



**Briefing para
establecer una
técnica que
permita la
cuantificación de
leche de
diferentes
especies en los
quesos de mezcla**

ABRIL 2020

ORGANIZACIÓN
INTERPROFESIONAL LÁCTEA



inLac'

ÍNDICE

1. ANTECEDENTES	2
2. ANÁLISIS DE TÉCNICAS DISPONIBLES	3
2.1. Análisis de proteínas	3
2.2. Análisis de ADN	8
2.3. Análisis de metabolitos. Ácidos grasos	10
2.4. Análisis de las limitaciones de las técnicas estudiadas	13
2.5. Conclusión	16
3. CONTENIDO DE LA PROPUESTA	17
4. PRESENTACIÓN DE PROYECTOS	17

1. ANTECEDENTES

El control de los ingredientes presentes en un producto alimentario ya sea mediante métodos de análisis de presencia/ausencia o, dependiendo del caso, mediante el uso de métodos de cuantificación, es considerado de primordial importancia con el fin de comprobar los valores declarados en la etiqueta.

El Real Decreto 1113/2006, de 29 de septiembre aprueba la Norma de calidad para los quesos. Según esta disposición y la normativa comunitaria relativa al etiquetado de los alimentos (Reglamento (UE) 1169/2011), los quesos elaborados con leche de dos o más especies deberán indicar en su etiqueta las cantidades de cada tipo de leche utilizadas en el momento de su elaboración, o en el caso de utilizar la denominación queso “de mezcla”, los porcentajes mínimos de cada uno de ellos.

La cuantificación de las leches de diferentes especies empleadas en los quesos no es sencilla, ya que depende de varios factores tanto relativos a la composición de la leche de partida, como de los diferentes procesos de fabricación.

Ante esta situación, InLac decidió llevar a cabo una prospección sobre las posibilidades de identificar y cuantificar las distintas leches utilizadas en la elaboración de quesos de mezcla existentes en el mercado, para lo que se contactó con diversos centros de investigación, laboratorios de análisis, centros tecnológicos e incluso laboratorios oficiales. Como resultado de los numerosos contactos realizados y las propuestas recibidas, se llegó a la conclusión de que las técnicas analíticas existentes actualmente para la cuantificación de leches de cabra, oveja y vaca en quesos de mezcla no responden a las necesidades planteadas, siendo necesario disponer de técnicas más potentes y fiables.

En consecuencia y considerándolo de importancia prioritaria y plenamente justificada, InLac quiere llevar a cabo un proyecto de investigación que dé lugar al desarrollo de una técnica que sola o en combinación permitan la detección y cuantificación pretendidas.

2. ANÁLISIS DE TÉCNICAS DISPONIBLES

Según el reglamento de la Comunidad Europea, el método de referencia para la detección de la leche de vaca y caseinato en los quesos elaborados a partir de leche de oveja, de cabra, de búfala o mezclas de leche de oveja, es el enfoque isoeléctrico de las caseínas después de un proceso de plasmólisis (Reglamento (CE) no 273/2008 de la Comisión) y estableció como límite de detección 1% (v/v) de leche de vaca. Por este motivo, los límites de detección de las técnicas utilizadas para la detección de quesos preparados con leche adulterada deberán igualar o sobrepasar estos límites marcados por la Comisión Europea.

Además del método oficial se han desarrollado muchos otros métodos para la detección de adulteración.

A continuación, se presentan las metodologías propuestas que se pueden agrupar en tres categorías atendiendo al tipo de molécula que analizan:

- Métodos **basados en el análisis de proteínas y péptidos**, que incluyen técnicas electroforéticas, cromatográficas e inmunológicas.
- Métodos **basados en la tecnología de ADN** dentro de los cuales podemos incluir PCR-secuenciación, RT-PCR y HRM-RT-PCR
- Métodos **basados en la detección de metabolitos** como los ácidos grasos.

2.1. Análisis de proteínas

La mayoría de las metodologías de identificación de autenticidad de los productos lácteos se basan en análisis de proteínas de la leche, principalmente la familia de las caseínas y lactoglobulinas, aunque la detección de proteínas puede ser en algunos casos obstaculizada por la desnaturalización y la proteólisis de las proteínas de la leche como resultado de tratamientos térmicos y la maduración del queso.

A. **Análisis proteómico cuantitativo mediante MRM (Multiple Reaction Monitoring)**

La metodología de **proteómica dirigida mediante MRM** (Multiple Reaction Monitoring), utilizando cromatografía líquida acoplada a equipos de espectrometría de masas del tipo triple cuadrupolo (LC-QqQ-MS/MS), se trata de una estrategia cuantitativa de elevada sensibilidad y selectividad, que **permite identificar y cuantificar la abundancia de proteínas/péptidos en muestras biológicas complejas a través del análisis de péptidos únicos proteotípicos**. Los resultados no se ven afectados por la conformación de la proteína

y a priori no es dependiente de los factores ambientales (alimentación, pastoreo, zona geográfica, etc..) de la leche de origen, así como tampoco depende del número de células somáticas contenidas en el producto. Los artículos publicados hasta la fecha relatan que las técnicas basadas en proteómica por LC-MS/MS permiten detectar valores inferiores al 1% de leche de vaca respecto al resto de metodologías.

A diferencia de la espectrometría de masas tradicional con un enfoque no dirigido, que intenta detectar todas las proteínas en una muestra biológica de una manera general, la MRM es altamente selectiva (targeted), lo que permite buscar específicamente péptidos o analitos de interés (por ejemplo, un candidato a biomarcador para cada una de las principales especies de leches utilizadas en la elaboración de quesos).

Los análisis MRM se basan en la selección de péptidos trípticos específicos como representantes estequiométricos de las proteínas de las que se escinden. Los péptidos trípticos se cuantifican utilizando un patrón interno marcado (un péptido marcado con un isótopo estable sintético) para dar una medida de la concentración de proteína. Esto permite evaluar el rendimiento de cada ensayo para determinar los límites de detección/cuantificación y la linealidad. Por lo tanto, los métodos MRM requieren el conocimiento de las secuencias de proteínas, las masas de los péptidos seleccionados y de sus iones fragmento.

La espectrometría de masas mediante la técnica de MRM, proporciona una alternativa al ELISA y a otros análisis basados en anticuerpos, basándose en la potencia de discriminación de los equipos de espectrometría masa para seleccionar un analito específico y determinar su concentración.

En el caso concreto de productos lácteos ha sido aplicada para investigar la posibilidad para diferenciar las 4 especies más importantes de la industria lechera italiana (vaca, búfalo, oveja y cabra) (Bernardi 2015) y para la autenticidad de origen del queso Parmigiano Reggiano (Popping 2017). En un estudio de Bernardi et al. (2015) se detectaron péptidos específicos en la leche para usar como biomarcadores en productos queseros (solamente a efectos cualitativos). Ni el envejecimiento ni el método de producción parece afectar la respuesta, lo que demuestra que los péptidos elegidos actúan como marcadores de especies para los productos lácteos. Recientemente, en el trabajo de Popping et al. (2017) se combina un poderoso análisis con estadísticas avanzadas y numerosos parámetros evaluados. Este

modelo especialmente tiene en cuenta el proceso de producción, el origen geográfico, así como el tipo de animal para evaluar la autenticidad del queso estudiado.

B. Análisis proteómico por matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS)

La espectrometría de masas del tipo MALDI-TOF-MS es una técnica analítica rápida, de fácil manejo, capaz de detectar moléculas pequeñas y grandes. En un experimento por MALDI-TOF, se pulsa un láser sobre una placa metálica sobre la que se seca una pequeña cantidad de analito y de matriz absorbente de UV. Al absorber la energía, la matriz y el analito se cargan y se volatilizan, acelerándose en el tubo de vuelo donde se separan basándose en la relación de masa/carga. La alta resolución del MALDI-TOF en el rango de bajo peso molecular permite la detección de moléculas pequeñas como pueden ser los péptidos o proteínas únicos que permiten identificar a proteínas de diferentes especies.

Un **análisis proteómico dirigido** a la detección de péptidos específicos de distintas clases de proteínas de la leche como la α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, o las caseínas, como marcadores moleculares de las distintas especies que pueden estar presentes en los quesos de mezcla mediante ionización MALDI en equipos de espectrometría de masas del tipo MALDI-TOF es una técnica similar a la proteómica dirigida por MRM.

C. Técnicas basadas en Electroforesis

La electroforesis es una técnica común para el estudio de proteínas, incluidas las proteínas lácteas. Las proteínas lácteas se separan en dos fracciones, las caseínas y las seroproteínas. Las dos fracciones contienen proteínas específicas para las diferentes especies lecheras, que permite su discriminación mediante técnicas electroforéticas.

Un método oficial descrito en el Real Decreto 1533/1991, es el análisis electroforético de las beta-lactoglobulinas y alfa-lactalbuminas, que presentan movilidades electroforéticas diferentes para leche de vaca, oveja y cabra. Bandas características permiten tanto la cuantificación de leche de vaca en quesos de cabra, oveja y mezcla, como la detección de leche de cabra en quesos de oveja en los rangos menor del 5 %, entre 5 y 10 %, entre 10 y 20 % y mayor del 20 %. Una mayor exactitud se obtuvo analizando las seroproteínas con electroforesis capilar (Herrero-Martínez et al., 2000). Sin embargo, el análisis de las seroproteínas tiene la desventaja que la mayor parte se pierde con el suero durante la elaboración de los quesos. Otro problema mayor es la sensibilidad de las seroproteínas a

tratamientos térmicos, que puede resultar en falsos negativos. Esto hace una cuantificación en quesos poco fiable, ya que no permite cuantificar leche añadida, si esta ha sido tratada térmicamente.

El método de referencia de la Unión Europea (EC 273/08) para el análisis de la composición de queso en relación con las leches iniciales, se basa en la detección de la gamma-caseína bovino (producto de la digestión enzimática de las beta-caseínas), que se diferencian de las gamma-caseína ovino/caprino mediante su punto isoeléctrico. Con este método se llega a determinar concentraciones de leche de vaca hasta 1% en quesos de oveja, cabra o mezcla. Sin embargo, no se puede diferenciar entre cabra y oveja. Las limitaciones del método de referencia están en que la cuantificación se basa en el análisis densiométrico de las bandas correspondientes a las gamma-caseínas en los geles de poliacrilamida, siendo poco preciso y permitiendo en la mayoría de los casos solamente una estimación semicuantitativa. Recientemente, se ha realizado un estudio validando el método de referencia para fines cuantitativos, demostrando su adecuación para leche de vaca cruda y tratada térmicamente en quesos puros de oveja o cabra y de mezcla (Mikulec, 2013).

D. Isoelectroenfoque de proteínas (IEF) + MS

Análisis de la separación de las proteínas de la leche mediante isoelectroenfoque (método de referencia EC Reg. 273/2008) combinado con la determinación y cuantificación por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

El enfoque isoeléctrico (IEF) de caseínas se basa en el método descrito para la determinación de cantidad de leche bovina en quesos de mezcla mediante el enfoque isoeléctrico en gel de poliacrilamida, en tiras comerciales de gradientes de pH inmovilizado, según la referencia EC Reg. 273/2008, y se presenta como adecuado no solo para la detección de leche de vaca, sino también para una estimación del porcentaje de leche de vaca en las variedades de queso de leche mixta.

Las ventajas de este método son que es de fácil manejo y buena reproducibilidad por aplicación de anfolitos con alta concentración de urea. El método incluye (i) recuperación de proteínas de queso; (ii) hidrólisis de proteínas de queso con plasmina; (iii) separación por enfoque isoeléctrico a pH 3-10 de las gamma-caseínas de distintas especies (bovina, ovina, caprina, de búfalo...) según sus diferentes puntos isoeléctricos.

E. Técnicas basadas en anticuerpos o sondas de ADN (ELISA, Bioplex, Biosensores)

La especificidad de los métodos inmunológicos los hace ideales para la detección de fracciones específicas de proteínas de la leche proveniente de diferentes especies. De entre todas las técnicas inmunológicas la técnica de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assays) puede ser adaptada a un gran número de formatos. Dependiendo del modo en que los antígenos o anticuerpos pueden ser detectados o cuantificados. Por ejemplo, en un ensayo directo el analito se enlaza a una superficie sólida y es detectado por la adición de un anticuerpo marcado. En un ELISA indirecto el analito enlazado a la superficie sólida es detectado mediante un anticuerpo que se unirá a un anticuerpo secundario el cual estará marcado. Una variante del ELISA directo es el conocido como ensayo tipo sándwich. En este tipo de ensayo un anticuerpo se unirá a la superficie sólida con el fin de capturar al analito, que seguidamente será detectado por un anticuerpo secundario marcado capaz de detectar un epítipo diferente del analito. Otro tipo de ensayo ELISA es conocido como ensayo competitivo que puede ser tanto directo como indirecto. En los ensayos competitivos un antígeno inmovilizado o en solución entra en competición con los epítopos enlazantes del anticuerpo.

La tecnología ELISA es una técnica analítica robusta, rápida, barata y fácil de usar, no obstante, estos procesos pueden fallar dependiendo del estado de proteólisis producido durante el proceso de maduración, o desnaturalización de las proteínas de la leche como consecuencia del tratamiento en calor.

Las caseínas son proteínas relativamente estables a la temperatura y estas son como antígenos utilizados en ELISA para la detección de leche adulterada tratada a altas temperaturas. No obstante, un gran número de antígenos han sido utilizados incluyendo caseína (b-caseínas o c-caseínas), b-lactoglobulinas, inmunoglobulina G (IgG), u otras proteínas del suero. El tipo de anticuerpo utilizado podrá afectar también tanto el límite de detección, como la especificidad. Por este motivo podemos encontrar anticuerpos policlonales que son menos específicos que los monoclonales. No obstante, tanto unos como los otros han sido utilizados de manera satisfactoria y todos ellos alcanzaron los límites marcados por la comunidad europea del 1% (v/v). El objetivo de estos inmunoensayos es el de mejorar la sensibilidad y algunos de ellos lo han conseguido mejorar hasta 10 veces, pero solo un ensayo comercial basado en IgG es capaz de detectar la adulteración con la leche de

vaca de leche de cabra, oveja y búfalo. Además, estudiando los parámetros de especificidad y sensibilidad es capaz de establecer la calidad de la leche adulterada que ha sido tratada a altas temperaturas.

F. Técnicas basadas en LC/MS-ELISA

La combinación de LC-MS/MS como método de referencia y ELISA de la Caseína como método de rutina ofrecería la solución más completa para toda la cadena de valor. La situación ideal sería que ambas técnicas compartiesen los mismos targets. Esto debería ser justamente uno de los objetivos del proyecto, pero tiene ciertas limitaciones.

Las técnicas proteómicas actuales permitirían la detección de especies, pero la cuantificación requiere de patrones específicos que deberían ser desarrollados (marcaje isotópico) y usados como patrón interno en el ensayo. Para uso en la industria sería interesante disponer de sistemas rápidos tipo tira inmunocromatográfica que permitiesen obtener resultados semi-cuantitativos e incluso cuantitativos. Pero esta tecnología todavía no ha sido desarrollada para esta aplicación.

2.2. Análisis de ADN

Otra posibilidad para la autenticación de productos lácteos, son el conjunto de enfoques basados en el ADN. Particularmente, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que se utiliza para la detección específica del origen animal de la leche y de los quesos.

Las células lácteas somáticas, principalmente los leucocitos, persisten durante los procesos de elaboración del queso y pueden usarse como una fuente de ADN amplificable (Diaz et al., 2007).

Actualmente las técnicas basadas en el análisis de ADN han avanzado considerablemente y es posible analizar de manera masiva distintos amplicones de diversas muestras mediante los equipos de Next Generation Sequencing (NGS).

A. PCR Y MÉTODOS MOLECULARES: RT-PCR, RT-PCR multiplex; HRM-RT-PCR

La técnica de PCR en tiempo real (RT-PCR) está ampliamente aplicada a la detección cualitativa de diferentes especies animales en alimentos. Se ha convertido en el método más fiable de investigación sobre adulteración, ya que utilizando este método el tipo de precisión llega hasta el 0,1% pudiendo ser capaz de identificar diferentes leches de origen en queso,

aunque se encuentren en proporción muy baja. Pero pocos estudios discuten el potencial para la cuantificación de ADN de las tres especies de cuestión.

La amplificación específica de fragmentos de ADN consiste en la copia reiterada de determinadas regiones cortas del ADN para las cuales se diseñan sondas o cebadores que impulsan su amplificación. El diseño de estas sondas se realiza para que cada una de ellas identifique regiones de ADN exclusivas de cada especie. De este modo y en las condiciones adecuadas, estos cebadores producen la amplificación de la región específica si en la muestra se encuentra presente la especie para la cual han sido diseñados. Para poder observar y sobre todo, cuantificar esta amplificación, se propone la PCR en tiempo real (RT-PCR). En esta técnica, se usan moléculas fluorescentes, cuya fluorescencia aumenta a medida que la PCR se va desarrollando y permite cuantificar los fragmentos de ADN sometidos a estudio. Estas moléculas fluorescentes pueden ser sondas Taqman o la molécula SYBR Green.

A la técnica de PCR a tiempo real se puede añadir el uso del análisis de fusión de alta resolución (HRM, del inglés High Resolution Melting). Este método es simplemente un calentamiento preciso del amplicón de ADN desde los 50 °C hasta alrededor de 95 °C. En algún momento durante este proceso, se alcanza la temperatura de fusión del amplicón y las dos cadenas de ADN se separan o "se funden". La temperatura de fusión del amplicón en el que se separan las dos cadenas de ADN depende de la secuencia de las bases de ADN, por lo que si el ADN de origen es una mezcla de diferentes especies se podrá detectar. Este proceso se puede monitorizar utilizando fluoróforos que se intercalan en el ADN.

El diseño de cebadores y sondas específicas permite la diferenciación clara incluso en matrices complejas y mezcladas como son los alimentos. Los estudios existentes incluyen la aplicación de esta técnica a la identificación de especies productoras de leche, como ovino, caprino y bovino. Muchos de los trabajos tienen como objetivo la detección de la adición fraudulenta de leche de una especie de menor valor, como por ejemplo la adición de leche de vaca a leche de oveja o búfala. En este sentido, la PCR en tiempo real ha sido aplicada con éxito a la detección de leche de vaca en queso mozzarella procedente de leche de búfala. Se pueden desarrollar métodos de multiplificación o múltiplex que realiza la amplificación simultánea de múltiples dianas de ADN en una única reacción. Este multiensayo permite reducir el tiempo, los reactivos y la cantidad de muestra necesarios para obtener el resultado. Tal y como describen mediante un artículo en CETAL (Golinelli et al., 2014), se

podría identificar en una misma reacción la presencia de dos especies diferentes amplificando el ARN ribosomal 12S mitocondrial.

Además de la opción de identificar la presencia de la especie(s) adulterada(s), también puede cuantificarse la proporción de leche ajena añadida durante el proceso de elaboración del queso en relación con la leche auténtica, mediante la técnica RT-PCR. En un estudio reciente, se ha descrito un límite de cuantificación (LOQ) de 2% [w/w] de leche de vaca en la leche de búfala utilizando amplificaciones del gen del citocromo b. Para poder llevar a cabo la cuantificación, se elaboran quesos utilizando mezclas de leche de proporciones relativas controladas entre dos especies, (por ejemplo 50%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, y 0,1%), y esta composición conocida se usa como material de referencia para extrapolar la proporción en las muestras de estudio. El resultado, se normaliza con la cantidad de ADN total para hacer la determinación con precisión y exactitud, y corregir las posibles desviaciones entre la cantidad de ADN real y medida causada por diferencias biológicas entre especies.

2.3. Análisis de metabolitos. Ácidos grasos

Otros trabajos muestran la idoneidad de realizar estudios de perfiles de ácidos grasos debido a las diferencias existentes entre ellos en las diversas especies lecheras. La cuantificación de los perfiles de ácidos grasos se utiliza ampliamente en la tipificación de los diversos tipos de grasas utilizadas en la industria alimentaria. Este tipo de estudios se realizan con frecuencia para diferenciar, sobre todo, si las matrices grasas son de origen lácteo, animal o vegetal utilizando técnicas como la cromatografía de gases o de líquidos acoplada a espectrometría de masas.

Aunque los perfiles de ácidos grasos son característicos en la leche para cada especie no resulta fácil realizar su cuantificación, ya que es necesario saber los porcentajes de grasa existentes en la leche de cada especie antes de la elaboración del queso. Con este tipo de métodos solo se podría hacer una identificación y cuantificación de la grasa por lo que en aquellos quesos en los que se añade únicamente nata de una especie conjuntamente con otras leches estaríamos sobreestimando la proporción de leche presente de esa especie. Aun así, es un método que se utiliza en el control industrial debido a su fiabilidad si se conocen con exactitud los procesos previos a la elaboración del queso.

A. Análisis lipidómico

Análisis cuantitativo y dirigido a la detección de distintas clases de lípidos como los triacilglicéridos (TAGs), la composición de sus ácidos grasos y los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) de las distintas especies que pueden estar presentes en los quesos de mezcla mediante cromatografía líquida y/o cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (LC-MS, GC-MS).

La MS es una técnica cuantitativa de elevada sensibilidad y selectividad; con tiempos de procesado de muestra y de análisis instrumental rápidos. Los TAGs constituyen más del 98% de las grasas de la leche y por tanto se puede centrar el modelo en estos compuestos. Se han realizado aproximaciones en el análisis tanto con la muestra hidrolizada a través de medida de los ácidos grasos por GC-MS como no hidrolizada a través de la medida de los TAGs por LC-MS. A su vez, también se han realizado aproximaciones con la medida de SCFAs por GC-MS.

Los perfiles de ácidos grasos de los quesos examinados por GC-MS han demostrado que los quesos de leche de cabra y de oveja exhiben un patrón de ácidos grasos de longitud de cadena característicamente inferior diferente a los quesos de leche de vaca. La relación media de ácido láurico: ácido cáprico (12:10) se podría utilizar para determinar la presencia de leche de vaca en quesos marcados con leche de cabra o de oveja. La relación se hace proporcionalmente mayor con una mayor sustitución de la leche de vaca en vez de leche de cabra o de oveja en la fabricación de los quesos.

La determinación de la composición de ácidos grasos para la detección de adulteración en la grasa de la leche se basa en la ISO 15885 / IDF 184 e ISO 15884 / IDF182. Los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) de la grasa de la leche se preparan mediante metanólisis catalizada por bases de los glicéridos.

Los aspectos para mejorar de la técnica, es que el contenido en lípidos está altamente condicionado por varios factores tales como: la raza del animal, la alimentación, la estación del año, el clima y la zona geográfica. Hasta la fecha, la aproximación basada en el análisis de lípidos se ha centrado más en la adulteración de leches crudas que en sus productos derivados, como el queso. En estos casos se ha visto que su perfil lipídico es dependiente del refinado de la leche (modificaciones por interesterificación e hidrogenación). Los modelos

realizados hasta la fecha solo permiten detectar la presencia de leche de vaca en el resto, a partir de un 15 %.

Para la autenticación y cuantificación de los porcentajes sería necesaria la realización de un modelo quimiométrico complejo que requeriría del análisis de un gran número de muestras para cubrir todas las variables comentadas con anterioridad.

B. Análisis metabolómico mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN o NMR en inglés) es una técnica basada en la excitación de los núcleos atómicos de ^1H , ^{31}P , ^{13}C o ^{19}F para la caracterización molecular de los compuestos de bajo a medio peso molecular. La RMN es reconocida como una de las principales técnicas para análisis de metabolitos y pequeñas moléculas en muestras biológicas, permitiendo una visión completa de los metabolitos de los productos alimenticios y, junto con un análisis estadístico adecuado, puede proporcionar resultados relevantes en términos de calidad de los alimentos, origen geográfico, procesamiento, seguridad de la materia prima...

Los análisis de los espectros de RMN de protón (^1H -RMN) de los alimentos pueden detectar la presencia de muchos compuestos y permiten su cuantificación, mediante la aplicación de distintas aproximaciones con experimentos 2D, 1D, experimentos selectivos, experimentos de adición estándar, y la comparativa con bibliotecas espectrales.

La huella metabólica se utiliza para la clasificación de las muestras, sin cuantificación de los metabolitos específicos individuales: En este caso, el espectro de RMN puede considerarse como una huella dactilar del alimento y todas las resonancias de RMN se miden sin ninguna identificación.

Los aspectos para mejorar de la técnica, es que la espectroscopia de ^1H -RMN aplicada directamente al estudio de la leche presenta una gran interferencia por la señal proveniente del agua, que es el componente principal de la leche, pero esto se verá reducido en el análisis de los quesos. Además, otro problema es la relativa baja sensibilidad que junto con la falta de preparación y/o separación de la muestra no hacen adecuada la técnica para la detección de adulteraciones/contaminantes en bajas concentraciones. Sin embargo, se puede solventar utilizando espectroscopia complementaria de ^{13}C -RMN y ^{31}P -RMN y haciendo un pretratamiento de extracción de triacilglicerolos, eliminación de grasa e iones metálicos y/o ajuste del pH. Los estudios de ^{31}P -RMN han permitido determinar un fosfoglicérido

específico relacionado con diferentes procesos de almacenamiento de la leche; mientras que el ^{13}C -RMN ha proporcionado una discriminación entre las leches de diferentes especies, examinando su composición de ácidos grasos, azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos.

El uso de ^1H -RMN en estudios de la leche entera sin pretratamiento ha sido reportado utilizando una aproximación de experimentos 2D para asignar las señales en extractos acuosos de queso del ácido butírico, cadenas de ácidos grasos mono y poliinsaturados, lactosa, citrato, N-acetil carbohidratos y lecitina.

Para la autenticación y cuantificación de los porcentajes sería necesaria la realización de un modelo quimiométrico complejo que requeriría del análisis de un gran número de muestras control para cubrir todas las variables comentadas con anterioridad.

C. Análisis elemental de la composición de isótopos estables

Este método incluye el análisis de una combinación de isótopos elementales estables de leche y queso de vaca, cabra y oveja para identificar los modelos que permitan distinguir entre leche y quesos de distintas especies y discriminar la leche y los quesos de acuerdo con su lugar de procedencia.

Habría que caracterizar la leche y los quesos españoles mediante el uso de una combinación de diferentes ratios de los bioelementos ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$) y su composición elemental. Este tipo de estudio podría permitir diferenciar la leche y los quesos de acuerdo con la especie animal y su origen geográfico (clasificación DA).

2.4. Análisis de las limitaciones de las técnicas estudiadas

A. Limitaciones comunes a todas las técnicas

- Ausencia de patrones de referencia normalizados y válidos para cualquier técnica (ELISA, PCR, LC-MS/MS). Se ha de asumir que se trata de una referencia “representativa” ya que siempre puede haber excepciones.
- Nivel de maduración del queso (ESM). Tras la fabricación el queso va perdiendo agua y por lo tanto hay que normalizar la medida analítica respecto al contenido de agua del queso, o bien hacerlo con respecto a un control interno común a todas las especies. Q. Ibérico $\geq 55\%$ ESM. Esta limitación no se aplica en el caso del análisis del ADN.
- Establecer rango de trabajo adecuado ($\geq 15\%$ LO/LC; $< 50\%$ LV).

- Entre las limitaciones de todas las técnicas se deberían buscar biomarcadores que no estén presentes en el suero.

B. Limitaciones a las técnicas basadas en proteínas/péptidos

Cuando se elaboran quesos se produce una pérdida de proteínas en el suero lácteo además de otros componentes que harán variar la composición molecular del queso con relación a las leches originales. Estas variaciones son de especial interés cuando se utilizan métodos de electroforesis de proteínas séricas, ya que una buena parte de ellas se eliminan en el desuerado. Puede haber otras proteínas que se pierdan en ese proceso, además de células somáticas. Estas últimas, no siempre se pierden en las mismas proporciones en las diferentes especies.

También es necesario tener en cuenta que muchos quesos se elaboran a partir de leches pasteurizadas o son sometidos a procesos térmicos en su proceso de elaboración por lo que los perfiles proteicos pueden verse alterados. Por esta razón, la utilización de métodos proteómicos en esta clase de quesos podría no ser de utilidad.

Para las técnicas basadas en la detección de proteínas, se debe considerar que el target debe ser:

- Péptidos de regiones no variables en la caseína (variantes genéticas).
- Péptidos no procedentes del GMP (k-caseína)..
- Péptidos >12-20 aa (para ELISA). Péptidos son poco inmunogénicos pero se puede aumentar su inmunogenicidad conjugándolos a otras proteínas “carrier” que sean inertes (KLH). Existen otras estrategias posibles para demostrar la funcionalidad, aunque idealmente habría que hacer Mabs.
- Péptidos fácilmente ionizables y proteotípicos (para MS). Mínimo >6 aa, más grandes aumentan la especificidad, pero no excesivamente grandes ya que baja la sensibilidad de la técnica. (Problemas: hidrolisis del ácido aspártico, oxidación de la metionina y deamidación de glutamina en condiciones básicas). Péptidos con una longitud superior a 20 aminoácidos son eliminados, debido al coste que supone su síntesis química y a la dispersión iónica que se produce con la carga múltiple de iones. Por otra parte, péptidos con un tamaño inferior a 6 aminoácidos no se usan por presentar poca especificidad.

- Idealmente sería necesario más de 1 péptido por especie, y al ser péptidos sin modificaciones por marcajes tienen un coste asequible.
- La normalización de las cuantificaciones de estos targets proteicos va a depender de la concentración de dichas moléculas en la leche original (además de otros factores como las pérdidas por desuerado, hidrólisis por proteasas endógenas y de los m.o. fermentadores, etc) pero se ha de tener en cuenta que el contenido en proteína es diferente entre las especies. Para esto se podría aplicar un factor corrector para cada especie (asumiendo que el porcentaje de proteína se mantiene bastante constante...).

C. Limitaciones a las técnicas basadas en ADN

Todos los métodos de identificación y cuantificación de especies basados en ADN dependen del contenido en células somáticas, se puede encontrar escenarios en los que la leche de vaca contenga un bajo número de células somáticas y las de oveja y cabra el máximo, por lo que proporcionalmente, o incluso literalmente, la cantidad de ADN será mayor en la especie que contenga más células. Este hecho sugiere la necesidad de estudiar como de importante es tener la información del número de células somáticas existentes en cada tipo de leche utilizada para la elaboración del queso.

Uno de los factores que más varía en los quesos es la cantidad de células somáticas presentes en la leche de partida. Con la actual legislación española el número de células somáticas en cada mililitro en leches de vaca destinadas a productos lácteos puede tener un máximo de 500.000, mientras que en cabra y oveja puede tener un máximo de 1.000.000. Los factores que influyen en la cantidad de células somáticas pueden ser estacionales, individuales, estar relacionados con mastitis, etc.

D. Limitaciones a las técnicas basadas en metabolómica

La cantidad de grasa presente en la leche puede variar en función de la época del año, del tipo de alimentación entre otros. Esta gran variación obliga a tener información previa sobre la cantidad de materia grasa presente en la leche de partida si se quiere utilizar este método como formato de cuantificación.

2.5. Conclusión

En la parte analítica, la mayor dificultad para realizar una cuantificación de las proporciones iniciales de las diferentes leches que componen el queso consiste en encontrar un biomarcador adecuado. Este biomarcador debería ser cuantificable en el producto final reflejando las proporciones iniciales de las leches con las que se elaboraron los quesos. En realidad, este caso nunca será el esperado debido a las variaciones interespecíficas e intraespecíficas que se dan en la leche. Así mismo, existen también importantes diferencias en el rendimiento quesero que imposibilitan la obtención de un biomarcador estándar aplicado a producto final.

Las distintas metodologías varían en su complejidad y coste y ambos factores pueden influir en la adopción rutinaria por laboratorios de control de alimentos e incluso en su uso en un ámbito más general y no tan restringido al entorno científico. Para la autenticidad de los productos lácteos, como los quesos, no sólo es importante la identificación del tipo de leche, sino también la cantidad de cada tipo de leche, y en ese caso las técnicas de cromatografía y la espectrometría de masas parecen las más apropiadas. En algunos casos, pues, la combinación de más de una técnica puede ser una estrategia definitiva para la autenticación y cuantificación del origen animal de la leche y productos derivados. Sin embargo, antes de que esto pueda ocurrir, se necesitaran procesos estrictos de validación de la fiabilidad y reproducibilidad de tales protocolos.

La realización de un estudio completo tendrá en cuenta el gran interés de combinar diferentes técnicas, como por ejemplo las basadas en el análisis del ADN, proteínas y metabolitos.

Las técnicas de ADN se basan en la detección de moléculas muy estables térmicamente por lo que permiten realizar análisis en alimentos que han sido procesados o sometidos a altas temperaturas, aunque se debe tener precaución en su uso como método cuantitativo, debido a que el ADN deriva de las células somáticas de las leches, el número de las cuales puede variar dependiendo de muchos factores.

Por otra parte, la aplicación de técnicas exploratorias para encontrar nuevos biomarcadores proteicos o peptídicos puede ser interesante, al igual que el análisis general de ácidos grasos. En ambos abordajes la aplicación de metodologías de análisis quimiométricas puede describir nuevas moléculas que pueden ser usadas como biomarcadores.

Estos biomarcadores al igual que otras moléculas que puedan estar ya descritas en bibliografía, pueden finalmente facilitar el desarrollo de procedimientos de screening dirigido para el control de la calidad de los quesos, ya sea con técnicas de ELISA (incluyendo los sistemas de multidetección) o con métodos basados en biosensores.

3. CONTENIDO DE LA PROPUESTA

El objetivo es desarrollar una técnica para CUANTIFICAR el porcentaje de leche de cada especie en un queso, por lo que la propuesta debe contener:

- Una propuesta tecnológica en base a una bibliografía justificando porqué se considera esta técnica o combinación de técnicas como la más adecuada.
- Una propuesta de estudio de esta tecnología incluyendo:
 - Elaboración de una serie de muestras de queso con diferentes porcentajes conocidos de cada leche y periodos de maduración sobre los que se realizaran los ensayos.
 - Número de muestras que se analizaran para que pueda considerarse el ensayo y los resultados estadísticamente significativos.
 - Análisis de si la maduración de los quesos afecta al resultado.
 - Análisis de las muestras de queso con la técnica propuesta comprobando si los resultados obtenidos se corresponden con el porcentaje utilizado, y por tanto si la técnica utilizada es válida para cuantificar el porcentaje de cada leche utilizada en la elaboración del queso.
 - Cálculo del margen de error de la técnica.
- Presupuesto para realizar el estudio.
- Plazo y calendario de ejecución
- Aproximación del coste que supondría esa técnica para analizar quesos comerciales.
- Breve resumen de la experiencia del equipo de investigación en este campo.

4. PRESENTACIÓN DE PROYECTOS

Las propuestas deben remitirse al correo electrónico de InLac (inlac@inlac.es) antes de las **14:00h del día 26 de junio 2020**.