

## REGLAMENTO (CE) Nº 1081/96 DE LA COMISIÓN

de 14 de junio de 1996

por el que se establece un método de referencia para la detección de leche y caseína de leche de vaca en quesos a base de leche de oveja, de leche de cabra o de leche de búfala o de sus mezclas y por el que se deroga el Reglamento (CEE) nº 690/92

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

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<sup>(1)</sup>, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) nº 2931/95 de la Comisión<sup>(2)</sup>, y, en particular, el apartado 3 de su artículo 9, los apartados 1 y 4 de su artículo 16 y el apartado 14 de su artículo 17,

Considerando que se pueden conceder ayudas para el almacenamiento privado de quesos a base de leche de oveja de conformidad con el Reglamento (CEE) nº 508/71 del Consejo, de 8 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<sup>(3)</sup>; que se puede obtener un reembolso especial para dichos productos en virtud del artículo 17 del Reglamento (CEE) nº 804/68; que la importación de quesos a base de leche de oveja, de leche de cabra o de leche de búfala, o de sus mezclas, procedentes de determinados terceros países puede efectuarse en la Comunidad en virtud de acuerdos preferenciales;

Considerando que, habida cuenta de la existencia de las disposiciones arriba mencionadas relativas a los quesos elaborados a base de leche de cabra, de leche de oveja o de leche de búfala, o de sus mezclas, es necesario comprobar mediante la realización de controles adecuados que no se ha incorporado leche de vaca a los productos en cuestión; que es conveniente establecer un método de referencia comunitario para la detección de la leche de vaca, sin perjuicio de la utilización de métodos de rutina si cumplen determinados criterios;

Considerando que existe un método de referencia aplicable a los quesos elaborados a base de leche de oveja, de leche de cabra o de leche de búfala, o de sus mezclas, que sustituye al método de referencia descrito en el Reglamento (CEE) nº 690/92 de la Comisión<sup>(4)</sup>, el cual, por consiguiente, puede quedar derogado;

Considerando que las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité de gestión de la leche y los productos lácteos,

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

### Artículo 1

El método de análisis de referencia que figura en el Anexo se aplicará para garantizar que los quesos que

deban estar elaborados exclusivamente con leche de oveja, leche de cabra o leche de búfala, o sus mezclas, no contenga caseína de leche de vaca.

Si el contenido aparente de caseína de leche de vaca de la muestra analizada es igual o superior al contenido de la muestra de referencia con un 1 % de leche de vaca que se describe en el Anexo, se considerará que el producto contiene caseína de leche de vaca.

### Artículo 2

Los métodos de rutina utilizados para la detección de caseína de leche de vaca en los quesos mencionados en el artículo 1 podrán emplearse en las siguientes condiciones:

- su límite de detección deberá ser igual o inferior al 0,5 %,
- no se deben producir falsos positivos; si no puede excluirse que esto ocurra, toda muestra que dé resultado positivo deberá analizarse empleando el método de referencia,
- la caseína de 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 este requisito no puede cumplirse con respecto a un determinado tipo de queso mencionado en el artículo 1, ese queso deberá analizarse empleando el método de referencia.

### Artículo 3

Queda derogado el Reglamento (CEE) nº 690/92. Toda referencia al Reglamento (CEE) nº 690/92 se entenderá como referencia al presente Reglamento.

### Artículo 4

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 1 de octubre de 1996.

<sup>(1)</sup> DO nº L 148 de 28. 6. 1968, p. 13.

<sup>(2)</sup> DO nº L 307 de 20. 12. 1995, p. 10.

<sup>(3)</sup> DO nº L 58 de 11. 3. 1971, p. 1.

<sup>(4)</sup> DO nº L 74 de 20. 3. 1992, p. 23.

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

Hecho en Bruselas, el 14 de junio de 1996.

*Por la Comisión*

Franz FISCHLER

*Miembro de la Comisión*

---

## ANEXO

**MÉTODO DE REFERENCIA PARA LA DETECCIÓN DE CASEÍNA DE LECHE DE VACA EN QUESOS ELABORADOS CON LECHE DE OVEJA, DE CABRA, DE BÚFALA O CON SUS MEZCLAS****1. Objetivo**

Detección de leche y caseína de leche de vaca en quesos elaborados con leche de oveja, leche de cabra, leche de búfala o con sus mezclas mediante isoelectroenfoque de  $\gamma$ -caseínas tras plasminolisis.

**2. Ámbito de aplicación**

El método es adecuado para la detección sensible y específica de leche y caseína de leche de vaca natural y tratada térmicamente en quesos de oveja frescos y maduros elaborados con leche de oveja, leche de cabra o leche de búfala, o con sus mezclas. No es adecuado para la detección de la adulteración de la leche y el queso con concentrados de proteínas del suero de leche de vaca tratados térmicamente.

**3. Principio del método**

- 3.1. Aislamiento de las caseínas del queso y los patrones de referencia.
- 3.2. Disolución de las caseínas aisladas y ruptura plasmínica (EC. 3.4.21.7).
- 3.3. Isoelectroenfoque de las caseínas tratadas con plasmína en presencia de urea y tinción de las proteínas.
- 3.4. Evaluación de los modelos de las  $\gamma_3$  y  $\gamma_2$ -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 de referencia 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 dimensiones  $265 \times 125 \times 0,25$  mm, 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 producción de geles de poliacrilamida con urea.

- 4.1.1. Solución madre del gel

Disolver en agua:

4,85 g de acrilamida

0,15 g N, N-metileno-bis-acrilamida (BIS)

48,05 g de urea

15,00 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 mS, hay que desionizar agitando con 2 g de amberlita MB-3 durante 30 minutos; después se filtra por membrana de  $0,45 \mu\text{m}$ .

## 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 de  $\beta$ -alanina

500  $\mu$ l de anfólito pH 3,5-9,5<sup>(1)</sup>

250  $\mu$ l de anfólito pH 5-7<sup>(1)</sup>

250  $\mu$ l de anfólito pH 6-8<sup>(1)</sup>.

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 inmediatamente antes de verterla (véase 6.2).

## 4.1.3. Soluciones de catalizadoras.

## 4.1.3.1. N,N,N',N'-tetrametilileno diamina (TEMED).

## 4.1.3.2. 40 % de persulfato amónico (PER) disolver 800 mg de PER en agua y llevar a 2 ml.

*Nota:* Utilizar siempre solución de PER recién preparada.

## 4.2. Líquido de contacto

Queroseno o parafina líquida.

## 4.3. Solución anódica

Disolver 5,77 g de ácido fosfórico (85 % p/p) en agua y diluir hasta 100 ml.

## 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.

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

## 4.5.2. Diclorometano.

## 4.5.3. 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 ditiotreitól.

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

## 4.7. Reactivos para la ruptura plasmínica de las caseínas.

## 4.7.1. Solución tampón de carbonato amónico.

Ajustar una solución de hidrogenocarbonato de amonio de 0,2 mol/l (1,58 g/100 ml de agua) que contenga ácido etilendiaminotetraacético 0,05 mol/l (EDTA, 1,46 g/100 ml) a pH8 con una solución de carbonato de amonio de 0,2 mol/l (1,92 g/100 ml de agua) que contenga EDTA 0,05 mol/l.

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

4.7.3. Solución de ácido  $\epsilon$ -aminocaproico de inhibición de enzimas.

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

<sup>(1)</sup> Se ha comprobado que los productos Ampholine pH 3,5-9,5 (Pharmacia) y Resolyte pH 5-7 y pH 6-8 (BDH, Merck) son especialmente adecuados para obtener la separación deseada de las  $\gamma$ -caseínas.

## 4.8. Patrones.

4.8.1. Los patrones de referencia certificados de una mezcla de leche de oveja y de cabra desnatada cuajada con un contenido de leche de vaca del 0 % y del 1 % pueden obtenerse en el Instituto Comunitario de Materiales y Medidas de Referencia, B-2440 Geel, Bélgica.

4.8.2. Preparación de patrones provisionales de laboratorio de leche de búfala cuajada que contengan un 0 % y un 1 % de leche de vaca.

Preparar la leche desnatada mediante centrifugación de leche cruda de vaca o de búfala 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 búfala en un vaso de 1 litro 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 ml de cuajo de ternero (actividad del cuajo 1: 10 000 aprox. 3 000 U/ml), agitar durante 1 minuto 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 búfala. Los patrones deben conservarse a - 20 °C.

*Nota:* Es conveniente comprobar la pureza de la leche de búfala 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 en 1 000 ml.

## 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 soluciones madre 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.I. 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 ( $\geq 2,5$  kV) o equipo automático de electroforesis.

5.5. Criostato de circulación, termostatzado a  $12 \pm 0,5$  °C.

5.6. Centrífuga, ajustable a 3 000 g.

5.7. Tiras de electrodos ( $\geq 265$  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 280 × 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 termostático 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 en un tubo de centrifuga 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 (4.5.1) 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 (4.5.1)], añadir 20 ml de diclorometano (4.5.2) y homogeneizar y centrifugar (5 minutos, 3 000 g). Con una espátula extraer 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 (4.5.2) 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 (4.5.3) 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 debe conservarse a -20 °C.

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

Suspender 25 mg de caseína aislada (6.1.1) en 0,5 ml de solución tampón de carbonato amónico (4.7.1) y homogeneizar 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 ditiotreitól.

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

### 6.2. Preparación de los geles de poliacrilamida 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 TEMED (4.1.3.1) a la solución de gel preparada y desgasificada (4.1.2), agitar y añadir 10 µl de solución PER (4.1.3.2), mezclar bien y verter de inmediato y uniformemente 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 forma 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 revés de la hoja de soporte cuidadosamente para eliminar los residuos de gel y la urea. Soldar 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  $4,5 \times 5$  cm).

### 6.3. Isoelectroenfoque

Graduar el termostato de refrigeración a  $12^\circ\text{C}$ . 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. Enjuagar el exceso de queroseno y quitar la hoja de cobertura. Empapar las tiras de los electrodos con las soluciones electródicas (4.3 y 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: $265 \times 125 \times 0,25$ 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 (1)	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

(1) Aplicación de la muestra: una vez realizado el preenfoco (fase 1), se ponen con pipeta en los aplicadores de muestra ( $10 \times 5$  mm) 18  $\mu\text{l}$  de la muestra y de las soluciones patrón, 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  $265 \times 125 \times 0,5$  mm).

#### 6.3.2. Ejemplo de programa de tensión para un equipo automático de electroforesis (2 geles de $5,0 \times 4,5$ 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	$8^\circ\text{C}$	85 Ve
2. Enfoque de la muestra	250 V	5,0 mA	2,5 W	$8^\circ\text{C}$	30 Ve
3. Enfoque	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	$8^\circ\text{C}$	80 Ve
4. Enfoque	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	$8^\circ\text{C}$	570 Ve

El aplicador de muestra se coloca en la fase 2 a 00 Ve.

El aplicador de muestra se saca en la fase 2 a 30 Ve.

### 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 continuamente.

#### 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). Retirar la solución decolorante y llenar el recipiente con 250 ml de solución colorante (4.11.3); se deja actuar 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 (4.10) cada vez y después agitar durante 15 minutos con 200 ml de solución decolorante y repetir la fase de decoloración al menos 2 o 3 veces hasta que el fondo se vea claro e incoloro. A continuación, enjuagar la placa de gel con agua destilada (2 x 2 minutos) y secar al aire (2 a 3 horas) o con un secador de pelo (de 10 a 15 minutos).

*Nota 1:* La fijación, el lavado, la tinción y la decoloración se deben realizar a 20 °C. No deben utilizarse temperaturas elevadas.

*Nota 2:* Si se prefiere utilizar tinción de plata (por ejemplo Silver Staining Kit, Protein, Pharmacia Biotech, Código nº 17-1150-01), de mayor sensibilidad, las muestras de caseína tratadas con plasmina deben diluirse a 5mg/ml.

## 7. Evaluación

La evaluación se lleva a cabo comparando la distribución de las proteínas de la muestra problema con los patrones de referencia en el mismo gel. La detección de leche de vaca en quesos a base de leche de oveja, leche de cabra y leche de búfala o sus mezclas se realiza por medio de las  $\gamma_2$  y  $\gamma_3$ -caseínas cuyos puntos isoelectrónicos se sitúan entre los pH 6,5 y 7,5 (figuras 4a, 4b y 5). El límite de detección es inferior al 0,5 %.

## 7.1. Evaluación visual

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  $\gamma_2$  y  $\gamma_3$ -caseínas de oveja, cabra y búfala (véase « $\gamma_2$  E,G,B» y « $\gamma_3$  E,G,B», en las figuras 4a y 4b y en la figura 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  $\gamma_3$  y  $\gamma_2$ -caseínas de vaca (véase « $\gamma_3$  C» y « $\gamma_2$  C» en las figuras 4a y 4b y en la figura 5) con las de los patrones de referencia del 0 % y el 1 % (oveja, cabra) o con los patrones provisionales de laboratorio (búfala).

## 7.2. Evaluación densitométrica

A ser posible aplicar la densitometría (5.19) para determinar las relaciones de las áreas de los picos de las  $\gamma_2$  y  $\gamma_3$ -caseínas de vaca con respecto a las de oveja, cabra y búfala (véase la figura 5). Compárese este valor con la relación de las áreas de los picos de las  $\gamma_2$  y  $\gamma_3$ -caseínas del patrón de referencia del 1 % (oveja, cabra) o del patrón provisional de laboratorio (búfala) analizados en el mismo gel.

*Nota:* El método funciona satisfactoriamente si se encuentra una señal claramente positiva de  $\gamma_2$  y  $\gamma_3$ -caseínas de vaca en el patrón del 1 % pero no en el patrón de 0 %. En caso contrario, deberá optimarse el procedimiento respetando los detalles del método con precisión.

Una muestra se considerará positiva cuando las  $\gamma_2$  y  $\gamma_3$ -caseínas o las relaciones de las áreas de los picos correspondientes sean iguales o superiores al nivel del patrón del 1 %.

## 8. Bibliografía

1. 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  $\gamma_2$ -caseins.* *Milchwissenschaft* 45, 708-711 (1990).
2. Addeo F., Nicolai M.A., Chianese L., Moio L., Spagna Musso S., Bocca A., Del Giovine L.: *A control method to detect bovine milk in ewe and water buffalo cheese using immunoblotting.* *Milchwissenschaft* 50, 83-85 (1995).
3. Krause I., Berner I., Klostermeyer H.: *Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte — and carrier ampholyte/immobilised pH gradient — isoelectric focusing of  $\gamma$ -caseins using plasmin as signal amplifier.* En: *Electrophoresis-Forum '89* (B. J. Radola, ed.) pp 389-393, Bode-Verlag, Munich (1989).
4. 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).
5. Radola B.J.: *Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100 mm polyacrylamide gels on silanized glass plates or polyester films.* *Electrophoresis* 1, 43-56 (1980).

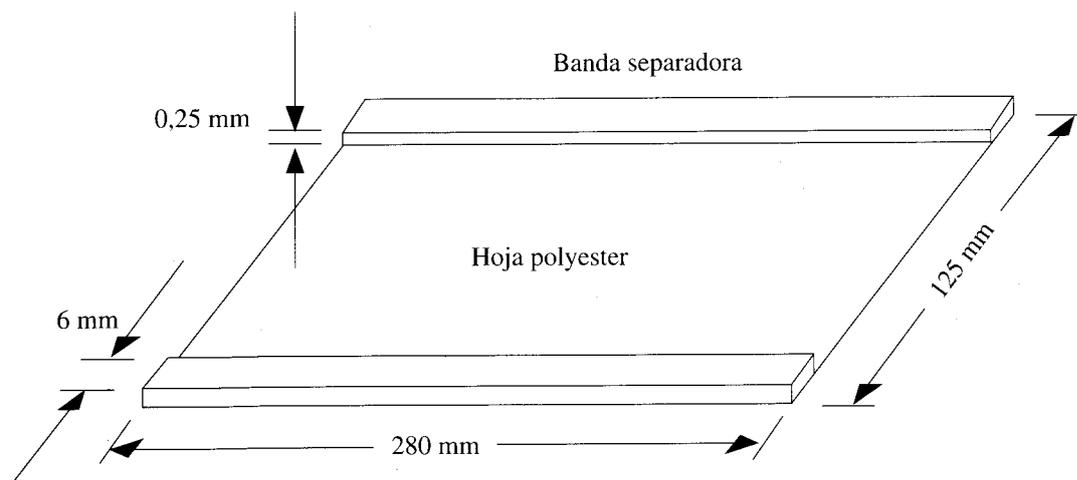


Figura 1: Esquema de la hoja de cobertura

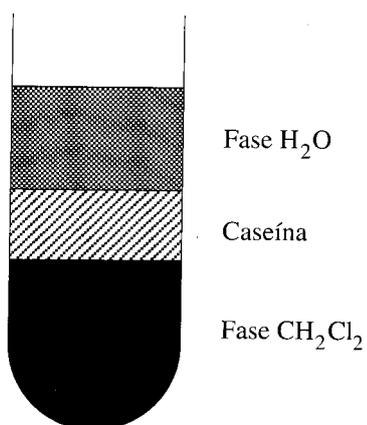


Figura 2: Capa de caseína flotando entre las fases acuosa y orgánica tras la centrifugación

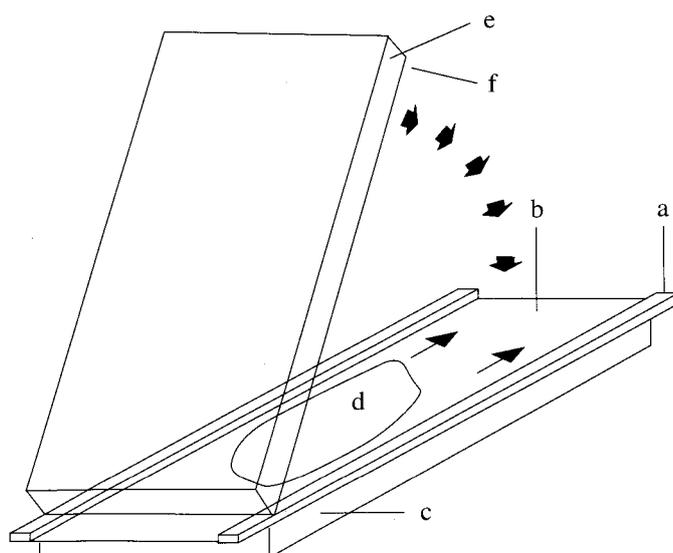


Figura 3: Técnica de inclinación para moldear ultrafinos de poliacrilamida.

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).

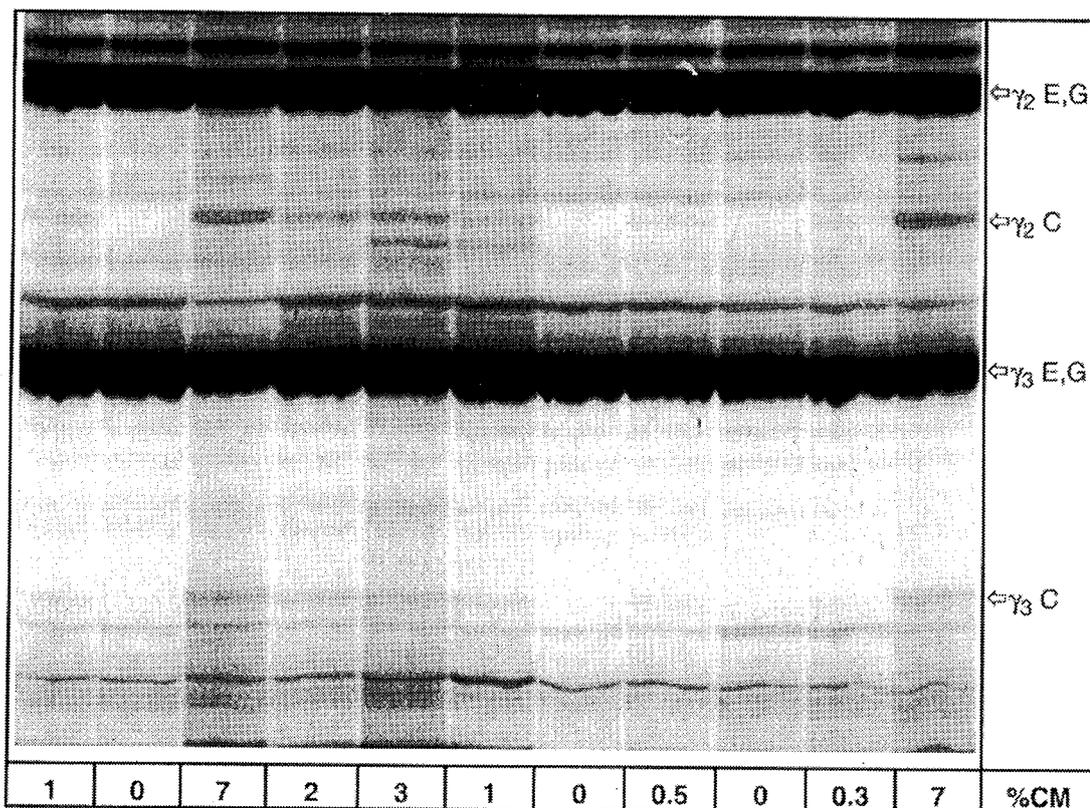


Figura 4a: Isoelectrofoque de caseínas tratadas con plasmina de queso elaborado con leche de oveja y cabra con cantidades diferentes de leche de vaca.

% CM = porcentaje de leche de vaca, C = vaca, E = oveja, G = cabra.

Se muestra la mitad superior del gel IEF.

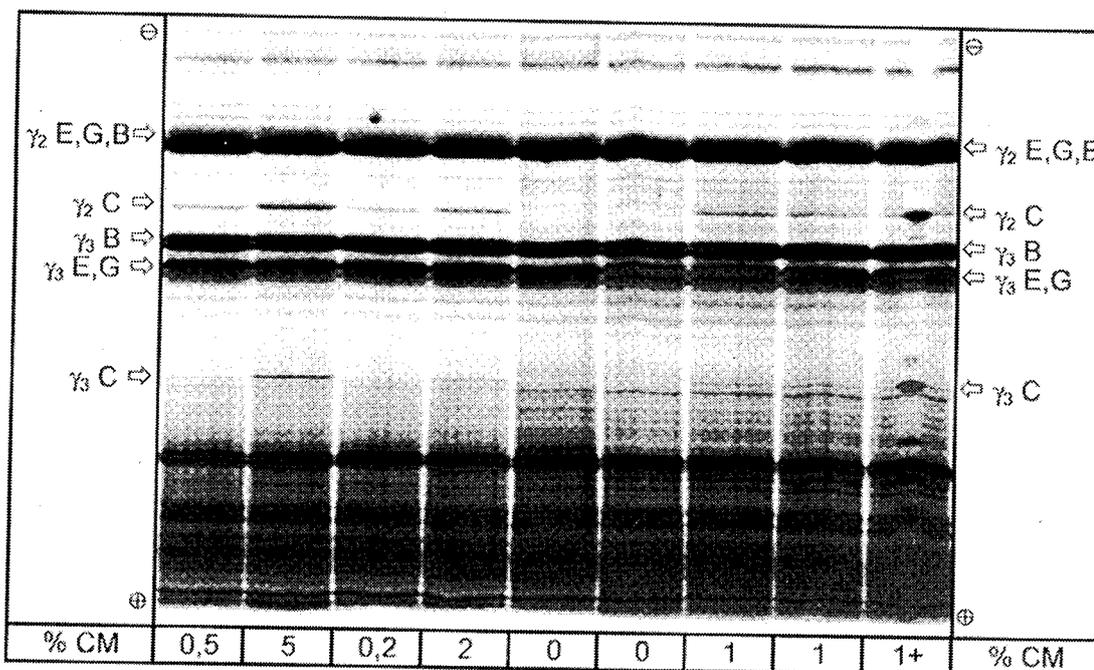
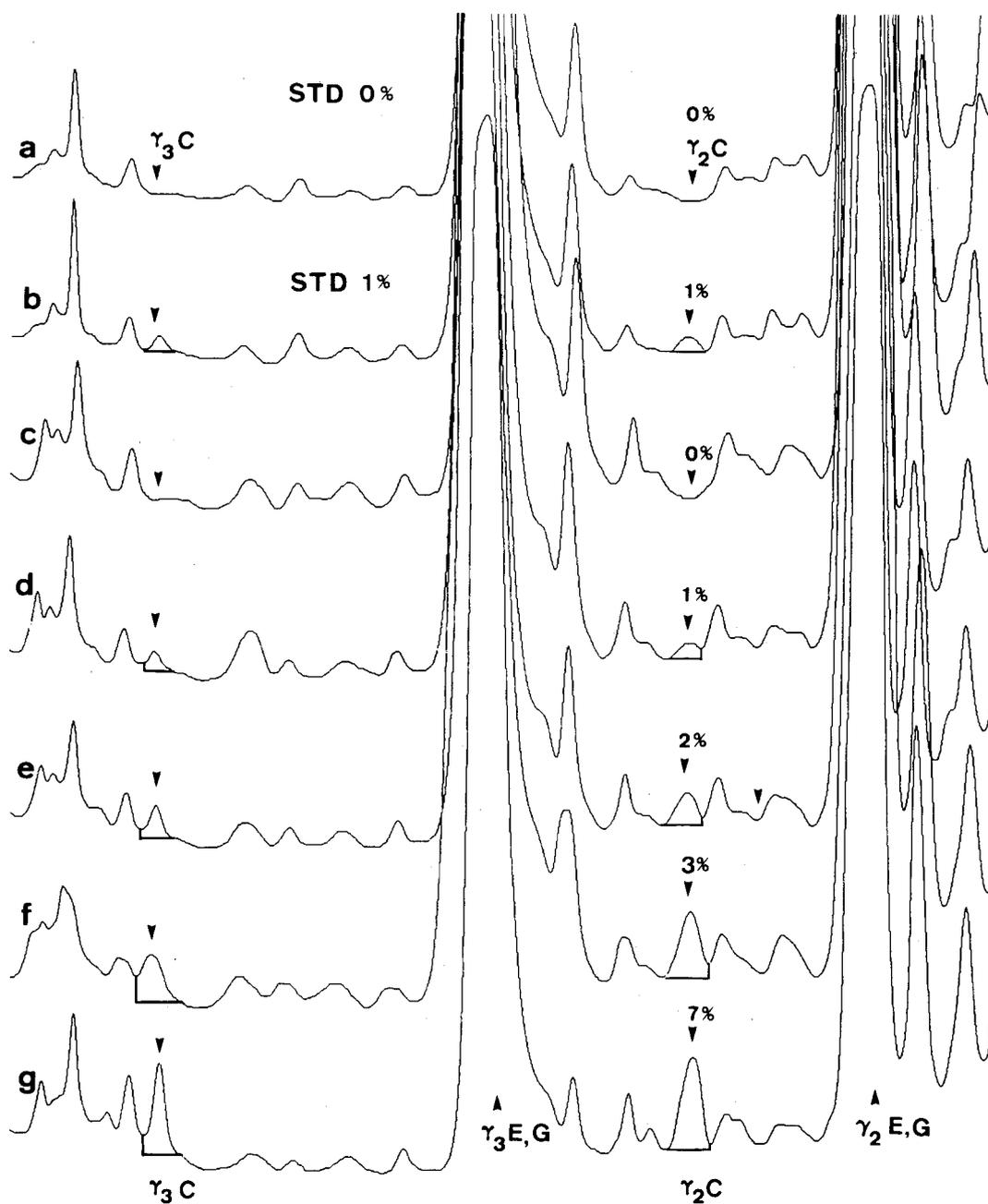


Figura 4b: Isoelectrofoque de caseínas tratadas con plasmina de queso elaborado con mezclas de leche de oveja, cabra y búfala con cantidades diferentes de leche de vaca.

% CM = porcentaje de leche de vaca; 1+ = muestra que contiene un 1 % de leche de vaca en la que se ha inyectado caseína pura de vaca a mitad del recorrido. C = vaca, E = oveja, G = cabra, B = búfala.

Se muestra la distancia de separación total del gel IEF.



**Figura 5:** Superposición de densitogramas de patrones (STD) y muestras de quesos elaborados con una mezcla de leche de oveja y cabra tras el isoelectroenfoco.

a, b = patrones con 0 % y 1 % de leche de vaca; c-g = muestras de quesos con 0 %, 1 %, 2 %, 3 % y 7 % de leche de vaca. C = vaca, E = oveja, G = cabra.

La mitad superior del gel IEF se leyó a  $\lambda = 634$  nm.