

# Correlación de glicomacropéptido de lacto suero dulce con proteasas de bacterias psicrótrofas e identificación de leche adulterada

Alexandra García-Romero, Eduardo Mayorga-Llerena\*

Laboratorio de Biotecnología  
Universidad Central del Ecuador  
Ciudadela Universitaria Quito-Ecuador  
Quito-Ecuador

\* emayorga@uce.edu.ec

**Resumen**— La adición de suero es una actividad no permitida, Norma INEN-NTE-2401. Se ha estimado la adulteración de leche cruda con suero mediante la cuantificación del Glicomacropéptido (GMP) y detectado la actividad proteolítica bacteriana (APB), actividad proteolítica total (APT), recuento de psicrotrofos proteolíticos (RPP) y recuento de psicrotrofos totales (RPT) como interferentes de cuantificación de GMP. Los resultados mostraron que la adulteración es alta, un 75%, la correlación entre GMP y APB es  $R^2=0,99$ ; igualmente entre APT, RPP y RPT. El contenido de GMP no solo que determina adulteración de la leche cruda; sino que también se realiza bajo malas prácticas desde los sitios de producción al centro de la ciudad.

**Palabras claves:** *Proteólisis bacteriana, Control de alimentos, Adulteración, control de calidad, actividad proteolítica*

**Abstracts**--The addition of serum is an illegal activity, Standard NTE-INEN-2401. It has been estimated adulteration of raw milk serum by quantifying the glycomacropeptide (GMP) and detected bacterial proteolytic activity (APB), the total proteolytic activity (APT), and proteolytic psicrotrofos count (RPP) and total count psicrotrofos (RPT) as interfering GMP quantization. The results showed that the adulteration is high, at 75%, the correlation between GMP and APB is  $R^2 = 0.99$ ; equally between APT, RPP and RPT. GMP content not only determines adulteration of raw milk; but also it is under bad practices from production sites to downtown.

**Keywords:** *Bacterial proteolysis, Control food adulteration, quality control, proteolytic activity*

## I. INTRODUCCIÓN

La adición de suero a la leche es un problema real, pues la leche falsificada se vende a la población ecuatoriana; la adulteración fluctúa entre los 60 mil a 150 mil litros diarios y con el incremento de producción nacional en los últimos cuatro años que bordea los 500 mil litros anuales, se genera enormes pérdidas para el sector lechero que incluso podría llevar a la quiebra del sector.

Esta situación es más crítica en industrias procesadoras y/o comercializadoras de leche, ya que por los grandes volúmenes de producción que manejan, tienen problemas de controlar adulteración de leche con suero lácteo, sin tomar en cuenta

que este parámetro debe vigilarse diariamente dentro de las plantas procesadoras [1]

El cuajo descompone la leche en caseína semisólida y suero de leche. Las proteínas no coagulables por acción del cuajo representan el 21% de la proteína total de la leche, la enzima más utilizada es la renina que tiene como principio activo la quimosina [2], cuando la  $\kappa$ -caseína es tratada con la quimosina, esta es hidrolizada entre los aminoácidos 105 y 106, (fenilalanina y metionina respectivamente), dando como resultado dos fracciones:  $\kappa$ -caseína (residuo 1–105) y Glicomacropéptido (GMP) residuo 106 – 169 [3].

El GMP queda soluble en el suero después de separar la cuajada, al ser formado por acción de la quimosina [4], no está presente en la leche y su detección es un indicador de adulteración de leche con lacto-suero dulce [5].

El GMP se utiliza como indicador de adulteración con suero de quesería mediante la técnica de electroforesis en gel poliacrilamida-SDS [6].

El empleo de técnicas cromatográficas para la determinación de GMP ha dado muy buenos resultados; en la actualidad existe un método cromatográfico capaz de detectar la presencia del GMP, con el inconveniente de dar resultados falsos positivos, ya que en el caso de leches almacenadas, es posible que exista una población relativamente alta de bacterias psicrótrofas como *Pseudomonas* spp, *Achromobacter* spp, *Flavobacterium* spp, en el proceso se generan enzimas lipolíticas, proteolíticas responsables del deterioro que incluyen olores pútridos y sabores rancios [11], estos péptidos son de peso molecular similar al del GMP.

Las proteasas de origen bacteriano atacan preferentemente a ciertas fracciones caseínicas de la leche, degradándolas en el orden  $\kappa$ -CN >  $\beta$ -CN >  $\alpha$ -CN [7]; aún en leche pasteurizada-UHT hay modificaciones en las caseínas producidas por las proteasas termoresistentes de las bacterias psicrótrofas; mientras que las proteínas de suero normalmente no se degrada por los microorganismos presentes en la leche.

## II. EXPERIMENTAL

## A. Materiales

Muestras: Se tomaron 32 muestras, 4 cada semana y durante 8 semanas, entre los meses de noviembre y diciembre del 2012.

Materiales Tipo A: Pipetas graduadas de 20 ml, Bureta de 50 ml, Vasos de precipitación 50 ml, Erlenmeyer de 250 y 500 ml, Placa Petri de vidrio de 100 mm x 15 mm.

Equipos: Balanza analítica, centrifuga, Autoclave, espectrofotómetro Shimadzu UV-160 A, Cromatógrafo HPLC-Shimatzu, Baño termo regulable, Estufa de incubación

Reactivos: Acetonitrilo p.a., Acido orto-fosfórico, Acido Tricloroacético, Di potasio hidrogenofosfato anhidro p.a., Potasio dehidrogen fosfato p.a., Sodio Sulfato p.a. Sodio fosfato di-hidrogenop.a., Azida de sodio, Agua de peptona, Agar nutritivo, Agar leche, Caldo triptona Soya TSA, Cepas *Pseudomonasspp*, Solución de caseína al 1%, Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.5

## B. Métodos

- i. Método de determinación de GMP en HPLC: según Norma NTE-INEN 2 401:2008 [8], el cromatograma se reporta en el Anexo 1.

Condiciones de equipo: Equipo marca Shimadzu®, presenta las siguientes condiciones: Fase estacionaria Agilent Zorbax Bio Series gf-250, fase móvil: Solución eluyente pH 6.0, Espectro UV de Longitud de onda 205 nm, Volumen de inyección 100 µl, flujo: 1ml/min y Temperatura de columna: 35+/- 1°C.

- ii. Método de contaje bacteriano como actividad proteolítica bacteriana (APB)

La actividad proteolítica fue determinada con el método de Kunitz [9], que se describe a continuación.

- Se prepararon tres series de tubos: 3 Blancos, 3 Testigos y 3 Tubos de reacción.
- Los blancos se prepararon con 2 ml de la solución de caseína al 1% y se agregaron 3 ml de solución de ácido tricloroacético al 5%.
- A los tubos testigo se agregó 1.9 ml de solución de caseína al 1% más 3 ml de solución de ácido tricloroacético al 5%; finalmente se adicionó 0.1 ml del cultivo (leche).
- Los tubos de reacción se prepararon con 1.9 ml de solución de caseína al 1%, se adicionó 0.1 ml del cultivo (leche) y se incubaron durante 20 minutos a 40° C en un baño de temperatura controlada. La

reacción fue detenida por adición de 3 ml de solución de ácido tricloroacético al 5%.

- Todos los tubos (blancos, testigo y de reacción), se centrifugaron en una centrifuga Beckman J2MI a 18000 rpm durante 15 minutos y se determinó la absorbancia del sobrenadante a 280 nm en celdas de cuarzo en el espectrofotómetro Shimadzu UV-160 A.
- Los resultados se trataron y se reportaron en UE/ml de cultivo. Una unidad de actividad enzimática (UE), fue definida como la cantidad de enzima que produce un aumento en 0.001 unidades de absorbancia por minuto

Bacterias psicrotrofas: Según APHA, el recuento en placas de PlateCount (Merck) incubando a 5-7°C durante 7 a 10 días.

Bacterias proteolíticas: recuento en placas de Agar leche (Merck) incubando a 30°C durante 72 horas.

Análisis estadístico: Coeficiente de correlación de Pearson.

## III. RESULTADOS

## A. GMP en leche cruda

Se determina la presencia del GMP en 24 muestras de las 32 muestras de leche cruda, lo cual revela que un 75% de las muestras fueron adulteradas con suero de leche en porcentajes de hasta 7,5%, el contenido de suero promedio en leche Cruda es de 3,5%; con una desviación estándar de 2,76. En la Gráfica 1 (Anexo 1) se identifica GMP al t=9.717 minutos en el cromatograma HPLC de una de las muestras de leche crudas. La actividad proteolítica de bacterias psicrotrofas presentes en leche cruda de muestras tomadas en la ciudad de Quito se detallan en la Tabla I.

TABLA I: VALORES MEDIOS DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA (µE/ml) EN LECHE CRUDA

Semana	M1	M2	M3	M4
1	97	19	54	57
2	110	36	59	69
3	89	25	47	42
4	98	28	57	77
5	96	17	36	45
6	116	24	57	66
7	85	31	65	58
8	97	35	58	81
Promedio	99	26,9	54,1	61,9

En la Tabla I se observa que el tratamiento que presentó mayor actividad proteolítica es la muestra con un valor de 116 µE/ml.

La presencia de microorganismos proteolíticos, es la razón de la actividad proteolítica bacteriana alta, los restantes tratamientos contiene valores más bajos de actividad proteolítica, lo que indica que son valores moderados de actividad proteolítica.

Con esta prueba se determinó la actividad proteolítica total de las muestras siguiendo el método Kunitz, para la estimación de bacterias psicrótrofas totales y proteolíticas en leche cruda.

#### B. Análisis microbiológico

Los resultados de la presencia de microorganismos psicrótrofos totales en leche cruda de distintos mercados ubicados en la Ciudad de Quito se encuentran en la Tabla II.

TABLA II: PROMEDIO TOTAL DE RECUENTO DE MICROORGANISMOS PSICRÓTROFOS TOTALES (RPT) EN LECHE CRUDAS DE LA CIUDAD DE QUITO. UFC/ML DE MICROORGANISMOS PSICRÓTROFOS TOTALES (RPT)

Sema	M1 Log ufc/ml	M2 Log ufc/ml	M3 Log ufc/ml	M4 Log ufc/ml
1	7,00	2,60	7,46	7,80
2	7,18	2,77	7,53	7,51
3	7,41	2,48	7,84	7,72
4	7,04	2,51	7,78	7,81
5	7,26	2,59	7,73	7,76
6	7,43	2,58	7,61	7,46
7	7,54	2,41	7,54	7,80
8	7,34	2,34	7,76	7,72
$\bar{X}$	7,28	2,54	7,66	7,70

#### C. Determinación de actividad proteolítica de leches crudas en placa de agar leche

Recuento de Bacterias Psicrótrofas Proteolíticas (RPP), La determinación de proteasas se realizó con la técnica de placa de agar con leche descremada, dicha hidrólisis se aprecia a través de la formación de halos alrededor de la colonia, lo que indica actividad proteolítica de los microorganismos presentes en la leche cruda y sirven para confirmar los resultados obtenidos donde se observa que las muestras de leche cruda con mayor actividad proteolítica por la técnica de Kunitz [9]. En la Tabla 3 se observa los resultados.

TABLA III: VALORES PROMEDIOS DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA TOTAL (APT), BACTERIAS PSICROTROFAS TOTALES (RPT), PSICROTROFAS PROTEOLÍTICAS (RPP) Y PORCENTAJE DE SUERO (W%) COMO GLICOMACROPÉPTIDO (GMP) EN LECHE CRUDAS

Tratamiento	(APT)	(RPT)	(RPP)	(GMP)
	( ABSORB 280 nm)	ufc/ml	ufc/ml	%
M1	54	7,35	5,11	7,57
M2	27	2,54	1,29	0,11
M3	99	7,7	5,52	3,9
M4	61	7,46	5,38	2,57

#### D. Correspondencia entre los Glicomacropéptidos (GMP) y actividad proteolítica bacteriana mediante correlación múltiple de Pearson.

Los resultados se muestran en la Tabla IV.

TABLA IV: COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE PEARSON ENTRE EL CONTAJE MICROBIOLÓGICO, ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA TOTAL Y GLICOMACROPÉPTIDOS (GMP)

	APT	RPT	RPP	GMP
APT	1			
RPT	0,9071	1		
RPP	0,9020	0,9999	1	
GMP	0,9925	0,9517	0,9479	1

RPT= Recuento de psicótrofos totales;  
RPP= Recuento de psicótrofos proteolíticos;  
APT= Actividad proteolítica Total;  
GMP= Glicomacropéptidos

#### IV. CONCLUSIONES

El Recuento de psicótrofos totales (RPT) resultó altamente correlacionado con el Recuento de psicótrofos proteolíticos(RPP), según Costa *et al.*[10], se produce un incremento notable en la actividad proteolítica desde las primeras horas de fermentación[10], el presente trabajo confirma que las elevadas cargas de psicótrofos totales y proteolíticos se encuentra estrechamente relacionados entre sí con un índice de  $R^2=0,99\%$  en muestras de leche cruda adquiridas en los mercados de la ciudad de Quito.

Esta correlación entre RPT y RPP es un indicativo fehaciente de manipulación de la leche tanto en la producción, así como también durante el transporte y comercialización en condiciones inadecuadas de temperatura y condiciones higiénicas, lo que conduce a la proliferación de psicótrofos durante las primeras horas de almacenamiento y transporte.

En base al Coeficiente de Correlación de Pearsonse confirma la interferencia entreGMP y los recuentos microbianos de psicótrofos totales, proteolíticos y la Actividad proteolítica Total, la concentración de GMP arrojó una alta correlación entre la proteólisis medida como APT, RPT y RPP con valores  $R^2=0,9925$ ,  $R^2= 0,9517$  y  $R^2= 0,9479$  respectivamente.

Se determina que no solo que existe una adulteración de la leche cruda; sino que también y debido al crecimiento de bacterias psicrótrofas, la adulteración se realiza bajo malas prácticas de producción, almacenamiento, transporte y comercialización de leche cruda desde los sitios de producción al centro de la ciudad.

Se detectó una alta incidencia de adulteración, 75% de las muestras fueron adulteradas con suero de leche en porcentajes de hasta 7,5%, el contenido de suero promedio en leche Cruda es de 3,5%; con una desviación estándar de 2,76, lo que constituye un peligro para la salud del consumidor, así como

también representa un fraude e incumplimiento de las normas sanitarias y de calidad especificadas en la norma INEN-NTE-2401.

IV. REFERENCIAS

[1] AGSO. Recuperado el MARTES de MARZO de 2012, de asociacion de ganaderos de la sierra y el oriente:página:  
[http://www.agsosite.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=88:preocupacion-de-leche-adulterada-preocupa-a](http://www.agsosite.com/index.php?option=com_content&view=article&id=88:preocupacion-de-leche-adulterada-preocupa-a)

[2] NORIEGA. *Introduccion a la tecnologia de alimentos*. 2da Edición ed. Noriega, Ed. Mexico: Editorial Limusa, S.A.2004.

[3] Kenji Haraguchi, F., & Abreu, W. C. (s.f.). Suero proteínas: composición, nutricional propiedades, aplicación en el deporte y los beneficios para la salud humana. *Departamento de nutrición de la Universida Centro Lavras ,Instituto de Ciencias de la de la salud, Escuela de nutrición, programa de doctorado*. BRASIL.

[4] Reyes, J. B. Adulteración de leche pasteurizada con suero de quesería en la ciudad de Aguascalientes. *Avances en Investigacion Agropecuaria, Redalyc*, (Mayo-Agosto de 2007). pp. 23-24

[5] Alcazar. Detección de glicomacropéptido (GMP) como indicador de adulteración con suero de quesería en leche deshidratada. *Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México*, (JULIO- SEPTIEMBRE de 2003)2003. pp. 217-222.

[6] Chavez Vela, N. A. (Enero-Abril de 2009). Desarrollo de un método inmuno blot para detectar Glicomacropéptidos (GMP) como indice de adulteracion de leche de vaca con suero de quesería. *Investigacion y Ciencia Aguas Calientes* , 2009. pp. 16-20

[7] Guerrero Rodriguez W.J, G. A. *UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO*. Recuperado el Lunes de Enero de 2013, de caracterizacion fisicoquimica del lactosuero en el valle de Tulancingo. 27 de Mayo de 2010.  
[http://www.uaeh.edu.mx/investigacion/icbi/LI\\_FisicAlim/Carlos\\_Aldap a/3.pdf](http://www.uaeh.edu.mx/investigacion/icbi/LI_FisicAlim/Carlos_Aldap a/3.pdf)

[8] INEN. Recuperado el 23 de Agosto de 2012, de Determinación de suero de quesería en leche fluida y en polvo por cromatografía HPLC: 2012. <http://www.inen.gob.ec>

[9] Carvalho, B. Detection methods of adulteration in milk by addition of cheese whey). *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria* , 2007. pp. 2-3.

[10] Márquez C. G, Piramanrique C K., Carrascal A., Clavijo D B., QuevedoB.. Determinación cuantitativa de proteasas de bacterias psicrotrofas aisladas de leche cruda. NOVA7\_14\_24.tomado 12 de mayo de 2015 de:  
[www.unicolmayor.edu.co/invest\\_nova/NOVA/NOVA7\\_14\\_24.PDF](http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/NOVA7_14_24.PDF)

[11] Garcés F.J. Diseño de un prototipo integrador de tiempo temperatura para el monitoreo de la calidad de leche refrigerada. Tesis de Maestría en diseño y gestión de procesos CHÍA. Universidad de la Sabana. Colombia. 2012. pp.81.

ANEXO 1. (Figura 1.)

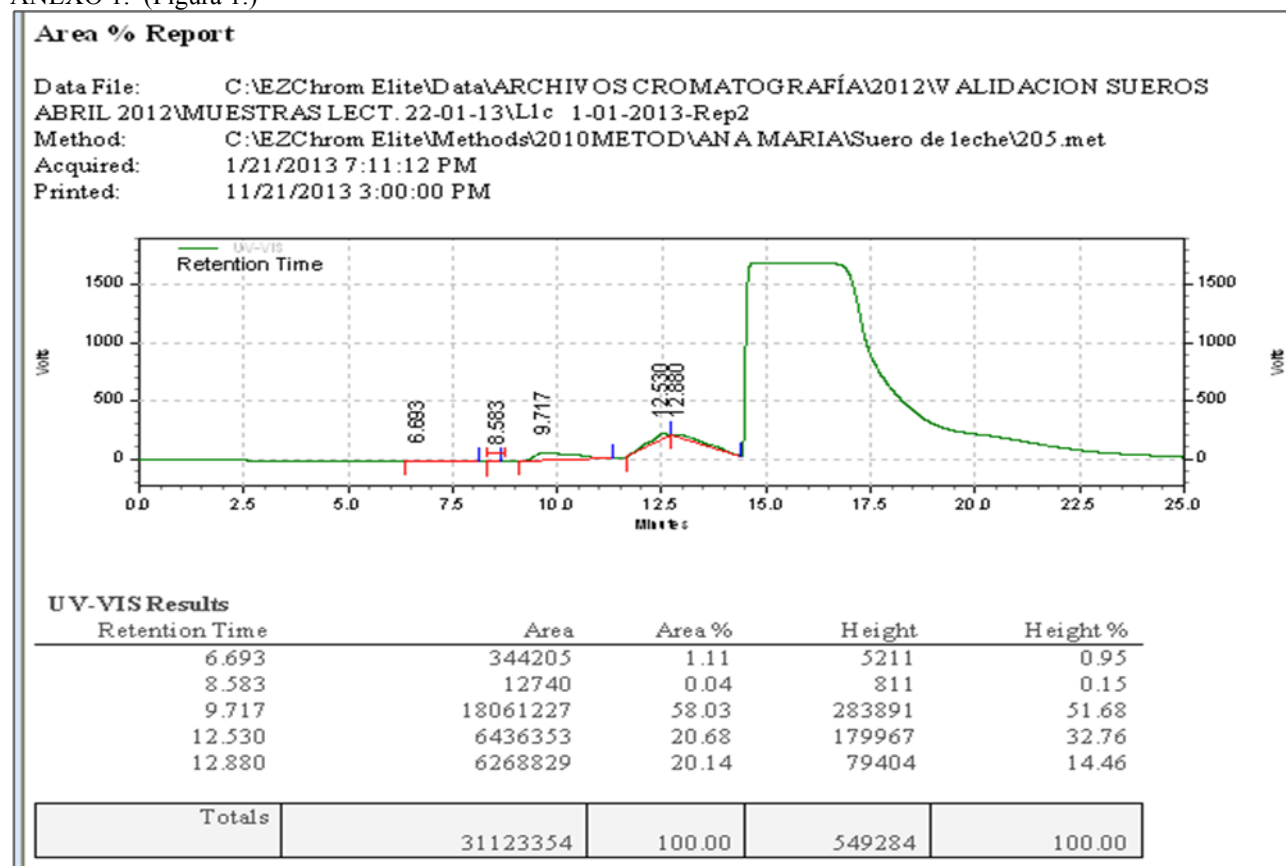


Figura 1. Cromatograma por HPLC de leche cruda pico de GMP al t=9.717 min.