

DETECCIÓN DE GLICOMACROPEPTIDO (GMP) EN LECHE DE CABRA MEDIANTE UN SISTEMA ELISA COMO INDICATIVO DE ADULTERACION CON SUERO DE QUESERIA

Chávez-Vela N.A, Salinas-Miralles E.M, Jáuregui-Rincón J, Medina-Ramírez I.E., Pérez-Téllez D.M, Guerrero-Roque. F.A, Bon-Rosas-F.

Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Básicas, Depto. de Ingeniería Bioquímica, Av. Universidad # 940, Ciudad Universitaria. C.P. 20131, Aguascalientes, Ags. México. *nachavez@correo.uaa.mx.

RESUMEN

En México y en el mundo la demanda de derivados de leche caprina se ha incrementado paulatinamente por sus propiedades biológico-químicas y benéficas para la salud. Una práctica común de los productores de leche es la adulteración de esta con suero de quesería (SQ), lo que hace que tengan una mayor utilidad económica. Sin embargo, esto afecta a los industriales porque disminuye el rendimiento de los productos por obtener. Existen varios métodos para determinar la presencia de SQ basados en la detección de un glicomacropéptido que está presente sólo en SQ y no en la leche. Sin embargo ninguno de estos métodos está enfocado a la detección del glicomacropéptido caprino. En este trabajo se utilizaron anticuerpos policlonales anti-glicomacropéptido bovino (anti-GMPb) para determinar la reactividad de estos frente al glicomacropéptido caprino como indicador de la presencia de suero de quesería de cabra. Con los anticuerpos policlonales anti-glicomacropéptido bovino, se desarrolló un sistema ELISA sándwich rápido, sensible, específico y cuantitativo para la detección rutinaria de GMP caprino como un indicador de adulteración de leche de cabra con suero de quesería.

ABSTRACT

In Mexico and the world, the demand for goat milk and derivatives has increased gradually by their biological, chemical and beneficial health properties. A common practice of producers of milk is the adulteration with cheese whey (SQ). However, this affects milk processor industries because it decreases the yield of the products obtained. There are several methods for determining the presence of cheese whey based on the detection of a glycomacropeptide (GMP) that is present only in SQ and not in milk. However, none of these methods is focused on the detection of goat's GMP. In this work were used polyclonal antibodies toward anti-glycomacropeptide bovine to determine the reactivity of these in front to the GMP of cheese whey from sheep as an indicator of the presence of cheese whey. With the polyclonal antibodies anti-glycomacropeptide bovine was developed a rapid, sensitive, specific and quantitative sandwich ELISA system for the routine detection of goat GMP as an indicator of adulteration of goat milk with cheese whey.

Palabras clave: Glicomacropéptido, anticuerpos policlonales, leche de cabra.

Área: Lácteos

INTRODUCCIÓN

En México y en el mundo la demanda de derivados de leche caprina se ha incrementado paulatinamente por sus propiedades biológico-químicas y benéficas para la salud. La leche caprina tiene una alta cotización en el mercado, razón por

la cual una práctica común que se ha estado presentando es la adulteración de esta con leche bovina que tiene menor valor comercial. Para identificar este tipo de adulteración se han reportado numerosos trabajos que identifican especies de leche. Sin embargo, una práctica común reciente de los productores de leche es la adulteración de esta con suero de quesería (SQ), la cual es económicamente atractiva debido a que el costo de suero de quesería es menor que la leche y no se afecta negativamente la percepción sensorial del producto por los consumidores, no obstante, tiene implicaciones nutricionales y económicas y causa bajo rendimiento en la obtención de productos. La adición fraudulenta de SQ a la leche puede determinarse por la presencia de un glicomacropéptido (GMP), un compuesto específico del suero de quesería y que debe de estar ausente en leche no adulterada (Galindo *et al.*, 2006; Bremer *et al.*, 2008; Chávez *et al.*, 2012).

Se han reportado diversos métodos para determinar la presencia de SQ basados en la detección de GMP, de los cuales los más sencillos, rápidos y precisos son los inmunoensayos (Bremer *et al.*, 2008; Chávez *et al.*, 2008, 2012), sin embargo ninguno de estos métodos está enfocado a la detección del GMP caprino (GMPc) como indicador de la presencia de SQ de cabra. Así pues, dado que el GMP bovino (GMPb) y el GMPc tienen cierta homología (Silva-Hernández *et al.*, 2004). En este trabajo se detectó GMPc mediante el uso de anticuerpos policlonales anti-GMP bovino (que ya se habían generado en el laboratorio). Con los anticuerpos policlonales anti-GMPb, se desarrolló y estandarizó un sistema ELISA para detectar adulteración de leche de cabra con suero de quesería.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Leche cruda de cabra utilizada en este trabajo fue proporcionada por la Posta Zootécnica del Centro de Ciencia Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Esta se utilizó en los inmunoensayos como control negativo de suero de quesería (leche sin adulterar) y para la extracción de GMPc para la estandarización de los métodos de detección.

GMPb comercial (LACPRODAN CGMP-10) de ARLA foods el cual se usó como control positivo para la estandarización del inmunoblot.

Extracción de GMP

Al suero caprino se le adicionaron 0.5 volúmenes de Ácido tricloroacético (TCA) al 24% para precipitar la κ -caseína. La mezcla se filtra al vacío y se recupera el filtrado, adicionando 0.4 volúmenes de TCA al 50%. Se recupera el precipitado (GMP) por centrifugación a 14 000 rpm por 10 minutos, se re-suspende el pellet con Tris HCl (75 mM pH 8) y se neutraliza la muestra con NaOH 4 M (Galindo *et al.*, 2006).

Detección de GMPc

Esta se hizo mediante inmunoblot para lo cual se llevo a cabo una separación electroforética de las muestras a analizar (leche de cabra, GMPc y GMPb) por SDS-PAGE al 13.5% bajo condiciones reductoras 2 h a 80V. Las proteínas se

electrotransfieren a una membrana de PVDF por 2h a 100 mA. La detección del GMPc se realizó con los anticuerpos policlonales de conejo anti-GMPb como anticuerpo primario de obtención propia (2h a -4°C) y con anticuerpos anti-conejo unido a fosfatasa (2h a temperatura ambiente). El revelado se realizó con fosfatasa alcalina.

Desarrollo del sistema ELISA

Anticuerpos policlonales anti-GMP puros de obtención propia, se conjugaron con un éster de la biotina, para esto se utilizó el estuche comercial *Immunoprobe™ Biotinylation* (Sigma-Aldrich). Con los anticuerpos biotinilados se desarrolló un sistema ELISA tipo sándwich utilizando el sistema de amplificación biotina-ExtrAvidina, donde la ExtrAvidina se encontraba marcada con peroxidasa de rábano. Los anticuerpos anti-GMP sin marcar, actuaron como anticuerpos de captura del antígeno problema (GMP o suero de quesería). Los antígenos fueron reconocidos por los mismos anticuerpos conjugados con la biotina.

Validación del sistema ELISA

La validación del sistema ELISA se realizó según parámetros propuestos por ICH Harmonised Tripartite Guideline Q2 (R1) y estos fueron:

- a) Curva de calibración: se hizo analizando muestras de leche cruda con diferentes concentraciones de SQ (0%, 0.02%, 0.08%, 0.25%, 0.5%, 1.0%, 2.5%, 5.0% v/v). Cada concentración se probó con 16 repeticiones en tres días consecutivos.
- b) Límite de detección (LD) y cuantificación (LC): estos se calcularon a partir de 24 mediciones de muestras de leche cruda sin GMP o sin SQ. Se aplicaron las siguientes fórmulas: $LD = 3.3 SD/S$, $LC = 10SD/S$, donde SD es la desviación estándar de la respuesta obtenida (concentración) y S es la pendiente de la curva de calibración.
- c) Especificidad: se analizaron muestras de leche de cabra sin GMP o sin SQ con el fin de hacer estudios de reactividad cruzada. Cada muestra se analizó por triplicado. El resultado esperado es que no hubiera reacción.
- d) Exactitud: esta se determinó con ensayos de recuperación. Tres diferentes bebidas fueron fortificadas con diferentes concentraciones de SQ caprino (1%, 2.5% y 5%) y se determinó la concentración de SQ mediante la prueba ELISA. Cada muestra se analizó cuatro veces por triplicado para verificar la repetitividad del ensayo.

RESULTADOS

Se comprobó la reactividad de los anticuerpos policlonales anti-GMP bovino frente al GMP caprino por medio de inmuno blot, donde aparecen dos bandas proteicas peso molecular (PM) muy similar al GMP de SQ de vaca. En el caso del GMP caprino, las fracciones proteicas observadas presentaron PM de 11.26 y 9.12 kDa. En la muestra de GMPb comercial las dos bandas proteicas tienen PM de 13.92 y 9.78 kDa (figura 1).

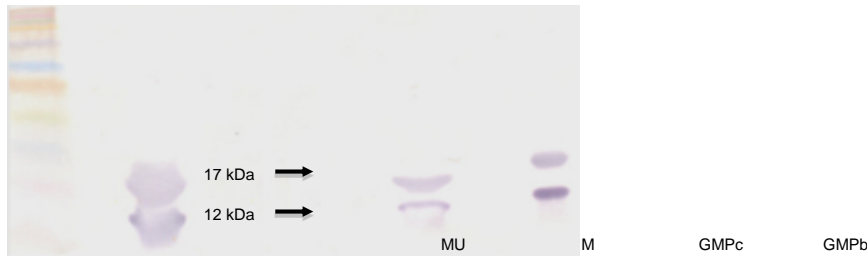


Fig.1. MU: 5 μ L leche de cabra sin procesar (sin TCA). M:20 μ L de leche de cabra procesada con TCA. GMPc : 20 μ L leche de cabra procesada, conteniendo 20% v/v de suero de quesería de cabra. GMPb: 20 μ g de GMPb puro. El marcador de peso molecular de las proteínas están en la parte izquierda del gel.

a) Curva estándar para detectar suero de quesería por ELISA: Con relación a la curva estándar para detectar SQc en leche de cabra (figura 2), se observó que los valores de absorbancia aumentan proporcionalmente con la concentración en un rango de 0- 5 % v/v.

b) Límite de detección (LD) y de cuantificación (LC): Con los datos obtenidos de la curva estándar y aplicándoles las formulas del ICH se obtuvo el límite de detección para SQ de cabra que fue 0.019% (v/v) y el límite de cuantificación de 0.057% (v/v).

c) Especificidad: La especificidad de los anticuerpos se demostró en el sistema ELISA usando leche cruda de cabra que estaba libres de SQ y de GMP. No hubo reacción positiva cuando se analizó leche cabra sin SQc ($0.0005 \pm 0.0001\%$ v/v).

d) Exactitud: La recuperación del SQ caprino en las muestras estuvo entre $98.44 \pm 0.08\%$ y $111.49 \pm 3.42\%$ (tabla I). Con esto se confirma la exactitud del ELISA. Las diferencias en los diferentes alimentos no afecta el porcentaje de recuperación.

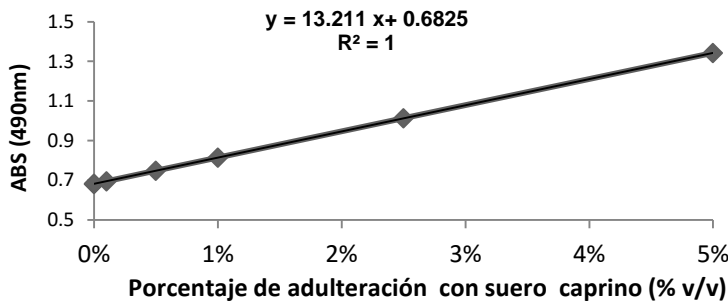


Figura 2. Curva estándar del sistema ELISA para detección de suero de quesería caprino. Se muestra la ecuación de la recta además de la línea de regresión lineal ajustada de tres muestras (n) con 16 réplicas, en donde y es la absorbancia; x: Porcentaje de adulteración con suero de quesería caprino; R^2 es el coeficiente de regresión de la recta

Tabla I: Exactitud del ELISA sándwich para detectar suero de quesería caprino

Producto	% SQ (v/v) adicionado	% SQ(v/v) detectado*	% Recuperación	CV (%)
Probiótico 1	1.0	1.02 ± 0.33	101.81 ± 3.27	3.21
	2.5	2.56 ± 0.20	102.41 ± 2.01	7.85
	5.0	5.15 ± 0.35	103.06 ± 6.98	6.77
Probiótico 2	1.0	1.05 ± 0.05	105.22 ± 5.15	4.89
	2.5	2.55 ± 0.15	102.19 ± 1.47	5.76
	5.0	4.99 ± 0.39	99.93 ± 6.70	7.88
Bebida de soya	1.0	1.05 ± 0.07	105.03 ± 6.67	6.34
	2.5	2.78 ± 0.34	111.49 ± 3.42	6.07
	5.0	4.92 ± 0.08	98.44 ± 0.08	1.57

* Porcentaje de suero de quesería de cabra recuperado en muestras de bebidas alimenticias libres de quesería o de GMPc, enriquecidas con 1%, 2.5% y 5% de Suero de quesería caprino líquido. Los valores son las medias ± SD, n= 4 en triplicado.

DISCUSIÓN

Mediante el inmunoblot los anticuerpos policlonales anti-GMPb reconocieron en las muestras de SQ caprino, dos fracciones proteicas correspondientes al GMP con pesos moleculares de 11.26 y 9.12 kDa para GMP caprino, PM diferente al del GMP bovino. La causa de que el GMP presente varias fracciones proteicas se debe a que se puede encontrar en diferentes estados de agregación, formando monómeros, dímeros, trímeros y tetrámeros. (Galindo *et al.* 2006). Las diferencias encontradas entre los pesos moleculares del GMPc y GMPb en el inmunoblot, se pueden utilizar como un indicador para diferenciar el tipo de suero que fue utilizado para adulterar la leche. Por inmunoblot también se demostró la especificidad de los anticuerpos policlonales anti-GMPb frente a GMPc, ya que los anticuerpos no reaccionaron con ninguna otra proteína presente en las muestras de leche de cabra, a excepción de la κ -caseína, demostrando así que no hay reacción cruzada con los demás componentes proteicos de la leche de cabra. También se demostró, que el tratamiento con TCA al que se someten las muestras de leche antes de analizarlas remueve eficientemente la κ -caseína (de la cual deriva el GMP), ya que en el inmunoblot de muestras de leche (sin GMP o sin SQ) con tratamiento con TCA no se observó ninguna banda proteica, por lo tanto no hay posibilidad de obtener resultados falsos positivos.

Respecto al sistema ELISA, no se han reportado métodos para la detección de GMPc en SQc. Las ventajas del ELISA con respecto a las otras metodologías, además de la rapidez y la sencillez, es el mayor número de muestras que se pueden procesar en un solo ensayo. Otros métodos para la detección de SQ o GMP llevan mayor tiempo, requiere de personas especializadas, se procesa una muestra a la vez y se requiere muestras de alta pureza, (Galindo *et al.*, 2006). Respecto a la validación, esta es importante ya que con esta se obtienen pruebas de que un método es lo suficientemente fiable para producir resultados previstos. El sistema resultó ser exacto y específico, con un límite de detección de 0.019% (v/v) de SQ caprino. Este ensayo es una buena alternativa para aplicarse en el análisis de leche de cabra en las industrias lácteas para control de calidad de sus productos.

BIBLIOGRAFÍA

Bremer, M, Kemmers-Voncken, Boers EA M, Frankhuizen R, Haasnoot W. 2008. Enzyme-Linked immunosorbent assay for the detection of bovine rennet whey powder in milk powder and buttermilk powder. *International Dairy Journal* 18, 294-302.

Chávez-Vela NA, Salinas-Miralles E, Palomares L A, Macías KE, Jiménez M. 2012. Highly sensitive sandwich ELISA for the determination of glycomacropeptide to detect liquid whey in raw milk. *Dairy Science & Technology*. 92: 121-132.

Galindo L, Valbuena E, Rojas E. 2006. Estandarización de la detección del glicomacropéptido por PAGE-SDS como índice de adulteración de leche. *Revista Científica FCV-LUZ* 16(3):308-314.

ICH Harmonised Tripartite Guideline Q2. Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1). <http://www.tga.gov.au/docs/pdf/tgmp0201g.pdf>. 2000.

Silva-Hernandez ER, Nakano T, Verdalet-Guzman I, Ozimek L. 2004. Comparison of glycomacropeptide isolated from raw and pasteurized goat milk. *Milchwissenschaft-milk Science International*: 59:27-31.