

Detección de glucomacropéptido (GMP) como indicador de adulteración con suero de quesería en leche deshidratada

Claudia Dolores Alcázar Montáñez*
Jorge Rosas Ramírez*
Carlos J. Jaramillo Arango*
Silvia D. Peña Betancourt**

Abstract

The objective of the present work was to test if dehydrated milk of three commercial brands that are expended in Mexico City is adulterated with dairy cheese whey by means of the poliacrilamide SDS gel electrophoresis technique. The study was carried out in the Laboratory of the Preventive Medicine and Public Health Department of the Veterinary Faculty. From the milk samples (n=108) obtained, 14.81% were positive. Considering the results, it is concluded that these commercial milk brands do not accomplish the guidelines established by the Regulation of the General Law of Health of Sanitary Control of Products and Services.

Key words: ADULTERATION, DEHYDRATED MILK, MILK WHEY.

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue detectar al glucomacropéptido (GMP) como indicador de adulteración con suero de quesería en tres marcas de leche deshidratada, dos de leche entera y una de leche descremada, mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. El estudio se realizó en el laboratorio del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional Autónoma de México, se estudiaron muestras de leche (n = 108) obtenidas en diferentes expendios de la ciudad de México, con el propósito de detectar al GMP, encontrándose 14.81% de las muestras positivas. Con base en los resultados obtenidos en las muestras de leche deshidratada, se concluye que tales marcas comerciales no cumplen los lineamientos establecidos tanto por el Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios de la Ley General de Salud como por la Norma Oficial Mexicana NOM-091-SSA1-1999.

Palabras clave: ADULTERACIÓN, LECHE DESHIDRATADA, SUERO DE LECHE.

Introducción

La leche como producto procesado puede llegar al consumidor en diferentes presentaciones y en cualesquiera de ellas puede existir adulteración con diversos propósitos, uno de ellos obtener mayor rendimiento en el producto final, tal es el caso de la adición de suero de quesería; éste es la fase acuosa separada de la cuajada que resulta de la coagulación enzimática de la leche en el proceso de elaboración del queso; el lactosuero representa del 80% al 90% del volumen total de la leche que entra a dicho proceso y contiene 25% de las proteínas de la leche, casi 10% de grasa y de la totalidad de lactosa. El suero de quesería puede ser adicionado líquido o en polvo a la leche fluida o deshidratada, según se trate¹.

Recibido el 8 de octubre de 1999 y aceptado el 20 de mayo del 2000.

* Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

** Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, 04960, México, D. F.

La utilización del lactosuero en la industria alimentaria en México es relativamente reciente debido a la falta de tecnología para su procesamiento. Sin embargo, actualmente se importan grandes volúmenes, lo que permite su utilización en la elaboración de productos alimentarios².

La producción nacional de este subproducto en 1998 fue de 22 671 kg y se importaron 56 201 toneladas, según las cifras presentadas por el Centro de Estadística Agropecuaria, de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR), y el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI)². Por otra parte, sus características sensoriales y nutricias le hacen apropiado para emplearse en sustitución de la leche, además de su precio, que puede ser hasta 4 o 5 veces menor^{1,3}.

Dicha sustitución ha generado en México un grave problema, ya que aún cuando la producción nacional fue de 8 315 711 litros durante 1998, existió un déficit de alrededor de 12 millones de litros de leche diarios, por lo cual México ocupó el quinto lugar como importador de leche deshidratada en el ámbito mundial, durante el mismo año; dicha importación fue de 140 123 toneladas, lo que generó una erogación de 242 737 dólares^{2,4}. Teniendo en cuenta el déficit mencionado y dadas las propiedades y características del suero de quesería, además de su precio, se ha inducido a una importación que asciende a 56 264 dólares en lactosueros en 1998², situación que podría propiciar la adición de dicho subproducto a la leche por parte de las plantas industrializadoras con el propósito de obtener un mayor rendimiento económico,* lo cual constituye una adulteración según los términos que la legislación vigente señala^{5,6}.

Existen varios métodos para detectar la presencia y en algunos casos conocer la cantidad de suero como agente adulterante en la leche en sus diferentes presentaciones, dichos métodos pueden clasificarse como indirectos y directos.

Entre los métodos indirectos se encuentra la determinación de la proporción de caseína del suero presente en la leche, que se hace a través de la cuantificación del nitrógeno no caseínico⁷; la cuantificación de grupos sulfhidrilos por gramo de proteína⁸; la determinación del aumento en los niveles de amonio en leche mediante el uso de un potenciómetro⁹, así como la determinación del complejo cisteína-cistina, a través de un método polarográfico¹⁰.

Entre los métodos directos se encuentra la detección de un péptido específico, el glucomacropéptido (GMP), que se libera al entrar la leche en contacto con la enzima renina que actúa sobre la caseína kappa de la leche, y convierte las micelas de la caseína en susceptibles a la formación de agregados, lo cual constituye el inicio del proceso de elaboración del queso. Esta enzima elimina el enlace fenilalanina-metionina (105-106) de la caseína kappa, liberando la para-kappa caseína y el péptido mencionado anteriormente, este último no es posible encontrarlo en forma libre en la leche a menos que ésta contenga suero adicionado¹¹. En leche fluida refrigerada, sin embargo, existe la posibilidad de obtener resultados falsos positivos debidos a cambios generados por la acción proteolítica de los organismos psicrotróficos, como *Pseudomonas* spp, que producen péptidos similares al GMP, actividad proteolítica que no se presenta en la leche deshidratada, debido principalmente a los requerimientos de humedad de dichos microorganismos y sin la cual no es posible su proliferación¹²; la determinación de ácido siálico, que se obtiene por hidrólisis ácida del GMP en muestras de leche deshidratada por medio de espectrometría, es otro método directo¹³.

Dentro de las metodologías existentes para la determinación del GMP, entre las cuales se encuentran la gravimetría y la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), sobresale la de electroforesis en placa, que es una técnica directa, cualitativa y sencilla, y según algunos autores, permite la detección de hasta 0.5% de sólidos de suero; en esta técnica, el GMP se somete a una diferencia de potencial una vez separado de la leche y puede identificarse sobre un gel de poliacrilamida-SDS¹⁴⁻¹⁶.

Este estudio formó parte de la segunda etapa del proyecto IN500697, realizado en el Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional Autónoma de México, que inició adaptando dos técnicas para la detección de sólidos de suero como adulterante en la leche pasteurizada, una de las cuales fue el método directo de electroforesis en placa, que se empleó en esta investigación para detectar el GMP como indicador de la presencia de suero de quesería en leche deshidratada de tres marcas comerciales.

* <http://serpiente.dgsca.unam.mx/jornada/1996/ago96/960802/LECHE-PG.html>

Material y métodos

El presente estudio fue observacional, descriptivo, transversal y prospectivo; se empleó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (BIO-RADII) para la identificación del GMP¹⁶. Se analizaron muestras de leche de tres marcas comerciales, dos de leche deshidratada entera y una de leche deshidratada descremada, que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión: dichas marcas fueron seleccionadas con base en la composición señalada en la etiqueta, misma en que se indicaba al producto como leche pura a la cual únicamente le fue extraída el agua. Se empleó leche deshidratada con el fin de descartar la actividad proteolítica de organismos psicrotrofos que se puede dar en leche fluida, en virtud de que las muestras se reconstituyeron sólo hasta el momento del análisis, eliminando la posible proliferación de dichos microorganismos.

Cálculo del tamaño de muestra

Con el propósito de calcular el tamaño de la muestra, se realizó un estudio piloto durante ocho semanas, que incluyó un total de 48 muestras, 16 de cada una de las marcas; se analizaron seis muestras por semana (y cada marca por duplicado).

Con la frecuencia de adulteración que se obtuvo, se determinó el tamaño de la muestra mediante la ecuación¹⁷:

$$n = \frac{z^2 pq}{d^2}$$

En el estudio piloto se obtuvo una frecuencia de adulteración de 10 muestras de las 48 que se analizaron, lo que representa 20.83%, sustituyendo los valores de la ecuación descrita se hallaron los siguientes resultados:

$$n = \frac{(1.28)^2(20.83)(79.17)}{(5)^2}; \quad \text{es decir, } n = \frac{(1.6384)(475)}{25}; \quad \text{esto es, } n = 108$$

Es decir, un total de 108 muestras que incluyeron las 48 del estudio piloto.

Técnica de muestreo

La obtención de las muestras se realizó mediante un muestreo no probabilístico por conveniencia en aquellos establecimientos comerciales en los cuales se pudieron encontrar las marcas estudiadas que cumplieron con los criterios de inclusión establecidos.

También se consideró que los números de lote indicados en los recipientes fueran distintos para cada análisis, con el propósito de garantizar que cada una de las muestras estudiadas correspondiera a lotes diferentes.

Procesamiento de las muestras

Las muestras fueron procesadas en el laboratorio del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM).

Se utilizaron muestras de leche en cantidades de 50 ml y reconstituidas a 10% de sólidos totales al momento de su análisis; para la precipitación de proteínas se emplearon 25 ml de una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 24% en agitación constante durante dos minutos a temperatura ambiente, dejándose en reposo durante 60 minutos; posteriormente se removió el precipitado de caseínas y sueroproteínas por filtración, utilizando papel filtro. Se transfirieron 30 ml del filtrado TCA 8% y se añadieron 8 ml de una solución de TCA al 50% para precipitar las proteínas que no se hubieran desnaturalizado durante el paso anterior. Posteriormente, las muestras fueron mantenidas a 4°C durante 24 horas para luego someterse a centrifugación en condiciones de 6 000 g durante 10 minutos, obteniéndose un precipitado que fue lavado con 10 ml de una mezcla de etanol-éter 1:1, sometiéndose a una segunda centrifugación en las mismas condiciones y dejando luego drenar el tubo para eliminar los excesos de la mezcla del lavado. Una vez obtenido el precipitado se utilizaron 380 µl de amortiguador 0.05 M TRIS-HCl + 1mM EDTA-Na₂ pH 7.2 y 500 µl de una solución de sacarosa al 50% y 0.002% de azul de bromofenol con el propósito de resuspenderlo; posteriormente las muestras se mantuvieron en

refrigeración hasta el momento de ser sometidas a la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS 0.375 M pH 8.8 a una concentración del 15% a un voltaje constante de 120v y 80 miliamperes durante 45 minutos, aproximadamente¹⁶.

Las variables en estudio fueron:

a) Cualitativa nominal categórica: Identificación de muestras adulteradas.

b) Cuantitativa discreta: Frecuencia de adulteración en las muestras según la marca comercial analizada.

Resultados

Se logró comprobar la presencia del GMP como indicador de adulteración con lactosuero en 16 muestras de leche deshidratada del total de 108 muestras analizadas, lo que representó 14.81%; cabe señalar que al menos dos de las muestras de cada una de las tres diferentes marcas comerciales de leche deshidratada resultaron positivas en diferentes porcentajes; para la muestra A 7.40%; 1.85% para B y 5.55% para C; en el Cuadro 1 se presenta la cantidad de muestras analizadas y las que resultaron positivas por semana, según la marca comercial estudiada.

En la Figura 1 se presenta un electroferograma con muestras positivas a la presencia del GMP, y en la Figura 2, una placa de electroforesis en donde no se observan bandas formadas por la presencia del GMP (testigo negativo).

Discusión

De acuerdo con los objetivos del estudio, se logró comprobar la presencia del GMP como indicador de adulteración en las tres marcas de leche estudiadas, lo cual constituye un llamado de atención sobre la dimensión del problema que dicha práctica ilícita representa.

Este estudio es el primero realizado en el país con el propósito de identificar la adición de suero de quesería en leche deshidratada comercial. La detección de GMP en 14.81% de las muestras analizadas evidencia la mezcla de leche en polvo con suero de quesería, lo cual demuestra el empleo fraudulento de dicho subproducto conforme a lo que establece la legislación nacional vigente, que define a la leche deshidratada como “el producto resultante de la eliminación del agua de la leche entera, semidescremada o descremada, que haya sido sometida a proceso de pasteurización” y “cuyo porcentaje de sólidos no grasos tienen que ser provenientes de la leche empleada”, lo que descarta absolutamente el empleo de ingredientes o aditivos, como es el caso del lactosuero.

La adición de suero de quesería a la leche no constituye un peligro para la salud del consumidor, pero sí representa un fraude para el mismo en tanto las normas sanitarias y de calidad no lo permitan y el industrial no lo declare en la etiqueta como un producto sustituto de la leche.

Debido a las repercusiones legales y económicas que trae consigo la incorporación de suero de quesería como agente adulterante en la leche fluida o deshidratada, se han efectuado diversos estudios^{3, 18, 19}, en los que se destaca la necesidad de una adecuación a la normatividad en que se contemple un mayor control de calidad para proteger la sana competencia en los mercados nacional e internacional¹⁶.

Tanto en países pertenecientes a la Unión Europea (UE), como en América Latina la adulteración de leche pasteurizada con suero de quesería es un problema que va en aumento y por este motivo se han realizado investigaciones empleando diversos métodos que han permitido la detección de concentraciones de 0.5% a 5% de suero adicionado en leche^{14, 15}. En México fue posible detectar hasta 2.5% en muestras de leche control adicionadas con lactosuero en concentraciones conocidas¹⁶.

Entre las metodologías empleadas para hacer la determinación de adulteración, la separación del GMP es una técnica que ha sido utilizada por Kawakami, Tanimoto, Chu, Lieske, entre otros investigadores^{11, 18, 19}.

Si bien se sugiere que las técnicas más sensibles están relacionadas con la detección y estimación del GMP por electroforesis capilar²⁰ o por HPLC, la técnica empleada en este estudio ha permitido detectar niveles hasta de 2.5% de sólidos de suero agregados a la leche deshidratada¹⁶.

De igual manera, es importante resaltar que en leches fluidas refrigeradas eventualmente se pueden presentar interferencias por péptidos resultantes de actividad proteolítica de organismos psicrotrófos, originando falsos positivos, lo cual constituye una limitante de esta técnica^{11, 12}.

Cabe señalar que hubo necesidad de cambiar la marca de leche que se utilizó como testigo negativo, ya que en los análisis en que se probó generó resultados positivos durante la electroforesis, dicha situación no se repitió con la marca de leche sustituta. Las dos marcas empleadas como testigo negativo fueron de leche deshidratada y descremada para su uso en análisis microbiológicos de laboratorio.

Es importante destacar que en las primeras pruebas que se realizaron no fue posible observar la banda formada por la presencia de GMP en los electroferogramas (Figura 1), incluyendo la del testigo positivo, lo que motivó a disminuir el tiempo de corrida al que eran sometidas, de 50 a un máximo de 45 minutos, tal situación pudo deberse a la influencia del calor generado durante el suministro de corriente, puesto que al ser mayor el tiempo de corrida, aumenta la producción de calor, el cual aumenta la velocidad de migración de las proteínas, esto último influye negativamente en la resolución de los geles y ocasiona la evaporación de la solución amortiguadora y posiblemente una elución completa del GMP. Lo anterior difiere de lo propuesto por Rosas¹⁶, quien utilizando la misma intensidad de corriente logró identificar las bandas de positividad utilizando 50 minutos como tiempo de corrida.

Un problema real con el que se enfrentan las autoridades del país ha sido, hasta el momento, la ausencia de una técnica oficial que permita determinar con plena confiabilidad la adulteración de leche con lactosuero, razón por la que se hace patente la necesidad de realizar un mayor número de estudios que permitan conocer la dimensión real que tal problemática ha adquirido, no sólo de manera cualitativa sino también determinando las cantidades de lactosuero que se emplean con el propósito de adulterar la leche pasteurizada en sus diferentes presentaciones.

En conclusión, se encontró adulteración en las tres marcas comerciales de leche deshidratada, lo que sugiere acción fraudulenta en contra del consumidor.

El método propuesto permite detectar la presencia de GMP como indicador de adulteración con suero de quesería en leche deshidratada, por lo que es recomendable que se realice un mayor número de investigaciones que permitan la validación de la metodología para su instrumentación como una técnica oficial.

Agradecimientos

Este estudio formó parte del proyecto IN500697, aprobado y financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Referencias

1. Reviller A. Tecnología de la leche: procedimiento, manufactura y análisis. Costa Rica: LICA, 1985.
2. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Centro de Estadística Agropecuaria. Boletín anual FAO de estadísticas, México (DF): SAGAR, 1999.
3. Sadini V, Rampilli M. Detection of rennet whey in dried milk and buttermilk. I. General considerations. *Sci Tec Lattiero-Casearia* 1985;36:127-129.
4. Gurría TF. Situación actual de la campaña de tuberculosis bovina y brucelosis en México. *Méx Ganadero* 1994;385:21-27.
5. Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios de la Ley General de Salud. Diario Oficial de la Federación, 9 agosto 1999. México (DF): Secretaría de Salud y Asistencia, 1999.
6. Norma Oficial Mexicana NOM-091-SSA1-1999. Bienes y servicios. Leche pasteurizada de vaca. Disposiciones y especificaciones sanitarias. México (DF): Secretaría de Salud y Asistencia, 1999.
7. López FR, Ramos M. Bovine caseine. II. Detection of cheese whey in dairy products. *Rev Esp Cien Tecnol Alim* 1993;33:1-12.
8. Hill SD, Richter PL, Dill CW. Sulfur-based method to detect adulteration of nonfat dry milk with whey. *Cult Dairy Prod J* 1988;23:16-18.
9. Montana LS, Caroppo S, Francani R, Emaldi GC. Ammonia content in milk and some milk products. *Sci Tec Lattiero-Casearia* 1982;33:95-105.
10. Lechner E. Experience in analysis of dried milk products. *Molk Zeit Welt-Milch* 1981;35:2325-2332.
11. Olieman C, Bedem-JW-Van-den R. A sensitive HPLC method of detecting and estimating rennet whey total solids in skim milk powder. *Net Milk Dairy J* 1983;37:27-36.
12. Martínez PA. Influence of milk proteolysis on methods of detection of cheese whey. *Rev Aliment* 1993;243:47-50.
13. Potgieter CM. The detection of added whey powder in milk powder. I. Investigation into the application of the free sialic acid method recommended by the European Economic Community. *South Afr J Dairy Tech* 1985;17:55-58.
14. Basch JJ, Douglas FW, Procino LG, Holsinger VH, Farrell HM. Quantitation of caseins and whey proteins of processed milks and with Harland-Ashworth procedure. *J Dairy Sci* 1985;68:23-31.
15. Pinto CM, Casadini VS, Brito CC, Molina CH, Israel AL. Detección de sólidos totales de suero de quesería en leche pasteurizada y leche en polvo por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. *Alimentos* 1991;3:23-31.
16. Rosas RJ. 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 (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Química. UNAM, 1997.
17. Daniel, WW: Bioestadística. México (DF): Limusa, 1983.
18. Chu L, MacLeod A, Ozimek L. Isolation of GMP from sodium caseinate hydrolysate solution by ultrafiltration. *Milchwissenschaft* 1996;6:303-306.
19. Lieske B, Konrad G. A new method to estimate casein macropeptide and glycomacropeptide from trichloroacetic acid filtrates. *Milchwissenschaft* 1996;6:431-435.
20. Riel JV, Olieman C. Determination of caseinomacropeptide with capillary zone electrophoresis and its application to the detection and estimation of rennet whey solids in milk and buttermilk powder. *Electrophoresis* 1995;16:529-533.

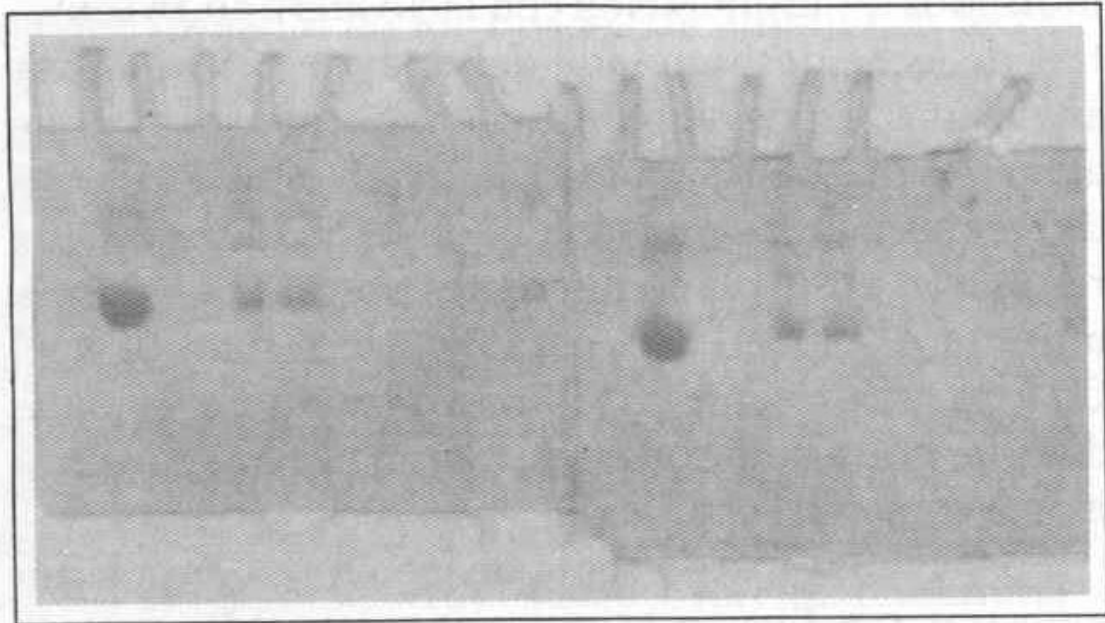


Figura 1. Muestras positivas a la presencia de GMP. Se observan dos geles de muestras positivas; en ambos casos la primera columna de la izquierda representa el testigo positivo y las siguientes dos columnas las muestras.

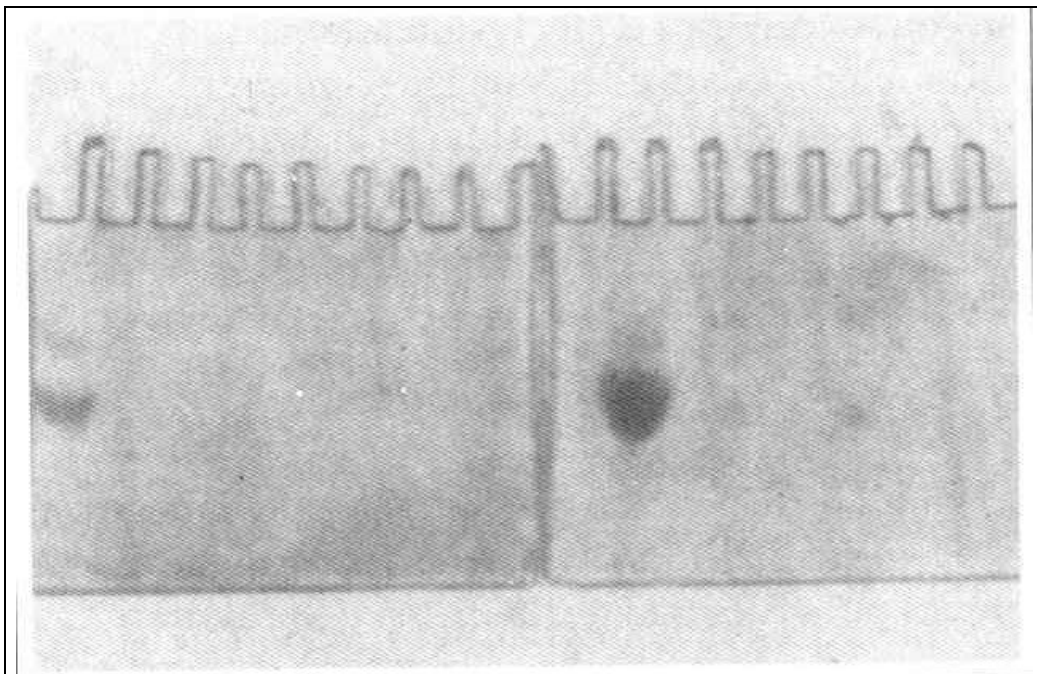


Figura 2. Muestras negativas a la presencia de GMP.

Cuadro 1

DETERMINACIÓN DE SUERO DE QUESERÍA EN EL TOTAL DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS.

Semana	<i>Marca A</i>			<i>Marca B</i>			<i>Marca C</i>		
	Número de muestras	Muestras positivas	Porcentaje	Número de muestras	Muestras positivas	Porcentaje	Número de muestras	Muestras positivas	Porcentaje
1	6	2	5.5	6	-	-	6	2	5.5
2	6	2	5.5	6	2	5.5	6	2	5.5
3	6	2	5.5	6	-	-	6	2	5.5
4	6	2	5.5	6	-	-	6	-	-
5	6	-	-	6	-	-	6	-	-
6	6	-	-	6	-	-	6	-	-
TOTAL	36	8	22.22	36	2	5.5	36	6	16.66

Nota: Las muestras fueron analizadas por duplicado con los mismos resultados en cada prueba.