

ESTANDARIZACIÓN DE LA DETECCIÓN DEL GLICOMACROPÉPTIDO POR PAGE-SDS COMO ÍNDICE DE ADULTERACIÓN DE LECHE

Standardization Of Glycomacropeptide Detection with SDS-PAGE as a Milk Adulteration Index

Luz Mila Galindo-Amaya¹, Emiro Valbuena-Colmenares² y Evelin Rojas-Villarreal²

¹Departamento de Química, Facultad de Humanidades y Educación.

²Unidad de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Apartado 15252. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. E-mail: evalbuena@luz.edu.ve

RESUMEN

La electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS) se ha utilizado ampliamente para separar proteínas nativas y desnaturalizadas. En algunos países esta técnica ha sido útil para detectar adulteración de leche con suero de quesería, práctica que resulta fraudulenta según la normativa legal vigente. La presencia del glicomacropéptido (GMP) que es liberado al suero por acción de la renina sobre la κ -caseína durante la elaboración del queso, en muestras de leche, constituye un marcador de este tipo de adulteración. En este trabajo se estandarizó la detección de este péptido como índice de adulteración de leche pasteurizada, mediante aislamiento del GMP por precipitación secuencial con ácido tricloroacético (ATC) al 24 y 50%; tratamiento con etanol-éter y resuspensión en buffer Tris-HCl 0,05 M, EDTA 1 mM, pH 7,2 a partir de muestras de suero dulce, suero ácido, leche cruda recién ordeñada, mezclas suero:leche, leches pasteurizadas y en polvo comercializadas en la región. Los precipitados fueron analizados por PAGE-SDS y el GMP se evidenció como un trímero de 20,9 kDa en muestras de suero dulce y mezclas de suero leche (1, 5, 10 y 50%), pero ausente en muestras de suero ácido y leche cruda fresca. El análisis de quince muestras de leche pasteurizada (marcas A, B, C, D y E) reveló la presencia del GMP en diez de ellas correspondientes a las marcas A, B, C y E; sin embargo en cinco muestras de leche en polvo (marcas F, G, H, I y K) este péptido no fue observado. Los resultados obtenidos demuestran que la detección del GMP por PAGE-SDS en leche, representa un parámetro específico y sensible para detectar porcentajes de adulteración con suero, a niveles tan bajos como 1%, algo que no

puede ser revelado con la evaluación de los parámetros físico-químicos de la leche.

Palabras clave: Adulteración de leche, suero, GMP, PAGE-SDS.

ABSTRACT

The polyacrylamide gel electrophoresis sodium dodecylsulfate (PAGE-SDS) has been extensively used to separate native and denaturalized proteins. In various countries this has been useful to detect milk adulteration with whey, which is a fraud according to the current legal standards. The presence of glycomacropeptide (GMP) constitutes a marker of adulteration. It is released to the serum due to the hydrolysis of κ -casein peptide catalyzed by rennin incheese elaboration. In this work, the GMP detection was standardized as a pasteurized milk adulteration index, by means of GMP isolation with sequential precipitation in trichloroacetic acid at 24% and 50%, treatment with ethanol-ether and resuspension in buffer Tris-HCl 0.05 M, EDTA 1 mM, pH 7.2 from sweet whey, acid whey, recently drawn raw milk, mixtures of whey: milk; pasteurized milk and powder milk locally commercialized. Precipitates were analyzed by SDS-PAGE and GMP was evidenced as a trimer of 20.8 kDa in samples of sweet whey, and mixtures of whey: milk (1, 5, 10 and 50%), but absent in samples of acid whey and drawn raw milk. Analysis of fifteen samples of pasteurized milk (brands A, B, C, D and E) revealed the presence of GMP in ten of them, corresponding to brands A, B, C and E. Nevertheless after analyzing five samples of powder milk (brands F, G, H, I y K) this peptide was not observed. The results obtained demonstrate that investigation of GMP by SDS-PAGE in milk, constitute a sensible and specific parameter to detect milk

adulteration with whey, to levels as low as 1%, something that can not be revealed only with the evaluation of the physical-chemical parameters of milk.

Key words: Milk adulteration, whey, GMP, SDS-PAGE.

INTRODUCCIÓN

La leche es un producto alimenticio de gran importancia por sus propiedades nutritivas y alto valor biológico. En Venezuela se producen aproximadamente 1.400.000.000 litros de leche por año, siendo el estado Zulia el de mayor producción, con más de 550 millones de litros, los cuales se destinan a la elaboración de diferentes productos lácteos, entre ellos la leche pasteurizada, leche en polvo, quesos y otros productos lácteos que forman parte de la dieta del venezolano [2, 11].

La leche pasteurizada es el principal producto lácteo fluido que se consume en Venezuela. Los elementos constitutivos de mayor importancia en la leche de las diferentes especies de mamíferos son las proteínas, las cuales están presentes a nivel de 3,2% de este alimento. El 80% de estas proteínas son caseínas y el 20% restante está representado por las proteínas séricas β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, albúmina del suero bovino, euglobulina, pseudoglobulina, mucinas, proteínas de la membrana del glóbulo graso, otras albúminas, así como numerosas enzimas [22].

Las caseínas son un grupo de proteínas que contienen fósforo y son específicas de la leche, en donde se encuentran casi siempre en forma de micelas y precipitan a un pH de 4,6. Se conocen seis tipos de caseínas: α_{s1} (alfa s1), α_{s2} (alfa s2), β (beta), γ (gamma), κ (kappa) y λ (lambda) [22]. La caseína κ tiene propiedades físico-químicas únicas, si se compara con las otras proteínas de la leche. Algunas de estas propiedades son: insensibilidad a precipitación por iones calcio, por lo que se mantiene soluble en soluciones de calcio con concentraciones que precipitan a todas las demás caseínas; efecto estabilizador sobre las otras caseínas cuando el calcio está presente en la suspensión; sufren hidrólisis por quimosina en un enlace peptídico específico, lo que resulta en la desestabilización de las micelas y la formación de precipitados; además, es la única de las caseínas que contiene residuos de cisteína y glúcidos en su estructura [19].

Debido a su condición de alimento perecedero y al gran riesgo de pérdida en lo económico que esto significa, la calidad de la leche se ve afectada en ciertos aspectos, tales como el microbiológico a causa de la falta de higiene y el fisicoquímico a causa de adulteraciones, con las consiguientes consecuencias de índole nutricional, económica y legal [2, 6, 20].

Entre las adulteraciones más frecuentes que se hacen a la leche, se pueden mencionar: adición de sustancias químicas no permitidas por la legislación venezolana como la adición de agua y cloruros; adición de preservativos o neutrali-

zantes; tratamientos térmicos inadecuados que alteran la conformación nativa de las proteínas; adición de suero dulce, entre otros [3, 6]. Estas adulteraciones ocurren en cualquier etapa de la producción como en el transporte o en el procesamiento de la misma, y con éstas se persigue aumentar los volúmenes de leche, a fin de incrementar las ganancias.

El suero dulce es el subproducto lácteo que se separa de la cuajada durante el proceso de fabricación de quesos frescos. Se obtiene por coagulación enzimática de la leche, por acción de la enzima quimosina, la cual hidroliza la kappa (κ)-caseína de la leche a nivel del enlace Phe-Met (105-106), produciendo dos fragmentos: una porción hidrofílica, de carácter ácido, constituida por 64 aminoácidos, llamada glicomacropéptido (GMP), la cual se mantiene en solución en el suero, y la otra porción es hidrofóbica, de carácter básico, compuesta por 105 aminoácidos, llamada paracaseína- κ , la cual queda retenida en el coágulo [16, 21, 22].

Diversas investigaciones a nivel mundial [17, 18] han evidenciado la presencia del GMP en muestras de leche. Esto constituye un indicador de adulteración de la leche cruda con fines comerciales, representando un fraude para el consumidor o el industrial, pero significa un aumento en los volúmenes de ganancia para quien lo practica, ya que este suero tiene un costo muy bajo comparado con el precio de la leche. Esta práctica se hace posible debido a que el suero es un componente natural de la leche y, por lo tanto, sus propiedades coligativas son similares, lo cual hace casi imperceptible su presencia cuando éste ha sido agregado a la leche.

Hasta ahora se han desarrollado varios métodos para detectar la adulteración de la leche por agregado de suero, diferenciándose éstos por su sensibilidad y versatilidad de los equipos empleados en el análisis [6, 17, 18]. El aislamiento del GMP mediante precipitación con ácido tricloroacético (ATC) seguido por electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS) ha sido ampliamente utilizado para detectar la presencia del GMP en leches procesadas para consumo humano [4, 9, 17, 18].

Con el fin de detectar la presencia del GMP como marcador de adulteración de leche con suero dulce, en el presente trabajo se planteó estandarizar la extracción y detección de este péptido mediante precipitación con ATC y PAGE-SDS, respectivamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las muestras

Se usó leche cruda recién ordeñada (leche cruda fresca) libre de suero, como control negativo, proveniente de una finca ubicada en el municipio Machiques de Perijá, estado Zulia. El suero dulce líquido se incluyó como control positivo, obtenido de una industria quesera del municipio Jesús Enrique Losada, estado Zulia. Se utilizó suero ácido como control negativo, el

cual fue obtenido mediante coagulación ácida de leche cruda fresca con ácido acético al 30%.

Se prepararon mezclas de suero dulce-leche y de suero dulce-agua en las siguientes proporciones 1; 5; 10; y 80 (%V/V). El suero utilizado para preparar las mezclas con leche fue previamente calentado a 80°C por 10 minutos para eliminar cualquier actividad residual de la quimosina en el suero [4, 5].

Extracción del GMP

La extracción del GMP se realizó siguiendo la metodología de Olieman y col. [15] con algunas modificaciones: A 50 mL de muestra (leche cruda fresca, suero dulce, suero ácido, mezclas de suero-leche y mezclas de suero-agua), se agregaron lentamente y bajo agitación constante durante 2 minutos, 25 mL de una solución de ATC al 24%. Esta mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 60 minutos. Luego de este tiempo se separó el precipitado (caseínas) del sobrenadante (proteínas séricas) por filtración, utilizando papel Whatman 42. A 30 mL del filtrado se añadió 8 mL de una solución de ATC al 50%, y se dejó en reposo bajo refrigeración (4-6°C) durante 60 minutos. La suspensión resultante se centrifugó en Centrífuga Sorvall, rotor SS-34, a 7.000 r.p.m. entre 4 y 6°C durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se descartó y el precipitado se lavó 2 veces con 10 mL de una mezcla de etanol-éter 1:1 y luego se centrifugó bajo las condiciones de la centrifugación anterior. El sobrenadante fue descartado y los tubos se escurrieron sobre papel absorbente para eliminar los excesos de la mezcla de lavado. El precipitado final se resuspendió en 300 µL de Buffer TRIS-HCl 0,05 M; EDTA 1mM, pH 7,2 y se guardó bajo congelación a -20°C hasta su uso.

Electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS)

Las muestras resultantes de la precipitación con ATC fueron analizadas por PAGE-SDS, usando el sistema buffer discontinuo de Laemmli [8]. En este sistema las proteínas son desnaturalizadas por calentamiento en buffer que contiene SDS y β -mercaptoetanol como agente reductor [10]. Las electroforesis fueron realizadas en una cámara Mini-PROTEAN III[®], BIO-RAD, a voltaje constante de 200 V, con una corriente que osciló entre 85 y 35 mA, usando geles de apilamiento y separación al 4% y 15% de acrilamida, respectivamente. La corrida se realizó utilizando buffer tris-glicina pH 8,3 durante un tiempo de 35 a 40 minutos.

En todas las corridas se incluyó un marcador de amplio rango de masa molecular de BIO-RAD (contiene miosina, β -galactosidasa, fosforilasa b, albúmina sérica bovina, ovoalbúmina, anhídrido carbónico, inhibidor de tripsina, lisozima y aprotinina).

La visualización de las bandas de proteínas se realizó mediante tinción de los geles con azul de Coomassie R-250 0,2% en metanol: ácido acético: agua (25: 10: 85) a temperatura ambiente, por un tiempo mínimo de 6 horas seguida por

decoloración en una solución de metanol: ácido acético: agua (25: 10: 85).

La masa molecular de las proteínas separadas en el gel se calculó a partir de una curva de calibración construida al graficar el logaritmo de la masa molecular de los marcadores, contra la movilidad relativa (Rf) de los mismos. Aplicando la ecuación de los mínimos cuadrados al valor de Rf de la banda de interés, se calculó la masa molecular aparente del GMP.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección del GMP en PAGE-SDS

Con el propósito de reconocer la banda correspondiente al GMP, se analizó en un mismo gel el perfil electroforético de leche cruda fresca; suero ácido (control negativo) y suero dulce (control positivo) antes y después de tratamiento con ácido tricloroacético (FIG. 1).

Se observan en las líneas 3, 5 y 7 el perfil de proteínas de leche auténtica, suero ácido y suero dulce, respectivamente. previo al tratamiento con ATC. En la muestra de leche se observa una zona muy coloreada y extensa entre 30 y 40 kDa, que se corresponde a la zona de las caseínas, mientras que en las muestras de suero, las bandas de proteínas que predominan son de 19 kDa y 13,5 kDa, correspondientes al monómero de β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina, respectivamente. En las líneas 4, 6 y 8 se observan las mismas muestras después de su tratamiento con ATC. La diferencia evidente entre el perfil de proteínas en estas tres líneas está dada por una banda con masa molecular aparente de 20,9 kDa presente en la línea 8 que también está presente en el suero dulce (línea 7).

El tratamiento con ATC permite precipitar el GMP, por lo tanto, en el PAGE-SDS de la leche cruda y el suero ácido (que no contienen el glicomacropéptido) tratados con este ácido, como era de esperarse, no se observa ninguna banda que se corresponda con el GMP. Por otro lado, si comparamos el perfil de proteínas del suero ácido (línea 5) y del suero dulce (línea 7) podemos notar que son prácticamente idénticos a excepción de la banda de 20,9 kDa. Esta observación sugiere que esta banda corresponde al GMP.

Se ha señalado que el monómero de GMP tiene una masa molecular de 6,8 kDa sin considerar la porción glucídica; además se ha reportado que este forma agregados a pH neutro y que la masa molecular del agregado depende del pH en el cual se encuentre [7, 22].

El GMP presente en suero de leche bovina se ha observado en su forma agregada cuando se analiza por cromatografía en gel [14] o por electroforesis [13]. El mecanismo de agregación se desconoce, y tampoco está claro por qué el agregado de GMP no se disocia en los geles en presencia de SDS. Se ha referido que el SDS se une a la porción peptídica de una molécula de GMP y evita las interacciones hidrofóbicas con otras moléculas de GMP; sin embargo, las cadenas glucí-

dicas de las diferentes moléculas de GMP pueden interactuar a través de enlaces por puentes de hidrógeno, lo cual trae como resultado masas moleculares mayores de 18.000 Da, para este péptido en PAGE-SDS. Además, la afinidad del SDS por el GMP es muy débil como para disociar el trímero de GMP, lo que puede contribuir al predominio de las formas agregadas en presencia de SDS [12].

También se ha señalado que a nivel de la leche, la β -lactoglobulina y la caseína- κ , pueden formar enlaces por efecto del tratamiento térmico y eventualmente esto pueda bloquear la unión de la porción peptídica del GMP y el SDS [12].

La obtención en este estudio de una banda de 20,9 kDa en el precipitado de ATC del suero dulce, probablemente representa una forma agregada (trímero) de este péptido, lo que se corresponde con lo reportado en investigaciones previas acerca del GMP donde pocas veces se ha observado su forma monomérica. En tal sentido, varios investigadores han analizado la estructura del GMP, utilizando diversos métodos de extracción, purificación y caracterización, encontrando que en PAGE-SDS, el GMP de suero dulce se presenta como 2 bandas con masas moleculares de 20.740 Da (26,1%) y 18.380 Da (73,9%) [1, 4].

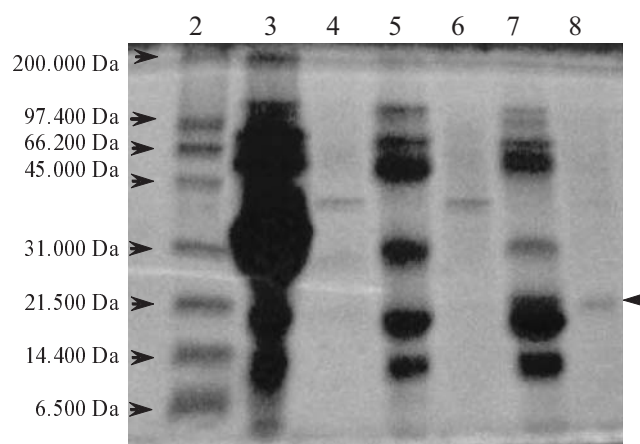
La heterogeneidad estructural del GMP, debida a la variación en su composición glucídica, determina que los valores de masas moleculares reportados para el GMP, dependan en gran medida del tipo de extracción realizada y del método utilizado para la detección del mismo [1, 18].

Con la finalidad de observar un aumento gradual de la banda de 20,9 kDa, correspondiente al GMP, en función del grado de adulteración sistemática de leche cruda fresca con suero dulce, se realizaron corridas electroforéticas de mezclas suero: leche.

En la FIG. 2 se muestra el patrón de proteínas de las mezclas suero:leche tratadas con ATC para extraer el GMP. Se puede apreciar en este gel que existe un aumento gradual de la banda de 20,9 kDa del GMP, proporcional a la concentración de suero en cada mezcla. En tal sentido, si se comparan las líneas 4, 5, 6, y 7 de esta figura, se observa que la intensidad de esta banda se incrementa en la medida que la proporción de suero en la mezcla aumenta en 1; 5; 10 y 50%, respectivamente.

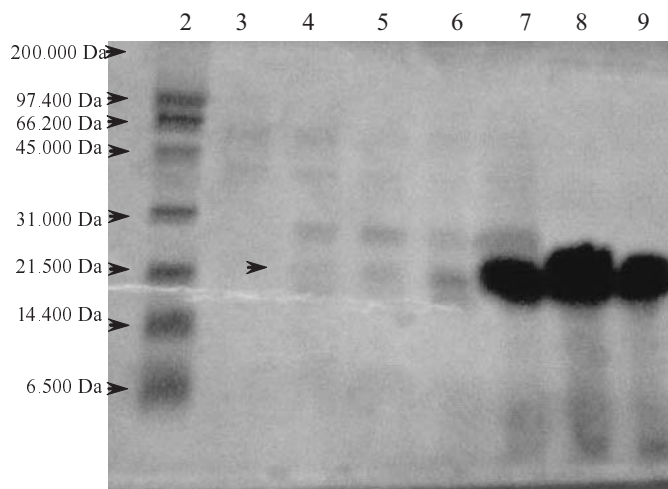
Los resultados de este gel evidencian que efectivamente la banda de 20,9 kDa corresponde al GMP ya que está ausente en la línea 3 donde se aplicó leche cruda fresca tratada con ATC, mientras que en las líneas 8 y 9 está claramente presente en muestras de suero dulce tratado con ATC.

De manera complementaria y paralela a este ensayo, se realizaron mezclas de suero: agua en proporciones análogas a las mezclas de suero: leche, encontrándose iguales resultados: una relación proporcional de la banda del GMP en la medida que la concentración de suero en la mezcla fue mayor (resultados no mostrados).



En las líneas se observan: 2: Estándar de Bio-Rad (8 μ L); 3 y 4: Leche cruda fresca sin tratar (3 μ L) y tratada (40 μ L); 5 y 6: Suero ácido sin tratar (3 μ L) y tratado (40 μ L); 7 y 8: Suero dulce sin tratar (3 μ L) y tratado (10 μ L); respectivamente con ATC.

FIGURA 1. PERFIL DE PROTEÍNAS DE LECHE, SUERO ÁCIDO Y SUERO DULCE POR PAGE-SDS / MILK, ACID WHEY AND SWEET WHEY PROTEIN PROFILE BY SDS-PAGE.



Se observa en las líneas: 2: Estándar de Bio-Rad (8 μ L) 3: Leche cruda fresca (20 μ L). 4, 5, 6 y 7: Mezclas de suero-leche 1, 5, 10 y 50 % respectivamente (20 μ L). 8 y 9: Suero dulce 100 % (10 y 5 μ L respectivamente).

FIGURA 2. PERFIL DE PROTEÍNAS EN MEZCLAS DE SUERO:LECHE POR PAGE-SDS / PROTEIN PROFILE IN WHEY: MILK MIXTURES BY SDS-PAGE.

El GMP como índice de adulteración de leche

Quince (15) muestras de leche pasteurizada (marcas A, B, C, D y E) y cinco (5) de leche en polvo (marcas F, G, H, I y J) fueron sometidas a tratamiento con ATC y analizadas por PAGE-SDS a fin de evaluar la eficiencia del método en la detección de adulteración de leche por suero dulce. La TABLA I resume los resultados obtenidos con la leche pasteurizada. En diez muestras de las marcas A, C, D y E se evidenció la banda

de 21,9 kDa del GMP, mientras que la leche de marca D no mostró presencia del GMP. Tomando como referencia los resultados descritos en la FIG. 2, se estimó el porcentaje de adulteración en las muestras de leche donde se evidenció la presencia del GMP. En tal sentido, la leche B se correspondió con 1%; las marcas A y C con 10% y la marca E mostró un poco más del 50% de adulteración (TABLA I).

En las marcas F, G, H, I y J correspondientes a leche en polvo, no se evidenció la banda del GMP, para ninguno de los casos, por lo que se presume que estas leches estaban libres de adulteración por suero.

Parámetros fisicoquímicos de las leches analizadas

En la TABLA II se muestran los valores promedio de los parámetros fisicoquímicos de las leches pasteurizadas A, B, C, D, E analizadas en este trabajo y leche cruda fresca, comparados con los valores establecidos por la normativa legal vigente

venezolana [3] para leche pasteurizada. Se observa en dicha tabla que la leche de la marca E, la cual mostró el mayor grado de adulteración, presenta valores de proteínas totales, grasa, sólidos totales y otros parámetros fisicoquímicos, inferiores al resto de las marcas estudiadas e inferior al valor establecido en la norma, lo cual fue producto de una evidente dilución de ésta al apreciarse la disminución de su punto crioscópico.

Estos resultados se correlacionan con los observados por Faría y Boscán [6] y Briñez y col. [2] quienes encontraron que leches adulteradas sistemáticamente con suero de quesería en porcentajes de 10 y 15%, mostraban valores de proteínas totales (2,95 y 2,85%, respectivamente) inferiores a los establecidos en la normativa legal vigente.

Por otro lado, la leche comercial E también exhibe porcentaje relativamente bajo de caseínas (1,6%) en comparación con las otras marcas comerciales (alrededor de 2,5%); similar a lo encontrado por Faría y Boscán [6] quienes describen valo-

TABLA I
PRESENCIA DEL GLICOMACROPÉPTIDO (GMP) EN 5 MARCAS DE LECHE PASTEURIZADA / PRESENCE OF GLICOMACROPEPTIDE (GMP) IN FIVE BRANDS OF PASTEURIZED MILK

Marca	n	Muestra/Presencia de GMP	% de muestras adulteradas	% estimado de suero añadido
A	3	1/+ 2/+ 3/+	100	5
B	3	1/+ 2/+ 3/-	66,6	10
C	3	1/+ 2/- 3/+	66,6	10
D	3	1/- 2/- 3/-	0	0
E	3	1/+ 2/+ 3/+	100	50

TABLA II
VALORES PROMEDIO DE LOS PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS DE LA LECHE PASTEURIZADA / AVERAGE VALUES OF THE PHYSICAL CHEMICAL PARAMETERS OF PASTEURIZED MILK

Parámetro	Marca de leche pasteurizada					Leche cruda	Norma COVENIN
	A	B	C	D	E		
Proteínas totales (%)	3,36	3,36	3,50	3,25	2,15	3,75	3,00
Caseína (%)	2,50	2,50	2,70	2,50	1,6	2,50	-
Proteína sérica (%)	0,86	0,86	0,80	0,754	0,55	1,25	-
Grasa (%)	3,60	3,70	3,40	3,10	2,30	4,00	3,20
Sólidos totales (%)	12,0	12,0	12,6	11,9	9,7	13,0	12,0
Acidez (mL NaOH 0,1N)	17,0	18,0	15,0	18,0	15,0	19,0	15,0-19,0
Punto de congelación (°H bajo cero)	0,545	0,525	0,535	0,538	0,513	0,531	0,540-0,555

res de 1,99 y 1,85% de caseína para las muestras previamente adulteradas con 10 y 15% de suero respectivamente; esto es, probablemente, consecuencia de la dilución de las caseínas con el agregado de suero.

El porcentaje de proteína sérica, obtenidos por diferencia entre las proteínas totales y las caseínas, fueron similares (alrededor de 0.8%) para las marcas A, B, C, y D, mientras que la leche de la marca E, mostró un valor relativamente menor (0,55%), en comparación al valor resultante en la leche cruda fresca (1,25%). Este se corresponde con el bajo valor obtenido para las proteínas totales para esta marca de leche.

Estos hallazgos, en correlación con los resultados de Faría y Boscan [6] y Briñez y col. [2] señalan que muestras de leche adulteradas con suero entre 1 y 10% no pueden ser detectadas al evaluar únicamente los parámetros físico-químicos de las mismas. De este modo, las leches A, B y C se mostraron químicamente adecuadas al comparar sus valores con los de la norma y numéricamente no difieren con respecto a los de la leche de la marca D la cual aparentemente no mostró adulteración; esto apunta a que la detección del GMP por PAGE-SDS, constituye un parámetro específico y sensible como marcador de la adulteración de leche con suero.

CONCLUSIONES

Las condiciones de extracción y corrida en PAGE-SDS utilizados en este trabajo señalan que el GMP se evidencia como una banda de 20,9 kDa que representa probablemente una forma trimérica de este péptido. Los resultados obtenidos indican que la investigación del GMP en leche, representa un parámetro específico y sensible para detectar grados de adulteración de leche con suero, desde un 1%: lo que no puede ser revelado al analizar los parámetros físico-químicos de la leche.

La presencia del GMP en cuatro marcas de leche pasteurizada que se expenden en el municipio Maracaibo analizadas en este trabajo, revela adulteración por suero; sin embargo éste constituyó sólo un estudio descriptivo el cuál amerita en futuras investigaciones, realizar un estudio más completo a fin evaluar la calidad de la leche pasteurizada que se expende en la región.

AGRADECIMIENTO

Los autores quieren expresar su agradecimiento al Parque Tecnológico Universitario (PTU) por el apoyo y financiamiento de esta investigación, así como también a la Unidad de Investigaciones Ofidológicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ARMSTRONG, C.E.; MAC KINLAY, A.C.; HILL, R.J.; WAKE, R.G. The action of renin on k-casein: The heterogeneity and origin of the soluble product. **Biochim. Biophys. Acta** 140: 123-131. 1967.
- [2] BRÍÑEZ, W.; VALBUENA, E.; CASTRO, G.; FUENTES, F.; GONZÁLEZ, D.; TOVAR, A. Calidad físico-química de las principales marcas de leche pasteurizadas en la ciudad de Maracaibo. **Rev. Cientif. FCV-LUZ**. XII(3): 221-230. 2002.
- [3] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Leche. (903). 1993.
- [4] CHOW, D.L.; HARPER, W.J. Selected characteristics of casein glycomacropptide from different sources. **Milchwissenschaft**. 56(7): 370-373. 2001.
- [5] DE SOUZA, E.; ARRUDA, S.; BRANDÃO, P.; SIQUEIRA, E. Electrophoretic analysis to detect and quantify additional whey in milk and dairy beverages. **Cienc. Tecnol. Aliment**. 20(3): 314-317.2000.
- [6] FARÍA, J.; BOSCAN, L. Detección de adulteración de leche con suero mediante la relación proteína sérica/caseinato. **Rev. Cientif. FCV-LUZ**.II(1): 43-48. 1992.
- [7] KAWASAKI, Y.; KAWAKAMI, H.; TANIMOTO, M.; DOSAKO, S.; TOMIZAWA, A.; KOTAKE, M.; NAKAJIMA, F. pH-Dependent molecular weight changes of k-casein glycomacropptides and its preparation by ultrafiltration. **Milchwissenschaft**. 48: 191-196.1993.
- [8] LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature**. 227(15): 580-685.1970.
- [9] LÉONIL, J.; MOLLÉ, D. A method for determination of macropptide by cation-exchange fase protein liquid chromatography and its use for following action of chymosin in milk. **J. Dairy Res**. 58: 321-328. 1991.
- [10] MCKEE, J.; MCKEE, T. **Bioquímica, la base molecular de la vida**. 3ª Ed. McGraw-Hill Interamericana. España.773 pp. 2003.
- [11] MINISTERIO DE AGRICULTURA Y CRÍA. **Anuario Estadístico del Ministerio de Agricultura y Cría**. Maracaibo. 169-174 pp. 1997.
- [12] MORR, C.V.; SEO, A. Fractionation and characterization of glycomacropptide from caseinate and skim milk hydrolysates. **J. Food Sci**. 53: 80-87. 1988.
- [13] NAKANO, T.; OZIMEK, L. Purification of glycomacropptide from non-dialyzable fraction of sweet whey by hydrophobic interaction chromatography on phenyl-agarose **Biotechnol. Lett**. 22(5): 413-416. 2000.

- [14] NAKANO, T.; OZIMEK, L. Gel chromatography of glycomacropéptide (GMP) from sweet whey on Sephacryl S-200 at different pH's and on Sephadex G-75 in 6M guanidine hydrochloride. **Michwissenschaft.** 53(11): 629-633. 1998.
- [15] OLIEMAN, C.; BEDEM, J. W.A A sensitive HPLC method of detecting and estimating rennet whey total solids in skim milk powder. **Neth Milk Dairy J.** 37: 27-36. 1983.
- [16] ORIA, R. **Ciencia y tecnología de la leche. Principios y aplicaciones.** 1ª Ed. Editorial Acribia, S. A. España. 393 pp.1991.
- [17] PINTO, C. Detección de sólidos totales de suero de quesería en leche pasteurizada y leche en polvo por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. **Alim.** 16(3): 23-31. 1991.
- [18] ROSAS, R. Implementación de dos técnicas de detección de suero de quesería como adulterante de leche deshidratada por espectrofotometría y por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México. (Tesis de Grado) 39 pp. 1997.
- [19] SWAISGOOD, H.J. Primary secuencia of kappa-casein. **J. Dairy Sci.** 58(4): 583-592. 1975.
- [20] VALBUENA, E.; CASTRO, G.; LIMA, K.; ACOSTA, W.; BRÍÑEZ, W.; TOVAR, A. Calidad microbiológica de las principales marcas de leche pasteurizadas distribuidas en la ciudad de Maracaibo, Venezuela. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** XIV(1): 59-67. 2004.
- [21] VAN HOOYDONK, A.C.M.; OLIEMAN, C.; HAGEDOORN, H.G. Kinetics of the chymosin-catalyzed proteolysis of κ -casein in milk. **Neth. Milk Dairy J.** 37: 207-222. 1984.
- [22] WALSTRA, P.; JENNES, R. **Química y Física Lactológica.** 1ª Ed. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 423 pp. 1987.