacer estimaciones diferentes de su concentración real. Por lo anterior, se ha recomendado interpretar los resultados de forma agrupada, con un mínimo de 8 ó 10 vacas (Broderick y Clayton, 1997; Shepers y Meijer, 1998, <http://www.inform.umd.edu/ManureNet/MUN/MUNsamp.htm>).

5.1.4 Método estándar para cuantificar NUL

El método estándar internacional de referencia para cuantificar NUL es el método diferencial de pH; basado en el mismo principio que el método del Eurochem CL, aprobado por la Federación Internacional de la Leche (IDF) como método de referencia para cuantificar NUL. Ambos métodos son superiores en exactitud y precisión al análisis del NUL efectuado por EIR (Young., 2001; <http://www.dhia.org/mundata.htm>).

IV. JUSTIFICACIÓN

Al ser la concentración de nitrógeno ureico en leche (NUL) un indicador fácil de medir y confiable del balance de la dieta proporcionada al ganado lechero, resulta de sumo interés el evaluar la relación del NUL con respecto a la dieta (proteína cruda y proteína soluble del alimento), y a la proteína de la leche, específicamente la caseína.

V. HIPÓTESIS

La concentración de proteína soluble y cruda de la dieta afecta la concentración de nitrógeno ureico y afecta la concentración de la proteína cruda y la caseína de la leche.

VI. OBJETIVOS

1. Objetivo General

Evaluar el efecto de la proteína soluble y cruda de la dieta sobre la concentración de NUL y su relación con la concentración de la proteína cruda y la caseína de la leche.

2. Objetivos Específicos

2.1 Estimar la relación entre la proteína de la dieta (soluble y cruda) y la concentración de NUL en vacas de primer parto en establos lecheros comerciales.

2.2 Evaluar la relación entre la concentración de NUL y la concentración de la proteína cruda, la caseína total y las caseínas α y β de la leche, en vacas de primer parto en los establos en estudio.

2.3 Determinar el porcentaje de variación de la estimación de NUL mediante Espectrometría de Infrarrojo con respecto al método enzimático de Berthelot.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. MATERIALES

1. MATERIAL QUÍMICO

Caseína y caseínas α y β (Sigma Chemical Co.). Los reactivos utilizados en la electroforesis fueron los siguientes: acrilamida, bisacrilamida, persulfato de amonio, TEMED, urea, azul Commassie R-250 y G-250, Tris, glicina, azul de bromofenol y estándares de peso molecular fueron grado electroforesis (BIORAD). El conservador adicionado a la leche fue el bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3 diol) (D&F, Control Systems, San Ramon, Ca). Estándares de leche adquiridos en DQCI Services, Inc. (Mounds View, MN). Las sales y reactivos restantes utilizados, fueron grado reactivo de la marca Baker.

2. MATERIAL BIOLÓGICO

Leche: recolectada en un muestreo único durante la estación de invierno (2000-2001). El volumen de cada muestra fue de 40 mL. Las muestras fueron conservadas en viales de plástico a 4°C hasta su análisis; en un plazo no mayor a 48 horas.

Alimento de ganado lechero: simultáneamente a la reccección de las muestras de leche, fueron recolectadas dos muestras representativas del alimento en cada establo.

B. MÉTODOS

1. SELECCIÓN DE ESTABLOS

Con información proporcionada por la Asociación Holstein de México, se seleccionaron seis establos con población mayor a 250 vacas en línea y con antecedentes que mostraban la existencia de diferentes concentraciones de NUL, así como un bajo número de células somáticas. Se consideraron tres intervalos de valores de NUL, los cuales fueron identificados de la siguiente manera: bajo, vacas cuyo historial indicaba valores de NUL menores a 12 mg/dL; medio, vacas cuyo historial indicaba valores de NUL entre 12.1 a 17.9 mg/dL y alto, vacas cuyo historial indicaba valores de NUL mayores a 18 mg/dL (Hutjens y Barmore, 1995).

La selección de establos se realizó para tratar de asegurar hasta donde fuese posible, el trabajar con unidades en donde la mayoría de las vacas presentara un bajo número de células somáticas y también en donde existiesen vacas con los diferentes intervalos de concentración de NUL. Se eligieron vacas de primera lactancia para trabajar con un grupo de animales de edad similar.

En la primer etapa de la selección de los establos, se revisó la información de los seis meses previos al estudio de 20 establos del estado de Querétaro, 28 establos del estado de Guanajuato y cinco establos del estado de Aguascalientes. Para el caso del nitrógeno ureico, se trabajó con los resultados promedio de los seis meses analizados y se seleccionaron aquellos establos con la menor variabilidad y cuyo promedio estuviese en el intervalo de 12 a 18 mg/dL de NUL. En el caso del indicador células somáticas, se seleccionaron los establos con niveles promedio de células somáticas menor a 282,000 células/mL. Aunado a lo anterior, se tomó en cuenta el porcentaje de vacas pertenecientes a cada nivel de células somáticas (categorización empleada en la Asociación Holstein de México): bajo ($\leq 282,000$), medio (283,000 a 1,130,000) y alto ($\geq 1,131,000$). En el Cuadro 12 se presentan los doce establos que fueron seleccionados después de este proceso.

En la segunda etapa de la selección, se determinó el porcentaje de vacas pertenecientes a cada nivel de NUL de los cuatro meses previos al estudio. De los 12 establos de la primer etapa, resultaron seleccionados seis, dos por cada estado (Cuadro 13) correspondientes a los establos 3, 5, 6, 7, 11 y 12 del Cuadro 12, asegurando que existieran animales en cada uno de los tres niveles de NUL.

Finalmente, en la tercera y última etapa se revisó la información de los últimos dos meses del listado de las vacas pertenecientes a cada establo. Se seleccionaron para cada establo 12 vacas para cada nivel de NUL (con un valor constante de NUL en los dos meses) y con un bajo número de células somáticas. Con lo anterior, se obtuvo un total de 216 vacas; 36 para cada establo.

Cuadro 12. Porcentaje de vacas en el establo de cada nivel de células somáticas después de la primer etapa de selección

Establo	Estado ¹	Vacas en línea	NUL (mg/dL) Promedio	% de vacas del hato ²		
				Bajo ³	Medio ⁴	Alto ⁵
1	Q	685	17.6 ± 3.5	84	13	3
2	Q	715	18.5 ± 4.1	80	15	5
3	Q	876	17.7 ± 2.3	64	24	12
4	Q	453	18.4 ± 3.2	67	21	12
5	Q	311	14.7 ± 1.9	73	20	7
6	G	442	18.0 ± 2.5	78	17	5
7	G	253	17.9 ± 2.2	80	15	5
8	G	576	19.0 ± 3.5	78	17	5
9	G	557	18.3 ± 3.0	71	22	7
10	G	429	15.2 ± 3.1	77	16	7
11	A	293	16.7 ± 3.1	60	28	12
12	A	747	14.9 ± 2.3	73	19	8

¹ Q: Querétaro, G: Guanajuato, A: Aguascalientes

² Porcentaje de vacas en el establo pertenecientes a cada nivel de células somáticas

³ Bajo: escala lineal 0-4, ⁴ Medio: escala lineal 5-6, ⁵ Alto: escala lineal 7-9

NUL: Nitrógeno ureico en leche

Cuadro 13. Porcentaje de vacas en el establo de cada nivel de NUL después de la segunda etapa de selección.

Establo	mes	NUL (mg/dL) ¹			Establo	mes	NUL (mg/dL) ¹		
		< 13	13.1-17.9	>18			< 13	13.1-17.9	>18
1-Q ²	Abril	9.55	26.97	63.48	2-Q ²	Abril	18.64	35.21	46.73
	Mayo	15.22	25.69	59.09		Mayo	21.94	40.01	38.05
	Junio	32.82	38.22	28.96		Junio	25.97	36.83	45.72
	Julio	39.56	39.95	20.49		Julio	36.83	45.78	17.39
3-G ³	Abril	7.40	20.28	72.32	4-G ³	Abril	12.78	30.83	56.39
	Mayo	18.11	41.76	40.13		Mayo	14.34	35.09	50.57
	Junio	10.23	25.80	63.97		Junio	9.96	35.64	54.40
	Julio	35.70	41.94	22.36		Julio	17.81	36.44	45.75
5-A ⁴	Abril	17.10	29.72	53.18	6-A ⁴	Abril	23.86	50.56	25.28
	Mayo	16.02	21.78	62.20		Mayo	25.48	43.30	31.22
	Junio	24.04	34.45	41.51		Junio	30.98	42.94	26.08
	Julio	24.45	31.52	31.52		Julio	21.98	35.64	42.38

¹ Porcentaje de vacas en cada nivel de nitrógeno ureico en leche (NUL)

² Q: Querétaro

³ G: Guanajuato

⁴ A: Aguascalientes

1.1 Origen del alimento y las muestras de la leche

Se trabajó con vacas de la raza Holstein-Friesian, de las cuales se obtuvieron las muestras de leche. Los animales fueron manejados conforme a las prácticas comunes de cada rancho. El número de animales por establo fue de 36. Fueron seleccionados animales de primer parto, no importando el número de días en leche.

La ubicación de los establos fue la siguiente:

- 2 establos ubicados en el estado de Querétaro
- 2 establos ubicados en el estado de Guanajuato
- 2 establos ubicados en el estado de Aguascalientes

Se obtuvieron muestras de leche de cada uno de los ordeños efectuados en cada establo. Simultáneamente, se tomaron muestras de alimento para los análisis correspondientes. En todos los establos se ofrecía una dieta única a las vacas que se les realizó el muestreo, por lo que se colectaron dos muestras representativas de alimento en cada establo.

1.2 Manejo de las muestras

A la leche se le adicionó el conservador bronopol para evitar la proliferación de microorganismos y se conservaron en refrigeración hasta su análisis.

Las muestras de alimento recolectadas, fueron almacenadas en bolsas de plástico y papel, dependiendo de la humedad de la muestra, y posteriormente, se conservaron en refrigeración hasta que fueron secadas y molidas para analizarse.

2. ANÁLISIS DEL ALIMENTO DEL GANADO

Antes de los análisis correspondientes, las muestras de alimento fueron secadas a una temperatura de 50°C, durante cinco horas en una estufa (Precision, GCA Corporation). Posteriormente se molieron en un molino Thomas-Wiley, modelo 4 de Thomas Scientific, hasta pasar por malla de un mm.

2.1 Determinación de materia seca

Se pesaron dos gramos de muestra en vasos previamente tarados. Las muestras se secaron en una estufa (Precision, GCA Corporation) a una temperatura de 100°C durante cinco horas y

después se dejaron enfriar en un desecador durante dos horas. Posteriormente, las muestras se volvieron a pesar para determinar el peso perdido debido a la humedad (Método 934.01, AOAC 1997).

2.2 Cuantificación de proteína cruda del alimento

La determinación de proteína cruda se realizó por el método de Kjeldahl, con un Analizador Kjeltec Tecator 1035. Brevemente, se pesaron 0.5 g de muestra, a los que se les adicionó 1.9 g de mezcla catalítica, y 10 mL de ácido sulfúrico. La digestión se llevó a cabo a 400°C por tres horas en un Digestor Gerhardt. Las muestras se dejaron enfriar y se destilaron, utilizando HCl 0.1 N como titulante. (Método 984.13, AOAC 1997).

2.3 Determinación de proteína soluble

Se realizó conforme al método modificado de Crooker et al. (1978). Se pesaron 0.1 gramos muestra, a los que se adicionaron 25 mL de la solución reguladora de McDougall (0.13 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 3.68 g Na_2HPO_4 , 0.053 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.57 g KCl, 0.47 g NaCl y 9.8 g $NaHCO_3$, por litro de solución). Se agitaron las muestras durante 60 minutos a 150 rpm y 40°C. Posteriormente fueron filtradas las muestras con papel Whatman # 54. Las muestras recolectadas en el papel filtro se enjuagaron con 10 mL de la solución de Mc Dougall y 10 mL de agua grado HPLC y se les determinó el contenido de proteína cruda, mediante el método de Kjeldahl, con un Analizador Kjeltec Tecator 1035, (Método 984.13, AOAC 1997).

El resultado obtenido, fue el contenido de proteína insoluble en el alimento. Por lo tanto, para obtener el resultado de proteína soluble, se restó el valor anterior al resultado de proteína cruda.

3. ANÁLISIS DE LA LECHE

A las muestras de leche obtenidas en cada ordeño, se les determinó la proteína cruda, el NUL y la caseína. Para el análisis de caseína, se obtuvo una muestra compuesta por vaca, de los ordeños efectuados.

3.1 Cuantificación de proteína cruda y NUL

El análisis de proteína cruda y NUL en leche (expresados en % y mg/dL, respectivamente), se realizó con un equipo Infrarrojo Bentley 2000 (Bentley Instruments Inc) (Marshall, 1993; AOAC, 1997; Godden et al., 2000); el cual se calibró con estándares de leche de conocida composición (DQCI Services, Inc).

3.2 Extracción y cuantificación de la caseína

3.2.1 Extracción de la caseína

Un volumen de 15 mL de leche por muestra fue delipidizado mediante centrifugación (4500 g, 20 minutos a 4°C). La caseína se obtuvo mediante precipitación ácida de la leche delipidizada a pH de 4.3 con HCl 1 N a 4°C (McKenzie, 1971). Se realizó una segunda centrifugación a 4500 g por 15 min a 4°C. El precipitado se disolvió en 15 mL de agua, y se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 1 N. La precipitación ácida, centrifugación y pasos de disolución en agua fueron repetidos. Finalmente, la solución de caseína fue dializada durante 48 hrs a 4°C, en agua desionizada. Las muestras fueron almacenadas en viales de plástico a temperatura de -70°C, hasta su análisis (Van Hekken y Thompson, 1992).

3.2.2 Cuantificación de caseína por Bradford

Se cuantificó el contenido de caseína total de las muestras mediante el método de Bradford, utilizando caseína grado reactivo como estándar (Basch, et al., 1985; Bradford, 1976; Douglas et al., 1981).

La curva de calibración se realizó en el intervalo de concentración de 20 a 200 µg de caseína/mL (Apéndice 1). Para el análisis de las muestras, a 100 µL del extracto de caseína se le adicionaron 900 µL de la solución: 50 mM Tris, 5 M urea, 10 mM 2-mercaptoetanol y 5 mL del reactivo de Bradford (100 mg de azul Coomassie G-250, 50 mL de etanol al 95 % y 100 mL de ácido fosfórico al 85%, diluido a 1 L con agua HPLC). Las muestras fueron mezcladas en un vórtex y se midió su absorbancia a una longitud de onda de 595 nm (Bradford, 1976).

3.2.3 Cuantificación de α y β caseína por electroforesis (UREA-PAGE) y densitometría

Las caseínas fueron identificadas y cuantificadas por electroforesis en geles de poliacrilamida (UREA-PAGE) (Van Hekken y Thompson, 1992; Kim y Jiménez, 1993), utilizando un equipo Hoeffer Scientific, Mighty Small 250.

Las fracciones de caseína fueron separadas bajo las siguientes condiciones: gel de separación, 8 % T (concentración total de los monómeros acrilamida y bisacrilamida), pH 8.9, urea 4 M y gel de alineamiento, 5 % T, pH 6.7, urea 4 M.

La solución reguladora de la cámara del electrodo fue: 6 g de Tris y 28.8 g de glicina por litro, a pH 8.3. Las condiciones de corrida de los geles fueron 15 mA.

Las muestras para analizar por electroforesis se prepararon de la siguiente manera: a 50 μ L del extracto de caseína, se le adicionaron 500 μ L de la siguiente solución: urea 6 M, 100 μ L de azul de bromofenol al 0.1% y 200 μ L de 2-mercaptoetanol (Kim y Jiménez, 1993).

Posteriormente, se inyectaron 10 μ l de las muestras anteriores en cada pozo del gel, 12 μ L de marcadores de peso molecular y 5 μ L de estándar de α y β caseína, respectivamente. Para determinar los pesos moleculares de las caseínas, se utilizaron marcadores de peso molecular, que comprendieron el intervalo de 10 a 250 kDa. Se utilizaron estándares de α y β caseína para su identificación y cuantificación. Los geles fueron revelados con la solución de Azul Coomassie R-250.

Una vez reveladas las bandas de las diferentes caseínas, se determinó su peso molecular y se cuantificaron por densitometría, con equipo y software de Kodak (Scientific Imaging Systems, Eastman Kodak Company).

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el análisis estadístico de los datos, la diferencia entre medias de las mediciones realizadas se efectuó por la prueba de Tukey; se plantearon además, varios modelos lineales de efectos fijos y mixtos para establecer relaciones entre las variables de interés. En primer lugar se plantearon modelos lineales de efectos fijos para establecer la posible relación entre el NUL, la proteína y la caseína de la leche respecto a la proteína de la dieta. Los siguientes modelos lineales de efectos mixtos fueron para determinar si existió relación entre la proteína y caseína de la leche respecto al NUL. Finalmente, se planteó un modelo lineal de efectos mixtos para

determinar si existió relación entre la producción láctea y su composición. Los análisis anteriores fueron realizados con el programa JMP Versión 4.04 (SAS).

4.1 Variables

4.1.1 Variables dependientes o de respuesta

- * NUL
- * Proteína cruda de la leche (PCL)
- * Caseína total
- * Producción de leche

4.1.2 Variables independientes o predictoras

- * Proteína cruda de la dieta (PCA)
- * Proteína soluble de la dieta (PSA)
- * Vaca
- * Establo
- * PCL
- * NUL
- * Grasa láctea
- * Lactosa
- * Días en leche (DEL)

4.2 Modelo de efectos fijos para determinar la relación entre NUL y la dieta.

Las variables independientes fueron PCA y PSA; la variable dependiente fue la concentración de NUL.

Modelo:
$$Y = \beta_0 + \beta_1 PCA + \beta_2 PSA + \varepsilon$$

Donde: Y representa la concentración de NUL (mg/dL)

$\beta_0, \beta_1, \beta_2$ son los parámetros del modelo

PCA es la variable proteína cruda de la dieta (%)

PSA es la variable proteína soluble de la dieta (%) ,

ε es el error aleatorio

4.3 Modelo de efectos fijos para determinar la relación entre la concentración de PCL y la dieta.

Las variables independientes fueron PCA y PSA; la variable dependiente fue la concentración de PCL.

Modelo:
$$Y = \beta_0 + \beta_1\text{PCA} + \beta_2\text{PSA} + \varepsilon$$

Donde: Y representa la concentración de PCL (%)

$\beta_0, \beta_1, \beta_2$ son los parámetros del modelo

PCA es la variable proteína cruda de la dieta

PSA es la variable proteína soluble de la dieta

ε es el error aleatorio

4.4 Modelo de efectos fijos para determinar la relación entre la concentración de caseína y la dieta.

Las variables independientes fueron PCA y PSA; la variable dependiente fue la concentración de caseína.

Modelo:
$$Y = \beta_0 + \beta_1\text{PCA} + \beta_2\text{PSA} + \varepsilon$$

Donde: Y representa la concentración de caseína (g/L)

$\beta_0, \beta_1, \beta_2$ son los parámetros del modelo

PCA es la variable proteína cruda de la dieta

PSA es la variable proteína soluble de la dieta

ε es el error aleatorio

4.5 Modelo de efectos mixtos con un efecto anidado para determinar la relación entre la proteína en la leche y el NUL.

Las variables independientes fueron la concentración de NUL, el establo y la vaca (efecto aleatorio anidado en el establo); la variable dependiente fue la concentración de PCL.

Modelo:
$$Y_{ijk} = \beta_0 + \beta_1 \text{NUL} + \text{ET}_i + \text{V}(\text{ET})_{j(i)} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde: Y_{ijk} representa la concentración de PCL (%)
 β_0, β_1 son los parámetros del modelo
NUL es la variable nitrógeno ureico lácteo (mg/dL)
 ET_i es el efecto del establo ($i = 1, 2, \dots, 6$)
 $\text{V}(\text{ET})_{j(i)}$ es el efecto de la vaca ($j = 1, 2, \dots, 36$) anidada en el establo i .
 ε_{ijk} es el error aleatorio

4.6 Modelo de efectos fijos para determinar la relación entre la caseína de la leche y el NUL.

Las variables independientes fueron las concentraciones de PCL, NUL, el establo y los días en leche (DEL); la variable dependiente fue la concentración de caseína en la leche.

Modelo:
$$Y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 \text{PCL} + \beta_2 \text{NUL} + \beta_3 \text{DEL} + \text{ET}_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde: Y_{ij} representa la concentración de caseína (g/L)
 $\beta_0, \beta_1, \beta_2$ son los parámetros del modelo
PCL es la variable proteína cruda (%)
NUL es la variable nitrógeno ureico (mg/dL)
DEL es la variable días en leche
 ET_i es el efecto del establo ($i = 1, 2, \dots, 6$)
 ε_{ij} es el error aleatorio

4.7 Modelo de efectos mixtos con un efecto anidado para determinar la relación entre la producción de la leche y su composición.

Las variables independientes fueron la concentración de PCL, grasa, lactosa y NUL; la vaca (efecto aleatorio anidado en el establo), el establo y los días en leche; la variable dependiente fue la producción de leche.

$$\text{Modelo: } Y_{ijk} = \beta_0 + \beta_1\text{PCL} + \beta_2\text{NUL} + \beta_3\text{GL} + \beta_4\text{LT} + \beta_5\text{DEL} + \text{ET}_i \\ + V(\text{ET})_{j(i)} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk}	representa la producción de leche (kg/día)
$\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_5$	son los parámetros del modelo
PCL	es la variable proteína cruda láctea (%)
NUL	es la variable nitrógeno ureico lácteo (mg/dL)
GL	es la variable grasa de la leche (%)
LT	es la variable lactosa (%)
DEL	es la variable días en leche
ET_i	es el efecto del establo ($i = 1, 2, \dots, 6$)
$V(\text{ET})_{j(i)}$	es el efecto de la vaca ($j = 1, 2, \dots, 36$) anidada en el establo i
ε_{ijk}	es el error aleatorio

5. CUANTIFICACIÓN DEL NUL MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE INFRARROJO Y EL MÉTODO ENZIMÁTICO DE BERTHELOT

5.1 Determinación del número de muestras a analizar

El número de muestras se calculó con base en la siguiente fórmula (Motulsky, 1995):

$$n = 4 \left[\frac{SD}{\text{Precisión}} \right]^2$$

Donde: SD = desviación estándar

n= número de muestras

La n se calculó con una SD = 4 y una precisión de 1 mg/dL; resultando n= 64.

5.2 Material Químico

Kit para determinación de urea (Bayer Diagnostics, Publication No. TL9-6924J6), ácido tricloroacético (TCA), agua destilada.

5.3 Material biológico

Se recolectaron 64 muestras de leche de establos comerciales. Las muestras de leche utilizadas como estándares para realizar la calibración por ambos métodos fueron adquiridas del Laboratorio DQCI Services, Minnesota, E.U.A.

5.4 Metodología

Las muestras de leche fueron conservadas con 2-bromo-2-nitropropano-1,3 diol (bronopol) y almacenadas a 4°C hasta su análisis (máximo 24 hrs después de su recepción). Las muestras fueron divididas en 2 partes, una para realizar el análisis por EIR y la otra para realizar el análisis por el método de Berthelot. Las muestras analizadas por el método de Berthelot se les dió el siguiente tratamiento: las muestras de leche fueron homogeneizadas y 200 µl fueron delipidizados y deproteinizados adicionando 1.8 mL de TCA al 3%, a 4°C. Después de 5 minutos, las muestras de leche se centrifugaron a 3500 x g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se utilizó para la determinación de NUL por el método de Berthelot.

5.4.1 Procedimiento para determinación de NUL mediante el kit No. 6374 (Bayer Diagnostics):

Se utilizaron 3 series de tubos: tubos blanco, tubos estándar y tubos de muestra. A cada serie de tubos a analizar se les dio el tratamiento mostrado en el Cuadro 14. Una vez adicionados todos los reactivos, los tubos fueron agitados en un vórtex por aproximadamente 10-15 segundos y se incubaron nuevamente en baño María a 37°C por 10 minutos. Las absorbencias de fueron detectadas a una longitud de onda de 546 nm. Las muestras fueron analizadas por duplicado.

Cuadro 14 Procedimiento seguido para la determinación de NUL en cada serie de tubos analizados.

	Blanco	Estándar	Muestra
Leche delipidizada	---	---	200 µL
Estándar NUL	---	200 µL	---
Ureasa	200 µL	200 µL	200 µL
Agua	200 µL	---	---
Mezclar e incubar a 37° C durante 10 minutos y adicionar las soluciones de:			
Fenol-nitroprusiato de sodio	5 mL	5 mL	5 mL
Hipoclorito de sodio	5 mL	5 mL	5 mL

Los resultados de la comparación de los métodos empleados para la cuantificación de NUL se analizaron mediante estadística descriptiva. Los análisis anteriores fueron realizados con el programa JMP Versión 4.04 (SAS).

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. ALIMENTO DE LOS ANIMALES

En cada establo se recolectaron dos muestras de alimento. Los resultados de la PCA (Cuadro 15) indicaron que ésta fue igual para todos los establos, excepto para el establo Aguascalientes 6, que presentó el valor más bajo de PCA ($p < 0.05$). La concentración de PSA fue muy variable en los establos en estudio, cuyo intervalo fue de 24.93 a 39.38 %. Para el caso del NUL, se formaron 3 grupos diferentes ($p < 0.05$): el establo de Aguascalientes 6, que presentó la concentración más elevada de NUL; los establos Querétaro 1, Guanajuato 3 y 4 mostraron una concentración media de NUL y en los establos Querétaro 2 y Aguascalientes 5 se observó una concentración baja de NUL.

Cuadro 15. Resultados promedio del análisis del alimento consumido por el ganado y el nitrógeno ureico en la leche (NUL).

Establo	PCA ¹ (%)	PSA ² (%)	NUL (mg/dL)
Querétaro 1	18.49 ^a ± 0.13	24.93 ^a ± 3.21	16.28 ^b ± 7.2
Querétaro 2	18.10 ^a ± 0.11	39.38 ^c ± 0.09	10.00 ^a ± 5.9
Guanajuato 3	18.18 ^a ± 0.25	28.25 ^{ab} ± 0.37	14.43 ^b ± 5.2
Guanajuato 4	17.20 ^a ± 0.25	39.31 ^c ± 1.67	15.96 ^b ± 7.5
Aguascalientes 5	17.23 ^a ± 0.69	35.53 ^{bc} ± 0.35	11.53 ^a ± 6.0
Aguascalientes 6	15.30 ^b ± 0.39	27.19 ^a ± 2.75	19.32 ^c ± 6.7

¹PCA: proteína cruda del alimento (base seca)

²PSA: proteína soluble del alimento (base seca) como % de PCA

Las literales representan diferencias significativas en las medias ($p < 0.05$)

Con los resultados anteriores se evaluó la relación existente entre el consumo de proteína (cruda y soluble) por las vacas y el NUL presente en la leche. Lo anterior se realizó determinando los coeficientes de correlación entre las variables y mediante el desarrollo de un modelo de regresión lineal de efectos fijos entre el NUL (variable respuesta) y las variables PCA y PSA (variables predictoras).

Las correlaciones entre PCA y PSA respecto a NUL no fueron significativas ($p = 0.25$), lo que puede indicar que la dieta no tuvo efecto sobre la concentración del NUL (Cuadro 16). Lo anterior se corroboró con el modelo desarrollado para explicar la concentración de NUL con base en la concentración de proteína de la dieta suministrada a los animales, y se presenta más adelante. Las variables independientes (PCA y PSA) y el modelo no fueron significativos ($p = 0.21$ para PCA y $p = 0.18$ para PSA y el modelo, respectivamente). La ausencia de efecto puede estar relacionada con lo siguiente:

- 1) En cada establo se les proporcionaba a las vacas una dieta única, por lo que teóricamente, todas las vacas comían lo mismo (particularmente proteína). Lo único diferente en este caso es la cantidad de alimento consumido por cada animal; información con la que no se contó y no se pudo estimar el consumo real individual.
- 2) Como consecuencia de manejar una dieta única y no contar con la cantidad consumida de proteína por cada animal, así como el balance proteico de la dieta; los resultados fueron analizados como promedios, teniendo únicamente 6 puntos para establecer las relaciones entre PCA, PSA y NUL. Debido a lo anterior, los resultados pueden no ser claros y la relación existente entre las variables medidas se encuentre confundida.

Cuadro 16. Correlaciones de las variables NUL, PCA y PSA.

Variables	Correlación (r)
NUL y PCA	- 0.5667*
NUL y PSA	- 0.6307*
PCA y PSA	0.0677

Nitrógeno ureico en leche (mg/dL) Proteína cruda del alimento (% base seca)

Proteína soluble del alimento (% base seca) como % de PCA

* $p = 0.25$

n = 6

Modelo de efectos fijos para determinar la relación entre NUL y la dieta

La relación entre las variables nutricionales (PCA, PSA) y la concentración de NUL fue descrita por la siguiente ecuación (Apéndice 2A):

$$\text{NUL} = 51.52 - 1.54 \text{ PCA} - 0.31 \text{ PSA}$$

$$p = 0.21 \quad p = 0.18$$

$$r^2 = 0.67; \quad p = 0.18$$

Donde:

NUL = nitrógeno ureico lácteo (mg/dL)

PCA = proteína cruda del alimento (% , base seca)

PSA = proteína soluble del alimento (% , base seca) como % de PCA

Los resultados de este trabajo difieren de otros estudios realizados. Debido al metabolismo propio de la vaca, se esperaba que al incrementarse las concentraciones de PCA y PSA de la dieta, el NUL también se incrementara, tal como se ha informado en diversos trabajos. Lyatuu y Eastridge (2002) encontraron que el % de PCA y su ingesta estuvieron correlacionadas positivamente con el NUL ($r = 0.24$, $p < 0.01$; $r = 0.16$, $p < 0.05$, respectivamente). Al realizar la regresión individual de cada variable, la PCA explicó sólo el 11 % de la variabilidad observada en NUL, mientras que su ingesta explicó el 16 % de la variabilidad del NUL. De igual manera, existen más trabajos que han encontrado una relación positiva entre la PCA y el NUL (Baker et al., 1995; Broderick y Clayton, 1997; Godden et al., 2001a; Hof et al., 1997; Roseler et al., 1993; Schepers y Meijer, 1998).

Si bien las correlaciones encontradas entre PCA respecto al NUL en los trabajos anteriores no son grandes, sí son significativas y en este caso la importancia radica en que es una relación positiva, lo cual es perfectamente explicable con el metabolismo desarrollado en la vaca: la proteína ingerida por el animal (PCA, PDR y PSA) es metabolizada en el rumen y es transformada a proteína bacteriana, amoníaco y ácidos grasos volátiles por la microbiota. Cuando se tienen excesos de proteína se incrementa la producción de amoníaco en el rumen, que posteriormente se metaboliza a urea en el hígado. Esto tiene como consecuencia un incremento de nitrógeno ureico en todos los fluidos corporales del animal, entre ellos la leche (NUL).

Con base en la información anterior, los resultados presentados pueden sugerir que los establos Querétaro 1, Guanajuato 3 y 4 tenían una dieta balanceada en las proporciones de los diferentes tipos de proteína; mientras que los establos Querétaro 2 y Aguascalientes 5 y 6 aparentemente tuvieron un desbalance en la proteína de su dieta. Esta aseveración se hace tomando en cuenta los valores de NUL de cada establo y comparándolos con los límites recomendados. Sin embargo, para precisar aún más esta información, hace falta tomar en cuenta la producción de leche, además de la concentración de PCL y caseína, valores que se analizarán a continuación.

Cabe destacar que todos los establos (con excepción del establo Aguascalientes 6) presentaron concentraciones de PCA adecuadas para alimentar el ganado lechero, puesto que la recomendación para vacas altas productoras es de 18-19 % PCA (Crooker et al., 1997). Por otro lado, la concentración de PSA estuvo desbalanceada, al estar por arriba o por debajo de las recomendaciones generales del NRC (31-34 % PSA) en los establos en estudio (Hutjens, 2004).

2. ANÁLISIS DE LA LECHE

2.1 Variables analizadas en la leche

En el Cuadro 17 se presentan los resultados promedio de las variables analizadas en la leche; así como la producción y días en leche promedio para las vacas de los seis establos en estudio. El establo Querétaro 2 presentó la concentración más alta de PCL (3.58 %) y el establo Aguascalientes 6 presentó la concentración más baja (3.05% PCL). Los establos restantes no mostraron diferencia estadística en la concentración de PCL. La producción de PCL se vió influenciada por la producción láctea, por lo que los establos con mayor producción de PCL fueron Guanajuato 3 y Aguascalientes 5 (1142 g y 1184 g de PCL, respectivamente).

Los establos con mayor concentración de caseína fueron Querétaro 2, Guanajuato 4 y Aguascalientes 5 (24.8, 23.8 y 23.3 g/L de caseína, respectivamente). Es importante hacer notar que dos de los tres establos anteriores fueron los que tenían las concentraciones más bajas de NUL (Querétaro 2, 10 mg/dL y Aguascalientes 5, 11.53 mg/dL). Los valores resultantes de concentración de la caseína en los establos fueron ligeramente menores al valor reportado de 27 g/L (Alaís, 1988). Esto tal vez se debió a que durante la etapa de extracción de la caseína pudieron existir pérdidas de esta proteína.

Con respecto a la producción de caseína, los establos Guanajuato 3 y Aguascalientes 5 tuvieron las mayores producciones de caseína (793 y 844 g de caseína por vaca, respectivamente). En los demás establos la producción de caseína fue similar. La producción de caseína, al igual que la producción de PCL, estuvo influenciada por la producción de leche. Los establos que presentaron las mayores producciones de leche fueron Guanajuato 3 y Aguascalientes 5 (35.3 y 36.2 kg de leche/vaca/día, respectivamente; $p < 0.05$). El establo Aguascalientes 6 presentó una producción ligeramente menor a los establos anteriores (31.1 kg de leche/vaca/día); mientras que los establos Querétaro 1, Querétaro 2 y Guanajuato 4 presentaron las producciones de leche más bajas de los establos analizados (26.0, 27.3 y 27.4 kg de leche/vaca/día, respectivamente; $p < 0.05$)

En las proporciones de caseína total no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los establos (con excepción del establo Querétaro 1, con una proporción de 65.5 % de

caseína, respecto a la proteína total), presentando valores dentro de los límites (68.7% – 83.7 %) que han sido reportados en otros trabajos experimentales (Cerbulis y Farrel, 1975). Cabe destacar que aunque se encuentran dentro de los límites reportados, están más cercanos al límite inferior. La razón para esto como ya se mencionó anteriormente, es que pudieron existir pérdidas de la caseína durante su extracción.

Finalmente, aunque en promedio no existió diferencia estadística en DEL entre los establos, los animales no se encontraban en la misma etapa de lactación, indicado por las desviaciones estándar tan elevadas que se observaron en esta variable.

Cuadro 17. Resultados promedio de la leche analizada por establo.

	n	QRO 1	QRO 2	GTO 3	GTO 4	AGS 5	AGS 6
NUL ¹ (mg/dL)	36	16.28 ^b ± 7.2	10.00 ^a ± 5.9	14.43 ^b ± 5.2	15.96 ^b ± 7.5	11.53 ^a ± 6.0	19.32 ^c ± 6.7
PCL ² (% p/p)	36	3.32 ^b ± 0.31	3.58 ^c ± 0.43	3.25 ^b ± 0.26	3.32 ^b ± 0.31	3.33 ^b ± 0.29	3.05 ^a ± 0.26
PCL ³ (g)	36	852 ^a ± 291	965 ^a ± 267	1142 ^b ± 206	897 ^a ± 215	1184 ^b ± 266	944 ^a ± 262
Caseína ⁴ (g/L)	36	21.8 ^a ± 2.4	24.8 ^c ± 2.8	22.4 ^{ab} ± 3.1	23.8 ^{bc} ± 3.4	23.3 ^{abc} ± 2.9	21.8 ^a ± 2.1
Caseína ⁵ (g)	36	558 ^a ± 190	667 ^{ab} ± 186	793 ^{bc} ± 194	648 ^a ± 171	844 ^c ± 226	681 ^{ab} ± 211
Caseína ⁶ (%)	36	65.5 ^a ± 6.4	70.0 ^b ± 4.5	69.1 ^{ab} ± 8.7	72.0 ^b ± 6.8	70.8 ^b ± 6.7	71.7 ^b ± 4.8
Producción ⁷	36	26.0 ^a ± 9	27.3 ^a ± 8.1	35.3 ^b ± 6.7	27.4 ^a ± 7.1	36.2 ^b ± 8.7	31.1 ^{ab} ± 9.1
DEL ⁸	36	214 ± 59	209 ± 62	210 ± 71	215 ± 74	195 ± 54	202 ± 79

QRO = Querétaro; GTO = Guanajuato; AGS = Aguascalientes

¹NUL, nitrógeno ureico en leche;

²PCL, proteína cruda en leche (% peso/peso);

³Producción de proteína en la leche (g)

⁴Caseína (g/L);

⁵Producción de caseína (g);

⁶Proporción de caseína = caseína⁴/PCL²; la proporción de caseína es una aproximación del valor real por no contar con el valor de densidad de las muestras de leche

⁷Producción de leche promedio/día/vaca (kg);

⁸DEL, Días en leche

Las literales representan diferencia estadística significativa (p < 0.05)

Con los resultados mostrados en el Cuadro 17 se observó que a mayor concentración de NUL existió una menor concentración de PCL y viceversa; es decir, se presentó una relación inversa entre NUL y PCL. Esto se ejemplifica con los establos Aguascalientes 6 (19.32 mg/dL NUL y 3.05 % PCL) y Querétaro 2 (10.00 mg/dL NUL y 3.58 % PCL). Los establos restantes presentaron igual concentración de PCL y sus valores de NUL se encontraron dentro de los límites recomendados por Hutjens y Barmore (1995), cuyo intervalo es de 12-18 mg/dL de NUL (excepto Querétaro 2, con 10 mg/dL y Aguascalientes 5, con 11.53 mg/dL NUL).

En el establo Aguascalientes 5 se presentó una relación inversa entre NUL y la producción de PCL. Fue uno de los dos establos con baja concentración de NUL y también uno de los dos que presentó la mayor producción de PCL (11.53 mg/dL NUL, 1184 gramos de PCL/vaca). El otro establo con alta producción de PCL fue Guanajuato 3, aunque su concentración de NUL estuvo dentro de los límites normales (1142 g PCL/vaca, 14.43 mg/dL NUL). Los otros establos tuvieron la misma producción de PCL por vaca.

Conjuntando la información obtenida del análisis del alimento proporcionado a los animales y el análisis realizado a la leche, ya se puede precisar un poco más si existió o no desbalance en las dietas de cada uno de los establos. De acuerdo a las recomendaciones hechas por Hutjens y Barmore (1995), los establos Querétaro 2 y Aguascalientes 5 que presentaron niveles muy bajos de NUL (por debajo de 12 mg/dL; 10 y 11.53 mg/dL, respectivamente) y elevadas concentraciones de PCL (3.58 % y 3.33 % respectivamente), los aminoácidos suministrados aparentemente fueron adecuados, pero la proporción PDR/PSA no estuvo balanceada y posiblemente existió un exceso de carbohidratos en el rumen. El establo Aguascalientes 6 que tuvo una elevada concentración de NUL (19.32 mg/dL) y una baja concentración de PCL (3.05 %), al parecer presentó un exceso de proteína con un desbalance en las proporciones PDR/PSA y un déficit de carbohidratos en rumen. Mientras tanto, los establos Querétaro 1, Guanajuato 3 y Guanajuato 4 con concentraciones de NUL óptimas (16.28, 14.43 y 15.96 mg/dL, respectivamente), aparentemente tuvieron un suministro adecuado de aminoácidos así como de carbohidratos en el rumen.

Por otra parte, la concentración de PCL encontrada en todos los establos (excepto Aguascalientes 6, con 3.05 % PCL) fue superior al valor de referencia para la raza Holstein,

el cual es de 3.1 – 3.2 % (Chalupa y Galligan, 1989; Jenness, 1985; Palmquist, 1995). Si bien es cierto que existen diferencias importantes con respecto al valor referido, esto se debe a que las tendencias actuales y desde hace tiempo son el incrementar los porcentajes de grasa y más recientemente, los porcentajes de PCL en la leche; realizando para ello modificaciones en algunas actividades, encontrándose entre las más importantes el mejoramiento genético y el balance de las dietas ofrecidas al ganado lechero.

Con base en los resultados obtenidos y la información anterior, parece apreciarse que sí existió un desbalance en la proteína (% PCA; % PSA) proporcionada al ganado en 5 de los 6 establos; sin embargo, no se puede ser más concluyente debido a que se requieren otras variables de la dieta que son de fundamental importancia [PDR, PNDR, carbohidratos (solubles y no solubles), fracciones de fibra, energía, etc.) para explicar los resultados obtenidos. Un ejemplo puede ser el establo Querétaro 1, con un 3.32 % de PCL y una concentración de caseína de 21.8 g/L. En este caso, el hecho notable es que a pesar de tener una elevada concentración de proteína láctea, su concentración de caseína fue igual al establo Aguascalientes 6, que presentó la más baja concentración de PCL (3.05 %). Se podría asumir que existió una ineficiencia en la conversión del nitrógeno de la dieta a nitrógeno proteico en el establo Querétaro 1. Al tratar de justificar los resultados con base en la dieta, se observó que ambos establos tuvieron una baja concentración de PSA, contrario a lo observado en PCA, siendo mayor en el establo Querétaro 1 (18.49%) que en el establo Aguascalientes 6 (15.30%). Al tener una concentración de PCA por arriba del límite recomendado, se podría suponer que incrementó las concentraciones de NUL, provocando una disminución en los componentes de la leche, entre ellos, la caseína. Sin embargo, al no tener completos los factores de la dieta que pueden influir en los resultados obtenidos, las conclusiones no pueden ser más contundentes.

A pesar que las conclusiones a las que se llegan con Hutjens y Barmore (1995) son diferentes, el establo Aguascalientes 5 fue el único en donde los resultados parecen indicar que tuvo el mejor balance en su dieta, al presentar las concentraciones más cercanas de PCA y PSA a los límites recomendados, una baja concentración de NUL (11.53 mg/dL) muy cercana al límite inferior recomendado (12 mg/dL) y que se pudo ver reflejado en una elevada producción de leche (36.2 kg leche/vaca/día) y altas concentraciones de PCL y caseína (3.33 % PCL, 23.3 g/L caseína).

2.2 Proporciones encontradas de α y β caseína

En la Figura 4 se presenta un gel de electroforesis en donde se indican las bandas correspondientes a la α y β caseína analizadas mediante UREA-PAGE y cuantificadas por densitometría. Se puede apreciar que la α caseína presentó un peso molecular de aproximadamente 50 kDa, mientras que el peso molecular de β caseína fue 200 kDa, resultados que sugieren que la α caseína se encontraba en forma de dímero y la β caseína como tetramero.

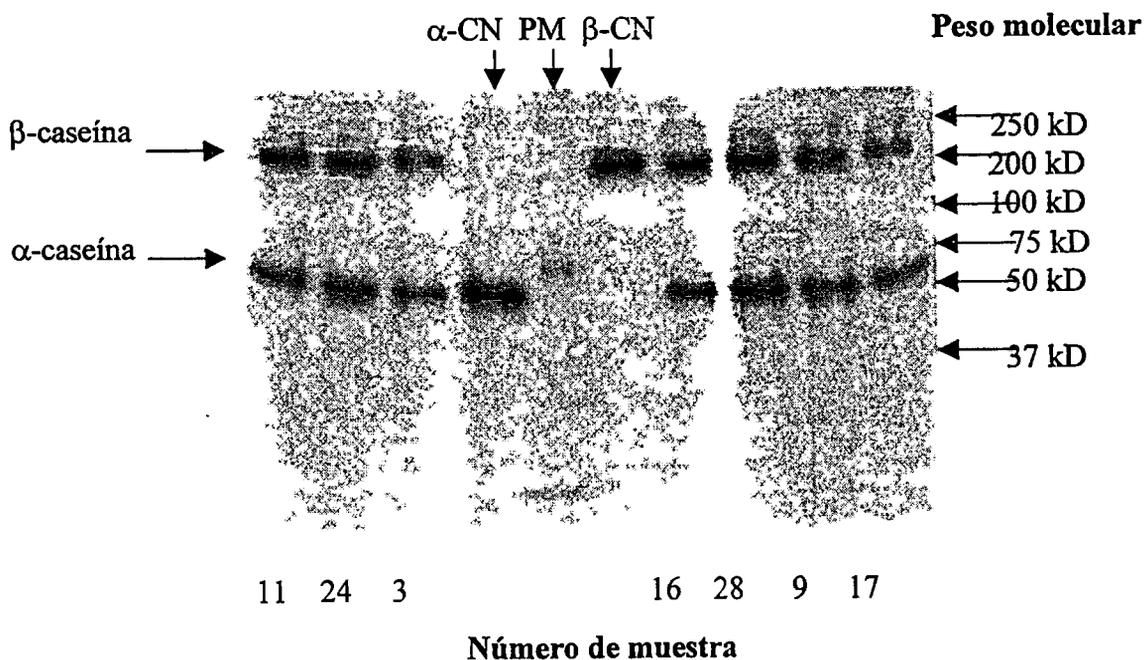


Figura 4. Gel de electroforesis (UREA-PAGE) representativo en donde se muestran las bandas de α y β caseína (α -CN y β -CN) analizadas en las muestras de leche 11, 24, 3, 16, 28, 9 y 17 del establo Guanajuato 3. Fueron inyectados 20 μ L muestra y 10 μ L de los estándares de peso molecular y de α caseína (α -CN) y β caseína (β -CN). Los marcadores de peso molecular fueron 250, 200, 100, 75, 50 y 37 kDa

Por densitometría se calcularon las proporciones de la α y β caseína encontradas en los establos en estudio (proporción con respecto a la caseína total), mostradas en el Cuadro 18. Las proporciones de α y β caseína sintetizadas se encontraron dentro de los límites reportados (45-63 % para α caseína y 19-30 % para β caseína). No se encontró diferencia entre los establos en las concentraciones de ambas proteínas, resultados que sugieren que independientemente de la cantidad sintetizada de caseína, las proporciones de α y β caseína se mantienen; y por lo tanto, nuestra variable de interés (NUL) no influyó en las proporciones de α y β caseína. Lo anterior se corrobora con los resultados de las correlaciones efectuadas entre el NUL y las proporciones de α y β caseína (Cuadro 19), que indicaron la ausencia de una relación lineal entre NUL y las proporciones de α y β caseína. Aunque no existen hasta el momento reportes en donde se relacione al NUL con las proporciones de α y β caseína sintetizada, el resultado obtenido es comprensible al disminuir únicamente la síntesis de caseína total, manteniéndose las proporciones de α y β caseína.

Cuadro 18 Proporciones de α y β caseína encontradas en los seis establos analizados

Establo	n	α -caseína (%)	β -caseína (%)
Querétaro 1	36	58 \pm 0.48	27 \pm 0.95
Querétaro 2	36	57 \pm 0.64	27 \pm 0.77
Guanajuato 3	36	58 \pm 0.90	28 \pm 0.78
Guanajuato 4	36	57 \pm 0.45	28 \pm 0.75
Aguascalientes 5	36	58 \pm 0.87	28 \pm 0.89
Aguascalientes 6	36	57 \pm 0.37	27 \pm 0.68
Referencia ¹		45-63	19-30

¹ Cheftel (1989)

La correlación encontrada entre las proporciones de α y β caseína fue positiva y significativa. Lo anterior significa que ambos tipos de caseína incrementaron o decrementaron sus proporciones al mismo tiempo pero en diferente magnitud (Cuadro 19).

Cuadro 19 Correlaciones entre el nitrógeno ureico y las caseínas α y β

Variables	Correlación (r)
NUL y CN-alfa (%)	- 0.0923*
NUL y CN-beta (%)	- 0.0433*
CN-alfa y CN-beta (%)	0.1362**

NUL: Nitrógeno ureico lácteo (mg/dL)

CN-alfa (%): Proporción de caseína alfa (g caseína alfa/g caseína total)*100

CN-beta (%): Proporción de caseína beta (g caseína beta/g caseína total)*100

*p = 0.19 **p < 0.05

Número de datos: 216

2.3 Relaciones encontradas entre las variables analizadas

Los resultados del análisis estadístico de los modelos se presentan en el apéndice 2.

2.3.1 Modelo de efectos fijos para determinar la relación entre PCL (%) y la dieta

Variable de respuesta: PCL (%)

Variables predictoras: PCA (%) y PSA (%)

Modelo:

$$\text{PCL} = 1.11 + 0.1 \text{ PCA} + 0.02 \text{ PSA} \quad (\text{Apéndice 2B})$$

$$p = 0.057 \quad p = 0.071$$

$$r^2 = 0.855; \quad p = 0.055$$

En el modelo propuesto para establecer la relación entre la PCL (%) y la dieta (Apéndice 2B), se observó una tendencia a incrementar la concentración de PCL (%) conforme se incrementaban las concentraciones de PCA (%) y PSA (%). Las variables predictoras utilizadas en el modelo explicaron el 85 % de la variación de PCL ($r^2 = 0.855$). Se observaron dos puntos atípicos (correspondientes a los establos Querétaro 2 y Aguascalientes 6) que al ser eliminados del modelo, disminuyó el coeficiente de determinación ($r^2 = 0.25$) y el modelo y las variables predictoras fueron no significativos. Sin embargo, los datos fueron revisados con detenimiento, concluyéndose que los datos son correctos y por lo cual se trabajó con el modelo planteado inicialmente.

Si bien el porcentaje de PCL puede ser influenciado por otros factores (estación, genética, mastitis, etc), en este estudio se enfocó el factor nutricional, con énfasis en la proteína de la dieta [PCA (%) y PSA (%)].

Anteriormente se pensaba que la proteína de la dieta tenía una mínima o nula influencia en la PCL, a menos que fuese severamente restringida. Existen estudios que demuestran que el porcentaje de PCA sí puede influenciar el porcentaje de PCL. Emery (1978) encontró que la concentración de PCL se incrementaba en 0.02 % por cada incremento de PCA de 1%; concluyendo además la necesidad de realizar más estudios diseñados para medir los efectos de la dieta sobre la concentración de PCL. Smoler et al. (1998) establecieron modelos basados

en los datos de 163 vacas Holstein utilizando como variables predictoras la proteína (PCA, PDR, PNDR) y los carbohidratos (solubles y no solubles) para predecir la concentración de PCL. Los resultados de las correlaciones entre la concentración de PCA, PDR, PNDR respecto a la concentración de PCL fueron significativas. Lo anterior mostró que a medida que la proteína de la dieta se incrementa, también lo hace la concentración de PCL. Otras variables de la dieta que también mostraron una correlación positiva y significativa respecto a PCL fueron los carbohidratos solubles.

Existen más estudios en donde se ha demostrado que con el aumento de las concentraciones de PCA se incrementan las concentraciones de PCL (Baker et al., 1995; Holter et al., 1982). Sin embargo, existe un límite en el que el exceso de proteína de la dieta presenta un efecto adverso no solamente a la concentración de la proteína, también a los demás componentes de la leche y a la producción de láctea (Ha y Kenelly, 1984). En la revisión realizada por Chalupa (1984) se reportó que la producción de leche disminuyó de 24.5 kg/día a 23.1 kg/día cuando la PCA se incrementó de 19-23%. Edwards et al. (1980) informaron que la concentración de PCL no fue diferente entre vacas Holstein alimentadas con dietas similares con concentraciones de 13% y 15% de PCA. Sin embargo, cuando la concentración de PCA se incrementó a 17 %, se observó una menor eficiencia en la conversión de la proteína de la dieta a proteína láctea.

Los resultados anteriores se justifican con la siguiente hipótesis: cuando el nitrógeno proporcionado en la dieta supera los requerimientos de nitrógeno de la microbiota del rumen y de las necesidades del animal, el exceso es transformado en amoníaco en el rumen y posteriormente en urea en el hígado, con el consecuente gasto energético que se ha mencionado con anterioridad en el presente estudio y que se cree es el responsable de los decrementos en la producción y los componentes de la leche cuando la concentración de la proteína de la dieta es excesiva.

Aún cuando los estudios anteriores no utilizaron la proteína soluble como una variable predictora, tomando en cuenta que toda la proteína soluble en el rumen es degradable, se puede tomar como una fracción de la PDR, la cual también presenta una asociación positiva con la PCA (%), como lo sugieren Smoler et al. (1998).

Existen otros factores de la dieta que pueden disminuir el porcentaje de PCL como son:

a) Grasa. Se sabe desde hace más de 15 años que al alimentar con grasas se puede reducir el contenido de proteína en la leche (alrededor de 0.15 puntos porcentuales por kg de grasa suplementada). Palmquist (1995) informó la relación entre la disminución de la proteína de la leche y la reducción en el consumo de materia seca cuando se proporcionan raciones altas en grasas.

b) Carbohidratos. Las cantidades inadecuadas de carbohidratos fermentables en el rumen (niveles adecuados: 35 a 45 % de carbohidratos fermentables) reducen la síntesis de proteína microbiana y también la PCL. La razón es que la población microbiana del rumen no dispone de la energía necesaria para llevar a cabo la fermentación sincronizada de los carbohidratos y el nitrógeno (Palmquist, 1995).

Existen también estudios en donde se ha observado que el efecto del porcentaje de PCA sobre la concentración de PCL (%) no fue significativo; tal como lo demostraron Claypool et al. (1980), al trabajar con 30 vacas Holstein con al menos 30 kg de producción láctea en su pico de producción. Las vacas fueron asignadas aleatoriamente a cada uno de los grupos formados con base en la dieta que se les proporcionó y que difirieron únicamente en el porcentaje de PCA (12.7%, 16.3% y 19.3%, expresado en base seca). Los animales fueron alimentados diariamente con la dieta seleccionada durante los 90 días posteriores al cuarto día posparto. Los resultados mostraron que no existió diferencia en la concentración de PCL de los animales alimentados con cada una de las dietas empleadas. Resultados similares encontraron Jaquette et al. (1986), sugiriendo que la concentración de PCA no tuvo efecto sobre el porcentaje de PCL.

Tal como se ha demostrado en otros trabajos al igual que en el presente estudio, los resultados del modelo en cuestión mostraron una tendencia a incrementar la concentración de PCL respecto a las concentraciones de PCA y PSA.

La conclusión a los resultados anteriores es que las variables predictoras utilizadas en el modelo son adecuadas, ya que explicaron un buen porcentaje de la variabilidad de PCL (%). La tendencia positiva mostrada entre PCL respecto a PCA y PSA puede sugerir que las concentraciones utilizadas de proteína en la dieta eran adecuadas en cada uno de los establos analizados. Sin embargo, dado el bajo número de datos empleado, se sugiere tomar con reservas el modelo propuesto.

2.3.2 Modelo de efectos fijos para determinar la relación entre la caseína (g/L) y la dieta

Variable de respuesta: Caseína (g/L)

Variabes predictoras: PCA (%) y PSA (%)

Modelo:

Caseína = 17.21 + 0.18 PSA (Apéndice 2C)

$p < 0.003$

$r^2 = 0.91; p < 0.003$

En el modelo propuesto para establecer la relación entre caseína (g/L) y la dieta se observó que la variable PSA (%) explicó el 91 % de la variación de la caseína en la leche ($r^2 = 0.91$). El modelo y la variable PSA (%) fueron significativos ($p < 0.003$, Apéndice 2C); la variable PCA no fue significativa ($p = 0.25$), por lo que se eliminó del modelo inicialmente propuesto. La variable PSA (%) mostró una relación positiva con respecto a la concentración de caseína. De acuerdo al modelo, la concentración de PSA influyó directamente en la concentración de caseína presente en la leche. No obstante, además de la concentración de la proteína, el tipo (PDR, PNDR, PSA) y la calidad de la proteína son importantes. Baker et al. (1995) llegaron a esta misma conclusión al probar dietas con diferentes concentraciones y proporciones de PCA, PDR y PNDR. La dieta balanceada para las variables anteriores, así como para los aminoácidos fue la que generó las más elevadas producciones de leche con elevadas concentraciones de proteína verdadera láctea (PVL) y con las más bajas concentraciones de NUL. Las dietas balanceadas para PCA de acuerdo al NRC (por sus siglas en inglés, National Research Council), pero con un exceso de PDR fueron ineficientes en la conversión de nitrógeno de la dieta a nitrógeno proteico. Roseler et al. (1993) informaron que los niveles de PVL eran mayores cuando las proporciones de PNDR eran las adecuadas o ligeramente por arriba de lo recomendado por el NRC.

Como se mencionó anteriormente, la calidad de proteína ingerida por las vacas es de suma importancia. Esto significa que la proteína proporcionada al ganado debe contener los aminoácidos necesarios para sintetizar la proteína láctea. Shwab et al. (1976), concluyeron que la metionina y la lisina fueron los dos primeros aminoácidos limitantes para la síntesis de proteína láctea en vacas cuya dieta era baja en PCA y estaba basada en maíz. Ribadeau et al.

(1975) recomendaron que la PNDR debe contener un perfil de aminoácidos similar al de la caseína, específicamente para los aminoácidos metionina, lisina, fenilalanina histidina y treonina. En la revisión realizada por Emery (1978) se mencionan varios estudios que demostraron que infusiones abomasales de proteína o aminoácidos incrementaron la concentración de PVL hasta en 0.2%. Lo anterior sugiere que además de proveer de manera adecuada la PDR para la síntesis de proteína microbiana en el rumen, se requiere también suministrar PNDR de alta calidad para asegurar la síntesis adecuada de PVL en la glándula mamaria.

Un punto muy importante y en el cual se debe hacer énfasis es que no necesariamente elevadas concentraciones de FCL significa que también se encontrarán elevadas concentraciones de PVL, como las proteínas del suero y la caseína. En el presente estudio, el establo Querétaro 1 presentó este problema; a pesar que su concentración de PCL fue alta (3.32 %), su concentración de caseína fue tan baja como para el establo Aguascalientes 6 (21.8 g/L), que a su vez presentó la concentración de PCL más baja de los establos (3.05 %). Lo que sugiere que las concentraciones de la PDR y la PNDR no eran las adecuadas, o bien, que la PNDR era de baja calidad; limitando la síntesis de PVL en general y en consecuencia, también la caseína.

En la literatura, generalmente la variable PNDR es la que más se ha asociado positivamente con la concentración de PVL. Sin embargo, en el presente estudio la variable PSA se asoció significativamente con la caseína, proteína principal de la leche y constituyente principal de la PVL. Este comportamiento resultó interesante, lo que tal vez puede sugerir que la concentración de PSA era la adecuada, o que no se encontraba en exceso en la dieta suministrada a los animales. Sin embargo, al igual que en el modelo anterior se recomienda tomar con reservas estos resultados dado el pequeño número de observaciones empleado.

2.3.3 Modelo de efectos mixtos para determinar la relación entre PCL y el NUL

Variable respuesta: PCL (%)

Variables predictoras: NUL (mg/dL), establo, vaca[establo]

Modelo:

$r^2 = 0.83$; $p < 0.0001$ (Apéndice 2D)

$$\text{Establo Qro 1: } \text{PCL} = 3.60 - 0.02 \text{ NUL} + 3.65 \text{ ET}_1 + V(\text{ET})_{j(1)}$$

$p < 0.0001 \quad p < 0.0001 \quad p = 0.16$

$$\text{Establo Qro 2: } \text{PCL} = 3.60 - 0.02 \text{ NUL} + 3.79 \text{ ET}_2 + V(\text{ET})_{j(2)}$$

$p < 0.0001 \quad p < 0.0001 \quad p < 0.0001$

$$\text{Establo Gto 3: } \text{PCL} = 3.60 - 0.02 \text{ NUL} + 3.53 \text{ ET}_3 + V(\text{ET})_{j(3)}$$

$p < 0.0001 \quad p < 0.0001 \quad p = 0.07$

$$\text{Establo Gto 4: } \text{PCL} = 3.60 - 0.02 \text{ NUL} + 3.63 \text{ ET}_4 + V(\text{ET})_{j(4)}$$

$p < 0.0001 \quad p < 0.0001 \quad p = 0.33$

$$\text{Establo Ags 5: } \text{PCL} = 3.60 - 0.02 \text{ NUL} + 3.55 \text{ ET}_5 + V(\text{ET})_{j(5)}$$

$p < 0.0001 \quad p < 0.0001 \quad p = 0.21$

$$\text{Establo Ags 6: } \text{PCL} = 3.60 - 0.02 \text{ NUL} + 3.60 \text{ ET}_6 + V(\text{ET})_{j(6)}$$

$p < 0.0001 \quad p < 0.0001 \quad p < 0.0001$

El modelo y la variable predictora NUL fueron significativos (Apéndice 2D), y explicaron el 83 % de la variabilidad de la PCL ($r^2 = 0.828$). Los componentes de varianza para el efecto aleatorio $V(\text{ET})_{j(i)}$ fueron: límite inferior: 0.0371 y límite superior: 0.0682. El comportamiento de los residuales fue adecuado, aunque existieron algunos puntos atípicos que no fueron influyentes en el modelo.

Con el modelo anterior y con la correlación efectuada entre NUL (mg/dL) y PCL (%) ($r = -0.69$, $p < 0.0001$, Apéndice 2D.1) se observó claramente que la concentración de NUL se relacionó de manera negativa con la concentración de PCL, tal como se aprecia en la Figura 5. Al respecto, se han encontrado resultados variables en la relación entre PCL y NUL. Lyatuu y Eastridge (2002) no observaron influencia del NUL en el porcentaje de PCL. Sin

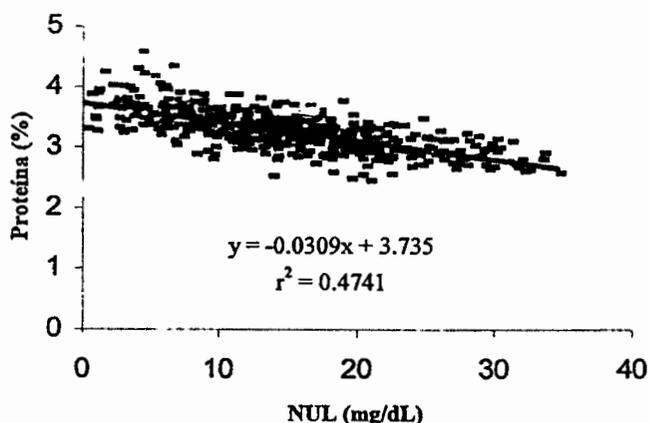


Figura 5. Relación encontrada entre la concentración de proteína de la leche y el nitrógeno ureico lácteo (NUL). La proteína se midió en porcentaje y el NUL en mg/dL. Número de datos: 539

embargo, Godden et al. (2001b), observaron el mismo comportamiento para PCL y NUL mostrado en este trabajo. Ellos concluyeron que si bien la asociación entre ambas variables fue negativa y significativa, al parecer tenía poco valor práctico, dado el valor numérico tan bajo que obtuvieron. Aunque en ese trabajo no midieron caseína, los resultados son por demás interesantes, al existir muy pocos estudios en donde se asocie el NUL con la proteína de la leche. A diferencia de lo que concluyeron Godden et al. (2001b), se considera que los resultados obtenidos en el presente trabajo además de la significancia estadística, también son de valor económico, ya que actualmente existen empresas que pagan una cantidad extra por cada centésima de punto porcentual en la concentración de PCL. Adicionalmente, este sistema de pago de la leche puede generalizarse a mediano plazo, tal como ocurrió en Francia y Australia y como está sucediendo actualmente en los Estados Unidos (<http://www.dhia.org/mundata.htm>).

La justificación a la relación negativa presentada entre PCL y NUL podría ser por el balance presentado en la dieta. La sobrealimentación de proteína total por encima de las recomendaciones, resulta en una pérdida de energía, porque se necesita glucosa para sintetizar urea en el hígado y excretar el exceso de nitrógeno suministrado en la dieta como urea (Palmquist, 1995). Por lo tanto, la energía disponible para la síntesis de leche y sus constitu-

yentes disminuye al canalizarla al ciclo de la urea, el cual es muy costoso energéticamente. La conversión de amoníaco a urea en el hígado tiene un costo estimado de 12 Kcal/g de exceso de nitrógeno excretado (Godden et al., 2001b). Usando un modelo de la Universidad de Cornell y considerando una lectura de 20 mg/dL, se estimó que habría una reducción en la producción de leche equivalente a 3.5 L diarios (Arias y Nesti de Alonso, 1999). Vandehaar (1998) predijo que la pérdida de energía por alimentar con un exceso de 2 % de PCA (una dieta de 19 % PCA) podría tener un costo de 0.36 Mcal/día. Esta podría ser la explicación principal a la relación inversa entre PCL y NUL; también observada para la producción de leche y la concentración de grasa láctea (Godden et al., 2001b).

2.3.4 Modelo de efectos fijos para determinar la relación entre la caseína (g/L) y el NUL

Variable respuesta: Caseína (CN, g/L)

Variables predictoras: Proteína (%), NUL (mg/dL), DEL, establo

Modelo:

$r^2 = 0.54$; $p < 0.0001$ (Apéndice 2E)

Establo Qro 1:	CN = 8.82 + 4.80 PCL - 0.107 NUL + 7.55ET₁
	p < 0.0001 p < 0.0001 p < 0.0001 p < 0.0001
Establo Qro 2:	CN = 8.82 + 4.80 PCL - 0.107 NUL + 9.15ET₂
	p < 0.0001 p < 0.0001 p < 0.0001 p = 0.33
Establo Gto 3:	CN = 8.82 + 4.80 PCL - 0.107 NUL + 8.36ET₃
	p < 0.0001 p < 0.0001 p < 0.0001 p = 0.15
Establo Gto 4:	CN = 8.82 + 4.80 PCL - 0.107 NUL + 9.79ET₄
	p < 0.0001 p < 0.0001 p < 0.0001 p < 0.003
Establo Ags 5:	CN = 8.82 + 4.80 PCL - 0.107 NUL + 8.78ET₅
	p < 0.0001 p < 0.0001 p < 0.0001 p = 0.91
Establo Ags 6:	CN = 8.82 + 4.80 PCL - 0.107 NUL + 8.82ET₆
	p < 0.0001 p < 0.0001 p < 0.0001 p < 0.0001

El modelo y las variables predictoras PCL y NUL fueron significativos (Apéndice 2E), y explicaron el 54 % de la variabilidad de la concentración de caseína en la leche ($r^2 = 0.54$). El comportamiento de los residuales fue adecuado, aunque existieron algunos puntos atípicos que no fueron influyentes en el modelo. La variable DEL fue eliminada del modelo debido a que no fue significativa ($p = 0.69$).

Con el modelo anterior y el análisis de correlación entre las variables, se observó una relación negativa entre la concentración de caseína y el NUL ($r = -0.59$, $p < 0.0001$, Figura 6) y positiva con la concentración de proteína ($r = 0.67$, $p < 0.0001$). Los resultados de las correlaciones se muestran en el Apéndice 2E.1.

Aunque no existe hasta el momento bibliografía en donde se relacionen las concentraciones de caseína con las de NUL, se puede deducir que si la concentración de PCL se ve afectada, como ya se demostró en resultados anteriores, está sucediendo lo mismo con la caseína láctea.

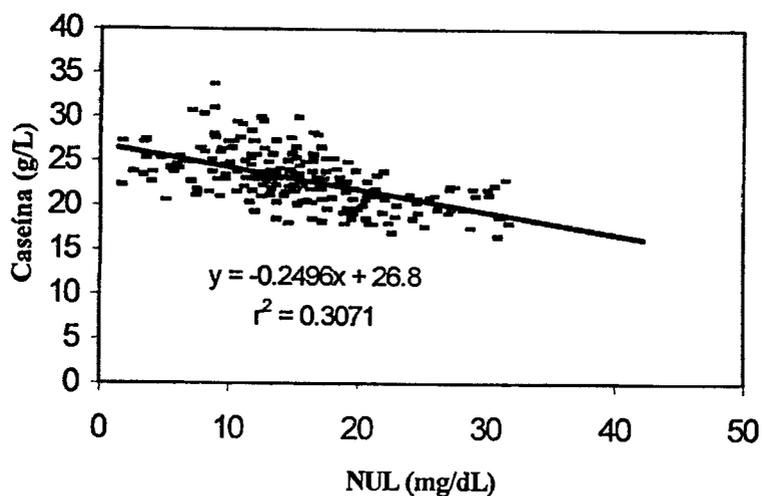


Figura 6. Relación encontrada entre la caseína de la leche y el nitrógeno ureico lácteo (NUL). La caseína se midió en g/L y el NUL en mg/dL. Número de datos: 213

2.3.5 Modelo de efectos mixtos para determinar la relación entre la producción de leche y su composición

Variable respuesta: Producción de leche (kg)

VARIABLES predictoras: PCL (%), NUL (mg/dL), grasa (%), lactosa (%), DEL, establo y vaca[establo].

Los parámetros de los modelos planteados se presentan en el Cuadro 20 y los resultados del análisis estadístico se muestran en el Apéndice 2F

Cuadro 20. Parámetros del modelo para determinar la relación entre la producción de la leche y su composición

Establo	β_0	β_1 PCL	β_3 GL	β_4 LT	β_5 DEL	ET _i	V(ET) _{j(i)}
ET ₁ -Qro	8.65	- 3.69 ^a	- 0.291	3.68	- 0.007	6.05	V(ET) _{j(1)}
	p = 0.0157	p < 0.0001	p = 0.0097	p < 0.0001	p = 0.0278	p < 0.0001	
ET ₂ -Qro	8.65	- 3.69	- 0.291	3.68	- 0.007	10.81	V(ET) _{j(2)}
	p = 0.0157	p < 0.0001	p = 0.0097	p < 0.0001	p = 0.0278	p < 0.0001	
ET ₃ -Gto	8.65	- 3.69	- 0.291	3.68	- 0.007	8.58	V(ET) _{j(3)}
	p = 0.0157	p < 0.0001	p = 0.0097	p < 0.0001	p = 0.0278	p = 0.858	
ET ₄ -Gto	8.65	- 3.69	- 0.291	3.68	- 0.007	10.66	V(ET) _{j(4)}
	p = 0.0157	p < 0.0001	p = 0.0097	p < 0.0001	p = 0.0278	p < 0.0001	
ET ₅ -Ags	8.65	- 3.69	- 0.291	3.68	- 0.007	8.95	V(ET) _{j(5)}
	p = 0.0157	p < 0.0001	p = 0.0097	p < 0.0001	p = 0.0278	p = 0.455	
ET ₆ -Ags	8.65	- 3.69	- 0.291	3.68	- 0.007	8.65	V(ET) _{j(6)}
	p = 0.0157	p < 0.0001	p = 0.0097	p < 0.0001	p = 0.0278	p = 0.254	

$\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4, \beta_5$: parámetros del modelo

PCL: proteína de la leche (%)

NUL: Nitrógeno ureico lácteo (mg/dL)

GL: grasa láctea (%)

LT: lactosa (%)

DEL: Días en leche

ET₁, ET₅: Establo

Qro: Querétaro

Gto: Guanajuato

Ags: Aguascalientes

V(ET)_{j(i)}: Vaca (j = 1, 2, ... 36) anidada en el establo i

Componente de varianza estimado para V(ET)_{j(i)}: límite inferior: 4.099, límite superior: 7.680

El modelo ($p < 0.0001$) y las variables predictoras PCL ($p < 0.0001$), GL ($p < 0.01$), LT ($p < 0.0001$), y DEL ($p < 0.05$) fueron significativos estadísticamente (Apéndice 2F). El modelo explicó el 77 % de la variabilidad de la producción de leche ($r^2 = 0.77$). El comportamiento de los residuales fue adecuado, aunque existió un punto atípico no influyente en el modelo (Apéndice 2F).

Con los resultados anteriores se concluye que la variable lactosa estuvo relacionada positivamente con la producción de leche. Esto resulta muy lógico, puesto que el volumen de leche secretado es directamente proporcional a la cantidad de lactosa sintetizada (Holmes y Wilson, 1984). Las variables PCL (%), grasa (%) y DEL se asociaron de forma negativa con la producción de leche. Esto se explica de forma muy clara con la curva que siguen la proteína y la grasa en el transcurso de la lactación, como se mostró en la Figura 2 (Alaís, 1988). Esta asociación negativa se debe principalmente a un efecto de dilución. Cuando la producción de leche es mayor, se observa una disminución en las concentraciones de grasa y proteína; y cuando la producción de leche disminuye, las concentraciones de grasa y leche se incrementan (Alaís, 1988). La asociación negativa entre la producción de leche y DEL también es muy comprensible, ya que a mayor número de días en leche, la producción disminuye, y viceversa. Este comportamiento se observa de forma muy clara en la Figura 1.

La variable NUL fue eliminada del modelo al no ser significativa ($p < 0.80$), y por lo tanto no influyó en la producción de leche.

3. RESULTADOS DE LA COMPARACIÓN DEL ANÁLISIS DE NUL ENTRE ESPECTROMETRÍA DE INFRARROJO Y EL MÉTODO DE BERTHELOT

En el Cuadro 21 se presentan los resultados obtenidos de la estimación de NUL, así como las diferencias y los porcentajes de diferencia que existieron entre los resultados de las muestras de leche analizadas por EIR y MBT. Claramente se observó que existen grandes diferencias entre ambos métodos en la cuantificación del NUL. Aunque la diferencia media entre ambos métodos fue baja (-0.22), el porcentaje de diferencia media refleja con mayor exactitud la variabilidad que existió entre ambos métodos. Los datos en forma resumida se muestran en el Cuadro 22.

Cuadro 21 Comparación de los resultados de NUL obtenidos por espectrometría de Infrarrojo (EIR) y el método de Berthelot (MBT)

No. Muestra	EIR NUL (mg/dL)	MBT NUL (mg/dL)	Diferencia EIR - MBT	% Diferencia
1	25.16	23.48	1.68	6.69
2	12.29	21.17	-8.88	-72.24
3	26.79	27.07	-0.28	-1.04
4	33.64	25.60	8.04	23.90
5	19.05	15.73	3.32	17.42
6	11.54	17.85	-6.31	-54.71
7	20.59	17.85	2.75	13.32
8	16.81	16.58	0.23	1.35
9	29.85	24.19	5.66	18.96
10	25.11	22.92	2.19	8.71
11	7.61	27.57	-19.96	-262.14
12	-0.32	11.08	-11.40	3595.27
13	31.09	34.76	-3.67	-11.82
14	17.34	17.85	-0.50	-2.92
15	18.87	17.00	1.87	9.94
16	11.25	15.31	-4.06	-36.05
17	15.69	18.69	-3.00	-19.14
18	19.32	22.07	-2.76	-14.26
19	16.40	21.65	-5.25	-31.99
20	16.52	13.62	2.90	17.55

Cuadro 21 Continuación

No. Muestra	EIR NUL (mg/dL)	MBT NUL (mg/dL)	Diferencia EIR - MBT	% Diferencia
21	15.57	9.81	5.75	36.98
22	13.70	10.66	3.04	22.19
23	11.70	6.43	5.27	45.03
24	23.26	7.70	15.56	66.89
25	21.16	11.50	9.66	45.66
26	21.29	8.12	13.17	61.86
27	20.52	15.31	5.21	25.38
28	25.30	12.35	12.95	51.18
29	22.64	11.50	11.14	49.21
30	23.54	7.70	15.84	67.29
31	26.00	11.50	14.50	55.77
32	21.69	16.58	5.11	23.55
33	29.41	15.31	14.10	47.95
34	33.30	11.08	22.22	66.73
35	39.43	14.04	25.39	64.40
36	23.95	20.68	3.27	13.65
37	17.40	23.74	-6.34	-36.44
38	7.75	16.55	-8.80	-113.55
39	5.14	15.47	-10.33	-200.97
40	21.76	10.07	11.69	53.72
41	8.10	13.67	-5.57	-68.77
42	17.15	15.47	1.68	9.80
43	35.22	21.76	13.49	38.22
44	16.47	11.15	5.32	32.30
45	23.40	11.33	12.07	51.58
46	-1.04	21.22	-22.26	2140.38
47	-6.16	13.49	-19.65	318.99
48	-13.82	14.21	-28.03	202.82
49	-0.93	9.00	-9.93	1067.74
50	5.98	15.83	-9.85	-164.72
51	4.18	9.18	-5.00	-119.62
52	-4.37	8.46	-12.83	293.59
53	7.15	13.31	-6.16	-86.15
54	-0.19	10.97	-11.16	5873.68
55	25.13	22.84	2.29	9.11
56	23.69	21.04	2.65	11.19
57	13.22	16.37	-3.15	-23.87
58	17.19	4.68	12.51	72.77

Cuadro 2i Continuación

No. Muestra	EIR NUL (mg/dL)	MBT NUL (mg/dL)	Diferencia EIR - MBT	% Diferencia
59	5.77	17.45	-11.68	-202.43
60	11.83	28.59	-16.76	-141.67
61	7.23	27.69	-20.46	-282.99
62	15.58	18.52	-2.94	-18.87
63	10.56	24.10	-13.54	-128.22
64	9.94	10.07	-0.13	-1.31
65	11.45	23.03	-11.57	-101.05
66	17.40	11.70	5.70	32.56
67	10.30	11.70	-1.40	-14.04
68	16.20	12.90	3.30	20.52
69	16.20	12.50	3.70	22.79
70	13.00	11.70	1.30	9.65
71	11.70	12.90	-1.20	-10.63
72	16.90	15.00	1.90	11.03
73	16.50	15.80	0.70	4.24
74	16.60	20.00	-3.40	-20.19
75	17.10	12.50	4.60	26.94
76	17.20	15.00	2.20	12.84
77	13.80	18.30	-4.50	-32.99
			Media -0.22	Media 162.32

EIR = Espectrometría de Infrarrojo

MBT = Método de Berthelot

NUL = Nitrógeno ureico en la leche

% diferencia = (EIR-MBT)*100/EIR

Cuadro 22 Resultados promedio del análisis realizado a los datos

n	EIR	MBT	Diferencia media EIR-MBT	% de diferencia media	Coefficiente de correlación
77	15.90	16.12	-0.22	162.32	0.2113

EIR = Espectrometría de Infrarrojo

MBT = Método de Berthelot

% diferencia media = (EIR-MBT)*100/EIR

n = número de muestras

En la Figura 7 se observa claramente la gran dispersión que existió entre los resultados obtenidos por EIR y MBT, de aquí que el coeficiente de correlación tuviese un valor tan bajo ($r = 0.2113$). Sin embargo, examinando con más detalle la calibración realizada en el equipo de Infrarrojo, así como las concentraciones de los estándares usados para ello, se tomó la decisión de formar 3 grupos con los resultados anteriores. Tomando como base la concentración de NUL de las muestras analizadas por EIR, se dividieron de la siguiente manera: el primer grupo comprendió las muestras con concentraciones menores de 12.5 mg/dL, el segundo de 12.6-20.5 mg/dL y el tercero de más de 20.6 mg/dL (los Cuadros se presentan en el Apéndice 3). En el Cuadro 23 se presenta un resumen de los resultados obtenidos de la anterior agrupación de los datos.

Correlaciones obtenidas entre los resultados de NUL analizados por EIR y MBT

	NUL EIR (mg/dL)	NUL Berthelot (mg/dL)
NUL EIR (mg/dL)	1.0000	0.2113*
NUL Berthelot (mg/dL)	0.2113*	1.0000

NUL EIR = Análisis de nitrógeno ureico por Espectrometría de Infrarrojo
 NUL Berthelot = Análisis de nitrógeno ureico por el método de Berthelot
 $p < 0.065$
 Número de datos = 77

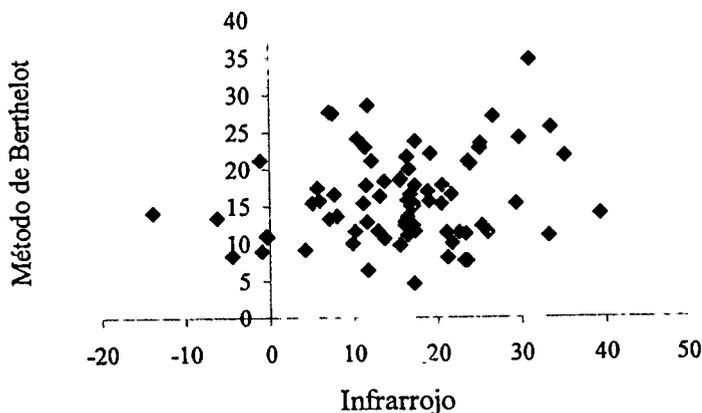


Figura 7. Diagrama de dispersión de los resultados de NUL analizados por EIR y MBT

Cuadro 23 Resumen de los resultados obtenidos después de la agrupación de los datos de NUL (< 12.5 mg/dL, 12.6-20.5 mg/dL y > 20.6 mg/dL) analizado por EIR y MBT

	Nivel de nitrógeno ureico en leche (NUL)		
	< 12.50 mg/dL	12.6-20.5 mg/dL	> 20.6 mg/dL
Número de datos	26	28	23
EIR			
Mínimo	-13.82	12.95	21.16
Máximo	12.29	20.59	39.43
MBT			
Mínimo	6.43	4.68	7.70
Máximo	28.59	23.74	34.76
Diferencia media*	-10.45	1.30	9.50
% Diferencia media**	441.40	7.10	35.80

EIR = Espectrometría de Infrarrojo

MBT = Método de Berthelot

* Diferencia promedio = $\Sigma (EIR - MBT) / \text{número de muestras}$

** % Diferencia = $\Sigma [(EIR - MBT) * 100 / EIR] / \text{número de muestras}$

Claramente se muestra que cuando se tienen valores extremos de NUL (menores de 12.5 y mayores a 20.6 mg/dL), la variación (% diferencia media) se incrementa considerablemente. El porcentaje de variación a concentraciones menores de 12 mg/dL fue de 441.4 %, mientras que a concentraciones mayores de 20.6 mg/dL fue de 35.8 %. En el intervalo de 12.6-20.5 mg/dL de NUL el porcentaje de variación medio fue considerablemente inferior, 7.1 %, aunque no despreciable por ser un método de cuantificación. Los resultados anteriores podrían explicarse con las siguientes razones:

1) Variabilidad inherente a la estimación de NUL con tecnología de EIR.

Los equipos que usan la tecnología de EIR tienen la limitante de tener mayor porcentaje de variabilidad en la medición (hasta 10 %; comunicación personal, Bentley Instruments) debido

a que la longitud de onda a la cual se detecta el NUL, también se detectan otros componentes de la leche (grasa, proteína, lactosa, citratos, células somáticas) creando interferencia en la estimación del NUL (Faust y Kilmer, 1996; Godden et al., 2000; Young, 2001). Estos compuestos pueden tener un efecto positivo (grasa) o negativo (células somáticas) en la estimación del NUL (Faust y Kilmer, 1996; Godden et al., 2000). Como los compuestos anteriores se estiman a otras longitudes de onda, se realiza un ajuste matemático y se hace una estimación indirecta de la concentración de NUL en la muestra de leche, de tal manera que aproximadamente el 45-50 % de la estimación de NUL proviene de la señal óptica, mientras que el 50-55 % restante proviene del ajuste matemático realizado a causa de los compuestos que interfieren en su detección (Godden et al., 2001). Con base en la forma en como se realiza la cuantificación de NUL, resulta más fácil explicar la variabilidad de sus estimaciones: debido a que las concentraciones de los compuestos que crean interferencia varían de una vaca a otra, los equipos de EIR tienden a producir estimaciones diferentes de NUL, aún cuando las muestras presenten la misma concentración de NUL. Aunado a lo anterior y tomando en cuenta la pequeña concentración a la cual se encuentra presente el NUL en la leche, se comprende la dificultad de obtener resultados más confiables por EIR (1 L de leche contiene aproximadamente 36 g de grasa, 32 g de proteína y solamente 0.12-0.18 g de NUL).

2) Estándares de leche.

Su limitante es no contar con muestras reales con altas o bajas concentraciones de NUL. Las concentraciones normales de la leche con la cual elaboran los estándares de NUL comprenden el intervalo de aproximadamente 8 a 24 mg/dL. Como consecuencia, cuando se tienen concentraciones fuera de este intervalo en las muestras de leche analizadas, los errores o desviaciones en las mediciones se incrementan

Con base en la información anterior se puede pensar el porqué aún se siguen utilizando equipos de EIR para estimar las concentraciones de NUL. La respuesta a lo anterior es la facilidad, rapidez y bajo costo para estimar el NUL en las muestras de leche. Los métodos químicos, como el método de Berthelot, por el contrario, aunque son más exactos y precisos, son más lentos y con un costo mucho mayor. Además, para disminuir la variabilidad existente en las estimaciones individuales (por vaca) de NUL por EIR, se ha

recomendado interpretar los resultados de forma agrupada, es decir, tener como mínimo un conjunto de 8 a 10 vacas (por ejemplo, agrupar las vacas que tengan la misma dieta, como sería el caso de las vacas pertenecientes a un mismo corral) y promediar sus resultados de NUL para poder dar alguna interpretación a este valor y utilizarlo al momento de balancear las dietas suministradas a los animales; o bien, que las muestras de leche sean tomadas directamente del tanque del establo (Broderick y Clayton, 1997; Shepers y Meijer, 1998; <http://www.inform.edu/ManureNet/MUN/MUN/MUNsamp.htm>).

Al igual que en el presente estudio, Godden et al. (2000) realizaron una comparación entre los resultados de NUL estimados con EIR y con el Eurochem CL (método de referencia), y encontraron que la diferencia media entre ambos métodos era de 0.84 mg/dL. En el presente estudio la diferencia media fue de 1.30 mg/dL para el intervalo de concentraciones de 12.6-20.5 mg/dL, nivel de NUL al cual se cree los resultados son más confiables por las razones descritas anteriormente. Puede observarse que ambos resultados son muy similares (0.84 mg/dL y 1.3 mg/dL); sin embargo, no podemos ser más concluyentes debido a que ellos no determinaron el porcentaje de diferencia media entre los métodos, valor que como se describió anteriormente representa con mayor exactitud la variabilidad encontrada entre ambos métodos. Finalmente, Godden et al (2000) concluyeron que existió una pérdida de concordancia en los resultados individuales obtenidos por ambos métodos, pero al ser agrupados los resultados fueron similares entre sí.

Con lo descrito anteriormente se concluye que los resultados obtenidos por EIR son confiables en un intervalo de concentración de 12-20 mg/dL con una variación media de 7%, y teniendo en cuenta la consideración de utilizar los resultados de forma agrupada.

IX. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que las dietas de los establos presentaron desbalances en las proporciones de PCA y PSA suministradas a los animales. Los residuales de los modelos relacionados con dieta, presentaron una varianza no constante.

Los resultados demostraron que los excesos de la concentración de NUL se relacionaron de forma negativa con la concentración de PCL. Por su parte, la proporción de caseína (g caseína/g PC en leche) y las proporciones de α y β caseína (g caseína α,β /g caseína) se mantuvieron constantes; es decir, no fueron afectadas por la concentración de NUL.

Se concluye además, que la concentración de PCL no es un valor que indique de manera confiable la concentración sintetizada de PVL, principalmente caseína, que es la de mayor importancia económica e industrial. Se sugiere por lo tanto, sustituir la medición de proteína de % PCL a % PVL para obtener resultados aún más exactos de la eficiencia del alimento proporcionado al ganado lechero.

Finalmente, los resultados de la comparación realizada del análisis de NUL por EIR respecto a MBT mostraron que existió un porcentaje de diferencia media muy grande a valores extremos de NUL (441 % para concentraciones menores a 12 mg/dL y 35.8 % para concentraciones mayores de 20 mg/dL, 35.8%). Para el intervalo de concentraciones de 12-20 mg/dL el % de variación fue de 7 %. Con base en lo anterior, se considera que las mediciones realizadas en este intervalo son confiables, con las consideraciones necesarias.

X. BIBIOGRAFÍA

Alaís, Ch. 1988. Ciencia de la leche. Editorial CECSA. España. 594 pp.

Arias, J. y Nesti de Alonso, A. 1999. Importancia de los niveles de nitrógeno ureico en leche y sangre en el ganado lechero. Rev. Fac. Agron. 16:553-561.

Baker, L.D., Ferguson, J.D. and Chalupa, W. 1995. Responses in urea and true protein of milk to different protein feeding schemes for dairy cows. J. Dairy Sci. 78:2424-2434.

Barbano, D.M. and Lynch, J.M. 1992. Crude and protein nitrogen bases for protein measurement and their impact on current testing accuracy. J. Dairy Sci. 75: 3210-3217.

Barbano, D.M., Rasmussen, R.R. and Lynch, J.M. 1991. Influence of milk somatic cell count and milk age on cheese yield. J. Dairy Sci. 74: 369-388.

Basch, J.J., Douglas, F.W., Procino, L.G., Holsinger, V.H. and Farrell, H.M. 1985. Quantitation of caseins and whey proteins of processed milks and whey protein concentrates, application of gel electrophoresis, and comparison with Harland-Ashworth procedure. J. Dairy Sci. 68:23-31.

Bayer, 1996. Sera-pak Urea. Publicación No. TL9-6924J96.

Bentley Instruments. Short communication. Bentley ChemSpec Analyzer. Rapid and accurate method for the determination of urea in milk. 2002.

Bobe, G., Beitz, C., Freeman, E. and Lindberg, G.L. 1999. Effect of milk protein genotypes on milk protein composition and its genetic parameter estimates. J. Dairy Sci. 82: 2797-2804.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.

- Broderick, G.A. and Clayton, M.K. 1997. Statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. *J. Dairy Sci.* 80: 2964-2971.
- Cerbulis, J. and Farrel, H.M. 1975. Composition of milks of dairy cattle. I. Protein, lactose and fat contents and distribution of protein fractions. *J. Dairy Sci.* 58:817.
- Chalupa, W. and Galligan, D.T. Manipulating protein levels in milk. En: *Biotechnology in the Feed Industry: Proceedings of Alltech's Fifth Annual Symposium*. Lyons, T. P. 1989. pp: 47-63.
- Chalupa, W. 1984. Discussion of protein symposium. *J. Dairy Sci.* 67:1134-1146.
- Chalupa, W. 1974. Rumen bypass and protection of proteins and aminoacids. *J. Dairy Sci.* 58:1198-1217.
- Cheftel, J.C., Cuq, J.L. and Lorient, D. 1989. *Proteínas Alimentarias*. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 346 pp.
- Clark, J.H. and Davis, C.L. 1980. Some aspects of feeding high producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 63: 873-885.
- Clay, A.B. and Satter, L.D. 1979. Milk production response to dietary protein and methionine hidroxy-analog. *J. Dairy Sci.* 66:75.
- Claypool, D. W., Pangborn, M.C. and Adams, H.P. 1980. Effect of dietary protein on high producing dairy cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 63: 833-837
- Cressman, S.G., Grieve, D.G., Macleod, G.K., Wheeler, E.E. and Young, L.G. 1980. Influence of dietary protein concentration on milk production by dairy cattle in early lactation. *J. Dairy Sci.* 63:1839.
- Crooker, B.A., Sniffen, C.J., Hoover, W.H. and Johnson, L.L. 1978. Solvents for soluble nitrogen measurements in feedstuffs. *J. Dairy Sci.* 61: 437-440.

- Crooker, B.A., Hertnell, G.F. y Staples Ch. R. 1997. Estrategias para alimentar a altas productoras. *Hoard's Dairyman en Español*. pp:306-307.
- DePeters, E.J. and Cant, J.P. 1992. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: A review. *J. Dairy Sci.* 75: 2043-2070.
- DePeters, E.J. and Ferguson, J.D. 1992. Nonprotein nitrogen and protein distribution in the milk of cows. *J. Dairy Sci.* 75: 3192-3209.
- Dildey, D.D. Getting Paid for Milk Quality: Improving Milk Composition. En: *Biotechnology in the Feed Industry: Proceedings of Alltech's Fifth Annual Symposium*. Lyons, T. P. 1989. pp: 45-65.
- Douglas, F. W., Greenberg, R., Farrell, H.M. and Edmondson, L.F. 1981. Effects of Ultra-high temperature pasteurization on milk proteins. *J. Agric. Food Chem.* 29: 11-15.
- Dyson, R. Ch., Brunner, J.R., Kalan, E.B., Larson, B.L., Melnychyn, P., Swaisgood, H.E and Waugh, D.F. 1970. Nomenclature of the proteins of cow's milk: Third revision. *J. Dairy Sci.* 58: 1-17.
- Edwards, J.S., Bartley, E.E and Dayton, A.D. 1980. Effects of dietary protein concentration on lactating cows. *J. Dairy Sci.* 63: 243-248.
- Emery, R. S. 1978. Feeding for increased milk protein. *J. Dairy Sci.* 61:825-828.
- Emmons, D.B. and Kertz, A.F. 1992. Borden symposium: effect of new milk protein determination technologies on the dairy industry: crude versus true protein. *J. Dairy Sci.* 75: 3191.
- Faust, M. A. and Kilmer, L.H. 1996. Determining variability of milk urea nitrogen reported by commercial testing laboratories. *Dairy Report*. Iowa State University. DSL-77.
- Franke, A.A., Bruhn, C. J. and Lawrence, M.C. 1988. Distribution of protein in California milk in 1983. *J. Dairy Sci.* 71:2373-2383.

Godden, S.M., Lissemore, K.D., Kelton, D.F., Leslie, K.E., Walton, J.S. and Lumsden, J.H. 2001a. Relationships between milk urea concentrations and nutritional management, production, and economic variables in Ontario dairy herds. *J. Dairy Sci.* 84: 1128-1139.

Godden, S.M., Lissemore, K.D., Kelton, D.F., Leslie, K.E., Walton, J.S. and Lumsden, J.H. 2001b. Factors associated with milk urea concentrations in Ontario dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84:107-114.

Godden, S.M., Lissemore, K.D., Kelton, D.F., Lumsden, J.H., Leslie, K.E. and Walton, J.S. 2000. Analytic validation of an infrared milk urea assay and effects of sample acquisition factors on milk urea results. *J. Dairy Sci.* 83: 435-442.

Gómez, B.M.A. 1998. Infertilidad por causas nutricionales. *Frisona Española.* 108:98-103.

Ha, J.K. and Kennelly, J.J. 1984. Effect of protein on nutrient digestion and milk production by Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 67:2302-2307.

Haenlein, G.F.W., Schultz, L.H. and Zikakis. 1973. Composition of proteins in milk with varying leucocyte contents. *J. Dairy Sci.* 56: 1017-1024.

Harding, F. 1992. Bases and experiences of expressing the protein content of milk-England and Wales. *J. Dairy Sci.* 75: 3218-3220.

Harris, B. 1996. Using milk urea nitrogen and blood urea values as management tools. En: *Proceedings of the 12 th Annual Symposium on Biotechnology in the Feed.* Lyons, T.P. Jacques, K.A. 376 pp.

Hernández Vera, M.A. 1998. El nitrógeno ureico en sangre y leche como herramienta en la evaluación de la salud y el nivel proteico en las vacas lecheras. *Unión Ganadera. Revista Oficial de la Unión Ganadera Regional de la Laguna.* Nov-Dic. 18: 32-33.

Hof, G., Vervoorn, M.D., Lenaers, P.J. and Tamminga, S. 1997 Milk urea nitrogen as a tool to monitor the protein nutrition of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80: 3333-3340.

Holmes, C.W y Wilson, G.F. 1984. Capítulo 16. Lactation: Mammary gland structure and milk secretion. En: Milk production from pasture. Editorial: Butterworths Agricultural Books. U. S. A. 319 pp.

Holter, J.B., Byrne, J.A. and Schwab, C.G. 1982. Crude protein for high milk production. J. Dairy Sci. 65:1175-1188.

Hutjens, F.M. 2004. Nutrient utilization in the dairy cow. IlliniDairyNet. The online resource for the dairy industry.

<http://www.traill.uiuc.edu/dairynet/paperDisplay.cfm?Type=paper&contentID=1190>

Hutjens, F.M. and Barmore, A.J. 1995. Milk urea test gives us another tool. Hoard's Dairyman. May. 401.

Idolo, I.G., Farkye, Y.N. and Spanier, A.M. 1997. Isolation, purification, and alteration of some functional groups of major milk proteins: A review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 37(7): 663-689.

Jaquette, R.D., Rakes, A.H. and Croom, W.J. 1986. Effects of dietary protein on milk, rumen, and blood parameters in dairy cattle fed low fiber diets. J. Dairy Sci. 69:1026-1034.

Jenkins, D.M., Delwiche, M.J., DePeters, E.J. and BonDurant, R.H. 1999. Chemical assay of urea for automated sensing milk. J. Dairy Sci. 82: 1999-2004.

Jenkins, D.M., Delwiche, M.J., DePeters, E.J. and BonDurant, R.H. 2000. Refinement of the pressure assay for milk urea nitrogen. J. Dairy Sci. 83:2042-2048.

Jenness, R. 1985. Capítulo 5. Biochemical and Nutritional Aspects of Milk and Colostrum. En: Lactation. Larson, L.B. Iowa State University Press. 1ª. Edición. U.S.A. pp: 276.

Jones, G.M., Pearson, R.E., Clabaugh, G.A. and Heald, C.W. 1984. Relationship between somatic cell counts and milk production. J. Dairy Sci. 67:1823-1831.

- Kim, H.Y. and Jiménez F. R. 1993. Two-dimensional analysis of skim milk proteins using preparative isoelectric focusing followed by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. of Food Biochemistry*. 16: 307-321.
- Kroeker, E.M., Ng-Kwai-Hang, K.F., Hayes, J.F. and Moxley, J.E. 1985. Effects of environmental factors and milk protein polymorphism on composition of casein fraction in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 68: 1752-1757.
- Leng, R.A. and Nolan, J.V. 1984. Symposium: Protein nutrition of the lactating dairy cow. Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 67:1072-1089.
- López N.C. 1998. Los productos lácteos es el marco de una dieta saludable. *Frisona Española*. 108: 118-119.
- Lyatuu, E.T. and Eastridge, M.L. 2002. Nutritional factors affecting milk production, milk composition, milk urea nitrogen and plasma urea nitrogen. http://ohioline.osu.edu/sc163/sc163_11html
- Mackle, T.R., Bryant, A.M., Petch, S.F., Hill, J.P. and Auldist, M.J. 1999. Nutritional influences on the composition of milk from cows of different protein phenotypes in New Zealand. *J. Dairy Sci.* 82:172-180.
- Matthews, M. 1998. Milk genotyping. Selection for protein variants. Victorian Institute of Animal Science, Australia.
- Marshall, R.T. 1993. Capítulo 15 Chemical and Physical Methods. En: *Standards Methods for the Examination of Dairy Products*. American Public Health Association. Washington, D.C. 546 pp.
- McKenzie, H.A. 1971. Whole casein: isolation, properties and zone electrophoresis. En: *Milk Proteins. Chemistry and Molecular Biology*. McKenzie, H.A. Volume II Academic Press U.S.A. 552 pp.

- Moore, D. A. and Varga, G. 1996. BUN and MUN: Urea nitrogen testing in dairy cattle. *Food Animal*. Vol. 18, No. 6: 712-720.
- Motulsky, H. 1995. Choosing an appropriate sample size. En: *Intuitive biostatistics*. Motulsky, H. Oxford University Press U.S.A. 385 pp.
- Ng-Kwai-Hang, K.F., Hayes, J.F., Moxley, J.E. and Monardes, H.G. 1982. Environmental influences on protein content and composition of bovine milk. *J. Dairy Sci.* 65: 1993-1998.
- Ng-Kwai-Hang, K.F., Hayes, J.F., Moxley, J.E. and Monardes, H.G. 1984. Variability of test-day milk production and composition and relation of somatic cell counts with yield and compositional changes of bovine milk. *J. Dairy Sci.* 67:361-366.
- Official Methods of Analysis of AOAC 1997. AOAC International. Volume II. 16th edition. Guithersbury, Maryland.
- Oldham, J. D. 1984. Protein-energy interrelationships in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 67:1090-1114.
- Palmquist, D.L. 1995. Hay formas de proporcionar más proteína en el alimento. *Hoard's Dairyman en Español*. Abril: 386-387.
- Philpot, W. N. and Nickerson, S. C. 1991. Mastitis: Counter attack. A strategy to combat mastitis. Babson Bros. Co. U.S.A. 150 pp.
- Raubertas, R.F. and Shook, G.E. 1982. Relationship between lactation measures of somatic cell concentration and milk yield. *J. Dairy Sci.* 65:419-425
- Reinart, A., and J. M. Nesbitt. 1956. The composition of milk in Manitoba. *Proc. 14th Int. Dairy Congr.* 1:946.
- Ribadeau D.B., Grosclaude, F. and Mercier, J.C. 1975. Primary structure of the polymorphs of the caseins. *Mod. Probl. Paediatr.* 15:46-62.

- Roseler, D.K., Ferguson, J.D., Saffin, C.J. and Herrema, J. 1993. Dairy protein degradability effects on plasma and milk urea nitrogen in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 76:525-534.
- Schwab, C.G., Satter, L.D. and Clay, A.B. 1976. Response of lactating dairy cows to abomasal infusion of aminoacids. *J. Dairy Sci.* 59:1254-1270.
- Shaafsma, G. and Steijns, J.M. 2000. Dairy Ingredients as a source of functional foods. En: *Essentials of functional foods*. Schmidl, K.M. y Labuza, P.T. Aspen Publication. Gaithersbury, Maryland. 395 pp.
- Schepers, A.J. and Meijer, P.G.M. 1998. Evaluation of the utilization of dietary nitrogen by dairy cows based on urea concentration in milk. *J. Dairy Sci.* 81: 579-584.
- Smoler, E., Rook, A.J., Sutton, J.D. and Beever, D. E. 1998. Prediction of milk protein concentration from elements of the metabolizable protein system. *J. Dairy Sci.* 81: 1619-1623.
- Speckmann, W. E., Brink, M.F. and McBean, D.L. 1981. Dairy Foods in Nutrition and Health. *J. Dairy Sci.* 64: 1008-1016.
- Stevenson, J. 1995. El exceso de proteína puede reducir la fertilidad. *Hoard's Dairyman* en español. pp: 79-80.
- Szijarto, L.D., Biggs, A. and Irvine, D.M. 1973. Variability in casein, serum protein and nonprotein nitrogen in plant milk supplies in Ontario. *J. Dairy Sci.* 56:45.
- Trevaskis, L.M. and Fulkerson, W.J. 1999. The relationship between various animal and management factors and milk urea, and its association with reproductive performance of dairy cows grazing pasture. *Livest. Prod. Sci.* 57:255-265.
- Troncoso, H. 1997. La calidad de la leche y la alimentación. *Carne y leche*. Julio-Agosto: 14-15
- Urech, E., Puhan, A. and Schällibaum, M. 1999. Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis. *J. Dairy Sci* 82: 2402-2411.

- Vandehaar, M. J. 1998. Efficiency of nutrient use and relationship to profitability on dairy farms. *J. Dairy Sci.* 81: 272-282.
- Van Hekken, D.L. and Thompson, M.P. 1992. Application of PhastSystem to the resolution of bovine milk proteins on urea-polyacrilamide gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.* 75: 1204-1210.
- Vallejo, B. 1997. Rapid separation and quantification of major caseins and whey proteins of bovine milk by capillary electrophoresis. *J. Capillary Electrophoresis.* 45(5): 219-224.
- Van Duinkerken, G. 1998. Nutrition and its contribution to milk yield and milk components. *Veepro-Holland.* 33:10-12.
- Van Eenennaam, A. and Medrano, J.F. 1991. Milk protein polymorphisms in California dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 74: 1730-1742.
- Van Soest, P. J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant.* 2^a. Edition. Comstock Publishing Associates. Ithaca, New York. 476 pp.
- Vélez, R.J.F. and Barbosa C. G.V. 1997. Rheological properties of selected dairy products. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37(4): 311-359.
- Verdi, R. J., Barbano, D.M., Dellavalle, M.E. and Senyk, G.F. 1987. Variability in true protein, casein, nonprotein nitrogen, and proteolysis in high and low somatic cells milks. *J. Dairy Sci.* 70:230-242.
- Wong, W.S.D., Camirand, M.W. and Pavlath, E.A. 1996. Structures and Functionalities of milk proteins. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 36(8): 807-844.
- Yokoyama, M. T. and Johnson, K.A. 1988. Microbiology of the rumen and intestine. En: *The Ruminant Animal. Digestive, Physiology and Nutrition.* Church, D.C. Waveland, Press Inc. 564 pp.
- Young, A. 2001. Milk urea nitrogen test (MUN). Utah University Extension. Electronic Publishing. AG/Dairy-01.

<http://accurexbiomedical.com/turea/htm>

<http://Bentleyinstruments.com>

<http://www.dhia.psu.edu/mun.htm>. Recent MUN research

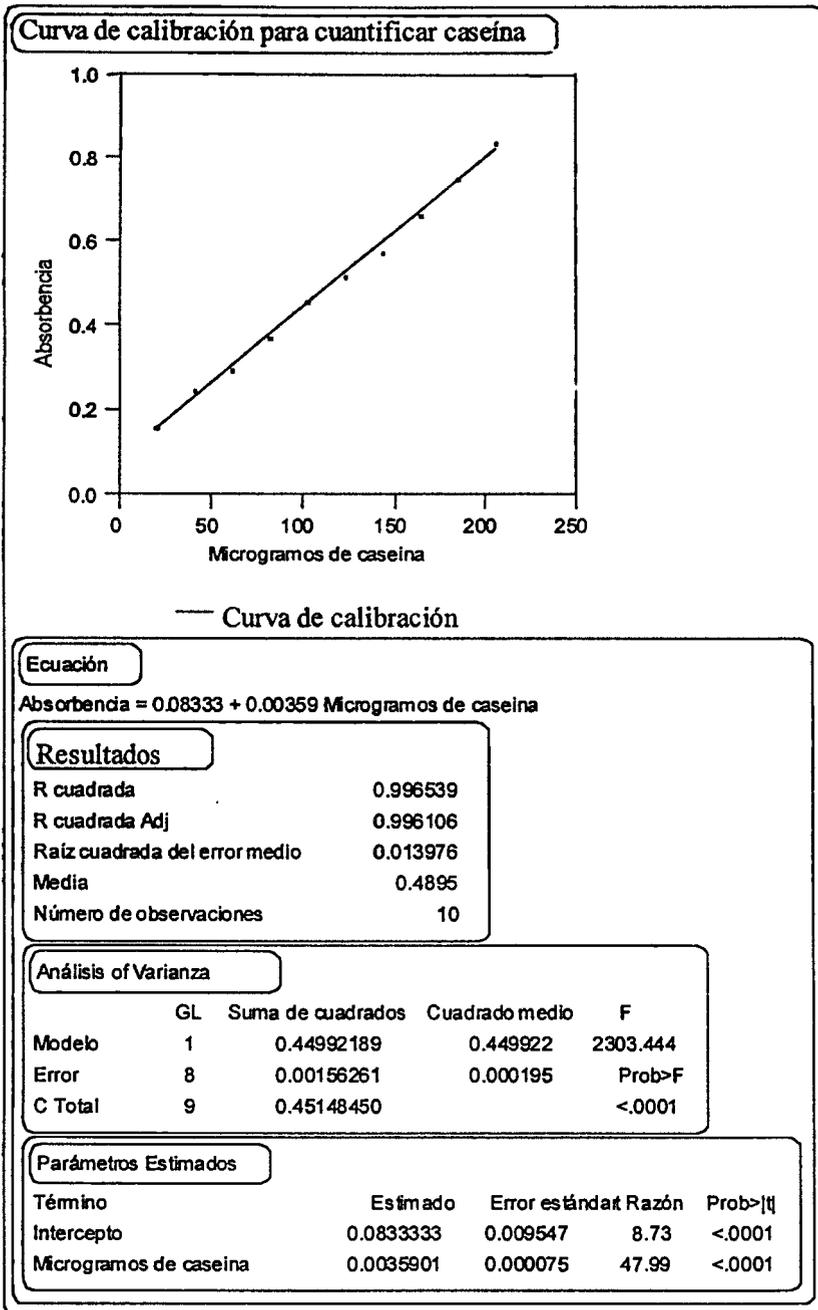
<http://www.inform.umd.edu/ManureNet/MUN/MUNsamp.htm>

<http://www.dhia.org/mundata.htm>

http://cahpwww.nbc.upenn.edu/mun/milk_protein.html, 2000

APÉNDICE 1.

Curva de calibración de caseína mediante el método de Bradford



APÉNDICE 2A

Modelo de efectos fijos para determinar la relación entre NUL (mg/dL) y la dieta

Variable respuesta: NUL (mg/dL)

Variables predictoras: PCA (%), PSA (%)

Resultados

r^2	0.673637
r^2 ajustada	0.456062
Raíz del error cuadrado medio	2.50243
Media	14.58667
Número de observaciones	6

Análisis de Varianza

	Grados de libertad (GL)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrado medio (CM)	F
Modelo	2	38.776661	19.3883	3.0961
Error	3	18.786473	6.2622	Prob > F
C. Total	5	57.563133		0.1864

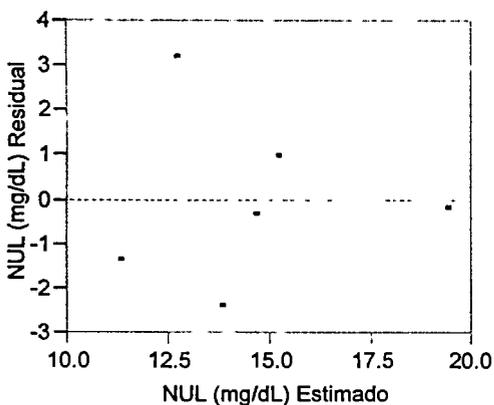
Parámetros Estimados

	Estimado	Error estándar	t	Prob> t
Intercepto	51.524447	17.38843	2.96	0.0594
PCA (%)	-1.535693	0.964422	-1.59	0.2095
PSA (%)	-0.314234	0.174573	-1.80	0.1697

Prueba de efectos

	Nparm	GL	SC	F	Prob > F
PCA (%)	1	1	15.878121	2.5356	0.2095
PSA (%)	1	1	20.289703	3.2400	0.1697

Gráfico de los residuales



APÉNDICE 2B

Modelo de efectos fijos para determinar la relación entre PCL (%) y la dieta

Variable respuesta: PCL (%)

Variables predictoras: PCA (%), PSA (%)

Resultados

r^2	0.855164
r^2 ajustada	0.758607
Raíz del error cuadrado medio	0.083577
Media	3.308333
Número de observaciones	6

Análisis de Varianza

	Grados de libertad (GL)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrado medio (CM)	F
Modelo	2	0.12372805	0.061864	8.8566
Error	3	0.02095529	0.006985	Prob > F
C. Total	5	0.14468333		0.0551

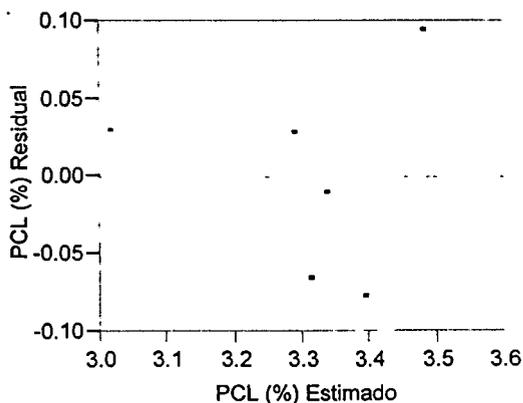
Parámetros Estimados

	Estimado	Error estándar	t	Prob> t
Intercepto	1.10719	0.580744	1.91	0.1527
PCA (%)	0.0966037	0.03221	3.00	0.0577
PSA (%)	0.0159915	0.00583	2.74	0.0712

Prueba de efectos

	Nparm	GL	SC	F	Prob > F
PCA (%)	1	1	0.06283148	8.9951	0.0577
PSA (%)	1	1	0.05254680	7.5227	0.0712

Gráfico de residuales



APÉNDICE 2C

Modelo de efectos fijos para determinar la relación entre la caseína (g/L) y la dieta

Variable respuesta: PCL (%)

Variables predictoras: PCA (%), PSA (%)

Resultados

r^2	0.907154
r^2 ajustada	0.883943
Raíz del error cuadrado medio	0.409043
Media	22.98333
Número de observaciones	6

Análisis de Varianza

	Grados de libertad (GL)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrado medio (CM)	F
Modelo	1	6.5390700	6.53907	39.0822
Error	4	0.6692633	0.16732	Prob > F
C. Total	5	7.2083333		0.0033

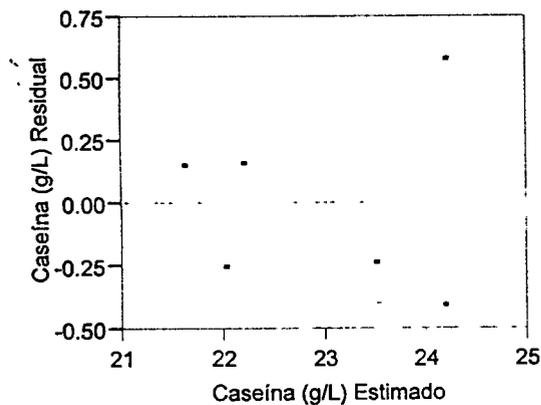
Parámetros Estimados

	Estimado	Error estándar	t	Prob> t
Intercepto	17.211097	0.938304	18.34	p < 0.0001
PSA (%)	0.1779815	0.02847	6.25	0.0033

Prueba de efectos

	Nparm	GL	SC	F	Prob > F
PSA (%)	1	1	6.5390700	39.0822	0.0033

Gráfico de residuales



APÉNDICE 2D

Modelo de efectos mixtos para determinar la relación entre PCL y el NUL

Variable respuesta: PCL (%)

Variables predictoras: NUL (mg/dL), vaca, establo

Resultados

r^2	0.82833
r^2 ajustada	0.826419
Raíz del error cuadrado medio	0.142567
Media	3.287821
Número de observaciones	546

Análisis of Varianza

	Grados de libertad (GL)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrado medio (CM)	F
Modelo	221	52.861271	0.239191	11.7680
Error	324	6.585457	0.020325	Prob > F
C. Total	545	63.816706		<.0001

Parámetros Estimados

	Estimado	Error estándar	t	Prob> t
Intercepto	3.59	0.029297	122.84	<.0001
NUL	-0.02	0.001652	-11.87	<.0001
Establo[i]Vaca[j]				
Establo Qro 1	3.65	0.036523	1.41	0.1593
Establo Qro 2	3.79	0.037841	5.09	<.0001
Establo Gto 3	3.53	0.03627	-1.8	0.0723
Establo Gto 4	3.63	0.037005	0.96	0.3371
Establo Ags 5	3.55	0.036494	-1.24	0.2169
Establo Ags 6	3.60			

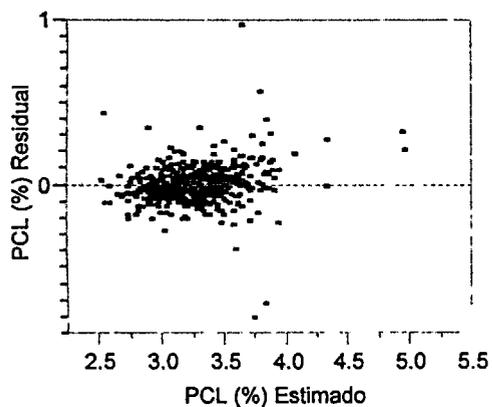
REML Componentes de Varianza estimados

Efecto aleatorio	Razón de Varianza	Componente de Varianza	Error estándar	Límite inferior 95 %	Límite superior 95 %
Vaca[Establo]& aleatorio	2.4167306	0.0491212	0.0076065	0.0370575	0.0682426
Residual		0.0203255			
Total		0.0694467			

Prueba de efectos

	Nparm	GL	DFDen	SC	F	Prob > F	
NUL	1	1	324	2.862579	140.8369	<.0001	
Vaca[Establo]& aleatorio	216	215	324	23.557633	5.3908	<.0001	Shru
Establo	5	5	215	0.921966	9.0720	<.0001	

Gráfico de Residuales



Apéndice 2D.1

Correlaciones presentadas entre PCL (%) y NUL (mg/dL)

	NUL (mg/dL)	PCL (%)
NUL (mg/dL)	1.0000	-0.688*
PCL (%)	-0.688*	1.0000

* p < 0.0001

Número de datos: 516

Apéndice 2E.

Modelo de efectos fijos para determinar la relación entre la caseína (g/L) y el NUL

Variable respuesta: Caseína (mg/dL)

VARIABLES predictoras: NUL (mg/dL), vaca, establo

Resultados

r^2	0.537581
r^2 ajustada	0.519536
Raíz del error cuadrado medio	2.081098
Media	23.0085
Número de observaciones	214

Análisis de Varianza

	Grados de libertad (GL)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrado medio (CM)	F
Modelo	7	1032.8392	147.548	34.4918
Error	205	889.7798	4.278	Prob > F
C. Total	213	1922.6190		<.0001

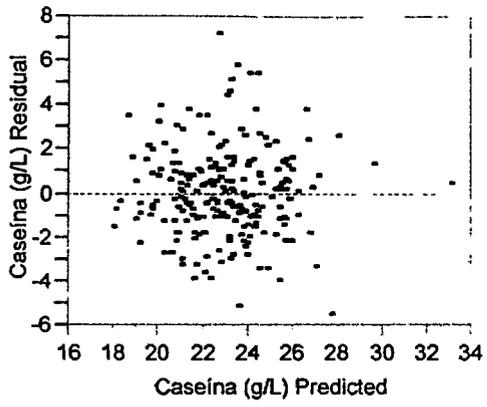
Parámetros Estimados

	Estimado	Error estándar	t	Prob> t
Intercepto	8.822	2.184	4.04	<.0001
PCL (%)	4.800	0.581	8.26	<.0001
NUL (mg/dL)	-0.1068	0.027	-3.97	<.0001
Establo[1]	7.55	0.317	-4.01	<.0001
Establo[2]	9.15	0.338	0.97	0.3345
Establo[3]	8.36	0.317	-1.45	0.1498
Establo[4]	9.79	0.318	3.04	0.0027
Establo[5]	8.78	0.329	-0.11	0.9087
Establo[6]	8.82			

Prueba de efectos

	Nparm	GL	SC	F	Prob > F
PCL (%)	1	1	291.624	68.17	<.0001
NUL (mg/dL)	1	1	67.381	15.75	<.0001
Establo	5	5	110.722	5.18	0.0002

Gráfico de Residuales



Apéndice 2F.

Modelo de efectos mixtos con un efecto anidado para determinar la relación entre la producción de leche y su composición

Variable respuesta: Producción de leche (kg)

VARIABLES predictoras: PCL (%), NUL (mg/dL), grasa (%), lactosa (%), SNG (%), establo, vaca(establo)

Resultados

r^2	0.765585
r^2 ajustada	0.761171
Raíz del error cuadrado medio	1.78838
Media	11.36236
Número de observaciones	543

Análisis of Varianza

	Grados de libertad (GL)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrado medio (CM)	F
Modelo	222	5563.5525	25.0524	7.9422
Error	320	1009.0608	3.1553	Prob > F
C. Total	542	7244.8522		<.0001

Parámetros Estimados

	Estimado	Error estándar	t	Prob> t
Intercepto	8.654	3.5639	2.43	0.0157
PCL (%)	-3.687	0.4981	-7.40	< 0.0001
Grasa (%)	-0.291	0.1117	-2.60	0.0097
Lactosa (%)	3.679	0.7041	5.23	< 0.0001
DEL	-0.0065	0.0029	-2.21	0.0278
Establo[1]	-2.603	0.405	-6.43	< 0.0001
Establo[2]	2.156	0.443	4.86	< 0.0001
Establo[3]	-0.072	0.402	-0.18	0.8578
Establo[4]	2.013	0.431	4.67	< 0.0001
Establo[5]	0.299	0.399	0.75	0.4547
Establo[6]	8.65			
Establo[]:Vaca[]	4.6E-06	1.03734	1.43	0.1535

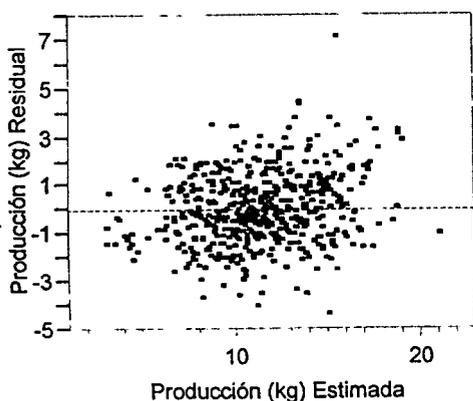
REML Componentes de varianza estimados

Efecto aleatorio	Razón de Varianza	Componente de varianza	Error estándar	Límite Inferior 95 %	Límite Superior 95%
Vaca[Establo]& aleatorio	1.7189279	5.4976547	0.885867	4.103799	7.7492641
Residual		3.1983045			
Total		8.6959592			

Prueba de efectos

	Nparm	GL	DFDen	SC	F	Prob > F	
PCL (%)	1	1	318	10.3508	3.2303	0.0730	
NUL (mg/dL)	1	1	318	0.6257	0.1956	0.6586	
Grasa (%)	1	1	318	22.1416	6.9229	0.0089	
Lactosa (%)	1	1	318	2.4940	0.7798	0.3779	
SNG (%)	1	1	318	0.2882	0.0901	0.7642	
Vaca[Establo]& aleatorio	214	213	318	2742.1057	4.0252	<.0001	Shru
Establo	5	5	213	252.6161	15.7969	<.0001	

Gráfico de residuales



APÉNDICE 3

Resultados de las concentraciones de NUL menores a 12.5 mg/dL analizado por Espectrometría de Infrarrojo (EIR) y el Método de Berthelot (MBT)

No. Muestra	EIR	MBT	Diferencia EIR - MBT	% Diferencia
48	-13.82	14.21	-28.03	-197.3
47	-6.16	13.49	-19.65	-145.7
52	-4.37	8.46	-12.83	-151.7
46	-1.04	21.22	-22.26	-104.9
49	-0.93	9.00	-9.93	-110.3
12	-0.32	11.08	-11.40	-102.9
54	-0.19	10.97	-11.16	-101.7
51	4.18	9.18	-5.00	-54.5
39	5.14	15.47	-10.33	-66.8
59	5.77	17.45	-11.68	-66.9
50	5.98	15.83	-9.85	-62.2
53	7.15	13.31	-6.16	-46.3
61	7.23	27.69	-20.46	-73.9
11	7.61	27.57	-19.96	-72.4
38	7.75	16.55	-8.80	-53.2
41	8.10	13.67	-5.57	-40.7
65	9.94	10.07	-0.13	-1.3
67	10.26	11.70	-1.44	-12.3
63	10.56	24.10	-13.54	-53.2
16	11.25	15.31	-4.06	-26.5
65	11.45	23.02	-11.57	-50.3
6	11.54	17.85	-6.31	-35.4
71	11.66	12.90	-1.24	-9.6
23	11.70	6.43	5.27	81.9
60	11.83	28.59	-16.76	-58.6
2	12.29	21.17	-8.88	-41.9
			Media -10.45	Media -63.9

EIR = Espectrometría de Infrarrojo

NUL = Nitrógeno ureico en la leche

MBT = Método de Berthelot

% diferencia = $(\text{EIR} - \text{MBT}) * 100 / \text{EIR}$

Resultados de las concentraciones de NUL (12.6 mg/dL a 20mg/dL) analizado por Espectrometría de Infrarrojo (EIR) y el Método de Berthelot (MBT)

No. muestra	EIR	MBT	Diferencia EIR - MBT	% Diferencia
70	12.95	11.70	1.25	10.7
57	13.22	16.37	-3.15	-19.2
22	13.70	10.66	3.04	28.5
77	13.76	18.30	-4.54	-24.8
21	15.57	9.81	5.76	58.7
62	15.58	18.52	-2.94	-15.9
17	15.69	18.69	-3.00	-16.1
69	16.19	12.50	3.69	29.5
68	16.23	12.90	3.33	25.8
19	16.40	21.65	-5.25	-24.2
44	16.47	11.15	5.32	47.7
73	16.50	15.80	0.70	4.4
20	16.52	13.62	2.90	21.3
74	16.64	20.00	-3.36	-16.8
8	16.81	16.58	0.23	1.4
72	16.86	15.00	1.86	12.4
75	17.11	12.50	4.61	36.9
42	17.15	15.47	1.68	10.9
58	17.19	4.68	12.51	267.3
76	17.21	15.00	2.21	14.7
14	17.34	17.85	-0.51	-2.8
66	17.35	11.70	5.65	48.3
37	17.40	23.74	-6.34	-26.7
15	18.87	16.99	1.88	11.0
5	19.05	15.73	3.32	21.1
18	19.32	22.07	-2.75	-12.5
27	20.52	15.31	5.21	34.0
7	20.59	17.85	2.74	15.4
			Media 1.3	Media 7.1

EIR = Espectrometría de Infrarrojo
 NUL = Nitrógeno ureico en la leche

MBT = Método de Berthelot
 $\% \text{ diferencia} = (\text{EIR} - \text{MBT}) * 100 / \text{EIR}$

Resultados de las concentraciones de NUL mayores a 20.6 mg/dL analizado por Espectrometría de Infrarrojo (EIR) y el Método de Berthelot (MBT)

No. Muestra	EIR	MBT	Diferencia EIR - MBT	% Diferencia
25	21.16	11.50	9.66	84.0
26	21.29	8.12	13.17	162.2
32	21.69	16.58	5.11	30.8
40	21.76	10.07	11.69	116.1
29	22.64	11.50	11.14	96.9
24	23.26	7.70	15.56	202.2
45	23.40	11.33	12.07	106.5
30	23.54	7.70	15.84	205.7
56	23.69	21.04	2.65	12.6
36	23.95	20.68	3.27	15.8
10	25.11	22.92	2.19	9.5
55	25.13	22.84	2.29	10.0
1	25.16	23.48	1.68	7.2
28	25.30	12.35	12.95	104.8
31	26.00	11.50	14.50	126.1
3	26.79	27.07	-0.28	-1.0
33	29.41	15.31	14.10	92.1
9	29.85	24.19	5.66	23.4
13	31.09	34.76	-3.68	-10.6
34	33.30	11.08	22.22	200.5
4	33.64	25.60	8.04	31.4
43	35.22	21.76	13.46	61.9
35	39.43	14.04	25.39	180.9
			Media	Media
			9.5	38.8

EIR = Espectrometría de Infrarrojo
 NUL = Nitrógeno ureico en la leche

MBT = Método de Berthelot
 $\% \text{ diferencia} = (\text{EIR} - \text{MBT}) * 100 / \text{EIR}$