

REVISIÓN: MÉTODOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA B-LACTOGLOBULINA (B-LG)

Yamile Jiménez-Alfonso¹, Claudia Constanza Pérez-Rubiano², Roy José Andrade-Becerra³

¹Licenciada en Ciencias Naturales y Educación Ambiental, Tunja, Colombia. Contacto: Yamile.jimenez@uptc.edu.co <https://orcid.org/0000-0001-9902-1466>

²Magister en Microbiología, Tunja, Colombia. Contacto: claudia.perez01@uptc.edu.co <https://orcid.org/0000-0003-0698-1826>

³Doctor en Ciencias Agrarias, Tunja, Colombia. Contacto: roy.andrade@uptc.edu.co <https://orcid.org/0000-0002-9681-2067>

RESUMEN

La β -lactoglobulina (β -LG) es la proteína de mayor proporción en el suero de leche, representando el 50% de la proteína total y el 10% de la proteína total de la leche. La β -LG se caracteriza por ser una proteína globular de la familia de las lipocalinas, su función principal es la de transportar moléculas hidrofóbicas, además, es ampliamente estudiada por sus diversas propiedades tecnofuncionales, principalmente por su alto valor como ingrediente alimentario. Por lo tanto, en los últimos años se han desarrollado varios métodos, que incluyen los espectrofotométricos, electroforéticos, inmunoensayos y cromatográficos para la separación y cuantificación de la β -LG. En esta revisión se recopilan las diferentes metodologías empleadas para su cuantificación. Además, se discuten fundamentos, ventajas y limitaciones de cada uno de ellos, así como su proyección a futuro, con el fin de ampliar la visión respecto a la cuantificación de las proteínas del lactosuero en especial la β -LG.

Palabras clave: Globulinas, β -lactoglobulina, Proteínas de la leche, Proteínas de suero, Técnicas analíticas

Recibido: 16 febrero de 2024. Aceptado: 10 de Abril de 2024
Received: February 16, 2024. Accepted: April 10, 2024

REVIEW: METHODS FOR THE QUANTIFICATION OF THE PROTEIN B-LACTOGLOBULIN (B-LG)

ABSTRACT

β -Lactoglobulin (β -LG) is the protein with the highest proportion in whey, representing 50% of the total protein and 10% of the total milk protein. β -LG is characterized by being a globular protein of the lipocalin family. Its main function is to transport hydrophobic molecules. Furthermore, it is widely studied for its various technofunctional properties, mainly for its high value as an ingredient. food. Therefore, in recent years, several methods have been developed, including spectrophotometric, electrophoretic, immunoassay and chromatographic methods for the separation and quantification of β -LG. This review compiles the different methodologies used for its quantification. Furthermore, the foundations, advantages and limitations of each of them are discussed, as well as their future projection, in order to broaden the vision regarding the quantification of whey proteins, especially β -LG.

Keywords: Globulins, β -lactoglobulin, Milk proteins, Whey proteins, Analytical techniques.

1. INTRODUCCIÓN

El lactosuero es la sustancia que corresponde a la fracción líquida, producto del proceso de coagulación de la leche, que se genera en mayor volumen en la industria láctea, y contiene el 25% de la proteína total [1] [2]. Además, contiene una amplia gama de componentes con un alto valor nutricional y actividades biológicas, que han generado interés en su investigación [3]. Por consiguiente, las proteínas presentes en el suero son reconocidas por su alto nivel nutricional, siendo empleadas en la producción de alimentos funcionales y versátiles [4]. La β -lactoglobulina (β -LG), es una proteína globular, que posee una estructura secundaria y presenta nueve hebras beta anti-paralelas, con una hélice alfa, que le confiere una cavidad central cónica, su peso molecular es de 18,4 kDa [5]. Está conformada por una cadena de 162 aminoácidos y hace parte de la familia de las lipocalinas, proteínas especializadas en el transporte de moléculas hidrofóbicas tales como: retinol y otras vitaminas liposolubles, ácidos grasos, isotiocianatos, varios polifenoles, entre otros [6]. Dentro de sus funciones desempeña un papel importante en la transferencia de inmunidad pasiva en los recién nacidos, así mismo, normaliza el metabolismo del fósforo en las glándulas mamarias e impulsa el crecimiento muscular debido a su alto contenido de aminoácidos, también se reconoce como fuente de aminoácidos esenciales, por la presencia de la cisteína que regula la síntesis de Glutación (GSH) que es una pequeña proteína compuesta por los aminoácidos cisteína, glutamato y glicina [7].

De acuerdo a lo anterior, por ser la β -LG la proteína cuantitativamente dominante en el suero de leche (50%), en los últimos años ha sido objeto de estudio en varias áreas, debido a que es un alérgeno nutricional, se encuentra en altas cantidades y es de fácil disponibilidad, se emplea en la producción de suplementos proteicos, materiales biodegradables, entre otros, aportando al desarrollo económico de las regiones productoras del país, debido a que se optimizan todos los componentes del lactosuero, proporcionándole un mayor valor agregado [8]. Actualmente, debido al amplio estudio de las fracciones proteicas del suero de la leche, en especial la proteína β -LG, se pueden destacar varios usos y aplicaciones en el campo de la medicina, debido a que posee propiedades antioxidantes, antitumorales, antimicrobianos, eficaces en la inhibición de la infección por *Chlamydia trachomatis* y el virus del Herpes simple HSV-1 y 2 [9] y en interacción con iones metálicos como la plata genera la formación de nanocompuestos de plata- β -lactoglobulina empleado como agente antimicrobiano [10]. Por otro parte, también se utiliza en la formación de biopolímeros para proteger compuestos bioactivos en los sistemas alimentarios ([11], [12]).

Por consiguiente, se estima que a nivel mundial se producen más de 200 millones de toneladas de lactosuero al año [13]. Por lo cual la cuantificación de la β -LG es fundamental para el procesamiento de la leche, con el fin de dar un valor agregado a los productos lácteos, así como también para la detección de la adulteración de la leche, que es uno de los alimentos que más se altera en los países en desarrollo, en este proceso, la leche es contaminada por múltiples sustancias químicas que al ser consumidas por el ser humano puede provocar graves afectaciones en la salud [14]. Por lo tanto, la revisión de métodos analíticos empleados para la cuantificación de la fracción de la β -LG en diferentes productos alimenticios contribuye a la seguridad alimentaria y genera un aporte en el campo de la investigación al aumentar el conocimiento en cuanto a su presencia y al desarrollo de nuevos productos lácteos con propiedades específicas. Por este motivo se han desarrollado diversos métodos analíticos para su cuantificación como la espectrofotometría, métodos inmunológicos (ELISA), electroforesis capilar, cromatografía líquida en alta resolución en fase reversa (HPLC) y espectrometría de masas, que separan y detectan esta proteína, ya que su contenido varía en las especies de mamíferos [15]. De acuerdo con lo anterior, el objetivo de esta revisión es analizar los fundamentos, ventajas y limitaciones de los principales métodos analíticos empleados actualmente en la cuantificación de la proteína β -LG, así como presentar las perspectivas futuras.

2. ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA VISIBLE (UV-Vis)

La espectrofotometría es una herramienta de análisis cuantitativo, el cual utiliza como componente principal la luz para la medición de las concentraciones de sustancias químicas, la composición de iones complejos en soluciones y la determinación de constantes de formación [16]. La luz es onda y partícula, está conformado por campos eléctricos y magnéticos oscilantes, perpendiculares entre sí. Cuando las moléculas absorben luz pasan a un estado excitado de mayor energía y cuando emiten el fotón, la energía disminuye [17]. Por lo tanto, el espectrofotómetro

mide la absorción de la luz, por medio de un mecanismo en el que se emplea una fuente de luz, que pasa por un monocromador, el cual selecciona una banda estrecha de longitudes de onda del haz incidente que traspasa una muestra y mide la potencia de la luz que sale, por lo que se formula la ley de Beer [18]. La espectrofotometría UV-Vis, se basa en la medición de la atenuación de la radiación electromagnética que posee un rango espectral de 190 a 800 nm por una sustancia absorbente [19].

Esta herramienta se utiliza para identificar y determinar sustancias orgánicas e inorgánicas, puesto que la radiación UV detecta grupos funcionales que actúan como cromóforos, tiene tres características fundamentales (i) la gran aplicabilidad para sistemas orgánicos e inorgánicos, (ii) posee límites de detección de 10^{-4} a 10^{-5} M, y (iii) generan selectividad de moderada a alta, tienen buena exactitud, es fácil y adecuada la adquisición de datos [20]. Sin embargo, existen algunas limitaciones en los análisis espectrofotométricos en cuanto a la exactitud y precisión por las incertidumbres o ruidos asociados al instrumento, además, la radiación dispersada puede generar desviaciones instrumentales de la ley de Lambert-Beer [21], los instrumentos sencillos y económicos son útiles en la región visible para las mediciones cuantitativas a una sola longitud de onda. En cuanto a las proteínas, presentan bandas de absorción claras en la zona de 240 nm a 300 nm. Sin embargo, esos picos claros no se notan en proteínas características como la albúmina bovina o la de huevo, ya que las moléculas al ser de gran tamaño dispersan con fuerza la radiación, por lo que genera un pico de absorción suave [22].

Actualmente existe una gran variedad de métodos espectrofotométricos para calcular la cantidad de proteína de suero presente en la leche, tales como la espectroscopia infrarroja y aquellos que emplean longitudes de onda del espectro electromagnético [23]. Varios estudios que emplearon este método midieron la cantidad de proteína en leche de origen bovino, bufalino y caprino, concluyendo que en estas matrices se debe de utilizar la amplitud del pico entre 270 a 300 nm para cuantificar la proteína total, ya que las tres contienen residuos de Triptófano (Trp) y Tirosina (Tyr), que ayudan a la absorción en esta longitud de onda [24], [25]. Por otro lado, respecto a la cuantificación individual de las proteínas del lactosuero como la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina se emplea la espectroscopia de fluorescencia, que determina concentraciones bajas de analitos, aunque la espectroscopia UV también es capaz de cuantificar las corrientes de baja concentración, debido a que detecta la absorción de aminoácidos aromáticos como la fenilalanina, tirosina y triptófano en el rango de 240 a 340 nm, por lo que es factible para realizar cuantificación selectiva de proteínas [26].

De acuerdo con lo anterior, la espectroscopia UV-Vis es uno de los métodos más utilizados en la cuantificación de proteínas de origen lácteo, incluida la β -LG, no obstante, posee limitaciones significativas que se deben de considerar al momento de emplear esta técnica en la cuantificación de proteínas específicas. Se resalta su falta de especificidad, debido a que es un método que se basa en la absorción de luz, y puede ser influenciada por varios componentes en la muestra, como azúcares, lípidos y sales, llevando a la sobreestimación o subestimación de la concentración de la proteína en presencia de otros compuestos absorbentes; además, tiene una sensibilidad limitada en el momento de detectar bajas concentraciones de proteínas y requiere curvas de calibración con estándares puros de β -LG, que son difíciles de obtener, por lo que afecta la precisión de los resultados. Este método no es adecuado para la cuantificación de proteínas que poseen variantes estructurales y aquellas que tienen bajo nivel de absorbancia en la región UV-Vis. En síntesis, aunque este método es muy utilizado por su fácil manejo, aun así, presenta características que no son favorables en términos de especificidad, sensibilidad, diferenciación y cuantificación de la proteína β -LG en matrices de muestras complejas.

3. INMUNOENSAYOS ENZIMÁTICOS (ELISA)

Las pruebas ELISA o más conocidas como inmunoensayos enzimáticos se definen como métodos especializados para la cuantificación y detección, que actúa en función de la unión de anticuerpos específicos con un determinado antígeno[27]. En el transcurso del tiempo se han generado variaciones experimentales en el método, pero siempre conservando su principio subyacente basado en combinar un anticuerpo con su objetivo, que pueden ser virus, proteínas, péptidos, células o cualquier molécula orgánica de muy baja concentración [28]. Esta técnica junto al radioinmunoensayo fue desarrollada hacia el año de 1941, siendo empleada en la década de los 60 con el fin de medir los niveles de insulina plasmática endógena en humanos [29].

El método se basa en la unión del antígeno a una fase sólida, ya sean tubos, microplacas de polivinilo, polipropileno y poliestireno rígido, las cuales son capaces de adsorber el antígeno y el anticuerpo, pero no los componentes de las otras fases, también incluye el uso de varias enzimas como β -galactosidasa, glucosa oxidasa, peroxidasa

y fosfatasa alcalina, las muestras se leen a través de un fluorómetro [30]. Los efectos catabólicos generados por las enzimas indican tanto la especificidad como la aceleración de las reacciones inmunológicas durante la reacción enzima-sustrato, que se completa en un tiempo estimado de 30 a 60 minutos, se puede detener usando hidróxido de sodio, ácido clorhídrico o sulfúrico y se leen los resultados por espectrofotometría a una longitud de onda entre 400-600 nm, esto varía de acuerdo con el conjugado empleado [31].

Los inmunoensayos enzimáticos se clasifican en dos tipos, por un lado, los métodos homogéneos, que se caracterizan por sus enzimas inactivas cuando se unen al anticuerpo, omitiendo la etapa de lavado en la que se separa el antígeno del medio, se utiliza en la medición de pequeñas cantidades de sustancias como los fármacos, lo que lo hace un método costoso, de baja sensibilidad, pero de fácil uso [32]. Por otro lado, en los métodos heterogéneos es fundamental la etapa de lavado para separar el antígeno unido del antígeno libre después de la interacción antígeno-cuerpo. Esto hace que sea más sensible y el más usado en la detección de anticuerpos específicos y antígenos solubles. Se han desarrollado varios tipos de este ensayo con el fin de aumentar su especificidad de la medición como el ELISA directo, indirecto, sándwich y competitivo[33].

Se han desarrollado diversos estudios en los cuales se han optimizado varios métodos ELISA para permitir la detección de la proteína β -LG en alimentos para bebés [34]. En dichos métodos se encuentran los basados en inmunoabsorción ligados a enzimas indirectos (ELISA) dirigidos a β -LG o caseínas para cuantificar su concentración en leche y productos cárnicos [32]. Así como el desarrollo de ELISA competitivo estandarizado, en el que se emplean anticuerpos IgE recombinantes a β -LG, para identificar y medir los cambios en la inmunorreactividad de β -LG provocados por procesos tecnológicos en alimentos que contienen dicha proteína láctea [36].

Si bien ELISA es una de las técnicas que se utiliza para cuantificar proteínas específicas en diversas muestras biológicas, como la β -LG en el lactosuero, presenta varias limitaciones que se deben de considerar en un contexto crítico al momento de utilizarla, entre ellas se resalta su rango dinámico limitado que genera una baja sensibilidad en la detección de concentraciones bajas de proteínas en algunas matrices; a pesar de que los kits de ELISA son específicos para determinadas proteínas como la β -LG, pueden presentarse dificultades en cuanto a la especificidad cruzada que se puede dar por la similitud estructural entre proteínas de la muestra. Por otro lado, requiere de anticuerpos específicos, que pueden ser difíciles de obtener debido a que la estructura de las proteínas del suero de leche es muy similar y limita la aplicabilidad de este método. Además, requiere de etapas manuales, influyendo en el tiempo de análisis y el riesgo de cometer errores humanos. Por lo tanto, ELISA es una valiosa técnica para cuantificar compuestos específicos, en el caso de las proteínas de suero como la β -LG. Es importante conocer sus limitaciones, mejorar los reactivos y protocolos con el desarrollo de nuevas tecnologías derivadas de los campos de la bioquímica y la biotecnología, que posibilitan avances como la ingeniería de anticuerpos, la utilización de nanomateriales, la implementación de técnicas multiplex y el desarrollo de plataformas basadas en microfluidos.

4. ELECTROFORESIS CAPILAR (CE)

La CE es una de las familias de técnicas más empleadas en química analítica, debido a que permite la cuantificación y separación de varios analitos entre ellos iones, proteínas, vitaminas, fármacos y péptidos, se basa en la diferente migración de estos analitos bajo la influencia de una corriente eléctrica [37]. Esta técnica fue descrita por Reuss en 1809 en las memorias de la Sociedad imperial Natural, en la cual describe el desplazamiento de partículas pequeñas de arena en agua contenida en un recipiente de vidrio con un fondo de arena fina y dos tubos al lado con electrodos de una batería que les suministra corriente generando un enturbiamiento cerca del polo positivo ya que las partículas por carga negativa se movilizan[38].

Actualmente, la separación se realiza en un capilar de sílice fundida, debido a que disipan el calor y pueden resistir altos voltajes, su diámetro es muy reducido y va desde las 10 μm hasta las 200 μm , facilitando la separación, reduciendo los tiempos de análisis, lo que conlleva a una excelente reproducibilidad de la técnica, bajos costos, alta eficiencia y respeto al medio ambiente, empleando menor cantidad de reactivos y disolvente [39]. La electroforesis capilar posee varios sistemas de separación como: la electroforesis capilar de zona (CZE); el isoelectroenfoque capilar (CIEF); la electroforesis en gel capilar nativo (nCGE); la isotacoforesis capilar (CITF); la cromatografía micelar electrocinética (MECC) y la electroforesis en gel de poli(acrilamida) (PAGE)[40]. Esta técnica de separación analítica ha tenido un alto impacto y aplicación en los campos clínico, ambiental, alimentario y forense, ya que se pueden realizar mediciones compuestas específicas de carácter genómico, proteómico y metabólico[41].



La electroforesis capilar es ampliamente utilizada para la separación, cuantificación e identificación de los principales componentes proteicos en la leche de oveja, cabra, vaca y búfala con el fin de detectar y evitar su adulteración, proporcionando perfiles electroforéticos distintos de las fracciones de caseínas de cada una de estas leches y sus productos lácteos, identificando las dos variantes genéticas más comunes de la β -LG como marcador de adulteración[42]. Por otro lado, se han generado nuevos métodos para el análisis de proteínas intactas mediante CE, teniendo en cuenta la selección específica de electrolitos de fondo apropiados de acuerdo con el punto isoeléctrico de las caseínas y proteínas de suero más abundantes [43].

Se han detectado falencias en los métodos actuales, empleados en el perfilado de proteína de leche bovina al nivel intacto, ya que generalmente se basan en electroforesis capilar UV, el cual no permite confirmar de manera específica las proteínas separadas, por lo que se formula un método de espectrometría de masas de CE, el cual es novedoso, rápido y de fácil manejo en modo de ionización por electropray positivo[44]. De acuerdo con lo anterior, dentro de las técnicas analíticas, la CE es la más utilizada debido a que puede detectar la adulteración en las mezclas de leche y sus derivados, requiere de pocos solventes, su análisis es rápido y es de fácil empleabilidad [45]

Considerando lo anterior, la electroforesis capilar es una técnica versátil y poderosa para la cuantificación de proteínas de leche como la β -LG, pese a esto, es importante reconocer que tiene algunas limitaciones, pues no es suficientemente sensible a la hora de cuantificar proteínas individuales, además, en el momento de separar proteínas según su carga y tamaño no proporciona información específica de cada una de estas por lo que requiere de técnicas adicionales. Por otro lado, es susceptible a la interferencia de otros componentes de la matriz de la muestra, lo que hace requerir de pretratamientos de muestra adicionales, también, requiere de equipos y personal especializado para su operación y los tiempos de análisis son un poco largos en comparación con técnicas más modernas, por lo que, si se quiere tener un resultado completo y preciso, se requiere complementar con otras técnicas analíticas.

5. CROMATOGRAFIA LIQUIDA EN ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica derivada de la cromatografía en columna clásica más empleada para la separación, identificación, cuantificación y análisis de los analitos muestras que se puedan disolver en líquidos, además, es uno de los métodos analíticos más precisos [46]. Este método se basa en la presencia de una fase móvil y una fase estacionaria, las cuales son inmiscibles entre sí y la muestra que se quiere analizar. La fase móvil es de naturaleza líquida, cuya función es transportar la muestra de interés hasta la fase estacionaria, que puede ser sólida o una película líquida en un sólido inerte, donde actúan fuerzas químicas y físicas para generar la retención y separación de los analitos presentes en la mezcla, dependiendo de la afinidad con las fases, lo que permite que los analitos se desplacen a diferentes velocidades [47]. Esta separación depende de parámetros ajustables de la fase móvil, como la polaridad, el caudal, el pH, la composición de la matriz, composición de la fase estacionaria, temperatura, tipo de detector, tipo de elución y modo de separación [48].

Este método genera múltiples ventajas como su alta precisión, automatización, además, ofrece un análisis cuantitativo rápido y preciso, se puede aplicar un sistema de disolvente en gradiente, es altamente reproducible y tiene un amplio rango de aplicabilidad[49], puesto que existe gran disponibilidad de equipos y columnas que permiten analizar cualquier tipo de mezcla, es de fácil manipulación, posee gran variedad de técnicas, entre las cuales se identifican las de adsorción, partición, intercambio iónico y exclusión molecular, sumado a esto, no es destructiva [50]. Por otro lado, como limitaciones se evidencia que el método es costoso, requiere varios reactivos, es de mantenimiento regular, carece de un detector universal por lo que la fiabilidad del método depende de la limpieza de las muestras y del correcto funcionamiento del sistema[51]. La HPLC se puede aplicar en la industria farmacéutica, producción de alimentos, ciencias forenses, ambientales y pruebas clínicas[52]

La HPLC en fase reversa es la técnica más utilizada para la separación y cuantificación de las principales proteínas de la leche (caseínas) y el lactosuero (β -lactoglobulina), incluida la identificación de sus variantes genéticas debido a que es un método fiable y rápido [53]. Inicialmente se propuso un método que permitió separar y cuantificar proteínas a una longitud de onda de 214 nm, empleando una columna C18[54]. Mas recientemente, otros estudios se basaron en HPLC para mejorar el método en cuanto a la disminución de costos, tiempo de análisis y optimización en la separación de proteínas utilizando columnas C8 [15], [55], [56], [57], [58]. En los últimos años, la HPLC

ha alcanzado su límite teórico, por lo cual se ha acoplado a la espectrometría de masas (LC-MS/MS), instrumento que le proporciona una mayor resolución en el proceso de identificación de proteínas y sus modificaciones [59]. Por lo anterior, esta técnica requiere de óptimas condiciones de separación como las fase móvil y estacionaria, el tipo de elución, la columna, la temperatura, la presión, los parámetros de detección, la curva de calibración, así mismo, pueden interferir los componentes de la matriz. A pesar de que tiene una buena sensibilidad y límites de detección, no puede detectar concentraciones extremadamente bajas de proteínas y más si estas están diluidas. Por lo tanto, esta técnica requiere de otras como la espectrometría de masas para aumentar sus niveles de detección, especificidad y sensibilidad en los diferentes análisis que impliquen cuantificar proteínas. A continuación, se presenta la Tabla I, la cual proporciona una descripción concisa y relevante respecto a las ventajas y limitaciones de los diferentes métodos analíticos empleados para la cuantificación de la proteína β -LG.

Tabla I
Comparación métodos analíticos empleados en la cuantificación de β -LG.

MÉTODO ANALÍTICO	VENTAJAS	LIMITACIONES
ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA VISIBLE (UV-Vis)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Gran aplicabilidad en sistemas orgánicos e inorgánicos. ➤ Tiene límites de detección de 10^{-4} a 10^{-5}M. ➤ Generan selectividad de moderada a alta. ➤ Posee buena exactitud. ➤ Fácil y adecuada adquisición de datos. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Falta de especificidad, debido a puede ser influenciada por varios componentes en la muestra. ➤ Sensibilidad limitada en el momento de detectar bajas concentraciones de proteínas ➤ Requiere curvas de calibración con estándares puros de β-LG
INMUNOENSAYOS ENZIMÁTICOS (ELISA)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Cuantificar proteínas específicas. ➤ Posee una alta sensibilidad y especificidad. ➤ Su uso es fácil y seguro. ➤ Es versátil, debido a que tiene una amplia gama de aplicaciones. ➤ Genera una Rápida detección 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Rango dinámico limitado que genera una baja sensibilidad en la detección de concentraciones bajas de proteínas en algunas matrices. ➤ Posee especificidad cruzada que se puede dar por la similitud estructural entre proteínas. ➤ Requiere de anticuerpos específicos. ➤ Contiene etapas manuales.
ELECTROFORESIS CAPILAR (CE)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Separa, cuantifica e identifica los principales componentes proteicos, lo que le confiere una alta reproducibilidad. ➤ Requiere pequeños volúmenes de muestra ➤ Es altamente sensible debido a que puede detectar trazas de moléculas en una muestra. ➤ Requiere pocos reactivos químicos, lo que lo hace menos costoso y más amigable con el ambiente. ➤ Posee un amplio rango de aplicaciones. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ No es suficientemente sensible en la cuantificación de proteínas individuales. ➤ Requiere de técnicas adicionales para proporcionar información específica. ➤ Es susceptible a la interferencia de otros componentes de la matriz de la muestra. ➤ Requiere de equipos y personal especializado para su operación. ➤ Son extensos los tiempos de análisis.
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EN ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Posee alta precisión y automatización. ➤ Tiene una buena sensibilidad y límites de detección. ➤ Ofrece un análisis cuantitativo rápido y preciso. ➤ Se puede aplicar un sistema de disolvente en gradiente. ➤ Es altamente reproducible. ➤ Tiene un amplio rango de aplicabilidad. ➤ Es de fácil manipulación. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Es un método costoso. ➤ Requiere de varios reactivos. ➤ Su mantenimiento debe de ser regular. ➤ Carece de un detector universal. ➤ Requiere de óptimas condiciones de separación. ➤ No puede detectar concentraciones extremadamente bajas de proteínas y más si están diluidas. ➤ Necesita de otras como la espectrometría de masas para aumentar sus niveles de detección, especificidad y sensibilidad.

- Posee gran variedad de técnicas, entre las cuales están por adsorción, partición, intercambio iónico y exclusión molecular.
- No es una técnica destructiva.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Con el paso del tiempo, se han dado importantes avances en la especialización y desarrollo de diversos métodos analíticos que proporcionan una mayor precisión y sensibilidad en la cuantificación de proteínas. Por lo que han surgido perspectivas futuras que prometen revolucionar el estudio y la determinación de las fracciones proteínicas presentes en el lactosuero. Algunas de estas perspectivas abarcan el desarrollo de tecnologías de determinación y detección sensibles y rápidas como son los biosensores fabricados con tinta de nanotubos de carbono a base de agua con funcionalidad carboxilo que tienen como función inmovilizar las proteínas como la β -LG, lo que facilita su cuantificación [60]. Así mismo, se han desarrollado aptasensores de electroquimioluminiscencia especializados en detectar y cuantificar β -LG en matrices de alimentos [61], así como el desarrollo de sensores impresos modificados con nanocompuestos Ru-AuNP/GNP/Naf [62]

Estos métodos poseen una determinación simple y rápida, además de alta especificidad, sensibilidad, estabilidad, portabilidad y rentabilidad. Por otro lado, la HPLC acoplada a LC-MS/MS es una de las técnicas más empleadas, que podría desarrollar mejoras en la velocidad de análisis, resolución de picos y sensibilidad de detección, ofreciendo una cuantificación más precisa [63]. Además, la espectrometría de masas de relación isotópica (IRMS) que utiliza hasta 5 isótopos estables de luz, aplicado para la autenticación de alimentos, permite la detección de fragmentos peptídicos, mejorando la selectividad y precisión [64]. También cabe señalar los avances en métodos inmunológicos avanzados como Western Blot, método estándar para cuantificar e identificar proteínas específicas en mezclas complejas [65], además del desarrollo de microarreglos de proteínas, podría generar la cuantificación multiplex de varias proteínas en una sola muestra [66]. En general, la cuantificación de la β -LG que se encuentra en mayor proporción, es un campo que está en constante desarrollo, guiando hacia métodos más sensibles, precisos, rentables, rápidos y eficientes (Figura 1), con una gran variedad de aplicaciones en diversos campos de investigación relacionados con la industria láctea, producción de suplementos nutricionales, la investigación biomédica y el desarrollo de nuevos biomateriales, lo que conlleva a reconocer su potencial en cuanto a la generación de un impacto significativo en múltiples campos del conocimiento.

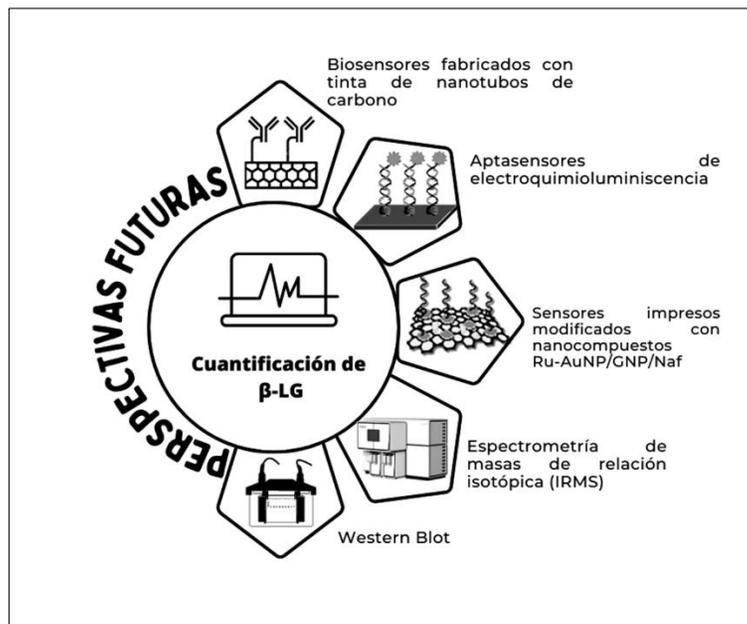


Fig. 1. Perspectivas futuras respecto a los métodos analíticos para la cuantificación de β -LG.

7. CONCLUSIÓN

La β -LG es una de las proteínas que ha tenido un mayor interés en las últimas décadas debido a sus propiedades químicas y biológicas que contribuyen a la investigación en varios campos como el de la medicina, debido a que posee propiedades antioxidantes, antitumorales, antimicrobianas, en la formación de nanocompuestos y producción de biopolímeros. Por ende, la cuantificación de la fracción proteica del suero lácteo es un procedimiento fundamental para la industria de los lácteos, debido a que contribuye al estudio de la concentración de cada una de las proteínas presentes, en especial la β -LG, que se encuentra en mayor proporción. Por lo tanto, permitirá aprovechar todas sus propiedades en cuanto a la generación de nuevos productos de alto valor comercial y tecnológico. Es precisamente por esta razón que en las últimas décadas se han desarrollado múltiples métodos analíticos para la cuantificación de esta proteína. Sin embargo, a pesar de que todos poseen ventajas en cuanto a su separación y cuantificación, muchos de ellos no son eficientes debido a sus altos costos, poca exactitud, precisión, selectividad y extensos tiempos de análisis, siendo los métodos cromatográficos los más empleados, puesto que son más efectivos y eficientes. Por lo cual, las perspectivas futuras brindan información valiosa respecto al potencial desarrollo de métodos analíticos más especializados para la óptima determinación y cuantificación de las proteínas del lactosuero en especial la β -LG.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] F. Asunis, G. De Gioannis, D. Dessì, M. Isipato and D. Spiga, "The dairy biorefinery: Integrating treatment processes for cheese whey valorisation," *Journal of Environmental Management*, vol. 276. Academic Press, Dec. 15, 2020. doi: 10.1016/j.jenvman.2020.111240.
- [2] R. E. López Barreto, M. L. Becerra Jiménez, and L. M. Borrás Sandoval, "Caracterización físico-química y microbiológica del lactosuero del queso Paipa," *Revista ciencia y agricultura*, vol. 15, no. 2, pp. 99–106, 2018.
- [3] P. Tsermoula, B. Khakimov, J. H. Nielsen, and S. B. Engelsen, "WHEY - The waste-stream that became more valuable than the food product," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 118. Elsevier Ltd, pp. 230–241, Dec. 01, 2021. doi: 10.1016/j.tifs.2021.08.025.
- [4] A. M. Joyce, A. Brodkorb, A. L. Kelly, and J. A. O'Mahony, "Separation of the effects of denaturation and aggregation on whey-casein protein interactions during the manufacture of a model infant formula," *Dairy Science Technology*, vol. 96, no. 6, pp. 787–806, Feb. 2017, doi: 10.1007/s13594-016-0303-4.
- [5] J. Anibal and R. Alpala, "polimorfismo de los genes k-caseína, β -lactoglobulina y α -lactoalbumina en razas bovinas criollas colombianas," 2009.
- [6] E. G. Varlamova and O. G. Zaripov, "Beta-lactoglobulin-nutrition allergen and nanotransporter of different nature ligands therapy with therapeutic action," *Research in Veterinary Science*, vol. 133. Elsevier B.V., pp. 17–25, Dec. 01, 2020. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.08.014.
- [7] A. R. Madureira, C. I. Pereira, A. M. P. Gomes, M. E. Pintado, and F. Xavier Malcata, "Bovine whey proteins - Overview on their main biological properties," *Food Research International*, vol. 40, no. 10. pp. 1197–1211, Dec. 2007. doi: 10.1016/j.foodres.2007.07.005.
- [8] S. le Maux, S. Bouhallab, L. Giblin, A. Brodkorb, and T. Croguennec, "Bovine β -lactoglobulin/fatty acid complexes: Binding, structural, and biological properties," *Dairy Science and Technology*, vol. 94, no. 5. Springer-Verlag France, pp. 409–426, 2014. doi: 10.1007/s13594-014-0160-y.
- [9] K. Kazimierska and U. Kalinowska-Lis, "Milk proteins-their biological activities and use in cosmetics and dermatology," *Molecules*, vol. 26, no. 11. MDPI AG, Jun. 01, 2021. doi: 10.3390/molecules26113253.
- [10] A. Rodzik, V. Railean, P. Pomastowski, P. Žuvela and B. Buszewski, "Study on silver ions binding to β -lactoglobulin," *Biophys Chem*, vol. 291, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.bpc.2022.106897.
- [11] O. Jones, E. A. Decker, and D. J. McClements, "Thermal analysis of β -lactoglobulin complexes with pectins or carrageenan for production of stable biopolymer particles," *Food Hydrocoll*, vol. 24, no. 2–3, pp. 239–248, Mar. 2010, doi: 10.1016/j.foodhyd.2009.10.001.
- [12] O. G. Jones, E. A. Decker, and D. J. McClements, "Formation of biopolymer particles by thermal treatment of β -lactoglobulin-pectin complexes," *Food Hydrocoll*, vol. 23, no. 5, pp. 1312–1321, Jul. 2009, doi: 10.1016/j.foodhyd.2008.11.013.

- [13] F. Ostertag, C. M. Schmidt, S. Berensmeier, and J. Hinrichs, "Development and validation of an RP-HPLC DAD method for the simultaneous quantification of minor and major whey proteins," *Food Chem*, vol. 342, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.128176.
- [14] S. Patari, P. Datta, and P. S. Mahapatra, "3D Paper-based milk adulteration detection device," *Sci Rep*, vol. 12, no. 1, p. 13657, Aug. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-17851-3.
- [15] L. Ma, Y. Yang, J. Chen, J. Wang, and D. Bu, "A rapid analytical method of major milk proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography," *Animal Science Journal*, vol. 88, no. 10, pp. 1623–1628, Oct. 2017, doi: 10.1111/asj.12804.
- [16] C. Rubia-Payá, G. de Miguel, M. T. Martín-Romero, J. J. Giner-Casares, and L. Camacho, "UV-Vis Reflection-Absorption Spectroscopy at air-liquid interfaces," *Adv Colloid Interface Sci*, vol. 225, pp. 134–145, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.cis.2015.08.012.
- [17] Harris D. C., "Análisis químico cuantitativo," Revente, 2003.
- [18] V. Cerdà, P. Phansi, and S. Ferreira, "From mono- to multicomponent methods in UV-VIS spectrophotometric and fluorimetric quantitative analysis – A review," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 157, p. 116772, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.trac.2022.116772.
- [19] M. L.C. Passos and M. L. M.F.S. Saraiva, "Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies," *Measurement*, vol. 135, pp. 896–904, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.measurement.2018.12.045.
- [20] M. Dehghani Mohammad Abadi, N. Ashraf, M. Chamsaz, and F. Shemirani, "An overview of liquid phase microextraction approaches combined with UV-Vis spectrophotometry," *Talanta*, vol. 99, pp. 1–12, Sep. 2012, doi: 10.1016/j.talanta.2012.05.027.
- [21] T. G. Mayerhöfer, S. Pahlow, and J. Popp, "The Bouguer-Beer-Lambert Law: Shining Light on the Obscure," *ChemPhysChem*, vol. 21, no. 18, pp. 2029–2046, Sep. 2020, doi: 10.1002/cphc.202000464.
- [22] D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, "Principios de análisis instrumental," 2008.
- [23] E. O. Rukke, E. F. Olsen, T. Devold, G. Vegarud, and T. Isaksson, "Technical note: Comparing calibration methods for determination of protein in goat milk by ultraviolet spectroscopy," *J Dairy Sci*, vol. 93, no. 7, pp. 2922–2925, Jul. 2010, doi: 10.3168/jds.2009-2841.
- [24] B. Miralles, B. BartolomeH, M. Ramos, and L. Amigo, "Determination of whey protein to total protein ratio in UHT milk using fourth derivative spectroscopy," 2000.
- [25] Q. Lüthi-Peng and Z. Puhan, "Determination of protein and casein in milk by fourth derivative UV spectrophotometry," *Anal Chim Acta*, vol. 393, no. 1–3, pp. 227–234, Jun. 1999, doi: 10.1016/S0003-2670(98)00823-X.
- [26] M. Tonolini, P. B. Skou, and F. W. J. van den Berg, "UV spectroscopy as a quantitative monitoring tool in a dairy side-stream fractionation process," *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 225, Jun. 2022, doi: 10.1016/j.chemolab.2022.104561.
- [27] R. Hnasko, A. Lin, J. A. McGarvey, and L. H. Stanker, "A rapid method to improve protein detection by indirect ELISA," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 410, no. 4, pp. 726–731, Jul. 2011, doi: 10.1016/j.bbrc.2011.06.005.
- [28] J. M. Van Emon, "Immunoassays in Biotechnology," in *Comprehensive Biotechnology*, Elsevier, 2011, pp. 659–667. doi: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00076-3.
- [29] R. S. YALOW and S. A. BERSON, "Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.," *J Clin Invest*, vol. 39, pp. 1157–1175, 1960, doi: 10.1172/JCI104130.
- [30] E. Engvall and P. Perlmann, "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G," *Immunochemistry*, vol. 8, no. 9, pp. 871–874, Sep. 1971, doi: 10.1016/0019-2791(71)90454-X.
- [31] E. Engvall, "The ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay," *Clin Chem*, vol. 56, no. 2, pp. 319–320, Feb. 2010, doi: 10.1373/clinchem.2009.127803.
- [32] S. Aydin, "A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA," *Peptides (N.Y.)*, vol. 72, pp. 4–15, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.peptides.2015.04.012.

-
- [33] L. Asensio, I. González, T. García, and R. Martín, "Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)," *Food Control*, vol. 19, no. 1, pp. 1–8, Jan. 2008, doi: 10.1016/j.foodcont.2007.02.010.
- [34] C. Pelaez-Lorenzo, J. C. Diez-Masa, I. Vasallo, and M. de Frutos, "Development of an Optimized ELISA and a Sample Preparation Method for the Detection of β -Lactoglobulin Traces in Baby Foods," *J Agric Food Chem*, vol. 58, no. 3, pp. 1664–1671, Feb. 2010, doi: 10.1021/jf9041485.
- [35] C. Villa, M. B. M. V. Moura, J. Costa, and I. Mafra, " β -Lactoglobulin versus casein indirect ELISA for the detection of cow's milk allergens in raw and processed model meat products," *Food Control*, vol. 135, p. 108818, May 2022, doi: 10.1016/j.foodcont.2022.108818.
- [36] J. Orcajo, M. Lavilla, and I. Martínez-de-Marañón, "Specific and sensitive ELISA for measurement of IgE-binding variations of milk allergen β -lactoglobulin in processed foods," *Anal Chim Acta*, vol. 1052, pp. 163–169, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.aca.2018.11.048.
- [37] M. C. Doroteo, "Principios básicos de electroforesis capilar: técnica analítica de separación de analitos," 2012. [Online]. Available: www.medigraphic.org.mx
- [38] J. M. Castagnino, "Electroforesis capilar," 2000.
- [39] A. Van Schepdael, "Capillary electrophoresis as a simple and low-cost analytical tool for use in money-constrained situations," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 160, p. 116992, Mar. 2023, doi: 10.1016/j.trac.2023.116992.
- [40] N. Sharma, R. Sharma, Y. S. Rajput, B. Mann, R. Singh, and K. Gandhi, "Separation methods for milk proteins on polyacrylamide gel electrophoresis: Critical analysis and options for better resolution," *Int Dairy J*, vol. 114, p. 104920, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.idairyj.2020.104920.
- [41] M. Palmblad, N. J. van Eck, and J. Bergquist, "Capillary electrophoresis - A bibliometric analysis," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 159, p. 116899, Feb. 2023, doi: 10.1016/j.trac.2022.116899.
- [42] F. Trimboli, N. Costanzo, V. Lopreiato, C. Ceniti and D. Britti, "Detection of buffalo milk adulteration with cow milk by capillary electrophoresis analysis," *Dairy Science Technology*, vol. 102, no. 7, pp. 5962–5970, Jul. 2019, doi: 10.3168/jds.2018-16194.
- [43] S. Meyer, D. Clases, R. Gonzalez de Vega, M. P. Padula, and P. A. Doble, "Separation of intact proteins by capillary electrophoresis," *Analyst*, vol. 147, no. 13, pp. 2988–2996, 2022, doi: 10.1039/D2AN00474G.
- [44] Z. Ghafoori, T. Tehrani, L. Pont, and F. Benavente, "Separation and characterization of bovine milk proteins by capillary electrophoresis-mass spectrometry," *J Sep Sci*, vol. 45, no. 18, pp. 3614–3623, Sep. 2022, doi: 10.1002/jssc.202200423.
- [45] M. Masci, C. Zoani, T. Navigato, A. Turrini, R. Jasionowska, R. Caproni and P. Ratini, "Authenticity assessment of dairy products by capillary electrophoresis," *Electrophoresis*, vol. 43, no. 1–2, pp. 340–354, Jan. 2022, doi: 10.1002/elps.202100154.
- [46] S. Kumar Bhardwaj, "A Review: HPLC Method Development and Validation," 2015. [Online]. Available: <http://www.urpjournals.com>
- [47] D. Suarez Ospina and Y. Morales Hernández, "Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas básicas," *América Revista Semilleros: Formación Investigativa*, vol. 4, 2018.
- [48] P. K. Sahu, N. R. Ramisetti, T. Cecchi, S. Swain, C. S. Patro, and J. Panda, "An overview of experimental designs in HPLC method development and validation," *J Pharm Biomed Anal*, vol. 147, pp. 590–611, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.jpba.2017.05.006.
- [49] U. Nirenberg, "Reversed-Phase HPLC: Analytical Procedure," in *Peptide Analysis Protocols*, New Jersey: Humana Press, pp. 23–36. doi: 10.1385/0-89603-274-4:23.
- [50] M. W. Dong, "The essence of modern HPLC: Advantages, limitations, fundamentals and opportunities," *LCGC NORTH AMERICA*, vol. 31, no. 6, pp. 472–479, 2013.
- [51] O. A. Quattrocchi, S. I. A. De Andrizzi, and R. F. Laba, *Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica escritoria*. 1992.

- [52] A. Iriarte, "historia, desarrollo y últimos avances en cromatografía." Corporación Tecnológica de Bogotá. 2022
- [53] H. Buzás, R. Székelyhidi, G. Szafner, K. Szabó, J. Süle and A.J. Kovács, "Developed rapid and simple RP-HPLC method for simultaneous separation and quantification of bovine milk protein fractions and their genetic variants," *Anal Biochem*, vol. 658, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.ab.2022.114939.
- [54] G. Bobe, D. C. Beitz, A. E. Freeman, and G. L. Lindberg, "Separation and Quantification of Bovine Milk Proteins by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography," 1998.
- [55] V. Bonfatti, L. Grigoletto, A. Cecchinato, L. Gallo, and P. Carnier, "Validation of a new reversed-phase high-performance liquid chromatography method for separation and quantification of bovine milk protein genetic variants," *J Chromatogr A*, vol. 1195, no. 1–2, pp. 101–106, Jun. 2008, doi: 10.1016/j.chroma.2008.04.075.
- [56] V. Bonfatti, M. Giantin, R. Rostellato, M. Dacasto, and P. Carnier, "Separation and quantification of water buffalo milk protein fractions and genetic variants by RP-HPLC," *Food Chem*, vol. 136, no. 2, pp. 364–367, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.09.002.
- [57] A. Maurmayr, A. Cecchinato, L. Grigoletto, and G. Bittante, "Detection and Quantification of α S1-, α S2-, β -, κ -casein, α -lactalbumin, β -lactoglobulin and Lactoferrin in Bovine Milk by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography," 2013.
- [58] E. Tsakali, K. Petrotos, A. Chatzilazarou, K. Stamatopoulos, A.G. D'Alessandro, P. Goulas, and J.F. Van Impe, "Short communication: Determination of lactoferrin in Feta cheese whey with reversed-phase high-performance liquid chromatography," *J Dairy Sci*, vol. 97, no. 8, pp. 4832–4837, 2014, doi: 10.3168/jds.2013-7526.
- [59] C. R. Bupp and M. J. Wirth, "Making Sharper Peaks for Reverse-Phase Liquid Chromatography of Proteins," *Annual Review of Analytical Chemistry*, vol. 13, no. 1, pp. 363–380, Jun. 2020, doi: 10.1146/annurev-anchem-061318-115009.
- [60] J. Molinari, L. Florez, A. Medrano, L. Monsalve, and G. Ybarra, "Electrochemical Determination of β -Lactoglobulin Employing a Polystyrene Bead-Modified Carbon Nanotube Ink," *Biosensors (Basel)*, vol. 8, no. 4, p. 109, Nov. 2018, doi: 10.3390/bios8040109.
- [61] R. Svirgelj, I. Zuliani, N. Dossi, and R. Toniolo, "A portable electrochemiluminescence aptasensor for β -lactoglobulin detection," *Anal Bioanal Chem*, vol. 414, no. 27, pp. 7935–7941, Nov. 2022, doi: 10.1007/s00216-022-04328-5.
- [62] C. P. Kurup, N. F. Mohd-Naim, and M. U. Ahmed, "A solid-state electrochemiluminescence aptasensor for β -lactoglobulin using Ru-AuNP/GNP/Naf nanocomposite-modified printed sensor," *Microchimica Acta*, vol. 189, no. 4, p. 165, Apr. 2022, doi: 10.1007/s00604-022-05275-9.
- [63] M. Yuan, C. Feng, S. Wang, W. Zhang, M. Chen, H. Jiang and X. Feng, "Selection of possible signature peptides for the detection of bovine lactoferrin in infant formulas by LC-MS/MS," *PLoS One*, vol. 12, no. 9, p. e0184152, Sep. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0184152.
- [64] C. Li, X. Kang, J. Nie, A. Li, M.A. Farag, C. Liu, K.M. Rogers and Y. Yuan, "Recent advances in Chinese food authentication and origin verification using isotope ratio mass spectrometry," *Food Chem*, vol. 398, p. 133896, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.133896.
- [65] G. H. Meftahi, Z. Bahari, A. Zarei Mahmoudabadi, M. Iman, and Z. Jangravi, "Applications of western blot technique: From bench to bedside," *Biochemistry and Molecular Biology Education*, vol. 49, no. 4, pp. 509–517, Jul. 2021, doi: 10.1002/bmb.21516.
- [66] H. Qi, F. Wang, and S. Tao, "Proteome microarray technology and application: higher, wider, and deeper," *Expert Rev Proteomics*, vol. 16, no. 10, pp. 815–827, Oct. 2019, doi: 10.1080/14789450.2019.1662303.