

**MANIPULACIÓN DE LA CURVA DE LACTACIÓN Y DE LA COMPOSICIÓN  
DE LECHE EN RUMIANTES:  
¿DE LA NUTRI-FENÓMICA A LA NUTRI-GENÓMICA?**

Gerardo Caja<sup>1</sup> y Juan Fernando Medrano<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Investigación en Rumiantes, UAB

<sup>2</sup>University of California-Davis

## **1.- INTRODUCCIÓN**

El sector lechero ha entrado en un proceso de crisis a nivel internacional en el que los criterios de producción tradicionales de cantidad y calidad (macro-componentes y elementos celulares) ya no son suficientes para asegurar una adecuada rentabilidad de las explotaciones. Como resultado de ello, especialmente el sector del vacuno lechero, se está viendo afectado por importantes cambios estructurales (i.e. aumento del tamaño de las explotaciones) y de estrategia productiva (i.e. variación de la frecuencia de ordeño), a los que se han unido nuevos aspectos de calidad y seguridad alimentaria.

Este es el caso de la exigencia de trazabilidad (i.e. programa español 'letra Q'); la certificación de leche bio ('orgánica'), que garantiza el uso exclusivo de alimentos convencionales y la ausencia de residuos de productos medicamentosos o contaminantes; la modificación del perfil de lipídico (i.e. ácidos poli-insaturados  $\omega$ -3, ácido linoleico conjugado); y del interés por la reducción de componentes lácteos que pueden resultar alérgicos o peligrosos para una parte de los consumidores (i.e. lactosa, metabolitos de la  $\beta$ -caseína A1).

Lo que resulta evidente a lo largo de su historia, es que el sector de vacuno lechero mundial es uno de los sectores ganaderos más dinámicos y que ha demostrado una mayor capacidad para integrar rápidamente los cambios tecnológicos. Claro ejemplo de ello son

los avances en mecanización (i.e. máquinas y robots de ordeño), tecnología de la reproducción (i.e. inseminación artificial, transplante de embriones,...), alimentación (i.e. raciones integrales, nutrientes protegidos,...) y manejo (i.e. cubriciones sincronizadas, secado, inducción de lactación, variación del número de ordeños,...), por lo que la información disponible sobre los últimos avances que puedan resultar aplicables a la producción de ganado vacuno lechero tiene una especial relevancia.

En este sentido, en el año 2006 se ha celebrado el centenario de ADSA (American Dairy Science Association) que ha realizado el esfuerzo por resumir los avances recientes y las necesidades futuras en materia de fisiología aplicada y alimentación, en el caso de los ruminantes lecheros. Los avances producidos en estos 100 años y destacados por ADSA corresponden principalmente a los asociados a los conocimientos sobre:

- Control del crecimiento mamario y de la lactación.
- Biosíntesis de los componentes lácteos.
- Nutrición fundamental de vacuno lechero.
- Efectos de la nutrición en la composición de leche.
- Efectos ambientales en la producción de leche.

Otro aspecto de relevancia en la producción de vacuno lechero es que la mejora de la rentabilidad de las explotaciones puede conseguirse mediante la utilización sistemas productivos, aparentemente contrapuestos, que utilizan la intensificación y la extensificación, tal como ocurre paradigmáticamente en California (mayores niveles de producción) y Nueva Zelanda (menores costes de producción), respectivamente. En la práctica esto supone utilizar condiciones de explotación en las que el máximo beneficio se obtiene con combinaciones ‘raza-manejo-alimentación’ totalmente diferentes. Esta aparente contradicción de medios de producción puede explicarse coherentemente a partir de la ecuación que expresa la respuesta fenotípica de un carácter productivo, según la cual:

$$\text{Fenotipo} = \text{Genotipo} + \text{Ambiente}$$

Según esta ecuación, un conocimiento detallado del genotipo permitiría proporcionar el ambiente adecuado (i.e. alimentación y manejo) para conseguir la respuesta fenotípica (i.e. producción) deseada. Sin embargo, la mayor parte de los esfuerzos de investigación realizados hasta la fecha para evaluar la respuesta animal a la alimentación (o al manejo) se han visto abordados exclusivamente desde un punto de vista ‘Fenómico’ (respuesta productiva aparente), lo que indudablemente ha limitado el progreso y la comprensión profunda del problema. En la práctica, se ha intentado reducir el impacto de esta importante objeción con el uso de genotipos animales y condiciones de explotación lo mas homogéneos posibles, lo que, en el caso del vacuno lechero, ha propiciado la generalización de sistemas productivos intensivos y de la raza Holstein Friesian.

En consecuencia, para tener una visión completa del problema, en toda investigación en la que se pretenda evaluar la respuesta animal, debería incluirse un conocimiento profundo del genotipo, lo que lleva actualmente a la utilización de la 'Genómica'. Pasamos así de una aproximación tradicional (y parcial) de la nutrición animal que se puede denominar 'Nutri-fenómica', a otra actual, mas completa, en la que resulta imprescindible evaluar el efecto modificador de los genes en la respuesta observada y que se denomina 'Nutri-genómica'.

## 2.- CONTROL DEL CRECIMIENTO MAMARIO Y DE LA LACTACIÓN

El sector lechero se ha visto enormemente beneficiado por la aplicación práctica de los resultados del trabajo de muchos investigadores en las últimas décadas. Los principales aspectos estudiados se refieren a:

- Crecimiento y desarrollo mamario (mamogénesis)
- Desencadenamiento de la secreción (lactogénesis)
- Producción de leche (galactopoyesis)

Excelentes revisiones sobre los mecanismos de acción de las principales hormonas implicadas en la función mamaria han sido publicadas por Akers (1985, 2002), entre otros autores. Entre las principales aplicaciones prácticas de estos avances en el conocimiento destacan: las técnicas de sincronización de celos y de inducción artificial de la lactación, los métodos manejo durante la transición del periodo seco al inicio de lactación y, de una forma especial, el uso de la hormona de crecimiento (GH) en vacas lecheras (Bauman, 1999; Collier et al., 2001).

Aunque no hay duda que, tal como su nombre indica, la prolactina (PRL) es una de las hormonas mas importantes y estudiadas en relación a la producción de leche, su papel en la mamogénesis, en comparación con la GH, no está todavía plenamente esclarecido y parece ser dependiente de la especie animal (Akers, 2006). La relación positiva de la PRL con la duración del día (fotoperiodo) explica actualmente las mayores respuestas productivas obtenidas en primavera y verano, respecto al invierno, y el interés de aplicar tratamiento luminosos al final de la gestación (Collier et al., 2006). Por otro lado, existe un acuerdo general de que PRL y los glucocorticoides son básicos para el inicio de la lactogénesis y en el control de la expresión de los genes implicados en la síntesis de las proteínas lácteas (Akers, 2006).

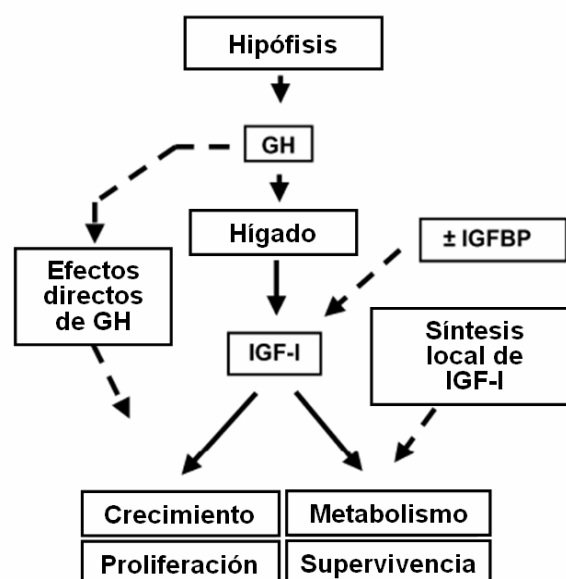
Pero, la hormona que ha merecido mayor atención en los últimos años ha sido la GH, especialmente por el marcado efecto galactopoyético observado en la práctica con la somatotropina recombinante bovina (bST). El efecto de la GH está mediado por factores

de crecimiento o somatomedinas (IGFs), en especial IGF-I (estimulante de la producción de leche) y por sus proteínas reguladoras (IGFBP), positivas o negativas (IGFBP3), tal como muestra la Figura 1. De una forma especial deben destacarse los efectos directos mamarios, evidenciada por la presencia de receptores, y la síntesis local de IGF-I recientemente determinadas.

Akers (2006) estima que en 2004 se habían publicado cerca de 6000 artículos científicos sobre el empleo de bST y que, en la actualidad, unos 3 millones de vacas en mas de 50 países usan bST. La respuesta a la GH es de tipo hiperbólico, con un óptimo de 10-15% de leche a una dosis de aproximadamente 40 mg/d (Bauman et al., 1999; Akers, 2006). En la práctica se usa en forma de implantes subcutáneos de liberación lenta (500 mg/vaca a intervalos de 14 d), a partir de los 60 d de lactación, cuando las vacas se aproximan a un balance energético cero. Pese a la controversia surgida en la opinión pública sobre los posibles riesgos del empleo de bST, estos no han podido ser demostrados ni existe un sistema fácil de detección de la leche de las vacas que utilizan bST.

Pero la utilización de ratones y cultivos celulares para la investigación de los mecanismos de acción de las hormonas y su relación con factores de crecimiento (IGF), ha abierto nuevos campos referidos a los factores de transcripción, los receptores (PRL-R, GH-R), los intermediarios de la señal intracelular (IGFBP), y determinadas moléculas extracelulares, cuya expresión está regulada por genes y que finalmente determinarán el tamaño y la capacidad funcional de la glándula mamaria.

**Figura 1.- Hipótesis modificada de la acción de la somatomedina IGF-I (insulin-like growth factor) sobre la glándula mamaria (Akers, 2006)**



El descubrimiento de la hormona leptina, producida por el tejido graso y con importantes efectos reguladores sobre el apetito, ha tenido importantes repercusiones en relación al tejido mamario. La glándula mamaria expresa receptores de la leptina y su tejido graso es capaz de segregar localmente leptina, lo que le confiere propiedades autocrinas y paracrinas (Akers, 2006). De una forma especial, la leptina inhibe a IGF-I, lo que es contrario al desarrollo y proliferación del tejido mamario (Silva et al., 2003) y en cuya función pare esencial la activación del gen STAT3. Este mecanismo explica en gran parte los efectos negativos de raciones de alto contenido energético en el desarrollo y posterior funcionalidad de la glándula mamaria.

Sin embargo, tal como ha señalado Akers (2006), el número de investigadores interesados en el estudio mamario de animales de granja ha disminuido notablemente en los últimos años. Esto se debe por un lado a que, ante la necesidad de obtener fondos competitivos para investigación, una gran parte de los investigadores pertenecientes a universidades, centros nacionales y privados, han cambiado su temática de trabajo y se han centrado en el estudio de los mecanismos fundamentales y el funcionamiento celular profundo del epitelio mamario utilizando como modelo de investigación el ratón o líneas celulares de cáncer mamario. En la práctica, el abandono de líneas de investigación aplicada en rumiantes lecheros supone un riesgo respecto al futuro desarrollo del conocimiento y de nuevas técnicas que permitan nuevos avances de un recurso tan importante para la producción ganadera como es la vaca lechera, tal como ha cuestionado de forma específica Akers (2006).

### **3.- BIOSÍNTESIS DE LOS COMPONENTES LÁCTEOS**

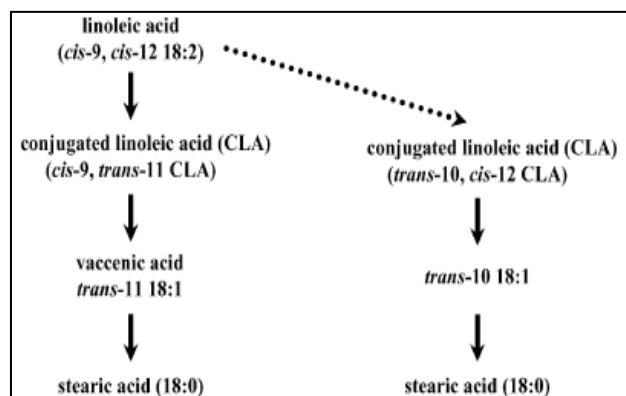
En la revisión realizada por Bauman et al. (2006) se destaca el increíble nivel de organización y la asombrosa capacidad de síntesis de componentes lácteos que posee la glándula mamaria para convertir los nutrientes que circulan en la sangre en componentes lácteos. Los principales avances conseguidos en relación a la biosíntesis de los componentes lácteos corresponden a la mejora de la comprensión de:

- Mecanismo intracelular de síntesis de la grasa láctea y de la identidad y funciones de las proteínas de la membrana del glóbulo graso.
- Composición de la grasa láctea y su relación con la composición de la ración, los procesos digestivos en el rumen y la regulación de la síntesis mamaria de grasa.
- Calidad nutritiva de la grasa láctea e identificación de componentes ‘bioactivos’ con potencial para la mejora de la salud humana.
- Utilización a los animales como ‘biorreactores’ para la producción de proteínas de interés farmacológico (‘pharming’).

La grasa láctea resulta fundamental para explicar las propiedades físicas y las características organolépticas de los productos lácteos. En este sentido, en los últimos 25 años se han producido importantes avances en el conocimiento del origen intracelular de las inclusiones citoplasmáticas de grasa en las células epiteliales mamarias y de la identidad y las funciones de las proteínas de la membrana del glóbulo de grasa en la secreción y estabilización del glóbulo de grasa libre en la leche.

El mecanismo descrito por Bauman et al. (2006) para la síntesis mamaria de grasa indica que la grasa láctea es sintetizada en forma de tri-acil-glicéridos mediante la acción de la enzima 'fatty acid transferase' (FAT) fijada a la membrana del retículo endoplasmático rugoso. A continuación se segrega en el citoplasma en forma de pequeñas gotas (0.5  $\mu\text{m}$ ) de 'microlípidos', donde son recubiertas por proteínas y lípidos polares segregados por la membrana del retículo endoplasmático (Mather y Keenan, 1998; Mather, 2000). Esta membrana es llamada 'membrana interna' del glóbulo de grasa. Las pequeñas gotas de grasa se ven sometidas a un proceso de fusión durante su migración en el citoplasma hacia el polo apical de la célula epitelial mamaria, donde reciben una segunda membrana o 'membrana externa' del glóbulo de grasa constituida por proteínas y fosfolípidos de la membrana celular. El análisis de las proteínas de la membrana ha revelado la presencia de mucinas (MUC1 y MUC15), las proteínas adipofilina y butirofilina, y la enzima xantina dehidrogenasa/oxidasa. Las dos últimas parecen ser esenciales para la secreción del glóbulo de grasa, de forma que ratones 'knokout' (a los que se les ha suprimido el gen productor de la proteína) son incapaces de producir glóbulos de grasa y como resultado acumulan lípidos en el citoplasma (Ogg et al., 2004). Uno de los aspectos que ha merecido más atención en los últimos años es el que se refiere a la relación entre la composición de la grasa láctea y la composición de la ración, su transformación en los procesos digestivos ruminales y su relación con la regulación de la síntesis mamaria de grasa. En este sentido merece especialmente destacarse el trabajo realizado por Bauman y Griinari (2003) sobre las vías metabólicas seguidas en la biohidrogenación de los ácidos grasos poli-insaturados en el rumen.

**Figura 2.- Vías metabólicas de biohidrogenación del ácido linoleico en el rumen en condiciones normales (izquierdo) y en el caso de la inducción del síndrome de depresión de grasa (Bauman y Griinari, 2003)**



Como resultado de la preocupación del consumidor por la relación entre dieta y salud, la calidad nutritiva de la grasa láctea resulta también hoy un aspecto relevante. Una de las principales razones que justifican la disminución del consumo de productos lácteos en muchos casos el perfil saturado de una parte importante de sus ácidos grasos. Sin embargo, descubrimientos recientes han identificado diversos componentes ‘bioactivos’ en la leche con un gran potencial para la mejora de la salud humana (Cuadro 1).

**Cuadro 1.- Componentes bioactivos de la leche que tienen acción específica mejoradora de la salud humana (Bauman et al., 2006).**

Función específica en	Componentes lácteos		
	Proteínas	Lípidos	Otros
Cáncer	Proteínas del suero Caseína Lactoferrina $\alpha$ -lactoalbúmina Péptidos	Ác. linoleico conjugado Ác. vaccénico Esfingolípidos Ac. butírico Ac. 13-metil tetradecanoico Extracto lipídico con éter	Ca Lactosa Vitaminas A y D Oligosacáridos Nucleósidos Probióticos
Cardio-vascular	Proteínas del suero Caseína	Ac. linoleico conjugado Ac. esteárico Ác. grasos $\omega$ -3	Ca Vitamina D
Hipertensión	Proteínas del suero	-	Ca, K
Inmunidad	Proteínas del suero Proteínas de la membrana glóbulo graso	Ac. linoleico conjugado	Probióticos
Hueso	Péptidos	Ac. linoleico conjugado	Ca, P Vitamina K

#### 4.- NUTRICIÓN FUNDAMENTAL DE VACUNO LECHERO

Los avances en relación a la nutrición fundamental de las vacas lecheras, revisados por Drackley et al. (2006), se refieren en especial a los estudios sobre las reacciones bioquímicas complejas implicadas en la digestión y asimilación de los nutrientes en distintos tejidos y órganos, así como a la cuantificación del flujo de nutrientes. En los últimos años se han producido importantes avances a todos los niveles de la organización biológica, incluyendo a todo el animal, sistemas y órganos, tejidos, células, e incluso moléculas.

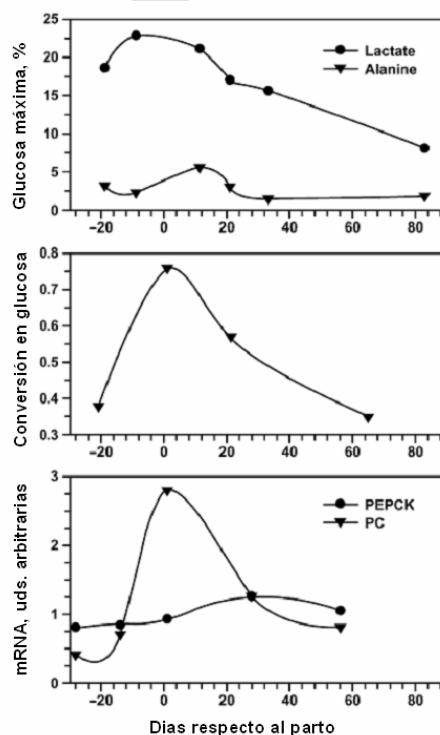
De una forma particular, los mayores progresos se han producido en el conocimiento de los cambios metabólicos que ocurren a nivel del animal, durante el final

de gestación e inicio de la lactación (Greenfield et al., 2000; Blouin et al., 2002; Reynolds et al., 2003), así como en la utilización de distintos nutrientes para y los aminoácidos para el crecimiento de terneros jóvenes (Díaz et al., 2001; Blome et al., 2003). La utilización masiva de técnicas de investigación basadas en la multicateterización ha permitido mejorar las descripciones cuantitativas del uso de los distintos nutrientes en los tejidos de las vísceras drenadas por la vena porta (digestivo, páncreas, y tejidos finos adiposos asociados) y en el hígado.

Otra importante fuente de progreso en el conocimiento del metabolismo ha sido el uso de preparaciones aisladas de tejidos, en especial de hígado (Hanigan et al., 2004) y glándula mamaria, lo que ha proporcionado importante información sobre las relaciones entre glucosa, ác. grasos y aminoácidos en hígado, tejido fino adiposo, así como sobre su regulación en distintos estados fisiológicos.

La Figura 3 muestra un ejemplo de cómo los datos de diferentes estudios, utilizando distintos enfoque, pueden aportar importante información complementaria de un mismo hecho (Drackley et al., 2006). Los datos de muestran que la contribución de la alanina y el lactato a la síntesis de glucosa en el hígado de las vacas lecheras son máximos alrededor del parto, y que esta contribución está regulada por la enzima piruvato carboxilasa (PC). Como se puede observar en la figura, la expresión del mRNA de la PC obtenida por medio de una biopsia hepática es máxima en torno al parto, mientras la fosfoenol-piruvato carboxilasa (PEPCK) aumenta paulatinamente al avanzar la lactación.

**Figura 3. Contribución de la alanina y lactato a la síntesis de glucosa y expresión de la actividad enzimática de la piruvato carboxilasa (PC) y la fosfoenol-piruvato carboxilasa (PEPCK) en vacas lecheras alrededor del parto (según Drackley et al. , 2006)**





## 5.- EFECTOS DE LA ALIMENTACIÓN EN LA COMPOSICIÓN DE LECHE

Debido a la mayor sensibilidad de respuesta de la grasa láctea, respecto a la proteína o la lactosa, la manipulación y control de la cantidad de grasas en la ración y de su perfil en ácidos grasos ha recibido mucha atención (Jenkins y McGuire, 2006). Los nuevos enfoques han sido consecuencia del estudio de las vías metabólicas seguidas en el rumen durante la biohidrogenación y en el síndrome de depresión de la grasa en leche anteriormente citados (Bauman y Griinari, 2002).

Por otro lado, el desarrollo de grasas protegidas (Palmquist et al., 1993), diseñadas para resistir la biohidrogenación ruminal y aumentar la concentración de ácidos grasos poli-insaturados en la leche ha tenido una gran relevancia. El descubrimiento del papel anticarcinogeno del ácido linoleico conjugado (CLA) también ha llevado a intentar aumentar su contenido en leche y a descubrir los efectos fisiológicos especiales de sus isómeros.

Por el contrario, los cambios en la concentración de la lactosa de la leche sólo se producen en situaciones de alimentación extremas o anormales, pero la biología básica de la síntesis y de la regulación de la lactosa todavía se está explorando utilizando técnicas moleculares modernas. En la práctica la relación entre la síntesis de lactosa y la  $\alpha$ -lactoalbúmina hacen muy difícil variar su contenido en la leche, por lo que se trabaja en procedimientos de ultrafiltración en la industria lechera.

## 6.- NUTRIGENÓMICA

Las ciencias básicas desarrolladas en la era de la 'Biómica' son la Genómica (referida al DNA), la 'Transcriptómica' (referida al RNA), Proteómica (proteínas), Metabolómica (metabolitos) y la 'Biología de Sistemas' que las integra a todas por medio de la 'Bioinformática'.

Aunque especialmente centrada en la nutrición humana, la 'Nutrigenómica' es una nueva ciencia que nace como resultado de la aplicación de los métodos de trabajo de la genómica a la nutrición. De una forma especial integra los avances y, de una forma especial, los métodos de trabajo de alto rendimiento de la Genómica (identificación y efectos de los genes), Proteómica (efectos de los genes sobre las proteínas) y Metabolómica (efectos de los genes sobre los metabolitos), con los de la Nutrición convencional. Sus primeros logros han sido una mayor comprensión de los efectos de la nutrición sobre los procesos de utilización y vías metabólicas seguidas por los nutrientes y sobre el control homeostático del organismo.

La Nutrigenómica tiene como objetivo final la adaptación de la nutrición al perfil genético de los individuos para así optimizar su salud y mejorar la eficacia de los procesos

fisiológicos normales (Muller y Kersten, 2003). Esto lleva al concepto de alimentación individualizada y al diseño de nuevos alimentos, tal como ya actualmente ocurre en el caso de la Farmacogenómica, que ha llevado a la aplicación de los medicamentos a medida o ‘de diseño’, y a una ‘medicina personalizada’. Su aplicación a la producción de leche ha abierto grandes expectativas que están siendo exploradas en la actualidad.

Un ejemplo de gran interés es el estudio comparado de los genes que se expresan en la glándula mamaria y en otros tejidos, en condiciones normales y extremas de alimentación (Chilliard et al., 2005; Medrano et al., 2006).

## 7.- REFERENCIAS

- AKERS, R.M. (1985) *J. Dairy Sci.* 68:413–437.
- AKERS, R.M. (2002) *En: Lactation and the mammary gland*. Iowa State Press. Ames, Iowa, USA.
- AKERS, R.M. (2006) *J. Dairy Sci.* 89: 1222–1234.
- AKERS, R.M., MCFADDEN, T.B., PURUP, S., VESTERGAARD, M., SEJRSEN, K. y CAPUCO, A.V. (2000) *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 5: 43–51.
- BAUMAN, D.E. (1999) *Domest. Anim. Endocrinol.* 17: 101–116.
- BAUMAN, D.E. y GRIINARI, J. M. (2003) *Annu. Rev. Nutr.* 23: 203–227.
- BAUMAN, D.E., MATHER, I.H., WALL, R.J. y LOCK, A.L. (2006) *J. Dairy Sci.* 89: 1235–1243.
- BLOME, R.M., DRACKLEY, J.K., MCKEITH, F.K., HUTJENS, M.F. y MCCOY, G.C. (2003) *J. Anim. Sci.* 81: 1641–1655.
- BLOUIN, J.P., BERNIER, J.F., REYNOLDS, C.K., LOBLEY, G.E., DUBREUIL, P. y LAPIERRE, H. (2002) *J. Dairy Sci.* 85: 2618–2630.
- COLLIER, R.J., BYATT, J.C., DENHAM, S.C., EPPARD, P.J., FABELLAR, A.C., HINTZ, R.L., MCGRATH, M.F., MCLAUGHLIN, C.L., SHEARER, J.K., VEENHUIZEN, J.J. y VICINI, J.L. (2001) *J. Dairy Sci.* 84: 1098–1108.
- COLLIER, R.J., DAHL, G.E. y VANBAALE, M.J. (2006) *J. Dairy Sci.* 89: 1244–1253.
- DIAZ, M.C., VAN AMBURGH, M.E., SMITH, J.M., KELSEY, J.M. y HUTTEN, E.L. (2001) *J. Dairy Sci.* 84: 830–842.
- DRACKLEY, J.K., DONKIN, S.S. y REYNOLDS, C.K. (2006) *J. Dairy Sci.* 89: 1324–1336.
- GREENFIELD, R.B., CECAVA, M.J. y DONKIN, S (2000). *J. Dairy Sci.* 83: 1228–1236.
- HANIGAN, M.D., CROMPTON, L.A., REYNOLDS, C.K., WRAY-CAHEN, D., LOMAX, M.A. y FRANCE, J. (2004) *J. Theor. Biol.* 228: 271–289.
- JENKINS, T.C. y MCGUIRE, M.A. (2006) *J. Dairy Sci.* 89: 1302–1310.
- MATHER, I.H. (2000). *J. Dairy Sci.* 83: 203–247.
- MATHER, I.H. y KEENAN, T.W. (1998) *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 3: 259–273.

- MEDRANO, J.F., ISLAS-TREJO, A., RINCON, G. y VERDUGO, R. (2006) *J. Dairy Sci.* *en prensa*.
- MÜLLER, M. y KERSTEN, S. (2003) *Nat. Rev. Genet.* 4: 315-322.
- OGG, S.L., WELDON, A.L., DOBBIE, L., SMITH, A.J.H. y MATHER, I.H. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 10084–10089.
- PALMQUIST, D.L., BEAULIEU, A.D. y BARBANO, M. (1993) *J. Dairy Sci.* 76: 1753–1771.
- REYNOLDS, C.K., AIKMAN, P.C., LUPOLI, B., HUMPHRIES, D.J. y BEEVER, D.E. (2003) *J. Dairy Sci.* 86: 1201–1217.
- SILVA, L.F.P., VANDERHAAR, M.J., WEBER NIELSEN, M.S. y SMITH, G.W. (2002) *J. Dairy Sci.* 85: 3277–3286.

FEDONA