ITEA (2003), Vol. **Extra N.º 24.** Tomo II, 546-548

OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LAS CASEÍNAS α_{s1} Y α_{s2} MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR

José A. Gómez[1], Pastora Agüera[2], Lourdes Amigo[1], y Juan M. Serradilla[2]
[1] Instituto de Fermentaciones Industriales. C.S.I.C.
[2] Departamento de Producción Animal. Universidad de Córdoba

INTRODUCCIÓN

El contenido de caseínas determina en gran medida las propiedades tecnológicas y el rendimiento quesero de la leche de cabra (Addeo y col., 1987). La mayor o menor proporción de cada una de las fracciones caseínicas de (α_{s1} α_{s2}, β y κ) influye también en las propiedades reológicas de la leche. Las frecuencias génicas y los efectos del polimorfismo de la CSN1S1 han sido ampliamente estudiados, sobre todo en las razas francesas (Remeuf, 1993; Ricordeau y col. 2000) y en algunas españolas (Jordana y cols.1996, Sánchez y cols.1998). En trabajos anteriores en el Departamento de Producción Animal de la UCO se trataron de cuantificar las diferentes fracciones caseínicas siendo imposible separar las fracciones de α_{s1}-y α_{s2}-CN utilizando técnicas electroforéticas en geles de almidón PAGE-SDS (Díaz, 1993). Por otra parte, el grupo del Instituto de Fermentaciones Industriales del C.S.I.C. ha trabajado en el aislamiento por cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) de distintas fracciones caseínicas de leche de oveja (Recio y col., 1997*a*) y cabra (Recio y col., 1997*b*) así como en el análisis por electroforesis capilar (CE) de leche y fracciones caseínicas con distintos fines, entre ellos la identificación del polimorfismo genético de las proteínas lácteas (Recio y col. , 1997*c* y 1997*d*; Molina y col. , 2000; Miralles y col. , 2000), pero sin llegar a realizar análisis cuantitativos de las distintas fracciones caseínicas

El objetivo planteado en este trabajo es la optimización de un método de EC rápido y fiable, para la determinación cuantitativa de α_{s1} y α_{s2}-CN en muestras individuales de leche de cabra.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las caseínas se prepararon a partir de leche de cabras pertenecientes a distintas ganaderías de la Asociación Española de Criadores de la Cabra Malagueña, cuyos genotipos para la α_{s1}-CN eran BB, BF, EE o FF.

Se desnató y ajustó el pH a 4.1 con HCl 2M. Se dejaron las muestras en reposo 2 horas y, a continuación, se centrifugaron a 4000 g durante 20 min. a 5° C. El sobrenadante conteniendo las proteínas de suero se filtró utilizando papel Whatman N° 40. El precipitado de caseínas se lavó 3 veces con agua acidulada a pH 4.1, se congeló y se liofilizó. En la leche entera y en el sobrenadante conteniendo las proteínas de suero se determinó el contenido en proteínas mediante el método Kjeldahl

La obtención de α_{s1}- y α_{s2}-CN caprina se llevó a cabo a partir de la caseína de la leche de cabras con genotipo α_{s1}-CN BB, utilizando un equipo de FPLC (Pharmacia LKB Biotechnology S-75182, Uppsala, Sweden) con una columna preparativa SP-Sepharose Fast Flow (Pharmacia 26/10) siguiendo el método de Law y Tziboula (1992) con ciertas modificaciones para mejorar la separación de las α_{s1}- y α_{s2}-CN caprinas. Para preparar la muestra se disolvieron 3 g de caseína en 100 mL de fase A para obtener una concentración final de 30 mg/mL y una vez ajustado el pH a 7 se añadieron 2 mL de mercaptoetanol y se dejó agitando durante 1 hora. Posteriormente

se ajustó el pH de la muestra a 4 con ácido fórmico y se procedió a su inyección en un volumen comprendido entre 5 y 15 mL. Tanto las fases de eluyente como las muestras se filtraron a través de una membrana de 0.45 micras.

Las fracciones correspondientes a la α_{s1}-CN y α_{s2}-CN de leche de cabra recogidas varias veces se dializaron (membrana de 6000-8000 Da) en cámara fría y con agitación constante durante 48 horas, cambiando el agua aproximadamente cada 6 horas. Las fracciones dializadas se congelaron y liofilizaron.

El procedimiento empleado para análisis de la α_{s1}- y α_{s2}-CN de leche de cabra por electroforesis capilar (CE) se basó en el método descrito por de Jong y col., (1993) y posteriormente optimizado por Recio y Olieman (1996) para la separación de las proteínas lácteas. El análisis fue realizado en un equipo Beckman P/ACE MDQ controlado por un software propio (Beckman Instruments Inc., Fullerton, USA). Se utilizó un capilar de sílice con un recubrimiento hidrofílico neutro CElect P1 (Supelco, Bellefonte, USA) de dimensiones 60 cm $\times$ 50 μm de d.i.

Las separaciones se llevaron a cabo a 45 °C con un gradiente lineal de voltaje de 0 a 25 kV en 3 min, seguido de voltaje constante a 25 kV. El tampón de separación, pH 3, estaba formado por citrato trisódico dihidratado (Sigma) 20 mM y ácido cítrico (Sigma) 0.32 M disueltos en urea 6 M y el tampón de la muestra era una disolución 167 mM de Tris (hidroximetil) aminometano (Merck), 67 mM de etilendiaminotetraacetato disódico dihidratado (EDTA) (Merck), 42 mM de ácido 3-morfolinopropanosulfónico (MOPS) (Fluka, Buchs, Alemania) y 17 mM de DTT (Sigma) en urea 6 M, de pH 8.6.

Para preparar la muestra antes de su inyección se disolvieron 18 mg de caseína de leche de cabra ó de α_{s1}-CN ó α_{s2}-CN caprinas en una mezcla de 720 μl de tampón de la muestra y 280 μL de agua. Las inyecciones se realizaron en el extremo anódico por inyección hidrodinámica durante 18 seg a una presión de 3.4 kPa. La detección se realizó en el extremo catódico a 214 nm. Antes de cada separación, el capilar se lavó con tampón de separación en sentido inverso (del cátodo al ánodo) durante 6 min.

Para establecer las curvas de calibrado se prepararon disoluciones de α_{s1}- y α_{s2}-CN caprina liofilizadas en tampón de la muestra (10 mg/ml) en seis proporciones diferentes (concentración final de α_{s1}-CN de 0.25 a 15.89 mg/ml y de α_{s2}-CN de 0.21 a 13.73 mg/ml) teniendo en cuenta el contenido de proteína calculado. Las regresiones lineales entre las áreas corregidas (A_c) y las concentraciones se establecieron utilizando el programa Microsoft Excel 7.0. La determinación del límite de detección y la señal de detección del método se realizó mediante el programa Detarchi (Ortiz y Sarabia, 1994).

Se calcularon la exactitud media del método, la repetibilidad y la reproducibilidad, así como la recuperación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de regresión correspondiente a las calibraciones para la α_{s1}-CN y α_{s2}-CN caprinas dio lugar respectivamente a las rectas:

A_c de α_{s1}-CN = - 0.95 + 18.06 x concentración α_{s1}-CN (R^2 = 0.994)

A_c de α_{s2}-CN = 4.23 + 22.19 x concentración α_{s2}-CN (R^2 = 0.996)

Los parámetros analíticos de la determinación cuantitativa de ambas fracciones se indican en la tabla 1.

Para evaluar el método de CE optimizado se procedió al análisis de 18 muestras de individuales de leche de cabra procedentes de varias ganaderías Malagueñas correspondientes a distintos genotipos para la α_{s1}-CN, cinco muestras α_{s1}-CN BB, cinco EE, seis BF y dos FF. Los valores se recogen en la tabla 2.

Tabla 1. Parámetros analíticos de las calibraciones

Parámetro	Determinación	α_{s1}-CN caprina	α_{s2}- CN caprina
Linealidad	Recta de calibrado	$R^2 = 0.994$	$R^2 = 0.996$
Sensibilidad	Límite de detección	1.23 mg/ml	0.98 mg/ml
	Señal de detección	10.6 u.a.	15.4 u.a.
Exactitud	V. encontrado/ V. real	105.6 %	90.02%
Precisión	Repetibilidad	$T_m = 0.35$ $A_c = 1.77$	$T_m = 0.46$ $A_c = 3.86$
	Reproducibilidad	$T_m = 0.41$ $A_c = 2.28$	$T_m = 0.38$ $A_c = 6.42$
	Recuperación		
	0.5 mg/ml	94%	88%
	1.0 mg/ml	102%	86%

Tabla 2. Valores medios de α_{s1}-CN y α_{s2}-CN de muestras para evaluación del método.

Genotipos para α_{s1}-CN.	Valor medio α_{s1}-CN.	Valor medio α_{s2}-CN
BB	9.42 g/Kg,	2.64 g/Kg,
BF	6.11 g/Kg,	2.81 g/Kg,
EE	3.35 g/Kg,	2.51 g/Kg,
FF	1.45 g/Kg,	1.25 g/Kg,

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Addeo, F, Masi, P, Rubino, R. 1987. En Symp. Philostios. Agrimes. pp.291-311.

Díaz Carrillo, E. Tesis Doctoral. 1993

de Jong, N., Visser, S., Olieman, C. (1993). *J. Chromatogr. A*,. 652, 207-213.

Jordana J., Amills M., Diaz E., Angulo C., Serradilla J.M., Sánchez A. (1996). Small Ruminant Research, 20, 215-221.

Law, A.J.R., Tziboula, A. (1992). *Milchwissenschaft*, 47, 558-652.

Miralles, B., Ramos, M., Amigo, L. (2000). *J. Dairy Res.*, 67, 91-100.

Molina, E., De Frutos, M., Ramos, M. (2000 *J. Dairy. Res.* 67, 209-216.

Ortiz, M.C., Sarabia, L.A. (1994). En *Avances en Quimiometría Práctica*, (Ed. R. Cela), pp. 189-209.

Pharmacia (1986). *PhastSystem Development Technique File nº 111.*

Recio, I., Olieman, C. (1996). *Electrophoresis* 17, 1228-1233.

Recio, I., Amigo, L., Ramos, M., López-Fandiño, R. (1997*a*). *J. Dairy Res.*, 64, 221-230.

Recio, I., Pérez-Rodríguez, M.L., Amigo, L., Ramos, M. (1997*b*). *J. Dairy Res.*, 64, 515-523.

Recio, I., Pérez-Rodríguez, M.L., Ramos, M., Amigo, L. (1997*c*). *J. Chromatogr. A*, 768, 47-56.

Recio, I., Ramos, M., Amigo, L. (1997*d*) *J. Dairy Res.*, 64, 525-534.

Remeuf, F. Lait, 73, 499-51

Ricordeau, G, Manfredi, E, Amigues Y. (2000). Proceedings 7th Inter. Conference on goats. Tours, France, pp. 249-251.

Sánchez A., Angulo C., Amills M., Ares J.L., Serradilla J.M. (1998). Proc 6th WCGALP 24: 242-245.