

Desarrollo de un método *inmuno blot* para detectar glucomacropéptido (GMP) como índice de adulteración de leche de vaca con suero de quesería

Norma Angélica Chávez Vela ¹, Eva Salinas Miralles ²,
Juan Jáuregui Rincón¹, Laura A. Palomares Aguilera ³,
Fernando Bon Rosas ¹

RESUMEN

La leche es un producto que contiene un alto valor nutricional y es considerada como un producto básico en la alimentación humana, razón por la cual, el sector lechero tiene gran importancia socioeconómica a nivel mundial. Las industrias procesadoras y comercializadoras de leche tienen problemas con su adulteración ocasionado por el suero de queserías. Uno de los métodos más usados para detectarlo es a través de la identificación de un glucomacropéptido (GMP), presente sólo en el suero de quesería y no en la leche. Los métodos para detectar GMP requieren de mucho trabajo y tiempo, y, a su vez, presentan problemas de sensibilidad y precisión en concentraciones bajas. En esta investigación se desarrolló un nuevo método de análisis mediante *inmuno blot* para la detección de GMP, usando anticuerpos policlonales anti-GMP. De este modo, puede detectarse GMP con una mayor

Palabras clave: Glucomacropéptido, anticuerpos policlonales, *inmuno blot*, suero de quesería, adulteración de leche.

Key words: *Glycomacropeptide, polyclonal antibodies, immune blot, cheese whey, adulteration of milk.*

Recibido: 8 de agosto de 2008, aceptado: 25 de septiembre de 2008

- ¹ Depto. de Ingeniería Bioquímica, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes. nachavez@correo.uaa.mx.
- ² Depto. de Microbiología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes. emsalin@correo.uaa.mx.
- ³ Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

sensibilidad, precisión y rapidez que con los métodos utilizados hasta ahora.

ABSTRACT

Milk is a product of high nutritional value and is considered commodity product for human consumption, which is why the dairy sector is of great socio-economic importance. Worldwidemilk processor industries and distributors have problems of milk adulteration with cheese whey. Most used method to detect cheese whey is the identification of a glycomacropeptide (GMP), which is present only in the cheese whey but not in milk. At present, methods to detect GMP require major work and time, presenting problems of sensitivity and accuracy at low concentrations. We developed a novel western blot analysis for GMP detection, using anti-GMP polyclonal antibodies. This assay can detect GMP with greater sensitivity, precision and speed that the methods used so far.

INTRODUCCIÓN

La leche es un producto alimenticio de gran importancia por sus propiedades nutritivas y alto valor biológico. Las industrias procesadoras y comercializadoras de leche tienen el problema de adulteración de ésta en cualquiera de sus presentaciones ya sea con suero de leche fresco o en polvo con el fin de obtener mayor rendimiento en el producto final con consecuencias de índole nutricional, económica y legal. La adición del suero de leche es atractiva económicamente ya que su costo es de cuatro a cinco veces menor que la leche, además de que no influye negati-

vamente en la percepción sensorial del producto por parte del consumidor. (Rosas, J., 1997).

Existen diferentes métodos directos e indirectos que sirven para detectar la presencia y, en algunos casos, conocer la cantidad de suero como agente adulterante en la leche en sus diferentes presentaciones. Entre los métodos indirectos se encuentra la detección de un péptido específico, el glucomacropéptido (GMP), que se libera cuando la leche entra en contacto con la enzima quimosina o pepsina que se utiliza para la coagulación de la caseína en la producción de quesos. Los métodos basados en la detección del GMP son los más confiables, por ser éste un componente específico del suero, y por tanto, debería estar ausente en la leche. (Benítez *et al.*, 2001; Mikkelsen, *et al.* 2006) sin embargo, requieren mucho trabajo y tiempo (desde unas horas hasta tres días) y, además, presentan problemas de sensibilidad y precisión en bajas concentraciones. Así pues, se necesitan métodos sensibles y específicos para detectar y cuantificar GMP como índice de adulteración de leche con suero de quesería. Técnicas analíticas de gran sensibilidad y muy específicas son las inmunológicas, las cuales se basan, fundamentalmente, en la gran especificidad que tienen los anticuerpos, permitiendo así realizar mediciones de muestras sin una previa purificación, concentración, extracción o tratamientos especiales.

Por todo esto, la hipótesis de este trabajo consistió en que se pueden obtener anticuerpos contra GMP y con ellos, mediante un sistema *inmuno blot*, detectar al GMP como índice de adulteración de leche por la adición de suero de quesería. El objetivo del trabajo fue desarrollar un sistema de detección sencillo, rápido, sensible y específico, basado en una reacción inmunológica, mediante la técnica del *inmuno blot*, para detectar adulteraciones en leche por la adición de suero de quesería.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras: GMP (CGMP-10; Arla Foods Amba, Denmark), leche cruda de vaca (control negativo de GMP) y suero proveniente de quesería (control positivo de GMP).

a) Inducción de producción de anticuerpos.

Se inmunizaron siete conejos hembras adultos, de la cepa "Nueva Zelanda". Se realizaron cuatro

pautas de inmunización, inoculando subcutáneamente 1 mg/ml de GMP en cada una y utilizando adyuvante de Freund como estimulador de la respuesta inmune del animal. Las inmunizaciones se hicieron a intervalos de cuatro semanas. La producción de anticuerpos anti-GMP se verificó mediante electroforesis e *inmuno blots*.

b) Purificación de anticuerpos policlonales anti-GMP.

El antisuero se trató con 0.5 volúmenes (del volumen inicial) de una solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y se centrifugó a 3000 g por 30 minutos. La pastilla se resuspendió en 0.5 volúmenes de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 100 mM, y KH_2PO_4 1.8 mM) del volumen inicial de suero. La solución de anticuerpos se ultrafiltró en Amicon 8050 con una membrana de corte de 10 kDa (Millipore Co.), se hicieron cinco cambios de PBS. El remanente (residuo no filtrado) se ajustó a un volumen del inicial en PBS y después se adicionaron dos volúmenes de acetato de sodio 60 mM (pH 4.0) y lentamente ácido caprílico 0.75 ml/10 ml de suero. La solución de anticuerpos se centrifugó a 5000 g por 10 min. El sobrenadante se ultrafiltró con una membrana de corte de 10 kDa con varios cambios de PBS hasta pH 7.4 de la solución de anticuerpos.

El GMP (5 mg) se acopló covalentemente a una columna HP (Sepharsa) NHS activada (GE Healthcare) según instrucciones del fabricante y después la solución de anticuerpos se pasó a través de esta columna acoplada para que se unieran los anticuerpos específicos del GMP. Los anticuerpos unidos se eluyeron con una solución de glicina 100 mM pH 2.5, se neutralizaron con Tris HCl 1 M pH 9 y se almacenaron en alícuotas a 4°C. La actividad de las fracciones obtenidas se probó por *inmuno blot* y la cantidad de proteína total se determinó por el método de Bradford. La pureza de los anticuerpos se probó por electroforesis en geles de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), bajo condiciones desnaturalizantes en gel de poliacrilamida al 10% y posterior tinción con plata de los geles. Finalmente, se almacenaron los anticuerpos en alícuotas a -80°C hasta su uso.

c) Inmuno blot.

Se utilizó el sistema Bio-Rad Miniprotean III para hacer una separación electroforética de proteínas de las muestras a analizar (leche y productos con suero de leche, GMP) por SDS-PAGE 13.5% bajo condiciones reductoras (Laemmli, 1970). Las proteínas se transfirieron elec-

troforéticamente del gel a membranas de nitrocelulosa de un *kit* (*One-Step™ Western Kit*) por dos h a 80 V en buffer de corrida (0.025 M Trizma® base, 0.186 M Glicina, 5.2 M metanol). Las membranas se trataron por cinco min. en una solución de pretratamiento del *kit*, se lavaron y, posteriormente, se incubaron con una solución que contenía los anticuerpos anti-GMP (dilución 1:1000) durante 40 minutos con agitación a temperatura ambiente. La membrana se lavó y se desarrolló el blot con una solución con cromosensor-TMB (3,3,5,5-Tetramethylbenzidine) del *kit*.

d) Procesamiento de leche y de muestras de productos lácteos. Se analizaron muestras de leche no adulterada, leche con diferentes cantidades de GMP o de suero de quesería, de yogurt, margarina y suplemento dietético. En el caso de muestras líquidas, 25 ml de éstas se mezclaron con ácido tricloroacético (TCA) a una concentración final de 8% con el fin de precipitar la κ -caseína que puede dar reactividad cruzada con el GMP. (Benítez *et al.*, 2001). Un segundo tratamiento con TCA a una concentración final del 14% se dio al sobrenadante con el fin de precipitar el GMP (Benítez *et al.*, 2001, Galindo *et al.* 2006). El precipitado se disolvió en 20 μ l de Tris HCl 75 mM, pH 8.0 y las muestras se analizaron por *inmuno blot*. En el caso de la margarina (2 g), ésta se disolvió previamente en cloroformo-metanol (2:1) para remover los lípidos; posteriormente, el GMP fue solubilizado por adición de agua (Nakano *et al.*, 2007) y recuperado con TCA a una con-

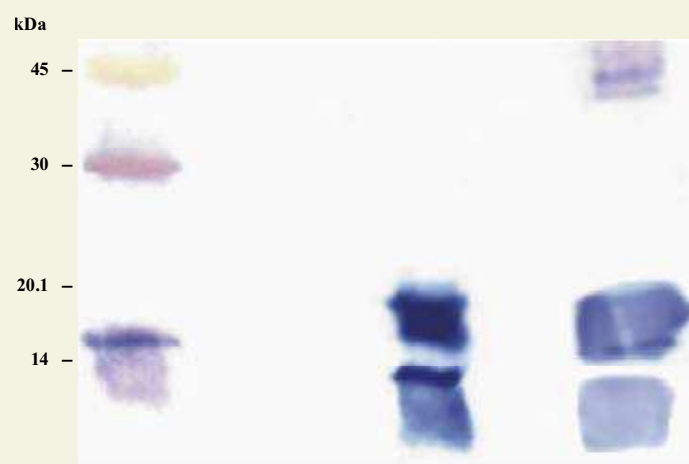
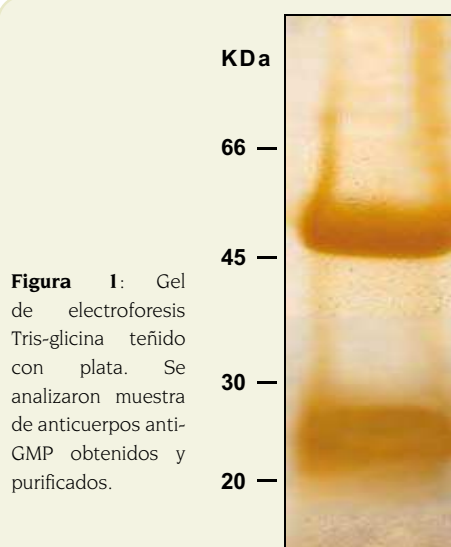
centración final del 14%, disuelto en 20 μ l de Tris HCl 75 mM, pH 8.0 y analizada por *inmuno blot*. El yogurt, la margarina y el suplemento dietético contienen suero de quesería como componente y cabe señalar que esto se especificaba en el producto.

RESULTADOS

a) Confirmación de la pureza de los anticuerpos anti-GMP obtenidos. Por análisis electroforético y tinción plata de los anticuerpos anti-GMP obtenidos, se observaron bandas proteicas de peso molecular aproximado a 25 y 50 kDa las cuales corresponderían con las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos IgG. (Figura 1).

b) Confirmación de la especificidad de los anticuerpos anti-GMP. La figura 2 muestra que los anticuerpos policlonales anti-GMP detectaron tres bandas de 45, 20 y 14 kDa en muestras de suero de quesería líquido. Las bandas de 20.1 y 14 kDa corresponden a muestras de GMP puro, el inmunógeno original. Estas bandas corresponden al GMP en diferentes estados de agregación. No se observaron estas bandas proteicas en muestras de leche no adulterada, indicando que no hubo reactividad cruzada con los componentes de la leche.

c) Límite de detección y duración del ensayo. Por *inmuno blot* con anticuerpos anti-GMP se detectó una concentración hasta de 0.5% (p/v) de



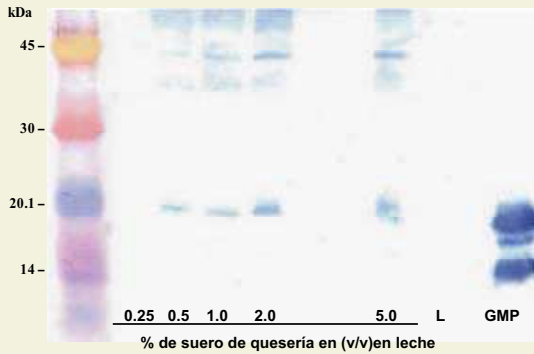


Figura 3: Análisis *inmuno blot* de muestras de leche adulterada con concentraciones crecientes de suero de quesería líquida, usando anticuerpos policlonales anti-GMP. **L:** 10 μ l de leche procesada sin suero de quesería (control negativo). **GMP:** 10 μ g de GMP puro (control positivo).



Figura 4: Análisis *inmuno blot* de diferentes alimentos comerciales con suero de quesería, usando anticuerpos policlonales diluidos 1:1000. **L:** 10 μ l de leche procesada sin suero de quesería (control negativo); **SD:** 10 μ l de suplemento dietético procesado; **M:** 5 μ l de margarina procesada; **Y:** 10 μ l de yogurt procesado; **GMP:** 10 μ g de GMP puro (control positivo).

GMP puro adicionada a leche (figura 3). Cuando se adicionó GMP a la leche y posteriormente las muestras se procesaron para la remoción de κ -caseína, no hubo modificación en las bandas visualizadas para el GMP (figura 3). La fracción proteica de 20.1 kDa siempre fue más intensa que la de 14 kDa.

El análisis mediante *inmuno blot* de muestras de leche con suero de quesería mostró bandas de 45, 20.1 y 14 kDa, correspondientes al GMP. La banda proteica de 20.1 kDa fue más abundante que la de 45 y 14 kDa. Se analizaron también por *inmuno blot* muestras de leche sin adulterar y GMP como control positivo y negativo, respectivamente. El límite más bajo de detección de suero de quesería fue de 0.5% (v/v) (figura 3).

El tiempo de análisis para la detección de GMP o de suero de quesería fue de 4.5 horas, incluyendo el tratamiento de las muestras con TCA.

d) Detección de GMP en productos comerciales. En el análisis de la margarina se detectaron tres bandas proteicas de 45, 20.1 y 14 kDa, mismas que se observaron en el suero de quesería cuando se analizó. En el suplemento dietético y en el yogurt, se observó solamente el GMP con peso molecular de 20.1 kDa (figura 4).

DISCUSIONES

Mediante la técnica de *inmuno blot* en este trabajo, se desarrolló un método fácil, rápido, sensible y específico para detectar GMP como índice de adulteración de leche con suero de quesería. Para esto, se utilizaron anticuerpos policlonales anti-GMP que detectaron GMP en leche adulterada con suero de quesería. Cuando se analizó GMP puro, los anticuerpos reconocieron dos bandas peptídicas de 20.1 y 14 kDa, mientras que en el análisis de suero, se observó una banda más de 45 kDa. El GMP como monómero tiene una masa molecular de 6.8 kDa sin considerar la porción glucídica, sin embargo, forma agregados. El mecanismo de agregación se desconoce, y tampoco está claro por qué el agregado de GMP no se disocia en presencia de SDS. Se ha referido que el SDS se une a la porción peptídica de una molécula de GMP y evita interacciones hidrofóbicas con otras moléculas de GMP; sin embargo, las cadenas glucídicas de las diferentes moléculas de GMP pueden interactuar a través de enlaces por puentes de hidrógeno, lo que trae como resultado masas moleculares mayores para este péptido pues se forman dímeros, trímeros, tetrámeros, etc. (Galindo *et al.*, 2006). Este hecho explica la identificación del GMP con bandas de diferentes pesos moleculares. La justificación de utilizar anticuerpos policlonales en lugar de anticuerpos monoclonales se debe a que las diferentes técnicas de procesamiento de los alimentos pueden afectar sus péptidos o pro-

teínas, destruyendo así epítomos, lo que impediría el reconocimiento de éstos por los anticuerpos monoclonales. Debido a que los anticuerpos policlonales reconocen varios epítomos diferentes, la probabilidad de detectar una proteína o péptido alterado o desnaturalizado es mayor.

La sensibilidad del método desarrollado fue mayor que otros reportados. De los métodos más sensibles que conocen está el de Galindo *et al.*, (2006) quienes por HPLC detectaron hasta 1% (v/v) de suero de quesería líquido en leche. Este método es complejo, costoso y tardado pues el GMP debe purificarse previamente, para lo cual se requiere al menos de seis horas. El método *inmuno blot* desarrollado para detectar GMP es más sencillo, menos caro, más rápido pues se realiza en un total de 4.5 horas y más sensible ya que se logró detectar hasta 0.5% (v/v) de suero de quesería líquido en leche.

Actualmente, el GMP se usa cada día más como nutraceútico debido a sus propiedades

funcionales tales como: factor estimulador de bífido bacterias, fuente de ácido siálico (importante para el desarrollo cerebral del lactante), actividad antiviral, modulador de las secreciones gástricas y a que da lugar a péptidos bioactivos con actividad anti-trombótica. (Jiménez *et al.*, 2001). Debido a que con el método *inmuno blot* se logró detectar GMP en productos comerciales que contienen suero de quesería, esta técnica desarrollada puede ser utilizada como control de calidad para identificar GMP en alimentos que lo contienen.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron anticuerpos policlonales puros, y con éstos fue posible desarrollar un método de detección de GMP mediante *inmuno blot*, con el cual ha sido posible detectar adulteración de leche con suero de quesería con una mayor sensibilidad, rapidez y precisión que con los métodos utilizados hasta ahora.

REFERENCIAS

- ALCAZAR, *et al.* Detección de glucomacropéptido (GMP) como indicador de adulteración con suero de quesería en leche deshidratada. *Vet Mex* 37(3):217-22, 2000.
- BENÍTEZ E., PONCE P., NOA M. Detección de suero de quesería en leche en polvo por HPLC de filtración en Gel. *Rev. de Salud Animal* 23(1): 27-31, 2001.
- GALINDO L., VALBUENA E, ROJAS E. Estandarización de la detección del glicomacropéptido por PAGE-SDS como índice de adulteración de leche. *Revista Científica FCV-LUZ* 16(3):308-314, 2006.
- JIMÉNEZ B., MARTÍNEZ A., J. BOUZA. Bioactive milk peptides and proteins. *Asr Pharmaceutica*. 42: 135-145, 2001.
- LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
- NAKANOTO T., IKAWA N., OZIMEK L. Detection of sialylated phosphorylated k-casein glycomacropéptide electrophoresed on polyacrylamide gels and cellulose acetate strips by the thiobarbituric acid and malachite green dye reactions. *J. Agric Food Chem* 55(7): 2714-2726, 2007.
- OLIEMAN CY, VAN RIEL JW. Detection of renner why total solids in skim milk powder and buttermilk with reverse-phase HPLC. *Neth Milk Dary J.* 43:171-174, 1989.