

USO DEL ISOELECTROENFOQUE EN MEDIO LÍQUIDO PARA EL FRACCIONAMIENTO PROTEÓMICO DE LECHE CONVENCIONAL Y LECHE A2

Beldarrain, L.R., Sentandreu, E. y Sentandreu*, M.A.

Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC). 46980 Paterna (Valencia)

*ciesen@iata.csic.es

INTRODUCCIÓN

La leche comúnmente conocida como “leche A2” contiene exclusivamente la variante A2 de la β -caseína (CN). En los últimos años, este tipo de leche se ha popularizado a raíz de que investigaciones hayan sugerido que la variante A1, presente junto a la A2 en la leche convencional, puede causar efectos gastrointestinales adversos en algunas personas consumidoras (Brooke-Taylor *et al.*, 2017). Entre ambas variantes existe únicamente un aminoácido de diferencia (la A1 sustituye Pro por His en la posición 67). Explotaciones de todo el mundo han comenzado a convertir sus rebaños a la producción de leche certificada como A2 mediante el uso de animales de genotipo A2A2, apreciándose un aumento de las ventas (Dantas *et al.*, 2023). Es necesario desarrollar metodologías transferibles a la industria alimentaria para autentificar este producto. Como paso previo es indispensable caracterizar el proteoma de la leche, por lo que el objetivo del presente trabajo fue optimizar el estudio de la fracción proteica de la leche mediante isoelectroenfoque en medio líquido (OFFGEL), SDS-PAGE y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-ESI-MS/MS).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon marcas comerciales españolas de leche semidesnatada, 3 de leche A2 y otras 3 de leche convencional, 2 UHT y 1 pasteurizada de cada tipo. La grasa fue separada por centrifugación, realizando a continuación el enfoque isoelectrico de las proteínas en el intervalo de pH 4-7 a lo largo de 24 fracciones independientes. Con las 17 primeras fracciones de cada muestra se realizó por duplicado una electroforesis SDS-PAGE en geles del 15% de acrilamida, tiñendo los geles con azul de Coomassie coloidal. La intensidad de las bandas fue analizada por densitometría y las bandas fueron caracterizadas mediante LC-ESI-MS/MS. Los espectros obtenidos fueron interpretados empleando el motor de búsqueda MASCOT y las bases de datos Uniprot KB y NCBIprot.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los geles obtenidos mostraron perfiles proteicos reproducibles. El fraccionamiento OFFGEL permitió la diferenciación de las familias de proteínas mayoritarias, que fueron identificadas mediante LC-ESI-MS/MS. La β -CN se enfocó principalmente entre las fracciones 7 y 10 (punto isoelectrico 4,75-5,25), dando lugar a 10 bandas con pesos moleculares observados de entre 28 y 30 kDa. Las múltiples bandas son consecuencia de su abundancia en la leche (el $29,2 \pm 0,2$ % de las bandas cuantificadas correspondían a la β -CN), haciendo que éstas no se enfoquen en un único carril. A esto se le suma la presencia de fragmentos y bandas de otras variantes minoritarias de la β -CN, previamente descritas por electroforesis 2-DE (Jensen *et al.*, 2012). Sin embargo, las dos bandas más intensas de β -CN (fracciones 7 y 8; $29,8 \pm 1,7$ y $29,4 \pm 1,5$ kDa) fueron identificadas como una mezcla de las variantes A1 y A2 en los geles de leche convencional, y como la variante A2 exclusivamente en los de leche A2. La diferenciación de ambas variantes por LC-MS fue posible gracias a dos péptidos proteotípicos de 20 aminoácidos que contienen el aminoácido de la posición 67 que las diferencia.

CONCLUSIÓN

El isoelectroenfoque en medio líquido ha permitido caracterizar el proteoma de la leche y aislar las bandas correspondientes a la β -CN en los geles de SDS-PAGE. Además, el análisis LC-MS de las bandas mayoritarias de β -CN ha permitido la caracterización de dos péptidos que discriminan entre la leche A2 y la convencional. Estos resultados permiten sentar las bases para desarrollar un método rápido y transferible a la industria, para así dar respuesta al mercado creciente de la leche A2 en lo referente a la certificación del producto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brooke-Taylor, S. *et al.* 2017. Adv. Nutr. 8: 739-748
- Dantas, A. *et al.* 2023. Food Res. Int. 167: 112690
- Jensen, H.B. *et al.* 2012. J. Dairy Sci. 95: 2891-2903.

Agradecimientos: A la Generalitat Valenciana y al FSE+ por el contrato postdoctoral de L.R.B. Al proyecto Centro de Excelencia Severo Ochoa CEX2021-001189-S otorgado al IATA-CSIC.