

ARTÍCULO

“Desarrollo de un método para la cuantificación de leches de diferentes especies en quesos de mezcla”

Autores:

Pedro Razquin, Luis Mata. ZEULAB.

Alberto Paradela, Laura Guerrero. Centro Nacional de Biotecnología-CSIC.

Colaboradores:

Laboratorios Arroyo: Los quesos patrón desarrollados en este proyecto como material de referencia fueron fabricados por Laboratorios Arroyo.

Entrepinares, Lactalis, Montesinos y Reny Picot: Los quesos comerciales han sido aportados por los anteriores fabricantes.

Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA): Se ha firmado un convenio con el MAPA para verificar, validar y normalizar, a través del Laboratorio Arbitral de Santander, como laboratorio oficial del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, nuevas técnicas de análisis identificadas por ambas partes.

InLac: Este proyecto se ha realizado gracias a la financiación de la Organización Interprofesional Láctea (InLac).

Se agradece a todos los miembros implicados en este proyecto su colaboración activa y el asesoramiento durante el desarrollo del método.

ANTECEDENTES

Los quesos de mezcla de leche de diferentes especies son producidos principalmente en países mediterráneos como España, Francia, Italia o Grecia y algunos de ellos están protegidos por denominaciones de origen o indicaciones geográficas, lo que les otorga un valor añadido hacia el consumidor. En España el 40% del queso que se produce es queso de mezcla. La elaboración y etiquetado de estos quesos en España está regulada por diversas normas que se resumen a continuación:

- **Real Decreto 1113/2006. Normas de calidad para quesos y quesos fundidos.** “Los quesos elaborados con mezcla de leches de distintas especies que utilicen la denominación «Queso de mezcla», indicarán las especies animales, de las que proceda la leche empleada, en orden decreciente de sus pesos en el momento en que se incorporen durante el proceso de fabricación del producto, acompañadas de sus porcentajes mínimos presentes en la mezcla”.
- **Real Decreto 818/2015**, de 11 de septiembre, por el que se modifican los anexos I y II del Real Decreto 1113/2006, de 29 de septiembre, por el que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos, y por el que se modifica la disposición transitoria segunda del Real Decreto 4/2014, de 10 de enero, por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibérico.
- **Real Decreto 262/2011. Norma de composición y características específicas para el queso “Ibérico”.** Requisitos de composición: leche de vaca, máximo 50 %; leche de cabra, mínimo 15 %; leche de oveja, mínimo 15 %.
- **Reglamento (UE) nº 1169/2011 sobre la información alimentaria al consumidor.** Establece la indicación cuantitativa de los ingredientes en la etiqueta: “se expresará en un porcentaje que corresponda a la cantidad del ingrediente o de los ingredientes en el momento de su utilización”

A todo esto, hay que sumar algunos requisitos incluidos en los respectivos pliegos de condiciones de las Denominaciones de Origen Protegidas (D.O.P) y las Indicaciones Geográficas Protegidas (I.G.P) de quesos de mezcla (Flor de Guía, Quesucos de Liébana, Cabrales, Gamoneu, etc.) que suelen ser mucho menos específicos en cuanto a la composición por especies.

Actualmente no existe un método analítico que permita cuantificar de forma fiable el porcentaje de mezclas de leche en quesos. Por lo tanto, la disponibilidad de un método para este propósito puede ser de alto valor para el desarrollo de programas de protección de la calidad de los quesos tipo ibérico.

OBJETIVO DEL PROYECTO

Ante esta necesidad, la Organización Interprofesional Láctea (InLac) decidió llevar a cabo un proyecto de I+D+i con el objetivo de desarrollar una técnica de cuantificación de leches de diferentes especies en quesos que pudiese ser aplicada por los laboratorios de análisis.

PRINCIPIO DE LA TÉCNICA

La técnica analítica utilizada es un método de proteómica dirigida denominado PRM (Parallel Reaction Monitoring) y emplea cromatografía líquida acoplada a equipos de espectrometría de masas del tipo Orbitrap (LC-Q-Orbitrap-MS/MS). Esta técnica permite identificar y cuantificar la abundancia, bien de manera relativa o absoluta, de proteínas presentes en una muestra compleja a través de la monitorización selectiva de fragmentos de dichas proteínas o péptidos. Cuando estos péptidos son específicos de proteína y/o especie se denominan proteotípicos y se pueden considerar la “huella digital” de la leche de cada especie utilizada. Por lo tanto, su detección certifica la presencia de la leche correspondiente en la composición del queso analizado. Se trata de una técnica de elevada especificidad, una gran sensibilidad y un elevado rango dinámico de detección. Además, es independiente del estado de la muestra, pudiendo trabajar con proteínas desnaturalizadas.

En consecuencia, el método desarrollado es capaz de determinar, en términos de proteína, la cantidad de leche de cada especie en las muestras de queso. Todos los resultados de cuantificación se presentan en unidades de proteína (porcentaje de proteína de cada especie respecto al total).

RESULTADOS DEL PROYECTO

Determinación de péptidos proteotípicos:

Los ensayos iniciales realizados permitieron identificar entre 150-200 proteínas y 1.100-1800 péptidos, según la especie considerada. A partir de esta información inicial, los péptidos

identificados correspondientes a las proteínas mayoritarias de la leche fueron filtrados en primer lugar en base a un criterio de especificidad (proteína y especie), y posteriormente de idoneidad experimental. Sucesivas rondas permitieron seleccionar una serie de péptidos proteotípicos de valor analítico para el método desarrollado: Vaca (4 péptidos); Oveja (3 péptidos); Cabra (2 péptidos).

Fabricación de los quesos patrón utilizados como material de referencia

Durante el proyecto se fabricaron 3 quesos de mezcla ternaria y 3 quesos puros con la siguiente composición:

- 10% Leche de oveja; 10% Leche de cabra; 80% Leche de vaca
- 20% Leche de oveja; 20% Leche de cabra; 60% Leche de vaca
- 30% Leche de oveja; 30% Leche de cabra; 40% Leche de vaca
- 100% Leche de vaca
- 100% Leche de cabra
- 100% Leche de oveja

Dichos quesos fueron elaborados en condiciones controladas utilizando leche de tres especies cuya composición se determinó mediante procedimientos normalizados en un laboratorio acreditado (ISO/IEC 17025). Los quesos elaborados fueron llevados a maduración en 3 periodos: 1, 3 y 6 meses en cámara con condiciones ambientales controladas.

Estos quesos se mantienen en las condiciones adecuadas para disponer de un banco de muestras. Por lo tanto, a efectos de este estudio dichos quesos se han considerado materiales de referencia (RM).

Método proteómico dirigido en formato PRM para la cuantificación de mezclas

El método desarrollado de cuantificación consta de 3 etapas:

- Método de extracción y digestión de proteínas del queso.
- Cuantificación de los péptidos proteotípicos en formato PRM.
- Método de interpretación de datos y obtención de resultado



Aplicación del método: análisis de quesos con el método desarrollado

Los estudios de aplicabilidad del método desarrollado se realizaron tanto con la serie de los 6 quesos patrón con una maduración entre 1 y 6 meses y con 13 quesos comerciales suministrados por varios fabricantes. En este último caso, la maduración de estos quesos osciló entre 1 y 11 meses.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en los quesos comerciales:

MUESTRA QUESO	COMPOSICIÓN PROTEÍNA			RESULTADO LC-MS/MS		
	% vaca	%oveja	%cabra	% vaca	%oveja	%cabra
1	69	11	20	76	10	14
2	83	9	8	83	10	6
3	58	42	0	57	43	0
4	82	11	7	86	9	5
5	56	28	16	59	28	13
6	58	28	13	69	23	8
7	57	27	16	61	28	11
8	58	28	15	65	23	12
9	56	28	16	65	23	12
10	57	28	15	64	25	11
11	56	29	15	66	24	10
12	0	59	41	0	61	39
13	0	70	30	0	73	27

Tabla. Análisis mediante proteómica dirigida de 13 quesos comerciales. Las columnas 2, 3 y 4 indican el porcentaje de la leche de cada una de las especies empleadas para su fabricación en términos de proteína (%). Las columnas 6,7 y 8 recogen los resultados obtenidos tras el análisis.

Validación del método

El método de proteómica dirigida utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas se ha validado de acuerdo con las recomendaciones de la AOAC (Association of Official Analytical Collaboration).

Los resultados demostraron la linealidad ($R^2 > 0.98$) del método para el análisis de quesos de mezcla en un rango entre 0% a 100% para las tres especies estudiadas. Se ha determinado un límite de detección inferior al 1% para cada especie y un límite de cuantificación inferior al 2%.

El estudio ha mostrado valores medios de repetibilidad del 8%, valores medios de reproducibilidad del 10% y valores medios de recuperación/exactitud del 99,6%. Estos datos son indicadores de un método robusto y fiable para el propósito para el que ha sido diseñado.

Finalmente, se ha demostrado la aplicabilidad del método para quesos de mezcla tipo ibérico con maduraciones entre 1 y 6 meses. El análisis de quesos comerciales con maduraciones entre 1 y 11 meses y mezclas tanto binarias como ternarias confirmó la capacidad de este método para el análisis de quesos de mezcla.

Actualmente, el estudio se está extendiendo sobre una nueva cohorte de quesos comerciales y un periodo de trabajo de 6 meses, con el objeto de consolidar los resultados obtenidos y facilitar la introducción del método en la rutina diaria.

CONCLUSIONES

Se ha desarrollado con éxito un método para la cuantificación de leches de diferentes especies en quesos de mezcla. Dicho método está listo para ser implementado en los laboratorios de análisis lácteos.

Esta técnica de proteómica dirigida PRM presenta una elevada especificidad, gran sensibilidad, un amplio rango dinámico de detección y es independiente del estado de maduración de la muestra de queso. En consecuencia, es capaz de determinar, en términos de proteína, la cantidad de leche de cada especie en las muestras de queso.

Los resultados de la validación realizada de acuerdo a las guías de la AOAC demostraron las prestaciones, robustez y fiabilidad del método para el análisis de quesos tipo ibérico. En la actualidad, se está consolidando el método analizando otros tipos de quesos y un número mayor de quesos comerciales tipo ibérico.