

42

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA III  
(HIGIENE Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS)  
FACULTAD DE VETERINARIA

**DETECCION POR TECNICAS INMUNOENZIMATICAS (ELISA), UTILIZANDO ANTICUERPOS POLICLONALES FRENTE A CASEINAS, DE LAS LECHE DE VACA, CABRA Y OVEJA EN MEZCLAS LACTEAS FRESCAS Y EN QUESOS.**

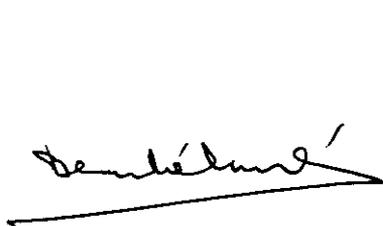
Memoria que para optar al grado  
de Doctor en Veterinaria presenta  
la Licenciada María Elena Rodríguez  
Valín.

PABLO ELPIDIO HERNANDEZ CRUZA, CATEDRATICO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA  
DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada **"DETECCION POR TECNICAS INMUNOENZIMATICAS (ELISA), UTILIZANDO ANTICUERPOS POLICLONALES FRENTE A CASEINAS, DE LAS LECHES DE VACA, CABRA Y OVEJA EN MEZCLAS LACTEAS FRESCAS Y EN QUESOS"**, de la que es autora D. María Elena Rodríguez Valín, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición y Bromatología III (Higiene y Tecnología de los Alimentos), bajo la dirección conjunta del catedrático D. Bernabé Sanz Pérez, de la profesora titular María del Rosario Martín de Santos y del que suscribe y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor en Veterinaria.

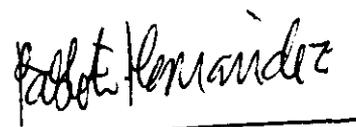
Madrid, 15 de Septiembre de 1992



Fdo: Bernabé Sanz Pérez



Fdo: María del Rosario Martín de Santos



Fdo: Pablo E. Hernández Cruza

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecer al profesor D. Bernabé Sanz Pérez su acogida en el Departamento que dirige, así como los consejos y orientaciones recibidos durante la realización de este trabajo.

De igual forma, deseo manifestar mi más sincero agradecimiento al Prof. Dr. Pablo E. Hernández Cruza, por haberme iniciado en el campo de la investigación y por su constante dedicación, apoyo y comprensión, sin los que esta tesis no hubiera sido posible.

El ejemplo y estímulo constantes de la Dra. Charo Martín de Santos, durante el desarrollo experimental de este trabajo, y sus consejos e ideas que han sido decisivos en mi formación.

Una mención especial a Teresa, no sólo por guiar mis primeros pasos en un laboratorio, sino también por la ayuda y amistad mostrada durante estos años.

Mi reconocimiento y amistad a los restantes miembros del Departamento de Nutrición y Bromatología III, por su colaboración desinteresada y, particularmente, a los becarios por los buenos momentos compartidos.

Al personal facultativo y auxiliar del Pabellón de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital Militar "Gomez Ulla", les expreso mi agradecimiento por la colaboración prestada en el proceso de inmunización de los conejos. A los Laboratorios Llorente y, en particular, a D. Carlos Paleo por su ayuda en la inmunización de los machos cabríos. A todo el personal de la Cooperativa Castellana de Ganaderos de Campo Real, por haber tenido la amabilidad de

proporcionarme, en repetidas ocasiones, las muestras de leche cruda.

Al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión de una beca de Formación de Personal Investigador y a la CICYT por la oportunidad de formar parte de los equipos de investigación de los proyectos nº ALI 88-0111 y ALI 91-0229.

Por último y, no por ello menos calurosamente, mi agradecimiento y eterno cariño a mis padres y hermanos y, muy especialmente, a Antonio por su comprensión, apoyo y estímulo constantes durante todo este tiempo.

A Antonio y a mis padres

## INDICE

Páginas

<b>I. EXPOSICION GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR.....</b>	<b>1</b>
<b>II. INTRODUCCION.....</b>	<b>7</b>
II.A. COMPOSICION QUIMICA DE LA LECHE.....	10
A.1. PROTEINAS.....	12
1.1. Caseínas.....	12
1. Tipos de caseínas.....	14
2. Estructura de la micela.....	18
3. Diferencias de composición entre las caseínas de las leches de vaca, oveja y cabra.....	21
1.2. Proteínas del suero.....	31
1.3. Otras proteínas.....	35
A.2. LIPIDOS.....	36
A.3. CARBOHIDRATOS.....	36
A.4. SALES.....	37
A.5. OTROS COMPONENTES.....	37
II.B. CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS QUESOS.....	38
B.1. ELABORACION DEL QUESO.....	38
B.2. COMPORTAMIENTO DE LAS PROTEINAS DE LA LECHE DURANTE LA ELABORACION DEL QUESO.....	43
2.1. Durante la coagulación.....	45
2.2. Durante el desuerado.....	46
2.3. Durante la maduración.....	47
II.C. METODOS PARA IDENTIFICAR EL ORIGEN ESPECIFICO DE LA LECHE EN MEZCLAS LACTEAS Y EN QUESOS FRESCOS Y MADURADOS.....	51

C.1. METODOS QUIMICOS.....	51
1.1. Determinación de la xantina-oxidasa.....	51
1.2. Índices de la grasa.....	52
1.3. Relación Ca/Mg.....	52
1.4. Determinación del $\beta$ -caroteno.....	52
1.5. Determinación de la uridina.....	54
C.2. METODOS CROMATOGRAFICOS.....	54
2.1. Proteínas y aminoácidos.....	54
2.2. Detección, caracterización y cuantificación de los ácidos grasos.....	55
2.3. Determinación de triglicéridos.....	57
C.3. METODOS ELECTROFORETICOS.....	57
3.1. Electroforesis de las caseínas en geles de poliacrilamida.....	58
3.2. Electroforesis de las proteínas del suero en geles de poliacrilamida.....	59
3.3. Isoelectroenfoque.....	60
C.4. METODOS INMUNOLOGICOS.....	62
4.1. Inmunoprecipitación en medio líquido.....	62
4.2. Inmunodifusión en geles de agarosa.....	63
4.3. Inmunoturbidimetría.....	65
4.4. Inhibición de la hemaglutinación.....	66
4.5. Inmunoelectroforesis.....	66
4.6. Electrosíntesis.....	67
4.7. Métodos inmunoenzimáticos (ELISA).....	68
4.8. Inmunodotting.....	73
<b>III. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>75</b>
III.A. MATERIAL.....	76
A.1. MATERIAL DE LABORATORIO.....	76

A.2. MATERIAL BIOLÓGICO.....	78
2.1. Origen de las muestras.....	78
2.2. Obtención de los inmunosueros.....	78
A.3. PRODUCTOS Y REACTIVOS.....	79
III.B. METODOS.....	79
B.1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ANTIGÉNICOS.....	79
B.2. DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA.....	81
B.3. OBTENCIÓN DE LOS INMUNOSUEROS.....	82
3.1. Pauta de inmunización de los conejos.....	82
3.2. Pauta de inmunización de los machos cabríos.....	83
B.4. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS.....	84
4.1. Inmunodifusión en geles de agarosa.....	84
4.2. Purificación de los inmunosueros por técnicas de cromatografía de afinidad.....	86
2.1. Acoplamiento de los ligandos a la matriz de Sepharosa 4B-CNBr.....	87
2.2. Condiciones de trabajo.....	88
2.3. Purificación por inmunoadsorción del inmunosero anti-CV obtenido de conejos.....	89
2.4. Purificación por inmunoadsorción del inmunosero anti-CV obtenido de machos cabríos.....	90
1. Precipitación de las inmunoglobulinas con sulfato amónico.....	90
2. Purificación por tres columnas.....	92
2.5. Purificación por inmunoadsorción del inmunosero anti-CC obtenido de conejos.....	94
1. Purificación por una columna.....	94
2. Precipitación de las Inmunoglobulinas con	

sulfato amónico.....	95
3. Purificación por tres columnas.....	95
4.3. Conjugación de los anticuerpos purificados a la biotina.....	95
4.4. Neutralización de los inmunosueros.....	96
4.5. Técnicas inmunoenzimáticas.....	97
1. Técnica del ELISA indirecto.....	97
1. Antígenos.....	98
2. Anticuerpos.....	99
3. Conjugado.....	99
4. Tampones y reactivos.....	99
5. Metodología del ELISA indirecto.....	101
2. Técnica del ELISA sandwich.....	102
1. Antígenos.....	103
2. Anticuerpos de captura.....	103
3. Anticuerpos de detección.....	103
4. Conjugado.....	103
5. Tampones y reactivos.....	103
6. Metodología del ELISA sandwich.....	104
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>106</b>
IV.A. DIAGRAMA ESQUEMATICO DEL TRABAJO DESARROLLADO.....	107
IV.B. ANALISIS POR INMUNODIFUSION EN GELES DE AGAROSA, DE LOS INMUNOSUEROS OBTENIDOS AL INOCULAR CASEINAS DE DIVERSAS ESPECIES A LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACION.....	110
B.1. Análisis de los inmunosueros de conejos.....	110
B.2. Análisis de los inmunosueros de machos cabríos.....	115

IV.C. PURIFICACION DE LOS INMUNOSUEROS ANTI-CV Y ANTI-CC	
POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD.....	115
C.1. PURIFICACION DEL INMUNOSUERO ANTI-CV	
DE CONEJOS.....	116
C.2. PURIFICACION DEL INMUNOSUERO ANTI-CV	
DE MACHOS CABRIOS.....	116
2.1. Precipitación de las inmunoglobulinas con	
sulfato amónico.....	118
2.2. Purificación por tres columnas.....	119
C.3. PURIFICACION DEL INMUNOSUERO ANTI-CC	
DE CONEJOS.....	121
3.1. Purificación por una columna.....	121
3.2. Precipitación de las inmunoglobulinas con	
sulfato amónico.....	122
3.3. Purificación por tres columnas.....	122
IV.D. DETECCION DE LECHE DE VACA EN LA LECHE FRESCA	
Y EN LOS QUESOS MADURADOS DE OVEJA POR	
TECNICAS INMUNOENZIMATICAS (ELISA).....	123
D.1. Detección de leche de vaca en la leche fresca	
de oveja por la técnica del ELISA indirecto.....	123
D.2. Detección de leche de vaca en los quesos madurados	
de oveja por la técnica del ELISA indirecto.....	128
D.3. Detección de leche de vaca en la leche fresca	
de oveja por la técnica del ELISA sandwich.....	131
D.4. Detección de leche de vaca en los quesos madurados	
de oveja por la técnica del ELISA sandwich.....	139
IV.E. DETECCION DE LECHE DE VACA EN LA LECHE FRESCA	

Y EN LOS QUESOS MADURADOS DE CABRA, POR TECNICAS INMUNOENZIMATICAS (ELISA).....	143
E.1. Detección de leche de vaca en la leche fresca de cabra por la técnica del ELISA indirecto.....	143
E.2. Detección de leche de vaca en los quesos madurados de cabra por la técnica del ELISA Indirecto.....	144
E.3. Detección de leche de vaca en la leche fresca de cabra por la técnica del ELISA sandwich.....	147
E.4. Detección de leche de vaca en los quesos madurados de cabra por la técnica del ELISA sandwich.....	148
IV.F. DETECCION DE LECHE DE CABRA EN LA LECHE FRESCA Y EN LOS QUESOS MADURADOS DE OVEJA POR TECNICAS INMUNOENZIMATICAS (ELISA).....	151
F.1. Detección de leche de cabra en la leche fresca de oveja por la técnica del ELISA indirecto.....	151
F.2. Detección de leche de cabra en los quesos madurados de oveja por la técnica del ELISA indirecto.....	153
F.3. Detección de leche de cabra en la leche fresca de oveja por la técnica del ELISA sandwich.....	158
F.4. Detección de leche de cabra en los quesos madurados de oveja por la técnica del ELISA sandwich.....	162
IV.G. INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO TERMICO EN LA DETECCION, MEDIANTE TECNICAS INMUNOENZIMATICAS (ELISA), DE LECHES DE VACA Y CABRA EN LAS FRESCAS DE CABRA Y OVEJA.....	165
G.1. Tratamientos térmicos aplicados.....	165
G.2. Influencia de los tratamientos térmicos en la	

detección de leche de vaca en la de oveja, mediante un ELISA indirecto.....	167
G.3. Influencia de los tratamientos térmicos en la detección de leche de vaca en la de oveja, mediante un ELISA sandwich.....	169
G.4. Influencia de los tratamientos térmicos en la detección de leche de vaca en la de cabra mediante un ELISA indirecto.....	169
G.5. Influencia de los tratamientos térmicos en la detección de leche de vaca en la de cabra, mediante un ELISA sandwich.....	171
G.6. Influencia de los tratamientos térmicos en la detección de leche de cabra en la de oveja, mediante un ELISA Indirecto.....	171
G.7. Influencia de los tratamientos térmicos en la detección de leche de cabra en la de oveja, mediante un ELISA sandwich.....	173
<b>V. DISCUSION.....</b>	<b>175</b>
V.A. OBTENCION DE LOS INMUNOSUEROS.....	176
A.1. Extractos antigénicos.....	176
A.2. Análisis por inmunodifusión en geles de agarosa, de los inmunosueros anti-CV y anti-CC.....	177
A.3. Purificación por cromatografía de afinidad, de los inmunosueros anti-CV y anti-CC.....	178
A.4. Conjugación de los anticuerpos purificados a la biotina.....	181

V.B. DETECCION Y CUANTIFICACION DE LA LECHE DE VACA EN LA FRESCA Y EN LOS QUESOS MADURADOS DE OVEJA Y DE CABRA.....	182
B.1. Detección de leche de vaca por un ELISA indirecto.....	182
B.2. Detección de leche de vaca por un ELISA sandwich.....	184
B.3. Comparación de los resultados obtenidos en este trabajo con los de otros investigadores.....	186
V.C. DETECCION Y CUANTIFICACION DE LA LECHE DE CABRA EN LA FRESCA Y EN LOS QUESOS MADURADOS DE OVEJA.....	193
C.1. Detección de leche de cabra por un ELISA indirecto.....	193
C.2. Detección de leche de cabra por un ELISA sandwich.....	194
C.3. Evaluación de los resultados de este trabajo frente a los de otras técnicas.....	196
V.D. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS TERMICOS DE LA LECHE EN LA DETECCION Y CUANTIFICACION DE LECHE DE VACA Y CABRA EN MEZCLAS LACTEAS EXPERIMENTALES, MEDIANTE LAS TECNICAS INMUNOENZIMATICAS (ELISA) DESARROLLADAS EN ESTE TRABAJO.....	198
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>201</b>
<b>VII. TRABAJO FUTURO.....</b>	<b>204</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>208</b>

CAPITULO I

EXPOSICION GENERAL DEL PROBLEMA  
A INVESTIGAR

La diversidad de climas y la compleja y variada orografía del territorio español, unido a la diversidad cultural, a una cabaña ganadera rica en razas lecheras autóctonas y a una extensa tradición quesera, constituyen las bases en las que se asienta una amplia producción de quesos, aunque muy pocos poseen una producción y comercialización apreciables. A medida que la cabaña bovina se ha especializado y se han implantado medidas de mejora genética en el ganado ovino y caprino, la producción y el consumo de leche y, paralelamente, el de queso, han aumentado. Este fenómeno es aún más patente desde nuestro ingreso en la Comunidad Europea, lo que ha originado una diversificación de la oferta de derivados lácteos en el mercado, debido no solamente al incremento de quesos importados sino, también, a la irrupción de variedades queseras españolas cuyo consumo se circunscribía a los mercados regionales o locales.

Ante esta situación, las industrias queseras españolas necesitan potenciar la calidad de sus productos para competir mejor tanto en el mercado interior como en los exteriores. En este sentido es de destacar la labor realizada en los últimos años por la Administración, ocupándose de potenciar los productos con "Denominaciones de Origen" y "Denominaciones Genéricas de Calidad". Así, poseen ya denominación de origen los quesos como el Manchego, Roncal o Idiazabal, elaborados con leche de oveja; Mahón y Cantabria, con leche de vaca, y Cabrales, que contiene leche de vaca, oveja y cabra, mientras que entre los que poseen denominación genérica puede citarse al de Liébana, elaborado con leche de vaca, oveja y cabra, ampliándose cada año la lista de quesos acogidos a estas denominaciones, que en 1989 sólo representaban un 3,6 % de la producción total (MAPA).

Además de los quesos acogidos a denominaciones específicas, en los que la leche procede de explotaciones inscritas en su correspondiente Consejo

Regulador, no debe olvidarse que la mayor parte de los quesos consumidos en España son elaborados con mezclas de leche de vaca, oveja y cabra. Así, de las más de 170.000 Tm de quesos producidos en 1989, el 56,6 % procedían de leche de vaca y sus mezclas y el 24,8 % de leche de oveja y de su mezcla con la de cabra (MAPA).

Asimismo, la Norma de calidad para quesos y quesos fundidos (BOE núm. 292 del 6 de diciembre de 1985), señala en su apartado 12.1 que en el etiquetado de los quesos deberá señalarse: "El nombre de la especie o especies animales de las que procede la leche empleada por orden decreciente de proporciones" y, que "En los registros oficiales correspondientes deberá declararse el porcentaje de los distintos tipos de leche utilizados en la fabricación de los diferentes tipos de quesos".

Considerando lo expuesto en el párrafo precedente, así como que el precio de la leche de vaca es inferior al de las leches de oveja y cabra, se hace tentadora la utilización de la primera en mayor cantidad de la declarada, así como su incorporación fraudulenta en la fabricación de quesos elaborados exclusivamente con leche de oveja o cabra. Por ello, sería de un gran interés económico y comercial el disponer de métodos analíticos eficaces que permitan detectar y cuantificar las leches de diferentes especies, tanto en la leche natural como en los productos derivados. De esta manera, podría detectarse el fraude antes de la fabricación del queso, y a la vez controlar la calidad del producto elaborado.

Para establecer la procedencia animal de una leche en mezclas lácteas y en quesos se han utilizado métodos cromatográficos, electroforéticos e inmunológicos. Los métodos cromatográficos se basan, por lo general, en la determinación y cuantificación de los ácidos grasos así como de una serie de

relaciones entre los mismos (Iverson y Sheppard, 1989). Los métodos electroforéticos se basan en la determinación de la movilidad de las caseínas o de las proteínas del suero en geles de poliacrilamida (Ramos y col., 1980; Ruiz y Santillana, 1986; Amigo y col., 1987; Addeo y col., 1989). Entre los métodos inmunológicos utilizados conviene señalar los de inmunodifusión radial (Levieux, 1977), inhibición de la hemaglutinación (Levieux, 1980), inmunoelectroforesis (Radford y col., 1981; Bernhauer y col., 1983; Elbertzhagen, 1987), e inmunodotting (Aranda y col., 1988). De los métodos analíticos desarrollados, los reconocidos como métodos oficiales de análisis de la leche y productos lácteos son los de la electroforesis de las caseínas o de las proteínas del suero en geles de poliacrilamida y el de la inmunodifusión radial (BOE núm. 260 del 30 de Octubre de 1991). El inconveniente de las técnicas citadas es que requieren materiales y equipos relativamente costosos, el realizarlas requiere mucho tiempo o una gran cantidad de anticuerpo purificado y la mayoría son sólo cualitativas o semicuantitativas.

En los últimos años el desarrollo de métodos inmunológicos basados en la conjugación de marcadores sensibles (isótopos, enzimas, etc.) a los anticuerpos, entre los que se incluyen los inmunoenzimáticos (ELISA), permiten alcanzar niveles elevados de sensibilidad y especificidad, constituyendo una alternativa interesante a otras técnicas químicas convencionales en el análisis de alimentos. Las ventajas más sobresalientes de los métodos inmunoenzimáticos son: a) su elevada sensibilidad, debido al empleo de marcadores que potencian la capacidad de detección, b) su elevada selectividad dada la especificidad de las reacciones que se llevan a cabo (antígeno-anticuerpo), c) la posibilidad de automatización del método, lo que permite analizar un número elevado de muestras en poco tiempo y d) el pequeño coste del material instrumental utilizado en comparación con el de otras técnicas.

En nuestro Departamento se posee ya una amplia experiencia en la diferenciación de carne de distintas especies animales en mezclas cárnicas frescas utilizando técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) (Martín y col., 1986, 1988a, 1988b, 1988c) y, recientemente, se ha desarrollado un método ELISA indirecto y sandwich que permite la detección de leche de vaca en la de oveja (García y col., 1990, 1991), utilizando anticuerpos policlonales frente a las proteínas del suero de la leche de vaca. Las limitaciones del método citado son las de su ineficacia cuando se utilizan leches tratadas térmicamente, debido a la inestabilidad térmica de las proteínas séricas, así como cuando se utilizan muestras de quesos madurados, pues durante su fabricación se eliminan la mayor parte de las proteínas del suero, permaneciendo sólo cantidades vestigiales de las mismas en el producto final.

Es por ello que se ha considerado conveniente obtener los reactivos inmunológicos y desarrollar las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) apropiadas, para detectar y cuantificar la presencia de leche de vaca en la leche fresca y en los quesos madurados de oveja y cabra, así como la presencia de leche de cabra en la leche fresca y en los quesos madurados de oveja. Para ello se han obtenido anticuerpos policlonales frente a las caseínas de la leche de las especies animales de interés, ya que al ser las caseínas proteínas térmicamente estables y, a su vez, componentes mayoritarios del queso, la técnica desarrollada puede emplearse tanto en la determinación de adulteración en las leches frescas como en las calentadas, así como en los correspondientes quesos madurados.

No obstante, para alcanzar los objetivos descritos es necesario desarrollar los siguientes objetivos parciales:

1. La obtención y aislamiento de las caseínas de la leche de las especies

animales sometidas a análisis (vaca y cabra).

2. La inmunización de animales de experimentación con los extractos antigénicos citados.
3. El análisis, mediante inmunodifusión en geles de agarosa, de los inmunosueros obtenidos, para comprobar si éstos reconocen a caseínas de la leche de especies animales distintas de aquella frente a la que se obtuvieron.
4. La obtención de anticuerpos especie-específicos de los inmunosueros procedentes de la fase anterior, mediante su neutralización con caseínas liofilizadas de aquellas especies animales con las que dan reacciones cruzadas, o bien sometiéndolas a cromatografía de afinidad por columnas de Sepharosa 4B-CNBr ligadas a caseínas liofilizadas de cada especie animal.
5. Finalmente, los inmunosueros neutralizados o purificados se emplearán, utilizando diversas técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) para detectar y cuantificar la presencia de leche de vaca en mezclas lácteas frescas y en quesos madurados de oveja y de cabra, así como para poner de manifiesto la presencia de leche de cabra en mezclas lácteas frescas y en quesos madurados de oveja. Finalmente se estudiará la influencia de diversos tratamientos térmicos industriales de la leche en la detección de las caseínas en mezclas lácteas.

## CAPITULO II

### **INTRODUCCION**

La leche y el queso son dos productos alimenticios de gran valor nutritivo. En el caso de la leche, baste señalar que constituye el único alimento ingerido durante la lactancia; además es un complemento indispensable en la alimentación de los jóvenes debido a su digestibilidad y a su contenido energético y de proteínas y minerales. Del valor nutritivo del queso basta decir que para elaborar un kilogramo de producto se requieren de 4 a 5 litros de leche de oveja y de 8 a 10 litros de leche de vaca o cabra. El valor biológico de sus proteínas, su contenido en minerales y en aminoácidos esenciales, así como su gran digestibilidad, lo convierten en el alimento apto para todas las edades.

Del total de la leche de vaca producida en España, más del 80% se destina al consumo humano como leche líquida, mientras el resto se destina a la elaboración de derivados lácteos, entre los que se incluye el queso. Por el contrario, las leches de cabra y oveja se utilizan esencialmente en la fabricación de quesos. En España se producen muchos tipos de quesos debido a las diferencias de sus regiones y a los aspectos geográficos, climáticos, agronómicos, históricos y culturales. Tanto el origen como la composición de la leche influyen en las características del queso obtenido. Así, la leche de cabra origina un queso de un aroma más manifiesto y picante que el procedente de leche de vaca, debido principalmente a que su grasa presenta un mayor contenido de los ácidos caproico ( $C_6$ ), caprílico ( $C_8$ ) y cáprico ( $C_{10}$ ). Por otro lado, su escaso contenido en  $\beta$ -caroteno origina unos quesos más blancos que los de la leche de vaca. La leche de cabra posee un color blanco mate, olor fresco característico y sabor neutro, aunque tras su conservación en refrigeración adquiere un sabor especial (Le Mens, 1985).

La leche de oveja posee un color blanco nacarado como la porcelana, un olor característico y una viscosidad más elevada que la de la leche de vaca. Debido a su mayor riqueza en componentes queseros (véase pag. 23), produce un coágulo más firme y un mayor rendimiento en la fabricación de quesos (Assenat, 1985). Los quesos elaborados con leche de oveja poseen un aroma característico, ya que contiene seis veces más ácido caprílico que la de vaca y dos veces más que la de cabra, mientras que su contenido en ácido cáprico es la mitad que el de la leche de cabra. Al igual que la leche de cabra, presenta un escaso contenido de  $\beta$ -caroteno, por lo que los quesos son más blancos que los de vaca.

La leche de vaca posee un contenido variable de  $\beta$ -caroteno, que fluctúa con la época del año, raza y alimentación, por lo que el color natural de los quesos resultantes varía desde el pajizo al amarillo manzanilla (Kosikowski, 1985).

En las páginas que siguen se estudian, de forma resumida la composición química y características de la leche y del queso, incidiendo más en las propiedades de las caseínas, por ser las proteínas de mayor interés en este trabajo.

## **II.A. COMPOSICION QUIMICA DE LA LECHE**

Según el Reglamento de Centrales lecheras y otras industrias lácteas (BOE, núm. 240 del 7 de Octubre de 1966) y el Código Alimentario Español vigente, la leche se define como: "El producto íntegro, no alterado ni adulterado y sin calostros, procedente del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de las hembras mamíferas domésticas sanas y bien alimentadas". También se señala que esta denominación se refiere exclusivamente a la leche de vaca; para designar las leches producidas por hembras de otros animales se indicará el nombre de la especie correspondiente.

La composición de la leche determina su calidad nutritiva, su valor como materia prima para la obtención de derivados lácteos y muchas de sus propiedades. En la tabla II.1 se muestran los porcentajes aproximados de los principales componentes de la leche. La leche es un líquido complejo en el que sus componentes se encuentran en diferentes estados físicos. Así, la grasa, constituida fundamentalmente por triglicéridos, se encuentra emulsionada y, las proteínas, entre las que destacan las caseínas, están en forma de suspensión coloidal, mientras que los azúcares, principalmente la lactosa, muchas sales, las vitaminas hidrosolubles y las sustancias nitrogenadas no proteicas están en solución. El agua es el componente mayoritario y actúa como solvente y medio de dispersión. La grasa emulsionada y las proteínas coloidales dispersan la luz incidente y proporcionan a la leche su color blanco característico.

Las sustancias citadas se encuentran en la leche en proporciones variables, dependiendo de la raza, estado fisiológico del animal y factores ambientales, si bien se considera que la composición y propiedades de la leche son cualitativamente constantes.

---

**TABLA II.1. Composición aproximada de la leche**

---

Componente	Contenido medio (g/Kg)
Agua	860
Lactosa	46
Proteína total	33
Grasa	
- triglicéridos	38
- fosfolípidos	0,3
Minerales	
- Ca	1,3
- P	0,9
- Na	0,4
- K	1,5

---

Fuente: Walstra y Jenness (1987)

## II.A.1. PROTEINAS

La leche de vaca contiene 30-35 g/l de proteínas, de las que aproximadamente el 80% son caseínas (24-28 g/l), proteínas que forman complejos esféricos con sustancias inorgánicas, conocidos como micelas. Casi toda la caseína de la leche está en las micelas y su principal característica es que precipita a un pH de 4,6. Bajo el nombre de caseínas se incluyen cuatro tipos de cadenas polipeptídicas,  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ , además de algunos derivados polipeptídicos procedentes de la proteólisis de estas cadenas. Las proteínas que permanecen en solución a pH 4,6 (5-7 g/kg) se denominan proteínas del suero, entre las que se incluyen  $\alpha$ -lactalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina, albúmina sérica bovina, inmunoglobulinas y péptidos de bajo peso molecular, procedentes de la hidrólisis de algunas caseínas a los que se denomina fracción proteosa-peptona. En la leche hay otras proteínas como los enzimas y otras menores que se encuentran en el suero lácteo, y también en la membrana de los glóbulos grasos. La tabla II.2 recoge la concentración aproximada de las proteínas mayoritarias de la leche.

### II.A.1.1. Caseínas

La obtención de las caseínas de la leche se consigue por precipitación isoeléctrica de las mismas a pH 4,6. Pero la separación de una mezcla de caseínas en sus componentes moleculares necesita de procedimientos más complejos, como la electroforesis en geles de poliacrilamida o, mejor, por cromatografía de intercambio iónico. Para disminuir las interacciones entre las distintas moléculas de caseína se utiliza la urea y los compuestos que rebajan los enlaces disulfuro.

---

**TABLA II.2. Concentración de las proteínas de la leche**


---

	Concentración en la leche (g/kg)	Porcentaje de la proteína total (p/p)
Proteína total	33	100
Caseína total	26	79,5
Proteínas del suero	6,3	19,3
Proteínas de la membrana del glóbulo graso	0,4	1,2
Caseína $\alpha_{S1}$	10	30,6
Caseína $\alpha_{S2}$	2,6	8,0
Caseína $\beta$	9,3	28,4
Caseína $\gamma$	0,8	2,4
Caseína $\kappa$	3,3	10,1
$\alpha$ -Lactalbúmina	1,2	3,7
$\beta$ -Lactoglobulina	3,2	9,8
Seroalbúmina sanguínea	0,4	1,2
Inmunoglobulinas	0,7	2,1
Varias	0,8	2,4

---

Fuente: Walstra y Jennes, 1987.

Las caseínas no poseen una estructura secundaria muy organizada, observándose solamente estructuras de  $\alpha$ -hélice y láminas  $\beta$  de pequeña longitud. El gran número y la distribución uniforme de los restos de prolina evitan una conformación secundaria empaquetada densa y ordenada, por lo que su conformación se parece mucho a la de las proteínas globulares desnaturalizadas. Los cuatro tipos de caseínas difieren en la distribución de la carga y en la tendencia a agregarse en ausencia o en presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Todas las caseínas muestran polimorfismo genético, debido a pequeñas diferencias en los aminoácidos de su secuencia, mientras que algunas caseínas presentan variantes no genéticas, debido a diferencias en el número y localización de los grupos fosfato y glucosilo.

### 1. Tipos de caseínas

Los cuatro tipos principales de caseínas son las  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ , cuyas propiedades se indican en la tabla II.3.

#### a) Caseína $\alpha_{s1}$

La cadena polipeptídica de esta proteína consta de 199 restos aminoácidos con una estructura dipolar muy marcada, que se caracteriza por dos regiones predominantemente hidrofóbicas (restos 1-44 y 90-199), y otra zona polar (45-89) muy cargada. Estudios recientes (Swaisgood, 1982) de su estructura han descubierto un cierto número de estructuras  $\beta$  y giros  $\beta$ , que le proporcionan una conformación globular relativamente estable.

Englobados en el término caseína  $\lambda$ , hay una pequeña cantidad de péptidos

---

**TABLA II.3. Propiedades de las caseínas.**


---

Propiedad	Caseínas			
	$\alpha_{S1}$ -B	$\alpha_{S2}$ -A	$\beta$ -A	$\kappa$ -B
Peso molecular	23.614	25.230	23.983	19.023
Restos/molécula				
Aminoácidos	199	207	209	169
Prolina	17	10	35	20
Cisteína	0	2	0	2
-S-S-	0	?	0	?
Fosfato	8	11	5	1
Carbohidrato	0	0	0	+
Hidrofobicidad				
(kJ/res)	4,9	4,7	5,6	5,1
Carga				
% restos/mol	34	36	23	21
carga neta/resto	-0,10	-0,07	-0,06	-0,02
distribución	irregular	irregular	muy irregular	muy irregular
A <sub>280</sub>	10,1	14,0	4,5	10,5

---

Fuente: Walstra y Jennes, 1987.

que proceden de la hidrólisis de la caseína  $\alpha_{S1}$  por la acción de la plasmina, proteasa originaria de la leche. También se ha comprobado que a temperaturas altas, la caseína  $\alpha_{S1}$  es más sensible a la proteólisis por el cuajo que la caseína  $\beta$ , mientras que a temperaturas bajas ocurre lo contrario. Otra propiedad a destacar de la caseína  $\alpha_{S1}$  es que a un pH próximo a 7 liga unos 8 moles de  $\text{Ca}^{2+}$  por mol, y que se agrega y precipita a concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  muy bajas (7mM).

#### b) Caseína $\alpha_{S2}$

Esta caseína posee 207 restos aminoacídicos y una estructura dipolar manifiesta, cuyas cargas negativas se concentran cerca del N terminal y las positivas cerca del C terminal. Es la más hidrofílica de las caseínas y aunque sus propiedades no se han estudiado con tanta profundidad como en las otras caseínas, se sabe que liga fuertemente el  $\text{Ca}^{2+}$  y que es incluso más sensible a la precipitación por  $\text{Ca}^{2+}$  que la caseína  $\alpha_{S1}$ .

#### c) Caseína $\beta$

Su molécula contiene 209 restos aminoacídicos, de naturaleza anfipática, dotados de una cabeza cargada negativamente y una cola neutra, siendo la más hidrofóbica de las caseínas. Una de sus principales características es que su sensibilidad a la proteólisis por el cuajo depende de la temperatura. Liga fuertemente 5 moles de  $\text{Ca}^{2+}$  por mol de caseína.

Las caseínas  $\gamma$  proceden de la rotura de la caseína  $\beta$  en las posiciones 28/29, 105/106 y 107/108 por el enzima plasmina. Los fragmentos más pequeños se detectan en el suero durante la precipitación ácida de las caseínas y forman parte de la fracción del suero llamada proteosa-peptona. Los fragmentos 1-105 y

1-107 se denominaron componentes 5 del suero, el fragmento 1-28 componente 8-rápido y los fragmentos 29-105 y 29-107 componentes 8-lentos, mientras que los fragmentos C terminales 29-209, 106-209 y 108-209 se denominaron caseínas  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  y  $\gamma_3$ , respectivamente.

#### d) Caseína $\kappa$

Esta caseína se diferencia de las otras por su gran sensibilidad a la quimosina, su escasa afinidad por el calcio y por su naturaleza glicoproteica, lo que se traduce en una estructura heterogénea. Al poseer sólo un grupo fosfoserina, en la posición 149, su capacidad de ligar  $\text{Ca}^{2+}$  es menor que la de las otras caseínas. A pH neutro liga 2 moles de  $\text{Ca}^{2+}$  por mol de proteína, pero se diferencia claramente de las otras caseínas por su solubilidad en un amplio rango de concentraciones de iones  $\text{Ca}^{2+}$ .

Su estructura primaria revela la existencia de una región  $\text{NH}_2$  terminal (1-105), de carácter hidrofóbico, y una región  $\text{COOH}$  terminal (106-169), de naturaleza hidrofílica. La fracción glucídica comprende N-acetil-galactosamina, galactosa, y ácido N-acetil-neuramínico, asociados en forma de mallas. La caseína  $\kappa$ , aislada de la leche, comprende una mezcla de polímeros unidos por enlaces disulfuro formando subunidades que poseen de 3 a 8 monómeros. Estas subunidades sufren una transformación posterior a partículas de unos 650.000 daltons, fenómeno que es insensible a la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y a la temperatura.

La caseína  $\kappa$  estabiliza a las caseínas  $\alpha_{s1}$  y  $\beta$  frente a la precipitación por  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta capacidad se pierde cuando la quimosina hidroliza la molécula por el enlace Phe (105)-Met (106), originando un fragmento N-terminal denominado

paracaseína  $\kappa$ , y un fragmento C-terminal llamado caseín-macropéptido. Esta reacción, que conduce a la coagulación de la leche en la fabricación del queso, se estudiará detenidamente más adelante.

## 2. Estructura de la micela de caseína

En la leche sin enfriar casi toda la caseína se encuentra en forma de partículas esféricas, denominadas micelas, de un diámetro de 0,02-0,30  $\mu\text{m}$ , que comprenden de 20 a 150.000 moléculas de caseína. Las micelas de caseína también contienen materia inorgánica, principalmente fosfato cálcico, así como pequeñas cantidades de otras proteínas como los enzimas lipasa y plasmina, y parte de la fracción proteosa-peptona.

Sobre la estructura de la micela se han formulado numerosas hipótesis. El modelo propuesto por Schmidt (1982), se apoya en observaciones efectuadas con el microscopio electrónico en leches privadas de fosfato cálcico coloidal y descalcificadas por diálisis. Según este autor, la micela de caseína estaría formada por subunidades, más o menos esféricas, de naturaleza exclusivamente proteica y de composición variable (tabla II.4), asociadas entre sí mediante elementos minerales (calcio, magnesio y fosfato). La estructura de las submicelas no es uniforme, como se muestra en la figura II.1. Estas subunidades micelares poseerían un interior de naturaleza hidrofóbica, debido a las porciones apolares de las caseínas y una cubierta polar debida de una parte a los residuos fosfoserina de las caseínas  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$  y  $\beta$ , y, de otra, a la cadena COOH terminal de la caseína  $\kappa$ .

Las submicelas se agregan entre sí mediante el fosfato cálcico coloidal que

---

**TABLA II.4. Composición de las micelas de caseína**

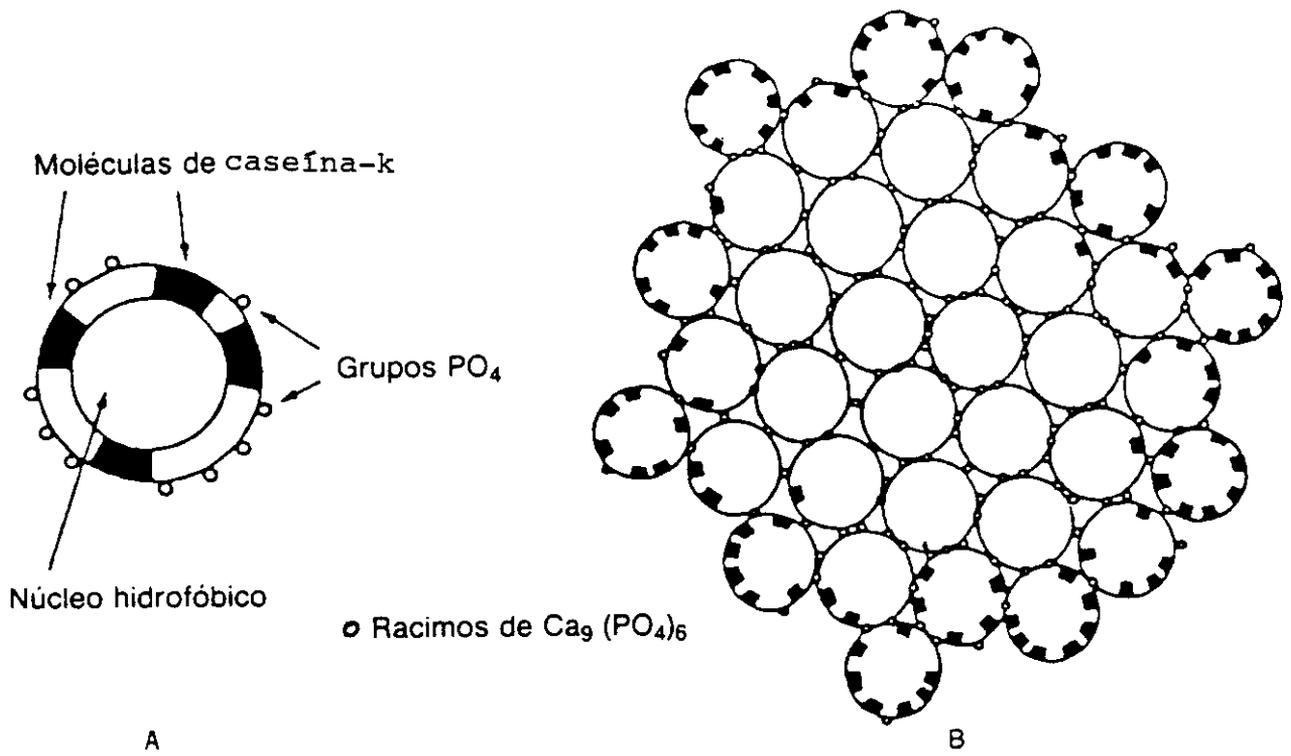

---

Componente	Contenido (g/100 g de micelas)
Caseína $\alpha_{S1}$	35,6
Caseína $\alpha_{S2}$	9,9
Caseína $\beta$	33,6
Caseína $\kappa$	11,9
Caseína $\gamma$ , R, S y TS *	2,3
Caseína total	93,3
Calcio	2,87
Magnesio	0,11
Sodio	0,11
Potasio	0,26
Fosfato inorgánico	2,89
Citrato	0,40
Material inorgánico total	6,6

---

\* procedentes de la degradación de la caseína  $\beta$

Fuente: Schmidt, 1982



A: subunidad micelar

B: micela

Figura II. 1. Estructura de la micela de caseína.

Fuente: Schmidt, 1982

actúa como agente cementante; la presencia de radicales fosfoserina en el exterior de las submicelas favorece esta asociación; los radicales fosfoserina poseen una gran afinidad por el calcio y por el fosfato cálcico. De no existir caseína  $\kappa$ , que actúa como cololde protector, la agregación continuaría hasta la formación de un gel o un precipitado. Este efecto se debe a la porción C-terminal hidrofílica de la caseína  $\kappa$ ; el crecimiento micelar se detiene cuando en la superficie de la micela predominan mayoritariamente las caseínas  $\kappa$ , cuyas zonas polares se protegen en la fase acuosa, creando alrededor una alfombra de un espesor mínimo de 5 nm.

Las submicelas que poseen poca caseína  $\kappa$ , o que carecen de ella, se localizan en el interior de la micela, mientras que las ricas en caseína  $\kappa$  se encuentran en el exterior. Este modelo estructural ofrece una respuesta satisfactoria a las diferencias de tamaño de las micelas, así como a las relaciones entre dimensiones de las micelas, carga mineral y riqueza de caseína  $\kappa$ . En efecto, se ha demostrado que las micelas grandes son más ricas en fosfato cálcico, mientras las pequeñas lo son en caseína  $\kappa$ . Las micelas de caseína son muy estables, aunque entre los factores que influyen en su estabilidad pueden citarse la composición salina, el descenso del pH, los tratamientos térmicos y la deshidratación, factores muy importantes en el proceso de elaboración del queso.

### 3. Diferencias de composición entre las caseínas de las leches de vaca, oveja y cabra

Como se observa en la tabla II.5, el porcentaje de caseína respecto de la proteína total de la leche es muy similar en las tres especies, oscilando entre un 79 y un 83%. No ocurre lo mismo con el contenido de las distintas fracciones

**TABLA II. 5. Contenido de caseínas de las leches de vaca, cabra y oveja.**

Componente	Vaca	Cabra	Oveja
% Caseínas en leche	2,6 <sup>a</sup>	2,3 <sup>c</sup>	4,5 <sup>b</sup>
% Caseínas respecto a proteína total	79,5 <sup>a</sup>	82,7 <sup>c</sup>	82,4 <sup>b</sup>
% Caseínas respecto a caseína total			
$\alpha_s$	45,5 <sup>b</sup>	12,6 <sup>b</sup>	30,2 <sup>b</sup>
$\beta$	33 <sup>b</sup>	75,3 <sup>b</sup>	47,1 <sup>b</sup>
$\gamma$	9,4 <sup>b</sup>	8,1 <sup>b</sup>	7,3 <sup>b</sup>
$\kappa$	6,8 <sup>b</sup>	3,9 <sup>b</sup>	15,4 <sup>b</sup>

Fuentes:

(a) Walstra y Jennes, 1987.

(b) Assenat, 1985.

(c) Le Mens, 1985.

caseínicas, cuyas diferencias han señalado distintos investigadores (Assenat, 1985; Ono y cols., 1989).

La mayoría de los estudios realizados revelan que la leche de cabra tiene un contenido de caseínas  $\alpha_s$  sensiblemente inferior al de las de vaca y oveja, por el contrario, posee una mayor proporción de caseínas  $\beta$ . No obstante, se observan diferencias en los resultados de investigadores distintos, debidas probablemente a variaciones en las condiciones experimentales, en el estado de lactación e, incluso, a factores individuales. Así por ejemplo, Assenat (1985) señala que la leche de cabra posee un 12,6% de caseínas  $\alpha_s$  respecto de la caseína total, mientras que Ono y cols. (1989) dan valores de un 50,5%. Por lo que concierne a la caseína  $\beta$ , según dichos autores los valores son, respectivamente, 75,3% y 43,2% de la caseína total.

De los datos de la tabla II.5 pueden extraerse las siguientes conclusiones:

a) La leche de oveja es más rica en caseínas que las de vaca y cabra. Este hecho explicaría el mayor rendimiento de la leche de oveja en la producción de queso frente al de las leches de vaca o cabra; o lo que es lo mismo, empleando cantidades idénticas de leche de cada una de las tres especies, la mayor cantidad de queso se obtiene con la leche de oveja (Assenat, 1985). Esta circunstancia, en lenguaje común, se expresa diciendo que la leche de oveja es rica en "componentes queseros" y que produce un "coágulo más firme".

b) El porcentaje de caseínas  $\alpha_s$ , respecto de la caseína total, es menor en las leches de cabra y oveja, especialmente en la primera, siendo la leche de vaca

la que posee un mayor contenido de estas caseínas. Debido a que las caseínas  $\alpha_s$  son más sensibles a la proteólisis por el cuajo que la  $\beta$  (Swaisgood, 1982), la baja proporción de estas caseínas en las leches de cabra y oveja, explicaría la casi ausencia de sabores amargos en los quesos madurados elaborados con la leche de estas especies (Assenat, 1985).

c) La leche de cabra presenta un contenido de caseínas  $\beta$  notablemente superior al de las de vaca y oveja, mientras que la de vaca es la que tiene menor proporción de estas caseínas.

d) El contenido de caseínas  $\gamma$ , procedentes de la hidrólisis de la caseínas  $\beta$ , es similar en las tres especies estudiadas, mientras que la proporción de caseínas  $\kappa$ , respecto a la caseína total, es mayor en la leche de oveja, siendo la de cabra la leche más pobre en estas caseínas. Conviene señalar que los contenidos relativos de las distintas fracciones caseínicas están muy influenciados por factores individuales y raciales y también por la fase de lactación de las hembras. Davies y Law (1977) han observado que, en las vacas de la raza Ayrshire, las concentraciones mínimas de caseína  $\beta$  se encontraban frecuentemente en las fases inicial y final de la lactación, mientras sucedía lo contrario con el contenido de caseínas  $\kappa$  y  $\gamma$ . Respecto de la caseína  $\alpha_{s1}$ , sus valores relativos apenas varían por el estado de lactación, mientras que las concentraciones de caseína  $\alpha_{s2}$  tendían a ser mayores al comienzo de la lactación. Los mismos autores han comprobado que al aumentar la edad del animal y el número de lactaciones el contenido de caseínas  $\beta$  disminuye, mientras aumenta la concentración de caseínas  $\kappa$  y  $\gamma$ .

Una vez establecidas las características generales de las caseínas de la leche, conviene establecer las diferencias más significativas entre las caseínas de la leche de vaca, oveja y cabra.

a) Caseína  $\alpha_{S1}$

Las caseínas  $\alpha_{S1}$  de la leche de vaca se han estudiado en profundidad, conociéndose la existencia de cinco variantes, designadas con letras mayúsculas (A, B, C, D y E), debidas a polimorfismos genéticos; y otras dos que dependen de su nivel de fosforilación. Por el contrario, se dispone de pocos datos sobre las caseínas  $\alpha_{S1}$  de otras especies animales (Jennes, 1982).

Las caseínas  $\alpha_S$  de la leche de cabra se encuentran en menor proporción que las de la vaca, y de sus dos componentes, la  $\alpha_{S1}$  abunda menos que la  $\alpha_{S2}$ . El componente mayoritario está más relacionado con la caseína  $\alpha_{S2}$  bovina que con la  $\alpha_{S1}$ , si bien las proporciones de caseínas  $\alpha_{S1}$  y  $\alpha_{S2}$  varían significativamente en los animales considerados individualmente.

En la leche de oveja se han detectado varios componentes de caseína  $\alpha_S$ , de los que algunos podrían ser variantes genéticas. Los componentes hasta ahora descritos son tres, y se han denominado  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$  y  $\alpha_{S3}$ ; el primero se encuentra en menor proporción que los otros dos. El componente  $\alpha_{S2}$  presenta 11 residuos aminoacídicos diferentes respecto a la variante genética  $\alpha_{S1}$ -B bovina; mientras que el componente  $\alpha_{S3}$  presenta 12 residuos diferentes si se compara con la

misma variante (Jennes, 1982).

Aschaffenburg y Dance (1968) observaron que la caseína  $\alpha_{S1}$  de vaca presentaba una mayor movilidad electroforética que las de cabra y oveja, cuyos índices de migración son similares. Basándose en la movilidad electroforética de la caseína  $\alpha_{S1}$  de cabra en geles de poliacrilamida-agarosa, Addeo y Mauriello (1988) clasificaron a la leche de esta especie en cuatro grupos. Los tres primeros se denominaron  $\alpha_{S1}$ -rápido,  $\alpha_{S1}$ -lento y  $\alpha_{S1}$ -rápido-lento; y el cuarto, procedente de animales en los que no se pudo detectar la caseína  $\alpha_{S1}$ , fue denominado  $\alpha_{S1}$ -nada o cero.

Asimismo, cuando los autores citados evaluaron la acción de la quimosina en la caseína  $\alpha_{S1}$  de las leches de vaca y cabra concluyeron que la caseína  $\alpha_{S1}$  bovina es más sensible a la acción de la quimosina que las caseínas  $\alpha_{S2}$  y  $\beta$ , que la caseína  $\alpha_{S1}$  de cabra se hidroliza preferentemente cerca de la región N-terminal (igual que la caseína  $\alpha_{S1}$  de vaca) y que los productos de degradación son iguales en ambas caseínas; tales productos se conocen como péptidos  $\alpha_{S1}$ -1, cuya formación se debe a que el enlace peptídico Phe (23)-Phe (24) de la caseína  $\alpha_{S1}$  bovina, es tan lábil a la quimosina como el enlace Phe (23)-Val (24) de la caseína  $\alpha_{S1}$  caprina.

#### b) Caseína $\alpha_{S2}$

En la leche de vaca estas caseínas se denominan "caseínas  $\alpha_S$  minoritarias",

o también caseínas  $\alpha_{S2}$ ,  $\alpha_{S3}$ ,  $\alpha_{S4}$  y  $\alpha_{S6}$ . Constan de una cadena polipeptídica de 207 aminoácidos con 2 residuos de cisteína y 10, 11, 12 y 13 grupos fosfato, respectivamente. También es frecuente que presenten, al menos, un enlace disulfuro.

Como ya se ha mencionado, en la leche de cabra abundan más las caseínas  $\alpha_{S2}$  que las caseínas  $\alpha_{S1}$ .

### c) Caseínas $\beta$ y $\gamma$

La caseína  $\beta$  de la leche de vaca posee 209 aminoácidos, con 5 residuos de fosfoserina (excepto en una variante) y carece de cisteína. En la cabra y en la oveja hay dos variantes de estas caseínas que se diferencian por su grado de fosforilación; las caseínas  $\beta$  de la leche de cabra poseen la misma cadena polipeptídica, en cambio los dos componentes de la caseína  $\beta$  de la leche de oveja difieren también en su composición de aminoácidos (Jennes, 1982).

Las caseínas  $\gamma$  se originan en la proteólisis de la caseína  $\beta$  que realiza el enzima plasmina. De la leche de oveja también se han aislado proteínas similares a las caseínas  $\gamma$  de la leche de vaca. Algunas caseínas  $\gamma$  de la leche de vaca son termolábiles y menos solubles a 25 °C que a 3 °C. Para detectar la presencia de leche de vaca en el queso de oveja se ha utilizado como indicador la diferente migración exhibida por las caseínas  $\gamma$  bovinas y ovinas, al separarlas por isoelectroenfoque (Krause y col., 1982).

### d) Caseínas $\kappa$

Se conoce ya la secuencia aminoacídica de las caseínas  $\kappa$  de las leches de

vaca, oveja y cabra, así como la de sus respectivas paracaseínas  $\kappa$  (Jennes, 1982). La diferencia de estructura observada entre las paracaseínas  $\kappa$  bovina y ovina la utilizaron Addeo y col.(1984), y otros investigadores (Mauriello y col., 1989; Addeo y col., 1990), para detectar la presencia de leche de vaca en el queso de oveja, mediante el isoelectroenfoco en geles de poliacrilamida. El método se basa en la diferencia de los puntos isoeléctricos de ambas caseínas, debido principalmente a los restos de aminoácidos en las posiciones 19 (Ser en la bovina y Asp en la ovina) y 90 (Ala en la bovina y Asp en la ovina), lo que determina una carga neta positiva en la paracaseína  $\kappa$  bovina, que emigrará hacia el cátodo, y una carga neta negativa en la ovina, que emigra hacia el ánodo. En la tabla II.6 se muestran las diferencias más significativas en estructura primaria de las paracaseínas  $\kappa$  bovina, ovina y caprina.

También se ha demostrado que son mayores las diferencias en la secuencia de caseinomacropéptidos de las leches de vaca, oveja y cabra que entre las paracaseínas  $\kappa$  (tabla II.7), si bien el enlace sensible a la quimosina es el mismo en las tres especies (Phe 105-Met 106).

#### Diferencias entre las micelas de caseína bovina, ovina y caprina

La estructura y composición de las micelas de caseína de la leche de las tres especies las han estudiado muchos investigadores, si bien las conclusiones más significativas se deben a Richardson y col. (1974), quienes demostraron que las diferencias más significativas radicaban en el tamaño y distribución de las submicelas, mientras que el contenido de minerales no presentaba diferencia significativa alguna entre las tres especies.

**TABLA II. 6. Diferencias en la estructura primaria de las paracaseínas  $\kappa$  bovina , ovina y caprina.**

	Aminoácidos en las posiciones nº									
	8	10	19	46	65	73	80	82	90	94
Vaca	Pro	Arg	Ser	Lys	Ala	Ile	Ser	Thr	Ala	Thr
Oveja	Arg	Cys	Asp	Arg	Val	Thr	Pro	Ala	Asp	Ala
Cabra	Pro	Cys	Asp	Arg	Val	Thr	Pro	Thr	Asp	Thr

Fuente: Amigo, 1989.

**TABLA II.7. Diferencias en la secuencia de los caseín macropéptidos de las especies bovina, ovina y caprina.**

	Aminoácidos en las posiciones nº					
	1	2	3	4	5	6
Vaca	45	45	27	29	16	0
Oveja	43	37	0	-	-	-
Cabra	45	38	5	0	-	-

Fuente: Jennes, 1982.

Respecto al tamaño de las micelas, los investigadores citados observaron al microscopio electrónico que las leches de oveja y de cabra presentaban mayor número de micelas pequeñas que la de vaca. Otra característica de la leche de cabra fue la presencia de algunas micelas de gran tamaño, incluso mayores que las bovinas, además estas micelas contenían más material electrodenso que las micelas grandes de la leche de otras especies. Observaron igualmente que todas las micelas se componían de subunidades de un tamaño similar en las tres especies y que cada micela contenía un máximo de 1000 subunidades.

En la tabla II.8 se muestra la concentración de cationes de la leche desnatada, y los contenidos de calcio y fosfato de las micelas y del suero lácteo. Como puede apreciarse las concentraciones de sodio y magnesio de la leche desnatada son parecidas en las tres especies, mientras que los niveles de potasio son mayores en la leche de cabra, y los de calcio en la de oveja. El alto contenido de calcio de la leche de oveja, se debe seguramente a su mayor contenido de caseínas. Asimismo, el contenido de calcio y fosfato inorgánico de los sedimentos de caseína es similar en la leche de las tres especies; por el contrario, su contenido en el suero es mayor en la leche de oveja. Estos valores concuerdan con los de Irlam y col. (1985) para las caseínas de cabra y vaca, estos investigadores también observaron unos contenidos de calcio y fósforo parecidos en las caseínas de ambas especies.

#### II. A. 1. 2. Proteínas del suero

Reciben este nombre un conjunto de sustancias nitrogenadas que no precipitan cuando el pH de la leche se lleva a 4,6, que corresponde con el punto isoelectrico de las caseínas, por ello se les denomina también "proteínas solubles". Representan aproximadamente el 20 % del total de las proteínas de la

**TABLA II. 8. Distribución de algunas sales en la leche desnatada, en las micelas de caseína y en el suero lácteo de las especies bovina, ovina y caprina.**

Componente	Vaca	Oveja	Cabra
<u>Sedimento de caseínas</u>			
(g/100 g de leche desnatada)	3,22	6,09	3,00
<u>Concentración de cationes en la leche desnatada (mM)</u>			
Na	20	11,6-19,4	11,2-13,7
K	39	35,1-39,5	48,1-56,2
Ca	34	45,1-56,3	27,0-30,8
Mg	5	6,0-8,1	3,7-4,5
<u>Contenido de Ca y fosfato inorgánico en las micelas (mmoles/g de sedimento)</u>			
Ca	0,613	0,704	0,726
fosfato	0,300	0,366	0,360
<u>Contenido de Ca y fosfato inorgánico en el suero (mmoles/l de suero)</u>			
Ca	31,7	60,2	34,7
fosfato	23,1	34,8	23,1

Fuente: Richardson y col., 1974.

leche y su principal característica es que tienen estructura globular y que se desnaturalizan por el calor, excepto la fracción proteosa-peptona. Las principales proteínas del suero de la leche son:  $\alpha$ -lactalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina, albúmina sérica bovina, inmunoglobulinas, microglobulina  $\beta_2$ , lactoferrina y transferrina y la fracción proteosa-peptona.

a)  $\alpha$ -Lactalbúmina

Tiene un peso molecular de 14.176 daltones y una cadena de 123 aminoácidos con 4 puentes disulfuro. Se conocen dos variantes genéticas de esta proteína, la A y la B; esta última es la única detectada hasta la fecha en la leche de las razas bovinas europeas. Su secuencia de aminoácidos y su estructura son semejantes a las de la lisozima, ligando fuertemente dos átomos de calcio, cuya eliminación convierte a la  $\alpha$ -lactalbúmina en más sensible a la desnaturalización por el calor.

b)  $\beta$ -Lactoglobulina

Tiene un peso molecular de 18.363 daltones y una cadena de 162 aminoácidos. La posesión de un grupo tiol libre es muy importante en los cambios que ocurren en la leche durante el calentamiento, pues está implicado en las relaciones con otras proteínas, especialmente caseína  $\kappa$  y  $\alpha$ -lactalbúmina. La  $\beta$ -lactoglobulina es un dímero de dos subunidades monoméricas que no están unidas covalentemente.

c) Albúmina sérica bovina

Esta proteína, sintetizada en el hígado, es uno de los componentes mayoritarios del suero sanguíneo y supone aproximadamente el 1,2 % de las proteínas de la leche. Tiene un peso molecular de 66.267 daltones y una cadena de

582 aminoácidos. Se admite que la albúmina sérica aislada de la leche es idéntica a la de la sangre, aunque se desconoce la función específica que desempeña en la glándula mamaria.

d) Inmunoglobulinas

Son las proteínas más termolábiles del suero de la leche, estando constituidas por dos tipos de cadenas polipeptídicas: ligeras (L) y pesadas (H). En la leche y en el calostro de vaca, oveja y cabra, las inmunoglobulinas más abundantes son las de la clase G, especialmente la IgG<sub>1</sub> y la IgG A.

e) Microglobulina B<sub>2</sub>

Esta proteína consta de 100 aminoácidos y posee un peso molecular de 11.800 daltones. Se encuentra en diversos líquidos orgánicos y en las membranas de varios tipos de células.

f) Lactoferrina y transferrina

Son dos proteínas ligantes de hierro ( unos dos moles de hierro por mol de proteína). La lactoferrina no solamente se encuentra en la leche, sino también en las mucosidades lacrimal, bronquial, salival, renal y endométrica y su peso molecular, según diversos investigadores (Walstra y Jennes, 1987), es de 77.000 a 93.000 daltones. La transferrina es una proteína del plasma sanguíneo de un peso molecular de 75.000 a 77.000 daltones. Tanto la una como la otra, son largas cadenas polipeptídicas sencillas de 600-700 aminoácidos.

g) Fracción proteosa-peptona

Electroforéticamente se detectan cuatro componentes principales: el componente 3, que deriva probablemente de la membrana del glóbulo graso y los

componentes 5, 8-rápido y 8-lento, que derivan de la proteólisis enzimática de la caseína  $\beta$ .

#### h) Otras proteínas del suero de la leche

Constituyen un grupo de glucoproteínas ácidas entre las que merece citarse la glucoproteína  $\alpha_1$  ácida, que no se detecta en la leche de vaca, pero sí en la leche y calostro humanos y en el calostro de la leche de vaca. En este grupo también se encuentran otras proteínas interesantes como las ligantes de folatos (FBP<sub>5</sub>).

#### II. A. 1. 3. Otras proteínas.

Son las proteínas de la membrana del glóbulo graso y diversos enzimas. La membrana del glóbulo graso contiene un 50 % de proteína, lo que supone el 1 % de la proteína total de la leche. Algunos componentes son enzimas, pero todavía es difícil estimar la proporción de componentes enzimáticos y no enzimáticos. Las proteínas de la membrana del glóbulo graso son difíciles de establecer y de separar analíticamente, porque interaccionan fuertemente entre sí y con los lípidos.

En la leche se detectan unos 50 enzimas, entre los que predominan la xantín-oxidasa, lactoperoxidasa y ribonucleasa. Se ha comprobado que la actividad del primero es 10 veces superior en la leche de vaca que en la de cabra; esta característica se ha empleado para diferenciar las leches de ambas especies (sección II. C. 1. 1). En cuanto a los otros dos enzimas, si bien su concentración es mayor en la leche de vaca, todavía no se han puesto a punto métodos eficaces que permitan distinguir las leches de vaca, oveja y cabra (Amigo, 1989).

## II. A. 2. LIPIDOS.

La leche contiene aproximadamente un 3,9 % de grasa, variando su cantidad y composición con la alimentación, raza, fase de lactación, etc. Los triglicéridos son los componentes mayoritarios de la grasa de la leche y, por tanto, los principales responsables de sus propiedades. Los diglicéridos suelen encontrarse en forma de 1,2-diglicéridos, mientras los monoglicéridos son predominantemente 2-monoglicéridos. De los ácidos grasos de la leche, merecen destacarse entre los saturados, el ácido mirístico ( $C_{14}$ ), el palmítico ( $C_{16}$ ) y el esteárico ( $C_{18}$ ) y, entre los insaturados, destaca el ácido oleico ( $C_{18:1}$ ), que representa el 30-35 % del total de los ácidos grasos. Es interesante mencionar que la leche de cabra posee casi el doble de proporción de los ácidos caprílico ( $C_8$ ), cáprico ( $C_{10}$ ) y laúrico ( $C_{12}$ ), que la leche de vaca (Le Mens, 1985).

La grasa de la leche se encuentra formando una emulsión constituida por pequeños glóbulos esféricos de diámetro variable, entre 2 y 10  $\mu\text{m}$ , rodeados de una membrana fosfolipídica cuya estructura y composición no están bien definidas. Esta membrana actúa impidiendo que los glóbulos grasos se fusionen y formen una capa continua en la superficie de la leche y protege a la grasa de la acción de los enzimas. La concentración de glóbulos grasos de diámetro inferior a 3  $\mu$  es mayor en la leche de cabra (65 %) que en la de vaca (43 %) (Le Mens, 1985), lo que determina un desnatado más lento en la primera, que en la segunda.

## II. A. 3. CARBOHIDRATOS.

El carbohidrato mayoritario de la leche de casi todas las especies es la lactosa, cuya concentración en la leche de vaca es de unos 45 a 50 g/litro. En las

leches de oveja y cabra el contenido de lactosa es el mismo que en la de vaca. Otros carbohidratos que se encuentran en la leche son la glucosa y galactosa libres, además de oligosacáridos neutros y ácidos, así como glucoproteínas y lípidos con moléculas de carbohidratos.

#### II. A. 4. SALES.

Bajo la denominación de sales se incluyen aquellas sustancias que se encuentran en la leche como iones de bajo peso molecular. Destacan entre los cationes los siguientes: sodio (17-28 mmol/Kg), potasio (31-43 mmol/Kg), calcio (26-32 mmol/Kg) y magnesio (4-6 mmol/Kg) y, entre los aniones: cloruro (22-34 mmol/Kg), fosfato (19-23 mmol/Kg) y citrato (7-11 mmol/Kg),.

La mayor parte de las sales se encuentran en solución en el suero de la leche, otra porción forma parte de las micelas de caseína, en donde están en forma de fosfato cálcico coloidal, y una cantidad pequeña se une a los glóbulos grasos. Las sales son las principales responsables del estado físico-químico de la leche, influyendo en la conformación y estabilidad de las proteínas.

#### II. A. 5. OTROS COMPONENTES.

En la leche hay también muchos otros componentes en concentraciones muy pequeñas, como algunos gases, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres, compuestos azufrados, hormonas, vitaminas y sustancias nitrogenadas no proteicas, siendo estas últimas las más importantes. Los compuestos nitrogenados no proteicos representan, aproximadamente, un 6 % del nitrógeno total (Walstra, 1987), siendo la urea el componente mayoritario; su concentración supera los 100 mg/Kg pudiendo alcanzar los 600 mg/Kg.

## **II.B. CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS QUESOS**

Según la Norma de Calidad para quesos y quesos fundidos destinados al mercado interior (BOE núm. 292 del 6 de Diciembre de 1985), se entiende por queso "el producto fresco o maduro, sólido o semisólido, obtenido por separación del suero después de la coagulación de la leche natural, de la desnatada total o parcialmente, de la nata, del suero de mantequilla o de una mezcla de algunos o de todos estos productos por la acción del cuajo u otros coagulantes apropiados, con o sin hidrólisis previa de la lactosa". Asimismo, se entiende por queso "el conseguido mediante técnicas de elaboración que comprendan la coagulación de la leche y/o materias obtenidas de la leche y que den un producto final que posea las mismas características del producto definido en el párrafo anterior y, siempre que la relación entre la caseína y las proteínas séricas, sea igual o superior a la de la leche".

### **II. B. 1. ELABORACION DEL QUESO**

Con independencia de que la fabricación sea artesanal o industrial, en la elaboración del queso se consideran las siguientes etapas: recepción y tratamiento de la leche, coagulación o cuajado, desuerado, salazón y maduración o afinado.

#### **a) Recepción y tratamiento de la leche**

La leche, sea natural o pasteurizada, debe ser de buena calidad bacteriológica. En España, la pasteurización es obligatoria para quesos con periodos de maduración inferiores a 60 días. La leche destinada a la obtención de quesos no debe sufrir tratamientos térmicos intensos, ya que estos alteran las proteínas y dificultan la coagulación. Antes de la pasteurización la leche se limpia por centrifugación.

Cuando la leche se encuentra entre 28-34 °C, se le añaden los cultivos iniciadores, cuya composición microbiana varía según el tipo de queso. Otras operaciones que sufre la leche durante esta fase son la adición de cloruro cálcico para favorecer su coagulación, la de colorantes autorizados en los quesos que lo requieren, de leche en polvo, si se desea aumentar el extracto seco, etc.

#### b) Coagulación o cuajado

Consiste en la floculación de las micelas de caseína, que forman un gel compacto, al precipitar del líquido de dispersión constituido por el suero. Los mecanismos que intervienen en la formación del coágulo difieren según el método de precipitación de la caseína seguido: por acidificación (coagulación ácida), o por la acción de enzimas coagulantes (coagulación enzimática).

La coagulación ácida se produce por una disminución progresiva del pH de la leche, debido al ácido láctico, originado por la degradación microbiana de la lactosa que llevan a cabo las bacterias lácticas, o bien originada por la adición directa a la leche de un ácido mineral u orgánico. El descenso del pH disminuye la ionización de los radicales ácidos de las caseínas, lo que se traduce en una desmineralización progresiva de las micelas. Al alcanzarse el pH de 4,6, que corresponde al punto isoeléctrico de las caseínas, se produce su precipitación a causa de su profunda desorganización estructural, mientras que el fosfato cálcico micelar permanece disuelto en el lactosuero.

Los factores que más inciden en la coagulación ácida de la leche son la temperatura y la velocidad de acidificación. La temperatura óptima es la de 20 °C, mientras que a temperaturas menores de 5 °C no se produce floculación de las caseínas; la velocidad de acidificación debe ser progresiva si se desea obtener un coágulo liso y homogéneo.

La coagulación enzimática la realizan muchos enzimas proteolíticos, pero el que más frecuentemente se utiliza es el cuajo de rumiantes lactantes (cabritos, terneras y corderos), cuyo principio activo mayoritario es la quimosina. También se conoce como renina o fermento Lab. El mecanismo de coagulación comprende dos fases: la primaria o enzimática y la secundaria o de coagulación. En la fase primaria la quimosina escinde la caseína  $\kappa$  situada en el exterior de las micelas, hidrolizando el enlace Phe (105)-Met (106); el segmento 1-105 resultante se denomina paracaseína  $\kappa$  que permanece en la micela, mientras el segmento 106-169 se denomina caseínamacropéptido, que es soluble en el suero. Como consecuencia de esta ruptura, la caseína  $\kappa$  pierde su capacidad estabilizante frente al calcio, lo que unido a que su repulsión está muy disminuída, permite la formación de enlaces intermicelares durante la fase secundaria. Este proceso de agregación de las micelas no comienza hasta que se ha hidrolizado el 85-90 % de la caseína  $\kappa$ .

La velocidad de floculación de las micelas de caseína se ve afectada por varios factores, entre los que se incluyen concentración de caseína  $\kappa$ , temperatura, pH, y sobre todo concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Las leches que contienen mayor proporción de caseína  $\kappa$  coagulan más lentamente, la temperatura óptima de coagulación es la de 40-42 °C, el pH óptimo 5,5 y la concentración óptima de iones  $\text{Ca}^{2+}$  la de 1,5-2 mM o superior (Walstra y Jennes, 1987).

### c) Desuerado

Se denomina desuerado al conjunto de dos operaciones: la sinéresis y la eliminación del lactosuero. La sinéresis consiste en la contracción del coágulo y la expulsión del lactosuero como consecuencia de la formación de enlaces entre

las micelas de caseína. Este fenómeno es más o menos intenso dependiendo del tipo de coágulo. Un gel láctico o ácido deja escapar rápida y espontáneamente una cantidad importante de lactosuero, pero la contracción de las micelas, es decir, la sinéresis propiamente dicha, es débil o nula. En el gel láctico las micelas de caseína se encuentran desmineralizadas, formando una red de mallas extremadamente finas; en consecuencia la cantidad de agua ligada es elevada, y al someterlo a una acción mecánica se desmorona y desintegra en una multitud de pequeñas partículas.

En el gel enzimático la situación es diferente. Los nudos de la red están constituidos por micelas de fosfoparacaseinato cálcico, proporcionando una mayor rigidez y compacidad debido a su elevada carga mineral. Esta firmeza aumenta con el tiempo debido a la formación de enlaces hidrofóbicos y puentes disulfuro. Por tanto, al principio el gel enzimático es casi impermeable pero con el tiempo expulsa lactosuero con facilidad, lo que se favorece mediante operaciones mecánicas como el cortado o troceado, que aumentan la superficie de exudación.

Para la eliminación del lactosuero se recurre a acciones de tipo mecánico y a la regulación de la temperatura. El desuerado de la cuajada de tipo láctico es difícil, lo que contrasta con la del coágulo enzimático que es más fácil. Los tratamientos mecánicos utilizados en quesería son el troceado, la agitación y el prensado (Weber, 1990). El troceado o cortado tiene la finalidad de aumentar la superficie de exudación del lactosuero, dividiendo la cuajada en granos cuyas dimensiones óptimas varían con cada tipo de queso. La agitación acelera y completa el desuerado renovando la superficie de exudación del suero, mientras que el prensado, aparte de eliminar las últimas porciones de lactosuero, confiere al queso su forma definitiva. La temperatura ejerce una influencia importante y

compleja en el desuerado y, en general, su elevación aumenta la expulsión de suero. Los valores óptimos oscilan entre los 35 y 55 °C, dependiendo del tipo de queso.

#### d) Salazón

El cloruro sódico adicionado a los quesos ejerce una triple función: completa el desuerado al favorecer el drenaje de la fase acuosa, inhibe el desarrollo de microorganismos y aporta al queso un sabor característico. La salazón o salado se realiza en seco o por inmersión en salmuera, siendo este último método el más utilizado por sus ventajas, como son una salazón más regular, menor gasto en mano de obra y una organización más racional del trabajo.

#### e) Maduración o afinado

En sentido estricto, la fabricación del queso termina con el desuerado de la cuajada, aunque son las fases de maduración, afinado o acabado las que confieren a los quesos las características específicas de cada tipo. En los llamados quesos frescos, su fabricación termina tras el desuerado, mientras el resto de los quesos sufren una maduración más o menos pronunciada, destinada a desarrollar su sabor al mismo tiempo que se modifica su aspecto, textura y consistencia.

La maduración de los quesos es un fenómeno bioquímico complejo y, a menudo, mal conocido. En general puede afirmarse que durante la misma se producen tres hechos principales: la fermentación de la lactosa, la hidrólisis de la grasa y la degradación de las proteínas. Los enzimas son muy importantes en la maduración de los quesos y proceden de tres orígenes: enzimas naturales de la leche, enzimas adicionados como coagulantes, y los enzimas de los microorganismos iniciadores (Choisy y col., 1990). Entre los enzimas naturales de la leche merecen citarse una lipasa, que suele encontrarse asociada a las micelas

de caseína y que presenta escasa termorresistencia; proteasas como la plasmina y una proteasa ácida de termorresistencia relativamente alta y otros enzimas, como la fosfatasa alcalina que se destruye a temperaturas de pasterización y la ácida que es muy termoestable.

Los enzimas coagulantes, como el cuajo y sus sustitutos de origen microbiano o vegetal, son endopeptidasas del grupo de las carboxilproteasas que poseen una doble actividad: actúan de forma muy específica sobre la caseína  $\kappa$ , según se ha señalado y, además ejercen una hidrólisis generalizada en las proteínas de la leche. Los enzimas producidos por los microorganismos durante la maduración de los quesos son muy variados. Entre ellos destacan los producidos por: bacterias lácticas, micrococos, levaduras y mohos. Los enzimas lipolíticos son producidos principalmente por levaduras y mohos y, en menor medida, por algunos estafilococos y bacterias psicrotrofas.

Finalmente, en la tabla II.9 se muestran la composición y las características de las variedades de quesos españoles más representativos.

## II. B. 2. COMPORTAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS DE LA LECHE DURANTE LA ELABORACION DEL QUESO

Las distintas fases de elaboración de los quesos, influyen decisivamente en la estructura y conformación de las proteínas de la leche y, en particular, de las caseínas. Pero sin duda, la que presenta una mayor importancia es la coagulación, constituyendo este mecanismo el principio básico de la obtención del queso.

**TABLA II. 9. Composición y características de las principales variedades de quesos españoles.**

Nombre	Especie de Procedencia		Tiempo de Maduración	Características <sup>b</sup>			
	de la Leche <sup>a</sup>	Tipo		ES (%)	MG/ES (%)	pH	CINa (%)
Alicante	C	fresco	-	40	37	-	-
Burgos	V y/o O	fresco	-	46	52	5,94	0,54
Cabrales	V, O, C	madurado	> 3 m	50-58	45-55	-	2-3,5
Cantabria	V	madurado	min 1 sem	52	50	-	-
Castellano	O	madurado	> 3 m	63,8	52,9	5,27	-
Idiazabal	O	madurado	min 2 m	62,5	48,86	5,1-5,5	2
Ibores	C	madurado	min 2 m	62,9	55,9	5-5,7	3-4
Mahón	V	madurado	2 m	57,31	50,9	5,42	-
Málaga	C	fresco	-	42-48	50-54	5,2-5,6	1,9-2,5
Manchego	O	madurado	min 1 m	min 55	min 50	5,1-5,8	max 2,3
Roncal	O	madurado	> 2 m	60,65	53,55	5,3	-
San Simón	V	madurado	min 10 d	54	45	5-5,55	1,3
La Serena	O	madurado	1 m	67,95	53,58	5,41	2,07
Tetilla	V	madurado	min 1 sem	40-60	40-55	5-5,55	1,5-2
Villalón	O y/o V	fresco	-	68,63	53,15	-	2,94
Zamorano	O	madurado	min 6 m	64,49	50,81	5,62	-

(a) V: vaca, O: oveja, C: cabra

(b) ES: extracto seco, MG: materia grasa

Fuente: Catálogo de quesos de España (MAPA, 1990).

## II. B. 2. 1. Durante la coagulación

Como ya se ha indicado hay dos tipos de coagulación de la leche: la ácida y la enzimática. En la coagulación ácida, el descenso del pH origina una disminución de la ionización de los radicales ácidos de las caseínas, lo que provoca una caída del potencial de superficie y en consecuencia, disminuye la capacidad secuestrante de las caseínas  $\alpha_s$  y  $\beta$ , mientras aumenta la hidrosolubilidad de las sales cálcicas. Consecuentemente hay un desplazamiento progresivo del calcio y del fosfato inorgánico, de las micelas hacia la fase acuosa, y una desmineralización de las mismas que es total a pHs menores de 5,0. Dado el papel preponderante del calcio y del fosfato en la estructura micelar, su salida se acompaña de una desintegración de las micelas (Brule y Lenoir, 1990). A valores de pH entre 5,7 y 5,8, las subunidades micelares todavía se mantienen parcialmente asociadas entre sí mediante enlaces fosfocálcicos, mientras que a valores de pH próximos al punto isoeléctrico de las caseínas (4,6) se produce una neutralización de la carga y una disminución importante de la hidratación de las caseínas lo que determina su insolubilización.

La coagulación enzimática se caracteriza porque la quimosina escinde el enlace Phe (105)-Met (106) de la caseína  $\kappa$ , enlace particularmente lábil debido a la naturaleza de los aminoácidos implicados, a la presencia de una serina adyacente y a la de radicales hidrofóbicos. De esta manera, la caseína  $\kappa$  se separa en dos fragmentos desiguales, uno que permanece dentro de la micela y que posee un marcado carácter básico e hidrofóbico y, otro, que es de carácter ácido e hidrófilo, que se separa de la micela pasando al suero.

Las diferencias más significativas entre la coagulación láctica y la

enzimática, estriban en la estructura de ambos geles y en la mineralización de las caseínas, como se señalaba en la sección II. B. 1. b, lo que determina a la vez su consistencia y su capacidad de retención de suero. En el gel láctico, las caseínas se encuentran desmineralizadas y formando una fina red de mallas entre las que se encuentra el lactosuero, que contiene el calcio micelar disuelto. Por el contrario, en el gel enzimático la caseína se encuentra en forma de fosfoparacaseinato de calcio y formando una red tridimensional, cuya rigidez está asegurada por la presencia del fosfato cálcico coloidal, encontrándose el lactosuero retenido en los poros de esta red.

#### II. B. 2. 2. Durante el desuerado

Las proteínas del coágulo retienen una cantidad importante de agua. En el gel enzimático, la capacidad de retención de agua de la paracaseína  $\kappa$  resultante está disminuida, debido a que el caseinmacropéptido contiene una proporción de radicales polares hidrófilos mayor que el resto de las caseínas. Así, la capacidad de sorción de agua de la paracaseína  $\kappa$  es un 10 % inferior a la de la caseína micelar (Hardy, 1990). Por el contrario, en una pasta láctica, la cantidad de agua fijada por las proteínas del coágulo es de 4 a 5 veces mayor que la retenida en una enzimática. También conviene señalar que las caseínas de la cuajada retienen menos agua que las proteínas del lactosuero; por ejemplo, un coágulo anormalmente rico en proteínas de lactosuero desuera lenta y difícilmente. Finalmente, la estructura de las micelas también modifica la intensidad del desuerado. En las leches cuyas micelas de fosfocaseinato cálcico son muy pequeñas, la eliminación del suero es lenta, mientras que cuando las micelas son grandes, es rápida.

### II. B. 2. 3. Durante la maduración

La proteólisis que acaece durante la maduración de los quesos no solamente determina su sabor, sino también su aspecto y textura. Dada la complejidad bioquímica de las sustancias nitrogenadas del queso y la gran variedad de agentes proteolíticos que intervienen en su maduración, es comprensible que sean muchos los productos metabólicos acumulados en los quesos durante la maduración, citaremos entre ellos péptidos, aminoácidos, aminas, amoniaco,  $\text{SH}_2$ , ácidos volátiles, aldehídos, cetonas, etc. Cada tipo de queso posee un espectro de productos degradativos que los expertos se esfuerzan en precisar.

No obstante, la proteólisis de los quesos no siempre es uniforme. Así, en los de pasta firme y dura con predominio de flora láctica, la degradación es uniforme en toda la masa, mientras que en los quesos de pasta blanda, que poseen una microflora superficial abundante, la degradación es más intensa en la superficie que en el interior.

Utilizando técnicas electroforéticas, se ha comprobado que las caseínas más sensibles a la proteólisis son las caseínas  $\alpha_{S1}$ , seguidas de las caseínas  $\beta$  y de sus productos de degradación (caseínas  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  y  $\gamma_3$ ); se han encontrado índices de correlación positivos entre tiempo de maduración y concentración de productos de la degradación de las caseínas  $\alpha_S$  y  $\beta$  (Hassan y El-Deeb, 1988). Esta observación ha sido confirmada mediante técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), observándose un aumento notable de la concentración de caseínas  $\gamma$  entre las dos y las diez semanas de maduración (Christensen y col., 1989).

Los componentes nitrogenados generalmente aumentan durante la maduración de los quesos, tanto en forma de nitrógeno soluble como de nitrógeno no proteico. En este sentido es de destacar la intensa actividad proteolítica detectada en los quesos azules, debido a la acción de los enzimas producidos por mohos del género *Penicillium* (*P. camemberti* y *P. roqueforti*). En la tabla II.10 se muestran los contenidos de nitrógeno soluble, nitrógeno no proteico, tirosina, triptófano y aminoácidos libres de quesos azules de 1, 2 y 3 meses de maduración; como puede observarse estos componentes aumentan mucho durante la maduración (Alonso y col., 1989).

Por lo que se refiere a los quesos de tipo Manchego, destaca el trabajo de Martín-Hernández y col. (1989), quienes estudiaron la evolución de las fracciones nitrogenadas de tres lotes de queso, elaborados con una mezcla de leches de vaca, oveja y cabra, madurados durante 25 días y conservados en refrigeración durante el periodo de comercialización estimado (25 a 90 días). En la tabla II. 11 se muestran los índices de maduración en forma de nitrógeno soluble (NS) y nitrógeno no proteico (NPN) de este queso. Estos resultados indican que se trata de una proteólisis media, en comparación con los valores obtenidos con los quesos azules (tabla II.10).

Las modificaciones experimentadas por las proteínas durante la maduración ejercen una influencia considerable en los caracteres organolépticos del queso como aroma y textura. Se conoce que la consistencia del queso disminuye progresivamente durante su maduración, si bien este proceso depende de tres variables: humedad, pH y degradación de las caseínas  $\alpha_s$ .

**TABLA II. 10. Contenido de nitrógeno soluble, nitrógeno no proteico, tirosina, triptófano y aminoácidos libres de quesos azules madurados durante 1, 2 y 3 meses.**

Componente <sup>a</sup>	Maduración		
	1 mes	2 meses	3 meses
NS (% NT)	43,13	66,56	82,08
NNP (% NT)	8,50	43,14	61,26
Tirosina (% ES)	0,41	1,14	1,52
Triptófano (% ES)	0,14	0,36	0,48
Aminoácidos libres (% ES)	0,50	7,96	8,25

(a) NS: nitrógeno soluble, NNP: nitrógeno no proteico, NT: nitrógeno total, ES: extracto seco.

Fuente: Alonso y col., 1989.

**TABLA II. 11. Índices de maduración de los quesos Manchegos A, B y C, elaborados con una mezcla de leche de vaca, oveja y cabra, después de 25 días de maduración y durante su conservación hasta los 90 días.**

Días	Quesos <sup>a</sup>					
	A		B		C	
	NS(% NT)	NNP(% NT)	NS(% NT)	NNP(% NT)	NS(% NT)	NNP(% NT)
25	14,80	5,55	18,40	7,16	17,91	4,37
45	18,75	5,99	23,91	10,26	23,59	6,73
80	20,16	9,64	27,01	12,33	24,18	8,60
75	22,69	12,5	28,06	13,99	24,94	10,39
90	25,23	12,73	28,73	14,25	25,06	11,58

(a) NS: nitrógeno soluble, NNP: nitrógeno no proteico, NT: nitrógeno total

Fuente: Martín-Hernández y col., 1988.

## **II. C. METODOS PARA IDENTIFICAR EL ORIGEN ESPECIFICO DE LA LECHE EN MEZCLAS LACTEAS Y EN QUESOS FRESCOS Y MADURADOS**

Para garantizar la genuinidad de los quesos elaborados con leche de una sólo especie animal o de varias, es imprescindible disponer de métodos analíticos que detecten y cuantifiquen la posible sustitución de una leche por otra. A pesar de que han sido muchos los trabajos realizados con este fin conviene profundizar en esta línea para disminuir los márgenes de error de tales métodos y también para lograr una mayor sensibilidad y rapidez de los ensayos.

En la revisión de los métodos analíticos utilizados en la diferenciación de mezclas de leche, se ha seguido básicamente el esquema desarrollado por Ramos y Juárez (1984).

### **II. C. 1. METODOS QUIMICOS**

#### **II. C. 1. 1. Determinación de la xantina-oxidasa.**

El método es consecuencia del trabajo de Monget y col. (1979), quienes para detectar la leche de vaca en mezclas de leche y en los quesos frescos de cabra propusieron un test colorimétrico basado en la reacción de la xantina-oxidasa con el azul de tetrazol. El método se basa en que la leche de vaca posee una actividad xantina-oxidasa 10 veces mayor que la de cabra (Jennes, 1982). Las limitaciones de esta técnica son la termosensibilidad del enzima, por lo que el método no es válido en leches pasterizadas a más de 76 °C durante 20 segundos y su hidrólisis durante la maduración de los quesos, por lo que sólo es utilizable en los quesos frescos.

### II. C.1. 2. Indices de la grasa.

Se determinan utilizando técnicas analíticas que permiten evaluar la concentración de determinados ácidos grasos. Los índices de la grasa más utilizados son los de refracción, de Reichert-Meissl (ácidos grasos volátiles solubles), de Polenske (ácidos grasos volátiles insolubles) y de Kirchner. En la tabla II.12 se muestran los valores medios de estos índices con sus fluctuaciones en la grasa de los quesos de vaca, cabra y oveja. No obstante, ninguno de ellos permite detectar sustituciones de una leche por otra menores del 15-20 %, por lo que carecen de utilidad práctica sobre todo en el caso de que se utilice como adulterante leche desnatada.

### II. C. 1. 3. Relación Ca/Mg.

Utilizando la espectrometría de absorción atómica, Pollman (1984) encontró que había algunas diferencias en la relación calcio/magnesio de los quesos elaborados con leche de oveja y vaca, siendo sus valores medios respectivos 17,2 y 23,3. No obstante, el método no está todavía bien normalizado y las diferencias señaladas no son suficientemente significativas para detectar la incorporación a las mezclas de bajos porcentajes de cualquiera de ambas leches.

### II. C. 1. 4. Determinación del $\beta$ -caroteno.

En 1959, Kuzdzal-Savoie desarrolló un método de detección de leche de vaca en la de cabra, basándose en el escasísimo contenido de  $\beta$ -caroteno de la última. Le Mens en 1985 propuso que se aprovechara esta diferencia para detectar la presencia de leche de vaca en los quesos de cabra, puesto que, como se ha dicho,

**TABLA II. 12. Características físico-químicas reglamentadas de la grasa de la leche de vaca, cabra y oveja.**

Indices	Leche de		
	Vaca	Cabra	Oveja
Indice de refracción a 40 °C	1,4540-1,4557	1,4520-1,4545	1,4530-1,4557
Indice de Reichert-Meissl	26-32	21-28	26-32
Indice de Polenske	1-4	5-9	5-8
Indice de Kirchner	19-27	14-21	19-27

Fuente: Norma de calidad para quesos y quesos fundidos destinados al mercado interior (BOE núm. 292 del 6 de Diciembre de 1985).

la concentración de  $\beta$ -caroteno de la leche de cabra es tan pequeña, que su presencia en las mezclas con leche de vaca es difícilmente detectable.

#### II. C. 1. 5. Determinación de la uridina.

Hicks y col. (1985) propusieron que la concentración de este nucleósido en la leche de cabra (30-40  $\mu\text{g/ml}$ ), podría utilizarse como indicador de la autenticidad del producto; también desarrollaron un método para detectar la sustitución fraudulenta de la leche de cabra por la de vaca, basado en que los niveles normales de uridina de la leche de esta última especie no son detectables. Sin embargo, para determinar con mayor precisión el contenido de uridina en las leches frescas y procesadas de ambas especies deben realizarse estudios adicionales.

#### II. C. 2. MÉTODOS CROMATOGRAFICOS.

Las técnicas cromatográficas se han utilizado mucho para estudiar la fracción lipídica y extractos tisulares, incluida la leche, así como las proteínas y aminoácidos de diversos líquidos.

##### II. C. 2. 1. Proteínas y aminoácidos.

Las técnicas cromatográficas no se han empleado mucho en la diferenciación de leches de mezclas lácteas, a pesar de su gran utilidad para la caracterización bioquímica de las proteínas de la leche.

No obstante, la utilización de estas técnicas para estudiar las mezclas lácteas tiene un futuro prometedor, como lo demuestran los trabajos de Kaiser y

Krause (1985), quienes con técnicas HPLC, comprobaron que los cromatogramas de los péptidos tripticos (derivados de la caseína por acción de la tripsina) eran distintos en los quesos de vaca, cabra, oveja y búfala. Así, en el cromatograma de las caseínas del queso de vaca, observaron un pico con un tiempo de retención (tr) de 60 minutos, mientras que en el de cabra el pico más importante tenía un tr de 80 minutos. Al aumentar el porcentaje de leche de vaca en el queso de cabra, se vió que aumentaba el péptido de tr de 60 minutos al mismo tiempo que disminuía el de tr de 80 minutos. Los investigadores citados afirman que con este método se detecta la adición de 1% de leche de vaca en el queso de cabra.

Haasnot y col. (1986) han empleado técnicas de cromatografía líquida rápida (FPLC) con columnas de intercambio iónico aniónicas para detectar la presencia de leche de vaca en las leches y quesos de oveja y cabra; como indicador utilizaron caseína  $\alpha_{S1}$  de leche de vaca. En las mezclas de leche y en los quesos frescos el límite de detección fue de un 2-4 % de leche de vaca, mientras que en los quesos madurados, debido a que la caseína  $\alpha_{S1}$  bovina se degrada rápidamente durante la maduración, debe emplearse como indicador caseína  $\alpha_{S1}$ -I, producto de la descomposición de aquella. En este caso, el límite de detección fue de alrededor del 10 %, dependiendo del grado de maduración.

#### II. C. 2. 2. Detección, caracterización y cuantificación de los ácidos grasos.

Para la determinación de la calidad y genuinidad de la grasa de la leche se han desarrollado técnicas cromatográficas en fase gaseosa. Es interesante destacar las posibilidades que presenta el empleo de columnas capilares, tanto para acortar el tiempo de análisis como para detectar mezclas de leche de vaca, oveja y cabra.

Las diferencias más significativas en la composición de ácidos grasos de la leche de las tres especies citadas, son el mayor contenido de ácidos caprónico ( $C_6$ ), caprílico ( $C_8$ ), cáprico ( $C_{10}$ ) y laúrico ( $C_{12}$ ) en las de cabra y oveja. No obstante, estas diferencias no son significativas debido al amplio margen de variación de las mismas, tanto por factores genéticos como ambientales.

Algunos investigadores han propuesto el estudio de algunas relaciones de ácidos grasos de menor intervalo de variación, para detectar mezclas de leches, tanto en las leches frescas como en los quesos. Smeyers-Verbeke y col. (1977) han realizado un análisis estadístico lineal de los datos cromatográficos procedentes de 15 ácidos grasos, señalando que sólo es posible detectar un 10 % de leche de diferente origen (vaca, oveja o cabra) en mezclas de dos orígenes distintos. Los ácidos grasos cuyas relaciones o índices se investigaron fueron los  $C_{4:0}$ ,  $C_{14:1}$ ,  $C_{16}$ ,  $C_{14}$  y  $C_{10}$ .

Ramos y col. (1977) utilizando la cromatografía en fase gaseosa y basándose en los índices o relaciones entre los ácidos grasos  $C_{15}/C_{14:1}$ ,  $C_{10}/C_{10:1}$ ,  $C_{12}/C_{10}$  y  $C_{14}/C_{10}$ , detectaron hasta un 7 % de leche de vaca en quesos elaborados con mezclas de leche de vaca/oveja. No obstante, si la grasa ha sufrido oxidación sólo pueden utilizarse los dos últimos, puesto que los ácidos de los dos primeros índices pueden encontrarse alterados.

Más recientemente, Iverson y Sheppard (1985 y 1989) han propuesto la utilización de la relación entre los ácidos cáprico y laúrico ( $C_{10}/C_{12}$ ) para detectar la adición de leche de vaca a los quesos de cabra y oveja. Estos autores encontraron unos valores de 1,16, 0,45 y 0,58 en los índices  $C_{10}/C_{12}$  de los

quesos de vaca, cabra y oveja, respectivamente. El límite de detección no bajó del 10 % de sustitución. En 1989 Prager observó que las leches de cabra y oveja podían distinguirse de la de vaca, utilizando los índices de los ácidos grasos  $C_{12}/C_8$ ,  $C_{14}/C_8$ ,  $C_{16}/C_8$ ,  $C_{12}/C_{10}$ ,  $C_{14}/C_{10}$ ,  $C_{16}/C_{10}$  y  $C_{18:1}/C_{10}$ , cuyos valores fueron significativos en la leche de oveja, lo mismo que los índices  $C_{10}/C_8$ ,  $C_{18:1}/C_8$  y  $C_{18}/C_{10}$  en la de cabra; estos índices permitían la detección de la adulteración de los quesos de oveja y cabra con leche de vaca pero Prager (1989) no señala cual fue el nivel de detección.

### II. C. 2. 3. Determinación de triglicéridos.

Aunque por cromatografía en fase gaseosa se han obtenido buenas separaciones de los triglicéridos de la grasa de la leche, la técnica no se ha aplicado a la detección de mezclas de leches. Barron y col. (1990) analizaron los triglicéridos de las leches de vaca, oveja y cabra por HPLC y cromatografía en fase gaseosa. Dichos autores señalaron que, de un total de 116 especies moleculares de triglicéridos con unos números de partición (NP) entre 22 y 50, el grupo principal en las tres especies era el que presentaba un NP de 46, y que las diferencias cuantitativas más significativas se detectaban en aquellos triglicéridos con unos NP de 34, 38, 42 y 48.

### II. C. 3. MÉTODOS ELECTROFORETICOS.

Estos métodos permiten la separación de las diferentes proteínas de una mezcla en diversos tipos de geles, por lo que han utilizado en el estudio de las mezclas lácteas.

### II. C. 3. 1. Electroforesis de las caseínas en geles de poliacrilamida.

En 1967 Assenat, empleando la electroforesis en geles de poliacrilamida, detectó la presencia de un 2 % de leche de vaca en las de cabra y oveja, basándose en la mayor movilidad electroforética de las caseínas  $\alpha_S$  de la primera. Debido a la similitud de las caseínas  $\alpha_S$  ovina y caprina, no es posible la detección de leche de cabra en la de oveja por debajo de un 30 % de adulteración. En el caso de los quesos madurados, el método no se consideró seguro, debido a la degradación de las caseínas durante la maduración, por lo que sólo pudo detectarse dicha adulteración a partir de un 20 % de sustitución.

Basándose también en la movilidad electroforética de la caseína  $\alpha_S$  de vaca, Pierre y Portmann (1970) detectaron un 1,5-2 % de leche de vaca en la de cabra y un 5-10 % en los quesos frescos. Posteriormente, Pierre (1977) estudió los factores que influyen en la precisión de este método, como composición de las caseínas, pasterización, ultrafiltración y acción del cuajo. Dicho investigador concluyó que la variación del contenido de caseína  $\alpha_S$  de la leche de cada animal origina una imprecisión del 26 %, que se reduce a un 10 % en las mezclas de leche. En Francia la electroforesis en geles de poliacrilamida se utiliza como método oficial de análisis de los quesos de cabra (Pierre y Portmann, 1970).

Basándose en la movilidad de la caseína  $\alpha_{S1}$  de vaca en geles de poliacrilamida, Ramos y col. (1977) han descrito la detección de un 5 % de leche de vaca en la de oveja. En los quesos madurados de tipo Manchego, la detección de leche de vaca presenta dificultades debido a la degradación proteolítica de dicha caseína durante la maduración, por lo que sólo era posible un límite de detección

del 10 %. No obstante, se puede detectar dicha adulteración debido a la aparición de caseína  $\alpha_{S1}$ -I, procedente de la degradación de la caseína  $\alpha_{S1}$  durante la maduración de los quesos. Utilizando el mismo método, estos mismos investigadores describieron en 1980 una detección del 2,5 % de leche de vaca en la de cabra y de un 5 % en los quesos frescos de cabra.

Con el método descrito también se puede diferenciar la leche de vaca de la de búfala. Addeo y col. (1981), utilizando la electroforesis en gel de poliacrilamida y la electroforesis en geles mixtos de poliacrilamida-agarosa (ambos en presencia de urea y mercaptoetanol), diferenciaron las caseínas  $\alpha_{S1}$ ,  $\beta$  y  $\kappa$  de las dos especies, obteniendo unos niveles de detección del 5 % de leche de vaca en la de búfala. En 1990 Chianese y col. mejoraron el nivel de detección de leche de vaca en el queso Mozzarella elaborado con leche de búfala, mediante electroforesis bidimensional (combinación de la electroforesis en geles de poliacrilamida con isoelectroenfoque en el mismo gel). De esta manera se consigue una mejor resolución de la caseína  $\alpha_{S1}$  de las dos especies, así como de sus productos de degradación. En estas circunstancias el límite de sensibilidad fue de un 2,5 %.

#### II. C. 3. 2. Electroforesis de las proteínas del suero en geles de poliacrilamida.

Amigo y col. (1986), comparando la movilidad electroforética de la  $\beta$ -lactoglobulina A y B de la leche de vaca frente a la de oveja, detectaron un 5 % de leche de vaca en el queso de oveja. En la cuantificación utilizaron el índice  $\beta$ -lactoglobulina B/albumina sérica bovina; asimismo, observaron que la  $\beta$ -lactoglobulina permanece inalterada durante el proceso de degradación del

queso. Posteriormente, Amigo y col. (1987) mejoraron el límite de detección de la leche de vaca en la de oveja, mediante la utilización de la  $\beta$ -lactoglobulina A como patrón interno.

La diferenciación de las leches de vaca y de búfala con esta técnica es problemática, como demostraron en 1979 Addeo y col. Estos investigadores observaron que las movilidades electroforéticas de la  $\alpha$ -lactalbúmina y de la  $\beta$ -lactoglobulina de la leche de búfala eran idénticas a las de las variantes A y B de la  $\beta$ -lactoglobulina de la leche de vaca.

### II. C. 3. 3. Isoelectroenfoque.

Esta técnica difiere de la electroforesis convencional, en que la separación de las proteínas se produce en un gradiente de pH. Cuando se establece un campo eléctrico, las proteínas migran según su carga eléctrica, pero en un gradiente de pH pierden su carga neta. Cuando la proteína alcanza su punto isoeléctrico (carga neta cero), cesa su migración y precipita. Por lo tanto, en el IEF la separación proteica depende sólo del punto isoeléctrico de las mismas y no de su tamaño y carga.

Utilizando la técnica descrita, Krause y col. (1982) detectaron un 1-2 % de leche de vaca en la leche y queso de oveja y cabra. Dichos investigadores utilizaron como indicador las caseínas  $\gamma$  de la leche de vaca, que presentan un punto isoeléctrico distinto de las de cabra y oveja. Addeo y col. (1989) estudiaron la degradación de la caseína  $\beta$  en caseínas  $\gamma_2$  y  $\gamma_3$  mediante la adición de plasmina a quesos Mozzarella elaborados con mezclas de leche de vaca y búfala. Tras el

tratamiento con plasmina, las caseínas  $\gamma_2$  y  $\gamma_3$  resultantes se detectaron en un intervalo de pH de 5-8, distinguiéndose fácilmente las procedentes de leche de vaca de las de búfala. Con este método se puede detectar hasta un 1 % de leche de vaca en el queso de búfala.

Posteriormente Addeo y col. (1990) utilizaron la misma metodología para detectar la leche de vaca en el queso de oveja, logrando una sensibilidad del 1 %. Como tiempo óptimo de incubación con la plasmina aconsejaron 60 minutos y también recomendaron la utilización de una curva de calibración obtenida con muestras de queso que contenían porcentajes conocidos de leche de las dos especies.

Las diferencias en la secuencia de las paracaseínas  $\kappa$  bovina y ovina determinan diferencias en sus puntos isoeléctricos lo que permitió a Addeo y col. (1984) detectar hasta un 5 % de leche de vaca en el queso Pecorino, utilizando el isoelectroenfoque en un gradiente de pH de 2,5-9. Para verificar la utilidad del método anterior en quesos en los que se produce una intensa proteólisis durante la maduración, Mauriello y col. (1989) estudiaron la migración de las paracaseínas  $\kappa$  bovina y ovina en el queso Roquefort, consiguiendo detectar hasta un 5 % de leche de vaca. No obstante, este método sólo es válido en quesos con un mes de maduración, ya que en los de 4-5 meses debido a la intensa degradación proteica, es imposible detectar la banda correspondiente a la paracaseína  $\kappa$  bovina. Recientemente, Addeo y col. (1990) utilizando la técnica de isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida con un gradiente de pH de 7-10 y tificando las proteínas con una solución de nitrato de plata, en lugar de emplear las tinciones clásicas con azul de Coomassie G-250 ó R-250, han mejorado la sensibilidad de esta técnica que les permite detectar hasta un 0,5 % de leche de

vaca en la leche y queso de oveja.

Finalmente, en la determinación cuali y cuantitativa de mezclas binarias y ternarias de leche de vaca, cabra y oveja, algunos investigadores han utilizado las proteínas séricas como indicadores en el isoelectroenfoco en geles de poliacrilamida con un gradiente de pH de 3,5-9,5 (Ruiz y Santillana, 1986). La preparación de la muestra es más sencilla, ya que las proteínas séricas son solubles y no precisan de una extracción previa, como las caseínas. El límite de detección conseguido fue de un 3 % de leche de vaca o cabra en la de oveja. Rispoli y Saugues (1989) recuperando el suero de quesos fabricados con mezclas de leche de vaca y oveja y analizando las proteínas séricas por IEF en un gradiente de pH de 4-6, detectaron hasta un 5 % de leche de vaca en los quesos de oveja, siempre que el periodo de maduración no fuese superior a los 4 meses.

#### II. C. 4. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS.

Los métodos inmunológicos, que se basan en la visualización objetiva de la interacción entre un antígeno y su correspondiente anticuerpo, son muy interesantes en la identificación y detección de las mezclas de leche de diversas especies animales debido a su sensibilidad y especificidad. A continuación estudiaremos las técnicas inmunológicas, utilizadas o en desarrollo, para la diferenciación de mezclas de leche.

##### II. C. 4. 1. Inmunoprecipitación en medio líquido.

El método fue desarrollado por Pinto (1966) para identificar la presencia de leche de vaca, búfala, cabra y oveja en mezclas lácteas, alcanzando niveles de

detección de un 5 %. Los inmunosueros se obtuvieron de conejos que se inmunizaban con proteínas sanguíneas de cada una de las especies productoras de la leche. Al observarse reacciones cruzadas entre los inmunosueros de una especie con las leches de las demás especies, fue necesario neutralizarlos con las proteínas sanguíneas de las especies con las que daban estas reacciones. La reacción de precipitación tenía lugar en tubos capilares en los que se depositaba la muestra de leche y el inmunosuero. No se observaron diferencias significativas al emplear leche cruda o pasteurizada, pero las leches esterilizadas, en polvo y condensada no inducían la reacción de precipitación.

#### II. C. 4. 2. Inmunodifusión en geles de agarosa.

Aunque existen muchas variantes de esta técnica, conviene considerar la inmunodifusión doble y la radial. En la primera, desarrollada inicialmente por Ouchterlony (1948), el antígeno y el anticuerpo se colocan en pocillos individuales desde los que difunden el uno hacia el otro a través del gel. En caso de correspondencia, se forman complejos antígeno-anticuerpo visualizables al originar bandas de precipitación. En la segunda, desarrollada por Levieux (1977), uno de los reactivos, el antígeno o el anticuerpo, se incorpora directamente al gel, mientras el otro se coloca en un pocillo desde el cual difunde e interacciona con el presente en el gel.

##### a) Inmunodifusión doble.

Durand y col. (1974) han empleado este método para establecer la presencia de leche de vaca en las de cabra y oveja. El inmunosuero se obtiene frente a las proteínas solubles del suero sanguíneo bovino, y se neutraliza con proteínas del suero sanguíneo de cabra o de oveja para evitar reacciones cruzadas. La técnica

consiste en colocar el inmunosuero neutralizado en un pocillo central excavado en el agar y las muestras de leche en pocillos equidistantes. Tras 18-24 horas de incubación de las placas a 37 °C se observan las bandas de precipitación formadas. Así se puede detectar la presencia de hasta un 2,5 % de leche de vaca en las de oveja y cabra. Esta técnica con los reactivos correspondientes se comercializa actualmente con los nombres de "Brebíttest" y "Capritest".

Gombocz y col. (1981) han empleado esta técnica en la detección de leche de vaca en la de oveja, utilizando como anticuerpos los inmunosueros producidos frente a las caseínas de vaca, neutralizados con proteínas de leche de oveja. De esta manera es posible detectar hasta un 5 % de leche de vaca en la de oveja; también se utiliza esta técnica en la detección de leche de vaca en quesos.

En nuestro Departamento, García y col. (1989) han desarrollado un test de identificación de leche de vaca (COMIT) en la de oveja, mediante inmunodifusión en geles de agar. Se trata de una modificación de la técnica de Mageau y col. (1984), empleada en la detección de carne de bóvido en mezclas cárnicas frescas. La diferencia más significativa con las técnicas de inmunodifusión convencionales radica en que los reactivos utilizados en el ensayo (inmunosuero anti-proteínas séricas de leche de vaca y mezclas lácteas de referencia) se distribuyen embebidos en discos de papel de filtro liofilizados al mismo tiempo que los discos que contienen las muestras problema, en la superficie de las placas de agar, lo que permite la difusión de su contenido por el gel. Además los geles poseen un colorante y una concentración adecuada de polietilenglicol, lo que permite una mejor visualización de las líneas de precipitación antígeno-anticuerpo. Mediante esta técnica se puede detectar hasta un 3 % de leche de vaca en la de oveja.

#### b) Inmunodifusión radial.

Esta técnica, desarrollada por Leveux (1977), se ha empleado en la detección de leche de vaca en mezclas lácteas frescas y en quesos madurados. En este caso, los anticuerpos, constituidos por inmunosueros obtenidos de machos cabríos frente a la inmunoglobulina G<sub>1</sub> purificada de calostro de vaca, se incorporan al gel, mientras las muestras de leche se depositan en pocillos practicados en éste. De esta forma se detecta hasta un 1 % de leche de vaca en la de cabra u oveja. Para detectar la presencia de leche de vaca en los quesos madurados deben establecerse correcciones de acuerdo con su extracto seco total. Actualmente la descripción de la técnica y los reactivos correspondientes se comercializan bajo los nombres de CV-test (detección de leche de vaca en la leche y quesos de cabra u oveja) y BC-test (detección de leche de cabra en la leche y quesos de oveja). Han sido varios los investigadores que la han utilizado en la identificación de mezclas lácteas en quesos madurados (Barbosa y Gonçalves, 1985; Amigo y col., 1989).

#### II. C. 4. 3. Inmunoturbidimetría.

El método se basa en medir la turbidez de los complejos antígeno-anticuerpo y presenta dos variantes: espectrometría (medida de la absorbancia de la solución) y nefelometría (medida de la luz dispersa por las partículas). El análisis turbidimétrico permite establecer la capacidad precipitante de distintos inmunosueros.

Ultimamente, el método se ha automatizado con la utilización de analizadores centrífugos. El inmunosero se disuelve en polietilenglicol para acelerar la formación de complejos inmunes; esta misma sustancia se emplea

para preparar las diferentes diluciones de la muestra antigénica a evaluar. La mezcla se somete a centrifugación y, durante la misma, se mide su absorbancia a 290 nm cada 10 segundos.

Gombocz y col. (1981) han utilizado esta técnica en la determinación de caseína bovina en el queso de oveja, así como de gliadina, proteína de soja y ovoalbúmina en diversos alimentos. No obstante, el método no se ha utilizado rutinariamente en la diferenciación de leches de distintas especies.

#### II. C. 4. 4. Inhibición de la hemaaglutinación.

Con esta técnica, Levieux (1980) ha detectado hasta un uno por mil de leche de vaca en la de cabra. El inmunosuero utilizado aglutina los hematíes de gallinas sensibilizadas con inmunoglobulinas  $G_1$  ( $IgG_1$ ) de calostro de vaca. Si el inmunosuero se incuba con una muestra de leche adulterada con leche de vaca, las  $IgG_1$  de esta última neutralizan su actividad, por lo que al añadir los glóbulos rojos sensibilizados no se produce aglutinación.

#### II. C. 4. 5. Inmunoelectroforesis.

La técnica se basa en la distinta movilidad de los reactivos inmunológicos al someterlos a un campo eléctrico (electroforesis) y en la capacidad de los complejos antígeno-anticuerpo de precipitar en los geles (inmunodifusión). De las variantes de esta técnica las más utilizadas son la inmunoelectroforesis en cohete y la inmunoelectroforesis cruzada o de dos dimensiones.

#### a) Inmunoelectroforesis en cohete.

Consiste en la migración electroforética de los antígenos de las muestras en un gel de agarosa que contiene los correspondientes anticuerpos. Los complejos antígeno-anticuerpo se desplazan hasta su punto de equivalencia y las líneas de precipitación convergen dando la imagen de un cohete. Radford y col. (1981), utilizando esta técnica, detectaron un 1-5 % de leche de vaca en la de cabra.

#### b) Inmunoelectroforesis cruzada.

Se trata de una electroforesis de las muestras de la leche en un gel de agarosa, que más tarde se incorpora a otro gel que contiene el inmunosuero, realizando a continuación una segunda electroforesis en sentido perpendicular al de la primera. De esta manera, al migrar los antígenos por el gel que contiene los anticuerpos, se forman los inmunocomplejos precipitables.

Elbertzhagen (1982; 1987) ha utilizado este método en la detección de leche de vaca en quesos de oveja y cabra. Detectó niveles de hasta 0,1-0,2 % de leche de vaca en los quesos de oveja o de cabra. Krause y col. (1988), con la misma técnica y con inmunosueros anti-caseínas de leche de vaca, han detectado 0,1-0,2 % de leche de vaca en la leche y quesos de oveja o cabra. Además, señalan que ni los tratamientos térmicos ni la maduración de los quesos modifican la sensibilidad del método.

#### II. C. 4. 6. Electrosinéresis.

Esta técnica se basa en la electroendósmosis, fenómeno por el que algunas proteínas cargadas negativamente se desplazan hacia el cátodo al someterlas a la

acción de un campo eléctrico. La causa de este efecto es la carga neta negativa del agar de soporte. Puesto que las moléculas de agar están inmovilizadas, el líquido del gel asume una carga positiva y se desplaza hacia el cátodo, afectando a todas las moléculas suspendidas en el gel pero en especial a las inmunoglobulinas gamma. Cuando las proteínas antigénicas de la muestra se han separado por electroforesis, se deposita el inmunosuero en un pocillo longitudinal, practicado en el gel en sentido paralelo a la dirección de la migración. Los componentes antigénicos difunden desde sus lugares de migración encontrándose con el anticuerpo que ha difundido desde el pocillo, formándose complejos antígeno-anticuerpo que precipitan en el gel.

Bernhauer y col. (1983) utilizando este método han detectado un 0,1-1 % de leche de vaca en la de cabra u oveja, y un 0,1-2 % en los quesos. No obstante, la sensibilidad del método varía cuando la leche se somete a tratamientos térmicos mayores que los de pasteurización, y cuando durante la maduración de los quesos se produce una proteólisis intensa.

#### II. C. 4. 7. Métodos inmunoenzimáticos (ELISA).

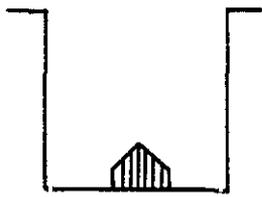
Los métodos inmunoenzimáticos, conocidos como ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays) permiten visualizar objetivamente la formación de los complejos antígeno-anticuerpo, mediante la conjugación de uno de los componentes con un enzima y la inmovilización del otro en un soporte. Los enzimas más utilizados son la peroxidasa de rábano, glucosa oxidasa,  $\beta$ -galactosidasa y fosfatasa alcalina (Voller y col., 1980). En la inmovilización del antígeno o anticuerpo se utilizan placas de nylon, poliestireno, polivinilo o polipropileno. Las variantes más conocidas de esta técnica son el ELISA indirecto, el competitivo y el sandwich.

En el ELISA indirecto (Figura II. 2) los antígenos se inmovilizan en una superficie inerte (1); los anticuerpos específicos reconocen la estructura antigénica de los primeros y se unen a ellos formando un complejo (2) que se detecta mediante un segundo anticuerpo marcado con un enzima o con un conjugado de Proteína A-enzima (3). La reacción se visualiza porque el enzima, al actuar sobre el sustrato, libera un compuesto coloreado (4).

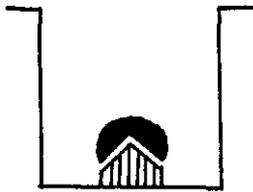
En la técnica del ELISA competitivo (Figura II. 3) el anticuerpo específico se inmoviliza sobre una superficie inerte (1), añadiendo posteriormente un conjugado enzima-antígeno (2a) de concentración conocida mezclado con la muestra problema. Como control se utiliza otro pocillo al que no se le añade la muestra (2b). Después de añadir el sustrato (3a y 3b), la diferencia de color entre ambos pocillos es indicativa de la concentración de antígeno de la muestra problema.

En el ELISA sandwich (Figura II. 4), el anticuerpo específico (Ac de captura) se inmoviliza en una fase sólida (1) a la que posteriormente se le añade el antígeno problema, el cual es capturado por el anticuerpo inmovilizado (2). El antígeno anclado puede ser reconocido por el mismo anticuerpo marcado con un enzima (3) (Ac de detección), o por un anticuerpo frente al primero marcado con un enzima. Finalmente se añade el sustrato (4) y el compuesto coloreado originado como consecuencia de la acción enzimática permite visualizar la reacción.

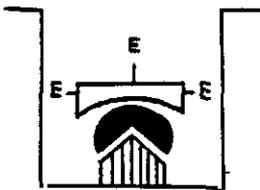
Las técnicas inmunoenzimáticas presentan múltiples ventajas en el análisis de alimentos, debido a su especificidad, sensibilidad y sencillez. Estas metodologías ya han demostrado su eficacia al permitir detectar la presencia de carne de diversas especies animales en mezclas cárnicas frescas (Jones y



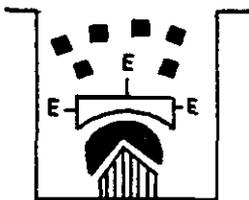
1. Antígeno adsorbido al pocillo



2. Anticuerpos específicos que reconocen al antígeno



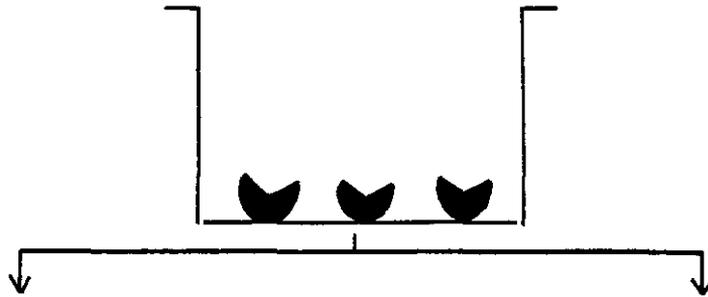
3. Antiinmunoglobulinas o Proteína A, conjugadas a un enzima, que reconocen al complejo antígeno-anticuerpo



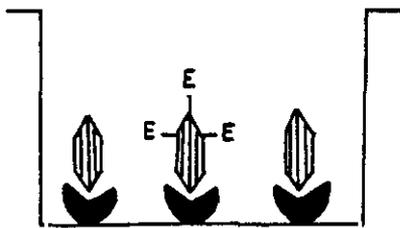
4. Adición del sustrato enzimático

Figura 11. 2. Esquema de la técnica del ELISA indirecto.

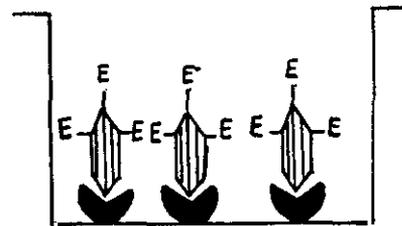
1. Anticuerpo adsorbido al pocillo



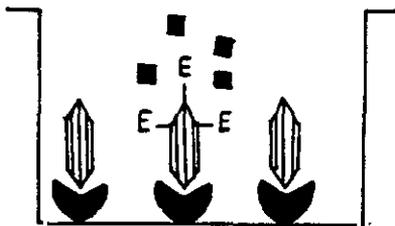
2a. Adición de la mezcla antígeno-enzima con la muestra problema



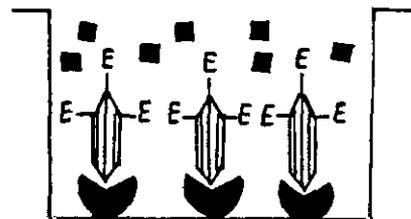
2b. Adición del conjugado antígeno-enzima



3a. Adición del sustrato enzimático

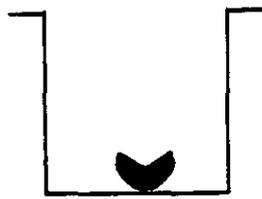


3b. Adición del sustrato enzimático

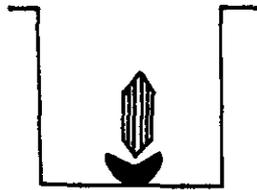


Diferencia entre 3a y 3b = Antígeno desconocido

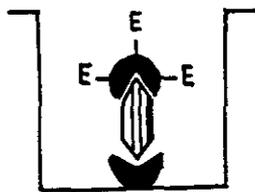
Figura 11. 3. Esquema de la técnica del ELISA competitivo.



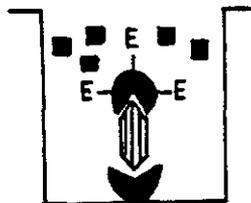
1. Anticuerpo adsorbido al pocillo



2. Antígeno capturado por anticuerpos específicos



3. Anticuerpos específicos marcados con un enzima que reconocen al antígeno anclado



4. Adición del sustrato enzimático

Figura II. 4. Esquema de la técnica del ELISA sandwich.

Patterson, 1986). En nuestro Departamento estamos realizando un amplio proyecto de investigación con estas técnicas para identificar la presencia de carne de una determinada especie animal en mezclas cárnicas diversas, para ello utilizamos tanto anticuerpos policlonales como monoclonales (Martin y col., 1986, 1988a, 1988b, 1988c, 1989a, 1989b).

De la misma manera, dichas técnicas nos han permitido identificar el origen de las leches de diversas mezclas lácteas. Así, García y col. (1990, 1991) han detectado un 1 % de leche de vaca en la de oveja mediante un ELISA indirecto y sandwich, en los que se utilizan inmunosueros anti-proteínas séricas de leche de vaca. No obstante, estas técnicas fallan en los quesos madurados, tanto por la inestabilidad térmica de las proteínas del suero, como por su escaso contenido en el producto final. Para obviar este inconveniente y con el objeto de detectar y cuantificar la presencia de leche de vaca y de cabra en la leche fresca de oveja y en los correspondientes quesos madurados, se ha realizado este trabajo de investigación, en el que se utilizan inmunosueros anti-caseínas de leche de vaca y de cabra.

#### II. C. 4. 8. Inmunodotting.

En esta técnica inmunoenzimática el antígeno se adsorbe en un papel de nitrocelulosa. Posteriormente se deposita en el papel el inmunosuero de interés, y en el caso de que exista correspondencia, los anticuerpos unidos al antígeno se detectan con un segundo anticuerpo obtenido frente al anterior y conjugado con un enzima. Al añadir el sustrato específico del enzima, se produce una reacción coloreada, que produce en el papel manchas de intensidad mayor o menor según sea la concentración de antígeno.

Aranda y col. (1988), han utilizado esta técnica en la detección de leche de vaca en la leche y en el queso de oveja. Para ello utilizaron un inmunosuero anti-caseínas de leche de vaca obtenido de conejos y más tarde purificado en columnas de Sepharosa-4B unida a caseínas de la leche de oveja. La reacción antígeno-anticuerpo en el papel de nitrocelulosa se detectó mediante un conjugado comercial anti-inmunoglobulinas de conejo, obtenidas de cabra, y unidas al enzima peroxidasa de rábano. Dichos investigadores describen la detección de hasta un 0,1 % de leche de vaca en la de oveja.

Con esta técnica, García (1990) ha detectado hasta un 3 % de leche de vaca adicionada a la de oveja empleando como antígenos el suero de la leche o la leche desnatada; con la leche entera el nivel de detección fué del 5 %. Como anticuerpos utilizó un inmunosuero anti-proteínas séricas de leche de vaca, purificado por una columna de Sepharosa-4B unida a proteínas liofilizadas del suero de leche de vaca y, neutralizado posteriormente con proteínas séricas de leche de oveja y de cabra. No obstante, aunque la técnica permite detectar la sustitución de una leche por otra, su cuantificación es problemática, ya que las manchas del papel empalidecen en pocos minutos y la apreciación de su intensidad es subjetiva.

CAPITULO III

**MATERIALES Y METODOS**

### III. A. MATERIAL.

#### III. A. 1. MATERIAL DE LABORATORIO.

En la preparación de las soluciones acuosas se empleó agua destilada en un aparato Afora (1) y desmineralizada en un intercambiador "Seta" mod. R-600.

Las pesadas ordinarias se realizaron en balanzas monoplato "Sauter" mod. S-1000. En las pesadas de precisión se utilizaron balanzas analíticas "Sartorius" mod. 2443 y "Microwa" mod. 6620.

Las mediciones de pH se realizaron con pHmetros "Crison" mod. Digit. 501 y "Radiometer" mod. 28.

Las homogeneizaciones de las muestras se realizaron en un triturador de cuchillas "Sorvall" Omni-mixer 17106.

Las centrifugaciones se realizaron en una centrifuga refrigerada "Sorvall" RC-5B, equipada con rotores SS-34 y GSA.

En las incubaciones se utilizaron estufas "Heraeus" mod. KB-500 y "Selecta" mod. Termotronic 338, termostatadas a la temperatura deseada.

---

(1) La cita de marcas de aparatos, reactivos, etc., no significa que la autora las recomiende con preferencia a otras marcas del mercado.

Las esterilizaciones se realizaron en un autoclave "Autester" 437-G y las incubaciones y tratamientos térmicos, que requerían un control más preciso de la temperatura, se efectuaron en baños de agua provistos de termostatos "Selecta" mod. Tectron y un termómetro digital "Crison" mod. 620/3.

En la liofilización de las muestras se utilizó un liofilizador "Terruzzi-Mevilsa" mod. TP-3 con superficie útil de carga de 0,3 m<sup>3</sup>, dotado de registro, dispositivo de termovació y programador.

Las muestras y reactivos se conservaron en arcones congeladores "Kelvinator" mod. ACK-55, así como en frigoríficos "Aspes" y "Kelvinator" mod. AKR-20 y en un armario frigorífico "Kelvinator" termostatado a  $4 \pm 1$  °C.

El material de vidrio empleado en las experiencias que aquí se describen fue siempre del tipo "Pyrex".

Las determinaciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro "Kontron" mod. Uvikon 820, registrándose los resultados en una impresora térmica Uvikon LS-48.

Las pipetas y micropipetas automáticas utilizadas fueron de la marca "Gilson" modelos p-5000, p-1000, p-200 y p-20 que dispensan volúmenes de 1-5 ml, 100-1000  $\mu$ l, 20-200  $\mu$ l y 2-20  $\mu$ l respectivamente. En el llenado de los pocillos de las placas de ELISA se utilizó una pipeta multicanal "Titertek", que dispensa un volumen de 50-200  $\mu$ l.

Las cromatografías se realizaron en columnas de "Pharmacia" modelo C

16/40. Las fracciones cromatográficas se recogieron en un colector de fracciones "LKB Bromma" mod. 2212 Helirac.

En la diálisis de las muestras se utilizaron membranas "Serva" mod. 27/32.

Las placas de ELISA utilizadas fueron de la marca "Costar" mod. 3590. Las agitaciones de las mismas se realizaron en un agitador de placas de ELISA marca Wallac, mod. 1296.001 y para su lectura se utilizó un lector espectrofotométrico "Titertek Multiscan Plus, versión 1.4".

## II. A. 2. MATERIAL BIOLÓGICO.

### II. A. 2. 1. Origen de las muestras.

Las leches de vaca, oveja y cabra se obtuvieron por mediación de la Sociedad Cooperativa Castellana de Ganaderos de Campo Real (Madrid). Para garantizar su procedencia, se recogieron directamente de los tanques de ordeño de las explotaciones de origen. Las razas de las vacas, ovejas y cabras productoras fueron la Frisona, Manchega y Murciano-Granadina, respectivamente. Los quesos de vaca, oveja y cabra utilizados en la preparación de mezclas se adquirieron en distintos comercios de la localidad, siendo todos ellos de "Denominación de Origen" o de procedencia conocida y garantizada.

### II. A. 2. 2. Obtención de los inmunosueros.

En la obtención de los inmunosueros se emplearon conejos machos blancos de 3-3,5 Kg de peso, de la raza Nueva Zelanda del animalario del Departamento de

Cirugía Experimental del Hospital Militar Central "Gomez Ulla" de Madrid. Asimismo, se inmunizaron dos machos cabrios de unos 33 Kg de peso explotados de forma tradicional en una ganadería de las afueras del pueblo de El Pardo (Madrid).

### II. A. 3. PRODUCTOS Y REACTIVOS.

Los productos químicos y biológicos utilizados en las experiencias descritas en este trabajo fueron suministrados por alguna de las siguientes firmas: "Merck", "Sigma", "Bio-Rad", "Nordic", "Pharmacia", "Difco" y "Fluka".

### III. B. METODOS.

#### III. B. 1. OBTENCION DE LOS EXTRACTOS ANTIGENICOS.

Tanto la leche cruda de vaca, como las de oveja y cabra se transportaron a nuestro Departamento en condiciones de refrigeración y, seguidamente, se procedió a la obtención de los extractos antigénicos según el protocolo que se describe a continuación. Los extractos antigénicos se denominaron CV (caseínas de leche de vaca), CC (caseínas de leche de cabra) y CO (caseínas de leche de oveja).

Para la obtención de los extractos se realizaron las siguientes operaciones:

1. Desnatado de la leche por centrifugación a 13.000  $g$  durante 10 minutos a 4 °C, seguido de filtración por lana de vidrio.

2. Calentamiento de la leche desnatada a 37 °C y precipitación de las caseínas por acidificación de la leche con HCl 0,2 M hasta un pH de 4,6. Conservación de la leche a 40 °C durante 30 min seguida de centrifugación a 6.000 *g* durante 30 min para separar las caseínas precipitadas. Las caseínas se lavaron tres veces con agua destilada para eliminar las proteínas séricas residuales.

3. Las caseínas lavadas y recuperadas como queda dicho se liofilizaron y mantuvieron en un desecador a -20 °C hasta su utilización.

Para la obtención de las caseínas de leche de cabra, la leche desnatada se calentó a 45 °C y se acidificó hasta un pH de 4,47 (punto isoeléctrico de las mismas) para así precipitarlas convenientemente.

El contenido proteico de los extractos de caseínas, determinado como se describe en la sección siguiente fue:

- CV: 753 µg de proteína/mg de extracto liofilizado.
- CC: 730 µg de proteína/mg de extracto liofilizado.
- CO: 620 µg de proteína/mg de extracto liofilizado.

El rendimiento de las caseínas liofilizadas por ml de leche utilizada fue de 18,5 mg en la de vaca (CV), de 13,9 mg en la de cabra (CC) y de 21,9 mg en la de oveja (CO).

### III. B. 2. DETERMINACION DE LA PROTEINA.

En la determinación del contenido proteico de los extractos antigénicos, de los inmunosueros y de otros reactivos, se utilizó el método de Bradford (1976), cuyos componentes son comercializados por "Bio-Rad". La técnica se basa en la variación que experimenta la absorbancia máxima del Azul Brillante de Coomassie G-250 entre 465 y 595 nm, al unirse a las proteínas. Por su sencillez, rapidez y estabilidad está sustituyendo al método tradicional de Lowry y col. (1951), con la ventaja adicional de que se encuentra libre de muchas de las interferencias que limitan el último método.

El método de Bradford presenta dos variantes dependiendo de la concentración de la proteína de la muestra: el procedimiento estándar y el microensayo. El primero permite medir entre 20-140  $\mu\text{g}$  de proteína (200-1400  $\mu\text{g}$  de proteína/ml) y, el segundo, entre 1-25  $\mu\text{g}$  de proteína/ml. En ambos casos es necesario extrapolar los resultados a una curva patrón que se construye para cada ensayo. Como proteína estándar se utiliza la seroalbúmina bovina (1500  $\mu\text{g}$  de proteína/ml). El reactivo coloreado consta de un 0,06 % de Azul Brillante de Coomassie G-250 en una solución que contiene un 66,6 % de ácido fosfórico y un 33,3 % de metanol.

En el método estándar se procede como sigue:

a) A partir de una serie de tubos que contienen alícuotas de 0,1 ml de agua destilada y entre 20-140  $\mu\text{g}$  de proteína (seroalbúmina bovina) se prepara una recta patrón. Se diluye la muestra en el mismo volumen de agua destilada (0,1 ml) y se prepara un blanco con agua destilada.

b) Añadir a cada alícuota 5 ml del reactivo coloreado, previamente diluido 5 veces en agua destilada y agitar los tubos. A los 5 minutos de la reacción y, como máximo, hasta una hora de iniciada, se determina la absorbancia de los tubos a 595 nm. Transcurrida una hora desde que se inició la reacción, la estabilidad del complejo proteína-colorante disminuye, pudiendo formarse precipitados.

En el microensayo los pasos a seguir son básicamente los mismos, pero el volumen de las alícuotas es menor y la concentración de proteína de la muestra para construir la recta patrón debe estar comprendida entre 1 y 25 µg/ml.

### III. B. 3. OBTENCION DE LOS INMUNOSUEROS.

Los inmunosueros frente a las caseínas de leche de vaca (anti-CV) se obtuvieron de conejos y machos cabrios, mientras que los obtenidos frente a las caseínas de leche de cabra (anti-CC), procedían de conejos.

#### III. B. 3. 1. Pauta de inmunización de los conejos.

Se emplearon ocho conejos, distribuidos en lotes de cuatro animales. Al lote A se le inoculó el extracto antigénico CV y al B el extracto antigénico CC.

La inmunización de los conejos comenzó con la inyección subcutánea, en varios lugares de la espalda, del extracto antigénico (8 mg de proteína) disuelto en 2 ml de agua destilada y desionizada, cuyo pH se ajustó a 7,4 con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M, y se emulsionó con 0,5 ml del Adyuvante Completo de Freund (Difco). Se aplicaron 12 dosis de recuerdo, a intervalos de 7 días, preparadas de la forma descrita, pero sustituyendo el Adyuvante Completo de Freund por el Incompleto.

A los 90 días se sacrificaron los animales, se recogió su sangre en tubos de ensayo limpios y se obtuvo el suero de la manera siguiente:

- Dejar coagular la sangre durante una hora a temperatura ambiente.
- Separar cuidadosamente el coágulo de las paredes de los tubos con ayuda de una espátula y mantenerlo a 4 °C para favorecer la retracción del mismo.
- Trasvasar el suero a tubos de centrifuga limpios y centrifugar a 800 *g* durante 30 min a 4 °C.
- Recoger el sobrenadante, distribuirlo en viales, añadir unas gotas de azida sódica al 0,01 % y conservarlos a -20 °C hasta el momento de su uso.

### III. B. 3. 2. Pauta de inmunización de los machos cabríos.

Se emplearon dos animales, que se inocularon con el extracto antigénico CV. La inmunización comenzó inyectando por vía intramuscular, en las cuatro extremidades, el extracto antigénico (12 mg de proteína) disuelto en 1 ml de agua destilada y desionizada; se ajusta el pH a 7,4 con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M y se añade como emulsionante 1 ml de Adyuvante Completo de Freund. Las dosis de recuerdo, una vez por semana y durante 14 semanas, se prepararon de la misma manera, pero sustituyendo el Adyuvante Completo por el Incompleto de Freund.

A la decimoquinta semana de inmunización se realizó una sangría final de un litro de volumen, obteniéndose el suero correspondiente siguiendo el mismo proceder que con la sangre de los conejos.

Tanto en los conejos como en los machos cabríos se realizaron 3 sangrias parciales para comprobar el grado de inmunización de los animales. La especificidad y potencia de los inmunosueros se determinó por inmunodifusión en geles de agarosa siguiendo la técnica de Ouchterlony (1948).

### III. B. 4. TECNICAS INMUNOLOGICAS.

#### III. B. 4. 1. Inmunodifusión en geles de agarosa.

Esta técnica, realizada de la manera descrita por Ouchterlony (1948), permite visualizar la interacción entre antígenos y anticuerpos tras su difusión en un medio semisólido (agarosa). Si existe correspondencia entre ambos se formará una línea de precipitación cuya posición dependerá del coeficiente de difusión de los antígenos y anticuerpos, de sus respectivas concentraciones y del tiempo de reacción.

##### **a) Preparación del gel de agarosa.**

El gel se elabora inmediatamente antes de utilizarlo; se prepara agarosa (Oxoid) al 1 %, en una solución acuosa de ClNa al 0,85 % que contiene como conservador un 0,01 % de azida de sodio. Una vez disuelta la agarosa en la solución salina, se calienta con agitación hasta ebullición y a continuación se añade la azida de sodio.

**b) Preparación de las placas de inmunodifusión.**

Se utilizaron portaobjetos de vidrio de 7,5 x 5 cm, que se situaron en una mesa niveladora, depositando en cada uno de ellos 6 ml de la solución de agarosa caliente. Una vez solidificada, se realizaron en la agarosa siete cortes con ayuda de moldes metálicos de sección circular: uno central, de 12 mm de diámetro y 6 periféricos de 6 mm de diámetro, dispuestos en forma de roseta y separados 7 mm del corte central. Seguidamente, y con ayuda de una aguja, se retiraron cuidadosamente los discos de agarosa cortados con los moldes metálicos con lo que se dispuso de siete pocillos o excavaciones.

**c) Llenado de los pocillos e incubación de las placas.**

Una vez preparadas las placas de inmunodifusión, con ayuda de una micropipeta automática, se depositaron en cada pocillo periférico 50  $\mu$ l de la solución antigénica a analizar y en el pocillo central 150  $\mu$ l del inmunosuero correspondiente.

A continuación las placas se colocaron en bandejas que se introdujeron en una cubeta que contenía de 5 a 10 ml de una solución de azida de sodio al 1 %. De esta forma, además de inhibir el crecimiento microbiano, se mantenía la humedad de la cubeta que, por último, se tapaba y se mantenía así durante 18-24 horas a 37 °C.

**d) Lavado, secado y tinción de los geles.**

Finalizada la incubación, las placas se lavaron en una solución salina al 0,85

% durante 48 horas a temperatura ambiente, cambiando diariamente tres veces la solución lavadora; el último lavado se realizó con agua destilada. Después se secaron las placas con una tira de papel Whatman nº 1 que se depositaba en su superficie, procurando eliminar las burbujas de aire que se forman entre el gel y papel; el secado se completa en una estufa a 37 °C.

Una vez secas, las placas se tiñeron durante 2 horas con una solución al 1% de Azul Brillante de Coomassie G-250 en una mezcla de metanol/ácido acético (9/1) (v/v). Posteriormente se lavaron durante 30 minutos con solución acuosa de ácido acético al 5 % que, por último, se arrastró con lavados repetidos de agua destilada.

### III. B. 4. 2. Purificación de los Inmunosueros por técnicas de cromatografía de afinidad.

La cromatografía de afinidad es una variante de la de adsorción, en donde la molécula a purificar se adsorbe de forma reversible y específica en una sustancia (ligando), inmovilizada en un soporte insoluble (matriz). Aunque la primera aplicación de esta técnica tuvo lugar en 1910, no adquirió importancia hasta que Axen y col. (1967) demostraron que las moléculas que contenían grupos amina primarios podían unirse a matrices de un polisacárido activadas con cianuro de bromo. Así se inició el empleo de la cromatografía de afinidad como técnica rutinaria de separación y la activación con cianuro de bromo como método más conveniente de unión de los ligandos.

En este trabajo se ha utilizado como soporte insoluble la Sepharosa-4B activada con cianuro de bromo (Sepharosa 4B-CNBr). Esta matriz permite la

rápida inmovilización de los ligandos que poseen grupos amino, el acoplamiento de una cantidad conocida de ligando y la presencia de múltiples puntos de unión para el mismo (Axen y col., 1967).

Cuando un Inmunosuero circula por una matriz insoluble que posee grupos reconocibles por los anticuerpos a purificar, estos se adsorben al ligando y se retienen en la columna. Para eluirlos, hay que cambiar la fuerza iónica, el pH o la constante dieléctrica de la fase móvil.

### **III. B. 4. 2. 1. Acoplamiento de los ligandos a la matriz de Sepharosa 4B-CNBr.**

Se prepararon tres columnas de afinidad cuyas matrices se acoplaron en cada caso a un ligando diferente concretamente a caseínas liofilizadas de leche de vaca (CV), de cabra (CC) y de oveja (CO).

Para el acoplamiento del ligando a la matriz insoluble se procedió según las directrices recomendadas en el manual de "Affinity Chromatography", editado por Pharmacia. Para ello, en una solución 1 mM de HCl se rehidrataron durante 15 minutos 10 gramos del liofilizado de Sepharosa 4B-CNBr. El gel resultante se lavó a continuación con la misma solución en un embudo de vidrio poroso del nº 4. En el lavado se emplearon 200 ml de HCl por gramo de polvo liofilizado; el HCl protege a los grupos reactivos que se hidrolizarían a pH alto. Una vez eliminado el HCl, la porción gelificada retenida en el filtro tenía un volumen aproximado de 35 ml. El gel se lavó después con el tampón de acoplamiento compuesto de  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M y NaCl 0,5 M (pH 8,3).

El gel activado se trasvasó a un vaso de precipitados que contenía el ligando (5 mg de proteína del extracto antigénico correspondiente por ml de gel hidratado) disuelto en 100 ml del tampón de acoplamiento. La mezcla de gel activado y de ligando se mantuvo 2 horas a temperatura ambiente, agitándola manualmente de cuando en cuando, ya que con agitación magnética el gel podría fragmentarse.

Posteriormente, se separó por filtración el tampón de acoplamiento de la mezcla y ésta se mantuvo 2 horas a temperatura ambiente en 150 ml de glicina 0,2 M (pH 8), para bloquear los grupos reactivos que no fueron ocupados por el extracto antigénico.

Después y para eliminar el extracto antigénico no ligado, se lavó el gel, primero con un tampón de  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M (pH 8,3) y después con el de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  0,1 M (pH 4), ambos con  $\text{NaCl}$  0,5 M. La mezcla matriz-ligando se mantuvo inmersa en el tampón de acetato durante 15 minutos, antes de añadirle el tampón de bicarbonato. Esta operación se repitió cuatro veces.

Finalmente, la matriz de Sepharosa 4B-extracto antigénico, se lavó con el tampón fosfato salino (PBS, pH 7,2), se le adicionó azida de sodio al 0,01 %, y se mantuvo a refrigeración a 4 °C en dicho tampón hasta el momento de su empleo.

### **III. B. 4. 2. 2. Condiciones de trabajo.**

La cromatografía de afinidad se llevó a cabo en una cámara termostataada a 4 ± 1 °C.

El contenido de las columnas se equilibró con tampón fosfato salino (PBS, de pH 7,2) que contenía azida de sodio 0,01 % y como tampón de elución del material que habían retenido, se empleó una solución de dietilamina 0,05 M de pH 11,5. El mismo tampón de elución se utilizó para regenerar las columnas tras la purificación de cada una de las fracciones de inmunosuero; posteriormente, la matriz de las columnas se equilibró con 100 ml de tampón PBS.

El eluato de las columnas se recogió con un colector de fracciones, ajustando a 90 gotas (= 6 ml) el volumen de cada fracción. El contenido proteico de las fracciones se evaluó midiendo en un espectrofotómetro su absorbancia a 280 nm.

### **III. B. 4. 2. 3. Purificación por Inmunoadsorción del Inmunosuero anti-CV obtenido de conejos.**

Este inmunosuero contiene anticuerpos frente a las caseínas de la leche de vaca (anti-CV). Para aislarlos del inmunosuero total, se pasó únicamente por la columna de Sepharosa 4B-CNBr acoplada a las caseínas liofilizadas de vaca (CV). De esta manera los anticuerpos que reconocen como antígenos a dichas caseínas quedan retenidos en la columna, mientras que permanecen en el eluato los anticuerpos inespecíficos. Los anticuerpos específicos anti-CV, se eluyen posteriormente de la columna con tampón de elución.

Para la elución, se depositaron en la columna citada 5 ml del inmunosuero anti-CV diluido en 10 ml del tampón PBS de pH 7,2 que contiene Tween 80 al 0,5 %. Cuando este volumen penetró en el lecho cromatográfico, se recogieron alícuotas de 6 ml de eluato y cuando su absorbancia a 280 nm se hizo cero, se

procedió a eluir los anticuerpos adsorbidos a la columna con tampón de dietilamina 0,05 M de pH 11,5. Cuando de nuevo se hizo cero la absorbancia de las fracciones recogidas, las alícuotas que tenían una absorbancia mayor de 0,1 se mezclaron y se ajustó el pH de la mezcla a 7,4 con tampón de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . A continuación se dializó la mezcla 16 horas a 4 °C, frente al tampón PBS de pH 7,2, con azida de sodio 0,01 %. Tras cambiar varias veces este tampón y, una vez finalizada la diálisis, se procedió a la liofilización del inmunosuero purificado, determinando su contenido proteico por el microensayo de Bradford (sección III. B. 2). El inmunosuero liofilizado se guardó en viales de vidrio que se mantuvieron a -20 °C hasta el momento de su empleo. La purificación se repitió cinco veces para alcanzar la concentración necesaria de anticuerpos purificados anti-CV obtenidos de conejos.

#### **III. B. 4. 2. 4. Purificación por inmunoadsorción del inmunosuero anti-CV obtenido de machos cabríos.**

Para aislar los anticuerpos anti-CV del inmunosuero total primero se precipitaron las inmunoglobulinas con sulfato amónico al 50 %, para más tarde purificarlas pasándolas por tres columnas de Sepharosa 4B-CNBr acopladas a los ligandos CC, CO y CV.

##### 1) Precipitación de las inmunoglobulinas con sulfato amónico.

La precipitación con sulfato amónico es uno de los métodos más utilizados para la separación de las proteínas de una solución y, en particular, se emplea para la separación de los anticuerpos o inmunoglobulinas del inmunosuero total. El método se basa en que las proteínas solubles forman puentes de hidrógeno con

las moléculas de agua a través de sus grupos polares; cuando se añaden concentraciones elevadas de iones fuertemente cargados como amonio o sulfato, éstos compiten con las moléculas proteicas por el agua. De esta manera las proteínas al perder su unión con las moléculas de agua disminuyen su solubilidad lo que origina su precipitación.

La concentración de sulfato amónico necesaria para precipitar las inmunoglobulinas varía con la especie animal de que proceden. No obstante, la más conveniente en la mayoría de los casos es la solución al 50 % (Harlow y Lane, 1988).

En la precipitación de las inmunoglobulinas del inmunosuero anti-CV de machos cabríos, se procedió como sigue (Harlow y Lane, 1988):

- Se centrifugaron 10 ml del inmunosuero a 3000  $g$  durante 30 minutos y el sobrenadante se trasvasó a un vaso de precipitados.

- Se le añadieron gota a gota, agitando al mismo tiempo, 10 ml de sulfato amónico saturado (761 gramos de  $(NH_4)_2SO_4$  en un litro de agua destilada) cuyo pH se había ajustado a 7,4 con NaOH 1 N inmediatamente antes de su empleo.

- La mezcla se mantuvo en reposo una noche a 4 °C, tras lo cual se volvió a centrifugar a 3000  $g$  durante 30 minutos para recuperar las inmunoglobulinas precipitadas.

- Eliminado el sobrenadante, las inmunoglobulinas que se encuentran en el sedimento se resuspendieron en 5 ml de tampón fosfato salino (PBS, pH 7,2), y a

continuación se sometieron a diálisis por membrana.

- La dialización frente a tampón PBS tuvo lugar durante 16 horas a 4 °C; el tampón se cambió varias veces para eliminar el sulfato amónico residual.

- Finalizada la diálisis, las inmunoglobulinas así obtenidas se distribuyeron en alícuotas de 5 ml, manteniéndose a -20 °C hasta su utilización. El proceso se repitió cinco veces para obtener una cantidad razonable de inmunoglobulinas para su purificación posterior.

Para comprobar que las inmunoglobulinas anti-CV se encontraban en el sedimento, tanto éste como el sobrenadante se sometieron a un ELISA indirecto frente al extracto antigénico CV. La falta de respuesta del sobrenadante indicó que no hay inmunoglobulinas en los sobrenadantes.

## 2) Purificación por tres columnas.

Tres columnas de afinidad que contenían los extractos antigénicos CC, CO y CV, se dispusieron en escalera y se conectaron entre sí por este orden (véase Figura III. 1).

Para purificar las inmunoglobulinas anti-CV, obtenidas como se indica en el apartado anterior, se procedió como sigue: Se depositaron en la primera columna 5 ml de una solución (20 mg/ml) de inmunoglobulinas, en 10 ml de tampón PBS, de pH 7,2 adicionado de Tween 80 al 0,5 %. Cuando estos 15 ml habían penetrado en el lecho cromatográfico se conectó la primera columna con el depósito de tampón PBS que contenía azida de sodio al 0,01 % y la última columna se conectó con un

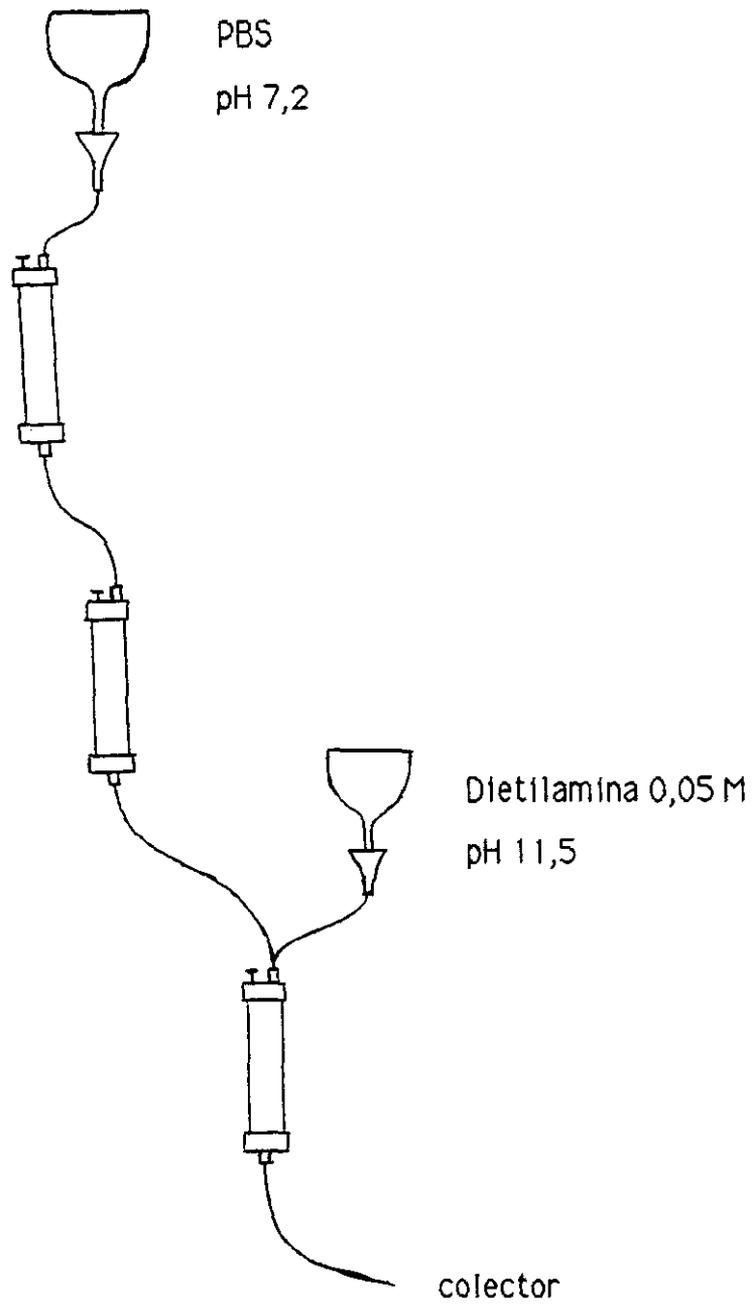


Figura III.1. Columnas de Sepharosa 4B-CNBr que contienen extractos antigénicos CC, CO y CV, utilizadas para purificar por inmunoadsorción el Inmunesuero anti-CV.

colector de fracciones, cuyo volumen de salida se ajustó a 6 ml por fracción recogida. A continuación se determinó la absorbancia a 280 nm de las fracciones eluidas y cuando ésta se hizo cero, se eluyó la última columna con tampón de dietilamina 0,05 M de pH 11,5 para arrastrar los anticuerpos anti-CV retenidos a ella. Los anticuerpos así recuperados, se concentraron, dializaron y liofilizaron de la manera descrita en la sección III. B. 4. 2. 3 y se mantuvieron a -20 °C hasta el momento de su empleo. Para alcanzar la concentración necesaria de anticuerpos específicos anti-CV se repitió diez veces la purificación por tres columnas.

#### **III. B. 4. 2. 5. Purificación por inmunoadsorción del inmunosuero anti-CC obtenido de conejos.**

Los anticuerpos específicos anti-CC se recuperaron del inmunosuero total siguiendo dos procedimientos distintos: a) pasando el inmunosuero sólo por la columna de afinidad que contenía el extracto antigénico CC, y b) precipitando las inmunoglobulinas con sulfato amónico y purificándolas más tarde por tres columnas.

##### 1) Purificación por una columna.

Para la purificación del inmunosuero anti-CC por una columna, se empleó la que contenía como ligando de afinidad extracto antigénico CC. La metodología utilizada fue la descrita para la purificación del inmunosuero anti-CV obtenido de conejos por una columna (véase sección III. B. 4. 2. 3)

## 2) Precipitación de las inmunoglobulinas con sulfato amónico.

Se realizó siguiendo el protocolo de Harlow y Lane (1988) ya descrito en la sección III. B. 4. 2. 4. 1, si bien el proceso de precipitación se repitió cinco veces. La eficacia de la precipitación de las inmunoglobulinas se comprobó con un ELISA indirecto empleando como anticuerpos tanto el precipitado, como el sobrenadante de la segunda centrifugación del inmunosero y como antígeno el extracto CC. Comprobada la ausencia de inmunoglobulinas en el sobrenadante, las presentes en el sedimento se purificaron por tres columnas.

## 3) Purificación por tres columnas.

Las columnas se conectaron de la manera descrita en la sección III. B. 4. 2. 4. 2, pero colocando en último lugar la que contenía el extracto antigénico CC. Las inmunoglobulinas precipitadas se purificaron siguiendo el mismo proceder que con el inmunosero anti-CV obtenido de machos cabríos; la purificación también se repitió diez veces hasta alcanzar la concentración necesaria de anticuerpos para experiencias posteriores.

## III. B. 4. 3. Conjugación de los anticuerpos purificados a la biotina.

La biotina es uno de los 12 factores hidrosolubles que forman el complejo vitamínico B y debido a su pequeño tamaño molecular, su unión con el anticuerpo es más estable que cuando éste se conjuga directamente con un enzima (Yolken y col., 1983). La unión de la biotina con el anticuerpo, además de ser fácil de realizar, presenta la ventaja de que el anticuerpo sigue manteniendo la especificidad por el antígeno. Se ha comprobado que la avidina, proteína

antibacteriana de la clara de huevo, posee una gran afinidad por la biotina ( $10^{15}$   $M^{-1}$ ); en ello se basa la detección inmunoenzimática con un compuesto comercial de avidina conjugada a un enzima, la llamada biotina conjugada a los anticuerpos.

Los anticuerpos anti-CV y anti-CC, purificados por inmunoadsorción, se conjugaron con un éster de la biotina, el N-hidroxi-succinimida biotinamidocaproato siguiendo la técnica de Bonnard y col. (1984), ligeramente modificada.

La biotina se une a los anticuerpos por sus grupos amino libres; se procedió como sigue: Se preparó una solución del éster de la biotina en dimetilsulfóxido a una concentración de 1 mg/ml. Los anticuerpos purificados se disolvieron en tampón PBS de pH 7,2, a una concentración entre 1 y 3 mg/ml y la solución de biotina se añadió a la de anticuerpos en un exceso molar de 50; se agita la mezcla y se deja en reposo 2 horas a temperatura ambiente. La biotina libre se elimina por diálisis (16 horas a 4 °C) de los anticuerpos biotinizados frente al tampón PBS. Finalmente los anticuerpos conjugados fraccionados en alícuotas de 0,1 ml, se conservaron a -20 °C hasta el momento de su utilización.

#### III. B. 4. 4. Neutralización de los inmunosueros

La neutralización o bloqueo es un procedimiento sencillo para eliminar las reacciones cruzadas de los anticuerpos con proteínas de otras especies. Con el fin de neutralizar la actividad que frente a las caseínas de la leche de otras especies presentaban los anticuerpos de los inmunosueros anti-CV y anti-CC, purificados por una sola columna, se incubaron con los extractos antigénicos frente a los que originaban reacciones cruzadas.

Se procedió como sigue: Los Inmunosueros anti-CV y anti-CC conjugados a la biotina y convenientemente diluidos en tampón PBST se incubaron 16 horas a 4 °C con una cantidad adecuada (determinada experimentalmente en cada caso) de los extractos antigénicos liofilizados frente a los que producían reacciones cruzadas. Finalizada la incubación estos inmunosueros neutralizados se utilizaron directamente en la técnica del ELISA indirecto.

La neutralización de los anticuerpos anti-CV se realizó diluyéndolos en una solución de tampón PBST que contenía extractos antigénicos CC y CO a una concentración de 0,557 y 0,876 mg/ml, respectivamente. Agitada enérgicamente la mezcla, se mantuvo durante 16 horas a 4 °C tras lo que ya pudo usarse en el ELISA indirecto.

La neutralización de los anticuerpos anti-CC se hizo de un modo similar, si bien en este caso se utilizaron los extractos antigénicos CV y CO, a una concentración de 0,738 y 0,876 mg/ml de tampón PBST, respectivamente. Los mejores resultados se obtuvieron cuando la mezcla de caseínas-anticuerpos se incubó 2 horas a 37 °C, y se mantuvo 16 horas a 4 °C. Una vez centrifugada a 2000 *g* durante 10 minutos, ya pudo utilizarse en el ELISA indirecto desarrollado.

### III. B. 4. 5. Técnicas inmunoenzimáticas.

#### **III. B. 4. 5. 1. Técnica del ELISA indirecto.**

En este trabajo se ha utilizado una variante del ELISA indirecto clásico que emplea un sistema de amplificación avidin-biotina. Como se ha señalado en la sección III. B. 4. 3, la avidina tiene una gran afinidad muy elevada ( $10^{15} \text{ M}^{-1}$ ) por

la biotina por lo que el complejo avidin-biotina se utiliza para amplificar las reacciones inmunoenzimáticas (ELISA). Esta amplificación se debe a que la avidina contiene en su molécula cuatro lugares de unión con la biotina.

La diferencia entre esta técnica y la del ELISA indirecto clásico (sección II. C. 4. 7), estriba en que los anticuerpos específicos se conjugan con la biotina (biotinización) y la detección del complejo antígeno-anticuerpo/biotina se realiza con un conjugado comercial de avidina marcada con un enzima.

#### 1) Antígenos.

Como antígenos se emplearon leche entera y extractos de queso, cuya procedencia se indica en la sección III. A. 2. 1. También se prepararon mezclas experimentales de leches y quesos, de vaca/oveja, vaca/cabra y cabra/oveja, con unos porcentajes de sustitución de 0, 1, 5, 10, 15, 25, 50 y 100 %.

En la preparación de los extractos antigénicos de queso se utilizaron 25 gramos de queso puro o de la mezcla correspondiente que se homogeneizaron en 500 ml de tampón PBS de pH 7,2. Las muestras se diluyeron después en el mismo tampón hasta una concentración de 1/5. Se distribuyeron en alícuotas de 200  $\mu$ l y se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización. Las mezclas de quesos de vaca/oveja, vaca/cabra y cabra/oveja, se prepararon con quesos cuyos periodos de maduración eran iguales.

Las mezclas de leches de vaca/oveja, vaca/cabra y cabra/oveja, se prepararon con leche cruda de estas especies cuyos porcentajes de sustitución eran los anteriormente señalados. Las muestras se repartieron en alícuotas de

200  $\mu$ l y se conservaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su empleo.

## 2) Anticuerpos.

Se utilizaron los anticuerpos anti-CV y anti-CC, obtenidos de conejos y purificados por inmunoadsorción en una sola columna (secciones III. B. 4. 2. 3 y III. B. 4. 2. 5. 1). Antes de emplearlos en el ELISA indirecto, se conjugaron a la biotina y se neutralizaron como se describe en las secciones III. B. 4. 3 y III. B. 4. 4.

## 3) Conjugado.

Como conjugado se empleó el preparado comercial de ExtrAvidina-peroxidasa de rábano (Sigma).

## 4) Tampones y reactivos.

### a. **Tampón PBS de pH 7,2.**

Cloruro sódico.....	8 g
Hidrógeno fosfato disódico 12-hidrato.....	2,9 g
Dihidrógeno fosfato potásico.....	0,2 g
Cloruro potásico.....	0,2 g
Agua destilada.....	l l

**b. Tampón PBST.**

Se prepara como el tampón PBS y se le añade un 5 % de Tween 20.

**c. Tampón ácido cítrico-fosfato de pH 3,9.**

- a. Preparar una solución 0,1 M de ácido cítrico monohidratado (21,01 g/l).
- b. Preparar una solución 0,2 M de hidrógeno fosfato disódico (28,4 g/l).
- c. Mezclar las dos soluciones hasta obtener el pH deseado.

**d. Sustrato.**

El sustrato empleado fue el ácido 2-2'-azino-bis-3-etil-benzotiazolina sulfónico (ABTS) (Sigma). Se preparan dos soluciones: de ABTS en agua destilada (15 mg/ml) y otra de ácido L(+) ascórbico (10 mg/ml), también en agua destilada. Después, se prepara la mezcla siguiente:

Tampón de ácido cítrico-fosfato de pH 3,9.....	10	ml
Solución de ABTS (15 mg/ml).....	0,40	ml
Solución de ácido ascórbico (10 mg/ml).....	2,66	μl
Agua oxigenada (30 % p/v).....	2	μl

**e. Solución de frenado.**

- Fluoruro sódico (NaF) al 2 % en agua destilada.

#### **f. Solución de tapizado.**

- Gelatina al 1 % en tampón PBS.

#### **5) Metodología del ELISA indirecto.**

En todos los ensayos se procedió como se describe a continuación: Los pocillos de una placa de ELISA (Costar 3590) se sensibilizaron con 100 µl del extracto antigénico correspondiente (leche cruda o queso), diluido en tampón PBS de pH 7,2; la placa se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Finalizada la incubación y, para eliminar el extracto antigénico no adsorbido en los pocillos, se lavaron 5 veces con tampón PBST de pH 7,2 y, seguidamente, se secaron al aire. Para tapizar las zonas en las que no se adsorbió el antígeno, se añadieron a cada pocillo 200 µl de una solución de gelatina al 1 % en tampón de PBS. La placa se mantuvo 30 minutos a 37 °C y los pocillos se lavaron 5 veces con tampón PBST para eliminar el exceso de gelatina.

A continuación, se añadieron a cada pocillo 100 µl del anticuerpo biotinizado y neutralizado (anti-CV o anti-CC), diluido en tampón de PBST y la placa se mantuvo durante una hora en agitación a temperatura ambiente. Los anticuerpos específicos no fijados al extracto antigénico y los complejos antígeno-anticuerpo, formados en la neutralización, se eliminaron lavando de nuevo la placa con tampón PBST. Una vez seca la placa, se depositaron en cada pocillo 100 µl del conjugado comercial ExtrAvidina-peroxidasa diluido en tampón PBST. La placa se mantuvo en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual los pocillos se lavaron 5 veces con agua destilada para eliminar los restos del conjugado libre.

Finalmente, tras secar la placa, se añadieron a cada pocillo 150  $\mu$ l del sustrato dejándola en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción enzima-sustrato se frenó añadiendo a cada pocillo 50  $\mu$ l de NaF al 2 %. El color azul-verdoso, resultante de la degradación del sustrato por el enzima, se cuantificó midiendo la absorbancia de cada pocillo a 405 nm en un lector espectrofotométrico de placas de ELISA.

En la prueba descrita siempre se realizaron, además, los siguientes controles:

- a. Control del antígeno: gelatina + anticuerpo + conjugado + sustrato
- b. Control del anticuerpo: antígeno + gelatina + conjugado + sustrato
- c. Control del conjugado: conjugado + sustrato

Si en alguno de los controles la absorbancia a 405 nm era mayor de 0,150, el experimento se consideraba nulo.

### **III. B. 4. 5. 2. Técnica del ELISA sandwich.**

En esta técnica, los anticuerpos específicos se inmovilizan en una fase sólida actuando como anticuerpos de captura de los antígenos problema. Los antígenos anclados son reconocidos por los mismos anticuerpos conjugados a la biotina y, el complejo formado, se detecta con el conjugado comercial de ExtrAvidina-peroxidasa. La reacción se pone de manifiesto porque al actuar el enzima sobre el sustrato se libera un compuesto coloreado.

### 1) Antígenos.

Se emplearon los mismos antígenos que en el ELISA indirecto (sección III. B. 4. 5. 1. 1).

### 2) Anticuerpos de captura.

Como anticuerpos de captura se utilizaron los anti-CV obtenidos de machos cabríos y los anti-CC procedentes de conejos, que habían sido purificados por cromatografía de afinidad en tres columnas (secciones III. B. 4. 2. 4. 2 y III. B. 4. 2. 5. 3).

### 3) Anticuerpos de detección.

Los anticuerpos de detección utilizados fueron los mismos que los de captura pero conjugados a la biotina como se describe en la sección III. B. 4. 3.

### 4) Conjugado.

Se empleó el conjugado comercial de ExtrAvidina-peroxidasa (Sigma).

### 5) Tampones y reactivos.

Además de los descritos en la sección III. B. 4. 5. 1. 4, se utilizó el tampón carbonato-bicarbonato de pH 9,6, cuya composición es la siguiente:

**Tampón carbonato–bicarbonato de pH 9,6.**

Bicarbonato sódico.....	2,93 g
Carbonato sódico.....	1,59 g
agua destilada.....	1 l

**6) Metodología del ELISA sandwich.**

Los pocillos de una placa de ELISA se sensibilizaron con 100 µl de los correspondientes anticuerpos de captura (anti-CV o anti-CC), diluidos en el tampón carbonato–bicarbonato de pH 9,6, incubándose la placa durante una hora a 37 °C. Transcurrido este tiempo y, para eliminar los anticuerpos de captura no adsorbidos a los pocillos, estos se lavaron 5 veces con tampón PBST y seguidamente se secaron al aire.

Para tapizar las zonas en las que no se adsorbieron anticuerpos, se añadieron a cada pocillo 200 µl de gelatina al 1 % en PBS. La placa se mantuvo 30 minutos a 37 °C y los pocillos se lavaron de nuevo con tampón PBST para eliminar el exceso de gelatina.

A continuación, se añadieron a cada pocillo 100 µl del antígeno (leche o queso) diluido en tampón PBST y la placa se mantuvo durante una hora en agitación a temperatura ambiente. El antígeno no capturado por los anticuerpos se eliminó lavando de nuevo la placa con tampón PBST. Una vez seca, se depositaron en cada pocillo 100 µl del anticuerpo correspondiente conjugado a la biotina y disuelto en tampón PBST; la placa se mantuvo en agitación durante una hora a temperatura ambiente. Después de lavada con PBST y, una vez seca, se añadieron a

cada pocillo 100  $\mu$ l del conjugado ExtrAvidina-peroxidasa disuelto en PBST y se mantuvo una hora en agitación a temperatura ambiente.

Después de lavada la placa con agua destilada y, para visualizar la reacción, se adicionaron a cada pocillo 150  $\mu$ l de la solución del sustrato y se sometió a agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez frenada la reacción con 50  $\mu$ l de NaF al 2 %, se leyó la absorbancia de los pocillos a 405 nm en un lector espectrofotométrico de placas de ELISA.

Los controles realizados en cada prueba del ELISA sandwich fueron los siguientes:

a. Control del antígeno: anticuerpo de captura + gelatina + anticuerpo de detección + conjugado + sustrato

b. Control del anticuerpo de captura: gelatina + antígeno + anticuerpo de detección + conjugado + sustrato

c. Control del anticuerpo de detección: anticuerpo de captura + gelatina + antígeno + conjugado + sustrato

d. Control del conjugado: gelatina + conjugado + sustrato.

Si la absorbancia a 405 nm era mayor de 0,150 en alguno de los controles, el experimento se consideraba nulo.

CAPITULO IV

**RESULTADOS**

#### **IV. A. DIAGRAMA ESQUEMATICO DEL TRABAJO DESARROLLADO.**

Los resultados descritos en este trabajo se obtuvieron siguiendo las pautas de trabajo que se muestran en las Figuras IV. 1 y IV. 2.

Como se ve en la Figura IV. 1, para la detección de la leche de vaca en las mezclas de leche fresca y en los quesos madurados de oveja y cabra, tuvieron que obtenerse Inmunosueros frente a las caseínas de leche de vaca (anti-CV).

Después de comprobarse por inmunodifusión que el inmunosuero anti-CV obtenido de conejos producía reacciones cruzadas con las caseínas de oveja y cabra, se purificó por una columna de afinidad que contenía como ligando el extracto antigénico CV. Posteriormente, los anticuerpos anti-CV purificados pasándolos por una columna se conjugaron a la biotina y se neutralizaron con las caseínas liofilizadas de cabra y oveja; estos anticuerpos se emplearon en la detección de leche de vaca en las mezclas de leche fresca y en los quesos madurados de oveja y cabra.

De otra parte, el Inmunosuero anti-CV obtenido de machos cabríos se purificó pasándolo por tres columnas de afinidad, después de precipitadas las inmunoglobulinas del inmunosuero total con sulfato amónico.

Los anticuerpos específicos anti-CV, obtenidos de la manera descrita, se emplearon como anticuerpos de captura y de detección en el desarrollo y puesta a punto de un ELISA sandwich, para detectar la presencia de leche de vaca en las mezclas de leche fresca y en los quesos madurados de oveja y cabra.

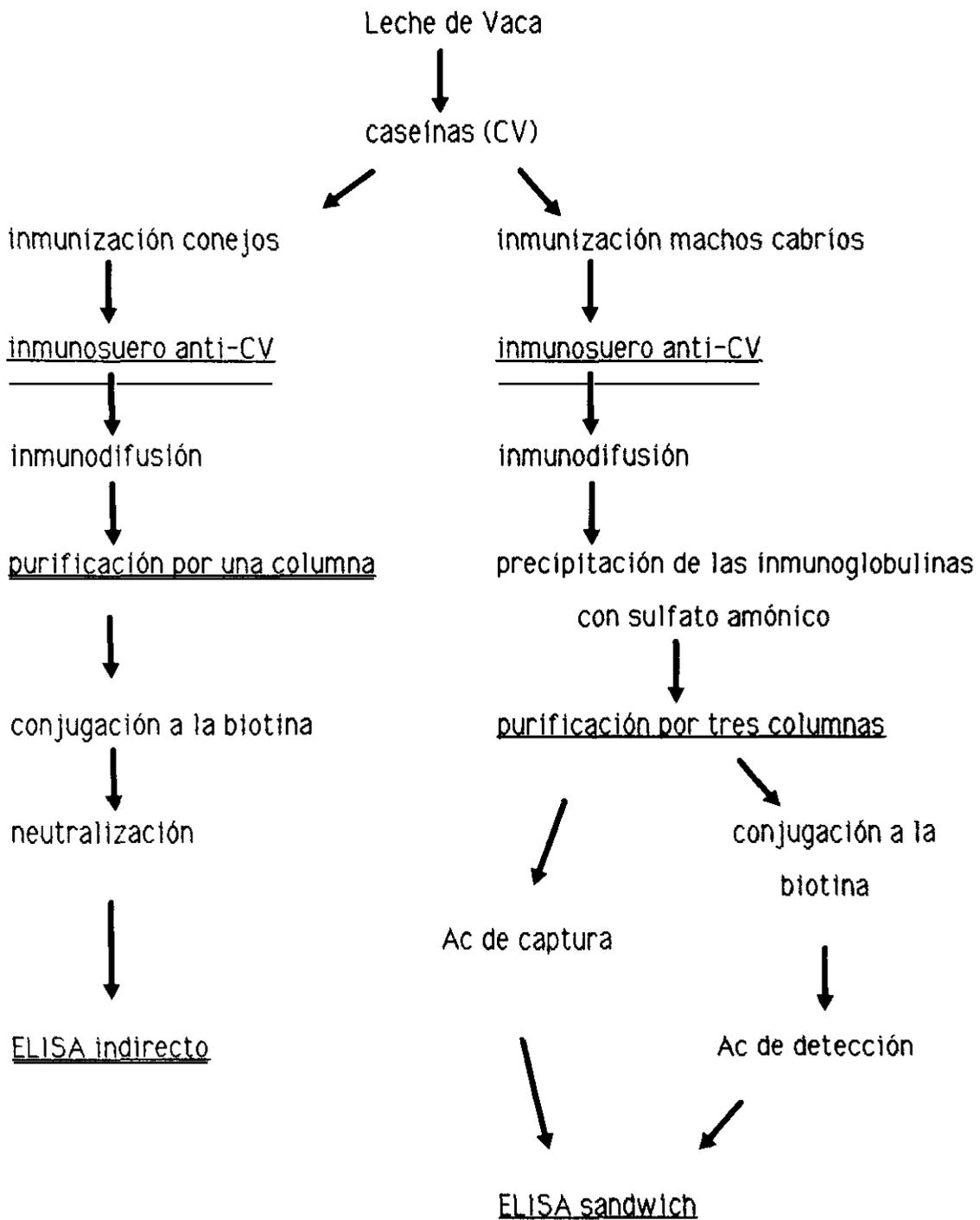


Figura IV. 1. Diagrama esquemático del trabajo desarrollado en la detección de leche de vaca en las mezclas de leche fresca y en los quesos madurados de oveja y cabra.

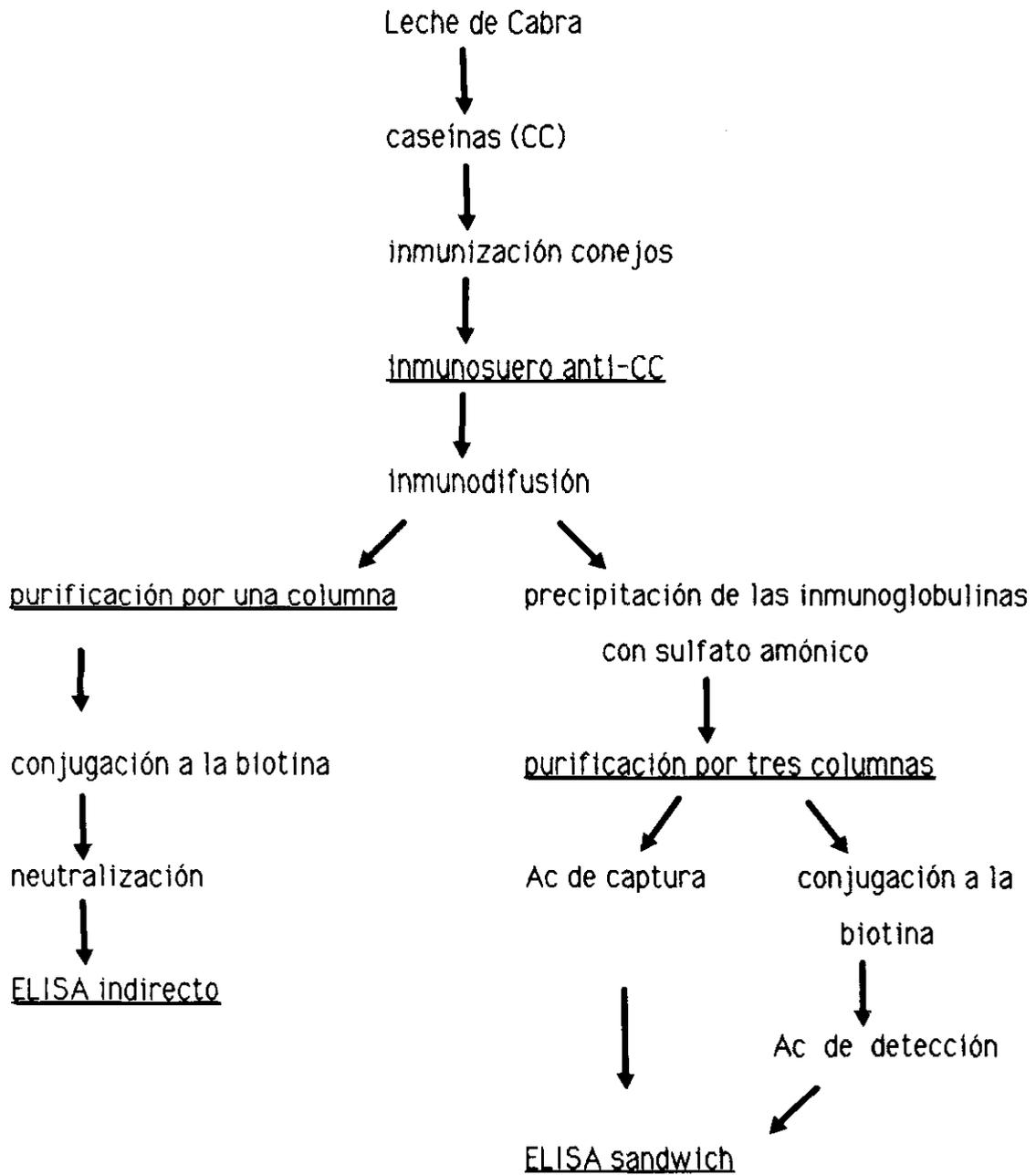


Figura IV. 2. Diagrama esquemático del trabajo desarrollado en la detección de leche de cabra en las mezclas de leche fresca y en los quesos madurados de oveja.

La Figura IV. 2 es un diagrama del trabajo desarrollado para la detección de leche de cabra en las mezclas de leche fresca y en los quesos madurados de oveja.

Para obtener inmunosuero anti-CC se emplearon caseínas liofilizadas de leche de cabra en la inmunización de los conejos. Este inmunosuero, se purificó pasándolo por una columna que contenía como ligando extracto antigénico CC; los anticuerpos anti-CC, así purificados, después de conjugados a la biotina y de neutralizados, se emplearon, como ya se ha dicho, en el desarrollo y puesta a punto de un ELISA indirecto para detectar la presencia de leche de cabra en la leche fresca y en los quesos madurados de oveja.

Los anticuerpos anti-CC de este mismo inmunosuero se purificaron pasándolos por tres columnas y se emplearon, según se ha dicho, en el desarrollo y puesta a punto de un ELISA sandwich con la finalidad antes señalada.

#### **IV. B. ANALISIS POR INMUNODIFUSION EN GELES DE AGAROSA, DE LOS INMUNOSUEROS OBTENIDOS AL INOCULAR CASEINAS DE DIVERSAS ESPECIES A LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACION.**

##### **IV. B. 1. ANALISIS DE LOS INMUNOSUEROS DE CONEJOS.**

En la obtención de los inmunosueros se emplearon 8 conejos, distribuidos en lotes de 4 animales. El lote A se inmunizó con caseínas liofilizadas de vaca (CV) y el lote B con caseínas de cabra (CC).

Como es costumbre, antes de iniciar la inmunización, se les extrajo a los conejos una muestra de sangre, que se analizó por inmunodifusión en geles de

agarosa frente a los extractos antigénicos liofilizados CV, CC y CO. Puesto que no se detectó ninguna línea de precipitación antígeno-anticuerpo, todos los animales se consideraron aptos para su inmunización.

Durante el periodo de inmunización de los animales se les realizaron tres sangrías parciales, para comprobar si producían anticuerpos frente a las caseínas inoculadas, así como para detectar si existían o no reacciones cruzadas con las caseínas de otras especies animales.

En la sangría parcial número 1, efectuada a los 30 días de la primera inoculación, ya se detectaron bandas de precipitación entre los inmunosueros y sus respectivos extractos antigénicos, así como reacciones cruzadas con los extractos antigénicos de otras especies animales. La inmunización finalizó a los 90 días de su inicio, momento en el que se sacrificaron los conejos. Como muestran la Tabla IV. 1 y las Figuras IV. 3 y IV. 4, al analizar los inmunosueros obtenidos frente a los distintos extractos antigénicos se observa que:

1. Cuando el inmunosuero anti-CV se enfrenta al extracto antigénico CV, aparecen 3 bandas de precipitación, mientras que frente a los extractos CC y CO sólo produce 2 bandas de precipitación.

2. Cuando el inmunosuero anti-CC se enfrenta al extracto antigénico CC, se observan 3 bandas de precipitación, frente al CV 2 y otras 2 frente al CO.

En todos los casos, la dilución del extracto antigénico más conveniente correspondió a la que contenía 50 mg del antígeno liofilizado por ml de agua destilada, ya que sus líneas de precipitación se presentaban más nítidas.

**TABLA IV.1. Bandas de precipitación detectadas por inmunodifusión en geles de agarosa, al enfrentar los inmunosueros anti-CV y anti-CC de las sangrías finales de conejos y el anti-CV de machos cabríos, con los extractos antigénicos CV, CC y CO.**

Inmunosuero	Nº de bandas de precipitación frente a los extractos de:		
	CV	CC	CO
Anti-CV de conejos	3	2	2
Anti-CC de conejos	2	3	2
Anti-CV de machos cabríos	2	0	1

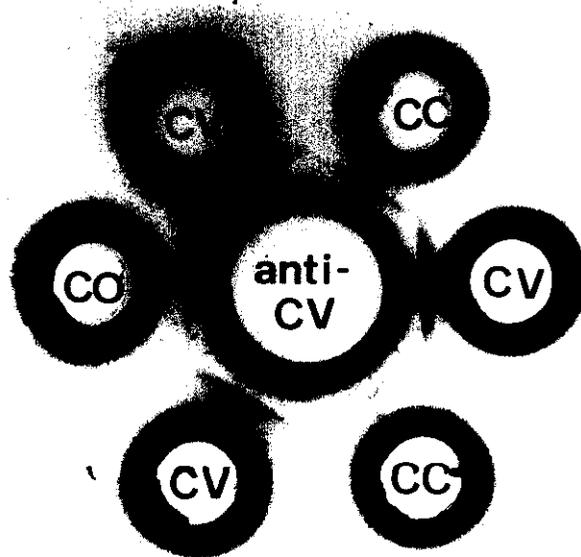


Figura IV. 3. Líneas de precipitación observadas al someter a inmunodifusión en geles de agarosa el inmunosuero anti-CV de conejos, frente a los extractos antigénicos CV, CC y CO.

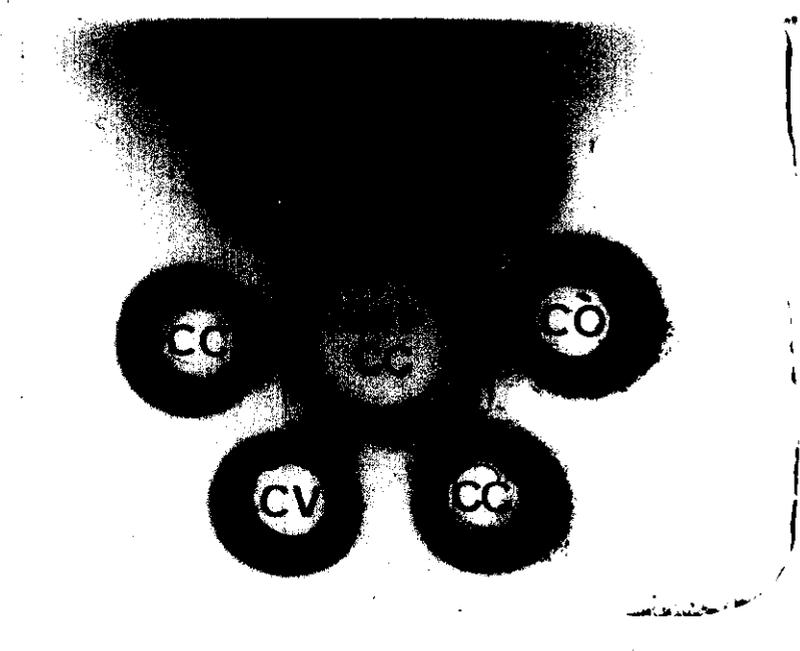


Figura IV. 4. Líneas de precipitación observadas al someter a inmunodifusión en geles de agarosa el Inmunesuero anti-CC de conejos, frente a los extractos antigénicos CC, CV y CO.

#### IV. B. 2. ANALISIS DE LOS INMUNOSUEROS DE MACHOS CABRIOS.

Al igual que en el caso de los conejos, antes de comenzar la inmunización de los animales se comprobó que su suero sanguíneo no producía reacciones de precipitación frente a los extractos antigénicos CV, CC y CO, por lo que los dos machos cabrios utilizados se consideraron aptos para su inmunización con las caseínas liofilizadas de leche de vaca (CV).

Durante la inmunización de los animales se realizaron tres sangrías parciales. En la primera, efectuada a las 5 semanas de la primera inoculación, ya se observaron bandas de precipitación; no obstante, conviene destacar que, contrariamente a los inmunosueros de conejos, el número de bandas de precipitación observadas fue menor. El inmunosero anti-CV de la sangría final efectuada a las 15 semanas, originaba 2 bandas de precipitación frente al extracto antigénico CV, una frente al CO, y ninguna frente al CC (Tabla IV. 1).

En este caso la dilución más conveniente del extracto antigénico fue la que contenía 25 mg del extracto antigénico liofilizado por ml de agua destilada.

#### IV. C. PURIFICACION DE LOS INMUNOSUEROS ANTI-CV Y ANTI-CC POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD.

Los resultados obtenidos por inmunodifusión en geles de agarosa, demostraron que los inmunosueros anti-CV y anti-CC de conejos y el anti-CV de machos cabrios, producían reacciones cruzadas con caseínas de especies animales distintas de las que se inocularon. En consecuencia, dichos inmunosueros no podrían utilizarse con fiabilidad para detectar el origen

específico de la leche de mezclas lácteas y de quesos madurados a no ser que se procediese a su purificación.

#### IV. C. 1. PURIFICACION DEL INMUNOSUERO ANTI-CV DE CONEJOS.

Con la purificación se pretende recuperar del inmunosuero total los anticuerpos que reconocen a las caseínas de leche de vaca. Para ello, el inmunosuero anti-CV se pasó por una columna de afinidad que contenía como ligando el extracto antigénico CV. Los anticuerpos que lo reconocen son retenidos en la columna y posteriormente eluidos.

En la Figura IV. 5 se muestra la absorbancia a 280 nm, de las fracciones eluidas tras depositar una alícuota del inmunosuero anti-CV en la columna cuyo ligando era la caseína de leche de vaca; como eluente de los anticuerpos adsorbidos se empleó un tampón de dietilamina 0,05 M de pH 11,5. Los anticuerpos de interés se localizaron en el segundo pico cromatográfico. La concentración de proteína de los anticuerpos purificados y liofilizados fue de 10 µg/mg de polvo liofilizado.

Los anticuerpos anti-CV así purificados se resuspendieron en agua destilada (5 mg de polvo liofilizado/150 µl de agua) y se sometieron a inmunodifusión en geles de agarosa frente a los extractos antigénicos CV, CC y CO. Se apreciaron tres bandas de precipitación, una frente a cada extracto (CV, CC y CO).

#### IV. C. 2. PURIFICACION DEL INMUNOSUERO ANTI-CV DE MACHOS CABRIOS.

Como se ha descrito en la sección III. B. 4. 2. 4, para purificar el

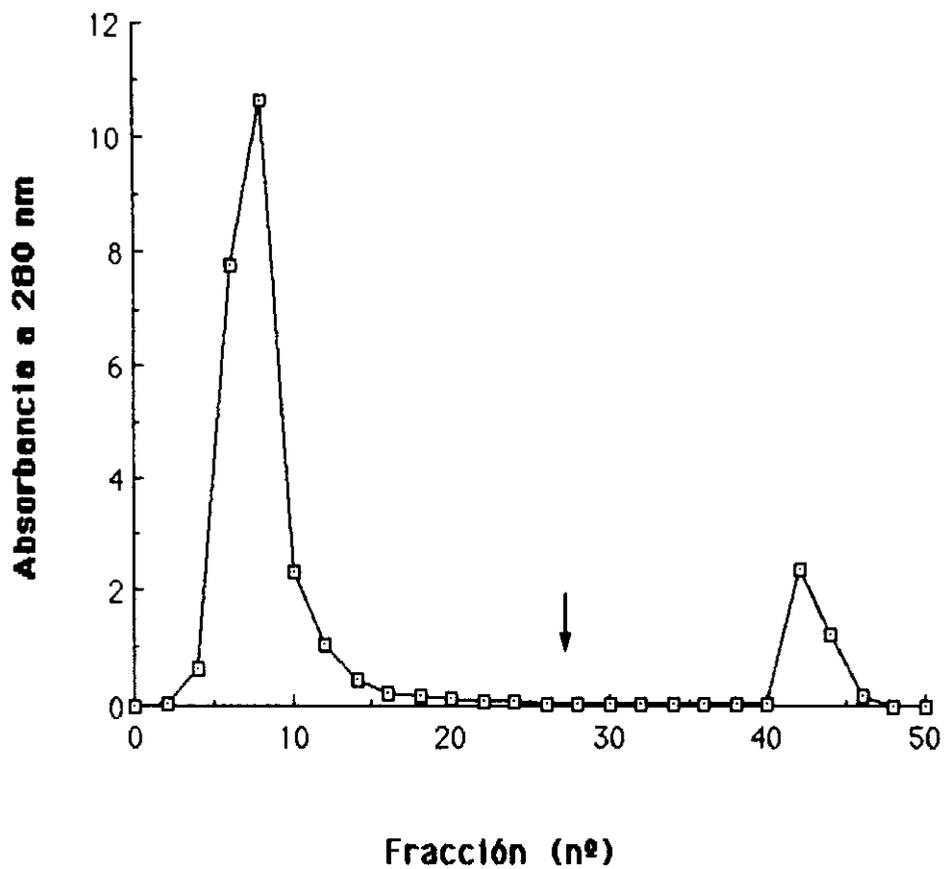


Figura IV. 5. Purificación del Inmunosero anti-CV de conejos, pasándolo por una columna de Sepharosa 4B-CNBr que contiene como ligando de afinidad extracto antigénico CV. La flecha indica el cambio del tampón PBS por el de elución (dietilamina 0,05 M de pH 11,5).

inmunesuero anti-CV de machos cabríos primero se precipitaron las inmunoglobulinas del inmunesuero total con sulfato amónico y más tarde se purificaron por cromatografía de afinidad en tres columnas.

#### IV. C. 2. 1. Precipitación de las inmunoglobulinas con sulfato amónico.

Las inmunoglobulinas anti-CV de machos cabríos se separaron del inmunesuero total por precipitación con una solución saturada de sulfato amónico, siguiendo básicamente el protocolo descrito por Harlow y Lane (1988). Para verificar la eficacia de este proceso, tanto el sedimento, como el sobrenadante de los inmunesueros precipitados se sometieron a un ELISA indirecto para comprobar la presencia de inmunoglobulinas de cabra. Las concentraciones óptimas de los reactivos utilizados en el ensayo fueron las siguientes:

- Antígenos: soluciones de caseínas liofilizadas de vaca (18,4 mg/ml), oveja (21,9 mg/ml) y cabra (13,98 mg/ml) en tampón PBS, diluidas 1/10 (v/v) en el mismo tampón.

- Anticuerpos: sedimentos y sobrenadantes de los inmunesueros precipitados, obtenidos según se describe en la sección III. B. 4. 2. 4. 1, en tampón PBST diluidos 1/250 (v/v).

- Conjugado: anti-inmunoglobulinas de cabra obtenidas de conejo y conjugadas a la peroxidasa (Sigma), diluidas en tampón PBST 1/500 (v/v).

- Sustrato: solución de ABTS preparada como se describe en la sección III. B.

#### 4.5.1.4.

Una vez realizado el ELISA indirecto en las condiciones descritas, se midió la absorbancia a 405 nm de los pocillos que contenían el sedimento de los inmunosueros precipitados frente a las caseínas de vaca, oveja y cabra; tal absorbancia fue de 2,471, 2,372 y 2,395, respectivamente. Por el contrario, las absorbancias de los pocillos que contenían el sobrenadante fueron, respectivamente, 0,072, 0,073 y 0,071.

Estos resultados indican que la precipitación de las inmunoglobulinas era la correcta y que no ocurrían pérdidas en el sobrenadante. No obstante, y como se esperaba, las inmunoglobulinas precipitadas no diferenciaban las caseínas de vaca de las de oveja o de cabra, por lo que se purificaron más tarde por cromatografía de afinidad.

#### IV. C. 2. 2. Purificación por tres columnas.

Para separar de las inmunoglobulinas precipitadas del inmunosuero total, las que reconocían como antígenos a las caseínas de cabra y oveja, se procedió a su purificación por tres columnas de afinidad que contenían los extractos antigénicos CC, CO y CV. Se siguió la metodología descrita en la sección III. B. 4. 2. 4. 2 de este trabajo.

En la Figura IV. 6 se muestra la absorbancia a 280 nm de las fracciones eluidas. El contenido proteico de los anticuerpos purificados fue de 16 µg de proteína/mg de polvo liofilizado.

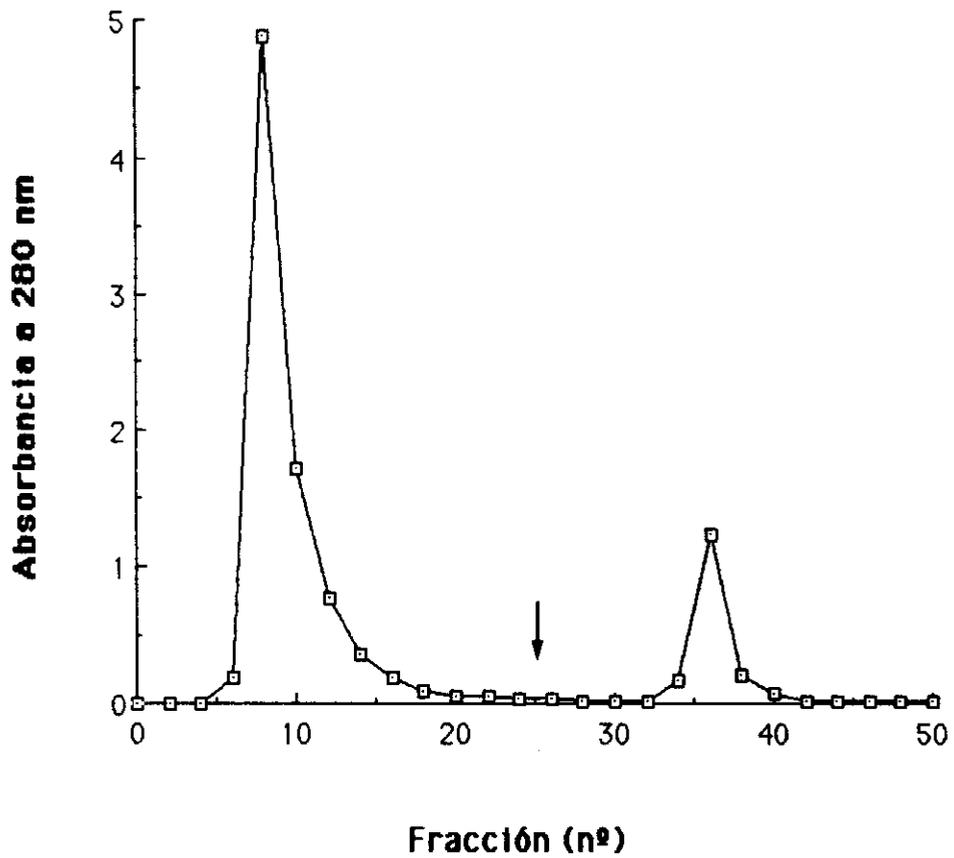


Figura IV.6. Purificación de los anticuerpos anti-CV de machos cabríos, pasándolos por tres columnas de Sepharosa 4B-CNBr que contienen como ligandos de afinidad extractos antigénicos CC, CO y CV. La flecha indica el cambio del tampón PBS por el de elución (dietilamina 0,05 M, pH 11,5).

La especificidad de los anticuerpos anti-CV purificados se determinó con un ELISA indirecto frente a las caseínas de vaca, cabra y oveja, en condiciones similares a las descritas en la sección IV. C. 2. 1. En este caso, la dilución óptima de los antígenos fue la 1/200 y la de los anticuerpos la 1/100. La absorbancia a 405 nm de los pocillos que contenían las caseínas de vaca, oveja y cabra, fue, respectivamente, de 2,415, 0,071 y 0,069.

En consecuencia, los anticuerpos anti-CV de machos cabríos, precipitados con sulfato amónico y purificados por tres columnas, se consideraron aptos para su utilización como anticuerpos de captura y de detección en la técnica del ELISA sandwich.

#### IV. C. 3. PURIFICACION DEL INMUNOSUERO ANTI-CC DE CONEJOS.

Se realizó pasándolo por una columna, cuando iba a utilizarse en el ELISA indirecto, o bien por tres columnas (después de precipitar las inmunoglobulinas con sulfato amónico) cuando se destinaba al ELISA sandwich.

##### IV. C. 3. 1. Purificación por una columna.

Se realizó de la manera descrita en la sección IV. C. 1, pero utilizando una columna de afinidad que contenía como ligando extracto antigénico CC.

Las absorbancias a 280 nm de las fracciones eluidas fueron similares a las de la Figura IV. 5; la concentración de proteína de los anticuerpos purificados y liofilizados fue de 16 µg/mg de polvo liofilizado.

Una fracción de los anticuerpos anti-CC purificados se resuspendió en agua destilada (5 mg de polvo liofilizado/150  $\mu$ l de agua), analizándose por inmunodifusión en geles de agarosa frente a los extractos antigénicos CC, CV y CO; se observó una banda de precipitación frente a cada uno de estos extractos.

#### IV. C. 3. 2. Precipitación de las inmunoglobulinas con sulfato amónico.

Para la precipitación de las inmunoglobulinas del inmunosuero anti-CC de conejos, se siguió la pauta descrita para el inmunosuero anti-CV de machos cabrios (sección IV. C. 2. 1). La eficacia del proceso de precipitación se comprobó con un ELISA indirecto; como conjugado utilizamos uno comercial que contenía anti-inmunoglobulinas de conejo, de origen caprino conjugadas a peroxidasa de rábano (Sigma); se utilizó diluido 1/1000 en tampón PBST.

#### IV. C. 3. 3. Purificación por tres columnas.

Las inmunoglobulinas precipitadas que reconocían como antígenos a las caseínas de oveja y vaca, se eliminaron pasando el inmunosuero correspondiente por tres columnas de afinidad cuyos ligandos eran, respectivamente, los extractos antigénicos CO, CV y CC. La absorbancia a 280 nm de las fracciones eluidas de la última columna, fueron iguales a las de la Figura IV. 6. En este caso el contenido proteico de los anticuerpos purificados fue de 8,44  $\mu$ g de proteína por mg de polvo liofilizado.

Los anticuerpos anti-CC purificados también se analizaron por un ELISA indirecto para comprobar si diferenciaban las caseínas de cabra de las de vaca y oveja. En un ensayo realizado como el descrito en la sección IV. C. 2. 2, se vio que

las diluciones óptimas de los antígenos y del anticuerpo fueron, respectivamente, de 1/100 y de 1/50. Asimismo, la absorbancia a 405 nm de los pocillos que contenían las caseínas de cabra, oveja y vaca fue, respectivamente, de 2,403, 0,068 y 0,074.

#### **IV. D. DETECCIÓN DE LECHE DE VACA EN LA LECHE FRESCA Y EN LOS QUESOS MADURADOS DE OVEJA POR TECNICAS INMUNOENZIMATICAS (ELISA)**

Para la detección y cuantificación de la leche de vaca en las mezclas de leche fresca y en los quesos madurados de oveja, se utilizaron anticuerpos purificados como sigue:

a) En el ELISA indirecto; anticuerpos anti-CV de conejos, purificados pasándolos por una columna, que se conjugaron con la biotina y se neutralizaron con caseínas de cabra y oveja.

b) En el ELISA sandwich; anticuerpos anti-CV de machos cabríos, precipitados con sulfato amónico, purificados pasándolos por tres columnas y conjugados o no a la biotina (anticuerpos de detección y de captura respectivamente).

##### **IV. D. 1. DETECCIÓN DE LECHE DE VACA EN LA LECHE FRESCA DE OVEJA POR LA TECNICA DEL ELISA INDIRECTO.**

Se utilizaron, como antígenos, leches crudas de vaca y de oveja; como anticuerpos los anti-CV de conejos (1 mg/ml), y como conjugado la

ExtrAvidina-peroxidasa de rábano (Sigma).

Primero se determinaron las diluciones óptimas de reactivos que intervienen en el ensayo, según el protocolo descrito en la sección III. B. 4. 5. 1.

Tras varios ensayos se vio que las concentraciones de extractos antigénicos CC y CO más idóneas para la neutralización de los anticuerpos anti-CV eran las de 0,557 y 0,876 mg/ml de tampón PBST, respectivamente.

Las diluciones de trabajo del inmunosuero neutralizado y del conjugado, se dedujeron de los resultados de las pruebas que se resumen en las Tablas IV. 2 y IV. 3. Los resultados obtenidos indican que los anticuerpos anti-CV neutralizados detectan la leche de vaca en la de oveja cuando se utilizan diluidos 1/200 (véase Tabla IV. 3) y el conjugado correspondiente se encuentra a una dilución de 1/3000 (Tabla IV. 2). Las diluciones de las leches de vaca y oveja empleadas estuvieron comprendidas entre 1/500 y 1/64000.

La eficacia de la neutralización o bloqueo de los anticuerpos anti-CV purificados por una columna se muestra en la Figura IV. 7. De esta experiencia, realizada con concentraciones decrecientes de leches de vaca, oveja y cabra, se concluye que los anticuerpos anti-CV sin neutralizar no diferencian la leche de vaca de las de oveja y cabra. Con los anticuerpos neutralizados, la dilución de antígeno más adecuada para la detección de las leches de estas especies es la de 1/2000.

Finalmente, se utilizó el ELISA indirecto para detectar la presencia de leche de vaca en mezclas experimentales que contenían 0, 1, 5, 10, 15, 25, 50 y 100 %

**TABLA IV. 2. ELISA indirecto para la detección de leche de vaca en la de oveja. Determinación de la concentración idónea de conjugado con los anticuerpos anti-CV neutralizados y diluidos 1/200.**

Diluciones de la leche de vaca u oveja	Diluciones del conjugado:			
	1/1500		1/3000	
	Vaca	Oveja	Vaca	Oveja
1/500	2,567	0,416	2,523	0,467
1/1000	2,547	0,385	2,475	0,309
1/2000	2,551	0,372	2,493	0,283
1/4000	2,531	0,376	2,467	0,287
1/8000	2,454	0,367	2,404	0,278
1/16000	2,499	0,369	2,334	0,281
1/32000	2,384	0,349	2,154	0,293
1/64000	2,141	0,374	1,715	0,287

**TABLA IV. 3. ELISA indirecto para la detección de leche de vaca en la de oveja. Determinación de la concentración idónea de los anticuerpos anti-CV neutralizados, con el conjugado a la dilución 1/3000.**

Diluciones de la leche de vaca u oveja	Diluciones de los anticuerpos anti-CV			
	1/200		1/400	
	Vaca	Oveja	Vaca	Oveja
1/500	2,523	0,467	1,889	0,334
1/1000	2,475	0,309	1,902	0,253
1/2000	2,493	0,283	1,933	0,253
1/4000	2,467	0,287	2,031	0,248
1/8000	2,404	0,278	1,955	0,244
1/16000	2,334	0,281	1,763	0,233
1/32000	2,154	0,293	1,330	0,251
1/64000	1,715	0,287	1,002	0,198

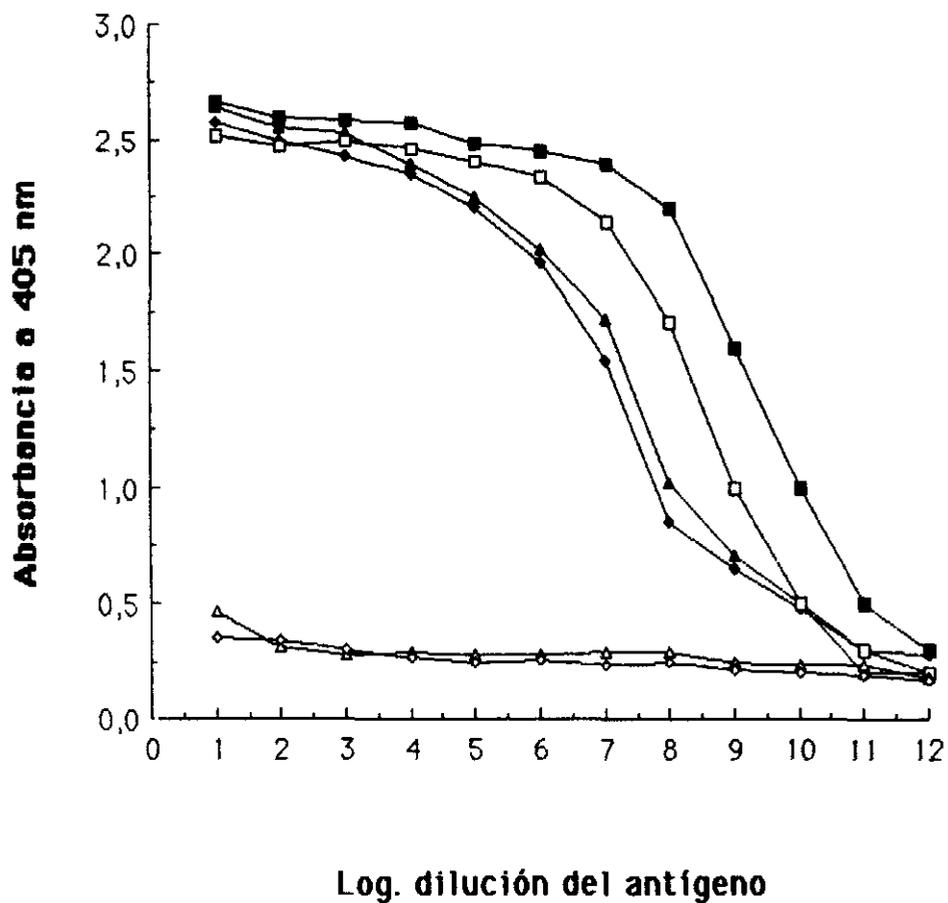


Figura IV. 7. Evaluación de los anticuerpos anti-CV, neutralizados y sin neutralizar, para diferenciar las leches de vaca (■), oveja (▲) y cabra (◆), mediante un ELISA indirecto. Inmunosuero a la dilución 1/200, sin neutralizar (símbolos llenos), y neutralizado (símbolos vacíos). Dilución del conjugado 1/3000.

de leche de vaca en la de oveja. En la Figura IV. 8 se muestran los resultados obtenidos; cada punto representa la media, con la correspondiente desviación estándar, de seis experiencias diferentes. Con esta técnica y con los reactivos descritos, se puede detectar la sustitución de un 1-50% de leche de vaca (V) en la de oveja, mediante la ecuación:

$$A_{405} = 0,224 + 0,035 (\%V)$$

cuyo coeficiente de correlación es  $r = 0,992$ .

#### IV. D. 2. DETECCION DE LECHE DE VACA EN LOS QUESOS MADURADOS DE OVEJA POR LA TECNICA DEL ELISA INDIRECTO.

El inmunosuero y el conjugado utilizados fueron los mismos que los descritos en el apartado anterior. Como antígenos se emplearon queso de vaca, de oveja y de sus mezclas, preparados de la manera descrita en la sección III. B. 4. 5. 1.1 de este trabajo.

Las concentraciones más idóneas de los extractos antigénicos CC y CO, utilizadas en la neutralización de los anticuerpos anti-CV, fueron iguales que las descritas en la sección anterior. Asimismo, la dilución más apropiada del conjugado ExtrAvidina-peroxidasa de rábano fue también la de 1/3000.

Los resultados de la Tabla IV. 4 indican, que la dilución óptima para la utilización en el ELISA indirecto de los anticuerpos anti-CV, purificados por una columna, biotinizados y neutralizados es la de 1/200.

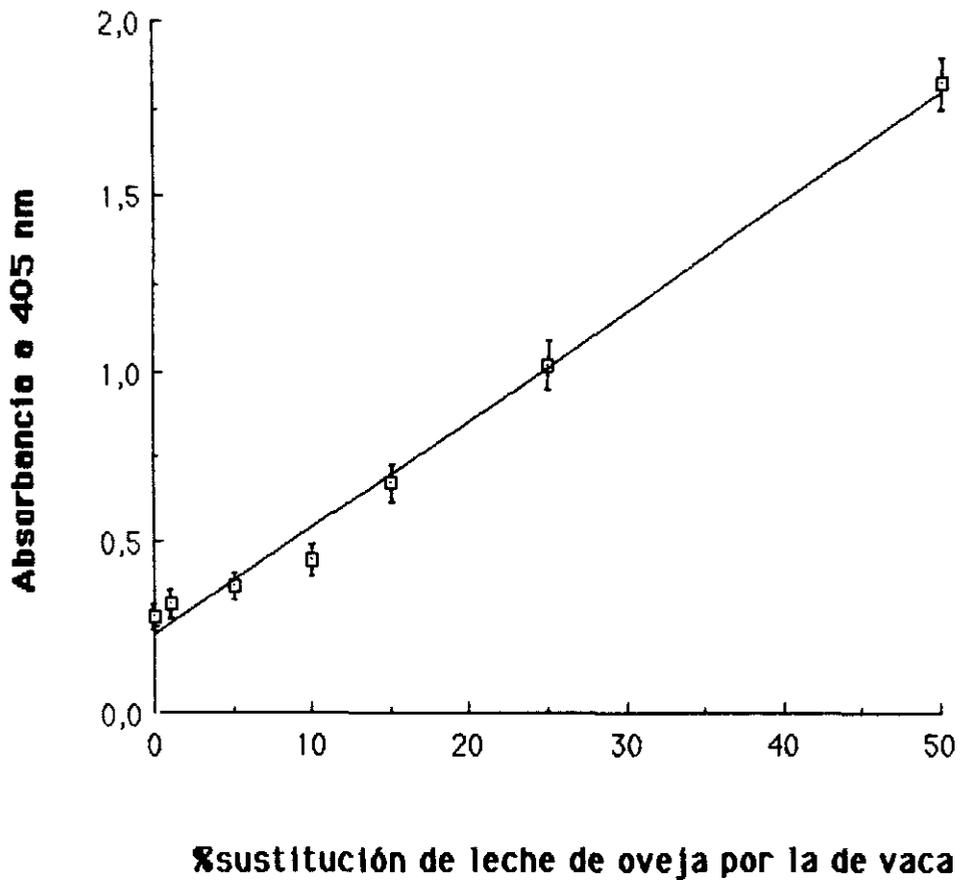


Figura IV. 8. Detección de leche de vaca, en mezclas lácteas experimentales de oveja/vaca, por la técnica del ELISA indirecto, empleando como antígenos las mezclas de leche diluídas 1/2000 y como inmunosuero los anticuerpos anti-CV, purificados por una columna, biotinizados, neutralizados y diluídos 1/200. Dilución del conjugado 1/3000. Cada punto de la gráfica corresponde a la media y desviación estándar de los resultados de seis experiencias diferentes.

**TABLA IV. 4. ELISA indirecto para la detección de leche de vaca en el queso de oveja. Determinación de la concentración idónea de anticuerpos anti-CV neutralizados, con el conjugado a la dilución 1/3000.**

Diluciones de los extractos de queso de vaca o de oveja	Diluciones de los anticuerpos anti-CV					
	1/100		1/200		1/400	
	Vaca	Oveja	Vaca	Oveja	Vaca	Oveja
1/100	2,538	0,581	2,522	0,395	2,205	0,330
1/200	2,535	0,561	2,486	0,312	2,155	0,330
1/400	2,437	0,673	2,467	0,309	2,136	0,304
1/800	2,534	0,677	2,486	0,392	1,994	0,329
1/1600	2,475	0,661	2,304	0,410	1,581	0,347
1/3200	2,495	0,668	1,984	0,400	1,184	0,377
1/6400	2,415	0,579	1,481	0,402	0,862	0,391
1/12800	2,011	0,584	1,063	0,434	0,594	0,393
1/25600	1,350	0,555	0,736	0,427	0,415	0,402

En la Figura IV. 9 se muestra la especificidad de los inmunosueros neutralizados y sin neutralizar para diferenciar los extractos de quesos de vaca, oveja y cabra, empleando extractos antigénicos a diluciones comprendidas entre 1/100 y 1/25600. De los resultados obtenidos se deduce que la dilución de extractos antigénicos más apropiada para diferenciar el queso de vaca de los de oveja y cabra es la de 1/400. También se aprecia en la misma figura, que el Inmunosuero sin neutralizar es incapaz de diferenciar los extractos de queso de las tres especies animales señaladas.

Una vez determinadas experimentalmente las condiciones óptimas del ensayo, se procedió al análisis de mezclas experimentales de quesos de oveja que contenían 0, 1, 5, 10, 15, 25, 50 y 100 % de queso de vaca. En la Figura IV. 10 se muestran los valores medios de la absorbancia a 405 nm de dos mezclas experimentales de quesos de vaca y oveja, procedentes de 6 experiencias diferentes. Como puede apreciarse, con la técnica y los reactivos descritos es posible cuantificar la sustitución de un 1 a un 50 % de queso de oveja por el de vaca (V), mediante la ecuación:

$$A_{405} = 0,271 + 0,045 (\%V)$$

cuyo coeficiente de correlación es  $r = 0,997$ .

#### IV. D. 3. DETECCION DE LECHE DE VACA EN LA LECHE FRESCA DE OVEJA POR LA TECNICA DEL ELISA SANDWICH.

Para la detección y cuantificación de la leche de vaca en las mezclas de leche fresca y en los quesos madurados de oveja, se ha desarrollado y puesto a

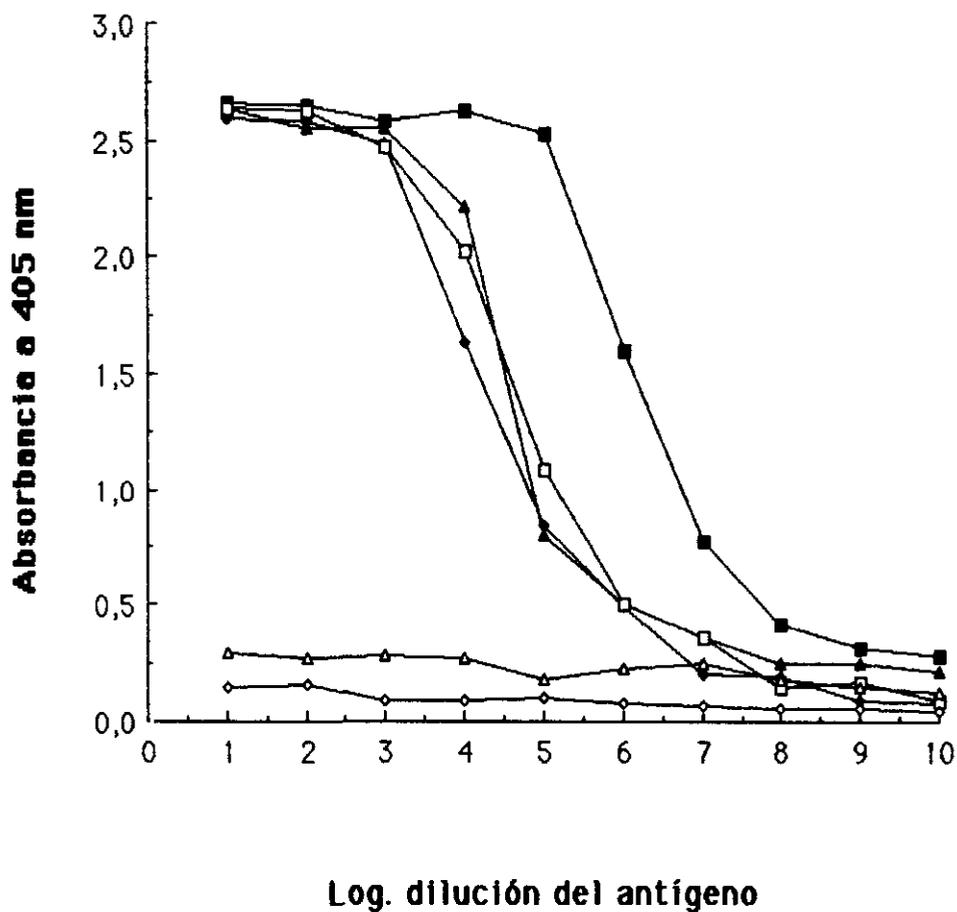


Figura IV. 9. Evaluación de los anticuerpos anti-CV, neutralizados y sin neutralizar, para diferenciar los quesos de vaca (■), oveja (▲) y cabra (◆), mediante un ELISA indirecto. Inmunosuero a la dilución 1/200, sin neutralizar (símbolos llenos), y neutralizado (símbolos vacíos). Dilución del conjugado 1/3000.

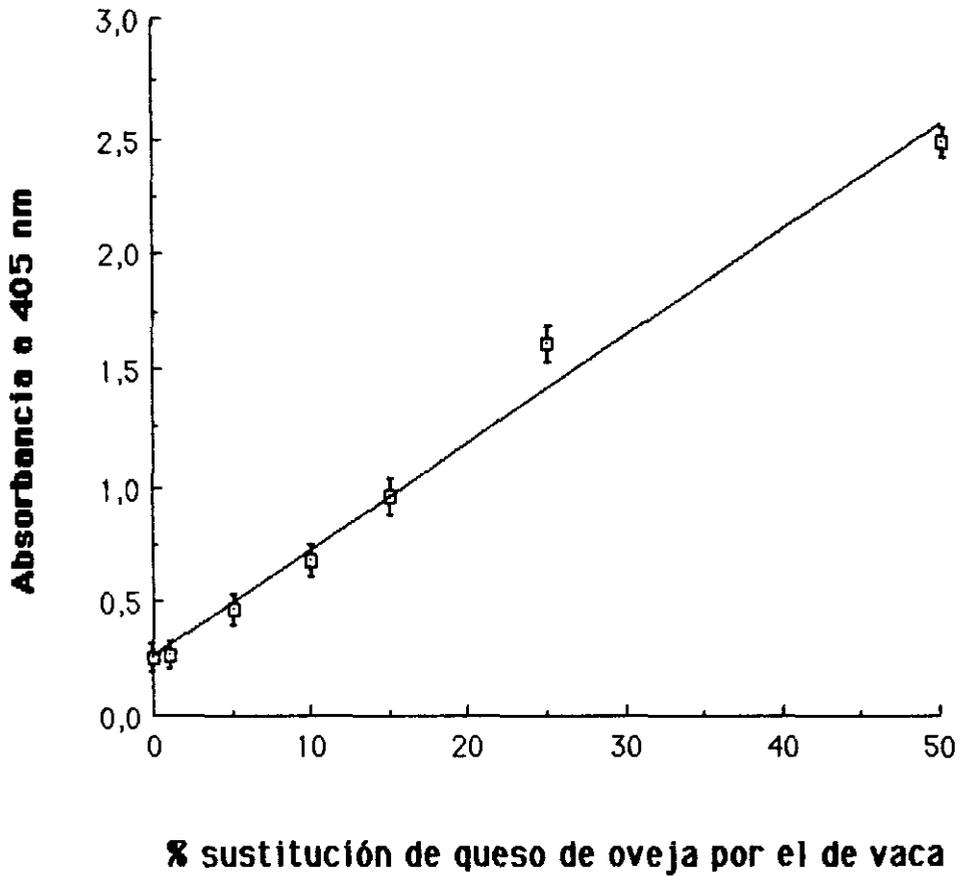


Figura IV. 10. Detección de leche de vaca, en mezclas experimentales de quesos vaca/oveja, por la técnica del ELISA indirecto, empleando como antígenos los extractos de quesos diluidos 1/400 y como inmunosuero los anticuerpos anti-CV, purificados por una columna, biotinizados, neutralizados y diluidos 1/200. Dilución del conjugado 1/3000. Cada punto de la gráfica corresponde a la media y desviación estándar de los resultados de seis experiencias diferentes con dos mezclas de quesos distintas.

punto, además del ELISA indirecto previamente descrito, una técnica de ELISA sandwich que utiliza los anticuerpos de captura y detección descritos en la sección IV. D.

Para desarrollar un ELISA sandwich que permita alcanzar el objetivo descrito, primero deben determinarse las diluciones óptimas de los anticuerpos de captura y detección, de los antígenos y del conjugado, siguiendo el protocolo descrito en la sección III. B. 4. 5. 2. De acuerdo con estos ensayos y como se muestra en la Tabla IV. 5, se encontró que en las condiciones de nuestro trabajo la dilución más apropiada de los anticuerpos de captura (1 mg de proteína/ml) y de los de detección (1,05 mg de proteína/ml) era la de 1/500.

Asimismo, los resultados de la Tabla IV. 5 y Figura IV. 11 indican que la dilución más adecuada del antígeno para diferenciar la leche de vaca de las de oveja y cabra correspondía a la 1/400. La dilución óptima del conjugado ExtrAvidina-peroxidasa fue la de 1/3000.

Establecidas las concentraciones óptimas de los reactivos que intervienen en el ELISA sandwich, se procedió a evaluar la presencia de leche de vaca en dos mezclas lácteas experimentales cuyos porcentajes de sustitución de leche de oveja por la de vaca eran 0; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5, 10, 15, 25, 50 y 100 %.

La Figura IV. 12 muestra la capacidad de los anticuerpos de captura y de detección, para detectar y cuantificar la presencia de leche de vaca en mezclas lácteas experimentales con leche de oveja. Con esta técnica y con los reactivos descritos se puede cuantificar la sustitución de un 0,1 a un 25 % de leche de oveja por la de vaca (V), mediante la ecuación:

**TABLA IV. 5. ELISA sandwich para la detección de leche de vaca en la de oveja. Determinación de la concentración idónea de anticuerpos específicos anti-CV, con el conjugado a la dilución 1/3000.**

Diluciones de la leche de vaca	Diluciones de los anticuerpos de detección					
	1/500			1/1000		
	Anticuerpos de captura					
	1/250	1/500	1/1000	1/250	1/500	1/1000
1/100	1,509	1,598	1,110	0,622	0,833	0,680
1/200	1,714	2,214	1,685	0,648	1,449	0,776
1/400	2,199	2,408	1,906	1,072	1,480	1,064
1/800	2,043	2,162	2,192	0,867	1,367	0,778
1/1600	1,099	1,233	1,140	0,493	0,795	0,485
1/3200	0,393	0,574	0,394	0,201	0,292	0,132
1/6400	0,095	0,060	0,060	0,065	0,061	0,062
1/12800	0,072	0,060	0,061	0,060	0,059	0,060

TABLA IV. 5. (continuación).

Diluciones de la leche de oveja	Diluciones de los anticuerpos de detección					
	1/500			1/1000		
	Anticuerpos de captura					
	1/250	1/500	1/1000	1/250	1/500	1/1000
1/100	0,081	0,069	0,067	0,064	0,061	0,064
1/200	0,080	0,069	0,070	0,067	0,065	0,065
1/400	0,082	0,071	0,065	0,073	0,066	0,065
1/800	0,075	0,070	0,064	0,063	0,063	0,060
1/1600	0,075	0,066	0,068	0,064	0,062	0,067
1/3200	0,074	0,066	0,068	0,066	0,060	0,063
1/6400	0,068	0,065	0,062	0,061	0,060	0,060
1/12800	0,070	0,064	0,061	0,067	0,065	0,063

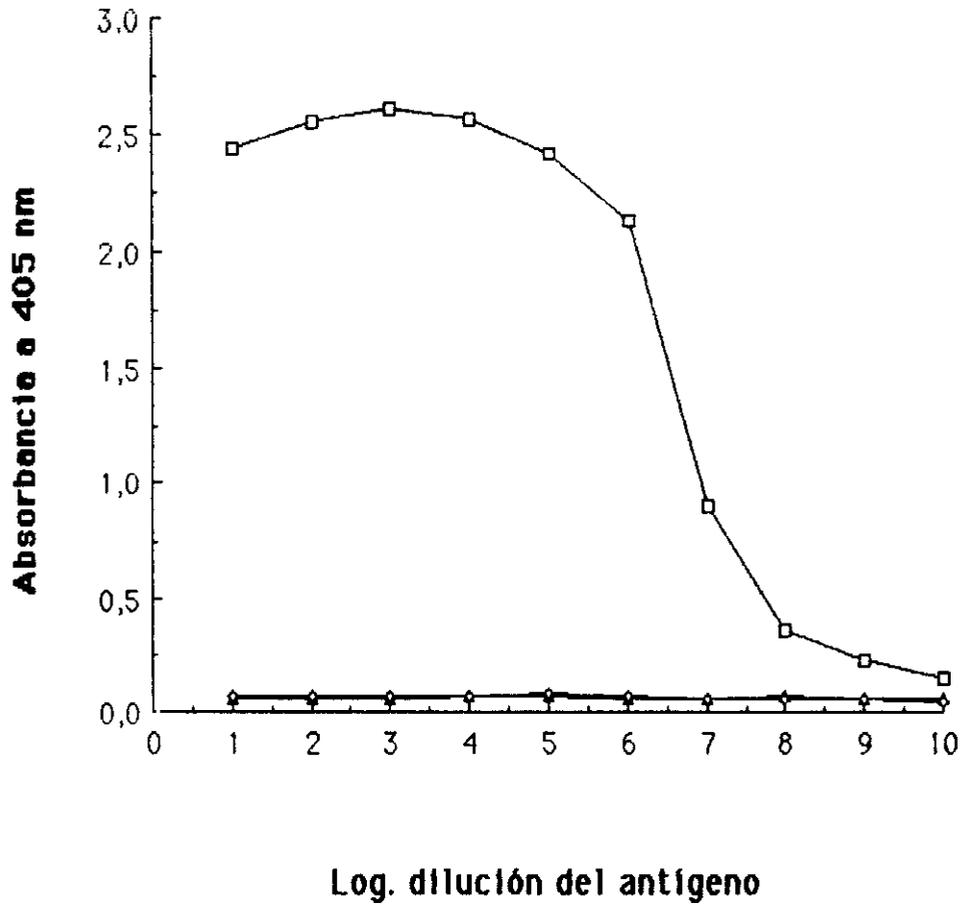


Figura IV. 11. Evaluación de los anticuerpos anti-CV, de captura y detección, para diferenciar la leche de vaca (□) de las de oveja (△) y cabra (◇) por un ELISA sandwich. Anticuerpos de captura y de detección a la dilución 1/500. Conjugado 1/3000.

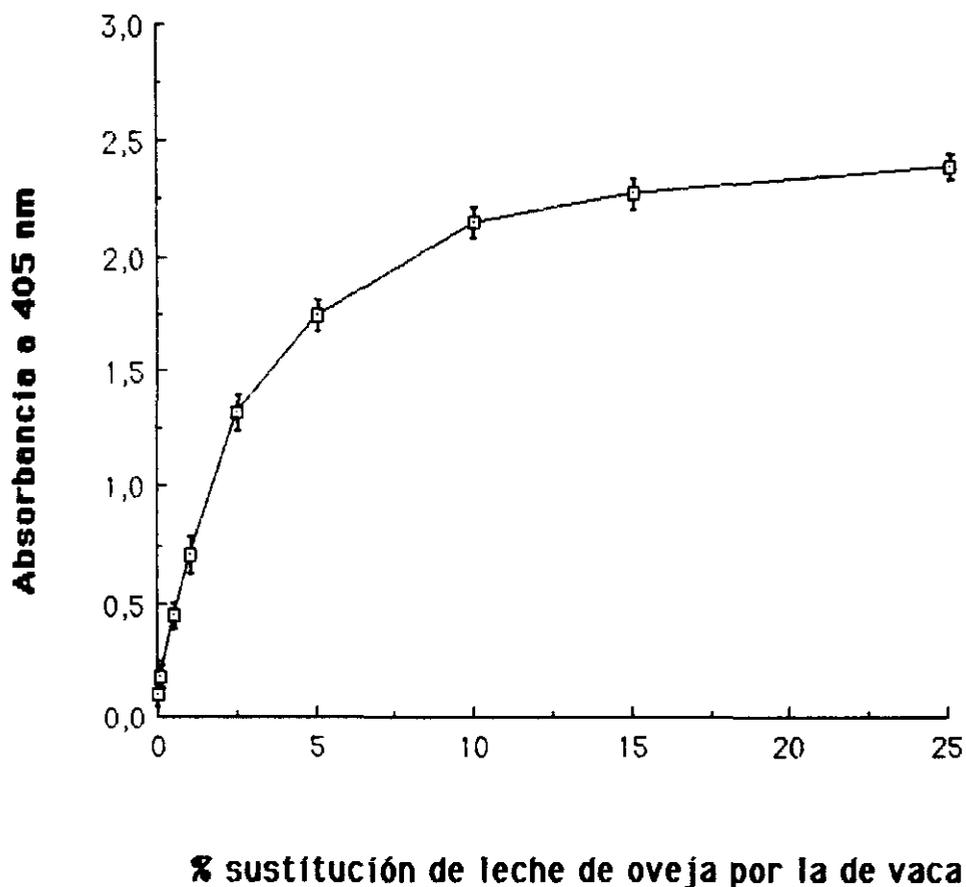


Figura IV. 12. Detección de leche de vaca en la de oveja, por la técnica del ELISA sandwich, empleando como antígenos mezclas de leches diluídas 1/400 y como inmunosueros anticuerpos anti-CV, de captura y de detección, a la 1/500. Dilución del conjugado 1/3000. Cada punto de la gráfica corresponde a la media y desviación estándar de los resultados de seis experiencias diferentes.

$$A_{405} = 0,963 + 0,454 \ln (\%V)$$

cuyo coeficiente de correlación es  $r = 0,980$ .

#### IV. D. 4. DETECCION DE LECHE DE VACA EN LOS QUESOS MADURADOS DE OVEJA POR LA TECNICA DEL ELISA SANDWICH.

Se utilizaron los mismos anticuerpos y conjugado descritos en la sección anterior. Como antígenos se emplearon extractos de quesos de vaca, de oveja y de sus mezclas, obtenidos de la manera descrita en la sección III. B. 4. 5. 1. 1.

Primero se determinaron las diluciones óptimas de los anticuerpos de captura y detección que intervienen en el ensayo. De los resultados de la Tabla IV. 6 se deduce que en la detección de leche de vaca en los quesos madurados de oveja, utilizando la técnica del ELISA sandwich, la dilución óptima del anticuerpo de captura es la de 1/500, y la de los anticuerpos de detección la de 1/1000. La dilución óptima de conjugado es la de 1/3000.

De los resultados de la Tabla IV. 6 y de la Figura IV. 13 se deduce que la dilución óptima de los extractos de queso es la de 1/10.

Con los mismos reactivos y a las diluciones antes establecidas, se procedió a la detección de leche de vaca en mezclas experimentales de queso de oveja que contenían 0; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5, 10, 15, 25, 50 y 100 % de queso de vaca. La Figura IV. 14 muestra los resultados obtenidos. Empleando la ecuación:

**TABLA IV. 6. ELISA sandwich para la detección de leche de vaca en queso de oveja. Determinación de la concentración idónea de anticuerpos específicos anti-CV, de captura y de detección; conjugado a una dilución de 1/3000.**

Diluciones de los extractos de queso de vaca u oveja	Diluciones de los anticuerpos de detección							
	1/500				1/1000			
	Anticuerpos de captura							
	1/500		1/1000		1/500		1/1000	
	Vaca	Oveja	Vaca	Oveja	Vaca	Oveja	Vaca	Oveja
1/10	2,570	0,260	2,523	0,163	2,547	0,140	2,250	0,063
1/20	2,530	0,290	2,550	0,071	2,531	0,153	2,380	0,070
1/40	2,591	0,271	2,561	0,078	2,580	0,130	2,330	0,069
1/80	2,582	0,284	2,430	0,090	2,143	0,100	1,623	0,067
1/160	1,920	0,247	1,230	0,081	1,053	0,110	0,631	0,068
1/320	0,972	0,250	0,473	0,103	0,451	0,103	0,230	0,065
1/640	0,512	0,223	0,230	0,091	0,270	0,101	0,157	0,063
1/1280	0,440	0,251	0,311	0,090	0,193	0,120	0,063	0,061

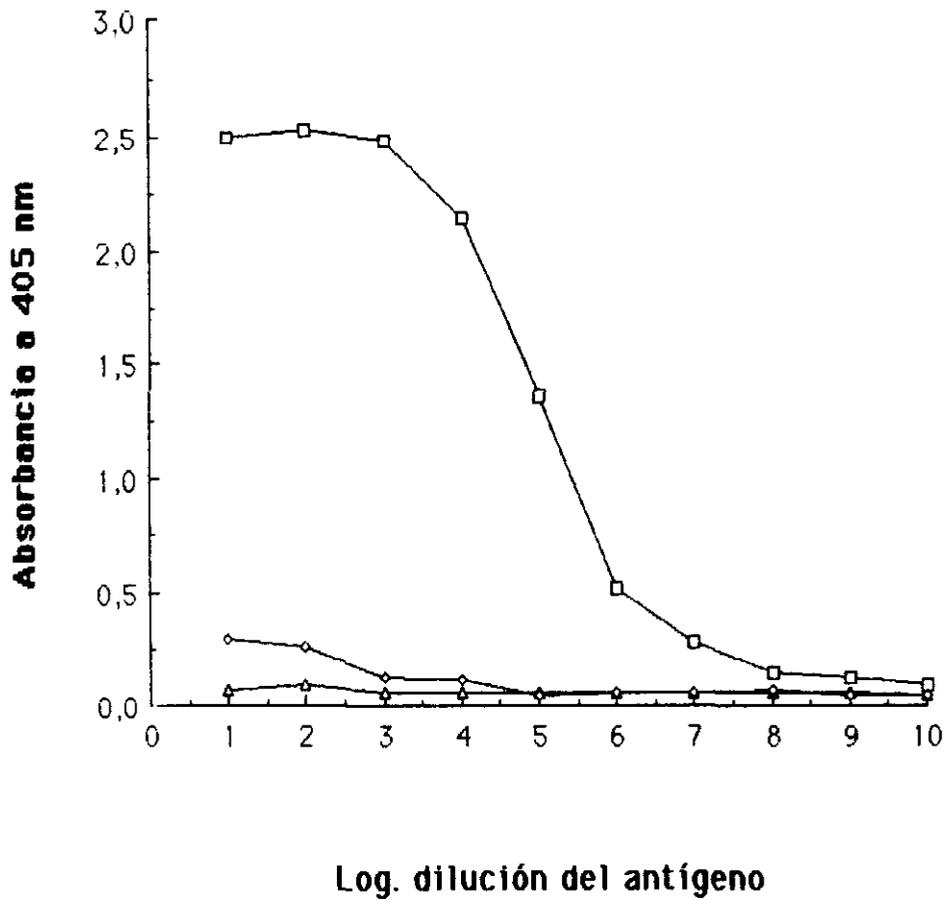


Figura IV. 13. Evaluación de los anticuerpos anti-CV, de captura y de detección, para diferenciar los quesos de vaca (□), oveja (△) y cabra (◇), mediante un ELISA sandwich. Diluciones: anticuerpos de captura 1/500, de detección 1/1000 y del conjugado 1/3000.

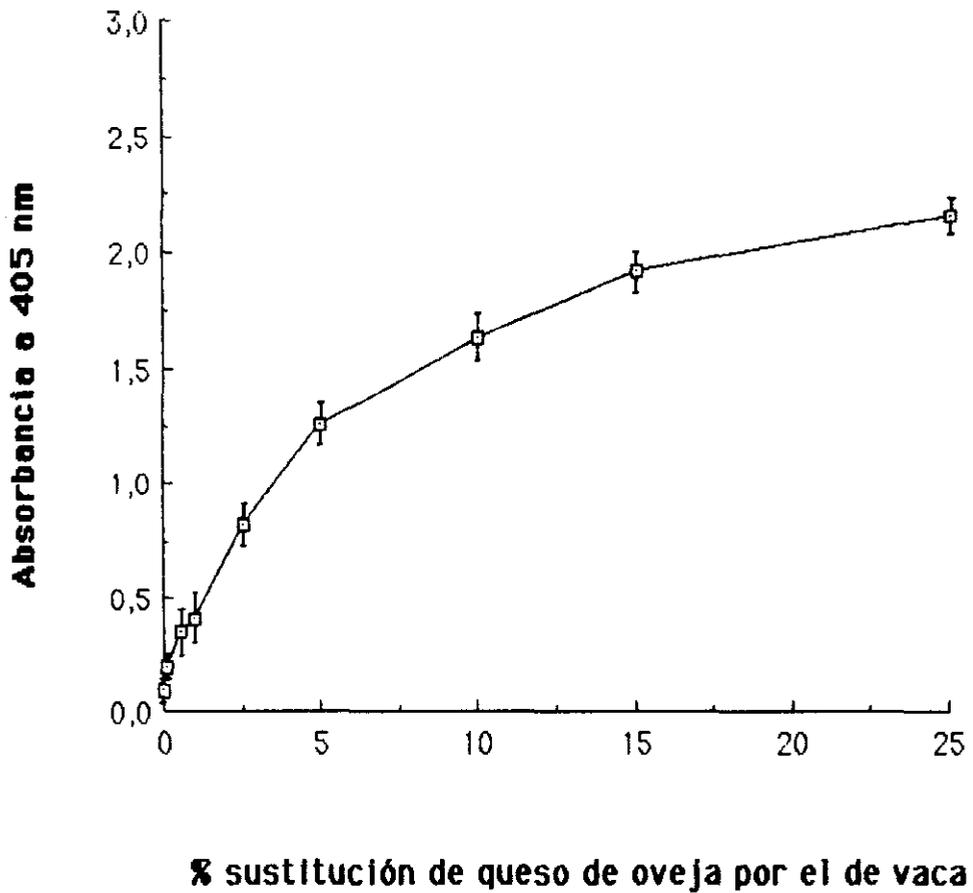


Figura IV.14. Detección de leche de vaca en el queso de oveja, por la técnica del ELISA sandwich, empleando como antígenos extractos de quesos diluidos 1/10 y como inmunosueros anticuerpos de captura diluidos 1/500 y anticuerpos de detección diluidos 1/1000. Dilución del conjugado 1/3000. Cada punto de la gráfica corresponde a la media y desviación estándar de los resultados de seis experiencias diferentes con dos mezclas de quesos distintas.

$$A_{405} = 0,718 + 0,384 \ln (\%V)$$

cuyo coeficiente de correlación es  $r = 0,953$  puede cuantificarse la sustitución de un 0,1-25 % de queso de oveja por el de vaca (V).

Cada punto de la gráfica corresponde a la media y desviación estándar de los resultados de seis experiencias diferentes con dos mezclas de quesos distintas.

#### **IV. E. DETECCION DE LECHE DE VACA EN LA LECHE FRESCA Y EN LOS QUESOS MADURADOS DE CABRA. POR TECNICAS INMUNOENZIMATICAS (ELISA)**

En la detección y cuantificación de la leche de vaca en la fresca y en los quesos madurados de cabra, se utilizaron los anticuerpos anti-CV descritos en la sección IV. D y purificados por una o tres columnas. La metodología empleada fue esencialmente la misma que se describe en las secciones IV. D. 1, IV. D. 2, IV. D. 3 y IV. D. 4, para la detección de leche de vaca en la leche fresca y en los quesos madurados de oveja.

##### **IV. E. 1. DETECCION DE LECHE DE VACA EN LA LECHE FRESCA DE CABRA POR LA TECNICA DEL ELISA INDIRECTO.**

Las diluciones óptimas de los reactivos que intervienen en el ensayo fueron las mismas que las utilizadas en la sección IV. D. 1. Los anticuerpos anti-CV de conejos, purificados por una columna, biotinizados y neutralizados, se emplearon a la dilución 1/200, mientras que la dilución del conjugado de Extravidina-peroxidasa de rábano fue la de 1/3000. La dilución más adecuada de

antígenos (leche de vaca o cabra) para detectar la presencia de leche de vaca en la de cabra por la técnica del ELISA indirecto, fue la de 1/2000.

En la Figura IV. 15 se muestra la absorbancia a 405 nm de dos mezclas experimentales de leche de cabra que contenían 0, 1, 5, 10, 15, 25, 50 y 100 % de leche de vaca. Cada punto de la gráfica corresponde a la media y desviación estándar de los resultados de seis experiencias diferentes con dos mezclas lácteas distintas. De los resultados obtenidos se deduce que el ELISA indirecto permite detectar la sustitución de un 1-25 % de leche de vaca (V) en la de cabra, utilizando la expresión:

$$A_{405} = 0,269 + 0,076 (\%V)$$

cuyo coeficiente de correlación es  $r = 0,996$ .

#### IV. E. 2. DETECCION DE LECHE DE VACA EN LOS QUESOS MADURADOS DE CABRA POR LA TECNICA DEL ELISA INDIRECTO.

Se emplearon las diluciones de anticuerpos, conjugado y extractos antigénicos descritas en la sección IV. D. 2. Como antígenos se emplearon extractos de queso de vaca, de cabra o de sus mezclas preparados de la manera descrita en la sección III. B. 4. 5. 1. 1.

Utilizando los reactivos descritos se desarrolló un ELISA indirecto para el análisis de mezclas experimentales de quesos de cabra que contenían 0, 1, 5, 10, 15, 25, 50 y 100 % de queso de vaca. La Figura IV. 16 muestra los resultados de la absorbancia a 405 nm de dos mezclas experimentales de quesos; los datos

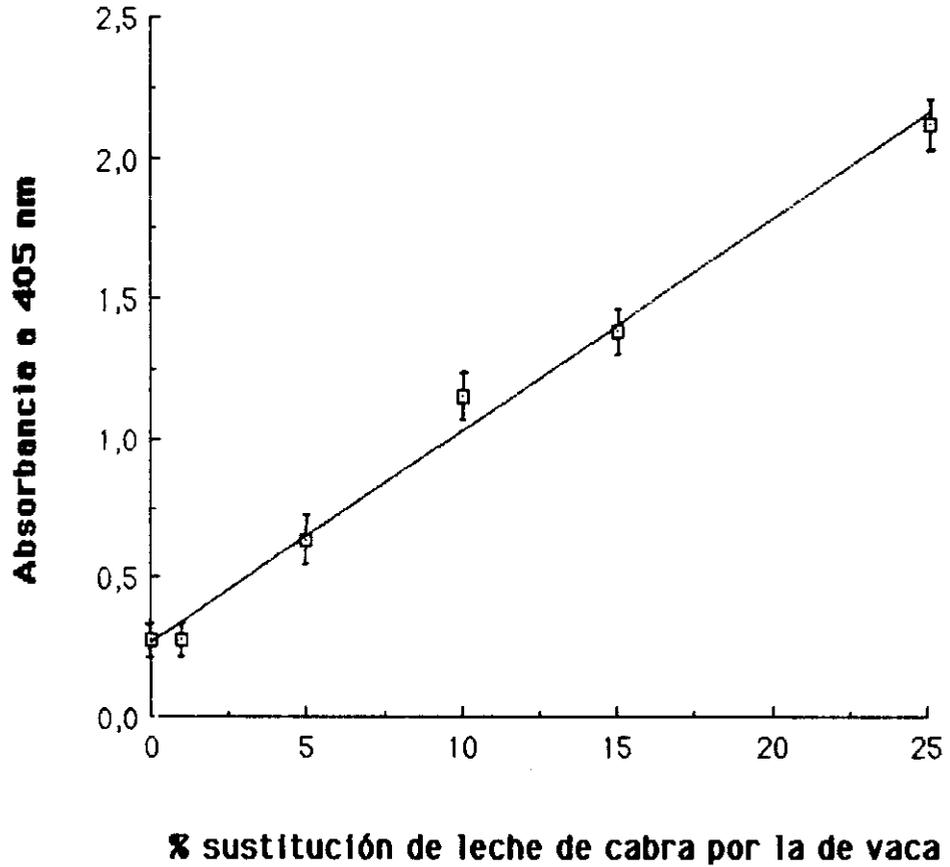


Figura IV. 15. Detección de leche de vaca en la de cabra, por la técnica del ELISA indirecto. Los anticuerpos anti-CV, purificados por una columna, biotinizados y neutralizados, se emplearon diluidos 1/200, las mezclas de leche a la dilución 1/2000 y el conjugado a la 1/3000. Cada punto de la gráfica corresponde a la media y desviación estándar de los resultados de seis experiencias diferentes.

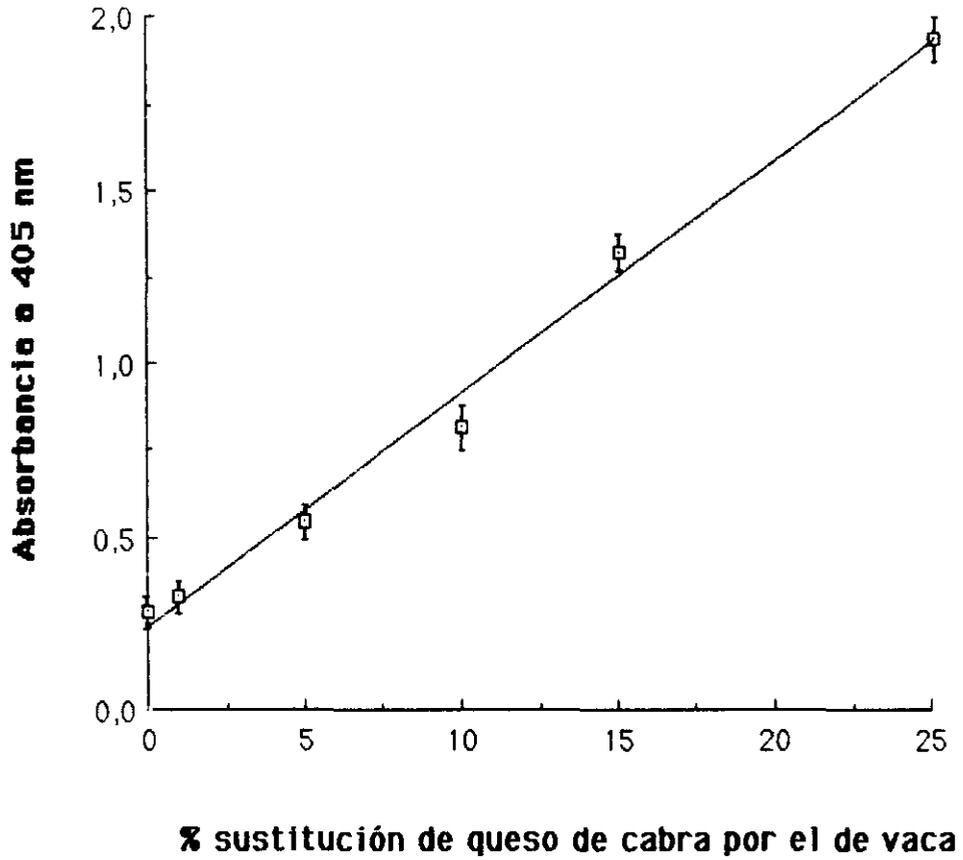


Figura IV. 16. Detección de leche de vaca en el queso de cabra por la técnica del ELISA indirecto, empleando como antígenos extractos de queso diluidos 1/400 y como inmunosuero los anticuerpos anti-CV diluidos 1/200. Dilución del conjugado 1/3000. Cada punto de la gráfica corresponde a la media y desviación estándar de los resultados de seis experiencias diferentes.

corresponden a 6 experiencias diferentes. De los resultados obtenidos se deduce que es posible cuantificar la sustitución de un 1- 25 % de queso de cabra por el de vaca, mediante la ecuación:

$$A_{405} = 0,244 + 0,067 (\% V)$$

cuyo coeficiente de correlación es  $r = 0,996$ .

#### IV. E. 3. DETECCIÓN DE LECHE DE VACA EN LA LECHE FRESCA DE CABRA POR LA TECNICA DEL ELISA SANDWICH.

Para la detección de la leche de vaca en la fresca y en los quesos de cabra, se desarrolló además del ELISA indirecto descrito un ELISA sandwich.

Como inmunosueros se emplearon anticuerpos anti-CV, de captura y detección, obtenidos de la manera descrita en la sección IV. D. 3. Recordemos brevemente que estos anticuerpos proceden de machos cabríos y que fueron precipitados con sulfato amónico, purificados por tres columnas y blotinizados o no (anticuerpos de detección y de captura). Asimismo, los reactivos para el ELISA sandwich se emplearon a las mismas concentraciones que en la sección citada: las mezclas de leche a la dilución 1/400, los anticuerpos de captura y detección a la 1/500 y el conjugado a la 1/3000.

Posteriormente se evaluó la presencia de leche de vaca en dos mezclas lácteas experimentales cuyos porcentajes de sustitución de leche de cabra por la de vaca fueron de 0; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5, 10, 15, 25, 50 y 100 %.

En la Figura IV. 17 se muestran las absorbancias a 405 nm de las dos mezclas lácteas analizadas; seis veces cada una de ellas. En este caso, la ecuación para cuantificar la sustitución del 0,1 al 25 % de leche de cabra por la de vaca (V) fue:

$$A_{405} = 0,902 + 0,431 \ln (\% V)$$

con un coeficiente de correlación de  $r = 0,971$ .

#### IV. E. 4. DETECCION DE LECHE DE VACA EN LOS QUESOS MADURADOS DE CABRA POR LA TECNICA DEL ELISA SANDWICH.

Los extractos antigénicos (quesos de vaca, de cabra o de sus mezclas), el conjugado y los anticuerpos de captura y detección se utilizaron a las siguientes diluciones: 1/10, 1/3000, 1/500 y 1/1000.

Con los reactivos descritos se desarrolló un ELISA sandwich que permitió detectar y cuantificar la leche de vaca de dos mezclas experimentales de queso de cabra que contenían 0; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5, 10, 15, 25, 50 y 100 % de queso de vaca. De los resultados de la Figura IV. 18 se deduce que se puede detectar la sustitución de un 0,1-25 % de queso de cabra por el de vaca (V), utilizando la expresión:

$$A_{405} = 1,071 + 0,372 \ln (\%V)$$

que presenta un coeficiente de correlación de  $r = 0,973$ .

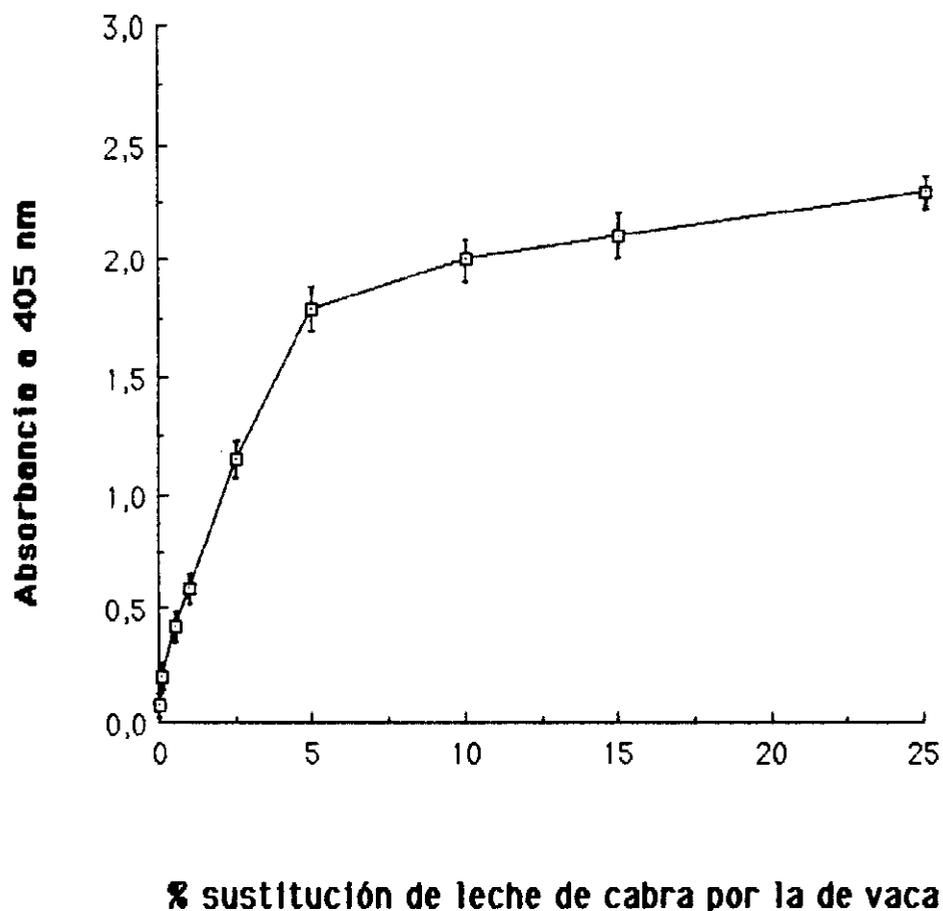


Figura IV. 17. Detección de leche de vaca en la de cabra, por la técnica del ELISA sandwich, empleando como antígenos mezclas de leche diluidas 1/400 y como inmunosueros anticuerpos anti-CV, de captura y de detección, a la 1/500. Dilución del conjugado 1/3000. Cada punto de la gráfica corresponde a la media y desviación estándar de los resultados de seis experiencias diferentes con dos mezclas lácteas distintas.

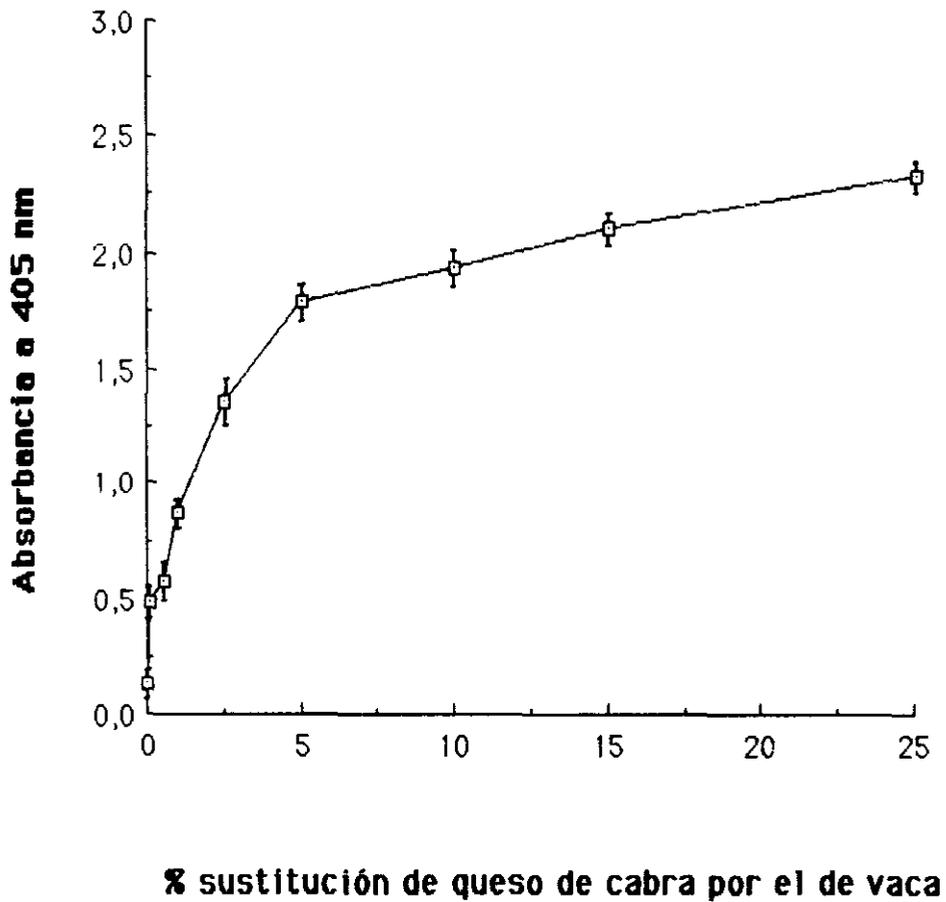


Figura IV. 18. Detección de leche de vaca en el queso de cabra, por la técnica del ELISA sandwich, empleando como antígenos extractos de queso diluïdos 1/10 y como inmunosueros anticuerpos de captura diluïdos 1/500 y de detección a la dilución 1/1000. Dilución del conjugado 1/3000. Cada punto de la gráfica corresponde a la media y desviación estándar de los resultados de seis experiencias diferentes con dos mezclas de quesos distintas.

#### IV. F. DETECCION DE LECHE DE CABRA EN LA LECHE FRESCA Y EN LOS QUESOS MADURADOS DE OVEJA, POR TECNICAS INMUNOENZIMATICAS (ELISA)

En la detección y cuantificación de la leche de cabra en la leche fresca y en los quesos de oveja, se emplearon dos tipos de ELISA:

a) ELISA indirecto: Se emplean anticuerpos anti-CC de conejos, purificados por una columna, conjugados a la biotina y neutralizados con caseínas de vaca y oveja.

b) ELISA sandwich: Utiliza anticuerpos anti-CC de conejos, precipitados con sulfato amónico, purificados por tres columnas y conjugados o no a la biotina (anticuerpos de detección y anticuerpos de captura).

##### IV. F. 1. DETECCION DE LECHE DE CABRA EN LA LECHE FRESCA DE OVEJA POR LA TECNICA DEL ELISA INDIRECTO.

Siguiendo el protocolo descrito en la sección III. B. 4. 5. 1 y con un procedimiento similar al desarrollado en la sección IV. D. 1, se determinaron las concentraciones idóneas de los reactivos que intervienen en el ensayo. En la neutralización del inmunosuero anti-CC se utilizaron 0,738 mg del extracto antigénico liofilizado de caseínas de vaca (CV) y 0,876 mg del extracto liofilizado de caseínas de oveja (CO) por ml de tampón PBST; se operó de la manera descrita en la sección III. B. 4. 4.

De los resultados de la Tabla IV. 7, se dedujo que la dilución más adecuada

**TABLA IV. 7. ELISA indirecto para la detección de leche de cabra en la de oveja. Determinación de la concentración idónea de anticuerpos anti-CC neutralizados, con el conjugado a la dilución 1/3000.**

Diluciones de la leche de cabra u oveja	Diluciones de los anticuerpos anti-CC					
	1/200		1/400		1/800	
	Cabra	Oveja	Cabra	Oveja	Cabra	Oveja
1/100	2,590	0,280	1,853	0,153	1,450	0,213
1/200	2,571	0,213	1,814	0,240	1,437	0,203
1/400	2,520	0,231	1,883	0,153	1,465	0,171
1/800	2,510	0,210	1,734	0,180	1,227	0,170
1/1600	2,365	0,183	1,443	0,167	1,083	0,150
1/3200	2,273	0,217	1,293	0,160	0,932	0,178
1/6400	2,050	0,209	1,327	0,136	0,863	0,154
1/12800	1,513	0,200	0,973	0,158	0,719	0,150

de los anticuerpos anti-CC neutralizados (concentración de proteína de 1,25 mg/ml), era la de 1/200 y la de antígeno (leche cruda de cabra o de oveja) la de 1/800. Como conjugado se empleó ExtrAvidina-peroxidasa de rábano a la dilución de 1/3000.

En la Figura IV. 19 se observa la eficacia de los anticuerpos anti-CC neutralizados con las caseínas liofilizadas de vaca y oveja, que contrastan con los anticuerpos sin neutralizar que no diferencian la leche de cabra de las de oveja y vaca. La Figura IV. 20 muestra la capacidad del inmunosuero descrito para detectar y cuantificar la leche de cabra en mezclas lácteas experimentales con leche de oveja que contiene un 0, 1, 5, 10, 15, 25, 50 y 100 % de leche de cabra. De los resultados obtenidos, se deduce que la ecuación que permite cuantificar la sustitución de un 1 a un 25 % de leche de oveja por la de cabra (C), es la siguiente:

$$A_{405} = 0,193 + 0,081 (\% C)$$

con un coeficiente de correlación de  $r = 0,999$ .

#### IV. F. 2. DETECCION DE LECHE DE CABRA EN LOS QUESOS MADURADOS DE OVEJA POR LA TECNICA DEL ELISA INDIRECTO.

Para la detección de leche de cabra en el queso de oveja (véanse Tabla IV. 8 y Figura IV. 21), se utilizaron como diluciones de trabajo las siguientes: extractos antigénicos 1/25, inmunosuero anti-CC neutralizado 1/100 y conjugado 1/3000.

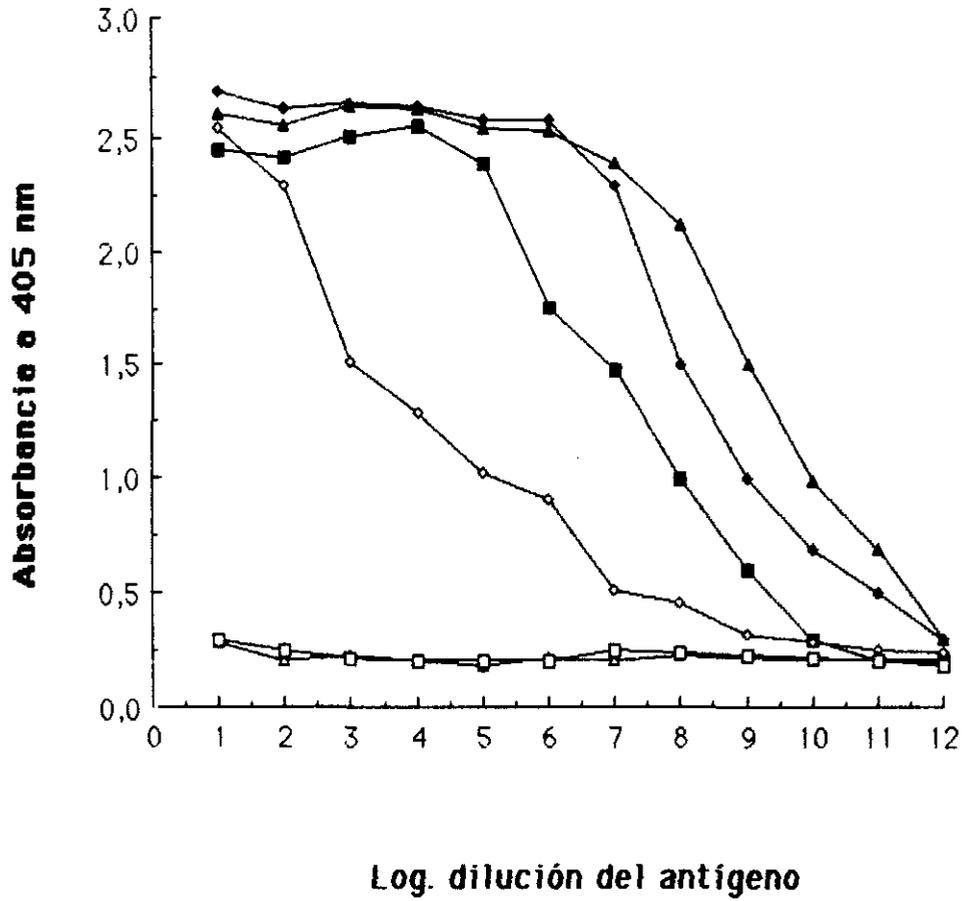


Figura IV. 19. Evaluación de los anticuerpos anti-CC, neutralizados y sin neutralizar, para diferenciar las leches de cabra (◆), oveja (▲) y vaca (■), mediante un ELISA indirecto. Inmunosuero a la dilución 1/200, sin neutralizar (símbolos llenos), y neutralizado (símbolos vacíos). Dilución del conjugado 1/3000.

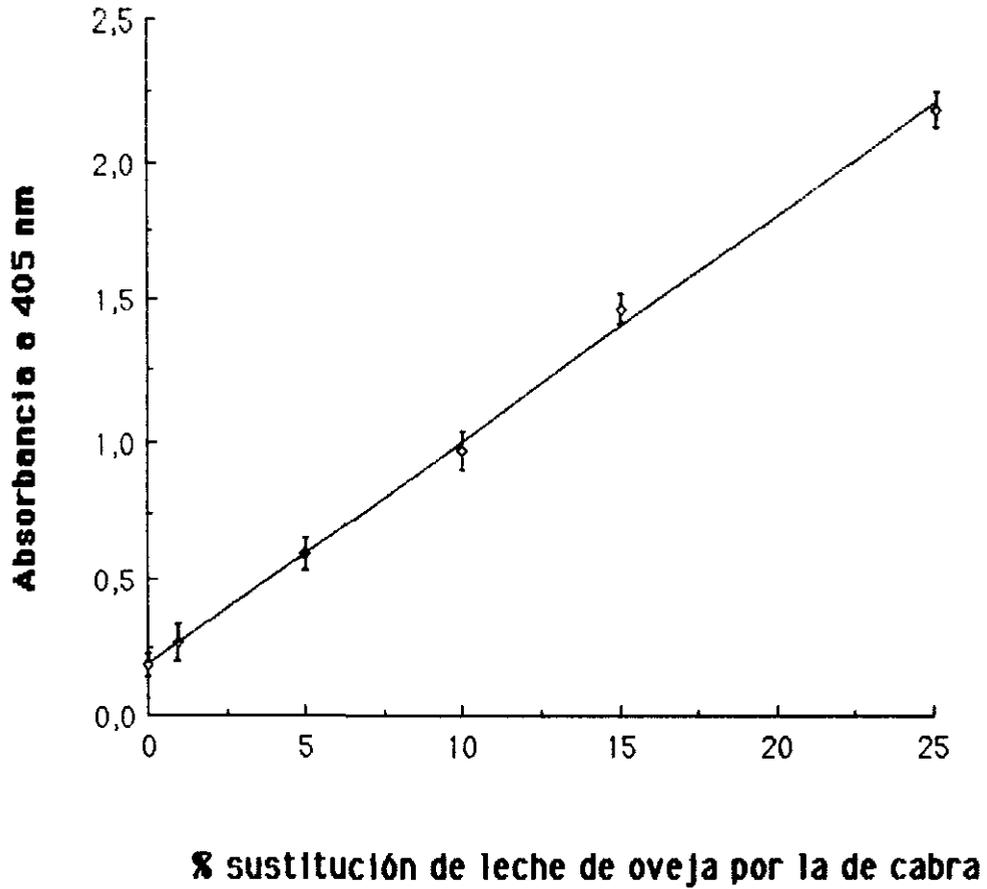


Figura IV. 20. Detección de leche de cabra en la de oveja, por la técnica del ELISA indirecto, empleando como antígenos las mezclas de leche diluidas 1/800 y como inmunosuero los anticuerpos anti-CC diluidos 1/200. Dilución del conjugado 1/3000. Cada punto de la gráfica corresponde a la media y desviación estándar de los resultados de seis experiencias diferentes.

**TABLA IV. 8. ELISA Indirecto para la detección de leche de cabra en el queso de oveja. Determinación de la concentración idónea de anticuerpos anti-CV neutralizados, con el conjugado a la 1/3000.**

Diluciones de los extractos de queso de cabra u oveja	Diluciones de los anticuerpos anti-CV							
	1/50		1/100		1/200		1/400	
	cabra	oveja	cabra	oveja	cabra	oveja	cabra	oveja
1/25	2,624	0,712	2,351	0,310	2,131	0,148	1,759	0,301
1/50	2,578	0,639	2,232	0,284	1,787	0,102	1,384	0,351
1/100	2,588	0,549	2,006	0,283	1,689	0,144	1,328	0,366

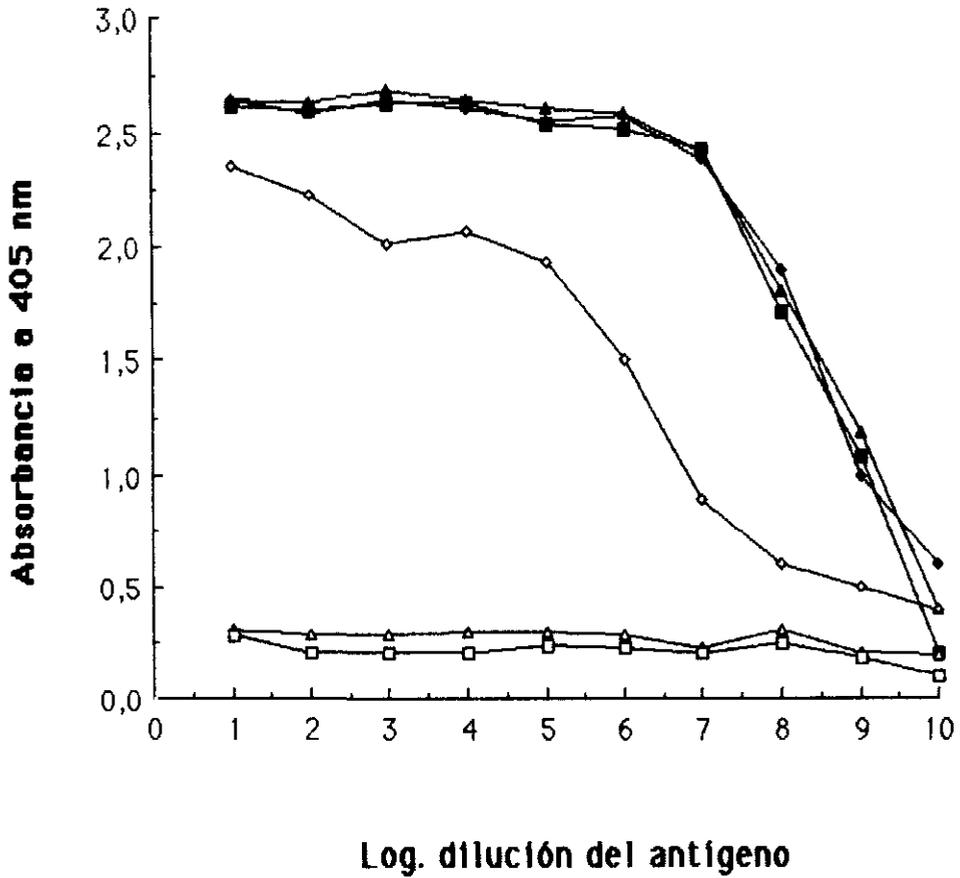


Figura IV. 21. Evaluación de los anticuerpos anti-CC, neutralizados y sin neutralizar, para diferenciar los quesos de cabra (◆), oveja (▲) y vaca (■), mediante un ELISA indirecto. Inmunosuero a la dilución 1/100, sin neutralizar (símbolos llenos), y neutralizado (símbolos vacíos). Dilución del conjugado 1/3000.

En las Figuras IV. 21 y IV. 22 puede apreciarse la eficacia de los anticuerpos anti-CC neutralizados para diferenciar los quesos de cabra, oveja y vaca, así como para detectar concentraciones crecientes de queso de cabra en el de oveja, a unos porcentajes de: 0, 1, 5, 10, 15, 25, 50 y 100 % de sustitución. De los resultados obtenidos se deduce que la sustitución de un 1-25 % de queso de oveja por el de cabra (C), se cuantifica utilizando la ecuación:

$$A_{405} = 0,265 + 0,072 (\% C)$$

con un coeficiente de correlación de  $r = 0,998$ .

#### IV. F. 3. DETECCION DE LECHE DE CABRA EN LA LECHE FRESCA DE OVEJA POR LA TECNICA DEL ELISA SANDWICH.

La detección y cuantificación de leche de cabra en la leche fresca y en los quesos madurados de oveja también se llevó a cabo con un ELISA sandwich que emplea como anticuerpos de captura y detección los descritos en la sección IV. F.

Utilizando el protocolo experimental descrito en la sección III. B. 4. 5. 2., se determinaron primero las concentraciones óptimas de los reactivos que intervienen en el ensayo; correspondían a la dilución 1/2000 para el anticuerpo de captura, a la 1/500 para el anticuerpo de detección, a la 1/400 para el antígeno (leche cruda) y a la 1/3000 para el conjugado ExtrAvidin-peroxidasa. (Tabla IV. 9. y Figura IV. 23). De la Figura IV. 23 también se deduce la eficacia de los anticuerpos descritos para diferenciar la leche de cabra de las de oveja y vaca.

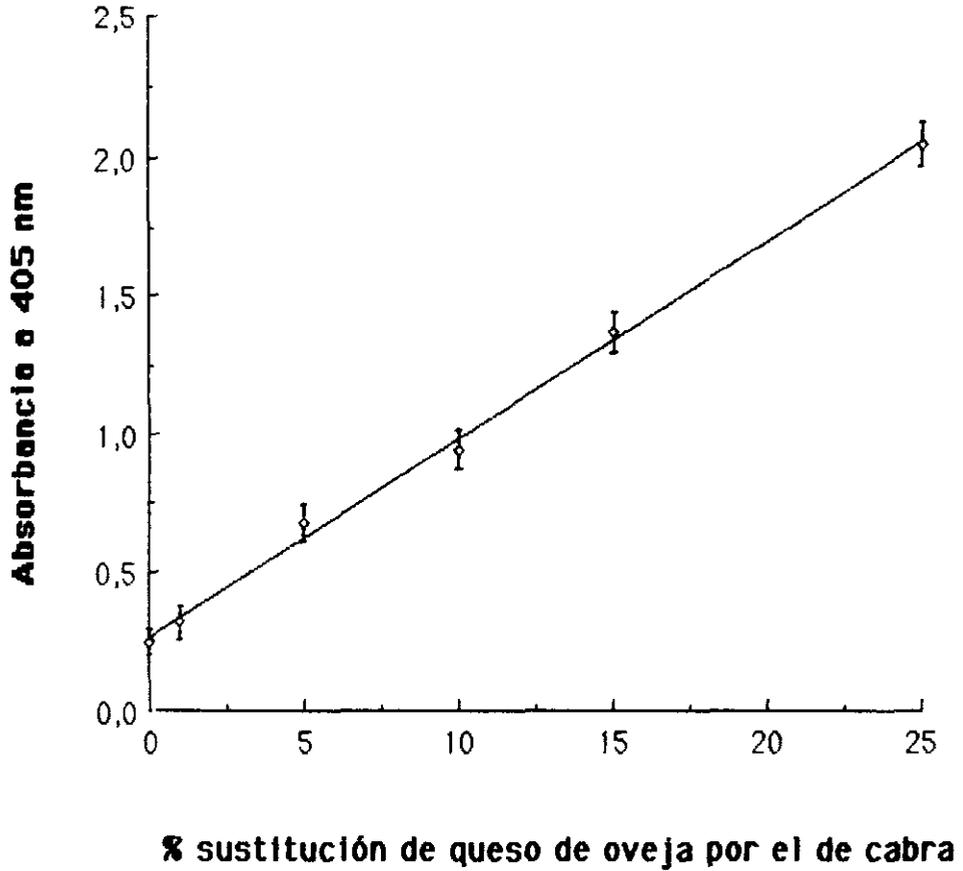


Figura IV. 22. Detección de leche de cabra, en mezclas experimentales de quesos de cabra/oveja, por la técnica del ELISA indirecto; se emplean como antígenos extractos de quesos diluidos 1/25 y como inmunosuero anticuerpos anti-CC, purificados por una columna, biotinizados, neutralizados y diluidos 1/100. Dilución del conjugado 1/3000. Cada punto de la gráfica corresponde a la media y desviación estándar de los resultados de seis experiencias diferentes con dos mezclas de quesos distintas.

**TABLA IV. 9. ELISA sandwich para la detección de leche de cabra en la de oveja. Determinación de la concentración idónea de anticuerpos específicos anti-CC, con el conjugado a la dilución 1/3000.**

Diluciones de la leche de cabra u oveja	Diluciones de los anticuerpos de detección							
	1/500				1/1000			
	Anticuerpos de captura							
	1/1000		1/2000		1/1000		1/2000	
	cabra	oveja	cabra	oveja	cabra	oveja	cabra	oveja
1/100	2,230	0,983	1,478	0,579	1,273	0,469	0,835	0,261
1/200	2,154	0,815	1,390	0,593	1,089	0,350	0,762	0,222
1/400	2,080	0,691	1,359	0,340	1,130	0,320	0,777	0,164
1/800	1,837	0,639	1,110	0,379	1,073	0,279	0,641	0,143
1/1600	1,560	0,449	0,835	0,318	0,920	0,234	0,634	0,137
1/3200	0,894	0,516	0,634	0,350	0,669	0,163	0,317	0,102

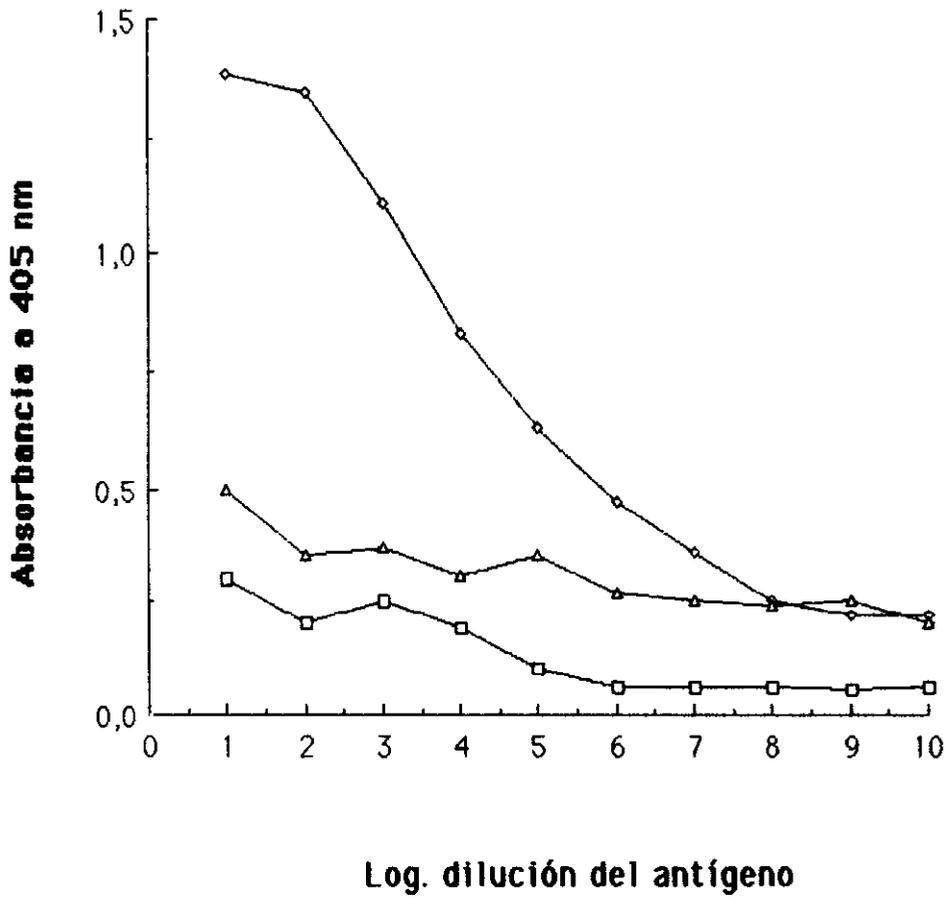


Figura IV. 23. Evaluación de los anticuerpos anti-CC, de captura y de detección, para diferenciar la leche de cabra ( $\diamond$ ) de las de oveja ( $\triangle$ ) y vaca ( $\square$ ), por un ELISA sandwich. Anticuerpos de captura a la dilución 1/2000 y de detección a la 1/500. Conjugado diluido 1/3000.

Posteriormente, se evaluó la eficacia del ELISA sandwich para detectar la presencia de leche de cabra en la de oveja. En la Figura IV. 24 se muestra la absorbancia de dos mezclas experimentales de leche oveja/cabra, que contenían 0, 1, 5, 10, 15, 25, 50 y 100 % de leche de cabra. De los resultados obtenidos se deduce que la ecuación que cuantifica la sustitución de un 1-100% de leche de oveja por la de cabra (C), es la siguiente:

$$A_{405} = 0,379 + 0,008 (\% C)$$

con un coeficiente de correlación de  $r = 0,995$ .

#### IV. F. 4. DETECCION DE LECHE DE CABRA EN LOS QUESOS MADURADOS DE OVEJA POR LA TECNICA DEL ELISA SANDWICH.

Se utilizaron los anticuerpos y el conjugado descritos en la sección anterior. De los resultados de varias experiencias preliminares, se dedujo que las concentraciones óptimas de los reactivos del ensayo eran la 1/1000 para los anticuerpos de captura, la 1/500 para los anticuerpos de detección, la 1/50 para los antígenos (extractos de queso de cabra y de oveja), y la 1/3000 para el conjugado.

Asimismo, en la Figura IV. 25 se muestra la eficacia de los anticuerpos anti-CC, de captura y detección, para diferenciar el queso de cabra de los de oveja y vaca a diluciones de los antígenos comprendidas entre 1/25 y 1/25600.

Posteriormente con los reactivos utilizados a las diluciones señaladas, se procedió a la detección de leche de cabra en mezclas experimentales de queso de

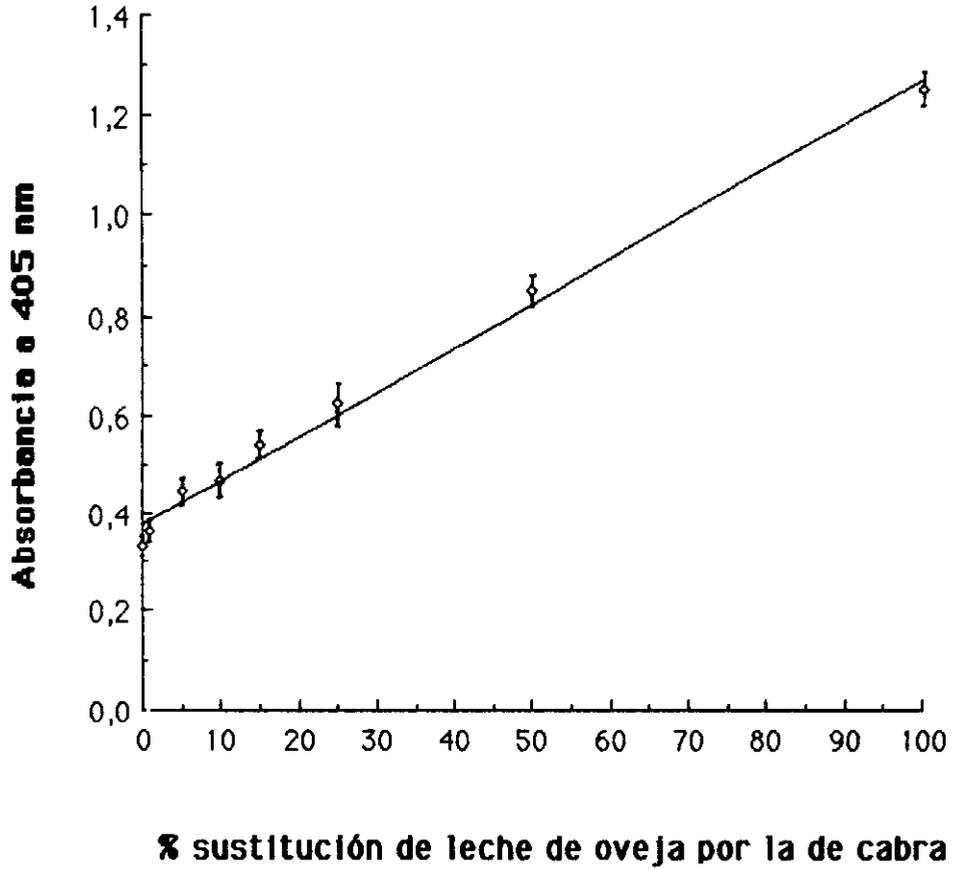


Figura IV. 24. Detección de leche de cabra en la de oveja, por la técnica del ELISA sandwich, empleando como antígenos las mezclas de leches diluidas 1/400 y como Inmunosueros los anticuerpos anti-CC de captura a la 1/2000 y los de detección a la 1/500. Dilución del conjugado 1/3000. Cada punto de la gráfica corresponde a la media y desviación estándar de los resultados de seis experiencias diferentes.

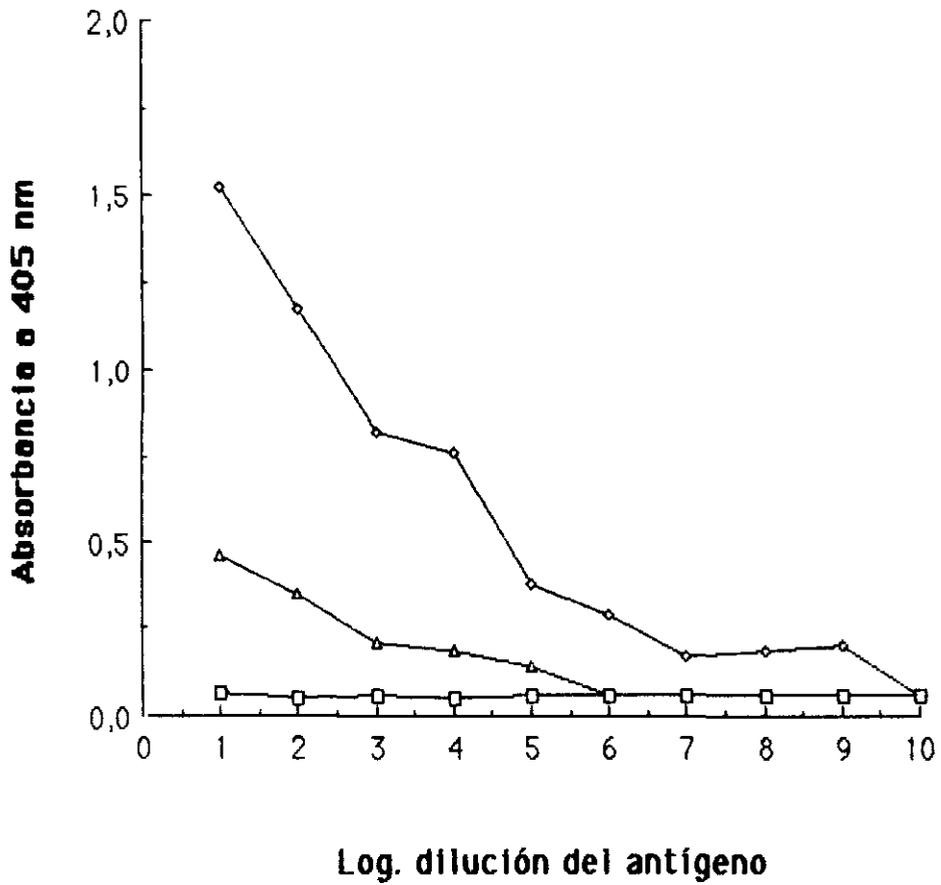


Figura IV. 25. Evaluación de los anticuerpos anti-CC, de captura y de detección, para diferenciar los quesos de cabra ( $\diamond$ ), oveja ( $\triangle$ ) y vaca ( $\square$ ), mediante un ELISA sandwich. Dilución de los anticuerpos de captura 1/1000, de los de detección 1/500 y del conjugado 1/3000.

oveja. La Figura IV. 26 muestra los valores medios de la absorbancia a 405 nm de dos mezclas experimentales de queso cabra/oveja, con una sustitución del 0, 1, 5, 10, 15, 25, 50 y 100 % de queso de oveja por el de cabra. De los resultados obtenidos se deduce que la sustitución de un 1-100 % de queso de oveja por el de cabra (C) se cuantifica mediante la ecuación:

$$A_{405} = 0,424 + 0,007 (\% C)$$

con un coeficiente de correlación de  $r = 0,991$ .

#### **IV. G. INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO TERMICO EN LA DETECCION, MEDIANTE TECNICAS INMUNOENZIMATICAS (ELISA), DE LECHE DE VACA Y CABRA EN LAS FRESCAS DE CABRA Y OVEJA.**

Para determinar la posible influencia de los tratamientos térmicos en la detección y cuantificación de las leches de diferentes especies animales en mezclas lácteas diversas, se adquirieron del mercado muestras de leche pasteurizada, esterilizada y UHT de las leches de interés. Ya que la leche de cabra no se comercializa normalmente de esta manera, las muestras de leche cruda de esta especie, de la procedencia que se indica en la sección III. A. 2. 1., se sometieron en nuestro laboratorio a distintos tratamientos térmicos.

##### **IV. G. 1. TRATAMIENTOS TERMICOS APLICADOS.**

La leche de vaca pasteurizada, esterilizada y UHT, se obtuvo comercialmente, mientras la leche cruda de cabra se calentó a 62 °C durante 30 minutos

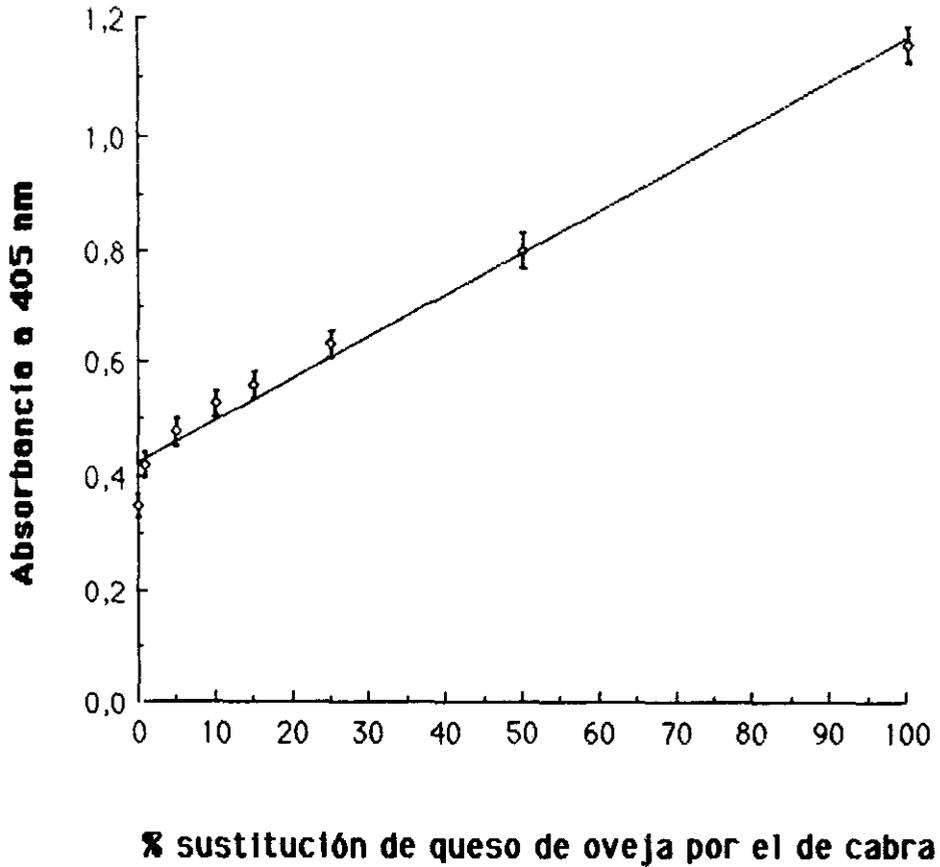


Figura IV. 26. Detección de la leche de cabra en el queso de oveja, por la técnica del ELISA sandwich; como antígenos se emplearon los extractos de quesos diluidos 1/50 y como inmunosueros los anticuerpos de captura a una dilución de 1/1000 y los de detección a la 1/500. Dilución del conjugado 1/3000. Cada punto de la gráfica corresponde a la media y desviación estándar de los resultados de seis experiencias diferentes con dos mezclas de quesos distintas.

(pasterización), a 121 °C durante 20 minutos (esterilización) y 140 °C durante 4 segundos (tratamiento UHT). La pasterización se realizó en un baño de agua termostatado, la esterilización en un baño de glicerina termostatado y el denominado "UHT" en un baño de glicerina a 140 °C y con las muestras de leche en capilares de vidrio.

Posteriormente, se prepararon las mezclas experimentales de leche de vaca/oveja, de vaca/cabra y de cabra/oveja, con unos porcentajes de sustitución de 0, 1, 5, 10, 15, 25, 50 y 100 %. En todos los casos la leche de la especie citada en segundo lugar se sustituyó por la primera (vaca en los dos primeros casos y cabra en el tercero).

#### IV. G. 2. INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS TERMICOS EN LA DETECCION DE LECHE DE VACA EN LA DE OVEJA, MEDIANTE UN ELISA INDIRECTO.

Utilizando el ELISA indirecto descrito en la sección IV. D. 1., se analizaron tres mezclas de leche de oveja que contenían, respectivamente, 0, 1, 5, 10, 15, 25, 50 y 100 % de leche pasterizada, esterilizada o UHT de vaca. En el ensayo se incluyó una mezcla de leche cruda de vaca/oveja con los mismos porcentajes de sustitución.

De los resultados de la Figura IV. 27 se deduce que la sensibilidad del ELISA indirecto para detectar la presencia de leche de vaca en la de oveja, no se afecta por los diversos tratamientos térmicos a los que se somete la leche de vaca.

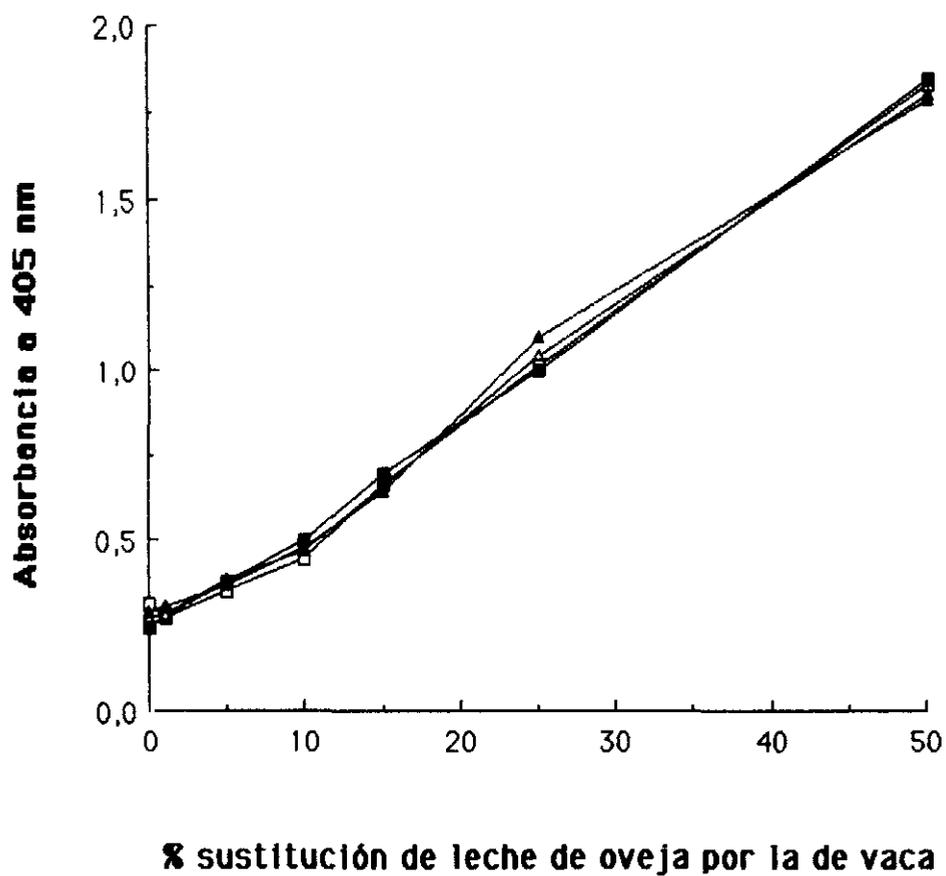


Figura IV. 27. Detección de leche de vaca cruda (□), pasteurizada (■), esterilizada (△) o UHT (▲) en la de oveja, por la técnica del ELISA indirecto. Dilución de las mezclas: leche 1/8000, inmunosuero 1/200 y conjugado 1/3000.

#### IV. G. 3. INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS TERMICOS EN LA DETECCION DE LECHE DE VACA EN LA DE OVEJA, MEDIANTE UN ELISA SANDWICH.

Las mezclas de leche descritas en la sección anterior, también se analizaron con el ELISA sandwich descrito en la sección IV. D. 3. de este trabajo.

Los resultados se muestran en la Figura IV. 28. De ellos se deduce que la sensibilidad del ELISA sandwich para detectar la presencia de leche de vaca en la de oveja, disminuye a consecuencia de los tratamientos térmicos a los que se somete la leche de vaca. También se observa que la disminución de la absorbancia de las muestras se ve influenciada por la intensidad del tratamiento térmico recibido; la disminución de la absorbancia es menor en la leche de vaca pasteurizada que en la esterilizada y que en la sometida a tratamiento UHT, debido probablemente a una mayor desnaturalización de las caseínas durante dichos tratamientos y posiblemente a la mayor sensibilidad del ELISA sandwich frente al indirecto.

#### IV. G. 4. INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS TERMICOS EN LA DETECCION DE LECHE DE VACA EN LA DE CABRA, MEDIANTE UN ELISA INDIRECTO.

Las mezclas de leches cruda, pasteurizada, esterilizada y UHT de vaca y de cabra se analizaron mediante el ELISA indirecto descrito en la sección IV. E. 1. de este trabajo.

Los resultados obtenidos indican que las mezclas lácteas se comportan como indica la Figura IV. 27, por ello en este trabajo no insistimos más en este aspecto. Como se aprecia, la sensibilidad del ELISA indirecto para detectar la

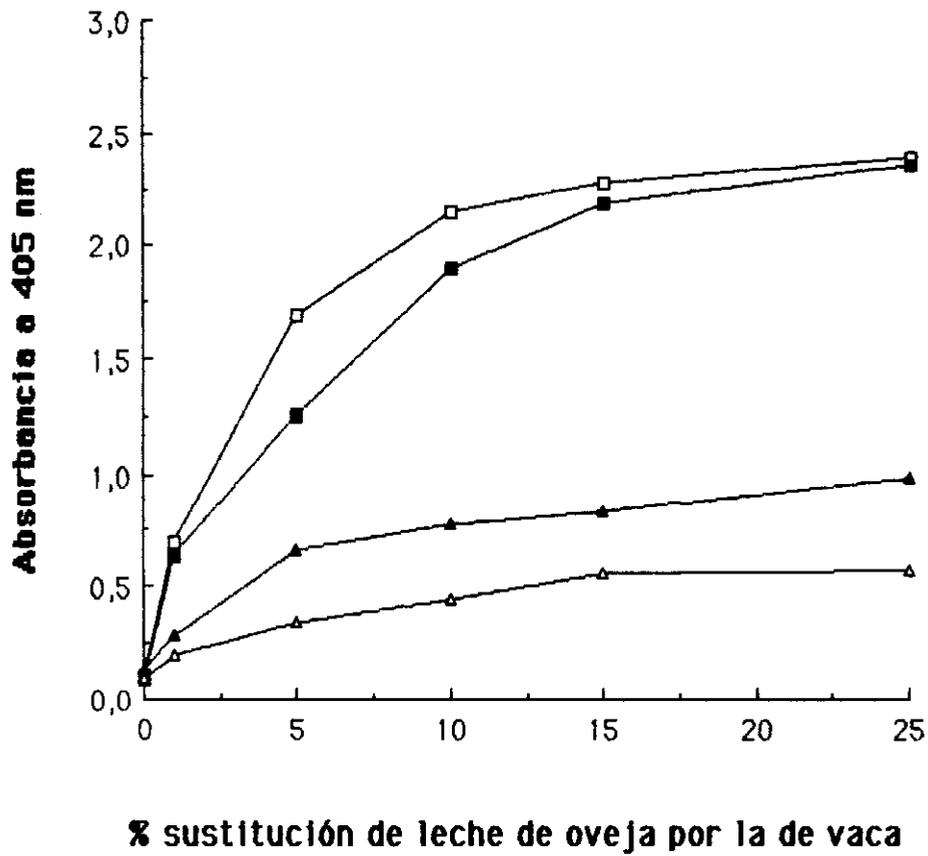


Figura IV. 28. Detección de leche de vaca cruda (□), pasteurizada (■), esterilizada (△) y UHT (▲), por la técnica del ELISA sandwich. Dilución de las mezclas de leche 1/400, de los anticuerpos de captura y de detección 1/500 y del conjugado 1/3000.

presencia de leche de vaca en la de cabra no se ve afectada por los diversos tratamientos térmicos a los que se somete la leche de vaca.

#### IV. G. 5. INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS TERMICOS EN LA DETECCION DE LECHE DE VACA EN LA DE CABRA, MEDIANTE UN ELISA SANDWICH.

Las mezclas de leche cruda, pasteurizada, esterilizada y UHT de vaca en las de cabra, se analizaron mediante el ELISA sandwich descrito en la sección IV. E. 3. de este trabajo.

Los resultados obtenidos mostraron un comportamiento de las mezclas lácteas similar al observado en la Figura IV. 28, lo que indica que como sucedía en la detección de leche de vaca en la de oveja, la sensibilidad del ELISA sandwich para detectar la leche de vaca en la de cabra se reduce significativamente como consecuencia de los diversos tratamientos térmicos a los que se somete la leche de vaca.

#### IV. G. 6. INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS TERMICOS EN LA DETECCION DE LECHE DE CABRA EN LA DE OVEJA, MEDIANTE UN ELISA INDIRECTO.

En la Figura IV. 29 se muestran los resultados obtenidos al analizar con el ELISA indirecto, descrito en la sección IV. F. 1., mezclas de leche de oveja que contenían un 0, 1, 5, 10, 15, 25, 50 y 100 % de leche cruda, pasteurizada, esterilizada o UHT de cabra.

De los resultados obtenidos, se deduce que la detección y cuantificación de la leche de cabra en la de oveja por el método ELISA indirecto, no se ve muy

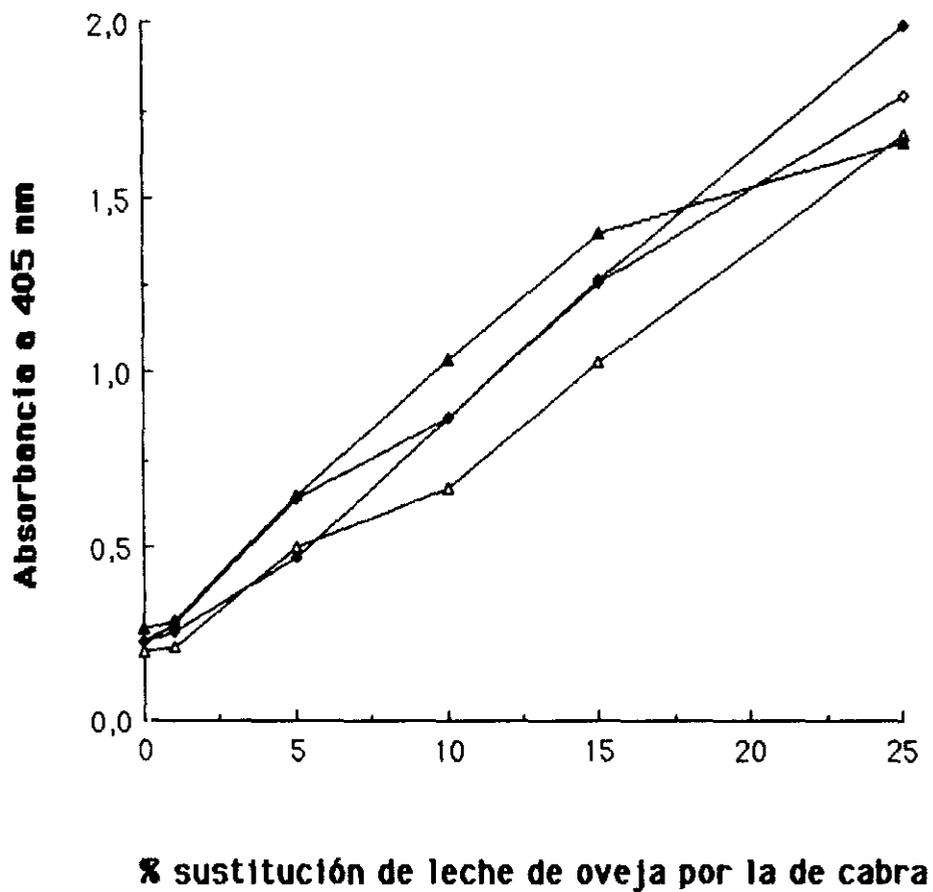


Figura IV. 29. Detección de leche de cabra cruda (◇), pasteurizada (◆), esterilizada (△) o UHT (▲) en la de oveja, por la técnica del ELISA indirecto. Dilución de las mezclas de leche 1/800, del inmunosuero 1/200 y del conjugado 1/3000.

afectada por los distintos tratamientos térmicos a los que se somete la leche de cabra.

#### IV. G. 7. INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS TÉRMICOS EN LA DETECCIÓN DE LECHE DE CABRA EN LA DE OVEJA, MEDIANTE UN ELISA SANDWICH.

Las mezclas de leche descritas en la sección anterior, se analizaron mediante el ELISA sandwich descrito en la sección IV. F. 3. de este trabajo.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura IV. 30. Como ya se ha mencionado, la sensibilidad del ELISA sandwich para detectar la leche de cabra en la de oveja disminuye significativamente como consecuencia de los diversos tratamientos térmicos a que se somete la leche de cabra.

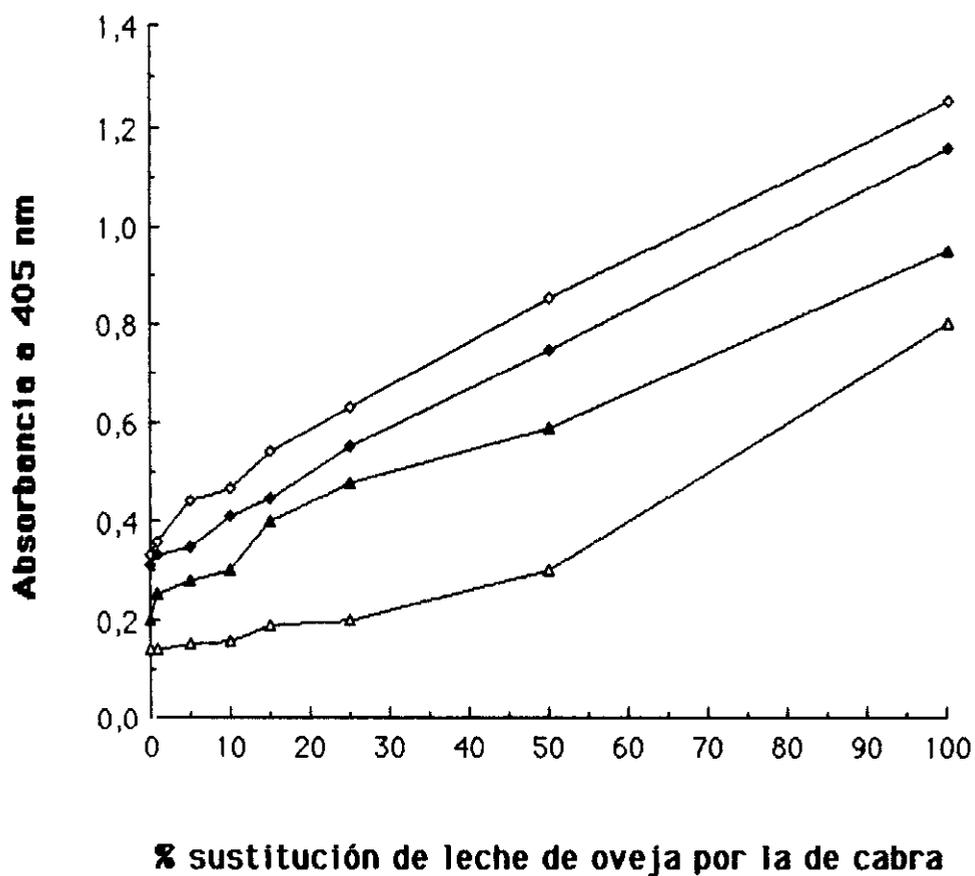


Figura IV. 30. Detección de leche de cabra cruda (◇), pasteurizada (◆), esterilizada (△) y UHT (▲), por la técnica del ELISA sandwich. Dilución de las mezclas de leche 1/400, de los anticuerpos de captura 1/2000, de los de detección 1/500, y del conjugado 1/3000.

CAPITULO V

DISCUSION

## **V. A. OBTENCION DE LOS INMUNOSUEROS.**

### **V. A. 1. EXTRACTOS ANTIGENICOS.**

El empleo como antígenos de las proteínas para la obtención de inmunosueros es muy conveniente debido a sus propiedades inmunógenas y, en particular, de las que poseen un elevado peso molecular. Entre las proteínas empleadas en la obtención de inmunosueros para identificar las leches de diversas especies animales en mezclas lácteas (sección III. C. 4.), deben citarse las del suero sanguíneo (Pinto, 1966; Durand y col., 1974) y, sobre todo, las inmunoglobulinas G (Levieux, 1977; Bernhauer y col., 1983). No obstante las más comunmente utilizadas han sido las de la leche, tanto las proteínas del suero (Elbertzhagen y Wenzel, 1982; García y col., 1989, 1990 y 1991), como las caseínas (Gombocz y col., 1981; Elbertzhagen, 1987; Krause y col., 1988; Aranda y col., 1988).

A pesar de que, como han señalado algunos autores (Aranda y col., 1988; Ramos, 1989), la antigenicidad de las proteínas del suero es mayor que la de las caseínas, la elección de estas últimas como antígenos para la obtención de anticuerpos presenta las ventajas derivadas de su termoestabilidad (Ramos y Juárez, 1984) y de ser las proteínas mayoritarias del queso. Debido a ello, se han obtenido inmunosueros anti-caseínas de las especies animales de interés para detectar y cuantificar la presencia de leche de diversas especies animales en mezclas lácteas diversas, tanto frescas como tratadas térmicamente, y en quesos madurados.

V. A. 2. ANALISIS POR INMUNODIFUSION EN GELES DE AGAROSA. DE LOS INMUNOSUEROS ANTI-CV Y ANTI-CC.

La elección de conejos para la obtención de inmunosueros presenta las siguientes ventajas: Su capacidad de respuesta a una gran variedad de antígenos, el volumen relativamente elevado de suero obtenible, y el pequeño espacio requerido para el mantenimiento de los animales (Garvey y col., 1977).

Aunque en líneas generales, la inmunogenicidad de un antígeno aumenta con la distancia filogenética entre el animal que lo posee y el receptor, a veces es conveniente elegir un individuo filogenéticamente más cercano para aumentar la especificidad de los inmunosueros. Debido a esta razón y, a que la utilización de animales más grandes proporciona un mayor volumen de suero sin la necesidad de sacrificar al animal, se utilizaron también machos cabríos en la obtención de inmunosuero anti-CV frente a las caseínas de leche de vaca.

Los resultados obtenidos al enfrentar los inmunosueros anti-CV y anti-CC procedentes de conejos y el anti-CV procedente de machos cabríos, con los extractos antigénicos liofilizados de leches de vaca, cabra y oveja demuestran que, tanto los inmunosueros procedentes de conejos como el obtenido de machos cabríos, producen bandas de precipitación, no sólo con los extractos antigénicos frente a los que se obtuvieron, sino también frente a los de especies animales distintas. De los resultados de la Tabla IV. 1 se deduce que:

a) Los inmunosueros anti-CV y anti-CC de conejos, producen tres bandas de precipitación con el extracto antigénico frente al que se obtuvieron (CV o CC), y dos bandas con los extractos antigénicos de especies distintas.

b) El inmunosuero anti-CV obtenido de machos cabríos, produce una respuesta inmunitaria ligeramente menor. Así, se observaron dos bandas de precipitación frente al extracto antigénico CV, una frente al CO y ninguna frente al CC.

No obstante, debe señalarse que aunque las reacciones cruzadas no se detecten por Inmunodifusión, si son detectables cuando los inmunosueros se analizan por técnicas más sensibles, como las inmunoenzimáticas (ELISA). Asimismo, la técnica de inmunodifusión en geles de agarosa se ha utilizado única y exclusivamente como control interno experimental, es decir, que no importa tanto el número de bandas de precipitación observadas, como el constatar si los inmunosueros obtenidos presentan o no reacciones cruzadas frente a los extractos antigénicos de especies animales distintas de aquellas frente a las que se obtuvieron.

De los resultados obtenidos se concluyó que ni los inmunosueros anti-CV y anti-CC de conejos, ni el anti-CV de machos cabríos, podían utilizarse para detectar la presencia de leches de diversas especies animales en mezclas lácteas o en quesos, a no ser que se sometieran previamente a un proceso de purificación.

#### V. A. 3. PURIFICACION POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD, DE LOS INMUNOSUEROS ANTI-CV Y ANTI-CC.

Para purificar los inmunosueros por cromatografía de afinidad, se escogió como matriz la Sepharosa 4B-CNBr. Esta matriz se utiliza mucho en la purificación de los anticuerpos que se emplean en ensayos inmunoenzimáticos. La activación de la matriz con cianuro de bromo proporciona numerosos puntos de

unión con las proteínas a través de los grupos amino de las últimas (Axen y col., 1967) y permite el acoplamiento de una cantidad controlada de ligando.

De acuerdo con lo expuesto, los inmunosueros anti-CV y anti-CC de conejos, se purificaron pasándolos primero por una columna de afinidad que contenía como ligando el extracto antigénico frente al que se obtuvieron (CV o CC, en cada caso). La purificación por una columna permite recuperar los anticuerpos que reconocen como antígenos a las caseínas de la especie frente a la que se obtuvieron. No obstante, las caseínas de las leches de vaca, cabra y oveja presentan determinantes antigénicos comunes, por lo que en este proceso también se recogen otras inmunoglobulinas que reaccionan con las caseínas de especies distintas de las de procedencia.

Estas reacciones cruzadas se evidencian al analizar, mediante inmunodifusión en geles de agarosa, los inmunosueros purificados, ya que producen bandas de precipitación con las caseínas de las tres especies animales citadas. No obstante, este inconveniente se elimina neutralizando los inmunosueros purificados con caseínas de especies animales distintas de aquellas frente a las que se obtuvieron; de esta forma los inmunosueros se convierten en específicos, pudiendo utilizarse más tarde para detectar y cuantificar la presencia de leche de diversas especies en las mezclas lácteas y en los quesos madurados mediante el desarrollo de métodos inmunoenzimáticos (ELISA) indirectos.

Por otra parte, la purificación de los inmunosueros de interés, pasándolos por varias columnas de afinidad que contienen antígenos liofilizados de las caseínas frente a las que los inmunosueros presentan reacciones cruzadas,

permite eliminar del inmunosuero los anticuerpos responsables de dichas reacciones; en la última columna sólo permanecen los anticuerpos realmente específicos. Para mejorar la eficacia de este proceso, primero se separaron las inmunoglobulinas del inmunosuero total por precipitación con una solución de sulfato amónico saturado ( Harlow y Lane, 1988). De esta manera se separan del inmunosuero las proteínas sanguíneas y cualquier otra sustancia que interfiera con la purificación, permitiendo un mejor acoplamiento de las inmunoglobulinas precipitadas con sus antígenos correspondientes.

Los inmunosueros se purificaron pasándolos, como se ha dicho, por tres columnas cromatográficas y se enfrentaron a los extractos antigénicos CV, CC y CO, mediante la técnica del ELISA indirecto; se comprobó así la ausencia de reacciones cruzadas, por lo que se consideraron aptos para su empleo en la detección y cuantificación de las mezclas de leches de diversas especies por el método del ELISA sandwich.

Es de destacar el diferente contenido proteico de los inmunosueros purificados por tres columnas. Así, el anti-CV contenía 16 µg de proteína/mg de polvo liofilizado, mientras que el inmunosuero anti-CC presentaba un contenido proteico de 8,44 µg de proteína /mg. Pensamos que estas diferencias se deben, en parte, a la distinta respuesta inmunitaria de los animales de experimentación empleados pero, sobre todo, a la mayor cantidad de inmunoglobulinas inespecíficas del inmunosuero anti-CC; estas inmunoglobulinas se eliminan durante el proceso de purificación, contribuyendo así a rebajar el contenido proteico total.

#### V. A. 4. CONJUGACION DE LOS ANTICUERPOS PURIFICADOS A LA BIOTINA.

Debido a las múltiples ventajas analíticas del complejo avidina-biotina, descritas en los últimos años, en este trabajo se ha empleado una variante del ELISA clásico (indirecto o sandwich), basada en la utilización del sistema de amplificación avidina-biotina. Las ventajas de este sistema se deben a la gran afinidad de la avidina por la biotina ( $10^{15} \text{ M}^{-1}$ ), y a la gran estabilidad de esta interacción no covalente.

Por otro lado la biotina es fácilmente reconocida por la avidina, tanto si se une a moléculas de alto peso molecular como si lo hace a las de bajo (Green, 1975). El pequeño peso molecular de la biotina y las suaves condiciones de la conjugación evitan, en su unión con el anticuerpo los efectos perjudiciales que ocurren cuando los anticuerpos se conjugan con un enzima; consecuentemente no se afecta la afinidad del anticuerpo por el antígeno. No obstante, la avidina presenta uniones no específicas atribuidas a la basicidad de su molécula y a sus cadenas hidrocarbonadas. Esta limitación se elimina sustituyendo la avidina de la clara del huevo por la estreptavidina bacteriana (producida por *Streptomyces avidinii*), que es una proteína neutra no glucosilada (Wilchek y Bayer, 1988).

Para facilitar la unión de la biotina con las inmunoglobulinas de interés, se ha empleado en este trabajo el éster de la biotina denominado biotinil-N-hidroxí-succinimida (BNHS) que es hidrosoluble y fácil de manejar y que se une a los anticuerpos por sus grupos amino libres. La conjugación se realizó de la manera descrita por Bonnard y col. (1984), con ligeras modificaciones. Por otro lado, aunque los inmunoseros totales pueden conjugarse directamente a la biotina (Bayer y col., 1976) en este trabajo se ha preferido

emplear anticuerpos purificados para evitar reacciones inespecíficas en las técnicas de ELISA.

## **V. B. DETECCIÓN Y CUANTIFICACION DE LA LECHE DE VACA EN LA FRESCA Y EN LOS QUESOS MADURADOS DE OVEJA Y DE CABRA**

### **V. B. 1. DETECCIÓN DE LECHE DE VACA POR UN ELISA INDIRECTO.**

En la realización y desarrollo de esta técnica se utilizó el inmunosuero anti-CV de conejos, parcialmente purificado por una columna, conjugado a la biotina y neutralizado con las caseínas de cabra y oveja. Como ya se ha citado, las reacciones cruzadas que producen los anticuerpos purificados por una columna se eliminaron neutralizándolos o bloqueándolos con caseínas de cabra y oveja (Figuras IV. 7 y IV. 9). Los complejos antígeno-anticuerpo formados durante la neutralización no interfieren en el ensayo ya que se eliminan al lavar las placas de ELISA.

Por otro lado, la conjugación con la biotina de los anticuerpos parcialmente purificados produce una amplificación de la respuesta inmunológica. Ello se debe, a que al encontrarse las inmunoglobulinas unidas a muchas moléculas de biotina, el conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano encuentra más lugares de anclaje a los anticuerpos que cuando se utilizan como conjugado los anticuerpos anti-inmunoglobulinas de especie marcados con el mismo enzima.

Como antígenos se emplearon leche cruda y entera y extractos de quesos de vaca, oveja, cabra o de sus mezclas (vaca/oveja, vaca/cabra). Como se observa en las Figuras IV. 8 y IV. 10, la respuesta del inmunosuero a porcentajes crecientes

de leche de vaca en la de oveja es similar en las mezclas lácteas y en las de queso, obteniéndose en ambos casos una ecuación de regresión lineal, que permite cuantificar de un 1 a un 50 % de adición de leche de vaca en la leche o en el queso de oveja.

En la detección de leche de vaca en la leche y en el queso de cabra (Figuras IV. 15 y IV. 16), la respuesta obtenida frente a porcentajes crecientes de leche de vaca en las mezclas fue también lineal. No obstante, en este caso, los mejores coeficientes de correlación se obtuvieron entre el 1 y 25 % de sustitución de leche de cabra por la de vaca, mientras los valores medios de absorbancia de la recta de regresión fueron ligeramente superiores a los de las Figuras IV. 8 y IV. 10.

La respuesta inmunológica de tipo lineal es muy frecuente en las técnicas inmunoenzimáticas y puede decirse que depende, por un lado, de la afinidad de los anticuerpos por el antígeno y, de otro, de las concentraciones de los reactivos que intervienen en el ensayo. Aunque la respuesta lineal en la detección de concentraciones pequeñas de antígeno es menos eficaz, resulta preferible cuando el antígeno de interés se encuentra en mayor cantidad en la muestra problema.

El que los valores medios de la absorbancia en la recta de regresión, sean ligeramente mayores en las mezclas de leche vaca/cabra que en las de vaca/oveja, puede atribuirse a varios factores. En primer lugar, a que, probablemente, la caseína bovina presenta un mayor número de determinantes antigénicos comunes con la caprina que con la ovina, por lo que la neutralización de los anticuerpos anti-CV parcialmente purificados resulta insuficiente, y éstos reconocen en parte a las caseínas de cabra, produciendo un aumento de los valores

de absorbancia. Por otro lado, la propia sencillez del ELISA indirecto produce una mayor variabilidad en los distintos ensayos, puesto que al ser el antígeno el que se fija directamente a los pocillos, la cantidad adsorbida a los mismos puede variar de un ensayo a otro.

Tanto en la detección de la presencia de leche de vaca en la de oveja como en la de cabra, si la adición superase al 50 % la fiabilidad sería escasa, ya que a partir de este valor se produce una saturación de antígeno y los valores de las absorbancias no aumentan al hacerlo el porcentaje de sustitución. Asimismo, **tampoco** pueden detectarse adiciones inferiores al 1 % ya que la sensibilidad del método es insuficiente y apenas existen diferencias entre los valores de las absorbancias a sustituciones del 0 % y 1 %.

Como se deduce de lo anteriormente expuesto, la técnica del ELISA indirecto presenta las ventajas de su sencillez en la preparación de los reactivos, y de su rapidez, ya que se invierten menos de 4 horas en su realización. No obstante, presenta el inconveniente de su variabilidad en distintos ensayos y de ser poco eficaz en la detección de sustituciones muy pequeñas de leche de una especie animal por la de otra.

#### V. B. 2. DETECCION DE LECHE DE VACA POR UN ELISA SANDWICH.

En la detección de leche de vaca en las mezclas de leche fresca y en los quesos madurados de oveja y cabra mediante un ELISA sandwich, se emplearon como anticuerpos de captura los anti-CV de machos cabríos purificados por cromatografía de afinidad en tres columnas y como anticuerpos de detección los mismos, pero conjugados a la biotina.

La especificidad del ELISA sandwich se debe a la utilización de anticuerpos de captura, muy específicos, que se adsorben a los pocillos de las placas de ELISA y capturan los antígenos de la muestra problema frente a los que se obtuvieron. Al añadir los anticuerpos de detección, no se encuentran con una mezcla heterogénea de antígenos sino con los específicos de la muestra a analizar, por lo que se unirán a ellos más fácilmente. De aquí que, no sea necesario que los anticuerpos de detección se encuentren tan purificados como los de captura; no obstante, para mejorar la sensibilidad del método, se ha preferido utilizar en ambos casos los anticuerpos purificados por tres columnas de afinidad. Por otro lado, la conjugación de los anticuerpos de detección con la biotina, produce un aumento de la respuesta inmunológica y disminuye la variabilidad de los resultados.

Los resultados obtenidos con este tipo de ELISA en la detección de leche de vaca en las mezclas de leche y queso de vaca/oveja, se observan en las Figuras IV. 12 y IV. 14, y en las Figuras IV. 17 y IV. 18 se muestran los correspondientes a las mezclas de leche y de queso de vaca/cabra. La respuesta inmunitaria frente a concentraciones crecientes de leche de vaca fue logarítmica en todos los casos.

Cuando se pretende detectar la presencia de cantidades muy pequeñas del antígeno de interés es preferible la respuesta logarítmica a la lineal. De esta manera es posible detectar hasta un 0,1 % de leche de vaca en las mezclas lácteas y en los quesos de interés.

Si se comparan el ELISA sandwich con el indirecto, se ve que el porcentaje de sustitución a partir del cual se produce una saturación de antígeno es menor en el primer caso; así, en el ELISA sandwich, este porcentaje es del 25 % tanto en

las mezclas de leche como en las de queso, mientras que en el ELISA indirecto es del 50 %. En consecuencia, a partir de estos porcentajes de sustitución de leche de vaca, los valores de absorbancia ya no aumentan. Este hecho, que a primera vista podría parecer un inconveniente, no lo es, puesto que lo más interesante en la lucha contra el fraude consiste en la detección de sustituciones pequeñas de leche de oveja por la de vaca que son las que corrientemente suelen practicarse, ya que sustituciones mayores originan productos de características muy distintas de las del producto original que se aprecian organolépticamente.

Como consecuencia de lo expuesto hasta ahora, puede concluirse que el ELISA sandwich, a pesar de que necesita una mayor purificación de los inmunosueros y de requerir mucho más tiempo (5 horas), presenta ventajas indudables frente al ELISA indirecto, como son su gran sensibilidad (0,1 % de sustitución) y el no necesitar inmunosueros neutralizados para llevarlo a cabo.

### V. B. 3. COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN ESTE TRABAJO CON LOS DE OTROS INVESTIGADORES.

Los métodos empleados para identificar el origen de la leche de mezclas lácteas y de quesos frescos y madurados se revisan en la sección II. C. de este trabajo. Se concluye que, de los métodos cromatográficos, los más sensibles son los basados en el estudio de la fracción proteica de la leche, en especial la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), que en estos últimos años ha desplazado a las demás técnicas cromatográficas por su mayor rapidez y poder de resolución. Analizando los cromatogramas resultantes de la degradación tripsínica de las caseínas, Kaiser y Krause (1985) detectaron hasta un 1 % de leche de vaca en el queso de cabra. Haasnot y col. (1986) señalan la detección de

un 2-4 % de leche de vaca en la leche y quesos frescos de oveja y cabra por FPLC (cromatografía líquida rápida de proteínas); para ello utilizaron como indicador la caseína  $\alpha_{S1}$  de vaca. No obstante, en los quesos madurados la sensibilidad del método disminuía al 10 % de detección, debido a la rápida degradación de la caseína  $\alpha_{S1}$  durante la maduración de aquellos; en este caso hubo de emplearse como indicador caseína  $\alpha_{S1}$ -I, producto de la descomposición de la anterior.

Los métodos cromatográficos que se basan en estudiar algunas relaciones de los ácidos grasos de la leche no son tan eficaces. Ramos y col. (1977) sólo consiguieron detectar un 7 % de leche de vaca en quesos tipo Manchego elaborados con mezclas de leche de oveja/vaca, y Smeyers-Verbeke y col. (1977), estudiando los datos cromatográficos de 15 ácidos grasos, señalaron que sólo podía detectarse la presencia de un 10 % o más de leche de diferente origen en las mezclas de leche de dos especies animales distintas. Este límite de detección tampoco lo mejoraron Iverson y Sheppard (1985, 1989) que propusieron utilizar la relación entre los ácidos cáprico y laúrico para detectar la adición de leche de vaca a los quesos de cabra y oveja.

En general los métodos cromatográficos presentan los inconvenientes de requerir una preparación laboriosa de las muestras, necesitar personal especializado y utilizar instrumentos de coste elevado. Además los basados en el análisis de los ácidos grasos presentan interferencias cuando las grasas sufren un proceso oxidativo que disminuye así su sensibilidad.

Los métodos electroforéticos han sido muy empleados para identificar el origen de las leches de mezclas lácteas. En este sentido, es de destacar que la

electroforesis de las caseínas en geles de poliacrilamida es la de mayor utilidad, ya que las proteínas no se afectan por los tratamientos térmicos y sus límites de sensibilidad son comparables a los de los métodos biológicos. Han sido muchos los investigadores que han empleado y desarrollado los métodos electroforéticos (Assenat, 1967; Pierre y Portmann, 1970; Ramos y col., 1977; Addeo y col., 1981); los niveles de detección de leche de vaca en diversas mezclas y muestras oscilan entre el 1,5 y 5 % en las leches de oveja, cabra y búfala. En los quesos madurados, la detección de la leche de vaca presenta problemas debido a la proteólisis de sus caseínas y a la aparición de nuevas bandas que dificultan la lectura de los geles. Para paliar este inconveniente, Ramos y col. (1977) utilizaron como indicador de la presencia de leche de vaca la caseína  $\alpha_{S1}$ -I procedente de la degradación durante el afinado de la caseína  $\alpha_S$ ; sin embargo, el límite de detección no fue menor del 5 %.

Algunos investigadores han utilizado la electroforesis en geles de poliacrilamida de las proteínas del suero, para detectar y cuantificar la presencia de leche de vaca en las de oveja (Amigo y col., 1986, 1987) y búfala (Addeo y col., 1979). Addeo y col. (1979) se basaron en las moviidades electroforéticas de la  $\alpha$ -lactalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina; no obstante, dependiendo de las variantes genéticas presentes en la leche de vaca los límites de detección conseguidos nunca fueron menores del 12 %. Amigo y col. (1986 y 1987) basándose en la movilidad electroforética de la  $\beta$ -lactoglobulina B y A llegaron a detectar hasta un 2 % de leche de vaca en la de oveja. Además, dichos investigadores observaron que esta proteína permanecía inalterada durante la maduración del queso.

Amigo y col. (1991) utilizaron la electroforesis para evaluar la influencia que ejercen diversos parámetros tecnológicos (tipo de cuajo, prensado, maduración, tratamiento térmico de la leche, tinción de los geles, etc.) en la detección de leche de vaca en el queso de oveja. Concluyeron que ni el tipo de cuajo empleado (animal o vegetal), ni el prensado (manual o mecánico), ni el tiempo de maduración, influían en la sensibilidad del método. Mediante la tinción de los geles con nitrato de plata detectaron hasta un 1% de leche de vaca en diversas mezclas; sin embargo, este procedimiento es más largo y costoso que el de la tinción tradicional con Azul Brillante de Coomassie. De otra parte, el calentamiento de la leche a 90 °C durante 30 minutos desnaturaliza las proteínas del suero y produce resultados negativos.

El isoelectroenfoque (IEF) de las proteínas en geles de poliacrilamida se considera como una variante de la electroforesis convencional, que difiere de ésta en que la separación de las proteínas se produce en un gradiente de pH estable, por lo que su separación sólo depende de su punto isoeléctrico y no de su carga y tamaño. Como indicadores pueden utilizarse las caseínas  $\gamma$  (Krause y col., 1982; Addeo y col., 1989, 1990), las paracaseínas  $\kappa$  (Addeo y col., 1984, 1990; Mauriello y col., 1989) o bien las proteínas séricas (Ruiz y Santillana, 1986; Rispoli y Saugues, 1989), cuyos puntos isoeléctricos difieren de unas especies animales a otras. En general, la sensibilidad de este método permite detectar entre un 0,5 y 2 % de leche de vaca en las leches y quesos de cabra, de oveja o de búfala.

Debido a la degradación proteica que tiene lugar durante la maduración de los quesos, se ha recurrido a someter a las caseínas  $\beta$  a la acción de la plasmina,

con lo que se consigue su degradación completa a caseínas  $\gamma$ ; sometiendo éstas IEF se puede detectar la presencia de un 1 % de leche de vaca en los quesos de oveja o de búfala (Addeo y col., 1989, 1990). No obstante, los mejores niveles de detección se han conseguido analizando por IEF las paracaseínas  $\kappa$  bovina y ovina (Addeo y col., 1990); en el queso Roquefort se ha llegado a detectar hasta un 0,5 % de leche de vaca. Estos autores utilizaron un gradiente de pH de 7-10 y tiñeron los geles con una solución de nitrato de plata.

Son pocos los trabajos que comparan la eficacia de las técnicas electroforéticas e inmunológicas para detectar la presencia de leche de diversas especies animales en las mezclas lácteas frescas y en los quesos madurados. En este sentido, es de destacar el estudio realizado por Amigo y col. (1989), en el que compararon la electroforesis en geles de poliacrilamida de las proteínas del suero (Amigo y col., 1986), con la inmunodifusión radial (Levieux, 1977), para detectar la presencia de leche de vaca en quesos elaborados con mezclas de leche de vaca, oveja y cabra. Dichos investigadores concluyeron que la electroforesis era más eficaz y que la inmunodifusión da valores de sustitución inferiores a los reales, lo cual podría ser consecuencia del efecto ejercido por el tratamiento térmico en las proteínas del suero. A pesar de su sensibilidad, los métodos electroforéticos presentan el inconveniente de que necesitan mucho tiempo para realizar los análisis.

Los métodos inmunológicos empleados para establecer el origen de la leche en mezclas lácteas y en quesos presentan el inconveniente de que algunos son cualitativos o semicuantitativos. Entre los más empleados destacan la inmunodifusión doble y la radial. El método de inmunodifusión doble fue utilizado en 1974 por Durand y col., y se basaba en el empleo de un Inmunosuero obtenido

frente a las proteínas solubles del suero sanguíneo bovino, neutralizado con las proteínas séricas de cabra y de oveja. El límite de detección descrito fue del 2,5 % de leche de vaca en la de oveja y cabra y, actualmente, se comercializa con los nombres de "Brebitec" y "Capritec", empleándose también en los quesos. Otros investigadores como Gombocz y col. (1981), utilizando este método y un inmunosuero anti-caseínas de leche de vaca neutralizado con proteínas de leche de oveja, detectan un 5 % de leche de vaca en la de oveja. García y col. (1989) desarrollaron un método de inmunodifusión doble con los reactivos adsorbidos en discos de papel de filtro; el inmunosuero utilizado se obtuvo de machos cabríos frente a proteínas séricas de leche de vaca y la sensibilidad descrita fue del 3 %. Mediante la inmunodifusión radial, basada en el método de Levieux (1977), los niveles de detección conseguidos son mejores, llegando al 1 % de detección de leche de vaca en la de oveja o cabra y se comercializa con el nombre de CV test. No obstante, presenta el inconveniente de que para detectar la leche de vaca en el queso madurado de cabra o de oveja, deben establecerse correcciones de acuerdo con el extracto seco total.

Otro método inmunológico de elevada sensibilidad es el de la inmunoelectroforesis. Este método combina las técnicas de inmunodifusión (formación de complejos antígeno-anticuerpo) y de electroforesis (movilidad en un campo eléctrico) y lo han empleado muchos investigadores que le asignan un límite de detección de un 0,1 a un 0,2 % de leche de vaca en las leches y quesos de oveja y cabra (Elbertzhagen, 1982, 1987; Krause y col., 1988). Otra ventaja de esta técnica es que los resultados no cambian ni al tratar térmicamente la leche ni durante la maduración de los quesos. No obstante, si bien la inmunoelectroforesis es una técnica sensible, se considera cualitativa o semicuantitativa y es tan laboriosa y costosa como la electroforesis.

También conviene mencionar la técnica del inmunodotting, en la que la visualización de la interacción antígeno-anticuerpo se realiza en un papel de nitrocelulosa y que según Aranda y col. (1988), permite detectar un 0,1 % de leche de vaca en la leche y queso de oveja. Sin embargo, esta técnica se considera semicuantitativa ya que se basa en la apreciación subjetiva de la intensidad de las manchas que aparecen en el papel. Por otro lado el Inmunosuero utilizado también necesita una purificación previa y el tiempo de realización del ensayo es parecido al de otros métodos Inmunoenzimáticos realizados en placas de ELISA.

Finalmente, conviene destacar el importante papel de las técnicas Inmunoenzimáticas (ELISA) en el análisis de los alimentos. Recientemente, García y col. (1990, 1991), han obtenido reactivos y desarrollado un ELISA indirecto (García y col., 1990) y otro sandwich (García y col., 1991), para detectar y cuantificar la presencia de leche de vaca en la de oveja. Empleando un inmunosuero anti-proteínas séricas de leche de vaca, neutralizado o purificado por cromatografía de afinidad, se alcanzó en ambos casos un límite de detección del 1 % de leche de vaca en la de oveja. El inconveniente del inmunosuero descrito es el no permitir una detección fiable de la leche de vaca en los quesos madurados ya que las proteínas séricas son muy sensibles a los tratamientos térmicos y además su concentración es pequeña en los quesos madurados.

De lo anteriormente citado, se deduce que las técnicas Inmunoenzimáticas (ELISA) desarrolladas en este trabajo, son más sensibles que la mayoría de las cromatográficas y de inmunodifusión, presentando una sensibilidad similar a las de isoelectroenfoque, inmunoelectroforesis e inmunodotting. Con los reactivos inmunológicos descritos en este trabajo, el ELISA sandwich desarrollado permite la detección de un 0,1 % de leche de vaca en las leches frescas y en los quesos de

oveja y cabra, ofreciendo como ventajas adicionales frente a los métodos señalados que no necesita una preparación previa de las muestras, requiere sólo 5 horas para su realización, su coste económico es pequeño y permite analizar un gran número de muestras en una sólo placa de ELISA.

#### **V.C. DETECCION Y CUANTIFICACION DE LA LECHE DE CABRA EN LA FRESCA Y EN LOS QUESOS MADURADOS DE OVEJA.**

Dada la escasez de trabajos que desarrollan técnicas analíticas para detectar la leche de cabra en la de oveja, y la importancia que está adquiriendo en nuestro país la fabricación de quesos con leche de estas especies, se consideró de interés poner a punto dos métodos inmunoenzimáticos (ELISA), indirecto y sandwich, con el objetivo descrito.

##### **V. C. 1. DETECCION DE LECHE DE CABRA POR UN ELISA INDIRECTO.**

Puesto que utilizando un ELISA indirecto para la detección de leche de vaca en la leche y en los quesos de oveja y cabra se obtuvieron resultados satisfactorios, se procedió a emplear la misma técnica en la detección y cuantificación de la leche de cabra en la leche y quesos de oveja.

En este caso se utilizó el inmunosueroanti-CC de conejos, purificado por una columna, conjugado a la biotina y neutralizado con caseínas liofilizadas de vaca y oveja. Como se deduce de la Figura IV. 19, son evidentes las ventajas obtenidas con el empleo del sistema de amplificación avidina-biotina tras la neutralización de los anticuerpos.

Los resultados obtenidos con este ELISA indirecto se muestran en las Figuras IV. 20 y IV. 22. Tanto en las mezclas lácteas como en las de queso, la respuesta de los anticuerpos a la presencia creciente de leche de cabra produce un incremento lineal de la absorbancia, en especial entre los porcentajes 1 y 25 % de sustitución. Asimismo, a partir del 50 % de sustitución la adición de leche de cabra no puede detectarse con fiabilidad, puesto que desde ese momento se produce una estabilización en la absorbancia de las muestras. La sensibilidad del método no permite detectar la presencia de leche de cabra en concentraciones inferiores al 1 %.

#### V. C. 2. DETECCION DE LECHE DE CABRA POR UN ELISA SANDWICH.

Dada la analogía existente entre las leches de cabra y oveja y la sensibilidad del ELISA sandwich para detectar la presencia de leche de vaca en la de oveja y cabra, se pensó en desarrollar y poner a punto esta metodología para la detección y cuantificación de la leche de cabra en las mezclas de leche y en los quesos de oveja.

Los anticuerpos utilizados fueron los anti-CC de conejo, purificados por tres columnas, conjugados a la biotina unas veces (anticuerpos de detección) y otras sin conjugar (anticuerpos de captura).

Analizando mezclas experimentales de leche y de queso de composición conocida se obtuvieron los resultados que se observan en las Figuras IV. 24 y IV. 26. La respuesta inmunológica obtenida fue en ambos casos lineal, permitiendo la detección de un 1 a un 100 % de sustitución de leche o queso de oveja por los de cabra. Como se desprende de la Figura IV. 24, la absorbancia para el 0 % de

sustitución (leche pura de oveja) no fue menor de 0,300, mientras que para una sustitución del 100 % (leche pura de cabra), la absorbancia no superó el valor de 1,252. Valores similares se encontraron con las mezclas de queso.

Esta respuesta lineal, que contrasta con la logarítmica observada en la detección de leche de vaca, puede deberse, de una parte, a la propia sensibilidad del ELISA sandwich, y de otra, a la escasa especificidad del inmunosuero anti-CC. Este hecho, que ya se ha comentado en la sección V. A. 3., se debería, como se resaltaba allí, a que el contenido proteico del inmunosuero anti-CC purificado por tres columnas era aproximadamente la mitad del correspondiente al inmunosuero anti-CV purificado de la misma manera; tal diferencia en contenido proteico lo atribuimos a que la concentración de inmunoglobulinas inespecíficas del inmunosuero anti-CC retenidas en las dos primeras columnas (la mayoría de las cuales reconocen a determinantes antigénicos comunes con la caseína de oveja), es grande, con lo que disminuye la concentración de inmunoglobulinas específicas retenidas en la última columna.

No obstante, el ELISA sandwich es el más eficaz para la detección y cuantificación de la leche de cabra en la leche y en el queso de oveja. Aunque los valores de las absorbancias obtenidos con este tipo de ELISA sean menores que los del ELISA indirecto y aunque con él no se detecten concentraciones menores del 1 %, este método es el más fiable, dado el intenso proceso de purificación al que se somete el inmunosuero. Por otra parte, cuando los porcentajes de sustitución de leche de oveja por la de cabra varían entre el 1 y el 100 %, la respuesta obtenida es de tipo lineal; además no se produce una saturación de los componentes que intervienen en el ensayo, contrariamente a lo que sucede con el ELISA indirecto.

### V. C. 3. EVALUACION DE LOS RESULTADOS DE ESTE TRABAJO FRENTE A LOS DE OTRAS TECNICAS.

Si bien la mayoría de los trabajos desarrollados para identificar el origen específico de la leche de mezclas lácteas y de quesos persiguen la detección de la leche de vaca, también se han desarrollado algunos métodos para identificar la presencia de leche de cabra en la de oveja y en sus quesos, según se señaló en la sección II. C. Entre los métodos no inmunológicos, se han citado los cromatográficos (Smeyers-Verbeke, 1977), que no detectan adiciones de leche de cabra menores del 10 %, y la electroforesis en geles de poliacrilamida (Assenat, 1967; Amigo y col., 1989), que tampoco logra mejores resultados. Respecto este último método Assenat (1967) señaló que, debido a la similitud de las caseínas  $\alpha_s$  ovina y caprina, sus resultados no son fiables para sustituciones de leche de oveja por la de cabra menores del 30 %. Otro método es el del isoelectroenfoque, puesto a punto por Ruiz y Santillana (1986), cuyo límite de sensibilidad es del 3 %; utiliza como indicadores las proteínas del suero de leche en un gradiente de pH de 3,5-9,5.

De los métodos inmunológicos, uno de los primeros empleados en la detección de leche de cabra fue el de la inmunoprecipitación en medio líquido (Pinto, 1966). La sensibilidad del método fue del 5 %; emplea inmunosueros anti-proteínas sanguíneas de leche de cabra, neutralizados con las proteínas sanguíneas de las especies con las que presentaban reacciones cruzadas. No obstante, este método sólo era aplicable a la leche cruda y a la pasteurizada, dado que con tratamientos térmicos de mayor intensidad no se observa precipitación.

El método de inmunodifusión radial de Levieux (1977), es el más utilizado en la identificación de leche de cabra; tiene un límite de detección del 1 %, y se comercializa actualmente bajo el nombre de BC test; se emplea tanto en mezclas lácteas como en quesos. Entre las limitaciones de este método señalaremos que en las leches sometidas a tratamientos térmicos superiores a 75 °C durante 30 segundos debe aplicarse un factor de corrección, lo mismo que en los quesos, en los que también es necesario establecer correcciones según su extracto seco total. Amigo y col. (1989), comparando los métodos de electroforesis e inmunodifusión, concluyeron que el segundo es menos fiable que el primero y a que da valores de sustitución inferiores a los reales.

García (1990) ha desarrollado y puesto a punto dos métodos inmunoenzimáticos (ELISA), indirecto y sandwich, para la detección de leche de cabra en la de oveja. Emplea un inmunosuero anti-proteínas séricas de leche de cabra, neutralizado o purificado por cromatografía de afinidad. El límite de sensibilidad obtenido de ambos ELISA es del 1 %. No obstante, los mejores resultados se obtenían al emplear como antígeno el suero de la leche ya que la leche entera da una respuesta inmunológica menos precisa.

De lo anteriormente expuesto se concluye que los métodos inmunoenzimáticos (ELISA), indirecto y sandwich, desarrollados en este trabajo, son adecuados para la detección de la leche de cabra en la de oveja. Su sensibilidad es comparable a la de otros métodos inmunológicos (1 %), y pueden emplearse tanto en mezclas de leche como en quesos madurados; su realización sólo requiere 4-5 horas.

**V. D. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS TERMICOS DE LA LECHE EN LA DETECCION Y CUANTIFICACION DE LECHE DE VACA Y CABRA EN MEZCLAS LACTEAS EXPERIMENTALES. MEDIANTE LAS TECNICAS INMUNOENZIMATICAS (ELISA) DESARROLLADAS EN ESTE TRABAJO.**

Puesto que las caseínas de la leche presentan una elevada termoestabilidad y dado que se utilizan como antígenos en la obtención de los inmunoseros empleados en este trabajo, se consideró de interés analizar la influencia de los tratamientos térmicos en la capacidad de los anticuerpos de reconocer a las caseínas frente a las que se obtuvieron.

Los resultados obtenidos con las leches de vaca y cabra sometidas a distintos tratamientos térmicos manifiestan ciertas diferencias que dependen del método ELISA empleado (indirecto o sandwich). Respecto al ELISA indirecto, en las Figuras IV. 27 y IV. 29 se muestran los valores de absorbancia obtenidos al analizar muestras de leche de oveja que contenían 0, 1, 5, 10, 15, 25, 50 y 100 % de leche de vaca o cabra. Como se deduce de la observación de estas figuras, la sensibilidad del método no cambia con los tratamientos térmicos empleados y el descenso de los valores de absorbancia es poco manifiesto entre las mezclas de leche cruda, pasterizada, esterilizada o UHT.

No obstante, la sensibilidad del ELISA sandwich disminuye con el tratamiento térmico de la leche, siendo las absorbancias de las mezclas de leche esterilizada y UHT significativamente menores que las de la leche cruda y pasterizada (Figuras IV. 28 y IV. 30). Así, en la detección de leche de vaca en la de oveja (Figura IV. 28), las absorbancias de la cruda, pasterizada, esterilizada y UHT con un 25 % de sustitución fueron, respectivamente 2,390, 2,360, 0,571 y

0,980. En la detección de leche de cabra en la de oveja (Figura IV. 30), las absorbancias del 100 % de sustitución fueron, respectivamente, de 1,250, 1,163, 0,851 y 0,958.

La razón de que se aprecie mejor el efecto negativo de los tratamientos térmicos en la detección de leches de vaca y cabra, en los ELISA sandwich que en los indirectos se debe probablemente a la mayor sensibilidad de los primeros. La pasterización de la leche (62 °C durante 30 minutos) no afecta a la estructura de las caseínas, pero a partir de los 70 °C comienzan a producirse cambios estructurales, que son tanto más marcados cuanto mayor es la temperatura de calentamiento. Efectivamente, a partir de los 70 °C las proteínas del suero, principalmente la  $\beta$ -lactoglobulina, se asocian a las caseínas  $\kappa$  y  $\alpha_{S2}$  y, a partir de los 120 °C, las caseínas, en particular la caseína  $\beta$ , comienzan a perder algunos radicales nitrogenados, con lo que aumenta la fracción de proteosa-peptona y de nitrógeno no proteico de la leche (Walstra y Jenness, 1987). Los cambios estructurales así como la precipitación de las proteínas del suero en las moléculas de caseína dificultan el reconocimiento de sus correspondientes antígenos por parte de los anticuerpos de captura, que son muy específicos; por esta causa los anticuerpos de detección encuentran menos moléculas de caseína a las que unirse disminuyendo así la respuesta inmunológica del ELISA sandwich.

De ello se deduce que si la adulteración de la leche de oveja se realiza con leche esterilizada y la detección se realiza con un ELISA sandwich, los valores de absorbancia obtenidos podrían inducir a error ya que equivaldrían a porcentajes de sustitución menores que los reales. Por el contrario, si la detección y cuantificación se realiza con un ELISA indirecto, los valores de las absorbancias

no resultarían tan afectados por el tratamiento térmico. No obstante, deben realizarse un mayor número de experiencias para valorar convenientemente la influencia de los tratamientos térmicos en la detección de leche de vaca y cabra por métodos inmunoenzimáticos (ELISA).

CAPITULO VI

**CONCLUSIONES**

1. Se ha comprobado que cuando se utiliza la técnica de inmunodifusión en geles de agarosa, los inmunosueros anti-caseínas de leche de vaca (anti-CV) y anti-caseínas de leche de cabra (anti-CC) producen reacciones cruzadas con otras caseínas de especies animales distintas de aquellas frente a las que se obtuvieron. En consecuencia estos inmunosueros no pueden utilizarse con fiabilidad en las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA), aplicadas a la detección y cuantificación de las leches de vaca y de cabra en las mezclas lácteas y en quesos. Para ello deben someterse a un proceso de purificación previo.

2. La purificación de los inmunosueros anti-CV y anti-CC de conejos, por cromatografía de afinidad en una columna de Sepharosa 4B-CNBr, que contiene como ligando el extracto antigénico frente al que se habían obtenido, no elimina sus reacciones cruzadas con las caseínas de especies heterólogas. Estas se evitan neutralizando los anticuerpos parcialmente purificados con las caseínas liofilizadas de las especies animales frente a las que presentan reacciones cruzadas.

3. Los inmunosueros anti-CV de macho cabrío y anti-CC de conejos, pueden purificarse por cromatografía de afinidad pasándolos por tres columnas; las dos primeras contienen como ligandos las caseínas de especies heterólogas, y la última las de la especie frente a la que se obtuvieron. La precipitación previa del inmunosuero total con sulfato amónico saturado mejora la purificación de las inmunoglobulinas.

4. La técnica inmunoenzimática (ELISA indirecto) desarrollada en este trabajo, permite detectar y cuantificar la presencia de leche de vaca en las leches y quesos de oveja y de cabra dentro de un rango de adición del 1 al 50 %. No obstante, la sensibilidad del método es insuficiente para detectar

concentraciones menores del 1 %, mientras que a partir del 50 % de sustitución la presencia de leche de vaca no se detecta con fiabilidad ya que se produce la saturación de los componentes que intervienen en el ensayo.

5. El ELISA sandwich desarrollado es el método más eficaz para la detección y cuantificación de la leche de vaca en las leches y quesos de oveja y de cabra, puesto que permite cuantificar de un 0,1 a un 25 % de sustitución; su respuesta inmunológica es logarítmica lo que permite emplearlo cuando los niveles de sustitución son pequeños.

6. Con el ELISA indirecto desarrollado en este trabajo y utilizando anticuerpos anti-CC, parcialmente purificados y neutralizados, es posible cuantificar una sustitución de leche o queso de oveja por los de cabra del orden del 1 al 25 %.

7. El ELISA sandwich desarrollado, que emplea anticuerpos anti-CC purificados por tres columnas, permite detectar de un 1 a un 100 % de leche de cabra en las leches y quesos de oveja; este método es el más recomendable debido a la purificación exhaustiva a que se someten los anticuerpos y a su respuesta lineal a concentraciones crecientes de leche de cabra. Con ninguno de los ELISA desarrollados pudieron detectarse con precisión concentraciones de leche de cabra menores del 1 %.

8. Los tratamientos térmicos a los que se somete comercialmente la leche no influyen en la detección de leches de vaca y cabra por el método del ELISA indirecto. Por el contrario, el ELISA sandwich pierde mucha sensibilidad al calentar la leche a temperaturas mayores de 70 °C.

CAPITULO VIII

**TRABAJO FUTURO**

De los resultados descritos en este trabajo puede concluirse que los anticuerpos policlonales anti-caseínas de leche de vaca y cabra, parcialmente purificados y neutralizados con las caseínas de las especies heterólogas o purificados por cromatografía de afinidad, permiten el reconocimiento de epítopos específicos de las caseínas de vaca y cabra.

No obstante, la utilización de anticuerpos policlonales presenta una serie de problemas que limitan su empleo en las técnicas inmunológicas. Estas limitaciones se deben no sólo a que el proceso de obtención y de purificación de los inmunosueros es largo y costoso y a la diferente respuesta de cada animal frente al proceso de inmunización, sino fundamentalmente a que los anticuerpos específicos resultantes constituyen una mezcla heterogénea de inmunoglobulinas, cuya afinidad es bastante variable debido a los distintos determinantes antigénicos frente a los que se obtuvieron.

Ello conduce a pensar en la utilidad de los anticuerpos monoclonales, así como en el empleo de los mismos para la identificación de la presencia de leche de diversas especies animales en mezclas lácteas y quesos madurados. Las ventajas de la utilización de anticuerpos monoclonales se derivan fundamentalmente de tres características: especificidad, homogeneidad y obtención en cantidades ilimitadas. El inicio de la tecnología de la obtención de anticuerpos monoclonales deriva de los trabajos de Kohler y Milstein (1975) que desarrollaron una técnica que permitía el crecimiento de clones de células secretoras de anticuerpos de especificidad definida. Mediante este procedimiento, las células secretoras de anticuerpos (linfocitos) procedentes de ratones inmunizados, se fusionan con células tumorales (mieloma) de ratón. La célula híbrida obtenida, denominada híbridoma, hereda de los linfocitos la capacidad de producir anticuerpos y de las células tumorales la de reproducirse

indefinidamente *in vitro*. A los anticuerpos producidos por estos hibridomas se les denomina, pues, anticuerpos monoclonales.

Puesto que en nuestro Departamento se posee experiencia en la obtención de anticuerpos monoclonales frente a las proteínas musculares solubles de la carne de pollo y en su empleo en la detección y cuantificación de la presencia de esta carne en mezclas cárnicas, proponemos obtener en un futuro próximo anticuerpos monoclonales específicos frente a las caseínas de vaca y de cabra, con vistas a su empleo en la identificación de la leche de estas especies en mezclas lácteas y en quesos madurados. No obstante, para ello deben alcanzarse los siguientes objetivos parciales:

1. Utilizar los anticuerpos obtenidos en este trabajo procedentes de la inmunización de conejos con caseínas de vaca y cabra y, más tarde, purificados por cromatografía de afinidad (anti-CV y anti-CC), para identificar las fracciones caseínicas ( $\alpha_s$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ ) de la leche de vaca y cabra, que induzcan la formación de una mayor concentración de anticuerpos especie-específicos. El fraccionamiento de las caseínas de la leche de vaca y cabra se realizará por cromatografía líquida rápida (FPLC), siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Andrews y col. (1985) y Davies y Law (1987).

2. Inmunizar ratones Balb/c con las fracciones caseínicas inductoras de la mayor concentración de anticuerpos especie-específicos de vaca y cabra y fusionar posteriormente los linfocitos extraídos del bazo de los ratones inmunizados con células de mieloma de ratón.

3. Una vez identificados y obtenidos los hibridomas productores de

anticuerpos monoclonales específicos frente a las caseínas de vaca y cabra, se procederá al análisis de los anticuerpos monoclonales producidos y a su evaluación utilizando técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) del tipo indirecto y sandwich, para detectar y cuantificar la presencia de leche de vaca o cabra en mezclas lácteas y quesos madurados.

4. Asimismo, se procederá a extraer de los híbridos de interés su RNA mensajero y de éste se obtendrá el DNA complementario para, mediante la utilización del sistema PCR (reacción en cadena de la polimerasa), enriquecer la preparación y proceder a la clonación en vectores genéticos adecuados de las secuencias VH (cadena pesada de la región variable) y VL (cadena ligera de la región variable), responsables del reconocimiento antigénico de los anticuerpos monoclonales por ellos producidos.

5. Utilizando hospedadores bacterianos como Escherichia coli y mediante la utilización de vectores genéticos adecuados, plásmidos (Ward y col., 1989) o bacteriófagos (Huse y col., 1989), se intentará la inserción, expresión y secreción al exterior de las cadenas peptídicas de interés de los anticuerpos monoclonales.

Las ventajas de la utilización de bacterias genéticamente manipuladas para sintetizar anticuerpos monoclonales son obvias en lo que se refiere a estabilidad genética de esta función, a su modificación genética utilizando mutágenos diversos, al almacenamiento de las bacterias a temperaturas de congelación menores y a su facilidad de transporte de un laboratorio a otro, de un país a otro, etc., sin los problemas de mortalidad celular propios de las células eucariotas.

CAPITULO VIII

**BIBLIOGRAFIA**

- ADDEO, F., CHIANESE, L. y SCUDIERO, A. 1979. Aggiunta di latte di vaca a latte di bufala. I. Analisi mediante elettroforesi delle proteine del siero del latte. Annali della Facolta di Scienze Agrarie della Universita degli Studi di Napoli Portici **13**, 124-132.
- ADDEO, F., TRIEU-CUOT, P., CHIANESE, L. y AMENO, M. 1981. Aggiunta del latte di vaca al latte di bufala. III. Analisis elettroforetica delle caseine. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia **32**, 95-108.
- ADDEO, F., ANELLI, G., STINGO, C., CHIANESE, L., PETRILLI, P. y SCUDIERO, A. 1984. Riconoscimento e dosaggio del latte bovino nel formaggio "pecorino". Il Latte **9**, 37-44.
- ADDEO, F. y MAURIELLO, R. 1988. A gel electrophoretic study of caprine casein. Journal of Dairy Research **55**, 413-421.
- ADDEO, F., MOIO, L., CHIANESE, L. y NOTA, G. 1989. Evaluation of bovine and water buffalo milk in mixtures of liquid milk and Mozzarella cheese by gel isoelectric focusing. Italian Journal of Food Science **3**, 71-80.
- ADDEO, F., MOIO, L., CHIANESE, L. y STINGO, C. 1990. Improved procedure for detecting bovine and ovine milk mixtures in cheese by isoelectric focusing of para- $\kappa$ -casein. Milchwissenschaft **45**, 221-223.
- ADDEO, F., MOIO, L., CHIANESE, L., STINGO, C., RESMINI, P., BERNER, I., KRAUSE, I., DI LUCCIA, A. y BOCCA, A. 1990. Use of plasmin to increase the sensitivity of the detection of bovine milk in ovine cheese by gel isoelectric focusing of

$\gamma_2$ -caseins. Milchwissenschaft **45**, 708-710.

AFFINITY CHROMATOGRAPHY - PRINCIPLES & METHODS -. 1983. Pharmacia Fine Chemicals. Uppsala. Sweden.

ALONSO, L., JUAREZ, M. y RAMOS, M. 1989. Contribución al estudio de quesos industriales de pasta azul. Revista de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos **29**, 77-84.

AMIGO, L., SANTA-MARIA, G., GONZALEZ DEL LLANO, D. y RAMOS, M. 1980. Polyacrylamide gel electrophoresis of whey proteins in cheeses made from milk of different species. XXII International Dairy Congress. La Haya, p. 28.

AMIGO, L., CALVO, M. M. y RAMOS, M. 1987. Quantitative determination of cow's milk in goat's and ewe's milks by PAGE using an internal standard. Proceedings of the II World Congress of Food Technology. Barcelona, p. 29.

AMIGO, L. 1989. Proteínas de leche de vaca, oveja y cabra. Estudio comparativo. Alimentación, Equipos y Tecnología **8**, 211-221.

AMIGO, L., IBAÑEZ, I., FERNANDEZ, C. SANTA-MARIA, G. y RAMOS, M. 1989. Comparison of an electrophoretic and an immunological method for the determination of goat and cow milk in cheese. Milchwissenschaft **44**, 215-218.

AMIGO, L., RAMOS, M. y MARTIN-ALVAREZ, P. J. 1991. Effect of technological parameters on electrophoretic detection of cow's milk in ewe's milk

cheeses. Journal of Dairy Science **74**, 1482-1490.

ANDREWS, A. T., TAYLOR, M. D. y OWEN, A. J. 1985. Rapid analysis of bovine milk proteins by fast protein liquid chromatography. Journal of Chromatography, **348**, 177-185.

ARANDA, P., ORIA, R. y CALVO, M. 1988. Detection of cows' milk in ewes' milk and cheese by an immunodotting method. Journal of Dairy Research **55**, 121-124.

ASCHAFFENBURG, R. y DANCE, J. E. 1968. Detection of cow's milk in goat's milk by gel electrophoresis. Journal of Dairy Research **35**, 383-384.

ASSENAT, L. 1967. Contribution a l'étude d'une méthode d'identification des laits et fromages au moyen de l'électrophorese sur gel de polyacrylamide. Le Lait **47**, 393-414 y 495-502.

ASSENAT, L. 1985. Le lait de brebis. Composition et propriétés. En: Laits et Produits Laitiers. I. Les Laits, pp. 281-346. Ed. Luquet. Technique et Documentation. Lavoisier. París.

AXEN, R. , PORATH, J. y ERNBACK, S. 1967. Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. Nature **214**, 1302-1304.

BARBOSA, M. y GONÇALVES, I. 1985. Seminario Internacional sobre "Producción y Utilización de Leches de Oveja y Cabra" , Atenas, Sesión V.

- BARRON, L., HIERRO, M. T. y SANTA-MARIA, G. 1990. HPLC and GLC analysis of the triglyceride composition of bovine, ovine and caprine milk fat. Journal of Dairy Research **57**, 517-526.
- BAYER, E. A., SKUTELSKY, E., WYNNE, D. y WILCHEK, M. 1976. Preparation of ferritin-avidin conjugates by reductive alkylation for use in electron microscopic cytochemistry. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry **24**, 933-939.
- BERNHAEUER, H., BAUDNER, S. y GUNTHER, H. O. 1983. Immunological detection of proteins of cow milk in sheep or goat milk and cheese with a specific immunoglobulin. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung **177**, 8-10.
- BICAN, P. 1983. High performance liquid chromatography of casein peptides. Journal of Dairy Science **66**, 2195-2197.
- BONNARD, C., PAPERMASTER, D. S. y KRAEHEBOHL, J. P. 1984. The streptavidin-biotin bridge technique: Application in light and electron microscope immunocytochemistry. En: Immunolabelling for Electron Microscopy. J. M. Polak e I. M. Varndell, Eds. pp. 95-109. Elsevier Science Publishers. Londres.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry **72**, 248-254.
- BRULE, G. y LENOIR, J. 1990. La coagulación de la leche. En: El Queso. Eck, A., ed.

pp. 3-20. Ediciones Omega. Barcelona.

Catálogo de Quesos de España. 1990. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.

CHIANESE, L., LAZZA, P., SMALDONE, L. A., STINGO, C., DEL GIOVINE, L. y ADDEO, F. 1990. Evaluation of bovine milk in the buffalo Mozzarella cheese by two-dimensional electrophoresis. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia **41**, 315-326.

CHOISY, C., DESMAZEAUD, M., GRIPON, J. C., LAMBERET, G., LENOIR, J. y TOURNEUR, C. 1990. Los fenómenos microbiológicos y enzimáticos y la bioquímica del afinado. En: El Queso. Eck, A., ed. pp. 57-91. Ediciones Omega. Barcelona.

CHRISTENSEN, T. M. I. E., KRISTIANSEN, K. R. y MADSEN, J. S. 1989. Proteolysis in cheese investigated by high performance liquid chromatography. Journal of Dairy Research **56**, 823-828.

DAVIES, D. T. y LAW, A. J. R. 1977. The composition of whole casein from the milk of Ayrshire cows. Journal of Dairy Research **44**, 447-454.

DAVIES, D. T. y LAW, A. J. R. 1987. Quantitative fractionation of casein mixtures by fast protein liquid chromatography. Journal of Dairy Research, **54**, 369-376.

Decreto 2478/1966 de 6 de Octubre, por el que se aprueba el "Reglamento de Centrales Lecheras y otras Industrias Lácteas". Boletín Oficial del Estado, número 240 de 7 de Octubre.

- DINCER, B., SPEAROW, J. L., CASSENS, R. G. y GREASER, M. L. 1987. The effects of curing and cooking on the detection of species origin of meat products by competitive and indirect ELISA techniques. Meat Science **20**, 253-265.
- DURAND, M. M., MEUSNIER, M., DELAHAYE, J. y PRUNET, P. 1974. Détection de l'addition frauduleuse de lait de vache dans les laits de chèvre et de brebis par la méthode de l'immunodiffusion en gelose. Bulletin de L'Académie Veterinaire **47**, 247-258.
- ELBERTZHAGEN, H. y WENZEL, E. 1982. Detection of bovine milk in sheeps milk cheese by means of immunoelectrophoresis. Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung **175**, 15-16.
- ELBERTZHAGEN, H. 1987. Detection of bovine casein in sheep and goat milk cheese by means of immunoelectrophoresis. Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung **185**, 357-361.
- FERNANDEZ DEL POZO, B. GAYA, P., MEDINA, M., RODRIGUEZ-MARIN, M. A. y NUÑEZ, M. 1988. Changes in chemical and rheological characteristics of La Serena ewes' milk cheese during ripening. Journal of Dairy Research **55**, 457-464.
- GARCIA, T., MARTIN, R., RODRIGUEZ, E., HERNANDEZ, P. E. y SANZ, B. 1989. Development of a cows' milk identification test (COMIT) for field use. Journal of Dairy Research **56**, 691-698.
- GARCIA, T. 1990. Identificación de mezclas de leche de vaca, oveja y cabra mediante técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) utilizando anticuerpos policlonales frente a proteínas del suero de leche. Tesis Doctoral.

Universidad Complutense de Madrid.

GARCIA, T., MARTIN, R., RODRIGUEZ, E., MORALES, P., HERNANDEZ, P. E. y SANZ, B. 1990. Detection of bovine milk in ovine milk by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. Journal of Dairy Science **73**, 1489-1493.

GARCIA, T., MARTIN, R., RODRIGUEZ, E., AZCONA, J. I., SANZ, B. y HERNANDEZ, P. E. 1991. Detection of bovine milk in ovine milk by a sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Journal of Food Protection **54**, 366-369.

GARVEY, J. S., CREMER, N. E. y SUSSDORF, D. H. 1977. Methods in Immunology, W. A. Benjamin, Inc. Publishers, Massachusetts.

GOMBOCZ, E., HELLWIG, E. y PETUELY, F. 1981a. Immunological estimation of bovine casein in sheep cheese products. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung **172**, 178-181.

GOMBOCZ, E., HELLWIG, E. y PETUELY, F. 1981b. Quantitative determination of proteins in food by immunoturbidimetry. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung **175**, 15-16.

GREEN, N. M. 1975. Avidin. En: Advances in Protein Chemistry. Anson, M. L. y Edsell, J. T., Eds. Vol. **29**, pp. 85-113. Academic Press. Nueva York.

HAASNOT, W., VENEMA, D. P. y ELENBAAS, H. L. 1986. Determination of cow milk in the milk and cheese of ewes and goats by fast protein liquid chromatography. Milchwissenschaft **41**, 642-645.

- HARDY, J. 1990. La actividad de agua y el salado de los quesos. En: El Queso. Eck, A., ed. pp. 35-55. Ediciones Omega. Barcelona.
- HARLOW, E. y LANE, D. 1988. Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Nueva York.
- HASSAN, H. N. y EL-DEEB, S. A. 1988. Electrophoretic patterns and thin-layer chromatography of common cheeses in Egypt: comparison and quantification Food Chemistry **30**, 245-255.
- HICKS, K. B., SONDEY, S. M., LIM, P. C., FOGLIA, T. A., RAUPP, D. L. y HOLSINGER, V. H. 1985. Analysis of uridine and uracil in caprine milk by High Performance Liquid Chromatography. Journal of Dairy Science **68**, 300-306.
- HUSE, W. D., SASTRY, L., IVERSON, S. A., KANG, A. S., ALTING-MEES, M., BURTON, D. R., BENKOVIC, S. J. y LERNER, R. A. 1989. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in a phage lambda. Science **246**, 1275-1281.
- IRLAM, J. C., HOLT, C., HASNAIN, S. S. y HUKINS, D. W. L. 1985. Comparison of the structure of micellar calcium phosphate in milk from six species by extended X-ray absorption fine structure spectroscopy. Journal of Dairy Research **52**, 267-273.
- IVERSON, J. L. y SHEPPARD, A. J. 1985. Utilization of capric and lauric acid ratios to detect substitution of cow's milk in imported sheep and goat cheeses. Journal of Dairy Science **68**, Supp 1, 95.

- IVERSON, J. L. y SHEPPARD, A. J. 1989. Detection of adulteration in cow, goat and sheep cheeses utilizing gas-liquid chromatographic fatty acid data. Journal of Dairy Science **72**, 1707-1712.
- JENNES, R. 1982. Inter-species comparison of milk proteins. En: Developments in Dairy Chemistry - I. Proteins. Fox, P. F., ed. pp. 87-114. Applied Science Publishers, Londres.
- JONES, S. J. y PATTERSON, R. L. S. 1986. A modified indirect ELISA procedure for raw meat speciation using crude anti-species antisera and stabilised immunoreagents. Journal of the Science of Food and Agriculture **37**, 767-774.
- KAISER, K. P. y KRAUSE, I. 1985. Analysis of proteins in foods by means of electrophoretic and chromatographic methods. Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung **180**, 181-201.
- KOHLER, G. y MILSTEIN, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature **256**, 495-497.
- KOSIKOWSKI, F. V. 1985. El queso. Investigación y Ciencia **106**, 40-48.
- KRAUSE, I., BELITZ, H. D. y KAISER, K. P. 1982. Detection of cow's milk in sheep's and goat's milk and cheese by isoelectric focusing of thin layers of polyacrylamide gels containing urea. Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung **174**, 195-199.
- KRAUSE, I., ELBERTZHAGEN, H., BERNER, I. y KLOSTERMEYER, H. 1988. Isoelectric

- focusing and crossed-immuno-electrophoresis: two supplementary methods for fast and reliable detection of cow's milk present in ewe's or goat's milk and cheese. Fresenius Zeitschrift fuer Analytische Chemie **330**, 466-467.
- KUZDZAL-SAVOIE, S. y KUZDZAL, W. 1959. La recherche du lait de vache ajouté au lait de chèvre. Application au cas du fromages. Annales de Technologie Agricole **8**, 131-144.
- LE MENS, P. 1985. Le lait de chèvre. Propriétés physico-chimiques, nutritionnelles et chimiques. En: Laits et Produits Laitiers. I. Les Laits, pp. 349-367. Ed. Luquet. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris.
- LEVIEUX, D. 1977. New technique for detecting adulteration of goat's milk and ewe's milk. Dossiers de L'Elevage **2**, 37-46.
- LEVIEUX, D. 1980. The development of a rapid and sensitive method, based on hemagglutination inhibition, for the measurement of cow milk in goat milk. Annales de la Recherche Veterinaire **11**, 151-156.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the Pholin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry **193**, 265-275.
- MAGEAU, R. P., CUTRUFELLI, M. E., SCHWAB, B. y JOHNSTON, R. W. 1984. Development of an overnight rapid bovine identification test (ORBIT) for field use. Journal of the Association of Official Analytical Chemists **67**, 949-954.

- MARTIN, R., AZCONA, J. I., TORMO, J., HERNANDEZ, P. E. y SANZ, B. 1986. Detection of chicken meat in unheated meat mixtures by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. Proceedings of the 32nd European Meeting of Meat Research Workers, Ghent, Belgium, pp. 429-432.
- MARTIN, R., AZCONA, J. I., CASAS, C., HERNANDEZ, P. E. y SANZ, B. 1988a. Sandwich ELISA for detection of pig meat in raw beef using antisera to muscle soluble proteins. Journal of Food Protection **51**, 790-794.
- MARTIN, R., AZCONA, J. I., GARCIA, T., HERNANDEZ, P. E. y SANZ, B. 1988b. Sandwich ELISA for detection of horse meat in raw meat mixtures, using antisera to muscle soluble proteins. Meat Science **22**, 143-153.
- MARTIN, R., AZCONA, J. I., TORMO, J., HERNANDEZ, P. E. y SANZ, B. 1988c. Detection of chicken meat in raw meat mixtures by a sandwich enzyme immunoassay. International Journal of Food Science and Technology **23**, 303-310.
- MARTIN, R., AZCONA, J. I., HERNANDEZ, P. E. y SANZ, B. 1989a. Partial purification of chicken specific muscle soluble proteins by immunoadsorption chromatography. Proceedings of the 35th International Congress of Meat Science and Technology. Copenhagen, Denmark, pp. 539-541.
- MARTIN, R., WARDALE, R. J., JONES, S. J., HERNANDEZ, P. E. y PATTERSON, R. L. S. 1989b. Production and characterization of monoclonal antibodies specific to chicken muscle soluble proteins. Meat Science **25**, 199-207.
- MARTIN-HERNANDEZ, H. C., JUAREZ, M. y ALONSO, L. 1988. Contribución al estudio

de quesos elaborados con mezclas de leche de vaca, oveja y cabra. Revista Española de Lechería **1**, 35-38.

MAURIELLO, R., CHIANESE, L., D'ACIERNO, C., KALATZOPOULOS, G. y ADDEO, F. 1989. Riconoscimento e dosaggio del latte bovino nel formaggio Roquefort. Il Latte **14**, 1071-1076.

MONGET, D., GELIN, M. y LAVIOLETTE, P. 1979. Recherche de la xantine oxydase appliquée a la mise en évidence du lait de vache ajouté au lait de chèvre. Le Lait **59**, 117-124.

ONO, T., KOHNO, H., ODAGIRI, S. y TAKAGI, T. 1989. Subunit components of casein micelles from bovine, ovine, caprine and equine milks. Journal of Dairy Research **56**, 61-68.

Orden de Presidencia del Gobierno de 29 de Noviembre de 1985 por la que se aprueban las "Normas de Calidad para Quesos y Quesos Fundidos". Boletín Oficial del Estado, número 292 de 6 de diciembre.

OUCHTERLONY, O. 1948. *In vitro* method for testing the toxin producing capacity of diphtheria bacteria. Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica **25**, 186-191.

PIERRE, A. y PORTMANN, A. 1970. Emploi de l'électrophorese en gel de polyacrylamide pour mettre en évidence et doser le lait de vache ajouté au lait de chèvre. Application au cas des fromages. Annales de Technologie Agricole **19**, 107-130.

- PIERRE, A. 1977. Etude des facteurs influençant la précision de la méthode électrophorétique du dosage du lait de vache dans le lait et le fromage de chèvre. Annales des Falsifications et de L'Expertise Chimique **70**, 213-222.
- PINTO, F. C. 1966. Serological differentiation of cow's, buffalo's, goat's and sheep's milks. Journal of Dairy Research **33**, 129-137.
- POLLMAN, R. M. 1984. Detection of adulteration in grated cheese by using calcium, phosphorus, magnesium and lactose indices. Journal of the Association of Official Analytical Chemists **67**, 1062-1066.
- PRAGER, M. J. 1989. Differential characteristics of fatty acids in cheese from milk of various animal species by capillary gas chromatography. Journal of the Association of Official Analytical Chemists **72**, 418-421.
- RADFORD, D. V., TCHAN, Y. T. y Mc PHILLIPS, J. 1981. Detection of cow's milk in goat's milk by immunoelectrophoresis. The Australian Journal of Dairy Technology **36**, 144-146.
- RAMOS, M., MARTINEZ-CASTRO, I. y JUAREZ, M. 1977. Detection of cow's milk in Manchego cheese. Journal of Dairy Science **60**, 870-877.
- RAMOS, M., MARTINEZ-CASTRO, I. y JUAREZ, M. 1980. Detección de leche de vaca en leche de cabra. Aplicación a quesos frescos. Resúmenes del III Congreso Nacional de Química. Química Agrícola Alimentaria. Sevilla. 121-127.
- RAMOS, M. y JUAREZ, M. 1984. Update on existing analytical methods for detecting mixtures of cow's, ewe's and goat's milk. International Dairy

Federation. Doc. **181**.

RAMOS, M. 1989. Detección de mezclas de leches de distintas especies en la fabricación de quesos. Últimas tendencias. Revista Española de Lechería **7**, 56-63.

Recopilación Legislativa Alimentaria. 1982. Capítulo 15. Leches y derivados. Tomo VIII. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

RICHARDSON, B. C., CREAMER, L. K. y PEARCE, K. N. 1974. Comparative micelle structure. II. Structure and composition of casein micelles in ovine and caprine milk as compared with those in bovine milk. Journal of Dairy Research **41**, 239-247.

RISPOLI, S. y SAUGUES, R. 1989. Isoélectrofocalisation des lactosérums de fromages de mélange brebis-vache sur gel de polyacrylamide. Application a la recherche et au dosage du lait de vache dans les fromages de brebis. Le Lait **69**, 211-222.

RUIZ, E. y SANTILLANA, I. 1986. Determinación de mezclas de leche de vaca, cabra y oveja, por isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida. Alimentaria **171**, 55-64.

SAWAYA, W. N., SAFI, W. J., AL-SHALHAT, A. F. y AL-MOHAMMAD, H. M. 1984. Studies on the chemical composition and nutritive value of shhep milk. Milchwissenschaft **39**, 90-93.

SCHMIDT, D. G. 1982. Association of caseins and casein micelle structure. En:

- Developments in Dairy Chemistry - I. Proteins. Fox, P. F., ed. pp. 61-86. Applied Science Publishers. Londres.
- SMEYERS-VERBEKE, J., MASSART, D. L. y COOMANS, D. 1977. Application of linear discriminant analysis to the differentiation of pure milk from different species and mixtures. Journal of the Association of Official Analytical Chemists **60**, 1382-1385.
- ST-MARTIN, M. y PAQUIN, P. 1990. Ion-exchange fast protein liquid chromatography: optimization of the purification of caseins using a non-denaturing detergent. Journal of Dairy Research **57**, 63-68.
- SWAISGOOD, H. E. 1982. Chemistry of milk protein. En: Developments in Dairy Chemistry - I. Proteins. Fox, P. F., ed. pp. 87-114. Applied Science Publishers. Londres.
- VOLLER, A., BIDWELL, D. y BARTLETT, A. 1980. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. En: Manual of Clinical Immunology. N. R. Rose y H. Friedman, Eds. American Society for Microbiology. Washington, D. C.
- WALSTRA, P. y JENNES, R. 1987. Química y Física Lactológica. Ed. Acribia. Zaragoza.
- WARD, E. S., GUSSOW, D., GRIFFITHS, A. D., JONES, P. T. y WINTER, G. 1989. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. Nature **341**, 544-546.
- WEBER, F. 1990. El desuerado del coágulo. En: El Queso. Eck, A., ed. pp. 21-33.

Ediciones Omega. Barcelona.

WILCHEK, H. y BAYER, E. A. 1988. The avidin-biotin complex in bioanalytical applications. Analytical Biochemistry **171**, 1-32.

YOLKEN, R. H., LEISTER, F. J., WHITCOMB, L. S. y SANTOSHAM, M. 1983. Enzyme Immunoassays for the detection of bacterial antigens utilizing biotin-labeled antibody and peroxidase biotin-avidin complex. Journal of Immunological Methods **56**, 319-327.