

ΥΠΟΥΡΓΙΚΕΣ ΑΠΟΦΑΣΕΙΣ & ΕΓΚΡΙΣΕΙΣ

Αριθ. 2073/87

(2)

Μέθοδος ηλεκτροφόρησης για την ανίχνευση νοθείας με αγελαδινό γάλα σε τυριά από πρόβειο γάλα.

ΓΕΝΙΚΟ ΧΗΜΕΙΟ ΚΡΑΤΟΥΣ
ΑΝΩΤΑΤΟ ΧΗΜΙΚΟ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ
(Συνεδρίαση 10.11.87)

Εχοντας υπόψη:

1. Το έγγραφο του Γενικού Χημείου του Κράτους 21003/25/87.

2. Το εδάφιο δ της παρ. 8 του άρθρου 6 του Νόμου 4328/1929 «περί συστάσεως του Γενικού Χημείου του Κράτους», όπως τροποποιήθηκε και συμπληρώθηκε με τον Α.Ν. 754/1937 (αρ. 3 παρ. 2 και 3) (ΦΕΚ 247/ΤΑ/1937).

3. Το άρθρο 4 του Διατάγματος της 31ης Οκτωβρίου 1929 «Περί κανονισμού της λειτουργίας και των εργασιών του Ανωτάτου Χημικού Συμβουλίου» (ΦΕΚ 391/ΤΑ/31.10.1929).

4. Το Νόμο 115/1975 «περί τροποποιήσεως διατάξεων τινών του Ν. 4328/1929» (ΦΕΚ 172/ΤΑ/20.8.1975).

5. Την απόφαση των Υπουργών Προεδρίας και Οικονομικών για αναμόρφωση συλλογικών οργάνων Γνωμοδοτικής και Αποφασιστικής αρμοδιότητας του Υπουργείου Οικονομικών Ο. 208/181, ΦΕΚ 214/ΤΒ/82.

6. Την Υ. 1362/Α/5.10.87 απόφαση του Πρωθυπουργού «Καθορισμός αρμοδιοτήτων στον Αναπληρωτή Υπουργό Οικονομικών» (ΦΕΚ 535/ΤΒ/5.10.87), αποφασίζουμε:

Εγκρίνουμε την εφαρμογή μεθόδου ηλεκτροφόρησης για την ανίχνευση της νοθείας με αγελαδινό γάλα, τυριών από πρόβειο γάλα, ως εξής:

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΝΟΘΕΙΑΣ ΤΩΝ ΤΥΡΙΩΝ ΦΕΤΑ, ΚΕΦΑΛΟΤΥΡΙ ΚΑΙ ΚΑΣΕΡΙ ΑΠΟ ΠΡΟΒΕΙΟ ΓΑΛΑ ΜΕ ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ.

1. Αρχή της μεθόδου.

Στηρίζεται στη διαφορά της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας που παρουσιάζουν οι παρά-κ-καζεΐνες του αγελαδινού και του πρόβειου γάλακτος.

Α) Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδης

1. Αντιδραστήρια.

α) TRIS (HYDROXYMETHYL) AMINOMETHANE.

β) Πυκνό υδροχλωρικό οξύ (HCL).

γ) Ουρία.

δ) CYANOGLUM 4L (95% ACRYLAMIDE + 5%, N, N'- METHYLENBISACRYLAMIDE)

ε) TEMED (N, N, N', N' TETRAMETHYLAETHYLENDIAMINE).

στ) Υπερθειικό αμμώνιο (χρυσταλλικό).

2. Διαλύματα.

α) Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής (PH=6,7).

7,5 γρ. TRIS (1α) και 4 ML πυκνό HCL (1β) αραιώνονται με απεσταγμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 1 LT.

β) Διάλυμα STOCK για την παρασκευή της πηκτής 420 γρ. ουρίας (1γ), 60 γρ. CYANOGLUM 4L (1δ) και 1 ML TEMED (1ε), διαλύονται σε ρυθμιστικό διάλυμα της πηκτής (2α) μέχρι τελικό όγκο 1 LT. Το διάλυμα διηθείται δια ηθμού ταχείας ροής.

3. Τεχνική παρασκευή της πηκτής.

Χρησιμοποιούνται πλάκες διαστάσεων 25 CM × 15 CM με δυνατότητα κατασκευής πηκτής πάχους 1,5 MM. Για κάθε πλάκα απαερώνεται ποσότητα 70 ML από το STOCK διάλυμα πηκτής (2β). Μετά το τέλος της απαέρωσης προστίθεται στο διάλυμα 32 MG υπερθειικού αμμωνίου.

Το γέμισμα των πλακών γίνεται με προσοχή για την αποφυγή ενσω-

μάτωσης φυσαλίδων αέρα. Ο πολυμερισμός γίνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Β) Αντιδραστήρια και διαλύματα ηλεκτροφόρησης, στερέωσης και εμφάνισης πρωτεϊνών.

1. Αντιδραστήρια.

α) TRIS (HYDROXYMETHYL) AMINOMETHANE.

β) 5,5 διαιθυλοβαρβιτουρικό οξύ.

γ) Τριχλωροξέικο οξύ (T.C.A.).

δ) κουμασίνη (ΨΟΟΜΑΣΣΙΕ ΒΡΙΛΛΑΝΤ ΒΛΘΕ).

ε) Μεθανόλη.

2. Διαλύματα.

α) Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων, PH 7,4:

5 γρ. 5,5 διαιθυλοβαρβιτουρικό οξύ (1β) και 1 γρ. TRIS (1α) διαλύονται σε απεσταγμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 1 LT. Ρυθμίζεται το PH σε 7,4 με προσθήκη (1α) ή (1β).

β) Διάλυμα τριχλωροξέικου οξέος (T.C.A.) 25% (βάρος/όγκο).

γ) Διάλυμα τριχλωροξέικου οξέος (T.C.A.) 12,5% (βάρος/όγκο).

δ) Διάλυμα τριχλωροξέικου οξέος (T.C.A.) 5% (βάρος/όγκο).

ε) Διάλυμα χρωστικής COOMASSIE BRILLANT BLUE 0,1% (βάρος/όγκο):

1 γρ. χρωστικής COOMASSIE BRILLANT BLUE, 500 ML μεθανόλη, 20 ML τριχλωροξέικο οξύ 25% (2β) διαλύονται σε απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 1 LT.

Το διάλυμα διηθείται μέσω ταχείας ροής διηθητικού χάρτου.

στ) Διάλυμα οξέικου οξέος 10% (όγκος/όγκο).

Γ) Προετοιμασία δείγματος τυριού για ηλεκτροφόρηση.

1. Αντιδραστήρια.

α) Διάλυμα ουρίας 8M.

β) 2- Μερκαπτοαιθανόλη.

2. Τεχνική.

«υγίζονται 4 γρ. τυριού, τα οποία διαλύονται σε 20 ML διαλύματος ουρίας 8M (1α). Το διάλυμα παραμένει περίπου 24 H στους 4°C. Ακολουθεί φυγοκέντριση για την απομάκρυνση του λίπους, στις 8.000 στροφές/MIN για 5 MIN. Μετά την απομάκρυνση του λίπους, προστίθενται στο δείγμα 3-4 σταγόνες 2 - μερκαπτοαιθανόλης (1β). Το δείγμα παραμένει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 60 MIN τουλάχιστον, πριν την ηλεκτροφόρηση.

Δ) Ηλεκτροφόρηση.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης DESAGA, DESAPHOR VA 150 με τη χρησιμοποίηση του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροδίων (B2α), σε συνεχή κυκλοφορία, ψυχόμενου στους 5°C και τους πόλους ανεστραμμένους (μαύρο(-) βίσμα κάτω ηλεκτρόδιο, κόκκινο (+) βίσμα πάνω ηλεκτρόδιο).

Πρώτα γίνεται απαέρωση του ρυθμιστικού διαλύματος (B2α). Ακολουθεί προηλεκτροφόρηση με τις πλάκες της πηκτής χωρίς δείγματα, με σταθερή τάση ρεύματος 150V για μια ώρα και στη συνέχεια εισάγονται τα δείγματα στις υποδοχές της πλάκας σε μικροποσότητες (10-50μL). Κατόπιν ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση σε σταθερή ένταση 1,5 MA ανά δείγμα για 16 ώρες.

Ε) Στερέωση και εμφάνιση των ζωνών των παρά-κ-καζεϊνών

1. Στερέωση των πρωτεϊνών.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης γίνεται στερέωση των πρωτεϊνών, με εμφάνιση της πηκτής κατ' αρχήν σε διάλυμα τριχλωροξέικου οξέος 12,5% (B2γ) για 60 λεπτά και στη συνέχεια σε διάλυμα τριχλωροξέικου οξέος 5% (B2δ) για 15 λεπτά.

2. Χρώση των πρωτεϊνών.

Μετά τη διαδικασία της στερέωσης των πρωτεϊνών, γίνεται η χρώση με εμφάνισή τους σε διάλυμα κουμασίνης (B2ε) για 60 λεπτά.

3. Εμφάνιση των πρωτεϊνών.

Ο αποχρωματισμός της πηκτής όπου δεν υπάρχουν ζώνες πρωτεϊνών, γίνεται με οξικό οξύ 10% (B2στ). Γίνονται διαδοχικά ξεπλύματα μέχρι του επιθυμητού βαθμού αποχρωματισμού.

ΣΤ) Μέτρηση των ζωνών της παρά-κ-καζεΐνης

Με τη βοήθεια ενός μετρητικού καταγραφικού οργάνου (SCANNER) μετρείται η οπτική πυκνότητα των χρωματισμένων ζωνών της παρά-κ-καζεΐνης με φίλτρο μήκους κύματος 595 NM, οπότε σε ειδικό χαρτί καταγράφονται οι αντίστοιχες καμπύλες, όταν χρησιμοποιείται η μέθοδος για ημιποσοτική προσδιορισμό.

Ζ) Προφίλ πηκτής πολυακρυλαμιδης μετά ηλεκτροφόρηση παρά-κ-καζεϊνών αγελαδινού και πρόβειου γάλακτος.

αρχή
(+)

██████████ α

██████████ β

██████████ α'

(-)

██████████ β'

παρά-κ-καζείνες
πρόβειου

παρά-κ-καζείνες
αγελαδινού

Παρατηρήσεις

1. Εάν χρησιμοποιηθεί άλλου τύπου συσκευή ηλεκτροφόρησης, προσαρμόζονται ανάλογα οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για την παρασκευή της πηκτής και για ρυθμιστικό διάλυμα των ηλεκτροδίων.

1. Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό νοθείας τυριών με αγελαδινό γάλα, ύστερα από σύγκριση με δείγματα τυριών γνωστής περιεκτικότητας σε γάλα αγελάδας.

Ο Πρόεδρος

Ο Γραμματέας

Στελ. Κατζηγιαννακός

Χαρ. Χαμαλίδης

Τα μέλη: Ευαγγ. Τσιγαρίδας, Αντ. Δασκαλάκης, Παν. Κώττης,
Ευαγγ. Συμβώνης, Διον. Φραγκάτος.

Εγκρίνουμε την παραπάνω απόφαση του Ανωτάτου Χημικού Συμβουλίου καθώς και τη δημοσίευση της στην Εφημερίδα της Κυβερνήσεως και ορίζουμε ότι θα αρχίσει η ισχύς της από την ημέρα που θα δημοσιευθεί.

Αθήνα, 23 Φεβρουαρίου 1988

ΟΙ ΥΠΟΥΡΓΟΙ

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ
ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΩΝ
ΓΕΩΡΓ. ΠΕΤΣΟΣ

ΓΕΩΡΓΙΑΣ
ΓΙΑΝ. ΠΟΤΤΑΚΗΣ

ΕΜΠΟΡΙΟΥ
ΝΙΚ. ΑΚΡΙΤΙΔΗΣ