

VERORDENING (EEG) Nr. 690/92 VAN DE COMMISSIE

van 19 maart 1992

tot vaststelling van een referentiemethode voor de opsporing van koemelk-caseïne in schapekaas

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE GEMEENSCHAPPEN,

Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese Economische Gemeenschap,

Gelet op de Akte van Toetreding van Spanje en Portugal, in het bijzonder op artikel 67, leden 1 en 2, artikel 98, artikel 234, lid 2, en artikel 310,

Gelet op Verordening (EEG) nr. 1677/85 van de Raad van 11 juni 1985 inzake de monetaire compenserende bedragen in de landbouwsector⁽¹⁾, laatstelijk gewijzigd bij Verordening (EEG) nr. 2205/90⁽²⁾, en met name op artikel 1, lid 1,

Gelet op Verordening (EEG) nr. 804/68 van de Raad van 27 juni 1968 houdende een gemeenschappelijke ordening der markten in de sector melk en zuivelprodukten⁽³⁾, laatstelijk gewijzigd bij Verordening (EEG) nr. 374/92 van de Commissie⁽⁴⁾, en met name op artikel 9, lid 3, artikel 14, lid 7, en artikel 17, lid 4,

Gelet op Verordening (EEG) nr. 876/68 van de Raad van 28 juni 1968 tot vaststelling van de algemene voorschriften betreffende de toekenning van de restituties bij de uitvoer en de criteria voor de vaststelling van het bedrag van de restitutie in de sector melk en zuivelprodukten⁽⁵⁾, laatstelijk gewijzigd bij Verordening (EEG) nr. 1344/86⁽⁶⁾, en met name op artikel 6, lid 3,

Overwegende dat in de communautaire wetgeving voor de landbouwsector speciale bepalingen gelden voor kaas die uitsluitend is vervaardigd uit schapemelk; dat, voordat deze bepalingen worden toegepast, maatregelen moeten worden genomen om ervoor te zorgen dat het betrokken produkt niet is vervaardigd uit koemelk;

Overwegende dat op grond van Verordening (EEG) nr. 508/71 van de Raad van 8 maart 1971 houdende vaststelling van de algemene regels voor de toekenning van steun voor de particuliere opslag van bewaarkaas⁽⁷⁾ steun kan worden verleend voor de particuliere opslag van schapekaas; dat op grond van Verordening (EEG) nr. 876/68 voor dezelfde produkten een bijzondere restitutie kan worden toegekend; dat op grond van Verordening (EEG) nr. 1677/85 geen monetaire compenserende bedragen worden toegepast voor de handel in produkten die zijn vervaardigd uit schapemelk; dat op grond van Verordening (EEG) nr. 466/86 van de Raad van 25 februari 1986 houdende vaststelling van de algemene voorschriften van het stelsel van compenserende bedragen „toetreding” in

de sector melk en zuivelprodukten in verband met de toetreding van Spanje⁽⁸⁾ en Verordening (EEG) nr. 3640/90 van de Raad van 11 december 1990 tot vaststelling van de algemene voorschriften van het stelsel van compenserende bedragen „toetreding” in de sector melk en zuivelprodukten voor de tweede etappe van de toetreding van Portugal⁽⁹⁾ geen compenserende bedragen „toetreding” mogen worden toegepast bij de handel in schapekaas met Spanje;

Overwegende dat, aangezien de Commissie bovengenoemde voorschriften voor schapekaas heeft vastgesteld, door middel van adequate controles moet worden geverifieerd dat geen koemelk in de betrokken produkten is verwerkt; dat het voor de controle nodig blijkt een communautaire referentiemethode voor de opsporing van koemelk vast te stellen, zonder dat het gebruik van routinemethodes wordt uitgesloten als die voldoen aan bepaalde criteria;

Overwegende dat het Comité van beheer voor melk en zuivelprodukten geen advies heeft uitgebracht binnen de door zijn voorzitter bepaalde termijn,

HEEFT DE VOLGENDE VERORDENING VASTGESTELD:

Artikel 1

De in de bijlage opgenomen referentiemethode voor analyse wordt toegepast om te waarborgen dat kaas die uitsluitend uit schapemelk mag zijn vervaardigd, geen koemelkcaseïne bevat.

Koemelkcaseïne wordt geacht aanwezig te zijn, als het gehalte aan koemelkcaseïne in het geanalyseerde monster gelijk is aan of hoger is dan het betrokken gehalte van het in de bijlage beschreven referentiemonster.

Artikel 2

Routinemethoden voor de opsporing van koemelkcaseïne in schapekaas mogen worden gebruikt op de volgende voorwaarden:

- met de methode moet een gehalte van 0,5 % of lager opgespoord kunnen worden;
- de methode mag geen vals positieve resultaten geven; als dit niet uitgesloten is, dient ieder monster dat een positieve uitslag geeft met gebruikmaking van de referentiemethode te worden geanalyseerd;

⁽¹⁾ PB nr. L 53 van 1. 3. 1986, blz. 23.

⁽²⁾ PB nr. L 362 van 27. 12. 1990, blz. 3.

⁽¹⁾ PB nr. L 164 van 24. 6. 1985, blz. 6.

⁽²⁾ PB nr. L 201 van 31. 7. 1990, blz. 9.

⁽³⁾ PB nr. L 148 van 28. 6. 1968, blz. 13.

⁽⁴⁾ PB nr. L 41 van 18. 2. 1992, blz. 9.

⁽⁵⁾ PB nr. L 155 van 3. 7. 1968, blz. 1.

⁽⁶⁾ PB nr. L 119 van 8. 5. 1986, blz. 36.

⁽⁷⁾ PB nr. L 58 van 11. 3. 1971, blz. 1.

- koemelkcaseïne moet ook na lange rijpingsperiodes, zoals die onder gebruikelijke handelsomstandigheden voorkomen, met de vereiste gevoeligheid kunnen worden opgespoord. Als voor een bepaalde soort scha-
pekaas niet aan deze eis kan worden voldaan, moet deze kaas worden geanalyseerd met gebruikmaking van de referentiemethode.

Artikel 3

Deze verordening treedt in werking op de derde dag volgende op die van haar bekendmaking in het *Publikatieblad van de Europese Gemeenschappen*.

Zij is van toepassing met ingang van 16 september 1992.

Deze verordening is verbindend in al haar onderdelen en is rechtstreeks toepasselijk in elke Lid-Staat.

Gedaan te Brussel, 19 maart 1992.

Voor de Commissie

Ray MAC SHARRY

Lid van de Commissie

BIJLAGE

REFERENTIEMETHODE VOOR DE OPSPORING VAN KOEMELKCASEÏNE IN SCHAPEKAAS

1. Doel

Detectie van koemelkcaseïne in schapekaas door middel van iso-elektrische focussering van γ -caseïne na plasminolyse.

2. Toepassingsgebied

De methode is bruikbaar voor een gevoelige specifieke detectie van koemelkcaseïne in verse en gerijpte schapekaas.

3. Principe van de methode

3.1. Isoleren van caseïnen van kaas.

3.2. De geïsoleerde caseïnen worden opgelost en geïncubeerd met plasmine (EC.3.4.21.7).

3.3. De met plasmine behandelde caseïnen worden iso-elektrisch gefocusseerd in aanwezigheid van ureum en de eiwitten worden gekleurd met Coomassie briljantblauw G 250.

3.4. De gekleurde patronen van γ -caseïne (aanwijzing voor koemelk) worden beoordeeld door vergelijken van het met het monster verkregen patroon met het patroon dat in dezelfde gel met standaarden met 0 % en 1 % koemelk is verkregen.

4. Reagentia

Tenzij anders aangegeven, worden chemicaliën van analysekwaliteit gebruikt. Water is tweemaal gedestilleerd of van gelijkwaardige zuiverheid.

Opmerking: De onderstaande bijzonderheden zijn van toepassing op in eigen laboratorium vervaardigde ureum bevattende polyacrylamide-gelen van $265 \times 125 \times 0,25$ mm. Bij gebruik van gelen van een ander type of met andere afmetingen worden de scheidingsomstandigheden zo nodig aangepast.

Iso-elektrische focussering

4.1. Reagentia voor de bereiding van de ureum bevattende polyacrylamide-gelen.

4.1.1. Voorraad-geloplossing

Los op in water:

4,85 g acrylamide

0,15 g N,N'-methyleen-bis-acrylamide (BIS)

48,05 g ureum

12,22 g glycerol (87 % m/m)

en vul aan tot 100 ml. Bewaar de oplossing in een bruine glazen fles in de koelkast.

Opmerking: In plaats van de genoemde afgewogen hoeveelheden van de neurotoxische acrylamiden kan een in de handel verkrijgbare gerede oplossing van acrylamide/BIS worden gebruikt. Indien een dergelijke oplossing 30 % m/v acrylamide en 0,8 % m/v BIS bevat, wordt een volume van 16,2 ml gebruikt in plaats van de aangegeven gewichten. De houdbaarheid van de voorraadoplossing is maximaal 10 dagen; indien de geleidbaarheid meer dan $5 \mu\text{S}$ bedraagt wordt gedeïoniseerd door 30 minuten roeren met 2 g Amberlite MB-3, gevolgd door filtreren door een $0,45 \mu\text{m}$ membraan.

4.1.2. Geloplossing

Een geloplossing wordt bereid door mengen van chemicaliën en amfolyten met de voorraad-geloplossing (zie 4.1.1).

9,0 ml voorraadoplossing

24 mg β -alanine

500 μl amfolyt pH 3,5-9,5⁽¹⁾

500 μl amfolyt pH 6-7⁽¹⁾.

De geloplossing wordt gemengd en 2 tot 3 minuten in een ultrasoonbad of onder verminderde druk ontgast.

Opmerking: De geloplossing wordt vlak voor het gieten van het gel (zie 6.2) bereid.

⁽¹⁾ De producten Ampholine pH 3,5-9,5 (Pharmacia-LKB) en Servalyt pH 6-7 (Serva) blijken bijzonder geschikt voor het bewerkstelligen van de gewenste scheiding van γ -caseïnen.

4.1.3. Katalysatoroplossingen

40 % m/v ammoniumpersulfaat (PER): 800 mg PER wordt opgelost in 2 ml water.
N,N,N',N'-tetramethyl-ethyleendiamine (TEMED).

Opmerking: Er wordt altijd een vers bereide PER-oplossing gebruikt.

4.2. Contactvloeistof

Petroleum of vloeibare paraffine.

4.3. Anodeoplossing

5,77 g fosforzuur (85 % m/m) wordt met water tot 100 ml aangevuld.

4.4. Kathodeoplossing

2,00 g natriumhydroxide wordt in water opgelost en tot 100 ml met water verdund.

Monstervoorbereiding

4.5. Reagentia voor eiwitisolatie

Dichloormethaan.

Verdund azijnzuur (25,0 ml ijsazijn verdund met water tot 100 ml).

Aceton.

4.6. Eiwitoplossende buffer

5,75 g glycerol (87 % m/m)

24,03 g ureum

250 mg dithiotreitol

worden in gedestilleerd water opgelost en tot 50 ml aangevuld.

Opmerking: Wordt in de koelkast bewaard; houdbaarheid 1 week.

4.7. Reagentia voor plasminesplitsing van caseïne

4.7.1. Ammoniumcarbonaatbuffer

Een 0,2 mol/l oplossing van ammoniumwaterstofcarbonaat (1,58 g/100 ml water) wordt tot pH 8 getitreerd met een 0,2 mol/l oplossing van ammoniumcarbonaat (1,92 g/100 ml water).

4.7.2. Runderplasmine (EC.3.4.21.7), activiteit ten minste 5 U/ml

4.7.3. Enzymremmingsoplossing

2,624 g ϵ -aminocapronzuur (6-aminohexaanzuur) wordt opgelost in 100 ml 40 % (v/v) ethanol.

4.8. Bereiding van standaarden van gestremde magere schapemelk met 0 % en 1 % koemelk

Magere melk wordt bereid door 20 minuten centrifugeren van rauwe schapemelk of koemelk bij 37 °C bij 2 500 g. Nadat de bus met inhoud snel tot 6-8 °C is afgekoeld, wordt de bovendrijvende vetlaag volledig verwijderd. Voor de bereiding van de standaard van 1 % wordt in een bekerglas van 1 liter 5,00 ml magere koemelk aan 495 ml magere schapemelk toegevoegd, waarna de pH door toevoeging van verdund melkzuur (10 % m/v) op 6,4 wordt gebracht. De temperatuur wordt op 35 °C ingesteld, waarna 100 μ l kalfsstremsel (1 : 10 000, circa 3 000 U/ml) wordt toegevoegd, 1 minuut wordt geroerd en de beker 1 uur afgedekt met aluminiumfolie op 35 °C wordt gehouden zodat de wrongel zich kan vormen. Nadat de wrongel is gevormd, wordt de gestremde melk in zijn geheel gevriesdroogd, zonder voorafgaand homogeniseren of aftappen van de wei. Na het vriesdrogen wordt het produkt fijngemalen tot een homogeen poeder.

Voor bereiding van de standaard van 0 % wordt dezelfde werkwijze gevolgd met 500 ml zuivere magere schapemelk.

Opmerking: Het verdient aanbeveling de zuiverheid van de schapemelk voorafgaande aan de bereiding van de standaarden te controleren door middel van iso-elektrische focussing van de met plasmine behandelde caseïnen.

Reagentia voor eiwitkleuring

4.9. Fixeeroplossing

150 ml trichloorazijnzuur wordt opgelost in water en tot 1 000 ml aangevuld.

4.10. Ontkleuroplossing

500 ml methanol en 200 ml ijsazijn worden tot 2 000 ml met gedestilleerd water aangevuld.

Opmerking: De ontkleuroplossing wordt dagelijks vers bereid, eventueel door mengen van een voorraadoplossing (van 50 % (v/v) methanol en 20 % (v/v) ijsazijn) met een gelijk volume water.

4.11. Kleuroplossingen**4.11.1. Kleuroplossing (voorraadoplossing 1)**

3,0 g Coomassie briljantblauw G 250 (Color Index 42655) wordt met behulp van een magneetroerder in ongeveer 45 minuten opgelost in 100 ml 90 % (v/v) methanol, waarna wordt afgefilterd door twee middelsnelle vouwfilters.

4.11.2. Kleuroplossing (voorraadoplossing 2)

5,0 g kopersulfaat-pentahydraat wordt opgelost in 1 000 ml 20 % (v/v) azijnzuur.

4.11.3. Kleuroplossing (werkoplossing)

125 ml van elk van de voorraadplossingen (4.11.1, 4.11.2) wordt vlak voor de kleurreactie gemengd.

Opmerking: De kleuroplossing dient na de dag van bereiding niet opnieuw te worden gebruikt.

5. Apparatuur

5.1. Glasplaten (265 × 125 × 4 mm); rubberen rol (breedte 15 cm); vlakke tafel

5.2. Gel-dragerfolie (265 × 125 mm)

5.3. Afdekfolie (280 × 125 mm). Langs beide lange zijden wordt een strook plakband (280 × 6 × 0,25 mm) gehecht (zie fig. 1)

5.4. Elektrofocuseringskamer met koelplaat (b.v. 265 × 125 mm) met geschikte spanningsbron ($\geq 2,5$ kV) of automatische elektrofocuseringsinrichting

5.5. Rondpompcryostaat, gethermostatiseerd op $12 \pm 0,5$ °C

5.6. Centrifuge, instelbaar op 3 000 g

5.7. Elektrodestroken (≥ 265 mm lang)

5.8. Plastic druppelflessen voor anodeoplossing en kathodeoplossing

5.9. Monsterdragers (10 × 5 mm viscose of weinig eiwitabsorberend filterpapier)

5.10. Roestvast stalen schaar, mes en pincet

5.11. Roestvast stalen of glazen kleurings- en ontkleuringschalen (b.v. instrumentbakjes van 265 × 150 mm)

5.12. Instelbare staafhomonisator (schachtdiameter 10 mm), snelheidsregeling tussen 8 000 en 20 000 tpm

5.13. Magneetroerder

5.14. Ultrasoonbad

5.15. Filmlasapparaat

5.16. Micropipetten van 5-25 μ l

5.17. Vacuümverdamer of vriesdroger

5.18. Thermostatisch geregeld waterbad, instelbaar op 35 en 40 ± 1 °C, met schudinrichting

5.19. Densitometer met aflezing bij $\lambda = 634$ nm

6. Werkwijze**6.1. Monstervoorbereiding****6.1.1. Isoleren van caseïnen**

Een met 5 g droge massa overeenkomende hoeveelheid kaas of standaard — bij schimmelkaas zo veel mogelijk het onrijpe midden gebruiken — wordt afgewogen in een centrifugebuis van 100 ml, er wordt 60 ml water toegevoegd en gehomogeniseerd met een staafhomonisator (8 000-10 000 tpm) 5.12. De pH wordt met verdund azijnzuur (4.5) op 4,6 gebracht en het geheel wordt gecentrifugeerd (5 minuten, 3 000 g). Het vet en de wei worden gedecanteerd, het residu wordt in 40 ml gedestilleerd water (met verdund azijnzuur (4.5) op pH 4-5 gebracht) gehomogeniseerd (20 000 tpm), er wordt 20 ml dichloormethaan (4.5) toegevoegd, waarna opnieuw wordt gehomogeniseerd en wordt gecentrifugeerd (5 minuten, 3 000 g). De caseïnelaag, die tussen de waterfase en de organische fase drijft (zie fig. 2), wordt met een spatel opgetrokken en beide fasen worden afgeschonken. De caseïne wordt opnieuw gehomogeniseerd in 40 ml gedestilleerd water (zie boven) en 20 ml dichloormethaan en gecentrifugeerd. Deze bewerkingen worden herhaald totdat de beide extractiefasen kleurloos zijn (2 tot 3 maal). Het eiwitresidu wordt gehomogeniseerd met 50 ml droge aceton (4.5) en door een middelsnel vouwfilterpapier gefiltreerd. Het residu op het filter wordt tweemaal met telkens 25 ml aceton gewassen, aan de lucht of onder een stikstofstroom gedroogd en in een mortier verpoederd.

Opmerking: Droge geïsoleerde eiwitten zijn bij kamertemperatuur onbeperkt houdbaar. Voor een snelle isolatie van eiwit wordt een hoeveelheid kaas die overeenkomt met 5 g droge massa tweemaal met telkens 100 ml aceton (4.5) bij 20 000 tpm gehomogeniseerd, 5 minuten laten staan en vervolgens door een vouwfilter afgefiltreerd. Het eiwitresidu wordt gedroogd als hierboven beschreven, waarna het met aceton gedroogde poeder wordt verkregen. Deze snelle methode is niet toepasbaar op kaas van het type Roquefort.

6.1.2. Plasminesplitsing van δ -caseïnen ter versterking van γ -caseïnen

25 mg geïsoleerde caseïne of 50 mg van de gevriesdroogde standaards (4.8) of van het met aceton gedroogde poeder van de snelle eiwitisolatie wordt gesuspenderd in 0,5 ml ammoniumcarbonaat-buffer (4.7.1) en 20 minuten gehomogeniseerd, in een ultrasonic behandeling (5.14). Na verwarming tot 40 °C wordt 10 μ l plasmine (4.7.2) toegevoegd, gemengd en één uur bij 40 °C onder voortdurend schudden geïncubeerd. Hierna wordt ter remming van het enzym 20 μ l ϵ -aminocapronzuuroplossing (4.7.3) toegevoegd, waarna 200 mg vast ureum en 2 mg dithiotreitol worden toegevoegd.

Opmerking: Ten einde meer symmetrie in de gefocusteerde caseïnebanden te verkrijgen verdient het aanbeveling de oplossing na de toevoeging van het ϵ -aminocapronzuur te vriesdrogen en de residuen vervolgens in 0,5 ml ureumbuffer (4.6) op te lossen.

6.2. Bereiding van de ureum houdende acrylamidegelen

Het gel-dragerfolie (5.2) wordt met behulp van enkele druppels water op een gasplaat (5.1) gerold, waarna eventueel overtollig water met een papieren handdoek of een tissue wordt verwijderd. Het afdekfolie (5.3) wordt op dezelfde wijze met afstandhouders (0,25 mm) op een tweede gasplaat gerold. De plaat wordt horizontaal op een vlakke tafel gelegd.

Aan de bereide en ontluchte geloplossing (4.1.2) wordt van elk van de katalysatoroplossingen van TEMED en PER (4.1.3) 10 μ l toegevoegd, waarna het geheel kort wordt gemengd en gelijkmatig over het midden van het dekblad uitgegoten. Plaats de plaat met het gel-dragerfolie op een smalle kant en met de bladkant naar beneden op het afdekfolie en laat de plaat met het gel-dragerfolie langzaam zakken, zodat zich tussen de bladen een gelfilm vormt die zich gelijkmatig en zonder bellen verspreidt (zie fig. 3). De plaat met het gel-dragerfolie wordt helemaal naar beneden gelaten, waarbij een dunne spatel wordt gebruikt, en bij wijze van gewicht worden nog drie gasplaten op de plaat gelegd. Wanneer de polymerisatie is voltooid (ongeveer 60 minuten), wordt de op de plaat met het gel-dragerfolie gepolymeriseerde gel samen met het afdekfolie door tikken op de glasplaten verwijderd. De achterkant van de plaat met het gel-dragerfolie wordt zorgvuldig van gelresten en ureum ontdaan. De „gel-sandwich” wordt in plasticfolie gelast en bewaard in de koelkast (max. 6 weken).

Opmerking: De afdekfolie met afstandhouders kan opnieuw worden gebruikt. De polyacrylamidegel kan in kleinere stukken worden gesneden, hetgeen aanbeveling verdient wanneer er weinig monsters zijn of wanneer een automatische elektroforese-richting wordt gebruikt (2 gelen, afmetingen 4,5 $\times$ 5 cm).

6.3. Iso-elektrische focussering

De koelthermostaat wordt op 12 °C ingesteld. De achterkant van het geldragerfolie wordt met petroleum afgeveegd, waarna midden op het koelblok enkele druppels petroleum (4.2) worden aangebracht. De gel-sandwich wordt met de dragerzijde naar beneden op het koelblok gelegd, waarbij ervoor wordt gezorgd dat er geen bellen ontstaan. Eventuele overtollige petroleum wordt weggeveegd en het afdekfolie wordt verwijderd. De elektrodestroken worden in de elektrodeoplossingen (4.3, 4.4) nat gemaakt, op de lengte van de gel afgeknipt en op de in aanmerking komende posities aangebracht (afstand tussen de elektroden 9,5 cm).

De focussering wordt uitgevoerd onder de onderstaande omstandigheden :

6.3.1. Gelformaat 265 $\times$ 125 $\times$ 0,25 mm

Stap	Tijd (min)	Voltage (V)	Stroomsterkte (mA)	Vermogen (W)	Volt-uur (Vh)
1. Prefocussering	30	max. 2 500	max. 15	const. 4	ca. 300
2. Monsterfocussering (*)	60	max. 2 500	max. 15	const. 4	ca. 1 000
3. Eindfocussering	60	max. 2 500	max. 5	max. 20	ca. 3 000
	40	max. 2 500	max. 6	max. 20	ca. 3 000
	30	max. 2 500	max. 7	max. 25	ca. 2 500

(*) Opbrengen monster : Na de prefocussering (stap 1) wordt telkens 18 μ l (5.9) van de monsteroplossingen op de monsterdragers gepipetteerd en deze worden met een onderlinge tussenruimte van 1 mm en op een afstand van 5 mm in de lengterichting van de anode op de gel gelegd en zachtjes aangedrukt. De focussering wordt onder de hierboven aangegeven omstandigheden uitgevoerd en na de 60 minuten van de focussering van de monsters worden de monsterdragers voorzichtig verwijderd.

Opmerking: Indien de dikte of de breedte van de gelen wordt veranderd, dienen de waarden voor de stroomsterkte en het vermogen te worden aangepast (b.v. tweemaal zo hoge waarden voor de stroomsterkte en voor het vermogen bij gebruik van een gel van 265 $\times$ 125 $\times$ 0,5 mm).

- 6.3.2. Voorbeeld van een voltageprogramma voor een automatische elektroforese-inrichting (2 gelen van $5,0 \times 4,5$ cm), elektroden zonder stroken rechtstreeks op de gel aangebracht

Stap	Spanning	Stroomsterkte	Vermogen	Temperatuur	Volt-uur
1. Prefocusering	1 000 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	85 Vh
2. Monsterfocusering	250 V	5,0 mA	2,5 W	8 °C	30 Vh
3. Focussering	1 200 V	10,0 mA	3,5 W	8 °C	80 Vh
4. Focussering	1 500 V	5,0 mA	7,0 W	8 °C	570 Vh

De monsterdrager wordt in stap 2 bij 0 Vh aangebracht.

De monsterdrager wordt in stap 2 bij 30 Vh verwijderd.

- 6.4. Eiwitkleuring

- 6.4.1. Eiwit-fixering

Direct na het uitschakelen van de stroom worden de elektrodestroken verwijderd en wordt de gel in een kleurings-/ontkleuringsschaal met 200 ml fixeermiddel (4.9) gebracht; 15 minuten laten staan onder af en toe schudden.

- 6.4.2. Wassen en kleuren het gel

Giet het fixeermiddel volledig af en was de gelplaat tweemaal telkens 30 seconden met 100 ml ontkleuroplossing (4.10). De ontkleuroplossing wordt afgegoten en de schaal wordt met 250 ml kleuroplossing (4.11.3) gevuld; de kleur wordt onder zachtjes schudden in 45 minuten ontwikkeld.

- 6.4.3. Ontkleuren van de gelplaat

De kleuroplossing wordt afgegoten en de gelplaat wordt tweemaal telkens met 100 ml ontkleuroplossing gewassen en ten minste 2×15 minuten met 200 ml ontkleuroplossing geschud, totdat de achtergrond schoon en ongekleurd is. Vervolgens wordt de gelplaat gespoeld met gedestilleerd water (2×2 minuten) en aan de lucht in 2 tot 3 uur of met een föhn in 10 tot 15 minuten gedroogd.

Opmerking: Het fixeren, wassen, kleuren en ontkleuren wordt uitgevoerd bij 20 °C. Geen hogere temperaturen toepassen.

7. Beoordeling

De beoordeling vindt plaats door vergelijking van de eiwitpatronen van het monster met die van referentiemonsters op dezelfde gel. Detectie van koemelk in schapemelk of in de produkten daarvan geschiedt aan de hand van de γ_2 - en γ_3 -caseïnen die zijn versterkt door behandeling met plasmin (zie 6.1.2), waarvan het iso-elektrisch punt ligt tussen pH 6,5 en pH 7,5 (zie fig. 4 en 5). De detectiegrens ligt beneden 0,5 %. Voor een visuele beoordeling van de hoeveelheid koemelk verdient het aanbeveling de concentraties van monsters en standaarden aan te passen zodat vergelijkbare intensiteiten van de γ_2 -caseïnen worden verkregen (zie „ γ_2 S” in fig. 4 en 5). Daarna kan de hoeveelheid koemelk (minder dan, gelijk aan of meer dan 1 %) in het onbekende monster rechtstreeks worden bepaald door vergelijking van de intensiteit van de runder- γ_2 -caseïnen (zie „ γ_2 C” in fig. 4 en 5). Zo mogelijk wordt voor de bepaling van de verhouding van piekoppervlakken van runder- tot schape- γ_2 -caseïnen densitometrie toegepast (zie fig. 5). De hiermee verkregen waarde wordt vergeleken met de verhouding van γ_2 -caseïnen in de op dezelfde gel geanalyseerde standaard van 1 %.

Opmerking: De methode werkt bevredigend wanneer er in de standaard van 1 % een duidelijk positief signaal voor runder- γ_2 -caseïne is en in de standaard van 0 % niet. Is dat anders, dan dient de procedure aan de hand van de bijzonderheden van de methode te worden verbeterd.

8. Literatuurverwijzingen

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*. In: *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.* (in voorbereiding).

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

Fig. 1. Schematische tekening van het dekblad

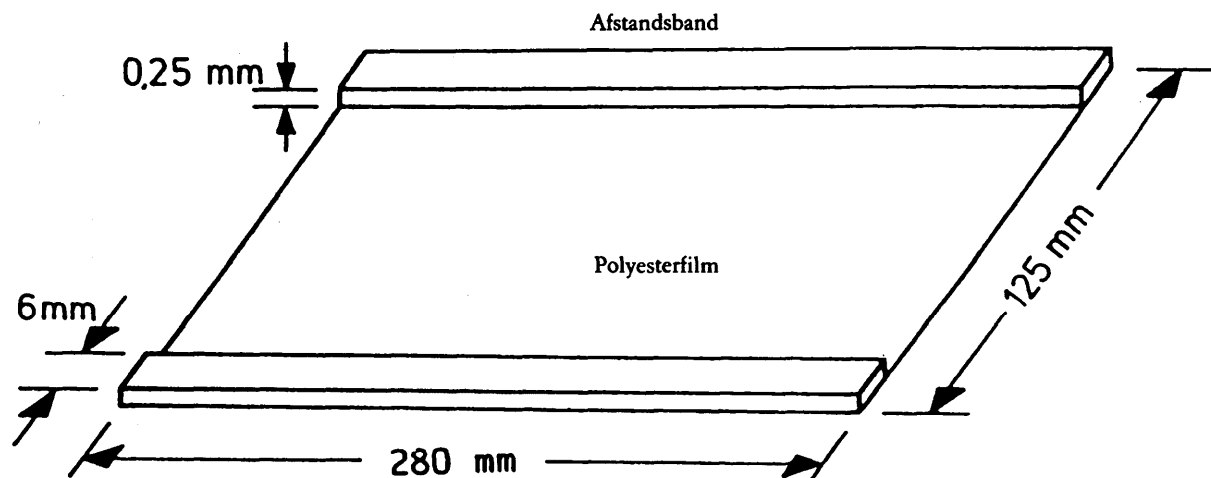


Fig. 2. Caseïnelaag die na centrifugering tussen de waterlaag en de organische laag drijft

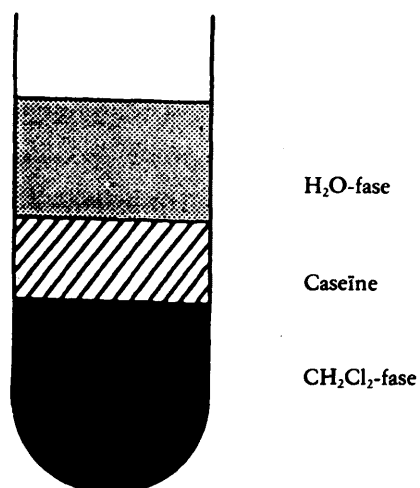


Fig. 3. Opklapmethode voor het gieten van ultradunne polyacrylamidegelen. a = afstandsband (0,25 mm); b = dekblad (5.3); c, e = glasplaten (5.1); d = geloplossing (4.1.2); f = gel-draagblad (5.2)

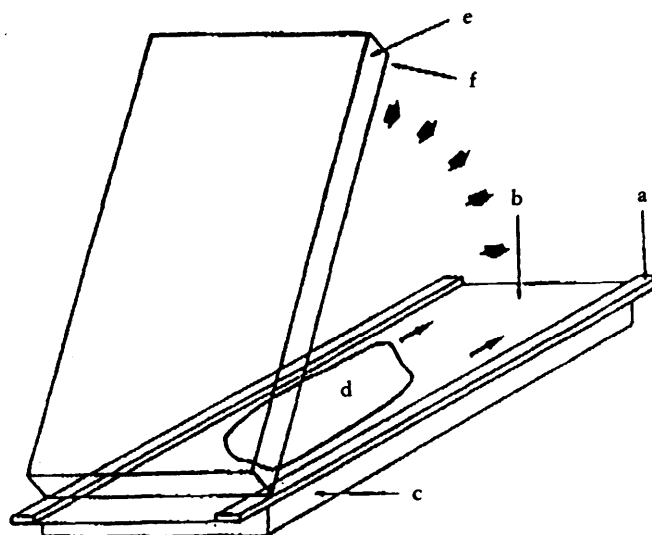


Fig. 4. Iso-elektrische focussing van met plasmine behandelde caseïnen van kaas van het type Pecorino met verschillende hoeveelheden koemelk. % CM = percentage koemelk, C = koe, S = schaap

Kaas van het type Pecorino met:

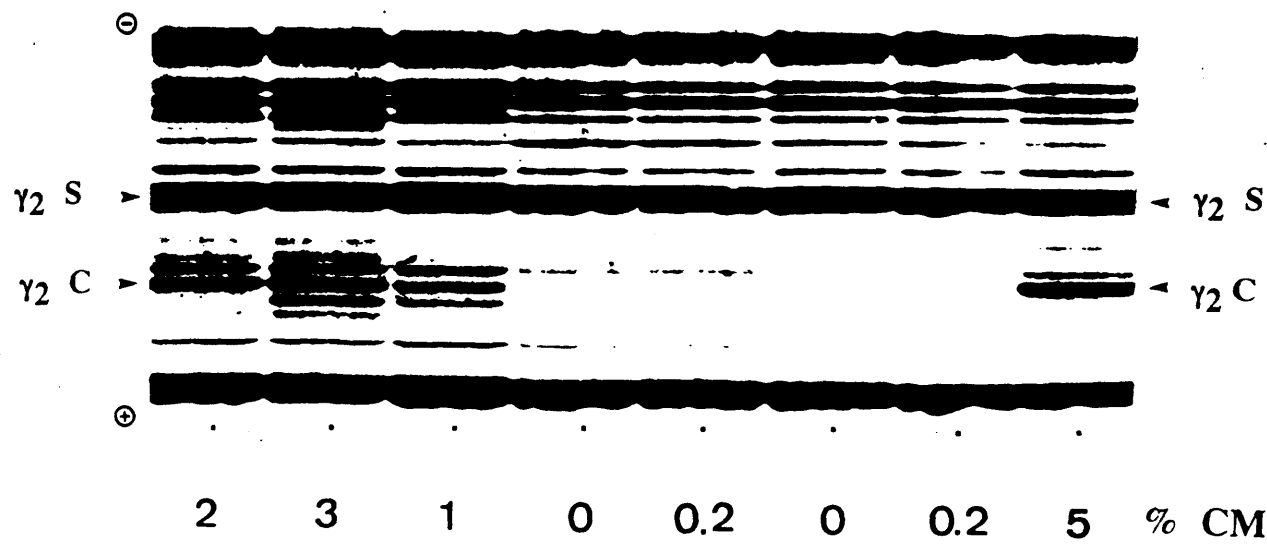


Fig. 5. Superpositie van densitogrammen van monsters kaas van het type Pecorino met 0, 1, 2, 3 en 7 % koemelk, na iso-elektrische focussing. De bovenste helft van de IEF-gel is onderzocht bij $\lambda = 634$ nm. STD = standaarden met 0 en 1 % koemelk

