

AISLAMIENTO Y RENDIMIENTO DEL GMP MEDIANTE PRECIPITACIÓN DE LACTOSUERO CON ÁCIDO TRICLOROACÉTICO.

GMP Isolation and Yield by Whey Precipitation With Trichloroacetic Acid.

Evelin Rojas V.¹, Emiro Valbuena C.¹, Gabriel Torres F.¹, Aiza García de H.¹, María Piñero G.¹ y Luz Mila Galindo A.²

¹ Unidad de Investigación Ciencia y Tecnología de los Alimentos (UDICTA), Facultad de Ciencias Veterinarias.

² Departamento de Química, Facultad de Humanidades y Educación. Universidad del Zulia. Apartado 15252, Maracaibo. Estado Zulia, Venezuela. E-mail: virojas@luz.edu.ve

RESUMEN

Durante la elaboración del queso, la κ -caseína es hidrolizada por la renina (Quimosina E.C.3.4.23.4) en el enlace peptídico Fen¹⁰⁵-Met¹⁰⁶ generando dos fracciones: la para- κ -caseína y el glicomacropéptido (GMP) que se libera al lactosuero. El GMP presenta una estructura química particular donde predominan los aminoácidos con cadena lateral ramificada, no presenta aminoácidos aromáticos y contiene carbohidratos unidos a residuos de treonina; por esta razón se le ha atribuido una variedad de actividades biológicas. Se ha estimado que en Venezuela se generan alrededor de 713 toneladas de lactosuero anualmente. Un volumen considerable de este subproducto se produce en el estado Zulia, constituyéndose esto en una fuente de péptidos y proteínas de alta calidad nutricional que está siendo subutilizada. Con el propósito de evaluar el aislamiento y rendimiento del GMP a partir de la precipitación de lactosuero de ricotta con ácido tricloroacético 50%, se realizaron 6 extracciones con este ácido a 50 mL de cada tipo de suero analizado: suero ricotta, suero comercial resuspendido y suero ácido (control negativo). Se verificó mediante pruebas químicas y PAGE-SDS 15% de manera indirecta, la presencia de GMP en las preparaciones obtenidas. Se observaron bandas de 6,5; 18,3 y 19,0 kDa en suero ricotta y suero comercial resuspendido. Las bandas de 18,3 y 19,0 posiblemente correspondan a la forma trimérica del péptido. El rendimiento del GMP en términos de proteínas fue en promedio 1,17 mg/50mL (1,17%) y 4,51 mg/50mL (0,81%), para suero ricotta y suero comercial, respectivamente. Los resultados indican que es factible obtener preparaciones del GMP, sin embargo, para plantear la producción a escala industrial de este péptido para su aprovecha-

miento, se requiere evaluar otros procedimientos donde se obtenga a bajo costo una preparación purificada del GMP.

Palabras clave: Glicomacropéptido, PAGE-SDS, lactosuero.

ABSTRACT

During cheese manufacturing κ -casein is hydrolyzed by rennin (Quimosine E.C.3.4.23.4) on peptidic bond Fen¹⁰⁵-Met¹⁰⁶ releasing two fractions: para- κ -casein and glycomacropeptide (GMP). GMP shows a particular chemical structure in which ramified lateral chain aminoacids prevail, without aromatics aminoacids, but with carbohydrates short chains linked to some threonine residues; because of this, a variety of biological activities have been attributed to molecule. It has been considered that in Venezuela, 713 tons of whey are generated annually. An important volume of this byproduct is produced in the Zulia State, becoming itself a source of peptides and proteins of high nutritional quality that has been subused. With the purpose of evaluating GMP isolation and yield from ricotta whey precipitation with 50% trichloroacetic acid treatment, 6 extractions were performed with this acid to 50 mL of each analyzed whey: ricotta whey, resuspended commercial whey and acid whey (negative control). By means of chemical tests and PAGE-SDS 15%, indirect presence of GMP was verified in all preparations. Bands of 6.5, 18.3 and 19.0 kDa were observed in ricotta and commercial whey. Bands of 18.3 and 19.0 possibly correspond to the peptide trimeric structure. GMP yield in terms of protein content was 1.17 mg/50mL (1.17%) and 4.51 mg/50mL (0.81%), for ricotta and commercial whey, respectively. Results show that it feasible to obtain preparations of GMP, however, in order to produce this peptide industrially for its use, evaluation of low cost procedures for GMP purification is required.

Key words: Glycomacropeptide, PAGE-SDS, whey.

INTRODUCCIÓN

Durante la primera etapa del proceso de elaboración de quesos mediante coagulación enzimática, la renina (Quimosina E.C.3.4.23.4) hidroliza el enlace peptídico Fen¹⁰⁵-Met¹⁰⁶ de la κ -caseína (169 a.a), originando dos fracciones: **la para k-caseína** (1-105), que precipita junto al coágulo de caseínas, y **el glicomacropéptido o GMP** (106-169), el cual permanece soluble en el suero junto a otras proteínas séricas (β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, albúmina sérica bovina y otras proteínas minoritarias) [9].

El GMP es un péptido hidrofílico C-terminal constituido por 64 residuos de aminoácidos que presenta una masa molecular aproximada de 6000 a 8000 Da en su forma monomérica. Su estructura posee hasta cuatro cadenas glucosídicas de ácido siálico-galactosa-N-acetil galactosamina que están unidas a residuos de treonina en seis posiciones diferentes (121; 131; 133; 136; 142 y 165). Los aminoácidos constituyentes de este péptido son principalmente de cadena ramificada, carece de aminoácidos aromáticos (Phe, Trp, Tyr) y además contiene 0,4% de fósforo [9, 31]. Investigaciones recientes estiman que el GMP está presente en el suero de quesería (o lactosuero) en concentraciones de 1,2-1,5 g/L, lo cual constituye entre el 10 - 25% de la proteína sérica [24].

Este péptido presenta una solubilidad muy variable en soluciones de ácido tricloroacético dependiendo de la κ -caseína de la cual derive, ya que ésta es una proteína heterogénea con dos variantes genéticas (A y B) que presentan diferentes grados de glicosilación [29].

Diversos estudios [4, 12, 24] han reportado una variedad de actividades biológicas para el GMP, entre ellas destacan: Inhibición del crecimiento de bacterias responsables de las caries dentales, modulador de las secreciones gástricas, promotor del crecimiento de bifidobacterias, actividad antiviral, prevención de diarreas infecciosas, supresión del apetito, entre otras. Además se ha señalado que este péptido puede ser el precursor de otros péptidos con actividad antitrombótica [4, 24]. Todas estas actividades han sido atribuidas a las propiedades químicas-estructurales particulares de este péptido, principalmente a la presencia de las cadenas heterogéneas de carbohidratos [4].

Desde 1990 se han venido desarrollando métodos para detectar la presencia del GMP como índice de adulteración de leche por agregado de suero [7, 23, 25]. Otros estudios se han orientado al aislamiento o purificación del GMP a partir de κ -caseína o suero de leche de bovino aplicando cromatografía de exclusión molecular [2, 30], cromatografía de interacción hidrofóbica [21, 28], cromatografía de intercambio iónico [8, 26], precipitación con ácido tricloroacético (ATC) [16] o mediante el uso de membranas de diálisis o ultrafiltración [1, 16]. La mayor parte de dichas investigaciones han tenido como propósito estudiar la secuencia de aminoácidos, estructura y variantes existentes del GMP, pero no se han reportado tablas de purifi-

cación y/o el rendimiento de este péptido u otras proteínas a partir de suero proveniente de la elaboración de quesos por coagulación enzimática. La precipitación del GMP con ácido tricloroacético (ATC) al 50% ha sido uno de los métodos más usados. Basados en el principio que la mayoría de los péptidos y proteínas forman sales insolubles en presencia de ATC, en algunos estudios aíslan el GMP en el sedimento después de la precipitación [1, 11, 16, 23, 26].

En Venezuela, y particularmente el estado Zulia, se generan aproximadamente 713 toneladas de lactosuero producto de la elaboración de quesos palmita, mozzarella, de año, entre otros; y de otros productos lácteos (ricotta, requesón). Gran parte de este lactosuero es utilizado directamente en la alimentación de cerdos (*Sus scrofa*). Otro uso que se le ha dado es la fertilización de pastos al añadirlo al agua de riego y en menor cuantía, es desechado en cuerpos de agua ocasionando problemas de contaminación al ecosistema [10].

Considerando que el lactosuero constituye una fuente importante de péptidos y proteínas que está siendo subutilizada, este trabajo tuvo como propósito aislar y recuperar el GMP a partir de suero proveniente de la elaboración de ricotta, mediante precipitación con ácido tricloroacético y PAGE-SDS. Esto con la finalidad de evaluar uno de los métodos menos laborioso y costoso para el aislamiento de este péptido, de manera que a mediano o largo plazo, se establezcan las condiciones experimentales que permitan producirlo de la manera más pura, a escala industrial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron tres tipos de suero los cuales fueron denominados de la siguiente manera:

a) Suero ricotta: lactosuero derivado de la elaboración de ricotta donado por la empresa Venelácteos C.A. ubicada en Santa Rosa de Agua, municipio Maracaibo, estado Zulia. El suero fue transportado hasta el laboratorio bajo refrigeración (-10°C) al cabo de 30 - 40 min.

La elaboración de ricotta (en Venezuela y cualquier otro país) involucra la desnaturalización de las proteínas del lactosuero a temperaturas entre 85- 90°C y la precipitación isoeléctrica de las caseínas residuales a pH 4,6 [18]; por lo que el suero obtenido constituye un lactosuero parcialmente desproteinizado ideal para aislar el GMP ya que bajo estas condiciones, el péptido se mantiene en solución y se tiene menos interferencia con las otras proteínas séricas.

b) Suero comercial: se utilizó el producto *Whey Protein Natural Source BCAA* de GNC® y se resuspendió para preparar una suspensión al 7% p/v en agua destilada, a fin de reproducir la concentración de proteínas presente naturalmente en el lactosuero. La tabla nutricional de este producto

indica la presencia de todos los componentes proteicos del lactosuero, por lo tanto, éste se incluyó como control positivo para el aislamiento del GMP.

c) Suero ácido: obtenido por coagulación de leche fluida completa recién ordeñada, mediante adición de ácido acético al 30%. Este suero, obtenido por hidrólisis química de la κ -caseína no contiene GMP, razón por la cuál se incluyó como suero control negativo.

De cada uno de los sueros se obtuvo aproximadamente 1L, se homogenizaron por separado mediante agitación manual y se centrifugaron a 5000 g durante 30 minutos en centrífuga marca IEC modelo K3/4 HP (EUA), a fin de eliminar cualquier material insoluble. Para cada aislamiento se utilizó 50 mL del sobrenadante de cada suero.

Se analizaron 6 muestras por tipo de suero, por lo que se realizaron en total 18 aislamientos o extracciones de GMP.

Aislamiento del GMP

Para el aislamiento del GMP se siguió la metodología descrita por Olieman y Van den Benden [23]; Pinto y col. [25], modificada por Galindo y col. [11]. A un volumen de 50 mL de suero ricotta, suero comercial resuspendido y suero ácido, se agregó lentamente y con agitación constante 25 mL de ATC al 24%, se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. El precipitado resultante se separó por centrifugación a 4°C y 5300 g, utilizando una centrífuga refrigerada marca HETTICH modelo 32R (Alemania), durante 10 minutos. A 30 mL del sobrenadante se le agregó 8 mL de solución de ATC al 50% y se dejó en reposo a 4°C durante 1 hora, las preparaciones fueron centrifugadas bajo las condiciones descritas anteriormente y el precipitado obtenido se lavó 3 veces con 10 mL de una mezcla de etanol-éter etílico 1:1 mediante centrifugación bajo las mismas condiciones. El sobrenadante se drenó por completo a fin de eliminar los restos de la mezcla de solvente. El precipitado se resuspendió hasta 200 μ L con buffer TRIS-HCl 0,005 M; EDTA 1 mM; pH 7,2 y se mantuvo a -20°C hasta su uso.

Cuantificación de proteínas totales

La concentración de proteínas solubles totales de las diferentes fracciones obtenidas en el aislamiento de GMP fue determinada por el método de Bradford [3]. Para ello se preparó una curva de calibración de proteínas usando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar en concentraciones desde 0 hasta 16 μ g/100 μ L y se midió la absorbancia en espectrofotómetro Smart Spec 3000 marca BioRad (EUA), a 595nm. Utilizando la ecuación de los mínimos cuadrados resultante de la curva de calibración, se calculó la concentración de proteínas en cada muestra analizada.

Electroforesis en gel de poli(acrilamida)-dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS)

Los precipitados resuspendidos obtenidos del tratamiento de los sueros con ATC al 50%, fueron analizados por PA-

GE-SDS en una dimensión y en condiciones disociantes, mediante el sistema buffer discontinuo de Laemmli [15]. Para ello se utilizaron geles de 0,75 mm de espesor, el gel de apilamiento al 4% contenía 1,3 mL de acrilamida: bis-acrilamida (29,2:0,8); 2,5 mL TRIS/HCl 1M pH 6,8; 100 μ L SDS 10%; 50 μ L persulfato de amonio (APS) 10%; 10 μ L N-N'-N'-Tetra-metil-etilen-diamina (TEMED) y 6,1 mL de agua destilada (volumen final 10 mL). El gel de separación al 15%, contenía 5 mL de acrilamida/bis-acrilamida (29,2:0,8); 2,5 mL de buffer TRIS/HCl 1,5 M pH 8, 8; 100 μ L de SDS al 10%; 50 μ L de APS al 10%; 5 μ L de TEMED y 2,4 mL de agua destilada (volumen final 10 mL). El ensamblaje del módulo de electroforesis, polimerización de geles, preparación, aplicación y corrida de las muestras, se realizó siguiendo las instrucciones del manual de la cámara Mini Protean III de BIO-RAD.

La tinción de los geles se realizó a temperatura ambiente y bajo agitación constante con Azul de Coomassie R-250 al 0,2% en metanol: ácido acético: agua (25:10:65) durante 6-12 horas. Los geles fueron decolorados bajo agitación, con una solución de metanol: ácido acético: agua (25:10:65) hasta que el fondo del gel se observara transparente. Después de decolorarlos, los geles fueron mantenidos en una solución de metanol: ácido acético: agua (5:10:85).

Las masas moleculares de las bandas de proteínas separadas en PAGE-SDS se calcularon a partir de una curva de calibración construida al graficar el logaritmo de la masa molecular de las bandas del estándar de amplio rango de BIO-RAD incluido en cada gel, contra la movilidad relativa de los mismos.

Pruebas químicas

A los precipitados obtenidos con ATC 50% se le aplicaron las siguientes pruebas químicas cualitativas según describen Robyt y White [26]. **Bradford**: 50 μ L precipitado resuspendido y 500 μ L de reactivo de Bradford. La aparición de un color azul indicó la positividad. **Sullivan**: 100 μ L de precipitado resuspendido y 100 μ L de NaOH al 30%, se calentó por 5 minutos a 100°C e inmediatamente se le adicionaron 50 μ L de acetato de plomo. La presencia de un precipitado negro indicó la positividad del ensayo. **Xantoproteica**: se adicionaron 100 μ L de precipitado resuspendido y 100 μ L de HNO₃ concentrado; se calentó por 5 minutos a 100°C. La aparición de una coloración amarilla indicó la positividad del ensayo. **Lowry**: se agregaron 100 μ L de precipitado resuspendido y 500 μ L de reactivo de Lowry (Na₂CO₃ al 2%; NaOH 0,1 M; CuSO₄·5 H₂O al 1%; tartrato de NaK al 2%) se dejó reposar por 10 minutos y se agregó 100 μ L de reactivo Fenol Folin-Ciocalteu diluido 1:2 en agua destilada. El color azul indicó un resultado positivo de la prueba. **Molibdato-Vanadato**: se adicionaron 100 μ L de precipitado resuspendido y 1 mL de reactivo molibdato-vanadato de amonio: mezcla 1:1 de una solución 5% de molibdato de amonio y 0,25% de vanadato de amonio. El color amarillo indicó la positividad de la prueba. Se incluyó H₂PO₄ como control positivo.

Con estos ensayos se verificó de manera indirecta la presencia o ausencia de ciertos grupos químicos contenidos

en el GMP. En todas las pruebas se incluyó agua como control negativo; BSA y κ -caseína como controles positivos.

Recuperación del GMP

La recuperación del GMP fue calculada y expresada de forma porcentual con base en la cantidad total de proteínas contenidas en los sueros utilizados, constituyendo este valor el 100% de las proteínas presentes antes del aislamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento del GMP

El GMP fue aislado a partir de 50 mL de suero ricotta y 50 mL de suero comercial resuspendido al 7% como se describió en la sección de materiales y métodos. En la TABLA I se muestra la concentración de proteínas de las diferentes fracciones obtenidas en el aislamiento del GMP. Las proteínas totales en las muestras de suero utilizadas fueron $90,66 \pm 7,82$; $99,66 \pm 8,91$ y $556,66 \pm 105,05$ mg/50 mL para suero ácido, suero ricotta y suero comercial, respectivamente, Valores equivalentes de proteína sérica obtuvieron Muñi y col. [20]. Los precipitados con ATC 50% (preparaciones finales donde se separa el GMP), contenían $1,17 \pm 0,33$ y $4,51 \pm 1,09$ mg de proteínas, en el suero ricotta y suero comercial, respectivamente.

El tratamiento de suero ricotta y suero comercial resuspendido con ATC 24%, provocó la precipitación de un porcentaje considerable (entre 45-46%) de las proteínas séricas presentes. Por otro lado, en el suero ácido, el cual no contiene GMP, toda la proteína sérica fue separada con ATC 24%, ra-

zón por la cual el tratamiento de este suero con ATC 50% no presentó precipitado alguno.

Estos resultados se corresponden con las observaciones de Withney [31], quién ha señalado que el GMP se encuentra en el suero dulce pero no en el suero ácido, debido a que la acidificación de la leche hasta pH 4,6 provoca la precipitación isoeléctrica de las caseínas en lugar de la hidrólisis de la κ -caseína.

PAGE-SDS de precipitados con ATC 50%

Se utilizó PAGE-SDS para separar y visualizar las bandas proteicas presentes en las fracciones obtenidas del aislamiento del GMP a partir de las muestras de suero utilizadas. En la FIG. 1 se muestra el patrón electroforético de estas fracciones.

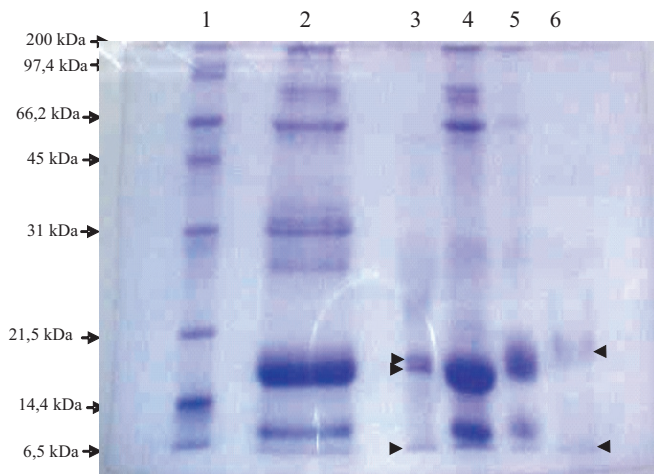
En el precipitado de suero ricotta y suero comercial con ATC 50%, se observaron 3 bandas principales con masas moleculares aparentes de 6,5; 18,3 y 19,0 kDa (bolsillos 3 y 6, FIG. 1). Estas bandas probablemente correspondan a las formas monoméricas y triméricas del GMP, ya que es conocido que el monómero de GMP tiene una masa molecular entre 6,0–8,0 kDa (según la variante de κ -caseína de la cual derive) y éste tiende a formar agregados a pH neutro que son observados en PAGE-SDS aún bajo las condiciones disociantes utilizadas en este método. El mecanismo de asociación aún no está del todo claro y actualmente es tema de discusión y debate entre investigadores del área, sin embargo, la hipótesis que gana fuerza es la que señala la posibilidad de que los monómeros que componen el agregado de GMP, estén firmemente asociados a través de su porción glucídica y sean resistentes a la disociación en PAGE-SDS [17].

TABLA I

CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN LAS FRACCIONES OBTENIDAS DURANTE EL AISLAMIENTO DEL GMP A PARTIR DE SUERO ÁCIDO, RICOTTA Y COMERCIAL/ PROTEIN CONCENTRATION IN THE OBTAINED FRACTIONS DURING GMP ISOLAMENT FROM ACID, RICOTTA AND COMMERCIAL WHEY

Preparación	Volumen* (mL)	Proteínas * (mg/mL)	Proteínas totales	
			mg*	%
Suero ácido	50,00 ± 0,00	1,81 ± 0,40	90,66 ± 7,82	100,00
ppdo ATC 24%	2,56 ± 0,56	13,07 ± 2,92	30,27 ± 9,52	32,00
ppdo ATC 50%	N.D	N.D	N.D	N.D
Suero ricotta	50,00 ± 0,00	1,99 ± 0,67	99,66 ± 8,91	100,00
ppdo ATC 24%	3,21 ± 1,16	15,80 ± 8,16	46,79 ± 6,22	46,00
ppdo ATC 50%	0,37 ± 0,09	3,07 ± 2,49	1,17 ± 0,33	1,17
Suero comercial	50,00 ± 0,00	11,13 ± 7,63	556,66 ± 105,05	100,00
ppdo ATC 24%	15,28 ± 4,98	21,40 ± 10,87	342,13 ± 53,83	45,70
ppdo ATC 50%	0,58 ± 0,12	8,00 ± 7,57	4,51 ± 1,09	0,81

*Promedio ± 1 Desviación estándar de 6 extracciones. N.D = No detectado.



1: Estándar de amplio rango (BIO-RAD); 2: Suero ácido sin tratar (10 µg); 3: Precipitado ATC 50% de suero ricotta (6 µg); 4: Suero ricotta sin tratar (10 µg); 5: Suero comercial resuspendido sin tratar (7 µg); 6: Precipitado ATC 50% de suero comercial resuspendido (3 µg); 1: Broad range standard (BIO-RAD); 2: Acid whey without treatment (10 µg); 3: Precipitate 50% TCA of ricotta whey (6 µg); 4: Ricotta whey without treatment (10 µg); 5: Resuspended commercial whey without treatment (7 µg); 6: Precipitate 50% TCA of resuspended commercial whey (3 µg).

FIGURA 1. PATRÓN ELECTROFORÉTICO DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LA PRECIPITACIÓN DE LACTOSUERO CON ATC 50%/ ELECTROFORETIC PARTNER OF OBTAINED FRACTIONS FROM WHEY PRECIPITATION WITH ATC 50%.

Los diferentes trabajos [5, 11, 17, 19] reportados en la literatura con relación a métodos de aislamiento, caracterización y purificación del GMP han observado a este péptido de diversas formas, según las condiciones experimentales empleadas. En tal sentido, resultados similares a los reportados en este trabajo, fueron obtenidos por Chow y Harper [5], quienes analizaron suero dulce por PAGE-SDS, y caracterizaron el GMP mediante tratamiento con CaCl_2 , encontrando 2 bandas con masas moleculares aparentes de 20,75 kDa y 18,38 kDa. Así mismo, se corresponde con los hallazgos de Morr y Seo [19], quienes encontraron que el análisis del peso molecular aparente del GMP mediante PAGE-SDS puede ser mayor a 18 kDa, ya que las cadenas glucídicas de diferentes moléculas de GMP pueden interactuar a través de enlaces por puentes de hidrógeno. Por otro lado, Galindo y col. [11] analizaron suero dulce y mezclas de suero-leche por PAGE-SDS, para estandarizar una técnica de detección de GMP como adulterante de leche fluida, donde el GMP se visualizó como una banda de 20,9 kDa y posiblemente corresponda a la forma trimérica del péptido.

La presencia de la banda de 6,50 kDa en las preparaciones de este estudio se correlaciona con los hallazgos de Kim y col. [14], quienes caracterizaron y purificaron en un 94% el GMP humano por cromatografía de intercambio iónico y PAGE-SDS, siendo este hallazgo confirmado por análisis de secuencia de los aminoácidos N-terminal, observándolo como una banda de 7 kDa. En concordancia a esto, Silva y col. [28],

aislaron el GMP a partir de leche de cabra (*Capra hircus*) utilizando cromatografía de interacción hidrofóbica y PAGE-SDS, encontrando dímeros de 14,4 kDa y monómeros de 7,5 kDa; una situación similar observaron con el GMP aislado a partir de leche bovina (*Bos taurus-indicus*).

Las formas agregadas del GMP fueron observadas también por Kawasaki y col. [13], sin embargo, estos investigadores han señalado que la masa molecular aparente del agregado de GMP depende del pH; ellos analizaron GMP obtenido de suero dulce mediante HPLC y encontraron que el peso molecular aparente fue entre 20-50 kDa a pH 7 y entre 10-30 kDa a pH 3,5, sin embargo, esto no ha sido confirmado por otros autores.

La masa molecular de las bandas proteicas observadas en las fracciones obtenidas en este estudio, se relaciona con los hallazgos reportados en otros trabajos [5, 11, 17, 19], lo que hace sugerir que las bandas de 18,3 y/o 19,0 kDa corresponden a la forma trimérica del GMP y la de 6,5 kDa a su forma monomérica.

Pruebas químicas en precipitados ATC 50%

Con el propósito de detectar la presencia de componentes o grupos químicos presentes en la estructura del GMP, se realizaron las pruebas químicas de Bradford, Sullivan, Xantoproteica, Lowry y Molibdato-Vanadato a las preparaciones con ATC 50%, cuyos resultados se muestran en la TABLA II.

Los resultados de las pruebas químicas indican que la fracción ATC 50% aislada a partir de suero ricotta es de naturaleza proteica, resultado que fue confirmado con la positividad de la reacción de Bradford; esto se correlaciona con la cantidad ($1,17 \pm 0,33$ mg) de proteínas presente en esta preparación (TABLA I). Por otro lado, en esta fracción no se detectaron mediante la prueba de Sullivan, la presencia grupos sulfidrilos o disulfuros sugiriendo que los aminoácidos cisteína o cistina no están presentes en esta preparación; además la reacción de Molibdato/Vanadato fue negativa indicando que ésta no contiene fósforo.

Los resultados de las pruebas químicas en el precipitado ATC 50% obtenido de suero comercial fueron similares a los de suero ricotta. En el suero ácido no se realizaron pruebas químicas ya que en éste, no se obtuvo precipitado con ATC 50% debido a que el GMP no está presente en este tipo de suero. Por otro lado, los resultados de las pruebas químicas en todos los controles positivos y negativos incluidos en los ensayos, resultaron conforme a lo esperado.

Los resultados de las pruebas químicas en correspondencia con el PAGE-SDS evidencian que los precipitados ATC 50% contienen GMP. Se descarta que las bandas de 18,3 y 19,0 kDa correspondan a β -lactoglobulina o α -lactoalbúmina (principales proteínas del suero) remanente ya que éstas presentan en su estructura química los tres aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr, Trp) y contienen 2,8 y 5,8% p/p de cisteína, res-

TABLA II
PRUEBAS QUÍMICAS APLICADAS A PRECIPITADOS ATC 50% OBTENIDOS A PARTIR DE SUERO RICOTTA Y SUERO COMERCIAL/ CHEMICAL ASSAYS OF 50% TCA PRECIPITATE OBTAINED FROM RICOTTA WHEY AND COMMERCIAL WHEY.

Pruebas	Bradford	Sullivan	Xantoproteica	Lowry	Molibdato/Vanadato
Controles y precipitados					
Agua (H ₂ O)	-	-	-	-	-
κ -Caseína	+	+	+	+++	+
BSA	+	+++	+	+++	-
KH ₂ PO ₄	N.R	N.R	N.R	N.R	+++
50% ATC suero ricotta	+	-	+	++	-
50% ATC suero comercial	+	-	+	+	-

Negativo (-); Positivo débil (+); Positivo (++); Positivo fuerte (+++); No realizado (NR).

pectivamente. La presencia de estas proteínas en las preparaciones hubiese mostrado un resultado positivo fuerte para las pruebas de Sullivan, Xantoproteica y Lowry.

Cabe destacar que la positividad de las pruebas Xantoproteica y Lowry, las cuales detectan la presencia de anillos bencénico y fenólico, respectivamente, indican que posiblemente en el sobrenadante de la fracción ATC 24% permanecen trazas de otros péptidos del suero que contienen tirosina u otro aminoácido aromático, que luego precipitan con ATC 50%. Al respecto, otros investigadores han obtenido preparaciones de GMP con cantidades trazas de aminoácidos aromáticos. En tal sentido, Nakano y Ozimek [22], utilizando tres métodos diferentes (cromatografía en gel sobre *Sephacryl S-200* en acetato de sodio pH 7,0 y 3,5; tratamiento con cloruro de cetilpiridinium, cromatografía sobre *Sephacryl S-200* seguida de *Sephadex G-75* en condiciones disociantes y desproteinización con ATC seguida de cromatografía en gel) obtuvieron preparaciones de GMP con alta pureza que contenían trazas de fenilalanina a razón de < 1 residuo por péptido. De igual manera, un producto comercial que muestra una pureza superior, formulado por Davisco Foods Internacional Inc. como suplemento alimenticio, conocido como *Glycomacropeptide Bioactive Whey Protein* reporta un contenido de 0,5 y 0,1 g/100g de fenilalanina y tirosina, respectivamente, aunque no especifica el método de purificación empleado [6].

Rendimiento del GMP

El rendimiento en términos de proteínas en las fracciones ATC 50% donde precipita el GMP fue de 1,17 y 0,81% en suero ricotta y suero comercial, respectivamente. Con estos resultados se puede estimar que para producir 100 gramos de GMP mediante precipitación con ATC, se requiere procesar aproximadamente 4300 L de suero ricotta sin concentrar, u 860 mL de este suero concentrado 5000 veces.

Considerando que el GMP está presente en suero de quesería en concentraciones de 1,2-1,5 g/L, constituyendo entre el 10-25% de la proteína sérica [24] y que los volúme-

nes de suero dulce que se generan en esta región son elevados, se hace factible establecer un método para la producción industrial de este péptido. Sin embargo, en las preparaciones de GMP obtenidas en este trabajo, permanecen residuos de ATC el cual es tóxico y corrosivo, por lo tanto, debe ser eliminado ameritando para ello, un procedimiento adicional que pudiese resultar en un menor rendimiento y mayor costo.

El uso de membranas de filtración ha sido señalado como el método más ampliamente usado a escala industrial para la recuperación de los diferentes componentes del lactosuero [20], e incluso la combinación del método de ultrafiltración y cromatografía aniónica pueden ser técnicas convenientes y prácticas para la producción industrial de GMP [27]; sin embargo, la aplicación de estos métodos a gran escala para producir GMP, resultan laboriosos y de alto costo.

En la actualidad, los porcentajes de recuperación más altos en preparaciones de GMP han sido reportados por Li y Mine [16], quienes obtuvieron 20,4% mediante precipitación etanólica; 33,9% utilizando ultrafiltración y 6,7% mediante precipitación con ATC, esto se correlaciona con el rendimiento obtenido en las preparaciones de GMP de este trabajo.

En el presente trabajo se pretendió evaluar el aislamiento y rendimiento de la fracción que contiene el GMP obtenida mediante precipitación con ATC 50%. Los resultados obtenidos sirven como punto de partida para diseñar un método o una combinación de ellos donde se aprovechen las propiedades físico-químicas del GMP para su separación del resto de las proteínas séricas y de esta manera, obtener de manera sencilla y a bajo costo, una preparación del péptido apta para consumo humano y/o animal.

CONCLUSIONES

El tratamiento de suero ricotta y suero comercial con ATC 24% permitió la precipitación de un alto porcentaje de sus proteínas solubles, mientras que las moléculas que permane-

cieron en solución a esta concentración de ATC, fueron separadas en el precipitado con ATC 50%.

Se evidenció de manera indirecta mediante pruebas químicas y PAGE-SDS que el precipitado ATC 50% posiblemente contiene GMP en su forma trimérica, debido a que este péptido exhibe facilidad de agregación bajo las condiciones de aislamiento y separación utilizadas.

El rendimiento en términos de proteínas, de la fracción que contiene el GMP fue relativamente bajo; sin embargo, es factible obtener proporciones mayores del péptido si se aísla a partir de volúmenes mayores de suero o de suero previamente concentrado.

La preparación ATC 50% contiene trazas de aminoácidos aromáticos y restos de ATC por lo que requiere un tratamiento adicional que garantice la depuración de este ácido orgánico.

RECOMENDACIONES

Se recomienda evaluar la utilización de otros métodos (cromatografía de afinidad o exclusión molecular) que permitan la obtención a bajo costo, de un mayor porcentaje de GMP de manera más pura y libre de químicos.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia por el financiamiento y apoyo al desarrollo de este trabajo de investigación enmarcado en el programa de investigación CC- 0955-06.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALCÁZAR, C.; ROJAS, J.; JARAMILLO, C.; PEÑA, S. Detección de glicomacropéptido (GMP) como indicador de adulteración con suero de quesería en leche deshidratada. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. México (DF). Tesis de grado. 62 pp. 2000.
- [2] BENITEZ, E; PONCE, P; NOA, M. Detection of rennet whey in powder milk by gel filtration high performance liquid chromatography (GFC-HPLC). **Rev. de Salud Anim.** 23 (1):27-31. 2001.
- [3] BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254. 1976.
- [4] BRODY, E. Biological activities of bovine glycomacropéptide. **Br. J. Nutr.** 80 (Suppl I): S39-S46. 2000.
- [5] CHOW, D.; HARPER, W. Selected characteristics of casein glycomacropéptide from different sources. **Milchwissenschaft.** 56 (7):370-373. 2001.
- [6] DAVISCO FOODS INTERNATIONAL INC. Bio-Pure GMP™. Description Product. Sheet Version 071-0319. On line: <http://www.doviscofoods.com/BioPURE/gmp.cfm.30/08/2007>.
- [7] DE SOUSA, E.; ARRUDA, S.; BRANDÃO, P.; SIQUEIRA, E. Electrophoretic analysis to detect and quantify additional whey in milk and dairy beverages. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 20(3): 314-317. 2000.
- [8] DOULTANI, S.; TURHAN, K.; ETZEL, M. Whey protein isolate and glycomacropéptide recovery from whey using ion exchange chromatography. **J. Food. Sci.** 68(4): 1389-1395. 2003.
- [9] EIGEL, W.; BUTLER, J.; ERNSTROM, C.; FARRELL, H.; HALWALKAR, V.; JENNES, R.; WITHNEY, R. Nomenclature of proteins of cows milk. Fifth revision. **J. Dairy Sci.** 67:1599-1631. 1984.
- [10] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Datos agrícolas de faostat. Producción de queso de todo tipo en la República Bolivariana de Venezuela para el año 2004. En línea: <http://faostat/form?collection=Production.14/11/2008>.
- [11] GALINDO, L.; VALBUENA, E.; ROJAS, E. Estandarización de la detección del glicomacropéptido por PAGE-SDS como índice de adulteración de leche. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** XVI (3):308-314. 2006.
- [12] HUFFMAN, L.; HARPER, W. Maximizing the Value of Milk Through Separation Technologies. **J. Dairy. Sci.** 82 (10): 2238-2244. 1999.
- [13] KAWASAKI, Y.; ISODA, K.; SHINMOTO, H.; TANIMOTO, M.; DOSAKO, S.; IDOTA, T.; NAKAJIMA, I. Inhibition by k-casein glycomacropéptide and lactoferrin of influenza virus hemagglutination. **Biosci. Biotech. Biochem.** 57:1214-1215. 1993.
- [14] KIM, Y.J.; PARK, S.; OH, Y.; KANG, W.; KIM, H.; LEE, E. Purification and characterization of human caseinomacropéptide produced by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Prot. Exper. Purif.** 41(2): 441-6. 2005.
- [15] LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature.** 227 (15):580-685. 1970.
- [16] LI, E.; MINE, Y. Comparison of chromatography profile of glycomacropéptide from cheese whey isolated using different methods. **J. Dairy. Sci.** 87: 174-177. 2004.
- [17] MIKKELSEN, T.; FRØKIÆR, H.; TOPP, C.; BONOMI, F.; IAMETTI, S.; PICARIELLO, G.; FERRANTI, P.; BARKHOLT, V. Caseinomacropéptide Self-Association is Dependent on Whether the Peptide is Free or Restricted in κ-Casein. **J. Dairy Sci.** 88: 4228-4238. 2005.

- [18] MONSALVE, J.; GONZÁLEZ, D. Elaboración de un queso tipo ricotta a partir de suero lácteo y leche fluida. **Rev.Cientif. FCV-LUZ**.XV(6): 543-550. 2005.
- [19] MORR, C.; SEO, A. Fractionation and characterization of glycomacropeptide from caseinate and skim milk hydrolysates. **J. Food Sci.** 53: 80-87. 1988.
- [20] MUÑI, A.; PAEZ, G.; FARIÑA, J.; FERRER, J.; RAMONES, E. Eficiencia de un sistema de ultrafiltración/nanofiltración tangencial en serie para el fraccionamiento y concentración del lactosuero. **Rev.Cientif. FCV-LUZ**. XV(4): 361-367. 2005.
- [21] NAKANO, T.; OZIMEK, L. Gel chromatography of glycomacropeptide (GMP) from sweet whey on Sephacryl S-200 at different pHs and on Sephadex G-75 in 6M guanidine hydrochloride. **Milchwissenschaft**. 53:629-633. 1998.
- [22] NAKANO, T.; OZIMEK, L. Purification of Glycomacropeptide from Caseinate Hydrolysate by Gel Chromatography and Treatment with Acidic Solution. **J. Food Sci.** 65(4): 588-590. 2000.
- [23] OLIEMAN, C.; VAN DEN BEDEM, J.W. A sensitive HPLC method of detecting and estimating rennet whey total solids in skim milk powder. **Neth. Milk. Dairy J.** 37: 27-36. 1983.
- [24] OLIVA, Y.; ESCOBAR, A.; PONCE, P. Caseinomacropéptido bovino: una alternativa para la salud. **Rev. Salud. Anim.** 24(2):73-81. 2002.
- [25] PINTO, M.; CASADINI, S.; BRITO, C.; MOLINA, H.; ISRAEL, L. Detección de sólidos totales de suero de quesería en leche pasteurizada y leche en polvo por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. **Alimentos**. 16 (3): 23-31. 1991.
- [26] ROBYT, J.; WHITE, B. Qualitative and quantitative methods for determine biological molecules. **Biochemical techniques: Theory and practice**. Waveland Press. USA. Chapter 7. 227-231 pp. 1990.
- [27] ROSSANO, R.; D'ELIA, A.; RICCIO, P. One step separation from lactose: Recovery and purification of major cheese whey protein by hydroxyapatite: A flexible procedure suitable for small- and medium-scale preparations. **Prot. Exper. Purif.** 21:165-169. 2001.
- [28] SILVA-HERNÁNDEZ, E.; NAKANO, T.; VERDALET-GUZMAN, I.; OZIMEK, I. Comparison of glycomacropeptide isolated from raw and pasteurized goat milk. **Milchwissenschaft**. 59 (1-2):27-31. 2004.
- [29] WALSTRA, P.; JENNES, R. Los componentes proteicos de la leche. **Química y física lactológica**. Edit. Acribia S.A. Zaragoza, España. Capítulo 2. 39-68 pp. 1987.
- [30] WANG, J.; LUCCY, J. Use of multi-angle angle laser light scattering and size-exclusion chromatography to characterize the molecular weight and types of aggregates present in commercial whey protein products. **J. Dairy. Sci.** 86 (10):3090-3101. 2003.
- [31] WITHNEY, R. Proteins in milk. **Fundamentals of Dairy Chemistry**. NP Wong, R Jennes, M Keeney and EH Marth Eds. New York. Van Nostrand Reinhold. 89-92 pp. 1988.