

CARACTERÍSTICAS DE LA LECHE DE VICUÑA (MAMMALIA, CAMELIDAE)

**Francisco M. Fernández^{1,2}, Silvia Saad¹, Miguel Calvo³,
Arturo Canedi⁴ y Marcela Hernández²**

¹Facultad de Ciencias Naturales e Instituto M. Lillo (UNT) Miguel Lillo 205; 4000 Tucumán, Argentina. Tel/Fax 081-330516; ²Fundación Miguel Lillo, Miguel Lillo 251; 4000 Tucumán, Argentina; ³Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España; ⁴ Estación de Fauna Silvestre, Universidad Nacional de Jujuy, Argentina.

RESUMEN: Se presentan los resultados sobre la composición de la leche de vicuñas, con especial referencia a sus proteínas. Las muestras fueron obtenidas del rebaño perteneciente al INTA-Abrapampa (Jujuy, Argentina). Los valores encontrados fueron los siguientes: proteínas totales: 3.70 ± 0.98 g%; caseínas: 3.17 ± 0.87 g%; proteínas del lactosuero: 0.53 ± 0.17 g%; lípidos: 4.58 ± 1.35 g%; glúcidos: 7.43 ± 0.75 g%; calcio 0.128 ± 0.022 g%; pH: 7.022 ± 0.141 . Mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS e inmunoblotting se evidencia la presencia de tres bandas mayores de caseínas y trece bandas menores, de distinto peso molecular; asimismo las corridas electroforéticas mostraron que las dos proteínas del lactosuero (PLS) más importantes son la α -lactalbúmina y la seroalbúmina. También se detectaron 17 bandas menores de proteínas en el lactosuero. No se detectó la presencia de β -lactoglobulina por los procedimientos empleados.

SUMMARY: Characteristics of vicugna's (Mammalia, Camelidae) milk. The aim of this work is to know the general characteristics of vicugna milk with special reference to lactic proteins, their types and concentration. Milk samples were obtained from INTA-Abrapampa vicuñas' breed. Glucids, proteins, lipids, calcium and pH were determined according cited methods. Proteins analyses were carried out through SDS polyacrylamide gel electrophoresis, scanning of the gels and immunoblotting. Results about gross composition showed the following: total proteins 3.70 ± 0.98 g%; caseins 3.17 ± 0.87 g%; lactoserum proteins 0.53 ± 0.17 g%; lipids 4.58 ± 1.35 g%; glucids 7.43 ± 0.75 g%; calcium 0.128 ± 0.022 g%; pH 7.022 ± 0.141 . PAGE-SDS showed three major and thirteen minor casein bands. Likewise, lactoserum proteins evidenced through this method 19 bands, two of which, serumalbumin and α -lactalbumin, were the most notorious. No β -lactoglobulin was detected in vicugna milk. The latest proteins were analyzed by western-blotting.

Palabras clave: proteínas lácteas, vicuña, camélidos, caseínas, proteínas lactoséricas, composición láctea.

Key words: milk proteins, vicugna, camelids, caseins, lactoserum proteins, milk composition.

INTRODUCCION

Las proteínas de la leche constituyen un grupo de compuestos con funciones nutritivas, de acción hormonal y defensiva para la cría (Neville y Daniel, 1987; Mestecky et al., 1991; Donovan y Odle, 1994). Existe una gran variabilidad interespecífica que refleja influencias adaptativas ambientales, comportamentales y taxonómicas (Jeness, 1982; Oftedal, 1984). En lo que respecta a la fisiología de la lactación y bioquímica de estos componentes, los mayores avances se han efectuado en bovinos, caprinos y roedores de laboratorio. Por otra parte, la mayor información sobre los camélidos en el tema proviene de los correspondientes al género *Camelus* del viejo mundo. En este sentido la fisiología de los camélidos sudamericanos constituye un campo de investigación en el que sólo recientemente se han empezado a conocer detalles de las características de la lactación y de los componentes de la secreción láctea.

El objetivo del presente trabajo fue determinar las características principales de la leche de vicuña (*Vicugna vicugna*), como así también los tipos más importantes de proteínas presentes en ésta.

MATERIALES Y METODOS

Las muestras se extrajeron de animales pertenecientes al rebaño que el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Argentina posee en la Estación Experimental de Abrapampa (Provincia de Jujuy) a 3200 m snm y en la cual aquéllos son criados en condiciones de semicautiverio. Las muestras se obtuvieron en oportunidad de llevarse a cabo uno de los dos principales arreos anuales para control (mayo de 1995). Durante la experiencia las vicuñas hembras permanecían con sus crías y eran separadas solamente en el momento del control, lapso siempre menor a dos horas. Las edades de las madres estaban comprendidas entre 3 y 6 años y el tiempo de lactación entre uno y dos meses. Se obtuvieron 15 muestras correspondientes a siete animales en dos días consecutivos. Las muestras eran extraídas mediante ordeño manual previa inyección de 0,1 U de oxitocina. De cada muestra se extrajo una cantidad media de 30 mL. A cada muestra se le agregó una gota de bicromato de potasio al 1% como conservador y se guardaron en hielo hasta su congelamiento a -20°C al día siguiente, previa de-

terminación del pH en un peachímetro Metrohm 704. Ninguna de las hembras mostraba signos externos de lesión mamaria o mastitis. Tampoco hubo accidentes ni problemas derivados del manejo.

Las corridas electroforéticas en geles de poli-acrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS) se efectuaron de acuerdo a Laemmli (1970), y las correspondientes en presencia de urea según Harris and Angal (1989). Los procedimientos para transferencia de proteínas desde los geles de acrilamida y posterior detección mediante anticuerpos (immunoblotting) se llevaron a cabo según Tijssen (1985) y las recomendaciones de fabricantes (Millipore). Para la detección por immunoblotting de la β -lactoglobulina se utilizaron anticuerpos policlonales anti- β -Lg bovina producidos en conejos (Dto Producción Animal, Fac.Veterinaria, Universidad de Zaragoza).

Las determinaciones cuantitativas de proteínas se llevaron a cabo según Lowry et al. (1955), las de glúcidos según Winzler (1955) y las de lípidos, basada en la extracción por solventes, de acuerdo a Kates (1972). El método de Lowry es ventajoso en los casos en que se cuenta con muestras de pequeños volúmenes y no se pueden hacer controles adicionales, pues es una mejor estimación de las proteínas que las resultantes de los métodos que dosan el nitrógeno total, toda vez que estos últimos pueden sobrestimar las proteínas si la especie, no estudiada anteriormente como es nuestro caso, tuviere una cantidad de urea significativa en la leche. Asimismo la utilización de la extracción por solventes mostró en ensayos previos una altísima correlación lineal con el método de Rose-Gotlieb ($r=0,995$), lo que lo hace completamente confiable en la cuantificación de lípidos. El aislamiento de la α -La se llevó a cabo según el método de Richter (1973), que demostró ser eficaz para la α -La de llama (Fernández y Oliver, 1992).

La densidad de cada banda electroforética se determinó mediante scanning y análisis densitométrico por computadora. En los casos en los que el sistema de detección no discriminó entre dos bandas, ello se indica en las tablas como suma de éstas.

El tratamiento con quimosina se efectuó incubando caseína ácida resuspendida en buffer imidazol 50 mM, pH 6,80, durante 20 min a 37°C, en una relación 1/1000 respecto a la concentración de caseína. La precipitación de β -Cn se llevó a cabo según lo recomendado por McKenzie (1967) para β -Cn bovina que demostró ser adecuado para la β -Cn de llama (Fernandez y Oliver, 1988).

La determinación de actividad de lactoperoxidasa se llevó a cabo según Marshall et al. (1986).

El contenido de calcio se determinó con un kit comercial (Laboratorios Wiener, Argentina) basado en la captura del catión por la cresolfaleína-complexona.

RESULTADOS

En la **Tabla 1** se muestran las concentraciones de los componentes mayores de la leche de vicuña

En la **Figura 1**, correspondiente a una corrida electroforética PAGE-SDS de distintos animales, se muestran las bandas proteicas de leche entera, caseínas y proteínas del lactosuero (PLS) que migran de acuerdo a sus pesos moleculares.

En las **Tablas 2 y 3** se muestran los pesos moleculares aproximados de las proteínas que se observan en las corridas electroforéticas efectuadas. Con respecto a las PLS se observa que las dos bandas de mayor intensidad corresponden a proteínas con migración idéntica a la α -La aislada del lactosuero de vicuña y a la seroalbúmina de la sangre de vicuña.

Lo mismo fue observado en las corridas electroforéticas en presencia de urea.

También se observa en el lactosuero una banda de peso molecular 78.000 ± 3.000 Da que probablemente corresponda a la Lf. Asimismo, por la técnica de inmunodot se detectó una proteína que reacciona con los

Tabla 1. Principales componentes de la leche de vicuña.
Major compounds of vicugna milk.

Variable 1	Concentración
Proteínas Totales	$3,705 \pm 0,976$ gr/100 mL
Proteínas Lactosuero	$0,535 \pm 0,170$ gr/100 mL
Caseínas	$3,170 \pm 0,866$ gr/100 mL
Glúcidos	$7,429 \pm 0,748$ gr/100 mL
Lípidos	$4,582 \pm 1,354$ gr/100 mL
pH	$7,022 \pm 0,141$
Calcio	$0,128 \pm 0,022$ gr/100 mL

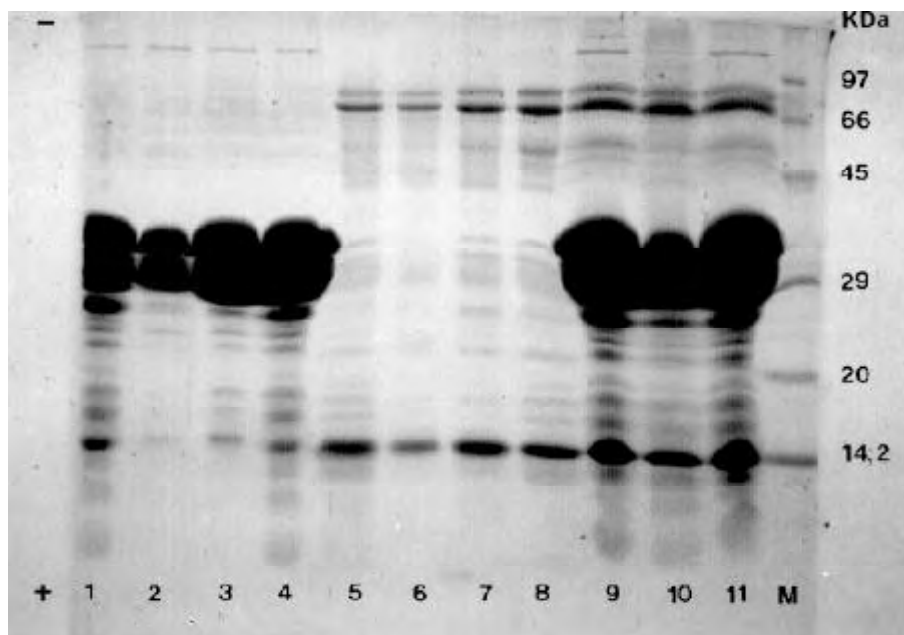


Fig. 1. Electroforesis en PAGE-SDS. 1-4: caseínas, 5-8: PLS, 9-11: leche entera, M: marcadores de peso molecular (14,2; 20; 29; 45; 66; y 97 kDa). En cada columna se sembraron cantidades equivalentes a su concentración en la secreción láctea.

PAGE-SDS of milk proteins. 1-4: caseins, 5-8: PLS, 9-11: whole milk, M: molecular weight markers (14.2; 20; 29; 45; 66 y 97 kDa). Each well was laid with equivalent amounts to original milk.

anticuerpos anti-lactoferrina humana. No se destaca ninguna banda proteica importante en la zona comprendida entre 16.000 a 18.000 Da que sea común a todas las muestras estudiadas. De la misma manera los ensayos de inmunoblotting para detectar la presencia de β -Lg no reaccionaron con ninguna banda del lactosuero de vicuña.

Entre las PLS se evidencian 7 u 8 bandas de muy pequeña intensidad y de migración similar a las caseínas. Las cuantificaciones de las bandas de PLS demostraron que las correspondientes a la α -La y a la SA representan el 26% y el 25% respectivamente del total de estas proteínas. Para el resto de las proteínas, las concentraciones varían dentro de valores menores a los citados (**Tabla 2**).

En cuanto a las caseínas es notoria la diferencia cuantitativa de éstas respecto a las proteínas del lactosuero (**Tabla 1**). Se destaca

Tabla 2. Bandas de proteínas del lactosuero obtenidas por electroforesis en PAGE-SDS. Pesos moleculares aproximados y porcentajes de concentración de cada una.

Proteins lactoserum bands obtained by PAGE-SDS. Approximate molecular weight and concentration percentage for each band.

Bandas de PLS	p.m.(Da)	% del Total de PLS
I (Lf)	78.000	8.1
II (SA)	66.000	24.9
III	62.000	<0.3
IV	50.000	<0.3
V	45.000	9.8
VI	42.000	2.4
VII	34.000	0.6
VIII	26.000	5.3
IX	25.000	6.3
X	24.500	
XI	24.000	(X+XI) 5.4
XII	22.000	1.6
XIII	21.500	2.5
XIV	17.500	<0.3
XV	16.500	2.4
XVI	16.000	1.7
XVII(α -La)	14.800	26.3
XVIII	14.000	1.4
XIX	13.200	0.3

asimismo la presencia de, por lo menos, 16 bandas de caseínas de distinto peso molecular, de las cuales hay tres de gran intensidad cuyos pesos están comprendidos entre 28 y 32 KDa. Estas bandas más intensas y otras ocho de menor intensidad también se observan en las corridas en presencia de urea. En los geles de las corridas en PAGE-SDS se observó una banda de peso molecular superior a 100 KDa que coprecipitaba con las caseínas y no se la encontraba en el lactosuero. El procedimiento de precipitación diferencial para separar β -Cn (y sus derivadas las γ -caseínas) del resto de las caseínas mostró que varias de las bandas precipitan en las condiciones en que precipitan las caseínas β . Por otra parte el tratamiento con quimosina no disminuye el número de estas bandas. En realidad se observan 2-3 bandas adicionales después de dicho tratamiento. Debemos agregar que la quimosina coagula la leche de vicuña en tiempo similar al correspondiente a la leche bovina. Las concentraciones de cada una de las bandas de Cn se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Bandas de caseínas obtenidas por electroforesis en PAGE-SDS. Pesos moleculares aproximados y porcentaje de concentración de cada una.

Caseins bands obtained by PAGE-SDS. Approximate molecular weight and concentration percentage for each band

Bandas de Caseínas	p.m.(Da)	% del Total de Cn
I	>100.000	1,1
II	32.000	43,5
III	29.500	
IV	28.500	(III+IV) 43,0
V	25.000	6,0
VI	24.500	<0,3
VII	22.200	1,3
VIII	21.500	0,8
IX	20.000	<0,3
X	18.500	1,2
XI	17.000	<0,3
XII	16.000	1,8
XIII	14.000	<0,3
XIV	13.200	<0,3
XV	12.000	0,5
XVI	11.000	0,3

Las determinaciones de actividad de lactoperoxidasa en lactosuero proporcionaron un valor de 0,76 U/mL.

DISCUSION

Los valores de los componentes mayores de la leche de vicuña difieren de los correspondientes al resto de los artiodáctilos. En este sentido hay que destacar algunas peculiaridades. Los valores de glúcidos son los más altos publicados hasta ahora entre los animales del orden citado. Debido al hecho de que los incrementos en los valores de lactosa generalmente se acompañan de aumentos en el volumen de leche que se produce (Walstra y Jenness, 1987; Faulkner and Peaker, 1987) cabría esperar un mayor volumen de leche y una concentración relativamente menor de materia seca. Ello se refleja en un porcentaje de lípidos ($4,58 \pm 1,35\%$) que si bien es superior al de las especies domésticas del Orden, es baja en relación a las especies silvestres ($8,0 \pm 1,7\%$) (Ofteidal, 1984). No obstante, hay que señalar que el valor obtenido se asemeja a los registrados en *Camelus bactrianus* (4,35%) (Ofteidal, 1984) y *Lama glama* (4,72%) (Fernández y Oliver, 1988). El valor calórico total correspondiente a la suma de los componentes principales es de 0,928 Kcal/gr, el cual es similar al de los otros camélidos mencionados. Como hecho destacable hay que mencionar que la alta concentración de glúcidos señalaría a la vicuña como la especie en la cual la contribución calórica de los hidratos de carbono es la más alta de las registradas entre los mamíferos con la excepción de los primates y perisodáctilos.

La consecuencia es que la leche aporta un valor calórico bastante alto en comparación a los valores conocidos para artiodáctilos, con excepción de las especies de climas árticos. Hay que mencionar el hecho de que las vicuñas viven en un ambiente en el cual la temperatura nocturna invernal es generalmente de varios grados bajo cero. Este contenido calórico relativamente alto probablemente represente una adaptación térmica favorable a la cría.

Los valores de concentración de PLS y Cn encontrados muestran que en esta especie el

número de caseínas (% del total de proteínas) es muy alto, 0,865, el cual es superior a la media conocida de los artiodáctilos más comunes ($N^{\circ} Cn = 0,815 \pm 0,039$) (Parkes, 1967).

La presencia casi dominante de α -La y seroalbúmina parece ser un carácter casi distintivo de la leche de este camélido sudamericano.

Por otra parte, hay que señalar que no se encuentra ninguna banda proteica importante (ni que aparezca en forma constante) en las muestras estudiadas en la zona de peso molecular de 16 a 18 KDa, ni se detectó la presencia de β -Lg mediante la técnica de Western-blotting. Todo ello permite afirmar que no hay β -lactoglobulina en la leche de vicuña o por lo menos que, de existir, sería una proteína que se encuentra en cantidades tan pequeñas que estaría por debajo del límite de detección aun por las técnicas mencionadas. Estaríamos frente a un caso similar al de la leche de llama donde no ha sido posible identificarla (Fernández, 1991; Puyol de León, 1994). Tampoco se ha encontrado esta proteína en la leche de híbrido entre llama y guanaco (Fernández et al., 1991). Estos datos, unidos al hecho de que se considera a la alpaca (*Lama pacos*) una forma descendiente de guanaco y resultante de la domesticación humana (Menegaz et al., 1990, citados por Galliari et al., 1996), indicarían que no se encuentra β -Lg en la leche de los camélidos sudamericanos.

La otra banda de peso molecular ligeramente superior a la seroalbúmina no sería la LPO dado la actividad relativamente baja que hemos encontrado en el lactosuero, por lo menos no sería la forma «hemo» (activa) de la enzima (Dumontet and Rousset, 1983). Creemos que se trata de la lactoferrina detectada por la técnica de inmunodot en nuestras muestras.

Los ensayos mostraron tres bandas mayores (dos de ellas muy importantes) de caseínas (Bandas II, III y IV). De acuerdo a la información disponible sobre caseínas de otros camélidos, *Camelus dromedarius* (Farah y Farah-Riesen, 1985) y *Lama glama* (Fernández

y Oliver, 1988) se ha observado que la α -Cn aislada según el procedimiento de precipitación en medio de urea ácida (Farah y Farah-Riesen, 1985) posee un peso molecular mayor que la β -Cn. Estos antecedentes permitirían hacer suponer que las caseínas de vicuña pueden comportarse en forma similar y ser la banda II una α -Cn y la banda III la β -Cn.

La gran cantidad de bandas menores de caseínas encontradas, podría ser el resultado de una hidrólisis post-traducciona que se llevaría a cabo en la células del epitelio secretor o en la luz del alvéolo de la glándula mamaria. En este último caso podría deberse a la existencia de una gran actividad de la plasmina u otra proteasa láctea. Debe mencionarse que estas bandas menores no son degradadas por la quimosina, evidenciando que no poseen enlaces susceptibles al ataque por esta enzima. Aunque este aspecto permanece por ahora abierto a nuevas investigaciones, de todas maneras la presencia de estas bandas menores parece ser una característica de la especie que merece destacarse.

Los niveles de calcio encontrados corresponden muy bien a los valores teóricos estimados (Jenness, 1979) en función de la concentración de caseína de la especie.

AGRADECIMIENTOS

Al Director, Ing. G. Rebufi, y personal del INTA (Abrapampa), a la Dra. Patricia Black de Décima y a las Srtas. Julieta Carilla y María Inés Fernández por la colaboración y apoyo brindados. A los revisores anónimos.

LITERATURA CITADA

- DONOVAN, S.M. y J. ODLE. 1994. Growth factors in milk as mediators of infant development. *Annual Review of Nutrition*, 14:147-167.
- DUMONTET, CH. y B. ROUSSET. 1983. Identification, purification, and characterization of a non-heme lactoperoxidase in bovine milk. *Journal of Biological Chemistry*, 258:14166-14172.
- FARAH, Z. y M. FARAH-RIESEN. 1985. Separation and characterization of major components of camel milk casein. *Milchwissenschaft*, 40: 669-671.
- FAULKNER, A. y M. PEAKER. 1987. Regulation of mammary glucose metabolism in lactation. *En: The Mammary Gland. Development, Regulation and Function.* (Neville, M.C. and Ch.W. Daniel, eds.). Plenum Press. New York. USA. 625 pp.
- FERNÁNDEZ, F.M. 1991. Proteínas de la leche de llama (*Lama glama L.*) Opera Lilloana N° 38. Centro Editor Fundación Lillo, 70 pp.
- FERNÁNDEZ, F.M. y G. OLIVER. 1988. Proteins present in llama milk. I. Quantitative aspects and general characteristics. *Milchwissenschaft*, 43(5):299-302.
- FERNÁNDEZ, F.M. y G. OLIVER. 1992. Studies on a-lactalbumin in llama milk. *Small Ruminant Research*, 8:97-106.
- FERNÁNDEZ, F.M.; S. SAAD DE SCHOOS y C. REGUILON. 1991. Las proteínas lácteas de llama y guanaco son electroforéticamente similares. *Acta Zoológica Lilloana*, 40(2):135-137.
- GALLIARI, C.A.; U.F.J. PARDIÑAS y F.J. GOIN. 1996. Lista comentada de los mamíferos argentinos. *Mastozoología Neotropical*, 3(1):39-61.
- HARRIS, E.L.V y S. ANGAL. 1989. Protein purification methods: A practical approach. IRL Press. Oxford University Press. England, 317 pp.
- JENNESS, R. 1979. Comparative aspects of milk proteins. *Journal of Dairy Research*, 46:197-210.
- JENNESS, R. 1982. Inter-species comparison of milk proteins. Pp. 87-114. *En: Developments in Dairy Chemistry*. 1. (Fox, P.F., ed.). Applied Science Publishers. London & New York.
- KATES, M. 1972. Techniques of lipidology: Isolation, analysis and identification of lipids. *En: Laboratory techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. North Holland Publishing Company. 610 pp.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 227:680-685.
- LOWRY, O.H.; N.J. ROSENBROUGH, A.L. FARR y R.J. RANDALL. 1955. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193:265-275.
- MARSHALL, V.; W.M. COLE y A.J. BRAMLEY. 1986. Influence of the lactoperoxidase system on susceptibility of the udder to *Streptococcus uberis* infection. *Journal of Dairy Research*, 53:507-514.
- McKENZIE, H.A. 1967. Milk proteins. *Advance in Protein Chemistry*. 22:56-234.
- MESTECKY, J.; C. BLAIR y P.L. OGRA. 1991. Immunology of milk and neonate. *Advance in Experimental Medicine and Biology*. Vol: 310. Plenum Press, New York. 490 pp.
- NEVILLE, M.C. y CH.W. DANIEL (Ed). 1987. *The Mammary Gland. Development, Regulation and Function*. Plenum Press, New York, USA, 625 pp.

- OFTEDAL, O.T. 1984. Milk composition, milk yield and energy output at peak lactation: A comparative review. Pp. 33-85. *En: Physiological Strategies in Lactation* (Peaker, Vernon and Knights, eds.). Zoological Society of London, Academic Press, London.
- PARKES, A.S. (Ed.). 1967. *Marshall's Physiology of Reproduction*. Third Edition. Longmans, Green and C. LTD, London, 880 pp.
- PUYOL de LEON, P. 1994. Estudio de la interacción del retinol y de los ácidos grasos con la β -Lactoglobulina bovina. Efecto sobre sus propiedades fisico-químicas y biológicas. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, Facultad de Veterinaria, Departamento de Producción Animal. 172 pp.
- RICHTER, R.L.; C.W. MORR y G.A. REINECCIUS. 1973. Simple technique for preparing high purity α -lactalbumin, *Journal of Dairy Science*, 56:1095-1097.
- TIJSSEN, P. 1985. Practice and theory of enzyme immunoassays. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 15. Elsevier, Amsterdam, 549 pp.
- WALSTRA, P. y R. JENNESS. 1987. *Química y Física Lactológica*. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España, 423 pp.
- WINZLER, R.J. 1955. Determination of serum glycoproteins. *Methods of Biochemical Analysis*, 2:279-311.