



# Métodos para Separação das Proteínas do Leite

## *Methods for Separation of Milk Proteins*

Soraya Stefani Butarelo

Mestre em Ciência de Alimentos - UEL e professora na FAI

Larissa Pernomian

Farmacêutica

### Resumo

As autoras estudaram e discorreram sobre os principais métodos de separação das proteínas do leite (cromatografia, eletroforese e ensaios imunológicos), técnicas analíticas que desempenham um papel de extrema importância no controle de qualidade de produtos lácteos. Para tanto, uma revisão de diversas pesquisas referentes ao assunto é apresentada como embasamento teórico do trabalho. No contexto da dissertação, busca-se uma posição conclusiva acerca dos métodos de maior resolução e viabilidade para tal análise.

### Palavras-chave

proteínas do leite – cromatografia – eletroforese – ensaios imunológicos

### Abstract

The authors studied and they talked about the main methods for separation of milk proteins (chromatography, electrophoresis and immune essays), analytical techniques that take on a role of extremely importance in the quality's control of milky products. To do this, a review of many researches that refer to the subject is presented as a theoretical basis of the work. In the context of the dissertation, it seeks a conclusive position about the methods more feasible and with best resolution.

### Key-words

milk proteins – chromatography – electrophoresis

– immune essays

### Introdução

O leite consiste numa emulsão de gorduras em água, estabilizada por uma dispersão coloidal de proteínas em solução de sais minerais, vitaminas e peptídeos, com pH variando de 6,5 a 6,7. A grande diversidade das proteínas presentes no leite, assim como sua importância funcional e nutricional, explicam o elevado interesse no estudo da composição desta fração láctea.

A caseína, uma fosfoproteína obtida por acidificação do leite desnatado em pH equivalente a 4,6 a 20° C, é a principal proteína do leite e ocorre em quatro subtipos principais: a-caseína (50%), b-caseína (33%), d-caseína (5%) e a k-caseína (15%). As proteínas que permanecem em solução após precipitação e separação da caseína constituem o soro, sendo representadas por: a-lactoalbumina e b-lactoglobulina, que correspondem a 70-80% das proteínas do soro, e em menor proporção, soroalbumina, imunoglobulina, lactoferrina e transferrina.

O diferente comportamento das caseínas e das proteínas séricas, devido às suas diferenças estruturais, permite sua separação, identificação e posterior quantificação. Os métodos analíticos mais utilizados nestes processos são os cromatográficos, os eletroforéticos e os imunológicos.

Os métodos de separação, identificação e quantificação das proteínas do leite voltam-se à



análise de polimorfismos, à avaliação da extensão dos tratamentos térmicos aplicados aos laticínios, à determinação de adulterações em leites e derivados, e à detecção de peptídeos derivados da proteólise que ocorre nestes produtos. Esta revisão dá ênfase à descrição dos principais métodos de separação das proteínas do leite.

## Métodos de Separação das Proteínas do Leite

### 1- Métodos Cromatográficos

A cromatografia é uma técnica físico-química de separação dos componentes químicos de uma amostra (solutos), baseada na migração diferencial destes solutos ao longo de duas fases que integram o sistema cromatográfico: a fase móvel e a fase estacionária. Durante a eluição dos solutos, estabelecem-se interações químicas entre estes e a fase estacionária (eletrostática e imóvel), o que permite ou não a retenção dos solutos nesta fase. Dentre os métodos cromatográficos mais utilizados para separação e identificação das proteínas do leite inclui-se a cromatografia líquida de alta pressão por permuta iônica, a cromatografia líquida de alta pressão em fase reversa, e a cromatografia líquida por exclusão molecular.

#### 1.1 - Cromatografia líquida de alta pressão por permuta iônica

Este método cromatográfico, o mais utilizado na separação de proteínas do leite, baseia-se no processo químico de troca de íons entre a fase estacionária e o meio eluente. Sua fase estacionária é formada por trocadores iônicos (moléculas que retém íons por afinidade química) ligados covalentemente à matriz da coluna cromatográfica. Estes trocadores trocam seus íons por outros íons presentes no meio formado pela fase móvel (que define o caráter elétrico dos solutos da amostra) e pela amostra (com solutos de carga elétrica compatível ao trocador da fase estacionária). Os trocadores iônicos classificam-se em: trocadores aniônicos (apresentam carga elétrica positiva, e, portanto, retém e trocam ânions); e trocadores catiônicos (apresentam

cargas elétricas negativas, e, portanto, retém e trocam cátions). A fase móvel eluente deste sistema cromatográfico deve conter íons de carga elétrica compatível aos trocadores da fase estacionária, porém de pouca afinidade a estes trocadores, que os adsorverão apenas durante a eluição inicial da fase móvel, em ausência da amostra. A amostra em análise deve ser preparada na fase móvel eluente para definição da carga elétrica de seus solutos, e então, ser eluída ao longo da coluna. À medida que ocorre a eluição da fase móvel com os solutos da amostra, os íons retidos aos trocadores, por apresentarem menor afinidade, vão sendo substituídos pelos solutos iônicos da amostra, que apresentam maior afinidade química ao trocador. Para isolar o soluto desejado na coluna, deve-se eluir a fase móvel contendo íons de maior afinidade ao trocador do que os íons que provavelmente se adsorveram ao trocador. Após a eluição destes íons, e, portanto, separação e isolamento do soluto desejado, que permanece retido na coluna, deve-se eluir a fase móvel contendo íons de maior afinidade ao trocador do que os solutos a ele adsorvidos, para que estes sejam recolhidos no eluato. Em seguida, a coluna deve ser regenerada com o eluente inicial. Na tabela abaixo, encontram-se os estudos da separação das proteínas do leite por cromatografia de permuta iônica.

**Tabela 1** – Cromatografia por permuta iônica aplicada à análise das proteínas do leite

Aplicação	Condições de Análise	Compostos Separados	Referência
Separação das proteínas do leite	Coluna de troca aniônica (Pharmacia Mono QHR5/5), gradiente de NaCl 0-0,35M em tampão Tris-HCl 20mM a pH 7 com ureia 4,5M e 2-mercaptoetanol 10mM	$\beta$ - $\kappa$ -caseína, $\alpha_1$ - $\mu$ -caseína	Andrews et al. (1985)
Separação das proteínas de soro de vacas e ícides	Coluna de troca aniônica Pharmacia Mono Q, gradiente de força iônica de água e acetato sódico 0,7M a pH 6,3	$\beta$ -lg A e B, $\alpha$ -lg e BSA	Manji et al. (1985)
Determinação de variantes genéticas da $\beta$ -caseína	Coluna de troca catiônica Pharmacia Mono S HR 5/5, gradiente não linear de NaCl em tampão ureia 6M acetato 0,05M a pH 5	$\beta$ -caseína A <sup>1</sup> , A <sup>2</sup> e B	Hofas et al. (1991)
Separação da caseína bovina, caprina e ovina	Coluna de permuta aniônica P.L. SAX	$\alpha_{1\beta}$ -caseína bovina, $\alpha_{1\beta}$ -caseína caprina, $\alpha_{1\beta}$ -caseína ovina	Kanmunde e Anfantakis (1993)
Inclusão do glicomacro-peptídeo do soro do queijo	Coluna de troca aniônica Pharmacia Mono Q HR 5/5, gradiente de NaCl 0-0,25M	Glicomacro-peptídeo	Outome et al. (1995)
Quantificação de leite bovino, caprino e ovino em queijos de misturas	Coluna Shodex IEC CM-825, gradiente de NaCl 0-0,5M em tampão de ácido malônico/ureia 10mM a pH 6	Para-caseína bovina, ovina e caprina	Mayer et al. (1997)



## 1.2 – Cromatografia Líquida de Alta Pressão em Fase Reversa

A cromatografia líquida de alta pressão baseia-se na eluição de uma fase móvel submetida a alta pressão, tornando a separação dos solutos muito mais rápida e eficiente. Na cromatografia líquida de alta pressão em fase reversa, a fase estacionária é apolar, sólida ou líquida, enquanto que a fase móvel é polar e líquida. A cromatografia em fase reversa permite separar as caseínas, as proteínas do soro e peptídeos derivados. Os solutos, portanto, vão sendo separados por ordem de polaridade: os mais polares (contendo maior número de cargas elétricas) são eluídos de modo mais rápido, enquanto que os menos polares vão sendo retidos na coluna. Os estudos de separação das proteínas do leite por cromatografia líquida de alta pressão por fase reversa encontram-se sucintamente descritos na tabela abaixo.

**Tabela 2** – Cromatografia líquida de alta pressão por fase reversa aplicada à análise das proteínas do leite.

Aplicação	Condições de Análise	Compostos Separados	Referência
Separação das caseínas em leite, leite em pó desnatado e caseínatos	Coluna HPLC de fase reversa $C_{18}$ , gradiente isocrático de ácido trifluoroacético em água 0,1% e ácido trifluoroacético em acetonitrilo 0,1%. Amostra preparada em uréia 4,5M e 0,1% de mercaptoetanol.	$\alpha_1$ , $\beta$ , $\alpha_2$ e $\kappa$ -caseínas, e fragmentos de $\gamma$ e de $\rho$ -caseínas.	Strange et al. (1991)
Identificação de nova variante genética da $\beta$ -caseína	Coluna HiPore RP-318 (Bio-Rad Labs) e pré coluna $C_{18}$ , gradiente de mistura de acetonitrilo, água e ácido trifluoroacético (100:900:1) acetonitrilo, água e ácido trifluoroacético (900:100:0,7).	$\beta$ -caseína e $A^1$ , $A^2$ e $A^3$	Visser et al. (1995)
Separação e quantificação das proteínas do leite	Coluna de fase reversa $C_{18}$ , gradiente de mistura de acetonitrilo, água e trifluoroacético nas proporções: 100:900:1 (solvente A) e 900:100:1 (solvente B).	$\kappa$ , $\alpha_2$ , $\alpha_1$ , $\beta$ -caseína, $\alpha$ -la e $\beta$ -lg	Bobbe et al. (1998)

## 1.3 - Cromatografia por Exclusão Molecular

Este método cromatográfico baseia-se no processo mecânico de exclusão molecular para separar os solutos da amostra. A coluna cromatográfica deste sistema é formada por partículas sólidas uniformes, contendo poros de diâmetros também uniformes. A fase móvel é líquida e elui por entre os poros da fase estacionária, arrastando consigo os solutos da amostra. Os solutos de pequeno diâmetro ficam retidos nos poros da fase estacionária enquanto que os de diâmetro maior são eliminados dos poros, saindo da coluna por exclusão. Uma das maiores dificuldades da cromatografia por exclusão molecular é a detecção

e avaliação do tamanho das micelas de caseína, em virtude da proximidade de seus pesos moleculares. Por outro lado, é utilizada com sucesso no isolamento de proteínas menores, presentes no soro do leite (STRANGE et al., 1992). Contudo, as semelhanças de peso molecular das proteínas do soro das várias espécies impedem a utilização desta técnica na identificação de vários tipos de leite.

## 2 – Métodos Eletroforéticos

A eletroforese consiste numa técnica físico-química empregada na separação de solutos e estruturas coloidais, baseada na migração de partículas eletricamente carregadas em solução, quando submetidas a um campo elétrico. Qualquer partícula ou molécula carregada pode se mover nessas condições, e conseqüentemente, podem ser separadas, desde que possuam diferentes cargas elétricas. A separação eletroforética das partículas pode ser realizada em meio líquido ou num suporte inerte, que não interfira na migração destas partículas. A diferença de potencial elétrico aplicada ao sistema eletroforético é produzida por dois eletrodos de cargas opostas, que são introduzidos na solução contendo as partículas carregadas. As partículas com carga elétrica positiva migram em direção ao eletrodo de carga negativa (cátodo), enquanto que as partículas com carga elétrica negativa migram em direção ao eletrodo de carga positiva (ânodo). A eletroforese desempenhou e continua a desempenhar um papel muito importante no estudo das proteínas do leite, tendo sido utilizada na investigação de suas variantes genéticas. A principal vantagem do método de eletroforese é a de permitir a separação, a quantificação e a identificação simultâneas das diferentes proteínas de uma mistura. Após a separação, as diferentes bandas resultantes podem ser identificadas com corantes, como azul de Coomassie ou nitrato de prata. Estes permitem, não só uma identificação qualitativa dos grupos de proteínas, mas também uma quantificação aproximada através de um densitômetro, ajustado ao comprimento de ondas correspondente à



absorção do corante.

## 2.1 - Eletroforese em Gel

Um dos métodos eletroforéticos utilizados na separação das proteínas é a eletroforese em gel de poliácridamida. O tamanho dos poros do gel de poliácridamida mais utilizado para macromoléculas permite separar proteínas de 15 000 a 250 000 Daltons. Este tipo de suporte separa tanto pelo tamanho do poro como por carga elétrica. Os trabalhos que usaram os métodos eletroforéticos em gel aplicados à análise das proteínas do leite, podem ser vistos na tabela abaixo.

**Tabela 3** - Métodos eletroforéticos em gel aplicados à análise das proteínas do leite.

Aplicação	Condições de Análise	Compostos Separados	Referência
Deteção de leite de vaca adicionado a queijos de leite de ovelha.	Gel de poliácridamida com tampão Tris-glicina a pH 8,3	Proteínas do Soro	Amigo et al., (1991)
Deteção de caseínas bovinas em leite e derivados.	Gel de poliácridamida com tampão superior de ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetano sulfônico (ACES) 40mM e pH 6,8 e um tampão inferior de piridina 200mM e pH 5,2.	$\beta$ -caseína	Mayer e Hörner (1992)
Determinação das proteínas do soro em leite de cabra e ovelha	Gel de poliácridamida com solução de fixação: metanol e ácido tricloroacético	Proteínas do Soro	Casper et al. (1998)

## 2.2 - Eletroforese Capilar

A eletroforese capilar é uma técnica analítica versátil e sensível que apareceu no final dos anos 80. Sua aplicação caracteriza-se por reduzidos tempos de análise, pequenas quantidades de amostra e baixos custos. A eletroforese capilar tem provado ser uma técnica eficiente na análise das proteínas do leite. Existem diversos trabalhos que descrevem sua utilização na análise de polimorfismos das proteínas do leite, na avaliação da extensão dos tratamentos térmicos dos laticínios, na detecção de adulterações e de peptídeos derivados das proteínas durante a proteólise no leite e em seus derivados. Na tabela abaixo, encontram-se resumidamente descritos os trabalhos que empre-

gam a eletroforese capilar na análise das proteínas do leite.

**Tabela 4** - Métodos de eletroforese capilar aplicada à análise das proteínas do leite

Aplicação	Condições de Análise	Compostos Separados	Referência
Separação das proteínas do leite de diferentes espécies e deteção de leite bovino em leite caprino e ovino	Coluna capilar de sílica fundida, solvente tampão citrato de sódio 20mM com metilhidropropilcelulose (MHPC) 0,1% e uréia 6M.	$\alpha$ e $\beta$ -caseínas e proteínas do soro	Cattaneo et al., (1996)
Identificação das proteínas séricas do leite bovino e caprino e determinação do leite bovino em leite e queijo caprino	Coluna capilar de metil-silanzada, solvente tampão borato 50mM, pH 9,27 ou tampão borato 120mM e pH 9,2.	$\alpha$ -la e $\beta$ -lg A e B	Cartoni et al. (1999)

## 3- Métodos Imunológicos

Os ensaios imunológicos são técnicas analíticas freqüentemente utilizadas na indústria alimentícia para separação, identificação e quantificação dos componentes alimentares e de agentes contaminantes presentes nos alimentos. Esses métodos foram aplicados inicialmente na identificação e quantificação de proteínas específicas em concentrações muito baixas. A aplicação destes métodos na separação das proteínas do leite deve-se a antigenicidade destes compostos, o que lhes permite a conjugação com anticorpos específicos. As proteínas do soro do leite são extremamente antigênicas, o que possibilita sua determinação por técnicas imunológicas usuais, como a imunodifusão, o método ELISA e os ensaios radioimunológicos. A determinação das caseínas, apesar de bastante viável, é mais difícil, já que estas proteínas são pouco antigênicas e encontram-se na forma de agregados (GRAPPIN e RIBADEAU-DUMAS, 1992). A principal finalidade da detecção das proteínas do leite por meio de ensaios imunológicos é verificar possíveis adulterações no leite e em seus derivados. Os primeiros ensaios imunológicos baseavam-se em ensaios radioimunológicos que utilizavam marcadores radioativos conjugados a anticorpos ou antígenos. Contudo, em virtude da elevada capacidade destrutiva dos marcadores radioativos no organismo humano, estes compostos foram substituí-



dos por enzimas, desencadeando o desenvolvimento dos ensaios imunoenzimáticos, que se tornaram mais aceitáveis em análises de alimentos. Os ensaios imunoenzimáticos são mais simples, baratos e mais sensíveis, devido à especificidade das reações antígeno – anticorpo. Dois tipos de anticorpos são utilizados nos ensaios imunológicos: anticorpos mono e policlonais. Os anticorpos policlonais correspondem a uma mistura de anticorpos, cada um produzido contra um epítipo diferente do antígeno. Cada um dos anticorpos presentes nesta mistura tem afinidade e especificidade pelo epítipo responsável por sua produção. Anticorpos policlonais são preparados através da imunização de animais com um antígeno, seguida pela retirada do sangue e purificação do soro para remoção dos anticorpos inespecíficos. Os anticorpos monoclonais são aqueles secretados por hibridomas (células híbridas resultantes da fusão de células tumorais com células secretoras de anticorpos). Para a sua obtenção efetua-se a imunização de um animal e posterior retirada do baço (órgão onde se concentram as células imunocompetentes, estimuladas durante a imunização). As células do baço são misturadas às células de mielomas (tumores) e fundidas para formação dos hibridomas. Em seguida é necessário fazer a seleção do hibridoma, que produz o anticorpo desejado, procedendo-se com sua clonagem. Os clones assim obtidos são, portanto, uma linhagem celular capaz de produzir anticorpos em grande quantidade e de alta especificidade.

### 3.1 – Método ELISA

Trata-se de um método imunoenzimático, que utiliza como marcadores enzimas cromogênicas (responsáveis por catalisar reações que resultam no desenvolvimento de cor) conjugadas a anticorpos ou antígenos. Nos testes imunoenzimáticos um dos reagentes está adsorvido à superfície de uma matriz sólida, como esferas de poliestireno. A reação é baseada na ligação não covalente e reversível do antígeno com o anticorpo específico, no qual um deles é marcado com uma enzima

cromogênica. As enzimas mais utilizadas para esta finalidade são a *fosfatase alcalina* e a *peroxidase*. Para o desenvolvimento de cor são adicionados substratos específicos às enzimas marcadoras. Durante a reação entre a enzima e seu substrato ocorre o desenvolvimento de cor, cuja intensidade pode ser observada visualmente ou medida com espectrofotômetros especiais. Entre os vários tipos de testes imunoenzimáticos, dois são mais comumente empregados: o tipo competitivo e o tipo não competitivo (em sanduíche). No método competitivo, o antígeno da amostra compete com o antígeno marcado com a enzima, adicionado a mistura reagente, pelos sítios de ligação com o anticorpo fixo na matriz sólida. A presença de antígeno na amostra diminui a quantidade de sítios de ligação dos anticorpos da matriz disponíveis aos antígenos marcados que serão posteriormente adicionados. Desta forma a concentração do antígeno marcado torna-se baixa, o que reduz a ocorrência de reações cromogênicas. Conseqüentemente, tem-se que a concentração do antígeno amostral é inversamente proporcional à intensidade da cor desenvolvida. No método em sanduíche, o antígeno deve ter pelo menos dois sítios de ligação com o anticorpo. Inicialmente faz-se a adsorção do anticorpo à matriz sólida, seguida pela adição da amostra e de um conjugado constituído de um anticorpo marcado com uma enzima. Completa-se a reação com a adição do substrato para esta enzima. Neste tipo de reação a concentração do antígeno amostral é diretamente proporcional à intensidade da cor desenvolvida.

Diversos tipos de ELISA têm sido aplicados no dosamento das proteínas do soro do leite e das caseínas, principalmente com o objetivo de se detectar adulterações dos produtos lácteos. Dois métodos ELISA (competitivo e em sanduíche) foram desenvolvidos por Garcia et al. (1991) para detectar pequenas adulterações de leite de vaca no leite de ovelha. Em ambos foram utilizados, anticorpos policlonais contra as proteínas do soro do leite da vaca, conjugados com a biotina. Uma vez que a biotina é uma pequena molécula, a sua



ligação aos anticorpos não prejudica a associação antígeno-anticorpo, mantendo a especificidade do anticorpo para o antígeno, o que poderia não acontecer quando uma enzima se fixa diretamente ao anticorpo. Além disso, a conjugação da biotina com anticorpos é um procedimento muito mais simples, originando produtos mais estáveis do que os complexos enzima-anticorpo. A biotina é um co-fator de várias enzimas, que só se tornam ativas em presença da vitamina. Portanto, após a adição do anticorpo ou do antígeno conjugado à biotina, se adiciona enzimas cromogênicas que utilizam a vitamina B<sub>12</sub> como co-fator. Em seguida, adiciona-se o substrato da enzima, para o desenvolvimento de cor. Os estudos que empregam o método ELISA na análise de proteínas do leite podem ser vistos resumidamente na tabela abaixo.

**Tabela 5** – Método ELISA aplicado na análise das proteínas do leite.

Aplicação	Antígeno	Referência
Deteção de proteínas do leite de vacas nativas e desnatadas em queijos de ovelha e cabra	$\beta$ -lactoglobulina nativa e desnaturada	Beer et al., (1996)
Deteção de leite de cabra em leite de ovelha	$\alpha_2$ -caseína de leite de cabra	Hara et al., (1996)
Deteção de leite de vaca e caseínatos em queijo de cabra e ovelha	$\gamma$ -caseína bovina	Richter et al., (1997)

## Conclusão

A cromatografia, a eletroforese e os ensaios imunológicos são as técnicas mais adequadas para a separação das diferentes proteínas do leite e de produtos lácteos. Os métodos cromatográficos apresentam uma elevada reprodutibilidade dos resultados e permitem recolher facilmente os compostos separados para análises posteriores. Assim, são os mais utilizados para a separação das proteínas. A principal vantagem das técnicas eletroforéticas é a de permitir simultaneamente separação, identificação e quantificação das proteínas do leite. A combinação de baixos custos, tempo de análise reduzido e pequeno volume da amostra fazem da eletroforese capilar um instrumento importante na análise das proteínas do leite. Os métodos ELISA são cada vez mais utiliza-

dos na análise de produtos alimentares devido à sua sensibilidade e ao seu reduzido tempo de análise, podendo vir a desempenhar um importante papel no controle de autenticidade dos produtos lácteos. Os ensaios imunológicos serão certamente mais utilizados na análise do leite quando estiverem disponíveis comercialmente, anticorpos mais baratos e específicos.

## Referências

- AMIGO, L.; RAMOS, M.; MARTINS-ALVAREZ, P. J. Effect of technological parameters on electrophoretic detection of cow's milk in ewe's milk cheeses. *J. Dairy Sci.*, 74:1482-1490, 1991.
- ANDREWS, A. T., Taylor, M. D. e Owen, A. J. Rapid analysis of bovine milk proteins by fast protein liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 348:177-185, 1985.
- BEER, M.; KRAUSE, L.; STAP, M.; SCHWARZER, C.; KLOSTERMEYER, H. Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of native and heat-denatured bovine  $\beta$ -lactoglobulin in ewes 'and goats' milk cheese. *Z Lebensm Unters Forsch.* 203:21-26, 1996.
- BOBE, G., BEITZ, D. C., FREEMAN, A. E. e LINDBERG, G. L. Separation and quantification of bovine milk proteins by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 46:458-463, 1998.
- CARTONI, G.; COCCIOLI, F.; JASIONOWSKA, R.; MASCI, M. Determination of cow's milk in goats' milk and cheese by capillary electrophoresis of the whey protein fractions. *Journal Chromatography American*, v.846, p. 135-141, 1999.
- CATTANEO, T.M.P.; NIGRO, F.; GREPPI, G. F. Analysis of cow, goat and ewe milk mixtures by



- capillary zone electrophoresis (CZE): preliminary approach. *Milchwissenschaft*, 51:616-619, 1996.
- CASPER, J.L.; WENDORFF, W.L.; THOMAS, D.L. Seasonal changes in protein composition of whey from commercial manufacture of caprine and ovine speciality cheeses. *J. Dairy Sci.*, 81:3117 - 3122, 1998.
- GARCÍA, T.; MARTÍN, R.; RODRÍGUEZ, E.; ACZONA, J. I.; SANZ, B.; HERNÁNDEZ, P. E. Detection of bovine milk in ovine milk by a sandwich enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Food Prot.*, 54:366-369, 1991.
- GRAPPIN, R.; RIBADEAU-DUMAS, B. Analytical methods for milk proteins. In P. F. Fox (editor). *Advanced dairy chemistry - Proteins*. 2. ed. London: Blackie Academic & Professional, p.1-62, 1992.
- HAZA, A. I.; MORALES, P.; MARTÍN, R.; GARCÍA, T.; ANGUITA, G.; GONZÁLEZ, I.; RODRÍGUEZ, E.; SANZ, B.; HERNÁNDEZ, P. E. Development of monoclonal antibodies against caprine  $\alpha_2$ -casein and their potential for detecting the substitution of ovine milk by caprine milk by an indirect ELISA. *J. Agric. Food Chem.*, 44:1756-1761.
- HOLLAR, C. M.; LAW, A. J. R.; DALGLEISH, D. G.; MEDRANO, J. F.; BROWN, R. J. Separation of b-casein A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, and B using cation-exchange fast protein liquid chromatography. *J. Dairy Sci.*, 74:3308-3313, 1991.
- KAMINARIDES, S. E.; ANIFANTAKIS, E. M. Comparative study of the separation of casein from bovine, ovine and caprine milks using HPLC. *J. Dairy Res.*, 60:495-504, 1993.
- MANJI, B.; HILL, A.; KAKUDA, Y.; IRVINE, D. M. Rapid separation of milk whey proteins by anion exchange chromatography. *J. Dairy Sci.*, 68:3176-3179, 1985.
- MAYER, W.; HÖRTNER, H. Discontinuous electrophoresis of b-caseins for the determination of bovine caseins in milk e dairy products. *Electrophoresis*, 13:803-804, 1992.
- MAYER, H. K.; HEIDLER, D.; ROCKENBAUER, C. Determination of the percentages of cows', ewes' and goats' milk in cheese by isoelectric focusing and cation - exchange HPLC of g- and para - k - caseins. *Int. Dairy J.*, 7:619-628, 1997.
- OUTINEN, M.; TOSSAVAINEN, O.; SYVÄOJA, E.-L.; KORHONEN, H. Chromatographic isolation of k- casein macropeptide from cheese whey with a strong basic anion exchange resin. *Milchwissenschaft*, 50:570-574, 1995.
- RITCHTER, W.; KRAUSE, I.; Graf, C.; SPERRER, I.; SCHWARZER, C.; KLOSTERMEYER, H. An indirect competitive ELISA for the detection of cows' milk and caseinate in goats' and ewes' milk and cheese using polyclonal antibodies against bovine g-caseins. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, 204:21-26, 1997.
- STRANGE, E. D.; VAN HEKKEN, D.; THOMPSON, M. P. Qualitative and quantitative determination of caseins with reverse-phase and anion-exchange HPLC. *J. Food Sci.*, 56:1415-1420, 1991.
- STRANGE, E. D.; MALIN, E. L.; VAN HEKKEN, D. L.; BASCH, J. J. Chromatographic and electrophoretic methods used for analysis of milk proteins. *J. Chromatogr.*, 624:81-102, 1992.
- VISSER, S.; SLANGEN, C. J.; LAGERWERF, F. M.; DONGEN, W. D. V.; HAVERKAMP, J. Identification of a new genetic variant of b-casein using reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectrometric analysis. *J. Chromatogr. A*, 711:141-150, 1995.