REGLAMENTO (CEE) Nº 690/92 DE LA COMISIÓN

de 19 de marzo de 1992

por el que se establece un método de referencia para la detección de la caseína de leche de vaca en los quesos a base de leche de oveja

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Vista el Acta de adhesión de España y de Portugal y, en particular, los apartados 1 y 2 de su artículo 67, su artículo 98, el apartado 2 de su artículo 234, y su artículo 310,

Visto el Reglamento (CEE) nº 1677/85 del Consejo, de 11 de junio de 1985, relativo a los montantes compensatorios monetarios en el sector agrícola (1), cuya última modificación la constituye el Reglamento (CEE) nº 2205/90 (2), y, en particular, el apartado 1 de su artículo 1,

Visto el Reglamento (CEE) nº 804/68 del Consejo, de 27 de junio de 1968, por el que se establece la organización común de mercados en el sector de la leche y de los productos lácteos (3), cuya última modificación la constituye el Reglamento (CEE) nº 374/92 de la Comisión (4), y, en particular, el apartado 3 de su artículo 9, el apartado 7 de su artículo 14 y el apartado 4 de su artículo 17,

Visto el Reglamento (CEE) nº 876/68 del Consejo, de 28 de junio de 1968, por el que se establecen, en el sector de la leche y de los productos las normas generales relativas a la concesión de restituciones a la exportación y a los criterios para la determinación de su importe (5), cuya última modificación la constituye el Reglamento (CEE) nº 1344/86 (6), y, en particular, el apartado 3 de su artículo 6,

Considerando que los quesos fabricados exclusivamente con leche de oveja están sometidos a determinadas normas específicas establecidas en los Reglamentos comunitarios del sector agrario; que, antes de proceder a la aplicación de estas normas, procede asegurarse de que el producto en cuestión no contenga leche de vaca;

Considerando que se pueden conceder ayudas para el almacenamiento privado de quesos a base de leche de oveja con arreglo al Reglamento (CEE) nº 508/71 del Consejo, de 18 de marzo de 1971, por el que se establecen las normas generales reguladoras de la concesión de ayudas para el almacenamiento privado de quesos conservables (7); que se puede obtener un reembolso especial para dichos productos con arreglo al Reglamento (CEE) nº 876/68; que el comercio de productos a base de leche de oveja no está sometido a montantes compensatorios monetarios con arreglo a los términos del Reglamento (CEE) nº 1677/85; que la aplicación de montantes compensatorios de adhesión está excluida en el comercio de quesos a base de leche de oveja de y hacia España con arreglo al Reglamento (CEE) nº 466/86 del Consejo, de 25 de febrero de 1986, por el que se determinan las normas generales del régimen de montantes compensatorios de adhesión en el sector de la leche y de los productos lácteos con motivo de la adhesión de España (8), y al Reglamento (CEE) nº 3640/90 del Consejo, de 11 de diciembre de 1990, por el que se determinan las normas generales del régimen de montantes compensatorios de adhesión en el sector de la leche y de los productos lácteos durante la segunda etapa de la adhesión de Portugal (9);

Considerando que, habiendo establecido, la Comisión la normativa arriba mencionada relativa a las quesos fabricados con leche de oveja, es necesario verificar mediante los controles adecuados que no se incorpora leche de vaca a los productos en cuestión; que, desde el punto de vista del control, parece necesario establecer un método de referencia comunitario para la detección de leche de vaca, sin perjuicio del empleo de métodos de rutina si éstos cumplen determinados criterios;

Considerando que el Comité de gestión de la leche y de los productos lácteos no ha emitido dictamen alguno en el plazo establecido por su presidente,

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

Se aplicará el método de análisis de referencia recogido en el Anexo para garantizar que el queso que deba ser fabricado exclusivamente con leche de oveja no contenga caseína de leche de vaca.

Se considerará presente la caseína de leche de vaca si el contenido aparente de caseína de leche de vaca en la muestra que deba analizarse es igual o superior al contenido de la muestra de referencia descrita en el Anexo.

Artículo 2

Se podrán emplear métodos de rutina para la detección de la caseína de leche de vaca en los quesos a base de leche de oveja si se cumplen las siguientes condiciones:

— el límite de detección será igual o inferior al 0,5 %,

— no se deben producir falsos positivos; si esto no puede excluirse, toda muestra que dé resultado positivo deberá analizarse empleando el método de referencia,

(1) DO nº L 164 de 24. 6. 1985, p. 6.
(2) DO nº L 201 de 31. 7. 1990, p. 9.
(3) DO nº L 148 de 28. 6. 1968, p. 13.
(4) DO nº L 41 de 18. 2. 1992, p. 9.
(5) DO nº L 155 de 3. 7. 1968, p. 1.
(6) DO nº L 119 de 8. 5. 1986, p. 36.
(7) DO nº L 58 de 11. 3. 1971, p. 1.
(8) DO nº L 53 de 1. 3. 1986, p. 23.
(9) DO nº L 362 de 27. 12. 1990, p. 3.

— la caseína de la leche de vaca deberá poder detectarse con la sensibilidad necesaria, incluso tras largos períodos de maduración, como puede suceder en las condiciones comerciales habituales; si un determinado tipo de queso de oveja no cumple este requisito, dicho queso se analizará empleando el método de referencia.

Artículo 3

El presente Reglamento entrará en vigor el tercer día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de las Comunidades Europeas.*

Será aplicable a partir del 16 de septiembre de 1992.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

Hecho en Bruselas, el 19 de marzo de 1992.

Por la Comisión

Ray MAC SHARRY

Miembro de la Comisión

ANEXO

MÉTODO DE REFERENCIA PARA LA DETECCIÓN DE CASEÍNA DE LECHE DE VACA EN QUESO DE OVEJA

1. Objetivo

Detección de caseína de leche de vaca en queso de oveja mediante isoelectroenfoque de γ-caseínas tras plasminolisis.

2. Ámbito de aplicación

El método es adecuado para la detección sensible y específica de caseína de leche de vaca en quesos de oveja frescos y maduros.

3. Principio del método

3.1. Aislamiento de las caseínas del queso

3.2. Disolución de las caseínas aisladas y tratamiento con plasmina (EC. 3.4.21.7).

3.3. Isoelectroenfoque de las caseínas tratadas con plasmina en presencia de urea y tinción de las proteínas con azul brillante Coomassie G-250.

3.4. Evaluación de los modelos de las γ_2-caseínas teñidas (prueba de la presencia de leche de vaca) mediante comparación del modelo obtenido en la muestra con los obtenidos en el mismo gel en patrones que contienen 0 % y 1 % de leche de vaca.

4. Reactivos

Salvo indicación en contra, se utilizarán reactivos de grado de pureza para análisis. El agua será bidestilada o de pureza equivalente.

Nota : La siguiente descripción se refiere a los geles finos de poliacrilamida con urea, de 265 × 125 × 0,25 mm de dimensiones, producidos en el laboratorio. En caso de que se utilicen otros tamaños o tipos de gel, podrá ser necesario ajustar las condiciones de separación.

Isoelectroenfoque

4.1. Reactivos para la produción de geles de poliacrilamida con urea.

4.1.1. Solución madre y solución « stock » del gel

Disolver en agua :

4,85 g de acrilamida
0,15 g de N, N'-metileno-bis-acrilamida (BIS)
48,05 g de urea
12,22 g de glicerol (87 % p/p).
Enrasar a 100 ml y guardar en un frasco de cristal de color topacio en frigorífico.

Nota : Puede utilizarse una solución comercial preparada de acrilamida/BIS en lugar de las cantidades establecidas de acrilamidas neurotóxicas. Si una solución de este tipo contiene 30 % p/v de acrilamida y 0,8 % p/v de BIS, habrá que utilizar un volumen de 16,2 ml en lugar de las cantidades indicadas. La vida útil de la solución madre es de 10 días como máximo ; si su conductividad es superior a 5 µS, hay que desionizar agitando con 2 g de amberlita MB-3 durante 30 minutos ; después se filtra por membrana de 0,45 µm.

4.1.2. Solución de gel

Preparar una solución de gel mezclando las siguientes cantidades de aditivos, anfólitos y solución madre de gel (véase 4.1.1).

9,0 ml de solución madre
24 mg ß-alanina
500 µl de anfólito pH 3,5-9,5 (1)
500 µl de anfólito pH 6-7 (1).

Homogeneizar la solución de gel y desgasificar durante 2-3 minutos en un baño de ultrasonidos o en vacío.

Nota : Preparar la solución de gel immediatamente antes de verterla (véase 6.2).

(1) Se ha comprobado que los productos Ampholine pH 3,5-9,5 (Pharmacia-LKB) y Servalyt pH 6-7 (Serva) son especialmente adecuados para obtener la separación deseada de las γ-caseínas.

4.1.3. Soluciones de catalizadoras

40 % p/v de persulfato amónico (PER):
disolver 800 mg de PER en agua y llevar a 2 ml.
N,N,N'N'-tetrametiletileno diamina (TEMED).

Nota: Utilizar siempre solución de PER recién preparada.

4.2. Líquido de contacto

Queroseno o parafina líquida.

4.3. Solución anódica

Llevar 5,77 g de ácido fosfórico (85 % p/p) hasta 100 ml con agua.

4.4. Solución catódica

Disolver 2,00 g de hidróxido sódico en agua y diluir hasta 100 ml con agua.

Preparación de la muestra

4.5. Reactivos de aislamiento de las proteínas

Diclorometano.
Ácido acético diluido (25,0 ml de ácido acético glacial enrasado hasta 100 ml con agua). Acetona.

4.6. Solución tampón de disolución de proteínas.

Disolver en agua y enrasar a 50 ml:

5,75 g de glicerol (87 % p/p)
24,03 g de urea
250 mg de ditiotreitol
Disolver en agua y enrasar a 50 ml

Nota: Conservar en frigorífico; tiempo máximo de conservación: una semana.

4.7. Reactivos para la ruptura plasmínica de la caseína

4.7.1. Solución tampón de carbonato amónico

Ajustar una solución de carbonato ácido de 0,2 mol/l (1,58 g/100 ml de agua) a pH 8 con una solución de carbonato amónico de 0,2 mol/l (1,92 g/100 ml de agua).

4.7.2. Plasmina bovina (EC. 3.4.21.7), mínima 5 U/ml.

4.7.3. Solución de inhibición de enzimas

Disolver 2,624 g de ácido E-aminocaproico (ácido 6-amino-n-hexanoico) en 100 ml de etanol al 40 % (v/v).

4.8. Preparación de los patrones de cuajada de leche desnatada de oveja con 0 % y 1 % de leche de vaca

Preparar la leche desnatada mediante centrifugación de leche cruda de vaca o de oveja a granel a 37 °C a 2 500 g durante 20 minutos. Tras enfriar el tubo y su contenido rápidamente a 6-8 °C, eliminar completamente la capa grasa superior. Para la preparación del patrón del 1 %, añadir 5,00 ml de leche desnatada de vaca a 495 ml de leche desnatada de oveja en un vaso de 1 l y ajustar el pH a 6,4 mediante adición de ácido láctico diluido (10 % p/v). Ajustar la temperatura a 35 °C y añadir 100 µl de cuajo de ternero (actividad del cuajo 1 :10 000 aprox. 3 000 U/ml), agitar durante 1 minutos y dejar el vaso en reposo, cubierto con lámina de aluminio, a 35 °C durante 1 hora para que se pueda formar la cuajada. Una vez formada ésta, liofilizar toda la leche cuajada, sin que haya previamente homogeneización ni eliminación del suero. Tras la liofilización, triturar bien para obtener un polvo homogéneo.

Para la preparación del patrón del 0 %, seguir el mismo procedimiento con 500 ml de leche desnatada pura de oveja.

Nota: Es conveniente comprobar la pureza de la leche de oveja mediante isoelectroenfoque de las caseínas tratadas con plasmina antes de la preparación de los patrones.

Reactivos de tinción de proteínas

4.9. Fijador

Disolver 150 g de ácido tricloroacético en agua y enrasar a 1 000 m.

4.10. Solución decolorante

Diluir 500 ml de metanol y 200 ml de ácido acético glacial hasta 2 000 ml con agua destilada.

Nota: La solución decolorante debe prepararse cada día. Puede ser útil prepararla mezclando volúmenes iguales de metanol 50 % (v/v) y de ácido acético glacial 20 % (v/v).

4.11 Soluciones colorantes

4.11.1. Solución colorante (solución madre 1)

Disolver 3,0 g de azul brillante Coomassie G 250 (C.L.42655) en 1 000 ml de metanol al 90 % (v/v) utilizando un agitador magnético (durante unos 45 minutos) y filtrar a través de dos filtros de pliegues de velocidad media.

4.11.2. Solución colorante (solución madre 2)

Disolver 5,0 g de sulfato de cobre pentahidratado en 1 000 ml de ácido acético al 20 % (v/v).

4.11.3. Solución colorante (solución de trabajo)

Mezclar 125 ml de cada una de las soluciones madre (4.11.1, 4.11.2), justo antes de realizar la tinción.

Nota: La solución colorante sólo debe utilizarse el mismo día en que se haya preparado.

5. Equipo

5.1. Placas de vidrio (265 × 125 × 4 mm); rodillo de caucho (15 cm de anchura); mesa de nivelación

5.2. Hoja de soporte del gel (265 × 125 mm)

5.3. Hoja de cobertura (280 × 125 mm). Se pega una tira de cinta adhesiva (280 × 6 × 0,25 mm) a cada uno de los bordes largos (véase la figura 1)

5.4. Cámara de electroenfoque con placa de refrigeración (por ejemplo, 265 × 125 mm) con fuente de alimentación adecuada (≥ 2,5 kV) o equipo automático de electroforesis

5.5. Criostato de circulación, termostatizado a 12 ± 0,5 °C

5.6. Centrífuga, ajustable a 3 000 g

5.7. Tiras de electrodos (≥ 265 mm de longitud)

5.8. Frascos de plástico para el goteo de las soluciones anódica y catódica

5.9. Aplicadores de la muestra (10 × 5 mm, papel de filtro de escasa absorción de proteínas o viscosa)

5.10. Escalpelos, pinzas y tijeras de acero inoxidable

5.11. Placas de cristal o acero inoxidable para teñir y decolorar (por ejemplo, bandejas de instrumentos de 265 × 150 mm)

5.12. Homogeneizador de varilla ajustable (10 mm de diámetro del cilindro, velocidad entre 8 000 y 20 000 rpm)

5.13. Agitador magnético

5.14. Baño de ultrasonidos

5.15. Soldador de películas

5.16. Micropipetas de 5-25 µl

5.17. Concentrador a vacío o liofilizador

5.18. Baño de agua termostatizado a 35 y 40 ±1 °C con agitador

5.19. Equipo de densitometría capaz de medir a una longitud de onda de 634 nm

6. Procedimiento

6.1. Preparación de la muestra

6.1.1. Aislamiento de las caseínas

Pesar la cantidad equivalente a 5 g de peso seco de queso o de patrón — si se trata de queso blanco con mohos, utilizar siempre que sea posible el centro no madurado — en un tubo de centrífuga de 100 ml, añadir 60 ml de agua destilada y homogeneizar con un homogeneizador de varilla (8 000-10 000 rpm). Ajustar el pH a 4,6 con ácido acético diluido (4.5) y centrifugar (5 minutos, 3 000 g). Decantar la grasa y el suero, homogeneizar el residuo a 20 000 rpm en 40 ml de agua destilada [con el pH ajustado a 4-5 con ácido acético diluido (4.5)], añadir 20 ml de diclorometano (4.5) y homogeneizar y centrifugar (5 minutos, 3 000 g). Con una espátula coger la capa de caseína que se halla entre las fases acuosa y orgánica (véase figura 2) y decantar ambas fases. Volver a homogeneizar la caseína en 40 ml de agua destilada (véase más arriba) y 20 ml de diclorometano y centrifugar. Repetir esta operación hasta que las dos fases de extracción sean incoloras (2 o 3 veces). Homogeneizar el residuo de proteína con 50 ml de acetona seca (4.5) y pasar a través de un filtro de pliegues de velocidad media. Lavar el residuo que queda en el filtro con dos porciones de acetona, de 25 ml cada una, y dejar secar al aire o en corriente de nitrógeno; después se pulveriza bien en mortero.

Nota : La proteína aislada seca puede mantenerse indefinidamente a temperatura ambiente. Si se desea aislar rápidamente la proteína, se puede homogeneizar la cantidad equivalente a 5 g de peso seco de queso con dos porciones de acetona (4.5), de 100 ml cada una, a 20 000 rpm, dejar reposar durante 5 minutos y filtrar después a través de filtro de pliegues. El residuo de proteína se seca con acetona de la forma antes descrita y así se obtiene finalmente el polvo secado con acetona. Este método rápido no puede aplicarse al queso de tipo Roquefort.

6.1.2. Ruptura de las β-caseínas con plasmina para intensificar las γ-caseínas

Suspender 25 mg de caseína aislada o 50 mg de los patrones liofilizados (4.8) o del polvo secado con acetona procedente del aislamiento rápido de proteína en 0,5 ml de solución tampón de carbonato amónico (4.7.1) y se homogeneiza durante 20 minutos, por ejemplo con ultrasonidos. Se calienta a 40 °C y se añaden 10 µl de plasmina (4.7.2), se mezcla y se incuba durante una hora a 40 °C sin dejar de agitar. Para inhibir la enzima se añaden 20 µl de solución de ácido ε-aminocaproico (4.7.3) y se añaden después 200 mg de urea sólida y 2 mg de ditiotreitol.

Nota : Para obtener mayor simetría en las bandas de caseína enfocada, es conveniente liofilizar la solución tras añadir en ácido ε-aminocaproico y disolver después el residuo en 0,5 ml de solución tampón (4.6).

6.2. Preparar los geles de acrilamida con urea

Con ayuda de unas cuantas gotas de agua, extender la hoja de soporte del gel (5.2) sobre una placa de vidrio (5.1), y eliminar el exceso de agua con toallas o pañuelos de papel. Extender la hoja de cobertura (5.3) con espaciadores (0,25 mm) sobre otra placa de vidrio de la misma forma. Colocar la placa horizontalmente sobre una mesa de nivelación.

Añadir 10 µl de cada una de las soluciones de catálisis TEMED y PER (4.1.3) a la solución de gel preparada y desgasificada (4.1.2), agitar brevemente y verter cuidadosamente en el centro de la hoja de cobertura. Colocar un extremo de la placa de soporte del gel (con la cara de la hoja hacia abajo) sobre la placa de la hoja de cobertura y bajar lentamente de manera que se forme una película de gel entre las hojas, extendiéndose de forma regular y sin burbujas (figura 3). Con una fina espátula hacer bajar cuidadosa y completamente la placa de soporte del gel y colocar otras tres placas de vidrio encima para que actúen de peso. Una vez completada la polimerización (alrededor de 60 minutos), extraer el gel polimerizado sobre la hoja de soporte del gel junto con la hoja de cobertura, inclinando las placas de vidrio. Limpiar el envés de la hoja de soporte cuidadosamente para eliminar los residuos de gel y la urea. Se suelda el « emparedado de gel » para formar un tubo de película y guardar en frigorífico (durante 6 semanas como máximo).

Nota : Puede volver a utilizarse la hoja de cobertura con los espaciadores. El gel de poliacrilamida puede cortarse en trozos más pequeños, lo que es recomendable cuando hay pocas muestras o si se utiliza un equipo automático de electroforesis (2 geles de 4,5 × 5 cm).

6.3. Isoelectroenfoque

Graduar el termostato de refrigeración a 12 °C. Frotar el revés de la hoja de soporte del gel con queroseno y después dejar caer unas cuantas gotas de queroseno (4.2) sobre el centro del bloque de refrigeración. Extender encima el emparedado de gel, con la cara del soporte hacia abajo, con cuidado para evitar la formación de burbujas. Enjugar el exceso de queroseno y quitar la hoja de cobertura. Empapar las tiras de los electrodos con las soluciones electródicas (4.3, 4.4), cortar para ajustarlas a la longitud del gel y colocar en los lugares previstos (9,5 cm de distancia de los electrodos).

Realizar el enfoque en las siguientes condiciones :

6.3.1. Formato del gel : 265 × 125 × 0,25 mm

Fase	Tiempo (min)	Tensión (V)	Intensidad (mA)	Potencia (W)	Voltios (hora)
1. Preenfoque	30	máx. 2 500	máx. 15	const. 4	ca. 300
2. Enfoque de la muestra (*)	60	máx. 2 500	máx. 15	const. 4	ca. 1 000
3. Enfoque final	60	máx. 2 500	máx. 5	máx. 20	ca. 3 000
	40	máx. 2 500	máx. 6	máx. 20	ca. 3 000
	30	máx. 2 500	máx. 7	máx. 25	ca. 2 500

(*) Aplicación de la muestra : Una vez realizado el preenfoque (fase 1), se ponen con pipeta en los aplicadores de muestra (10 × 5 mm) 18 l de cada una de las soluciones de muestra, se colocan en el gel a intervalos de 1 mm y a 5 mm del ánodo en sentido longitudinal y se aprieta ligeramente. Se realiza el enfoque en las condiciones arriba indicadas, se extraen cuidadosamente los aplicadores de muestra tras 60 minutos de enfoque de la muestra.

Nota : Si se modifica el espesor o la anchura de los geles, habrá que ajustar convenientemente los valores de intensidad y potencia (por ejemplo, habrá que duplicar los valores de intensidad eléctrica y de potencia si se utiliza un gel de 265 × 125 × 0,5 mm).

6.3.2. Ejemplo de programa de tensión para un equipo automático de electroforesis (2 geles de 5,0 × 4,5 cm), con electrodos cuyas tiras se aplican directamente al gel.

Fase	Tensión	Intensidad	Potencia	Temperatura	Voltios/hora
1. Preenfoque	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Vh
2. Enfoque de la muestra	250 V	5,0 mA	2,5 W	8 °C	30 Vh
3. Enfoque	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	80 Vh
4. Enfoque	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 Vh

El aplicador de muestra se coloca en la fase 2 a 0000 Vh.

El aplicador de muestra se saca en la fase 2 a 0030 Vh.

6.4. Tinción de proteínas

6.4.1. Fijación de proteínas

Sacar las tiras de los electrodos inmediatamente después de cortar la corriente y poner el gel inmediatamente en un recipiente de tinción/decoloración con 200 ml de fijador (4.9); dejar durante 15 minutos, agitando de vez en cuando.

6.4.2. Lavado y tinción de la placa de gel

Escurrir totalmente el fijador y lavar la placa de gel dos veces durante 30 segundos cada vez con 100 ml de solución decolorante (4.10). Tirar la solución decolorante y llenar el recipiente con 250 ml de solución colorante (4.11.3); se deja 45 minutos con agitación suave.

6.4.3. Decoloración de la placa de gel

Retirar la solución colorante, lavar la placa de gel dos veces con 100 ml de solución decolorante cada vez y después agitar durante al menos 2 × 15 minutos con 200 ml de solución decolorante hasta que el fondo se vea claro e incoloro. A continuación, enjuagar la placa de gel con agua destilada (2 × 2 minutos) y secar al aire (2 a 3 horas) o con un secador de pelo (10 a 15 minutos).

Nota: La fijación, el lavado, la tinción y la decoloración se deben realizar a 20 °C. No deben utilizarse temperaturas elevadas.

7. Evaluación

La evaluación se lleva a cabo comparando la distribución de las proteínas de la muestra con los patrones de refencia en el mismo gel. La detección de leche de vaca en leche de oveja o en sus productos se realiza por medio de las γ_2 y γ_3-caseínas intensificadas por el tratamiento con plasmina (véase 6.1.2), cuyos puntos isoeléctricos se sitúan entre los pH de 6,5 y 7,5 (figuras 4 y 5). El límite de detección es inferior al 0,5 %. Para la evaluación visual de la cantidad de leche de vaca es conveniente ajustar las concentraciones de las muestras y patrones para obtener el mismo nivel de intensidad de las γ2-caseínas de oveja (véase « γ_2S » en las figuras 4 y 5). Sólo en esas condiciones podrá evaluarse directamente la cantidad de leche de vaca (menor, igual o mayor que el 1 %) en la muestra problema comparando la intensidad de las γ_2-caseínas de vaca (véase « γ_2C » en las figuras 4 y 5). A ser posible aplicar la densitometría para determinar las relaciones de las áreas de los picos de las γ_2-caseínas de vaca con respecto a la de oveja (véase la figura 5). Compárese este valor con la relación de γ_2-caseínas en el patrón del 1 % analizado en el mismo gel.

Nota: El método funciona satisfactoriamente si se encuentra una señal claramente positiva de γ_2-caseína de vaca en el patrón del 1 % pero no en el patrón de 0 %. En caso contrario, deberá optimarse el procedimiento con precisión respetando los detalles del método.

8. Bibliografía

Addeo F., Moio L., Chianese L., Stingo C., Resmini P., Berner I., Krause I., Di Luccia A., Bocca A.: *Use of plasmin to increase the sensitivity of the detection of bovine milk in ovine cheese by gel isoelectric focusing of γ_2-caseins.* Milchwissenschaft 45, 708-711 (1990).

Krause I., Berner I., Klostermeyer H.: *Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte — and carrier ampholyte/immobilized pH gradient — isoelectric focusing of γ_2-caseins using plasmin as signal amplifier.* En: Electrophoresis-Forum '89 (B.J. Radola, ed.) pp 389-393, Bode-Verlag, Munich (1989).

Krause I., Belitz H.-D., Kaiser K.-P.: *Nachweis von Kuhmilch in Schaf- und Ziegenmilch bzw. -käse durch isoelektrische Fokussierung in harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen.* Z. Lebensm. Unters. Forsch. 174, 195-199 (1982).

Krause I., Berner I., Klostermeyer H.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. (en preparación).

Radola B.J.: *Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100 µm polyacrylamide gels on silanized glass plates or polyester films.* Electrophoresis 1, 43-56 (1980).

Figura 1 : Esquema de la hoja de cobertura

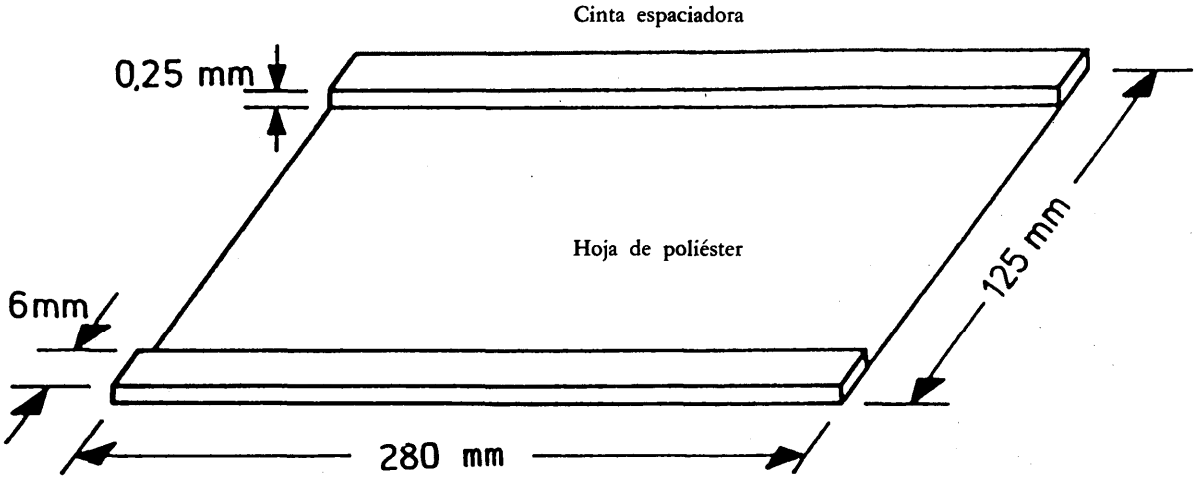


Figura 2 : Capa de caseína flotando entre las fases acuosa y orgánica tras la centrifugación

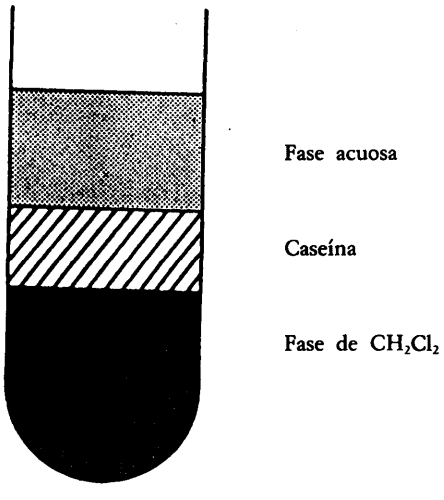


Figura 3 : Técnica de inclinación para moldear ultrafinos de poliacrilamida.
a = cinta espaciadora (0,25 mm); b = hoja de cobertura (5.3); c, e = placas de vidrio (5.1); d = solución de gel (4.1.2); f = hoja de soporte del gel (5.2)

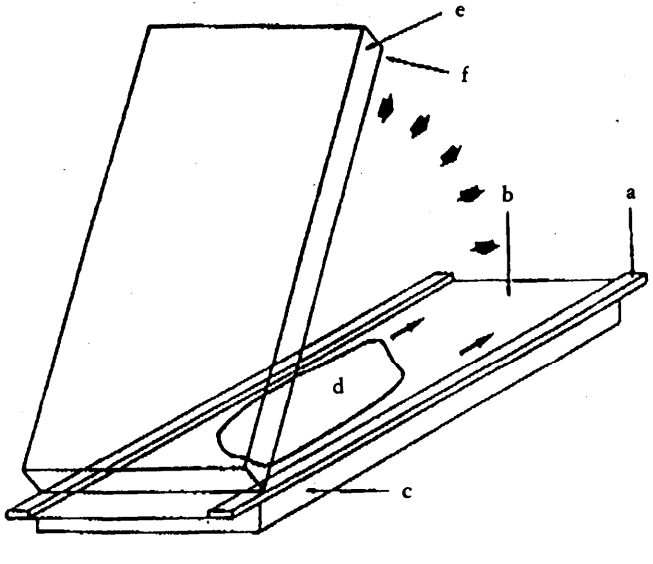


Figura 4: Isoelectroenfoque de caseínas tratadas con plasmina procedentes de queso de tipo Pecorino con diferentes cantidades de leche de vaca. % CM = porcentaje de leche de vaca, C = vaca, S = oveja

Queso de tipo Pecorino con:

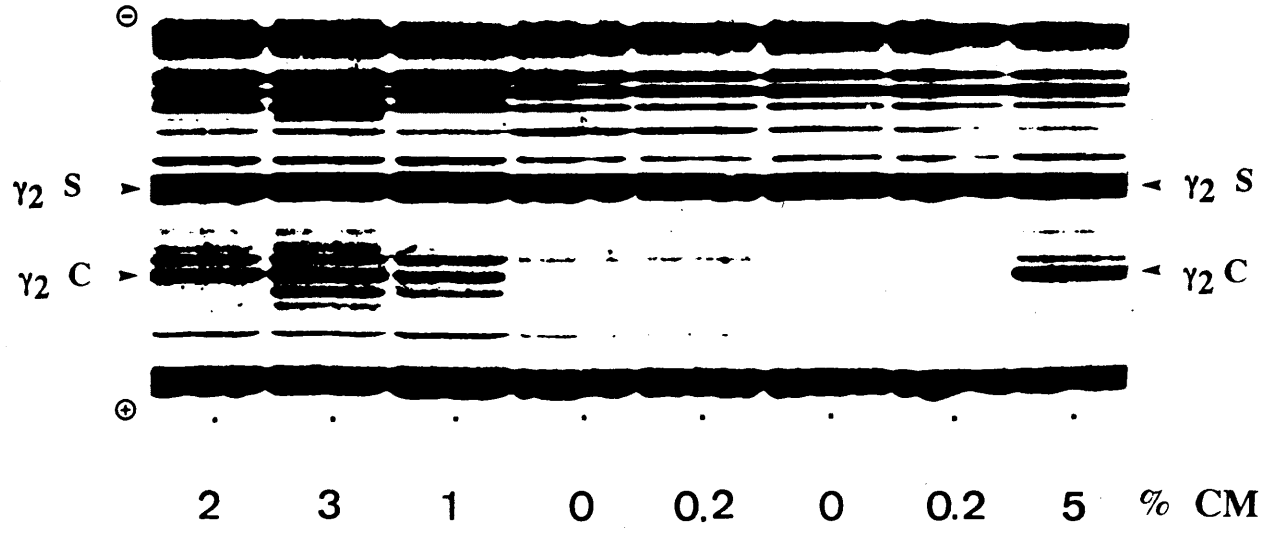


Figura 5 : Superposición de densitogramas de muestras de queso de tipo Pecorino con 0, 1, 2, 3 y 7 % de leche de vaca tras el isoelectroenfoque. La mitad superior del gel IEF se leyó a $\lambda = 634$ nm. STD = patrones con 0 y 1 % de leche de vaca

