

Reactividad de anticuerpos policlonales anti-glicomacropéptido de suero de quesería bovino frente al glicomacropéptido de suero de quesería de oveja

Reactivity of polyclonal antibodies toward glycomacropéptide of bovine cheese whey in front of the glycomacropéptide of cheese whey from sheep

Norma Angélica Chávez Vela,¹ Eva Salinas Miralles,² Juan Jáuregui Rincón,³ Fernando Bon Rosas,⁴ Dulce María Diana Pérez Tellez⁵

Chávez Vela, N. A.; Salinas Miralles, E.; Jáuregui Rincón, J.; Bon Rosas, F.; Pérez Tellez, D.M.D., Reactividad de anticuerpos policlonales anti-glicomacropéptido de suero de quesería bovino frente al glicomacropéptido de suero de quesería de oveja. 54, 12-16, 2012.

RESUMEN

La producción y consumo de leche de oveja en México y en el mundo cada vez se incrementa debido a que ésta tiene importantes ventajas frente a la leche de vaca. Una práctica común de los productores de leche es su adulteración 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 ovino. En este trabajo se utilizaron

Palabras clave: glicomacropéptido, anticuerpos policlonales, inmuno blot, suero de quesería, leche ovina.

Key words: glycomacropéptide, polyclonal antibodies, inmuno blot, cheese whey, sheep milk.

Recibido: 16 de Diciembre de 2011, aceptado: 27 de Febrero de 2012

¹ Departamento de Ingeniería Bioquímica, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, nachavez@correo.uaa.mx.

² Departamento de Microbiología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, emsalin@correo.uaa.mx.

³ Departamento de Ingeniería Bioquímica, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, jjaureg@correo.uaa.mx.

⁴ Departamento de Ingeniería Bioquímica, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, fbonros@correo.uaa.mx.

⁵ Departamento de Ingeniería Bioquímica, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes.

anticuerpos policlonales anti-glicomacropéptido bovino (anti-GMPb) para determinar la reactividad de éstos frente al glicomacropéptido ovino como indicador de la presencia de suero de quesería de oveja.

ABSTRACT

The production and consumption of milk from sheep in Mexico and the world, is increasing every time because this has important advantages over cow's milk. A common practice of milk producers is its adulteration with cheese whey. 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 glycomacropéptide (GMP) that is present only in SQ and not in milk. However, none of these methods is focused on the detection of sheep's GMP. In this study, polyclonal antibodies toward anti-glycomacropéptide bovine were used 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.

INTRODUCCIÓN

La leche de oveja es un producto muy valorado por sus cualidades gastronómicas y nutraceuticas, por su inocuidad para personas que no toleran la leche de vaca y por su alto contenido graso, extracto seco y rendimiento industrial (Bain, 2004). Principalmente, esta leche se consume en forma de productos elaborados, como yogures, leches desnatadas, semidesnatadas, enteras,

quesos, etc. (Park *et al.* 2007; FAO, 2007; Trejo, 2009).

En los países subdesarrollados, la producción de esta clase de leche ha llegado a constituir una estrategia útil para disminuir la desnutrición, sobre todo en la población infantil, ya que la leche de oveja presenta ventajas, especialmente frente a la leche de vaca, como son: la leche de oveja tiene mayor cantidad de proteínas que la de vaca, por ende, también tiene casi el doble de grasa, aunque el producto disponible en el mercado viene parcialmente desnatado (semi desnatado). La leche de oveja tiene las vitaminas y minerales en mayor cantidad que la leche de vaca. Además, otra de las ventajas de la leche de oveja es que es mucho más digestiva que la leche de vaca, por lo que está muy recomendada también en personas mayores y ancianos (Sanz *et al.*, 2003).

La leche ovina tiene una alta cotización en el mercado, razón por la cual una práctica común que se ha estado presentando es la adulteración de ésta con leche bovina o caprina que tienen menor valor comercial. Para identificar este tipo de adulteración se han reportado numerosos trabajos que identifican especies de leche, como son la electroforesis capilar (Molina *et al.*, 2005;), la aplicación de polimerasa en cadena (PCR) (López Calleja *et al.*, 2005) y el ensayo por inmuno absorción ligado a enzimas (ELISA) (Haza *et al.*, 1996; Alava *et al.*, 1998; Moatsou y Anifantakis, 2003; Costa, 2008; Hongxin *et al.*, 2011). Sin embargo, una práctica común reciente de los productos de leche es la adulteración de ésta con suero de quesería (SQ). Dicha adulteración es económicamente atractiva debido a que el costo del 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 (Alcázar *et al.*, 2000).

La adición fraudulenta de SQ a la leche puede determinarse por la presencia de un glicomacropéptido (GMP), también conocido como caseinomacropéptido (Galindo *et al.*, 2006; Bremer *et al.*, 2008; Chávez *et al.*, 2008, 2012), que es un compuesto específico del suero de quesería y que debe de estar ausente en leche no adulterada (Benítez *et al.*, 2001). El GMP es un derivado de la k-caseína producido cuando la leche es tratada con quimosina durante la fabricación del queso; el péptido más grande, para-k-caseína, se incor-

pora con la cuajada, mientras que el más pequeño, el GMP, queda soluble en el SQ (Brody, 2000).

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; Oancea *et al.*, 2009; Chávez *et al.*, 2008, 2012), sin embargo, ninguno de estos métodos está enfocado a la detección del GMP ovino (GMPo) como indicador de la presencia de SQ de oveja. Así pues, dado que el GMP bovino (GMPb) y el GMPo tienen cierta homología (López Fandiño *et al.*, 1993, Silva-Hernández *et al.*, 2004), la hipótesis de este trabajo es que mediante anticuerpos policlonales anti-GMPbovino se puede detectar GMPo como indicativo de adulteración de leche de oveja con suero de quesería de oveja. Por tanto, el objetivo de esta investigación es probar la reactividad de anticuerpos anti-GMP bovino frente al GMPo para detectar adulteraciones en leche de oveja por la adición de suero de quesería.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras: GMPb (CGMP-10; Arla Foods Amba, Denmark), suero de leche de oveja, leche de oveja (Posta Zootécnica del Centro de Ciencia Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes), anticuerpos policlonales de conejo anti-GMPb (Dpto. de Ingeniería Bioquímica, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes).

a) *Obtención del GMP de suero de leche de oveja.* A 25 ml de muestras de leche de oveja con diferentes cantidades de SQ ovino se les adicionó 0.5 volúmenes de una solución de ácido tricloroacético (TCA) a 24%, con el fin de precipitar y eliminar la k-caseína (Benítez *et al.*, 2001). Se dio un segundo tratamiento con 0.4 volúmenes de TCA a 50% al sobrenadante con la finalidad de precipitar el GMP (Benítez *et al.*, 2001; Galindo *et al.*, 2006). El precipitado fue disuelto en 20 μ L de 75 mM Tris HCl, pH 8.0 y neutralizado con NaOH 2 M. La muestra obtenida se analizó con la técnica de inmuno blot.

b) *Reactividad de los anticuerpos policlonales anti-GMP bovino frente a GMP ovino.* Se desarrolló un inmuno blot del GMPo obtenido de SQ, de GMPb (control positivo de la reactividad) y leche de oveja sin SQ sometida a tratamiento con TCA (como control negativo). Se utilizó el sistema Bio-Rad Miniprotean III para hacer una separación

electroforética de las proteínas de las muestras para analizar, mediante electroforesis (SDS-PAGE), 13.5% bajo condiciones reductoras, con un buffer de corrida (0.025 M Trizma base, 0.25 M glicine, 3.7 mM, pH 8.3) a 80 volts por 1.5 h. Las fracciones proteicas se transfirieron electroforéticamente a una membrana de polivinildieno fluorado (PVDF) (Millipore Corporation, Bedford, EUA) por 2 h a 100 mA, usando para ello una solución de transferencia (0.024 M Trizma base, 0.186 M glicina, 4.1 M metanol). Una vez hecha la transferencia de las proteínas a la membrana, se lavó con la solución de transferencia limpia y se secó para posteriormente llevar a cabo la inmunotinción, que se desarrolló con los anticuerpos policlonales de conejo anti-GMPb diluidos en una solución tampón de NaCl 0.5 M, Tris HCl 0.02 M (TBS) con leche en polvo a 5%. Para detectar el complejo formado por el GMP y los anticuerpos anti-GMP, se utilizó un anticuerpo secundario anti-conejo de cabra unido a fosfatasa alcalina (PA) (Zymed, San Francisco, EUA) diluido 1:10,000 en la solución de TBS más leche en polvo a 5%, usando 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato/nitro azul tetrazolio (BCIP/NBT) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) como cromosensor.

RESULTADOS

Reactividad de los anticuerpos policlonales anti-GMP bovino frente a GMP ovino. Se comprobó la reactividad de los anticuerpos policlonales anti-GMP bovino frente al GMP ovino, donde aparecen dos bandas proteicas peso molecular (PM) muy similar al GMP de SQ de vaca. En el caso del GMP ovino, las fracciones proteicas observadas presentaron PM de 14.1 y 10.2 kDa. Esta última fracción fue menos abundante según se aprecia por la intensidad de color y tiende a desaparecer conforme disminuye la concentración de suero de quesería de oveja, lo que indicaría que se encuentra en menor cantidad. En la muestra de GMPb comercial, las dos bandas proteicas tienen PM de 14.1 y 11.1 kDa (figura 1). La primera fracción proteica coincide con la obtenida en el SQ de oveja. Estas bandas corresponden al GMP en diferentes estados de agregación.

Se analizaron también muestras de leche de oveja sin SQ (L) con el fin de determinar si en el análisis, por la técnica de inmuno blot, había interferencia con los componentes de la leche, sin embargo, no se observaron bandas proteicas, lo que indica que no hubo reactividad cruzada de los anticuerpos anti-GMPb con los componentes de la leche de oveja (figura 1).

El límite más bajo de SQ detectado en leche fue de hasta 5% (v/v) (figura 1).

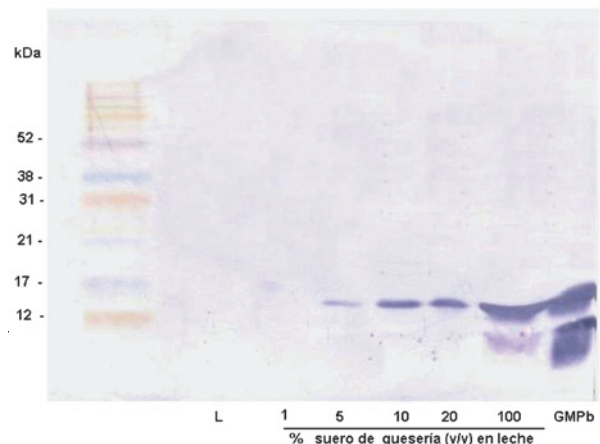


Figura 1. Inmuno blot para probar reactividad de los anticuerpos policlonales anti-GMP bovino frente al GMP ovino. Se analizaron muestras de leche de oveja adulterada con concentraciones crecientes de suero de quesería ovino líquido. L: 10 μ l de leche de oveja procesada con TCA sin suero de quesería (control negativo). GMPb: 10 μ g de GMP bovino puro (control positivo).

La detección de SQ en la leche de oveja mediante la técnica de inmuno blot se realizó en un tiempo de 8 horas, incluyendo el tratamiento de la leche con TCA.

DISCUSIÓN

En este trabajo se desarrolló un método fácil y específico para detectar GMPo como indicativo de adulteración de leche de oveja con suero de quesería. Este método se desarrolló con anticuerpos policlonales anti-GMPb que fueron reactivos al GMP ovino. La reactividad de estos anticuerpos frente al GMPo se debe a que el GMP de SQ de vaca, cabra y oveja tienen una gran homología entre sí, presentando sólo algunos sitios de diferencia (López Fandiño *et al.*, 1993; Silva Hernández *et al.*, 2004), la cual no causa problema para la detección mediante el uso de anticuerpos policlonales, ya que éstos reconocen diferentes epítopos. Una ventaja del uso de anticuerpos policlonales en comparación con los anticuerpos monoclonales para el inmuno blot, es que tienen mayor probabilidad de detectar péptidos o proteínas similares, que se alteran o modifican como sucede en el caso de los alimentos cuando se someten a diferentes técnicas de procesamiento (pasteurización, calentamiento, acidificación, etc), ya que

los anticuerpos reconocen epítomos diferentes. Se acepta, por tanto, que el uso de anticuerpos policlonales es favorable para el análisis de alimentos (Holden *et al.*, 2005).

En el análisis de las muestras de SQ analizadas mediante inmuno blot, los anticuerpos policlonales reconocieron dos bandas proteicas tanto en el GMPb como en el GMPo. En el caso del SQ de oveja las fracciones proteicas tuvieron un PM de 14.1 y 10.2 kDa del GMP obtenido de SQ de oveja. El GMP como monómero tiene un PM aproximado de 6.8 kDa sin considerar la porción glicosídica (Brody, 2000; Galindo *et al.*, 2006), sin embargo, se ha demostrado que diferentes moléculas de GMP interactúan mediante enlaces de puentes de hidrógeno de las cadenas glicosídicas que contiene, originando así dímeros, trímeros tetrámeros, etc., lo que trae como resultado pesos moleculares mayores para este compuesto (Galindo *et al.*, 2006). Este hecho explica que al analizar GMPb y GMPc se hayan identificado fracciones proteicas de diferente peso molecular. Las banda de 14.1 kDa corresponde a la observada en muestras de GMP de referencia (GMPb) al inmunógeno principal.

Mediante el inmuno blot también se demostró la especificidad de los anticuerpos frente a otros componentes de la leche ovina, ya que el análisis de muestras procesadas de leche sin suero no dieron reacción alguna con los anticuerpos, pues no se observó ninguna banda proteica, indicando que no hay reactividad cruzada con otros componentes de la leche, por lo tanto, no hay posibilidad de obtener resultados falsos positivos. Este hecho aumenta la veracidad de la prueba para determinar adulteración de leche ovina con SQ.

Una ventaja del método inmuno blot es su especificidad para detectar GMP como indicativo de adulteración SQ, ya que comparado con otros métodos que se han reportado, tales como cromatografía de líquidos (HPLC) y electroforesis SDS-PAGE, no es definitiva la identificación del GMP, debido a péptidos de peso molecular similar al GMP que pueden estar presentes en la leche por acción de microorganismos psicrófilos (Alcázar *et al.*, 2000; Recio *et al.*, 2000), dando resultados falsos positivos en el análisis de leche. Además, mediante la técnica de inmuno blot, el análisis es más rápido y menos costoso que por HPLC que es el método que más se utiliza para detectar este tipo de adulteración (Recio *et al.*, 2000), pues es necesario purificar previamente GMP y esto requiere al menos 6 h, además el equipo de HPLC es más

complejo y caro que el inmuno blot desarrollado en este trabajo. Por lo tanto, el método inmuno blot para detectar GMPo como indicativo de la presencia de SQ ovino por anticuerpos policlonales anti-GMPb resultó ser un método más sencillo, rápido y menos costoso. Este método puede usarse como control de calidad de la leche ovina para prevenir fraudes por la adulteración con SQ.

Una vez que se comprobó la reactividad y especificidad de los anticuerpos policlonales anti-GMPb frente al GMPo, se pretende desarrollar con éstos un sistema ELISA que es mucho más sencillo, rápido y barato, con la finalidad de disminuir los tiempos de análisis y aumentar la sensibilidad del método para saber si la leche de oveja está adulterada con SQ. Además, con el sistema ELISA se pueden analizar una mayor cantidad de muestras al mismo tiempo.

CONCLUSIONES

Los anticuerpos policlonales anti-GMPb fueron reactivos al GMPo. Con estos anticuerpos se puede desarrollar un método de análisis para detectar adulteración con SQ en leche de oveja. Este método es más preciso y rápido que otros métodos que se han utilizado para detectar este tipo de adulteración.



Ilustración 1. La leche de oveja es una opción para la desnutrición por ser más nutritiva y más digestiva.

Fuente: <http://images.google.com.mx>.

Agradecimiento

Los autores agradecen al Mtro. Rafael Casillas Peñuelas por su apoyo, comentarios y sugerencias que se recibieron para mejorar la calidad del artículo.

LITERATURA CITADA

- ALAVA, M.; CALVO M.; INDA, L.; RAZQUÍN, P.; LAMPREAVE, F., Rapid, sensitive, enzyme-immunodotting assay for detecting cow milk adulteration in sheep milk: a modern laboratory project. *J Chem Educ.*, 75(12): 16-18, 1998.
- ALCÁZAR, M.C.; ROSAS, J.; JARAMILLO, A.C.; PEÑA, S., Detección de glucomacropéptido (GMP) como indicador de adulteración con suero de quesería en leche deshidratada. *Vet México*, 37(3) 217-222, 2000.
- BAIN, I., Elaboración de quesos artesanales con leche de oveja. *IDIA XXI*, 7: 208-2011, 2004.
- BENÍTEZ, E.; PONCE, P.; NOA, M., Detección de suero de quesería en leche en polvo por HPLC de filtración. *Gel. Rev. Salud Animal*, 23(1): 27-31, 2001.
- BREMER, M.; KEMMERS VONCKEN, A.; BOERS, E.; FRANKHUIZEN, R.; HAASNOOT, W., Enzyme-Linked immunosorbent assay for the detection of bovine rennet whey powder in milk powder and buttermilk powder. *Int Dairy J.* 18: 294-302, 2008.
- BRODY, E.P., Biological activities of bovine glycomacropéptido. *Br J Nutr.*, 84(1): S39-S46, 2000.
- CHÁVEZ, N.; SALINAS, E.; JÁUREGUI, J.; PALOMARES, L.A.; MACÍAS, K.; Detection of bovine milk adulterated with cheese whey by Western blot immunoassay. *Food Agric Immunol*, 19: 265-272, 2008.
- CHÁVEZ, N.; JÁUREGUI, J.; PALOMARES, L.; MACÍAS, K.; JIMÉNEZ, M.; SALINAS, E., A highly sensitive sandwich ELISA for the determination of glycomacropéptido to detect liquid whey in raw milk. *Dairy Sci. & Technol.*, 92, 121-132, 2012.
- COSTA, N.; RAVASCO, F.; MIRANDA, R.; DUTHOIT, M.; ROSEIRO, L.B., Evaluation of a commercial ELISA method for the quantitative detection of goat and cow milk in ewe milk and cheese. *Small Ruminant Res*, 79, (1): 73-79, 2008.
- GALINDO, L.; VALBUENA, E.; ROJAS, E., Estandarización de la detección del glicomacropéptido por PAGE-SDS como índice de adulteración de leche. *Rev Cient FCV-LUZ*, 16(3): 308-314, 2006.
- HAZA, I.; MORALES, P.; MARTIN, R.; GARCÍA, T.; ANGUISTA, G.; GONZÁLEZ I.; SANZ, B.; HERNÁNDEZ, P., Development of monoclonal antibodies against caprine α s2-casein and their potential for detecting the substitution of ovine milk by caprine milk by an indirect elisa. *J Agric Food Chem*, 44: 1756-1761, 1996.
- HOLDEN, L.; FÆSTE, C.; EGAAS, E., Quantitative Sandwich ELISA for determination of Lupine (*Lupinus* spp.) in foods. *J Agric Food Chem*, 53: 5866-5871, 2005.
- HONGXIN, S.; HAIYAN, X.; YAN, H., Detection of cow's milk in shaanxi goat's milk with an elisa assay. *Food Control*, 22: 883-888, 2011.
- LÓPEZ CALLEJA, I.; GONZÁLEZ A.; FAJARDO, V.; RODRÍGUEZ, M.; HERNÁNDEZ, P.E.; GARCÍA, T., Application of polymerase chain reaction to detect adulteration of sheep's milk with goat's milk. *J. Dairy Sciences*, 88: 3115-3120, 2005.
- LÓPEZ FANDIÑO, M.; ACEDO, M.I.; RAMOS, M., Comparative study by HPLC of casein macropeptides from cows' ewes' and goats' milk. *J Dairy Res*, 60: 117-121, 1993.
- MOATSOU, G.; ANIFANTAKIS, E., Recent developments in antibody-based analytical methods for the differentiation of milk from different species. *Int J Dairy Technol.*, 56(3): 133-138, 2003.
- MOLINA, E., ÁLVAREZ, M.; RAMOS, M., Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques. *Int. Dairy J.*, 9: 99-105, 2005.
- OANCEA, S., Identification of glycomacropéptido as indicator of milk and dairy drinks adulteration with whey by immunochromatographic assay. *Rom Biotechnol Lett*, 14: 4146-4151, 2009.
- PARK, Y.W.; JUÁREZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN, G.F.W., Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Res*, 68: 88-113, 2007.
- RECIO, I.; GARCÍA RISCO, M.R.; RAMOS, M.; LÓPEZ FANDIÑO, R., Characterization of peptides produced by the action of psychrotrophic proteinase on k-casein. *J Dairy Res*, 67: 625-630, 2000.
- SANZ, M.R.; FERNÁNDEZ, J.R.; DE LA TORRE, G.; RAMOS, E.; CARFONA, F.D.; BOZA, J., Calidad de la leche de los pequeños rumiantes. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, 16(1): 155-166, 2003.
- SILVA HERNÁNDEZ, E.R.; NAKANO, T.; VERDALET-GUZMÁN, I., OZIMEK, L., Comparison of glycomacropéptido isolated from raw and pasteurized goat milk. *Milchwissenschaft-milk Sci In.*, 59: 27-31, 2004.

Diccionario

- FAO, Base de datos TRADESTAT. Disponible en: www.fao.org. Consultado en, Diciembre de 2011.
- TREJO, G.E., Leche ovina, un negocio que da lana, *El economista*. Disponible en: <http://economista.com.mx/notas-impreso/columnas/agro-negocios/2009/04/16/leche-ovina-negocio-mexico>. Consultado en diciembre de 2011.