Grado en Veterinaria
Unidad de Genética y Mejora Animal
Curso 2016/2017

IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE DE ORIGEN EN PRODUCTOS LÁCTEOS COMERCIALES: COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN

- *Cristina Sousa Cervera* -

DIRECTORAS:
Dra. Araceli Rabasco Mangas
Dra. Margarita Martínez Trancón

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi agradecimiento a todas las personas que han hecho posible la realización de este trabajo de fin de grado.

En primer lugar quiero agradecer a mis tutoras, la Dra. Araceli Rabasco Mangas y la Dra. Margarita Martínez Trancón, su confianza, tiempo y paciencia durante la elaboración de este trabajo. Gracias de corazón por vuestra ayuda.

En segundo lugar al profesor de la unidad de Genética y Mejora Animal, el Dr. Juan Carlos Parejo Rosas, por su ayuda desinteresada, y a Dña. Justa Salazar Núñez, T.E. de laboratorio de la Unidad de Genética, por toda la ayuda que me ha prestado en la realización de la parte experimental de este estudio.

Y, por último, a mi familia, por ayudarme y apoyarme de manera incondicional durante toda la carrera. Gracias por vuestra confianza y paciencia.

ÍNDICE

1. RESUMEN 4
2. ABSTRACT 5
3. INTRODUCCIÓN 6
3.1 OBJETIVOS 9
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 10
4.1. LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS 10
4.2. TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES BASADAS EN EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS . 12
4.3. TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES BASADAS EN EL ANÁLISIS DEL ADN 16
5. MATERIALES Y MÉTODOS 26
5.1. MATERIAL 26
5.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO 26
5.1.2. MATERIAL DE LABORATORIO 28
5.2. MÉTODOS 31
5.3. EXTRACCIÓN DE ADN 31
5.4. VALORACIÓN DE LA CALIDAD Y CANTIDAD DE ADN 33
5.5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) 34
5.6. LÍMITE DE DETECCIÓN 36
5.7. OTRAS HERRAMIENTAS 36
6. RESULTADOS 37
6.1. SELECCIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN 37
6.2. IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE DE ORIGEN EN PRODUCTOS LÁCTEOS COMERCIALES . 41
7. DISCUSIÓN 48
8. LÍNEAS FUTURAS 53
9. CONCLUSIONES 53
10. BIBLIOGRAFÍA 54

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Tipos de fraude alimentario.

FIGURA 2. Detalle de las muestras de queso y yogur utilizadas.

FIGURA 3. Centrífuga Eppendorf® 5424R

FIGURA 4. Baño seco digital Fisher Scientific FB15103

FIGURA 5. Termociclador Peltier ptc-200

FIGURA 6. Espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop 2000c

FIGURA 7. Cubeta de electroforesis Wide Mini-Sub® Cell GT

FIGURA 8. Transiluminador Gel Doc™ XR

FIGURA 9. Electroforesis en gel de agarosa del ADN extraído de 5 muestras por ambos métodos.

FIGURA 10. Análisis electroforético de los productos PCR amplificados a partir de 7 muestras tras la extracción de ADN con los dos métodos utilizados.

FIGURA 11. Análisis electroforético de los productos PCR amplificados a partir de muestras de quesos comerciales (I).

FIGURA 12. Análisis electroforético de los productos PCR amplificados a partir de muestras de yogur y leche.

FIGURA 13. Análisis electroforético de los productos PCR amplificados a partir de muestras de quesos comerciales (II).

FIGURA 14. Análisis electroforético de los productos PCR amplificados a partir de muestras de queso comerciales (III).

FIGURA 15. Análisis electroforético de los productos PCR de distintas muestras.

FIGURA 16. Análisis electroforético de los productos PCR amplificados de una serie de diluciones para detectar la sensibilidad del método de extracción seleccionado.

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Propiedades organolépticas de los distintos tipos de leche.

TABLA 2. Métodos basados en la PCR, utilizados en la autentificación de productos lácteos.

TABLA 3. Identificación de las 33 muestras de productos lácteos utilizadas.

TABLA 4. Cebadores utilizados para la amplificación del ADN extraído.

TABLA 4. Concentraciones y volúmenes empleados de cada reactivo para la PCR.

TABLA 5. Valores indicativos de pureza en muestras de ADN según las relaciones de absorbancia A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230}.

TABLA 6. Comparación de la concentración de ADN y las relaciones de absorbancia A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} obtenidas a partir de los métodos de extracción ensayados.

TABLA 7. Etiquetado e identificación de las 33 muestras del estudio.

1. RESUMEN

La identificación de las especies de origen en productos lácteos mediante métodos analíticos es necesaria tanto para la industria alimentaria como para los organismos de control oficiales. Además de la creciente preocupación de los consumidores por la alimentación, hacen necesario desarrollar protocolos de extracción e identificación del ADN para verificar la trazabilidad de los productos de origen animal.

En este estudio se ha realizado la extracción de ADN mediante dos métodos diferentes con el fin de elegir el más adecuado. Uno de ellos es la técnica de HotSHOT y el otro método empleado es el kit comercial G-Spin™. Se determinó la calidad y la cantidad de ADN obtenido con los dos métodos mediante electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría respectivamente. Con el método HotSHOT se obtuvo mayor concentración de ADN mientras que con el kit comercial G-Spin™ se obtuvo mejor calidad, por lo que se seleccionó éste último para el desarrollo del estudio. Por último se realizó la amplificación del ADN mitocondrial (genes 12S y 16S de ARNr) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se visualizaron los resultados mediante electroforesis en gel de agarosa. Con una sola PCR múltiple se ha podido identificar la especie de origen (vaca, cabra, oveja y búfala) en derivados lácteos.

Se han analizado 33 muestras de productos lácteos comerciales (queso, leche y yogur) con el objetivo de determinar si se cometen fraudes alimentarios referentes al etiquetado. En el 12% de los quesos analizados, los resultados obtenidos con la PCR no coinciden con la información del etiquetado.

La PCR que se ha desarrollado en este estudio ha demostrado ser una técnica rápida, sensible y específica, siempre que se disponga de ADN de calidad, con capacidad para ser amplificado. Se ha demostrado una sensibilidad del método del 0’5%.

Palabras clave: ADN, PCR, especie, productos lácteos, fraude alimentario.

2. ABSTRACT

The identification of species of origin in dairy products with analytical methods is necessary not only for the food industry, but also for the official control organizations. In addition to the growing concern of consumers by the food, making it necessary to develop extraction and identification protocols of DNA to verify the traceability of animal products.

In this study DNA extraction has been performed using two different methods in order to choose the most appropriate one. One of them is the HotSHOT technique and the other method used is the commercial G-Spin™ kit. The quality and quantity of DNA obtained with the two methods were determined by agarose gel electrophoresis and spectrophotometry respectively. With the HotSHOT method, the main DNA concentration was obtained while the commercial G-Spin™ kit obtained the best quality, so the last one was selected for the development of this study. Finally mitochondrial DNA amplification (12S and 16S rRNA genes) was performed by the polymerase chain reaction (PCR) and the results were visualized by agarose gel electrophoresis. With a single multiple PCR, it has been possible to identify the species of origin (cow, goat, sheep and buffalo) in dairy products.

Thirty-three samples of commercial dairy products (cheese, milk and yogurt) have been analysed in order to detect food fraud referent to labelling. In 12% of the cheeses analysed, the results obtained with the PCR do not correspond with the labelling information.

The PCR developed in this study has proved to be a fast, sensitive and specific technique, provided that quality DNA is available, with capacity to be amplified. A sensitivity of the 0.5% method has been demonstrated.

Key words: DNA, PCR, species, dairy products, food fraud.

3. INTRODUCCIÓN

La leche y los productos lácteos son productos de alto consumo en la sociedad en las distintas etapas de la vida, por su alto valor nutricional y los beneficios que aportan. En muchas ocasiones estos alimentos han sido objeto de adulteraciones realizadas con fines económicos por parte de fabricantes sin escrúpulos, lo que impacta negativamente en la calidad de los productos (Nicolau y col., 2011).

El fraude alimentario es un término que abarca la sustitución, adición, eliminación, manipulación o presentación engañosa, que se ha realizado de forma deliberada e intencionada, en alimentos, ingredientes alimentarios o en el envasado de los mismos; con el objeto de obtener un beneficio económico que puede repercutir en la salud pública (Spink y Moyer, 2011). El Reglamento (CE) Nº 273/2008 de la Comisión de 5 de marzo de 2008, establece las disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) nº 1255/1999 del Consejo (Comisión Europea, 2008), relativo a los métodos de análisis y evaluación de la calidad de la leche y de los productos lácteos. Esta regulación considera que el límite legal de la sustitución de leche es del 0,99%, y el fraude alimentario se define cuando un valor es igual o superior al 1%.

En la actualidad la preocupación de los consumidores con respecto a la composición de los alimentos hace necesaria la verificación del etiquetado de los productos (Mafra y col., 2007), ya que es una de las principales causas de fraude alimentario (*Figura 1*).

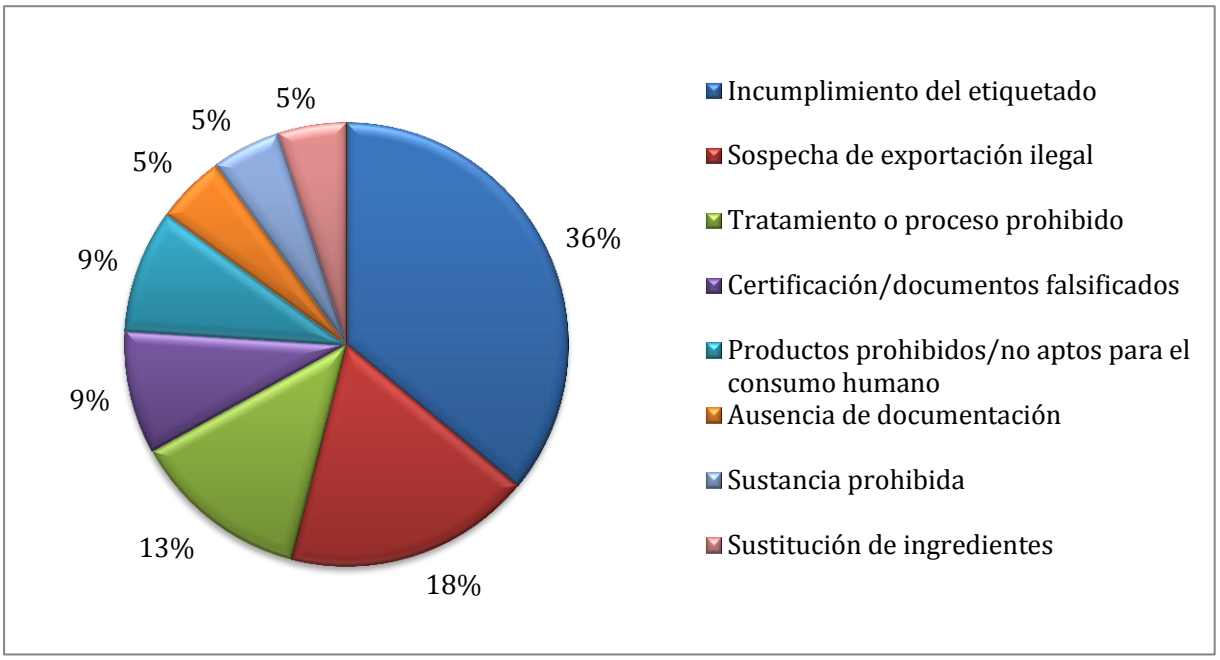

Figura 1. Tipos de fraude alimentario. Fuente: Comisión Europea, 2015.

Son muchos los alimentos susceptibles de fraude alimentario: detección de carne de cerdo (Calvo y col., 2001), marisco procesado (Mackie y col., 1999), detección de gluten en cereales (Köppel y col., 1998), etc. En la industria láctea existe la práctica generalizada de adulterar un tipo de leche de alto valor económico (cabra, oveja o búfala) con otra de menor coste como la leche de vaca (Zarei y col., 2016).

Existen al menos tres razones importantes para llevar a cabo la verificación del etiquetado:

1. Evitar que se cometa fraude económico por sustitución o adulteración del producto, algo que sucede cuando se vende un producto de una especie por otro de menor valor comercial.
2. Aspectos relacionados con la salud (alergias o intolerancias alimentarias), importantes por las reacciones adversas que provocan.
3. Razones culturales como el no consumo de productos de origen porcino por parte de los musulmanes (Rodríguez y col., 2004; Aranguren-Méndez y col., 2009, Bottero y col., 2011).

Por estos motivos es necesario desarrollar métodos analíticos que permitan identificar la autenticidad de los productos de origen animal.

En los últimos años se ha identificado la especie de origen mediante distintas técnicas como la electroforesis de proteínas solubles (Addeo y col., 1989, Molina y col. y Cartoni y col., 1999), la separación mediante HPLC (Ashoot y col. 1988; Pellegrino y col., 1991), o la técnica ELISA (Ritcher y col.; Haza y col., 1997). El Reglamento (CE) nº 1255/1999 del Consejo (Comisión Europea, 2008), establece los métodos para el análisis y evaluación de la calidad de la leche y productos lácteos. Este Reglamento define el Isoelectroenfoque (IEF) de la γ-caseína como método oficial para la identificación de especies.

Actualmente se emplean técnicas de biología molecular que utilizan el ADN, debido a su estabilidad a altas temperaturas y a la conservación de su estructura en las células del individuo (López-Calleja y col., 2005).

Es importante disponer de muestras de ADN con calidad y cantidad adecuada, que posteriormente permitan su amplificación, lo que implica elegir un buen método de extracción. En relación a la leche y productos lácteos se han desarrollado varios métodos que extraen ADN de calidad, como el Salting-Out (D'Angelo y col., 2007), o diversos kits comerciales como DNeasy® (Di Pinto y col., 2007) o Wizard DNA (López-Calleja y col., 2005a). La extracción de ADN a partir de productos lácteos tiene mayor dificultad debido a procesos a los que son sometidos para su elaboración (salado, adición de aceites, procesos térmicos, presencia de mohos, etc.).

Una de las técnicas más utilizadas para la discriminación de especies es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que por su elevada especificidad, sensibilidad y rapidez permite detectar porcentajes de ADN muy bajos, como 0'1% (López-Calleja y col., 2005b) o 0'5% (Feligini y col., 2005). Una de las limitaciones de esta técnica es la presencia de inhibidores (polisacáridos) que pueden interferir con la reacción (Di pinto y col., 2007).

3.1 OBJETIVOS

Los objetivos de este estudio son:

1. Comparar dos métodos de extracción de ADN con el fin de elegir el más apropiado para este estudio.

2. Desarrollar una PCR múltiple que permita discriminar las especies más utilizadas en la elaboración de productos lácteos en una sola reacción.

3. Identificar la especie de origen de la materia prima en productos lácteos y comprobar la veracidad del etiquetado.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS

La leche y sus derivados son alimentos de origen animal con un valor nutricional muy elevado, especialmente ricos en proteínas y calcio, y cuyo consumo es importante y necesario principalmente en etapas de la vida como la infancia, la maternidad y la vejez. El queso se encuentra dentro de los principales productos lácteos, siendo un alimento con un gran valor nutritivo por el aporte de proteínas, vitaminas, minerales y grasas saturadas, además de ser una de las mejores fuentes de calcio. Es recomendable un consumo de dos o tres porciones diarias del grupo de los productos lácteos (leche, yogur o queso).

Además de las cualidades nutricionales, los distintos tipos de leche difieren en las propiedades organolépticas, que las hacen identificables por los consumidores (Tabla 1).

Especie	Aspecto	Olor	Sabor
Vaca	Blanco intenso	Débil	Suave, ligeramente dulce
Oveja	Blanco nacarado, más viscoso y más opaco que la leche de vaca y cabra	Característico a oveja. Ausente en leche de calidad	Menos dulce que la de vaca y cabra
Cabra	Blanco mate. Más viscosa que la leche de vaca	Neutro recién ordeñada	Dulce, muy característico

Tabla 1. Propiedades organolépticas de los distintos tipos de leche.

Golinelli y col., (2014) realizaron una prueba triangular para estimar la capacidad de los consumidores al percibir la adición fraudulenta de leche de vaca. En la prueba se ofrecieron quesos formulados con diferentes proporciones de leche de cabra y vaca a 102 consumidores regulares de queso. Casi la mitad de los consumidores eran capaces de percibir adulteración al 10% (vol/vol) de leche de vaca.

Para la elaboración de los quesos es imprescindible disponer de leche como materia prima principal. La leche generalmente procede de vacas, ovejas, cabras y búfalas, pudiendo obtener quesos puros de cada una de las especies mencionadas o quesos de mezcla. El resultado final del queso depende tanto de la especie de origen como del procesado, pudiendo variar su sabor y su textura.

En Europa la leche de oveja y cabra posee gran importancia debido a que son utilizados en la elaboración de quesos tradicionales como el Roquefort, el Feta y el Manchego (Ramos y Juárez, 1986). Tienen especial importancia en Francia, Italia, España y Grecia, donde los productos lácteos tienen una actividad tradicional de gran importancia social, cultural y ambiental (Zachar y col., 2011).

En Extremadura tienen gran reconocimiento los 3 quesos con denominación de origen protegido (DOP):

- Torta del Casar: queso elaborado a base de leche cruda de ovejas pertenecientes a los troncos merino y entrefino.
- Queso de la Serena: elaborado a base de leche cruda de oveja de la raza Merina.
- Queso de los Ibores: queso elaborado a base de leche cruda de cabras Serranas, Retinta, Verata y sus cruces.

La identificación de la especie productora de la leche tiene gran importancia, sobre todo en los quesos con denominación de origen, como quesos puros de oveja y/o de cabra (Bottero y col., 2002), ya que la sustitución de leche de oveja y cabra por leche de vaca, más barata, es una práctica fraudulenta en la industria láctea (Mayer y col., 1997). Zeleňáková y col., (2009) detectaron un 28% de leche y productos lácteos adulterados con leche de vaca.

La verificación del etiquetado es importante no sólo para evitar que se cometa fraude económico, sino también por aspectos relacionados con la salud (alergias o intolerancias alimentarias) o razones culturales o éticas (Rodríguez y col., 2004; Aranguren-Méndez y col., 2009).

4.2. TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES BASADAS EN EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

Para impedir la posible eliminación, adición o sustitución fraudulenta de un tipo de leche por otra se han desarrollado procedimientos analíticos capaces de detectar estos fraudes y proteger a los consumidores de un etiquetado indebido (De La Fuente y Juárez, 2005).

Muchos de esos métodos requieren mucho tiempo, técnicos especialistas y son caros. El desarrollo de un método rápido, preciso, barato y que requiera de unos conocimientos técnicos mínimos sería muy valioso para la industria lechera en la certificación de la calidad y seguridad de sus productos. Un método que permita detectar la adulteración en la materia prima sería de especial interés para los fabricantes de productos lácteos.

Algunas de estas metodologías se basan en el análisis de las principales proteínas de la leche (Stanciuc y Rapeanu, 2010): cromatografía (Enne y col., 2005), electroforesis (Mayer, 2005), y técnicas inmunológicas (Xue y col., 2010).

4.2.1. CROMATOGRAFÍA

La cromatografía es un método físico de separación de componentes que tiene lugar debido a la migración individual de cada componente desde la fase estacionaria a la fase móvil. Existen varios tipos de cromatografía (intercambio iónico, interacción hidrofóbica, de fase reversa, etc.) que difieren en los mecanismos de separación y en la selección de las fases estacionaria y móvil (Ghosh, 2002; Kawai y col., 2003).

- La **cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)** separa las proteínas según su hidrofobicidad superficial. Esta técnica se ha aplicado para analizar cualitativa y cuantitativamente las fracciones de caseína en la leche cruda no procesada de vaca, cabra y oveja (Bramanti y col., 2003).

- La **cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, High Performance Liquid Chromatography)** es un procedimiento analítico basado en la separación de moléculas en función de su diferente polaridad. De este modo se obtienen perfiles cromatográficos de proteínas característicos de cada especie, que permiten su identificación mediante comparación con cromatogramas de referencia. La técnica HPLC en fase reversa (RP-HPLC), es la que más se ha utilizado en la identificación de especies animales. Se ha aplicado para el control de leche adulterada, detectando un 1 % de leche de vaca en leche humana mediante la β-lactoglobulina, la α-lactoalbúmina y la κ-caseína, (Urbanke y col., 1992).

  Ferreira y Caçote, (2003) también usaron la RP-HPLC para detectar y cuantificar leche de vaca, oveja y cabra en leches y quesos portugueses de denominación protegida y en quesos que fabricaron usando diferentes proporciones de leche de vaca, oveja y cabra. Los perfiles cromatográficos extraídos de la β-lactoglobulina y la α-lactoalbúmina fueron muy diferentes. Según los autores, la RP-HPLC es una técnica exacta y muy sensible para medir los porcentajes de leche y de quesos frescos y madurados.

- En la **inmunocromatografía** existen anticuerpos por los que una o más proteínas presentes en la mezcla tienen afinidad y por tanto se quedarán unidas, separándolas del resto de componentes de la mezcla. Stanciuc y Rapeanu (2010) utilizaron un kit de inmunocromatografía para detectar la presencia de leche de vaca en quesos de oveja y cabra. Analizaron 73 muestras y se detectó la presencia de leche de vaca en el 67'3% de los quesos de oveja y en el 79'7% de los quesos de cabra.
  Colak y col., (2006) también utilizaron un kit de inmunocromatografía para la detección de leche de vaca en 100 quesos de oveja, detectando la adulteración con leche de vaca en el 48% de las muestras.

4.2.2. ELECTROFORESIS

Los métodos electroforéticos están basados en la identificación de patrones de proteínas específicos, tras la separación por diferencias de movilidad de las proteínas bajo la acción de un campo eléctrico (García-Segura y col., 1996). La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) posee un gran poder de separación en función de la densidad de carga de las moléculas y de su tamaño.

- Entre las técnicas electroforéticas se encuentra el método de **isoelectroenfoque (IEF)** en geles de poliacrilamida. Éste método logra separar las proteínas en un gradiente de pH en función de su punto isoeléctrico (Berrini y col., 2006; Mackie y col., 2000).

  Históricamente, el isoelectroenfoque de las proteínas ha sido el método estándar para detectar la adulteración en la leche y los productos lácteos. La regulación define el isoelectroenfoque (IEF) de las gamma-caseínas como el método oficial para la identificación de especies (Comisión Europea, 2008).

- También se han aplicado métodos de **electroforesis capilar** basados en la determinación de los distintos tiempos de migración de las proteínas de cada especie a lo largo del capilar hasta el detector, lo que permite diferenciar los distintos perfiles proteicos entre especies (Vallejo-Córdoba y Cota-Rivas, 1998; Vallejo-Córdoba y González-Córdova 2010). Éste método consigue una gran resolución pero resulta muy laborioso y es difícil la extrapolación a todas las especies de interés.

  Cartoni y col., (1999) determinaron la presencia de leche de vaca en productos hechos con leche de cabra utilizando una electroforesis capilar. La cantidad mínima detectada es del 2% en leches de mezcla y del 4% en quesos.

  Molina y col., (1999) usaron la electroforesis capilar para separar y analizar la fracción de la caseína en mezclas de leche de vaca, cabra y oveja.

4.2.3. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

El **ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)** se basa en el uso de un anticuerpo preparado frente a una región antigénica característica de la especie, lo que permite su detección mediante un anticuerpo secundario conjugado. Posteriormente se revela la unión Ag-Ac mediante identificación visual o con técnicas analíticas convencionales como la espectrometría o fluorimetría.

La técnica ELISA es la forma de inmunoensayo más aplicada en la industria láctea, ya que tiene ventajas como la facilidad de uso, fiabilidad, rapidez y automatización (Bottero y col., 2002; Popelka y col., 2002). La presencia de leche de una especie no declarada en el producto puede ser detectada usando dos métodos ELISA: ELISA indirecto y el sándwich ELISA, incluyendo sus variaciones (Zachar y col., 2011).

La técnica ELISA es capaz de detectar leche de vaca y cabra en mezclas de leche mediante anticuerpos mono y policlonales. Las caseínas que representan la parte principal de la fracción proteínica presentan la ventaja de ser más o menos estables, por lo que pueden utilizarse como antígenos en leche y productos lácteos que han sido tratados térmicamente (pasteurización, UHT). Su principal desventaja es la débil inmunogenicidad y su mayor sensibilidad a la degradación proteolítica. Las proteínas del suero, son proteolíticamente degradables en cantidades mínimas y menos resistentes a las altas temperaturas (Zeleňáková y col., 2008).
Xue y col., (2010) desarrollaron un ELISA indirecto para detectar y cuantificar la presencia de leche de vaca en muestras de leche de cabra, modificando los anticuerpos policlonales. Se determinó una relación lineal entre la absorbancia a 450nm en el ELISA con la concentración de leche bovina adulterada. El límite de detección fue del 4% para las muestras de leche mezcladas.

Zeleňáková y col., (2008) utilizaron la técnica ELISA para detectar y cuantificar leche de cabra, basándose en la presencia de inmunoglobulinas específicas (IgG). Utilizaron 43 muestras, mezclando leche de oveja y de cabra. Detectaron la influencia del tratamiento térmico de la leche ya que las muestras pasteurizadas

dieron respuestas de densidad óptica más bajas que las preparadas a partir de la leche cruda.

En otro estudio, Zeleňáková y col., (2010) utilizaron un kit ELISA para detectar la caseína bovina en leche de oveja. Los resultados pusieron de manifiesto la rapidez del método (3 horas aproximadamente) y la capacidad para detectar la adulteración de la leche con porcentajes entre el 0'5 y el 50%.

Las principales ventajas de este método son el procesamiento de un gran número de muestras, la creación de la curva de calibración y la medición de muestras de forma simultánea. El ELISA es lo suficientemente sensible y específico para la detección de alérgenos alimentarios. Sin embargo, el método ELISA también tiene desventajas como la aparición de falsos negativos si las proteínas no se han extraído de forma efectiva. (Taylor y col., 2009).

4.3. TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES BASADAS EN EL ANÁLISIS DEL ADN

En los últimos años se han utilizado técnicas de Biología Molecular para la identificación de especies en alimentos de origen animal. Las técnicas genéticas están basadas en la detección de secuencias de ADN únicas para cada especie. La molécula de ADN ofrece una serie de ventajas cuando se compara con los marcadores proteicos. La información genética que contienen los tipos celulares de un individuo es idéntica y por tanto la identificación es independiente del tejido.

Prácticamente todos los sistemas de identificación de especies en alimentos basados en ADN utilizan la amplificación mediante PCR, ya que permite detectar cantidades muy pequeñas de ADN a partir de los materiales más diversos. Estas técnicas han ganado popularidad debido a la presencia de moléculas de ADN en la mayoría de los tejidos y a la estabilidad del ADN tras procedimientos como el tratamiento térmico. Además son técnicas rápidas, simples y específicas (Mafra y col., 2008).

Estas técnicas aprovechan la alta especificidad y sensibilidad de los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar cantidades muy bajas de leche de vaca, del orden de 0,5% (Feligini y col., 2005) o 0,1% (López-Calleja y col., 2005a).

Además se han aplicado con éxito a quesos madurados (Mayer, 2005) y a productos lácteos sometidos a tratamientos térmicos (López-Calleja y col., 2005b), a diferencia de los métodos basados en proteínas, que no siempre se pueden aplicar.

4.3.1. OBTENCIÓN DE ADN

La extracción de ADN es un proceso muchas veces laborioso y costoso que difiere dependiendo del tejido del cual se va a extraer, por ello se han desarrollado diferentes protocolos y continuamente se hacen modificaciones a los ya existentes, con el objeto de hacer más sencillo el proceso (De Jesús y col., 2005).

En general, para la reacción en cadena de la polimerasa no es necesario disponer de gran cantidad ni calidad de ADN, pudiendo éste encontrarse tanto en estado mono como bicatenario. En alimentos es importante conocer el origen de las muestras, así como los posibles procesos a los que han sido sometidas. Los tratamientos térmicos pueden producir precipitación de proteínas que se arrastran durante el proceso de purificación e inhiben finalmente la PCR.

La purificación exitosa de ácidos nucleicos requiere cuatro pasos importantes: lisis celular o tisular, desnaturalización de complejos de nucleoproteínas, inactivación de nucleasas, y eliminación de contaminantes biológicos y químicos (Doyle, 1996). Muchos de los métodos de extracción siguen pasos básicos similares y emplean reactivos orgánicos e inorgánicos y métodos de centrifugación, lo que ha desembocado en la existencia de gran variedad de métodos automatizados y diferentes kits comerciales disponibles (Carpi y col., 2011; Greene y Rao, 1998; Price y col., 2009).

Dentro de los kits comerciales de extracción de ADN que han sido utilizados por distintos autores para los productos lácteos se encuentra el kit de aislamiento Invisorb Spin Food I de Invitek Co. (Mašková y Paulíčková, 2006), diseñado para muestras de origen animal. Bottero y col., (2003) utilizaron el protocolo Dneasy® Tissue (Qiagen) para extraer ADN de muestras de sangre y tejido animal, y Di Pinto y col., (2007) comparó éste kit con el de Purificación de ADN para alimentos Wizard® Magnetic (Promega) para comparar la eficiencia de la extracción, la pureza y la idoneidad del ADN para ser amplificado posteriormente.

Por otro lado se han descrito, entre otros, métodos basados en el protocolo salting-out (precipitación salina), libre de solventes tóxicos, para extraer ADN de las células somáticas de la leche (D'Angelo y col., 2007).

Debido a la gran diversidad de métodos de extracción de ADN que existen, resulta complicado elegir el mejor de ellos. Para escoger el método más adecuado se tienen en cuenta los recursos de los que se dispone, la disponibilidad de equipamiento y los costes, así como las muestras que se van a utilizar, los reactivos y la rapidez, calidad y cantidad del ADN extraído, siendo éstas dos últimas las principales razones para la elección del método a utilizar.

4.3.2. CARACTERÍSTICAS DEL GENOMA MITOCONDRIAL

Muchos estudios de identificación de especies se han basado en la búsqueda de regiones variables en ADN mitocondrial, sobre todo en regiones codificantes como los genes citocromo b o citocromo oxidasa I (Jerome y col., 2003). En el análisis de productos lácteos se han utilizado también los genes que codifican las subunidades 12S y 16S del ARNr (Bottero y col., 2003).

El genoma mitocondrial de los animales es una pequeña molécula de ADN bicatenario circular, de la que existen muchas copias dentro de la mitocondria. Dependiendo del tipo de célula se pueden encontrar hasta incluso mil copias. El tamaño del genoma mitocondrial en los animales se estima en unos 16.500±500 pares de pases (pb), aunque existen variaciones tanto intraespecíficas como

interespecíficas (Avise y col., 1987). Además de por su menor tamaño, mayor número de copias en cada célula y disposición circular, el ADN mitocondrial (ADNmt) se diferencia del nuclear en algunos aspectos:

- Se trata de un ADN haploide y no recombinante. Salvo alguna excepción en la que se ha demostrado herencia paterna (Saavedra y col., 1997), el ADNmt es casi exclusivamente de herencia materna.
- Es un ADN muy compacto y de gran eficiencia: no contiene intrones, raramente aparecen secuencias duplicadas y no hay apenas espacios intergénicos; los genes suelen estar separados por menos de 10 pb o incluso se solapan entre sí.
- Están presentes en la célula en múltiples copias, pero como alelos individuales.

El genoma mitocondrial para la identificación de especies ha sido comúnmente elegido por muchos investigadores por su relación entre la conservación de secuencias y la variabilidad genética (Kocher y White, 1989; Momcilovic y Rasooly, 2000). El elevado número de mitocondrias por célula aumenta el nivel de sensibilidad del método.

4.3.3. AMPLIFICACIÓN DE ADN

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue desarrollada por el científico Kary Mullis a mediados de los 80. El éxito de ésta técnica reside en que permite obtener un gran número de copias de fragmentos específicos de ADN, basándose en la utilización de mecanismos similares a los empleados por la propia célula en la replicación del ADN durante la división celular.
La reacción en cadena de la polimerasa consiste en la repetición cíclica de tres etapas:

1. **Desnaturalización del ADN bicatenario** para separar las dos cadenas, aplicando temperaturas superiores a 90ºC.

2. **Unión específica de los cebadores** (oligonucleótidos sintéticos) a las cadenas sencillas mediante complementariedad de bases. La temperatura a la que se realiza esta unión es muy importante para controlar la especificidad de la reacción y depende de la composición de las bases y del tamaño de los cebadores. Se suelen emplear dos cebadores que se unen cada uno a una cadena diferente delimitando la secuencia diana que se pretende amplificar. La selección de dichos cebadores constituye uno de los puntos más críticos del ensayo de PCR.

3. **Extensión de la cadena de ADN** a partir de los cebadores. Dicha extensión la lleva a cabo la enzima ADN polimerasa, que inicia su actividad tras reconocer la unión de los cebadores a las cadenas de ADN de la muestra. La polimerasa empleada actualmente es una enzima termoestable, la Taq polimerasa.
   Después de cada ciclo se duplica la secuencia de ADN diana delimitada por los cebadores específicos. Dado que las nuevas copias también sirven como patrones en los subsiguientes ciclos, la cantidad de ADN generado se incrementa exponencialmente.

Desde Lipkin y col., (1993) se han desarrollado varios métodos basados en la PCR para evaluar la autenticidad de los productos lácteos, permitiendo la identificación de la especie de origen de las diferentes muestras (vaca, cabra, oveja y búfala) (Branciari y col., 2000; Mayer, 2005). Esto ha sido posible dado que el ADN amplificable se puede obtener a partir de leche tratada térmicamente (leche pasteurizada, ultrapasteurizada y leche en polvo), así como de los caseinatos de la leche de vaca (Mayer, De la Fuente y Juárez, 2005; Mafra y col., 2004).

- **PCR simple**. Bania y col., (2001) detectaron la adulteración de la leche de cabra con leche de vaca amplificando con cebadores específicos del ADN bovino un fragmento de 274 pb correspondiente al citocromo b.
  Bobková y col., (2009) aplicaron la PCR para amplificar una región del ADN mitocondrial y detectaron la adulteración de leche de oveja con leche de vaca.
  Zeleňáková y col., (2009) utilizaron el método PCR para el análisis de 70 muestras de leche y queso. De las 20 muestras de leche de oveja analizadas, se

detectó la presencia de leche de vaca en 8 muestras. De las 30 muestras de queso de oveja, 12 muestras contenían leche de vaca.

- El desarrollo de técnicas de **PCR múltiple** hace referencia a la posibilidad de amplificar más de una secuencia en una sola reacción. Mafra y col., (2004) y Mafra y col., (2007), utilizando cebadores que amplifican el gen mitocondrial 12S de ARNr, detectaron cuantitativamente leche de vaca en quesos de oveja y cabra respectivamente.

  El queso Mozzarella italiano típico marcado con PDO (Denominación de Origen Protegida) debe fabricarse únicamente con leche de búfala (*Bubalus bubalis*). Como la adición de leche de vaca no declarada al queso Mozzarella es un fraude común, varios métodos basados en PCR se han desarrollado para este propósito. Se propusieron dos técnicas de PCR doble que detectaban el citocromo b para la identificación simultánea de leche de vaca y búfala en quesos Mozzarella (Bottero y col., 2002; López-Calleja, 2004). La técnica permitió la detección del 1% (p/p) de leche de vaca en algunos quesos (Bottero y col., 2002).

  La técnica de PCR múltiple utilizada por Bottero y col., (2003) permitió la identificación simultánea de leche de oveja, vaca y cabra en distintos quesos, amplificando los genes mitocondriales 12S y 16S de ARNr.

- Gracias al incremento de la información genómica en las bases de datos, cada vez disponible para más especies, es posible buscar polimorfismos susceptibles de usarse para el diseño de cebadores específicos de especie. Bajo condiciones adecuadas, estos cebadores amplifican sólo si en la muestra se encuentra presente el ADN de la especie para la que han sido diseñados.

  Para detectar la adulteración de leche de vaca en queso de cabra, se desarrolló una técnica de **PCR específica de especie**, segmentando una secuencia de la región de control (D-loop) del ADN mitocondrial. Esto permitió la detección de leche de vaca en quesos de ovejas y cabras (Maudet y Taberlet, 2001).

  Mediante una PCR específica de especie del gen del citocromo b, se detectó la presencia de leche de vaca en 22 de 30 muestras de queso Mozzarella con una

sensibilidad del 1,5% (p/p) (Di Pinto y col., 2004). Feligini y col., y López-Calleja y col., (2005b) mejoraron aún más la sensibilidad de los ensayos de PCR específica de especie para la detección de leche de vaca en quesos de leche de búfala a 0,5 y 0,1% (p/p), respectivamente.

Mayer (2005) indicó que la PCR específica de especie resultó ser una técnica muy sensible para la detección de leche de vaca en quesos curados. Señala que, dado que el ADN puede extraerse a partir de productos lácteos tratados térmicamente, la PCR puede utilizarse para la detección de caseinatos bovinos que se añaden en ocasiones a quesos de oveja y cabra.

Golinelli y col., (2014), amplificando el gen de la subunidad 12S del ARNr de cabra y vaca simultáneamente, detectaron la adulteración de los 20 quesos de cabra analizados con leche de vaca.

- En la **PCR-RFLP** el ADN se amplifica con cebadores adecuados a la especie y los productos amplificados se digieren con enzimas de restricción, que cortan el ADN en una secuencia específica. Posteriormente se separan los fragmentos de acuerdo con su tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida. La presencia o ausencia de bandas de un tamaño concreto permite asignar el ADN de la muestra a una especie determinada. Es uno de los métodos más extendidos, sobre todo por su utilización sobre genes mitocondriales conservados, sin embargo cuando se analizan mezclas de especies, el patrón de bandas puede llegar a ser confuso por la presencia de varios patrones de restricción superpuestos en la misma reacción (Bottero y col., 2003; Dalmasso y col., 2012).

En la última década se ha utilizado la PCR-RFLP para la identificación de especies tanto en carne como en derivados lácteos (Branciari y col., 2000; Pfeiffer y col., 2004; El Rady y Sayed, 2006; Fajardo y col., 2006).

Branciari y col., (2000) utilizaron la técnica PCR-RFLP para detectar el origen de la leche utilizada en la producción de los quesos Feta y Mozzarella. La amplificación de un fragmento del gen del citocromo b permitió identificar leche de vaca, cabra, oveja y búfala mediante los perfiles de restricción obtenidos con las enzimas Taq I, Hae III, Hinf I y Sau3AI.

Bottero y col., (2002) emplearon el gen mitocondrial citocromo b y la enzima de restricción Hinf I para confirmar la identificación específica de vaca y búfala en quesos.

Lanzilao y col., (2005) utilizaron cebadores que amplifican un fragmento de 275 pb del gen del citocromo b para identificar las cuatro especies (vaca, oveja, cabra y búfala) de mayor interés en la industria láctea. Los patrones de RFLP obtenidos con tres enzimas de restricción fueron distintos para cada especie.

- La técnica **PCR-SSCP** (PCR asociada a Polimorfismo de Conformación de Cadena Simple) consiste en la desnaturalización de los productos de PCR, obteniendo ADN de cadena simple, seguido de renaturalización favoreciendo los apareamientos intercatenarios, para finalmente separar los productos en un gel de poliacrilamida. Cada hebra de ADN adopta una conformación dada, dependiente de la secuencia de nucleótidos, que afecta a su migración en el gel.

  Este método basado en las diferencias en la movilidad electroforética ha demostrado la utilidad de la existencia de diferentes formas de disposición de los fragmentos de ADN como método para identificar diferentes especies animales (Rehbein y col., 1999).

  Csikos y col., (2016) desarrollaron una PCR-SSCP mediante el diseño de cebadores para la región conservada del ADN mitocondrial (vaca, búfalo, oveja y cabra) correspondiente a la subunidad 12S del ARNr. El estudio de 105 quesos puso de manifiesto que en el 32% de los casos se habían utilizado mezclas de leches diferentes a las declaradas.

- La **PCR en tiempo real o PCR cuantitativa** permite el análisis continuo de la amplificación del ADN. Se basa en la detección de fluorescencia asociada a cada ciclo de amplificación de la reacción de PCR, lo que permite obtener una cinética del incremento de fluorescencia de la que se pueden calcular datos cuantitativos, absolutos o relativos, del número de copias de ADN del molde inicial en la mezcla de reacción. Es una variante de la PCR utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación del ADN. La gran diferencia de la técnica de PCR en tiempo real con respecto a la PCR convencional radica en que la detección de

la amplificación no se realiza al final de la reacción, sino durante el transcurso de la misma y sin necesidad de un paso posterior de migración electroforética del producto de PCR.

López-Calleja y col., (2007) utilizaron una PCR en tiempo real empleando sondas TaqMan para la detección cuantitativa de leche de vaca en mezclas de leche de vaca y oveja.

Lopparelli y col., (2007), mediante PCR cuantitativa, determinaron la adición de leche de vaca en queso Mozzarella de denominación de origen protegida.

Recientemente Snirc y col., (2017) utilizan la q-PCR para la identificación y cuantificación de ADN bovino en muestras de leche y oveja, llegando a detectar un mínimo del 0'5% de leche de vaca en la mezcla.

Seçkin y col., (2017) y Di Domenico y col., (2017) con la misma técnica han determinado el origen de la leche usada en la fabricación de quesos, concluyendo que esta técnica puede usarse para la detección de adulteraciones hechas con mezclas de leche de distintas especies.

Los distintos métodos basados en PCR utilizados para la autenticidad de los productos lácteos se presentan en la *Tabla 2*.

Producto	Especies	Técnica	Gen objetivo	Límite de detección (%)	Referencia
Leche, quesos puros y de mezcla	Vaca, oveja, cabra, búfala	PCR-RFLP	β-caseína	0.5	Plath y col., 1997
	Vaca, oveja y cabra	PCR Múltiple/ PCR-RFLP	12S ARNr/ 16S ARNr	0.5	Bottero y col., 2003
Carne, leche y productos lácteos	Vaca, oveja, cabra y búfala	PCR-RFLP	Citocromo b	NM	Lanzilao y col., 2005
	Vaca, oveja, cabra y búfala	PCR-RFLP	12S ARNr/ Citocromo b	0'5%	Di Domenico y col., 2017
Queso Mozzarella	Vaca y búfala	PCR Doble	Citocromo b	1	Bottero y col., 2002
		PCR Doble/ PCR-RFLP	Citocromo b	1'5	Rea y col., 2001; Di Pinto y col., 2004
		PCR especie-especifica	Citocromo oxidasa I	0'5	Feligini y col., 2005
		PCR especie-especifica	12S ARNr	0'1	López-Calleja y col., 2005a
		PCR en tiempo real	Citocromo b/ Hormona del crecimiento	0'1	Lopparelli y col., 2007
Quesos de cabra y mixtos	Vaca	PCR especie-especifica	D-loop	0'1	Maudet y Taberlet, 2001
	Vaca y cabra	PCR doble	12S ARNr	0'1	Mafra y col., 2007
	Vaca y cabra	PCR doble	12S ARNr	0'5	Golinelli y col., 2014
Quesos de oveja y mixtos	Vaca y oveja	PCR doble	12S ARNr/16S ARNr	0'1	Mafra y col., 2004
Leche cruda y tratada	Vaca	PCR especie-especifica	12S ARNr	0'1	López Calleja y col., 2004
	Cabra y oveja	PCR especie-especifica	12S ARNr	0'1	López Calleja y col., 2005b
	Vaca y oveja	PCR en tiempo real	12S ARNr	0'5	López Calleja y col., 2007b

Tabla 2. Métodos basados en la PCR, utilizados en la autentificación de productos lácteos. *NM= No mencionado.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIAL

5.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

En la realización de este estudio se han utilizado 33 muestras de productos lácteos comerciales, de las cuales 25 eran de queso de distintos tipos: queso fresco, curado, semicurado, tipo torta, tierno, requesón; 10 de los quesos estaban etiquetados como de oveja, 3 de vaca, 4 de cabra, 1 de vaca y oveja, 1 de cabra y vaca y 6 etiquetados como oveja/vaca/cabra. 5 muestras eran de yogures (1 etiquetado de búfala, 1 de cabra, 2 de oveja y 1 de oveja y cabra), y 3 muestras eran de leche, una de cada especie (oveja, vaca y cabra) (*Tabla 3*).

Figura 2. Detalle de las muestras de queso y yogur utilizadas.

Los productos se compraron en diferentes establecimientos y se llevaron al laboratorio de la unidad de Genética, donde se almacenaron en un frigorífico a 7ºC durante 24 horas, momento en el que se tomaron muestras individuales de forma estéril y se identificaron y conservaron en el congelador a -20ºC hasta su procesado.

Muestra	Tipo de producto	Etiquetado
1	Queso curado	Oveja
2	Queso madurado	Oveja
3	Queso tipo Torta	Oveja
4	Queso madurado	Oveja
5	Queso semicurado	Oveja
6	Queso tierno	Oveja
7	Queso madurado	Oveja
8	Queso madurado	Oveja
9	Queso madurado	Oveja
10	Queso fresco	Vaca
11	Queso semicurado	Vaca
12	Requesón de vaca	Vaca
13	Queso madurado	Cabra
14	Rulo de cabra	Cabra
15	Queso madurado	Oveja, cabra y vaca
16	Queso curado	Oveja, cabra y vaca
17	Queso semicurado	Oveja, cabra y vaca
18	Queso semicurado	Oveja, cabra y vaca
19	Queso fresco	Cabra
20	Queso curado	Cabra
21	Queso tipo Torta	Oveja
22	Queso madurado	Oveja, cabra y vaca
23	Queso curado	Vaca y oveja
24	Queso semicurado	Cabra y vaca
25	Queso semicurado	Oveja, cabra y vaca
26	Yogur	Búfala
27	Yogur	Cabra
28	Yogur	Oveja
29	Yogur	Oveja
30	Yogur	Oveja y cabra
31	Leche	Oveja
32	Leche	Cabra
33	Leche	Vaca

Tabla 3. Identificación de las 33 muestras de productos lácteos utilizadas.

5.1.2. MATERIAL DE LABORATORIO

La extracción de ADN se ha realizado mediante dos técnicas diferentes, la técnica de HotSHOT y el kit comercial G-spin™. Posteriormente se han evaluado la calidad y cantidad de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría respectivamente. Finalmente se ha realizado la amplificación del ADN mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se han visualizado los resultados en un gel de agarosa.

MATERIAL GENERAL DE LABORATORIO:

Puntas de pipeta, pipetas, tubos eppendorf®, gradillas, hojas de bisturí, material de vidrio.

APARATOS:

- Centrífuga Eppendorf® 5424R (*Figura 3*).
- Baño seco digital Fisher Scientific FB15103 (*Figura 4*)
- Agitador vórtex Fisher Scientific
- Agitador magnético
- Balanza electrónica (máx. 120g)
- Termociclador Peltier ptc-200 (*Figura 5*)
- Sistema de purificación de agua Wasserlab®
- Espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop 2000c (*Figura 6*)
- Sistema de electroforesis en gel Bio-Rad® formado por:
    - Cubeta horizontal de electroforesis Wide Mini-Sub® Cell GT (*Figura 7*)
    - Fuente de alimentación Power PAC 300
    - El transiluminador Gel Doc™ XR (*Figura 8*)
    - Software de análisis: Gel-Doc (Quantity One 1-D Analysis software)

Figura 3. Centrífuga Eppendorf® 5424R

Figura 4. Baño seco digital Fisher Scientific FB15103

Figura 5. Termociclador Peltier ptc-200

Figura 6. Espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop 2000c

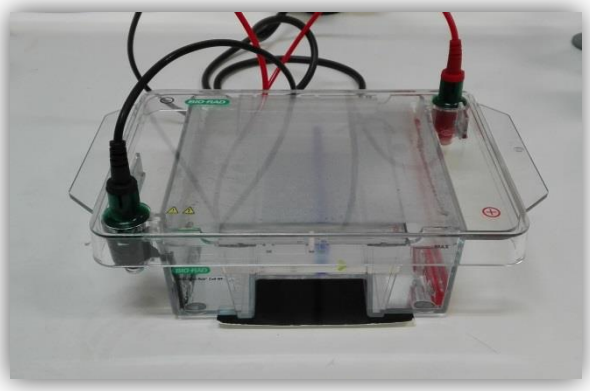

Figura 7. Cubeta horizontal de electroforesis Wide Mini-Sub® Cell GT

Figura 8. Transiluminador Gel Doc™ XR

REACTIVOS EMPLEADOS:

En este estudio se han utilizado reactivos con calidad para "biología molecular".

- Para la extracción de ADN:
  - Con la técnica de HotSHOT:

    -NaOH 25 mM + EDTA (disódico) 0'2 mM y pH 12

    -Tris-HCl 40 mM y pH 5
  - Con el kit comercial G-Spin™ (Intron Biotechnology, 2012):

    -Proteinasa K

    -ARNasa

    -Etanol absoluto

    -Buffer CL

    -Buffer BL

    -Buffer WA

    -Buffer WB

    -Buffer CE

- Para la PCR se han utilizado:

  -Buffer compuesto por: Tris-HCl 750 mM (pH 9.0), KCl 500mM y $(NH_4)_2SO_4$ 200 mM (Biotools)

  -Cl_2Mg

  -dNTPs

  -Cebadores de vaca, oveja, cabra y búfala (*Tabla* 3) (Stabvida)

  -TAQ polimerasa

  -Agua osmotizada (tipo I) del sistema de purificación de agua Wasserlab®

- Para la electroforesis se ha empleado:

  -Agarosa (Nzytech)

  -TBE 0'5x (Tris Hidroximetil aminometano, ácido bórico y EDTA disódico)

  -Agua ultrapura (tipo II) del sistema de purificación de agua Wasserlab®

  -Realsafe como solución de tinción (Applied biosystems™)

  -Buffer de carga

  -Marcador de 100 pares de bases (pb)

5.2. MÉTODOS

5.3. EXTRACCIÓN DE ADN

Para elegir el método apropiado para este estudio se ha realizado la extracción de ADN mediante dos técnicas diferentes, el método HotSHOT y el kit comercial G-Spin™. Ambas técnicas se han realizado sobre 5 muestras de productos lácteos, 4 de quesos (1 etiquetado de oveja, cabra y vaca, otro etiquetado de vaca, otro de cabra y otro de oveja) y 1 muestra de yogur (etiquetado de oveja y cabra).

5.3.1. TÉCNICA Nº1 – EXTRACCIÓN DE ADN CON EL MÉTODO HotSHOT

El fundamento del método HotSHOT (Hot Sodium hydroxide and Tris) es extraer ADN mediante lisis alcalina usando NaOH 25 mM y pH 12, para posteriormente neutralizarlo con Tris-HCl 40 mM y pH 5.

En primer lugar se toma una muestra (un fragmento de queso de 2x2mm, 75 µl de leche y 75 µl de yogur) y se coloca en un tubo eppendorf® de 1'5ml. Se le añade NaOH 25 mM + EDTA (disódico) 0'2 mM y pH 12 (300 µl en el caso del queso y 150 µl en el caso de la leche y del yogur) y se agita en el vortex durante 30 segundos. Se incuba a 95ºC durante 15 minutos y se deja enfriar en hielo otros 5 minutos.

A continuación se añade Tris-HCl 40 mM y pH 5 (300 µl en el caso del queso y 150 µl en el caso de la leche y del yogur), se homogeniza la muestra y se deja sedimentar 5 minutos. Tras ese tiempo se toman 150 µl del sobrenadante que contiene el ADN y se pasa a otro tubo eppendorf® de 1'5 ml.

5.3.2. TÉCNICA Nº2 – EXTRACCIÓN DE ADN CON EL KIT COMERCIAL G-SPIN™.

El kit comercial G-Spin™, también denominado método de extracción por columnas, tiene como base el uso de un buffer de lisis para extraer el ADN, y emplea las columnas para obtener un ADN más puro, libre de proteínas, nucleasas y otros contaminantes o inhibidores (Intron Biotechnology, 2012).

En primer lugar se toman 25 mg de queso, 75 µl de leche y 75 µl de yogur, y se ponen en un tubo eppendorf® de 1'5 ml. Se le añaden 20 µl de Proteinasa K y 5 µl de ARNasa y se mezclan durante 30 segundos en un vortex. Se añaden 200 µl de Buffer CL y se mezcla durante 30 segundos en el vortex. Se incuba a 56º C durante 25 minutos (mezclando suavemente cada 5 minutos para ayudar a la lisis).

A continuación se añaden 200 µl de Buffer BL al mismo tubo y se mezcla bien, con cuidado de que no se rompa el ADN. Se incuba la mezcla a 70ºC durante 5 minutos y se centrifuga a 13'000 rpm durante 5 minutos.

Se recogen 350 µl de sobrenadante y se pasa a un tubo limpio donde se le añaden 200 µl de etanol absoluto y se mezcla invirtiendo los tubos hasta que quede homogéneo.

Se pasa el contenido a los tubos que ya vienen con las columnas preparadas y se centrifuga a 13'000 rpm durante 1 minuto. Se elimina el filtrado y se le añade a la columna 700 µl de buffer WA.

Se repite la centrifugación y la eliminación del filtrado y se añaden 700 µl de buffer WB. Se elimina el filtrado y se vuelve a centrifugar.

Se elimina el último filtrado y se pasa la columna a un tubo nuevo donde se añaden 50 µl de buffer CE. Se incuba a temperatura ambiente durante 1 minuto y se centrifuga a 13'000 rpm durante 1 minuto. Se desechan las columnas y recogemos el filtrado en el que se encuentra el ADN.

5.4. VALORACIÓN DE LA CALIDAD Y CANTIDAD DE ADN

5.4.1 CALIDAD DEL ADN

Para valorar la integridad del ADN extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0'8% de concentración en TBE 0'5x, al que se le añaden 100 µl de realsafe como solución de tinción.

En la preparación de las muestras se emplean 12 µl de ADN extraído y 3 µl del tampón de carga en un tubo eppendorf®. Se centrifugan brevemente (un spin) los tubos para que se mezclen bien.

Se monta el gel en la cubeta de electroforesis horizontal y se depositan 10 µl de la muestra en los pocillos. Se le añade el tampón puente (TBE 0'5x) que se obtiene de una solución madre 10x con la siguiente composición:

- 108g de Tris Hidroximetil aminometano
- 55g de ácido bórico
- 7'45ml de EDTA disódico

Por último se conecta a la fuente de alimentación con un voltaje constante de 110 voltios durante 40 minutos, suficiente para que avance la carrera unos 6-7 centímetros. Posteriormente se visualizaron las muestras en el transiluminador Gel Doc™ XR.

5.4.2. CANTIDAD DEL ADN

La concentración de una muestra de ADN se puede evaluar realizando una espectrofotometría con luz UV, midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260nm. Una unidad de densidad óptica a 260 nm equivale aproximadamente a 50 µg/ml de ADN de doble cadena. La pureza de las muestras se puede evaluar mediante la relación de absorbancias A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230}.

En este estudio se ha utilizado el espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop 2000c que permite medir microvolúmenes. Se ha empleado 1 µl del ADN extraído de cada muestra y se ha colocado sobre la superficie de medición óptica. Se han realizado 3 mediciones de cada muestra.

5.5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para detectar las distintas especies animales de forma simultánea se llevó a cabo una PCR múltiple en la que se utilizaron cebadores de vaca, oveja, cabra y búfala (*Tabla 4*). Estos cebadores amplificaron fragmentos de ADN mitocondrial (genes 12S y 16S de ARNr).

Especies y genes	Cebadores	Tamaño del fragmento amplificado
Ovis aries (Gen 12S para el Forward y 16s para el Reverse)	**F:** 5´ - ATA TCA ACC ACA CGA GAG GAG AC – 3´ **R:** 5´- TAA ACT GGA GAG TGG GAG AT – 3´	172 pb
Capra hircus (Gen 12S para el Forward y para el Reverse)	**F**: 5´- CGC CCT CCA AAT CAA TAA G -3´ **R**: 5´- AGT GTA TCA GCT GCA GTA GGG TT -3´	326 pb
Bos taurus (Gen 12S para el Forward y el Reverse)	**F**: 5´- GTA CTA CTA GCA ACA GCT TA -3´ **R**: 5´- GCT TGA TTC TCT TGG TGT AGA G -3´	256 pb
Bubalus bubalis (Gen 12S para el Forward y el Reverse)	**F:** 5' – CTA GAG GAG CCT GTT CTA TAA TCG ATA A – 3´ **R:** 5' - TTC ATA ATA ACT TTC GTG TTG GGT GT – 3´	220 pb

Tabla 4. Cebadores utilizados para la amplificación del ADN extraído. F= Forward; R=Reverse. Pb = pares de bases.

La amplificación se realizó de acuerdo con las condiciones de Bottero *y* col. (2003) modificadas:

- <u>Condiciones de la mezcla de reacción</u>:

  Para la mayoría de las muestras, la reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl que contenían: 4 mM de buffer, 2'5 mM de Cl_2Mg, 1U

de Taq polimerasa, 0'2 mM de dNTPs, 25, 30 y 15 pmol de cebadores de vaca, cabra y oveja respectivamente y 3 µl del ADN extraído.

Cuando se incluyeron en la reacción los cebadores de búfala se modificaron las condiciones de reacción en los siguientes términos: un volumen final de 25 µl contenían 4 mM de buffer, 2'5 mM de Cl_2Mg, 0'75U de Taq polimerasa, 0'1 mM de dNTPs, 10 pmol de cada cebador (oveja, cabra, vaca y búfala), 3 µl de ADN y el resto agua osmotizada (tipo I) hasta llegar a los 25 µl.

En la siguiente tabla se muestran las cantidades de reactivos utilizadas en cada reacción para una sola muestra según se haya empleado o no los cebadores de búfala.

	Sin cebadores de búfala		Con cebadores de búfala	
Reactivos	**Concentración**	**Volumen (µl)**	**Concentración**	**Volumen (µl)**
Buffer	4mM	2'5	4 mM	2'5
Cl2Mg	2'5 mM	1'25	2'5 mM	1'25
dNTPs	0'2 mM	4	0'1 mM	2
Cebadores Bos Taurus	25 pmol	5	10 pmol	2
Cebadores Capra hircus	30 pmol	6	10 pmol	2
Cebadores Ovis aries	15 pmol	3	10 pmol	2
Cebadores Bubalus bubalis	-	-	10 pmol	2
Taq polimerasa	1U	1	0'75U	0'75
ADN	-	3	-	3
Agua	-	-	-	7'5
TOTAL		25'75		25

Tabla 5. Concentraciones y volúmenes empleados de cada reactivo para la PCR. Muestras sin cebadores de búfala a la izquierda y muestras con cebadores de búfala a la derecha.

- Condiciones de amplificación:

  La PCR se llevó a cabo en un termociclador Peltier ptc-200, en el que se diseñó un programa térmico formado por una primera etapa a 94ºC durante 5 min., seguido de 35 ciclos que comprendían una primera fase de desnaturalización a

94ºC durante 30 seg., una fase de hibridación a 55ºC durante 1 min. y una fase de extensión de la cadena a 75ºC durante 1 min. Finalizó con una extensión a 72ºC durante 5 min.

La visualización de los productos de la PCR se realizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%, con un voltaje continuo de 110 voltios durante 75 minutos, tiempo necesario para que el fragmento más pequeño (oveja = 172 pb) se pueda detectar.

5.6. LÍMITE DE DETECCIÓN

Con el fin de determinar la sensibilidad del método empleado se prepararon 6 muestras mezclando leche de vaca y oveja, variando la proporción de la leche de oveja en 0'1%, 0'5%, 1%, 2%, 5% y 100% (vol/vol).
Se realizó la extracción de ADN de estas 6 muestras con el método seleccionado, se amplificaron posteriormente por PCR y se visualizaron los resultados en un gel de agarosa al 2%.

5.7. OTRAS HERRAMIENTAS

Para la realización del presente trabajo, se ha utilizado el procesador de texto Microsoft Word y el Excel como procesador de base de datos, ambos de la versión 2010 del paquete ofimático Microsoft Office.

Se ha empleado Refworks como gestor bibliográfico tanto en la web como el complemento en Microsoft Word.

6. RESULTADOS

6.1. SELECCIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN a partir de leche y productos lácteos se realizó con dos métodos diferentes: el método HotSHOT y la técnica de extracción con columnas (kit comercial G-Spin™).
Para determinar la validez de los dos protocolos y la calidad del producto obtenido se utilizaron parámetros como la integridad, pureza y cuantificación. Así mismo se determinó si a partir del ADN extraído era posible la amplificación.

La integridad del ADN extraído a partir de 5 muestras (4 muestras de queso y 1 muestra de yogur) se evaluó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0'8% (*Figura 9*). Se considera que una muestra de ADN es íntegra cuando se observa una banda discreta en el gel de agarosa, conforme se va perdiendo definición de esa banda y aparece una estela a lo largo del gel se considera que la muestra pierde calidad.

El método de extracción con columnas permitió obtener un ADN íntegro **(B)** en la mayoría de los casos, mientras que en las muestras extraídas por HotSHOT se observan impurezas en la parte superior de la carrera **(A).** Hay que señalar que en las muestras de yogur (calles 5 y 10), aunque apenas se observa ADN en el gel, sí que amplifica posteriormente en la PCR.

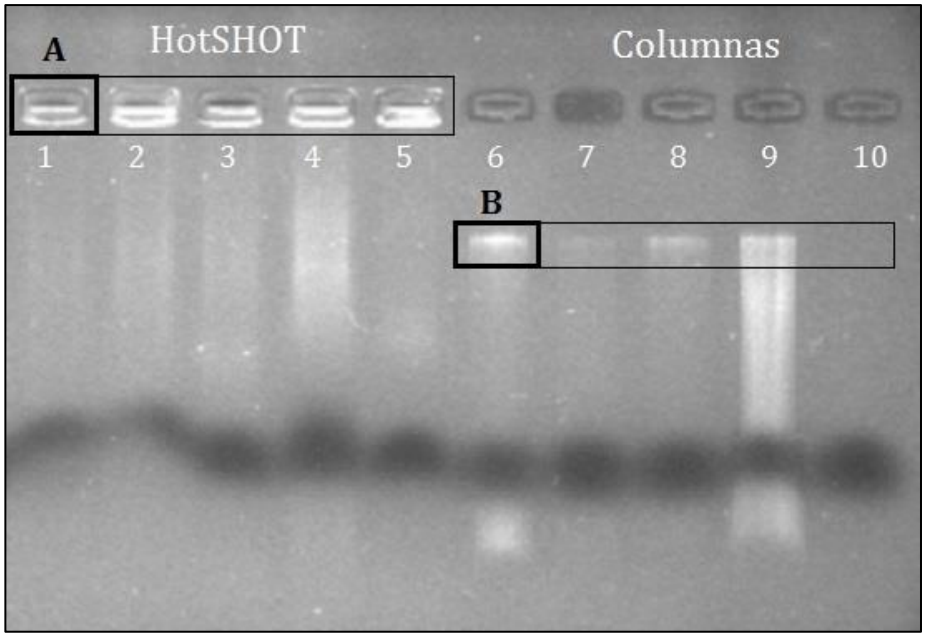

Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa del ADN extraído de 5 muestras por ambos métodos. HotSHOT (Calles 1-5) y columnas (calles 6-10).

La pureza y cantidad de ADN extraído se valoraron mediante una espectrofotometría con luz UV. La cantidad de ADN se obtiene midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260nm, y la pureza de las muestras se determinó gracias a la relación de absorbancias A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} (*Tabla 6*).

Se considera que un ADN es de pureza óptima cuando A_{260}/A_{280} tiene un valor entre 1'8-2'0. Un ADN de pureza aceptable debe tener una relación $A_{260}/A_{280} > 1'6$, y valores inferiores a 1'6 o superiores a 2'1 indican distintas contaminaciones de la muestra.

En general se considera que el ADN es puro cuando la relación A_{260}/A_{230} se sitúa entre 1'5-2'2. Valores inferiores a 1'5 indicarían que la muestra está contaminada, no obstante la relación A_{260}/A_{230} es más variable que la relación A_{260}/A_{280} dependiendo de factores como la concentración de ADN o de la composición del tampón.

Relación	Valor	Pureza
A_{260}/A_{280}	1'8-2'0	ADN de pureza óptima
	1'6-1'8	ADN de pureza aceptable
	<1'6	Presencia de compuestos aromáticos
	>2'1	Contaminación con ARN
A_{260}/A_{230}	1'5-2'2	ADN puro
	<1'5	Contaminación con sales, carbohidratos, fenoles

Tabla 6. Valores indicativos de pureza en muestras de ADN según las relaciones de absorbancia A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230}.

Con los datos obtenidos en las distintas mediciones se han calculado los estadísticos (media, mediana y desviación típica) que nos permiten comparar los dos métodos de extracción (*Tabla 7*). Se puede observar que con el método HotSHOT se obtiene más cantidad de ADN, sin embargo, con el método de extracción con columnas el ADN extraído es de mayor calidad, según la relación de $A_{260/280}$.

Muestra		**QUESO**		**YOGUR**	
Método		HotSHOT	Columnas	HotSHOT	Columnas
Concentración (ng/µl)	Media	**839'65**	11'02	**244'5**	1'65
	Mediana	652'2	7'15	105'5	2'45
	D.T.	740'51	12'54	283'9	1'77
$A_{260/280}$	Media	1'16	**2'27**	1'47	**1'78**
	Mediana	1'04	2'11	1'56	2'06
	D.T.	0'43	0'61	0'16	0'74
$A_{260/230}$	Media	0'22	0'47	0'61	0'01
	Mediana	0'22	0'46	0'64	0'02
	D.T.	0'08	0'04	0'21	0'01

Tabla 7. Comparación de la concentración de ADN y las relaciones de A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} obtenidas a partir de los métodos de extracción ensayados. D.T.=Desviación típica.

Por último se realizó la amplificación del ADN extraído mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se visualizaron los productos en un gel de agarosa al 2%. Como se puede observar en la *Figura 10*, los dos métodos proporcionan ADN válido para ser amplificado por PCR. Con la extracción mediante columnas se aprecian bandas más nítidas sobre todo de las muestras de las calles 1 y 8 que representan un queso de 3 especies (oveja, cabra y vaca); las calles 2 y 9 que representan un queso de oveja y las calles 5,6,7 por un lado y 12, 13, 14 por otro, representando todos ellos muestras de yogur con distintos volúmenes (5 y 12 = 75 µl, 6 y 13 = 100 µl, 7 y 14 = 200 µl).

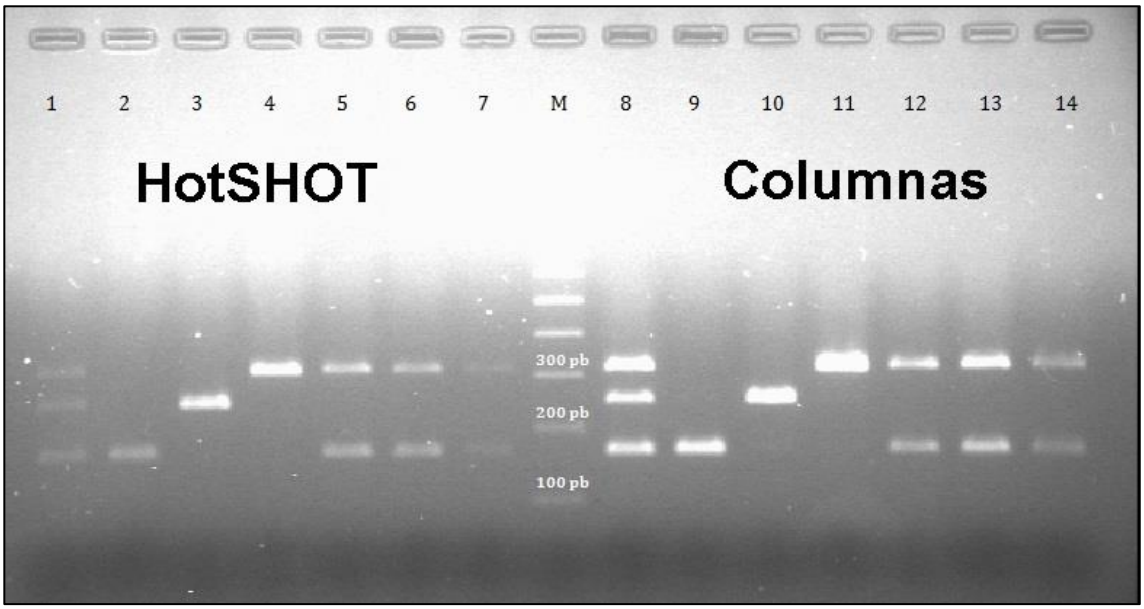

Figura 10. Análisis electroforético de los productos PCR amplificados a partir de 7 muestras tras la extracción del ADN con los dos métodos utilizados. M= marcador de 100 pb.

Se valoraron estos resultados y se seleccionó el método de extracción por columnas (kit comercial G-Spin™) para identificar la especie de origen en productos lácteos comerciales de distinta procedencia.

6.2. IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE DE ORIGEN EN PRODUCTOS LÁCTEOS COMERCIALES

Para identificar la especie de origen de los productos lácteos analizados se realizó la extracción de ADN de todas las muestras del estudio mediante el kit de extracción G-Spin™ y posteriormente se realizó la amplificación con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En la *Figura 11* se observan los fragmentos amplificados a partir de muestras de quesos de oveja, vaca y cabra. En cada uno de ellos se observa una sola banda correspondiente a un fragmento único de 172 pb en el queso de oveja, 256 pb en el queso de vaca y 326 pb en el queso de cabra.
En la *Figura 12* se observan los fragmentos amplificados a partir de muestras de yogur elaborado con leche de diversas especies (búfala, oveja, cabra y mezcla oveja-cabra), así como muestras de leche de oveja, vaca y cabra. Los fragmentos amplificados a partir de yogures elaborados con leche de una sola especie son fragmentos únicos y se corresponden en tamaño con los que se amplifican a partir de muestras de leche de esa especie (172 pb y 326 pb en el caso de oveja y cabra respectivamente). En la muestra correspondiente al yogur de búfala el fragmento amplificado coincide con el tamaño esperado (220 pb). En las muestras de yogur elaborados a partir de mezclas de leche (oveja y cabra) se amplifican dos fragmentos correspondientes a cada una de las especies implicadas.

Cabe destacar que en los quesos etiquetados como de una sola especie no se detectó ningún fraude (*Figura 11*), al igual que en los yogures y en la leche (*Figura 12*), mientras que sí que se detectaron fraudes en algunos de los quesos de mezcla. En particular, en un queso etiquetado como "oveja, cabra y vaca" sólo se detectó oveja y vaca; en un queso etiquetado como "oveja, cabra y vaca" y en otro queso etiquetado como "vaca y cabra" sólo se detectó ADN de vaca (*Figuras 13 y 14*).

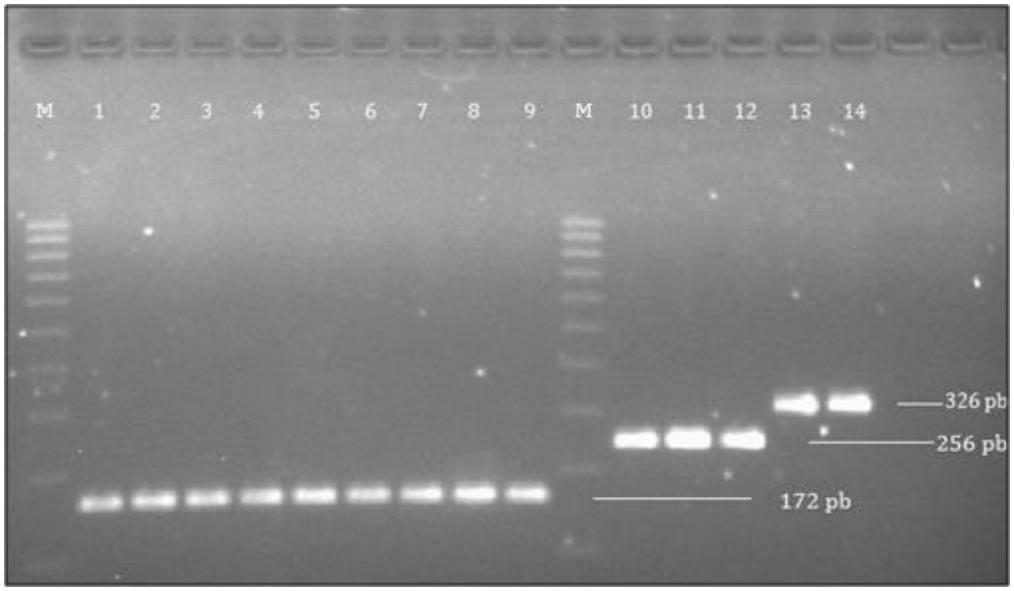

Figura 11. Análisis electroforético de los productos PCR amplificados a partir de muestras de quesos de oveja (calles 1-9), vaca (10-12) y cabra (13 y 14). M=marcador de 100 pb.

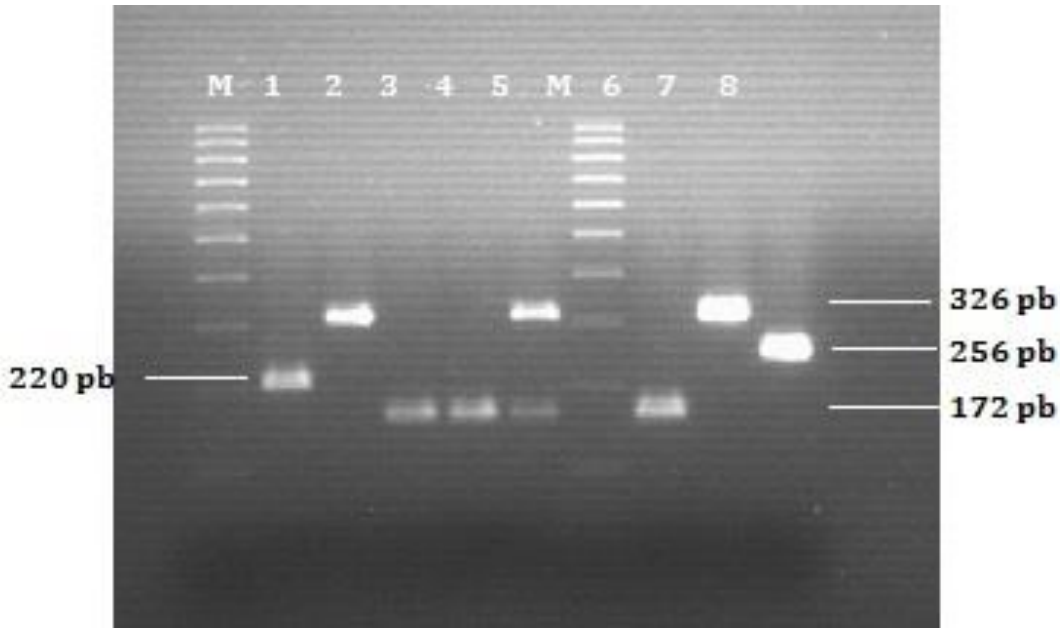

Figura 12. Análisis electroforético de los productos PCR de muestras de yogur (calles 1-5) y leche (calles 6-8). La calle 1 se corresponde al yogur de búfala, la calle 2 se corresponde al yogur de cabra, las calles 3 y 4 corresponden a yogures de oveja y la calle 5 corresponde a un yogur de oveja y cabra. Las calles 6, 7 y 8 corresponden a muestras de leche (oveja, cabra y vaca respectivamente). M= marcador de 100pb.

En la *Figura 13* se muestran los resultados de los productos amplificados a partir de muestras de quesos elaborados. Una de las muestras (calle 2), correspondiente a un queso etiquetado como oveja, cabra y vaca, presenta tan solo una banda, correspondiente al fragmento de vaca (256 pb).

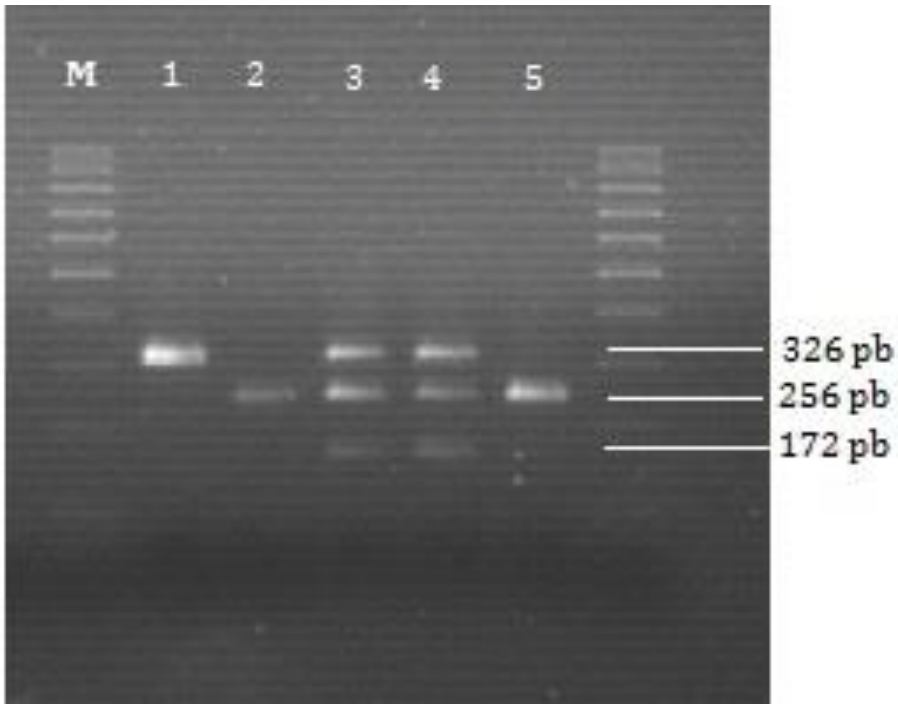

Figura 13. Análisis electroforético de los productos PCR de muestras de quesos comerciales. Calle 1, queso de cabra. Calle 2, queso de vaca, etiquetado como "vaca, oveja y cabra". Calles 3 y 4, quesos de vaca, oveja y cabra. Calle 5, queso de vaca. M= marcador de 100 pb.

En la *Figura 14* se muestran los resultados de los productos amplificados a partir de muestras de quesos elaborados con mezclas de leche de distintas especies. Una de las muestras (calle 3,), correspondiente a un queso etiquetado como "vaca y oveja" presenta las dos bandas correspondientes a los fragmentos de esas dos especies, aunque el fragmento correspondiente al ADN de oveja (**A**) es muy tenue. Esto se debe probablemente a que la cantidad de ADN de oveja es muy pequeña, y por ello no amplifica de la misma forma que el ADN de la vaca.

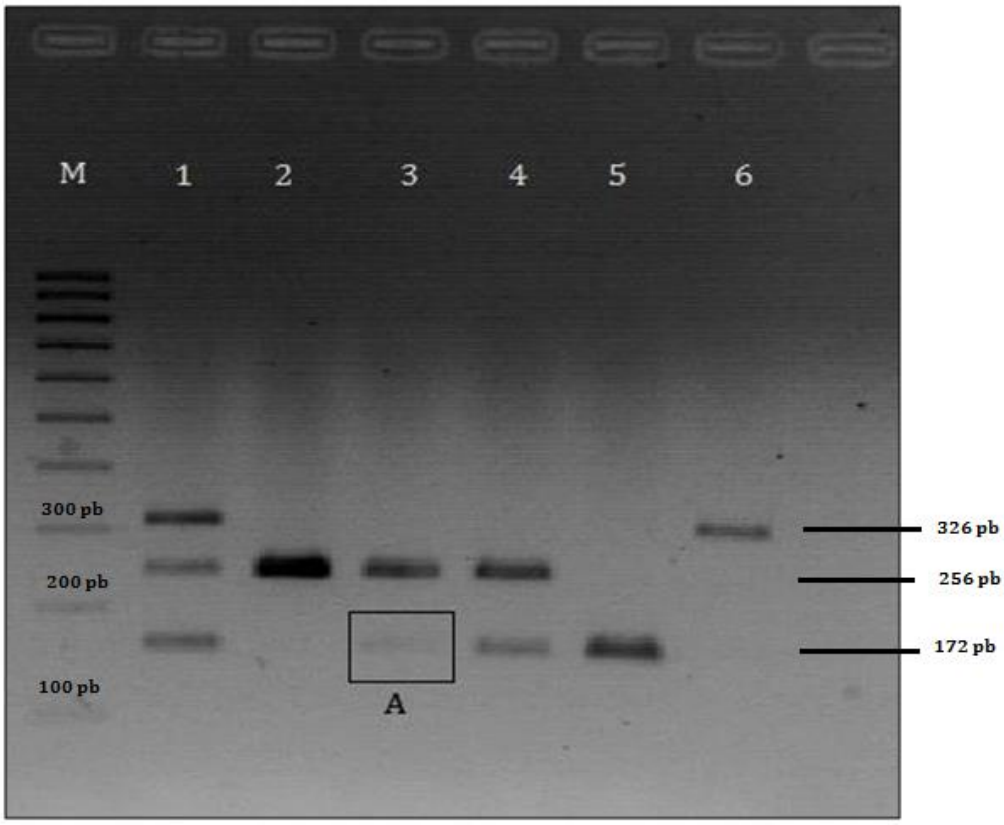

Figura 14. Análisis electroforético de los productos PCR amplificados a partir de muestras de quesos comerciales. Calle 1, queso de oveja, cabra y vaca; calle 2, queso de vaca (etiquetado como "vaca y cabra"); calle 3, queso de vaca y oveja; calle 4, queso de vaca y oveja (etiquetado como "vaca, oveja y cabra"); calle 5, queso de oveja; calle 6, queso de cabra. A= fragmento tenue de ADN amplificado. M=marcador de 100 pb.

Se realizó una segunda extracción de ADN de aquellos quesos en los que se había detectado la adulteración del producto con respecto al etiquetado, junto con otras muestras (yogur y leche). Los resultados obtenidos fueron los mismos de la primera extracción.

En la *Figura 15* se observan los resultados de los productos amplificados. En la calle 2 se encuentra un queso de vaca y oveja, etiquetado como "oveja, cabra y vaca", aunque el fragmento correspondiente al ADN de oveja **(A)** es muy tenue, debido probablemente a que no haya amplificado correctamente, ya que en la *Figura 14*, éste fragmento si se visualiza con claridad.

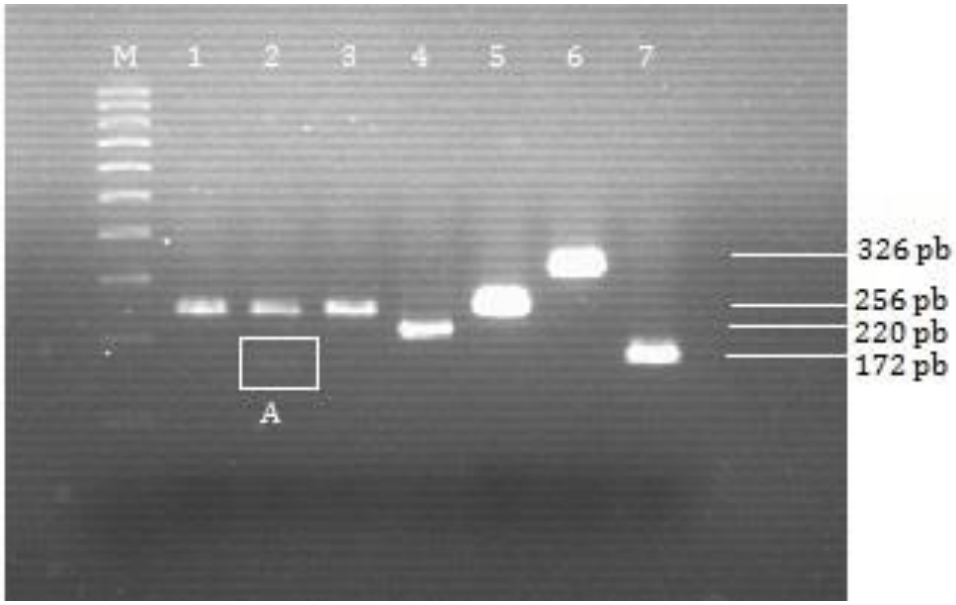

Figura 15. Análisis electroforético de los productos PCR de distintas muestras. Calle 1, queso de vaca, etiquetado como "oveja, cabra y vaca". Calle 2, queso de vaca y oveja, etiquetado como "oveja, cabra y vaca". Calle 3, queso de vaca, etiquetado como "vaca y cabra". Calle 4, yogur de búfala. Calle 5, leche de vaca. Calle 6, leche de cabra. Calle 7, leche de oveja. A=fragmento tenue de ADN amplificado. M = marcador de 100 pb.

En la *Tabla 8* se relacionan los productos analizados, la información de su etiquetado y los resultados obtenidos en nuestros análisis PCR.

Muestra	Tipo de producto	Etiquetado	Especie identificada mediante PCR
1	Queso	Oveja	Oveja
2	Queso	Oveja	Oveja
3	Queso	Oveja	Oveja
4	Queso	Oveja	Oveja
5	Queso	Oveja	Oveja
6	Queso	Oveja	Oveja
7	Queso	Oveja	Oveja
8	Queso	Oveja	Oveja
9	Queso	Oveja	Oveja
10	Queso	Vaca	Vaca
11	Queso	Vaca	Vaca
12	Queso	Vaca	Vaca
13	Queso	Cabra	Cabra
14	Queso	Cabra	Cabra
15	Queso	Oveja, cabra y vaca	Oveja, cabra y vaca
16	Queso	Oveja, cabra y vaca	Oveja, cabra y vaca
17	Queso	Oveja, cabra y vaca	Oveja, cabra y vaca
18	Queso	Oveja, cabra y vaca	Vaca
19	Queso	Cabra	Cabra
20	Queso	Cabra	Cabra
21	Queso	Oveja	Oveja
22	Queso	Oveja, cabra y vaca	Oveja y vaca
23	Queso	Vaca y oveja	Vaca y oveja
24	Queso	Cabra y vaca	Vaca
25	Queso	Oveja, cabra y vaca	Oveja, cabra y vaca
26	Yogur	Búfala	Búfala
27	Yogur	Cabra	Cabra
28	Yogur	Oveja	Oveja
29	Yogur	Oveja	Oveja
30	Yogur	Oveja y cabra	Oveja y cabra
31	Leche	Oveja	Oveja
32	Leche	Cabra	Cabra
33	Leche	Vaca	Vaca

Tabla 8. Etiquetado e identificación de las 33 muestras del estudio. En color se señalan los fraudes alimentarios que se han detectado.

De las 33 muestras analizadas, en treinta de ellas el análisis electroforético del producto amplificado confirmaba la información que se daba en el etiquetado en relación a la especie o especies de origen.

En tres de las muestras analizadas no se corresponde el etiquetado con nuestras determinaciones (muestras 18, 22 y 24). La muestra 18 está etiquetada como queso de oveja, cabra y vaca. En este caso se detectó solo un fragmento amplificado de 256 pb correspondiente a ADN de vaca (*Figura 13, calle 2*). La muestra 22 está etiquetada como queso de oveja, cabra y vaca. En este caso se detectaron dos fragmentos amplificados, de 256 y 172 pb correspondiente a ADN de vaca y oveja respectivamente (*Figura 14, calle 4*). La muestra 24 está etiquetada como queso de cabra y vaca. En este caso se detectó solo un fragmento amplificado de 256 pb correspondiente a ADN de vaca (*Figura 14, calle 2*).

Para analizar la sensibilidad del método se analizaron diluciones seriadas mezclando leche de vaca y oveja, variando la proporción de la leche de oveja en 0'1%, 0'5%, 1%, 2%, 5% y 100% (vol/vol). Como se observa en la *Figura 16,* el mínimo de leche de oveja detectado mediante PCR es del 0'5%.

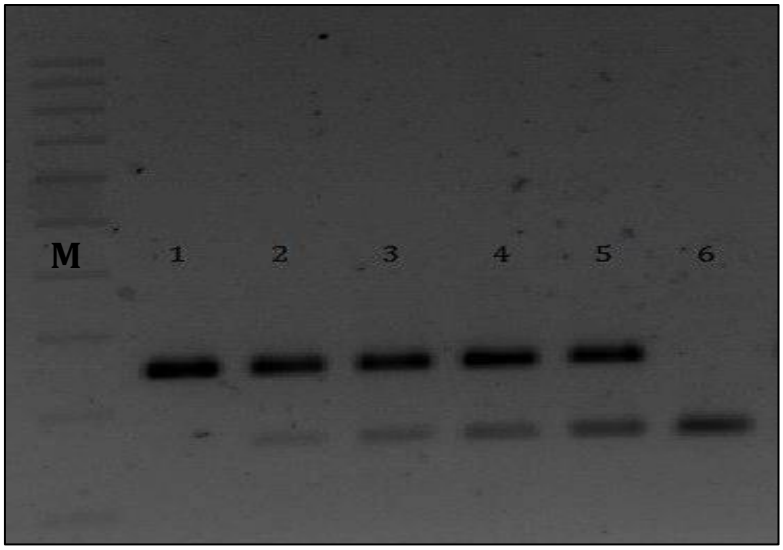

Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados por PCR de una serie de diluciones para detectar la sensibilidad del método de extracción de ADN. Calles 1, 2, 3, 4, 5 y 6 con 0'1%, 0'5%, 1%, 2%, 5% y 100 % de leche de oveja respectivamente. M=Marcador de 100 pb.

7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se compararon dos métodos de extracción para obtener ADN en cantidad y calidad, con el fin de seleccionar uno de ellos para identificar la especie de origen en productos lácteos comerciales. Los resultados muestran gran diferencia en cuanto a la concentración y calidad del ADN obtenido en función de los dos métodos de extracción.

La cuantificación del ADN obtenido en las muestras se realiza midiendo la absorbancia de las mismas a 260 nm, y la pureza del ADN se evalúa con las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230.

Con los dos métodos ha sido posible amplificar y analizar fragmentos de ADN específico de especie incluso a partir de muestras de ADN degradado.

En nuestro trabajo, en cuanto a la calidad del ADN cabe mencionar que todas las pruebas realizadas han dado mejores resultados con el método de extracción con columnas. Aunque el HotSHOT es un método más rápido, sencillo y barato que el método de extracción con columnas, con éste último se obtiene un ADN con menos contaminantes, probablemente por la eficacia en la eliminación de distintos componentes (ARN, proteínas, fenoles). Este hecho se comprueba con la electroforesis del ADN extraído en la que se observa la banda de ADN íntegro; así como lo muestran las mediciones espectrofotométricas, dado que los valores de la relación de absorbancias 260/280 se encuentran dentro de los valores óptimos; y en último lugar observando los resultados de la amplificación del ADN, que presenta bandas más nítidas con el método de extracción con columnas. Por estos motivos se seleccionó el método de extracción con columnas para la extracción de ADN y posterior identificación de la especie de origen en productos lácteos comerciales.

El método HotSHOT se ha utilizado en otros estudios para extraer ADN genómico de muestras de tejido de ratón (De Jesús y col., 2005), y también se han obtenido resultados similares a los nuestros en cuanto a concentración y calidad.

En concreto se comparó con el método Salting-out (Precipitación salina). Aunque el tipo de muestras era diferente (sangre y tejido de ratón), los resultados mostraron menor concentración de ADN con el método de precipitación salina (45'00 µg/ml), en comparación al método HotSHOT (368'30 µg/ml), pero se obtuvo mayor calidad de la muestra, siendo la relación de absorbancia A_{260}/A_{280} de 1'2 para el método HotSHOT y 1'7 para el método de la precipitación salina.

En nuestro estudio, con el método de extracción con columnas, hemos obtenido valores de absorbancia de 2'27 para el queso y 1'78 para el yogur. Estos datos son similares e incluso superiores a los encontrados por Volk y col., (2014), en un estudio en el que comparan 6 kits comerciales de extracción de ADN en productos lácteos comerciales (rango de absorbancia 260/280 entre 1'34 y 1'87).

El kit comercial G-Spin™ se ha empleado para extraer ADN bacteriano (Cho y col., 2007), pero de éste método no se realizó análisis electroforético ni espectrofotométrico. Uno de los kits comerciales más usados en la extracción de ADN de productos lácteos comerciales es el "DNeasy® Tissue Kit" (Qiagen) (Bottero y col., 2003; Di Pinto y col. 2007).

En relación al coste económico del método de extracción seleccionado, cada columna cuesta 1'75 €, las 33 muestras nos han salido por 57'75€. En relación a otros kits comerciales utilizados para la extracción de ADN de productos lácteos, el que hemos elegido es relativamente económico, ya que hay algunos cuyo coste se encuentra entre los 3-3'5 € por muestra, como es el caso del "NucleoSpin Food kit" (3'32€/muestra), o "DNeasy mericon Food kit" (3'47€/muestra). Aunque también los hay más económicos como es el caso del "DNeasy Blood and Tissue kit" (1'44€/muestra) (Volk y col., 2014).

Cabe mencionar que a pesar de que se ha seleccionado el mejor método para la extracción del ADN, se observan productos de la PCR poco definido, como por ejemplo, en una muestra de queso el fragmento amplificado correspondiente al ADN de oveja apenas es visible. Esto es debido probablemente a que la cantidad de ADN de oveja es muy pequeña, y por ello no amplifica de la misma forma que el

ADN de la vaca. No obstante, la cantidad de ADN de oveja ha sido suficiente para ser amplificado debido a que la sensibilidad de detección de la PCR ha resultado en un 0'5%.

Se han realizado diversos estudios que emplean técnicas muy diversas para la identificación de la especie de origen en productos lácteos comerciales. Técnicas basadas en el análisis de proteínas como la cromatografía (Stanciuc y Rapeanu, 2010), electroforesis capilar (Cartoni y col., 1999) o técnicas inmunológicas como el ELISA (Zeleňáková y col., 2008); y en los últimos años se han extendido las técnicas basadas en el análisis de ADN, incluyendo la amplificación de ADN mediante PCR utilizando cebadores de distintas especies que permiten su identificación (Bania y col., 2001).

En este trabajo se ha llevado a cabo una PCR múltiple para la identificación de la especie de origen (vaca, oveja, cabra y búfala) en productos lácteos comerciales de distinta procedencia, utilizando cebadores específicos de dos genes mitocondriales: 12S y 16S de ARNr (Bottero y col., 2003; Darwish y col., 2009). La identificación de la especie de origen por PCR se determina principalmente por la especificidad de los cebadores utilizados (López-Calleja y col., 2005b), por ello se han desarrollado cebadores específicos para la detección de la especie animal en productos lácteos mediante PCR simple o múltiple (Branciari y col., 2000; Bottero y col., 2002, 2003; López-Calleja y col., 2004).

En nuestro caso hemos conseguido diferenciar ADN procedente de 4 posibles especies en una sola reacción de PCR múltiple. Aunque la optimización de los parámetros en una reacción múltiple es más compleja que en una reacción simple, tiene la ventaja de que permite un ensayo rápido, reduciendo el coste de cada análisis, lo que representa un gran ventaja para la implantación de la técnica como método rutinario de control de calidad.

Los fragmentos de los productos amplificados en la PCR múltiple correspondieron a los tamaños esperados, siendo dichos fragmentos específicos de 172 pb para las muestras de oveja, 220 pb para la muestra de búfala, 256 pb para las muestras de

vaca y 326 pb para las muestras de cabra. Estas claras diferencias de tamaño nos han permitido identificar de forma inequívoca la especie de origen del producto analizado.

Según esto, se pudo detectar la adulteración de tres de los 25 quesos, el 12%, de este estudio. En particular, en un queso etiquetado como "oveja, cabra y vaca" sólo se detectó oveja y vaca; en un queso etiquetado como "oveja, cabra y vaca" y en otro queso etiquetado como "vaca y cabra" sólo se detectó ADN de vaca.

Hay diversos estudios que indican la adulteración de los productos lácteos, principalmente en quesos de oveja o cabra "puros", mientras que en nuestro estudio, se han detectado adulteraciones en quesos etiquetados como mezcla de varias especies por la ausencia de una o dos de las especies mencionadas en el etiquetado.

En un estudio realizado por Stanciuc y Rapeanu (2010), en el que se analizaron mediante inmunocromatografía muestras de queso etiquetado como oveja y cabra, hallaron leche de vaca en el 67'3% de los quesos de oveja y en el 79'7% de los de cabra.

Di Pinto y col., (2004) mediante una PCR en la que se amplificó un fragmento correspondiente al citocromo b Bovino, evaluaron 30 quesos de Mozzarella y en 22 de ellos hallaron leche de vaca no presente en el etiquetado.

Maskova y Paulickova (2006), analizando mediante una PCR la secuencia de ADN mitocondrial que codifica el citocromo b, detectaron leche de vaca en el 17'6% de los quesos de cabra y en el 14'2% de los quesos de oveja analizados.

Špoljarić y col., (2017) desarrollaron un estudio en el que analizaron mediante isoelectroenfoque 133 quesos de oveja y cabra que fueron seleccionados de forma aleatoria durante un período de cuatro años. La determinación se basó en diferenciar los puntos isoeléctricos de las γ_2/γ_3-caseínas, presentes en la leche de

vaca, con los puntos isoeléctricos de las caseínas de la leche de oveja y cabra. El 30% de los quesos analizados no se correspondían con el etiquetado.

La sensibilidad del método de extracción por columnas se ha evaluado añadiendo 0'1, 0'5, 1, 2, 5 y 100% (vol/vol) de leche de oveja a leche de vaca. El límite de detección de la técnica ha sido del 0'5%. En estudios previos basados en la autentificación de productos lácteos mediante PCR, y particularmente para la identificación de especies en queso, presentan una sensibilidad similar o inferior.

Bottero y col., (2003) obtuvieron un límite de detección de 0'5% empleando una PCR múltiple, al igual que en nuestro estudio, que identificaba la presencia de vaca, cabra y oveja en productos lácteos. Mafra y col., (2004) y Maudet y Taberlet (2001) obtuvieron un límite de detección del 0'1%, detectando leche de vaca en quesos de oveja y cabra con una PCR simple y doble respectivamente. Rea y col., (2001) obtuvieron un límite de detección del 1% usando una PCR doble para identificar leche de vaca en leche de búfala en el queso Mozzarella.

8. LÍNEAS FUTURAS

Se debe seguir investigando para desarrollar un método de extracción de ADN que sea rápido, económico, sensible y eficaz.

Sería necesario ampliar el número de muestras y la variedad de las mismas, con objeto de conocer la incidencia de fraudes en la industria láctea.

Se podría desarrollar una PCR cuantitativa, que en una sola reacción y sin necesidad de electroforesis nos permita la identificación y cuantificación de distintas especies.

9. CONCLUSIONES

1. Cualquier método de extracción de ADN puede ser utilizado para identificar la especie en productos de origen animal.

2. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple descrita en este trabajo es específica y sensible, amplificando fragmentos génicos especie-específicos que han permitido la identificación de leche de vaca, cabra, oveja, y búfala en productos lácteos.

3. Ésta PCR puede ser utilizada de forma rutinaria para la identificación de la especie de origen en productos lácteos comerciales.

4. En la industria alimentaria, y particularmente en la industria láctea, es necesario emplear técnicas de identificación de especies en los productos de origen animal para proteger a los consumidores de posibles adulteraciones.

10. BIBLIOGRAFÍA

-Addeo, F., Stingo, C., Chianese, L., Petrilli, P., Scudiero, A., Annelli, G. (1983). Isoelectrofocusing of caseins for the identification of bovine milk in water buffalo mozzarella cheese. *Il Latte* 8 (11), 795-803.

-Addeo, F., Mojo, L., Chianese, L., Nota, G. (1989). Evaluation of bovine and water buffalo milk in mixteures of liquid milk and mozzarella cheese by gel isoelectric focusing. *Journal of Food Science* 1 (3), 71-80

-Addeo, F., Pizzano, R., Nicolai, M.A., Caira, S., Chianese, L. (2009). Fast isoelectric focusing and anti-peptide antibodies for detecting bovine casein in adulterated water buffalo milk and derived Mozzarella cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 10063–10066

-Aranguren-Méndez, J., Portillo, M., Ruiz, J., Villasmil-Ontiveros, Y., Yáñez, L., Borjas, L., Zabala, W. (2009). Identificación de especies en productos de origen animal mediante PCR. *Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia,* 19 (2), 159-164.

-Ashoot, S.H., Monte, W.C., Stiles, P.G. (1988). Liquid chromatographic identification of meats. *Journal Association of Official Analytical Chemists* 71, 397-403.

-Avise, J.C., Reeb, C.A., Saunders, N.C. (1987). Geographic population structure and species differences in mitochondrial DNA of Mouthbrooding marine catfishes (*Ariidae*) and demersal spawning toadfishes (*Batrachoididae*). *Evolution,* 41, (5), 991-1002.

-Bania, J., Urgorski, M., Polanowski, A., Adamezyk, G. (2001). Application of polymerase chain reaction for detection of goats' milk adulteration by milk of cow. *Journal of Dairy Research* 68, 333-336.

-Berrini, A., Tepedino, V., Borromeo, V., Secchi, C. (2006). Identification of freshwater fish commercially labelled "perch" by isoelectric focusing and two-dimensional electrophoresis. *Food Chemistry* 96, 163-168.

-Bobková, A., Židek, R., Flimelová, E., Bobko, M., Fiková, M. (2009). Application of PCR method for milk adulteration and milk products identification. *Potravinárstvo* 3 (1), 1-3.

-Bottero, M.T., Civera, T., Anastasio, A., Turi, R.M., Rosati, S. (2002). Identification of cow's milkin "buffalo" cheese by dúplex polymerase chain reaction*. Journal of Food Protection* 65, 362-366.

-Bottero, M.T., Civera, T., Nucera, D., Rosati, S., Sacchi, P., Turi, R.M. (2003). A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows', goats', and sheep's milk in dairy products *International Dairy Journal* 13, 277-282.

-Bottero, M.T., Dalmasso, A. (2011). Animal species identification in food products: Evolution of biomolecular methods. *The Veterinary Journal*, 190, 34-38.

-Bramanti, E., Sortino, C., Onor, M., Beni, F., Raspi, G. (2003). Separation and determination of denatured alpha(s_1)-, alpha(s_2)-, beta- and kappa-caseins by hydrophobic interaction chromatography in cows', ewes' and goats' milk, milk mixtures and cheeses. *Journal of Chromatography A* 994(1-2), 59-74.

-Branciari, R., Nijman, I.J., Plas, M.E., Di Antonio, E., Lenstra, J.A. (2000). Species origin of milk in Italian Mozzarella and Greek Feta cheese. *Journal of Food Protection,* 63,408-411.

-Calvo, J.H., Osta, R., Zaragoza, P. (2001). A quick and more sensitive method to identify pork in processed and unprocessed food by PCR amplification of a new specific DNA fragment. *Journal of American Society of Animal Science,* 79, 2108-2112.

-Carpi, F.M., Di Pietro, F., Vincenzetti, S., Mignini, F., Napolioni, V. (2011) Human DNA extraction methods: patents and applications. *Recent Patents on DNA and Gene Sequences Journal,* 5 (1):1–7.

-Cartoni, G., Coccioli, F., Jasionowska, R., Masci, M. (1999). Determination of cows' milk in goats' milk and cheese by capillary electrophoresis of the whey protein fractions. *Journal of Chromatography A,* 846 (1-2), 135-141.

-Cho, K.M., Hong, S.Y., Lee, S.M., Kim, Y.H., Kahng, G.G., Lim, Y.P., Kim, H., Yun, H.D. (2007). Endophytic bacterial communities in Ginseng and their antifungal activity against pathogens. *Microbial Ecology,* 54 (2), 341-351.

-Colak, H.A., Aydin, B. N., Ergun, O. (2006). Detection of presence of cow's milk in sheep's cheeses by immunochromatography. *Food Control*, 17, 905-908.

-Comisión Europea (2008). Commission Regulation (EC) No 273/2008 of 5 March 2008 laying down detailed rules for the application of Council Regulation (EC) No. 1255/1999 as regards methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products. *Official Journal of the European Union*, 29.3.2008, L 88/1.

-Comisión Europea (2015). Food Fraud Network Activity Report. Disponible en https://ec.europa.eu/food/safety/food-fraud/reports_en

-Csikos, A., Hodzic, A., Pasic-Juhas, E., Javor, A., Hrković-Porobija, A., Goletic, T., Czegledi, L. (2016). Applicability and sensitivity of PCR-SSCP method for milk species identification in cheese. *Acta Alimentaria*, 45 (1), 69-76.

-Dalmasso, A., Sacchi, P., Bottero, M.T. (2012). Development of a real-time PCR assay for the detection of cow and donkey milk. *European Food Research and Technology*, 235, 47-52.

-D'Angelo, F., Santillo, A., Sevi, A., Albenzio, M. (2007). A simple salting-out method for DNA extraction from milk somatic cells: investigation into the goat CSN1S1 gene. *Journal of Dairy Science*, 90, 3550-3552.

-Darwish, S.F., Allam, H.A., Amin, A.S. (2009). Evaluation of PCR assay for detection of cow's milk in water buffalo's milk. *World Applied Sciences Journal,* 7 (4), 461-467.

-De Jesús, R., Moreno, N., Martínez, J.A. (2005). Ensayo de dos métodos de extracción de ADN de ratón para ser usado en el control genético de ratones consanguíneos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia,* 15, (2), 134-140.

-De La Fuente, M.A., Juárez, M. (2005). Authenticity assessment of dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 563-585.

-Di Domenico, M., Di Giuseppe, M., Wicochea Rodríguez, J.D., Cammà, C. (2017). Validation of a fast real-time PCR method to detect fraud and mislabeling in milk and dairy products. *Journal of Dairy Science,* 100, 106-112.

-Di Pinto, A., Conversano, M.C., Forte, V.T., Novello, L., Tantillo, G. (2004). Detection of cow milk in buffallo "Mozzarella" by polymerase chain reaction (PCR) assay. *Journal of Food Quality*, 27, 428-435.

-Di Pinto, A., Forte, V., Guastadisegni, M.C., Martino, C., Schena, F.P., Tantillo, G. (2007). A comparison of DNA extraction methods for food analysis. *Food Control*, 18, 76-80.

-Doyle, K. (1996). The source of discovery: Protocols and applications guide. *Ed.: Promega*, Madison, Wisconsin, USA.

-El Rady, A., Sayed, M. (2006). Identification of milk source by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 1*4, 146–155.

-Enne, G., Elez, D., Fondrini, F., Bonizzi, I., Feligini, M., Aleandri, R. (2005). High-performance liquid chromatography of governing liquid to detect ilegal bovine milk addition in wáter buffalo Mozzarella: Comparison with results from raw milk and cheese matrix. *Journal of Chromatography A,* 1094 (1-2), 169-178.

-Fajardo, V., González, I., López-Calleja, I., Martin, I., Hernández, P.E., García, T., Martín, R. (2006). PCR–RFLP authentication of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), and goat (*Capra hircus*). Journal of *Agricultural and Food Chemistry,* 54, 1144–1150.

-Feligini, M., Bonizzi, I., Curik, V.C., Parma, P., Greppi, G.F., Enne, G. (2005). Detection of adulteration in italian Mozzarella cheese using mitocondrial DNA templates as biomarkers. *Food Technology and Biotechnology,* 43 (1), 91-95.

-Ferreira, I.M.P.L.V.O., Caçote, H. (2003). Detection and quantification of bovine, ovine and caprine milk percentages in protected denomination of origin cheeses by reverse-phase high-performance liquid chromatography of beta-lactoglobulins. *Journal of Chromatography A,* 1015, 111-118.

-García-Segura, J.M., Gavilanes, J.M., Gavilanes, J.G., Martínez-Pozo, A., Montero, F., Oñaderra, M., Vivanco, F. (1996). Técnicas instrumentales de análisis en bioquímica. *Ed.: Síntesis.* Madrid.

-Ghosh, R. (2002). Protein separation using membrane chromatography: Opportunities and challenges. *Journal of Chromatography A.* 952 (1-2), 13-27.

-Golinelli, L.P., Carvalho, A.C., Casaes, R.S., Lopes, C.S.C., Deliza, R., Paschoalin, V.M.F., Silva, J.T. (2014). Sensory analysis and species-specific PCR detect bovine milk adulteration of frescal (fresh) goat cheese.

-Greene, J.J., Rao, V.B. (1998). Recombinant DNA principles and methodologies. New York: Marcel Dekker, Inc.

-Haza, A.I., Morales, P., Martín, R., García, T., Anguita, G., Gonzáles, I., Sanz, B., Hernández, P.E. (1997). Use of a monoclonal antibody and two enzyme-linked immunosorbent assay formats for detection and quantification of the substitution of caprine milk for ovine milk. *Journal of Food Protection*, 60 (8), 973-977.

-Jerome, M., Lemaire, C., Verrez-Bagnis, W., Etienne, M. (2003). Direct sequencing method for species identification: fish of canned sardine and sardine-type products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 7326-7332.

-Kawai, T., Saito, K., Lee, W. (2003). Protein binding to polymer brush, based on ionexchange, hydrophobic and affinity interactions*. Journal of Chromatography B.* 790 (1-2), 131-142.

-Kocher, T.D., White, T.J. (1989). Evolutionary analysis via PCR. In: Erlich, H.A. (Ed.), PCR technology. Principles and applications for DNA amplification. Stockton Press, New York, pp. 137-147.

-Köppel, E., Stadler, M., Lüthy, J., Hübner, P. (1998). Detection of wheat contamination in oats by polymerase chain reaction (PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Forschung*, 206, 399.

-Lanzilao, I., Burgalassi, F., Fancelli, S., Settimelli, M., Fani, R. (2005). Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial cyt b gene from species of dairy interest. *Journal of AOAC International*. 88 (1), 128-135.

-Lipkin, E., Shalom, A., Khatib, H., Soller, M., Friedmann, A. (1993). Milk as a source of deoxyribonucleic acid and as a substrate for the polymerase chain reaction*. Journal of Dairy Science.* 76, 2025-2032.

-López-Calleja, I., Gonzalez, I., Fajardo, V., Rodríguez, M.A., Hernández, P.E., García, T., Martín, R. (2004). Rapid detection of cow's milk in sheeps' and goats' milk by a species-specific PCR technique. *Journal of Dairy Science.* 87, 2839-2845.

-López-Calleja, I., Gonzalez, I., Fajardo, V., Rodríguez, M.A., Hernández, P.E., García, T., Martín, R. (2005a). PCR detection of cows' milk in wáter buffalo milk and mozzarella cheese. *International Dairy Journal,* 15,1122-1129.

- López-Calleja, I., Gonzalez, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P.E., García, T., Martín, R. (2005b). Application of polymerase chain reaction to detect adulteration of sheep's milk with goats' milk. *Journal Dairy Science,* 88, 3115-3120.

-López-Calleja, I., Gonzalez, I., Fajardo, V., Martin, I., Hernandez, P., Garcia, T., y col. (2007). Real-time TaqMan PCR for quantitative detection of cows' milk in ewes' milk mixtures. *International Dairy Journal*, 17 (7), 729-736.

-Lopparelli, R.M., Cardazzo, B., Balzan, S., Giaccone, V., Novelli, E. (2007). Real-time TaqMan polymerase chain reaction detection and quantification of cow DNA in pure water buffalo mozzarella cheese: method validation and its application on commercial samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (9), 3429-3434.

-Mackie, I.M., Pryde, S.E., González Sotelo, C., Medina, I., Pérez Martín, R.I., Quinteiro, J., Rey-Méndez, M., Rehbein, H. (1999). Challenges in the identification of species of canned fish. *Trends in Food Science and Technology,* 10, 9-14.

-Mackie, I.M, Graig, A., Etienne, M., Jerome, M. Fleurence, J., Jessen, F., Smelt, A., Krujit, A., Yman, I.M., Ferm, M., y col., (2000). Species identification: fish of smoked and gravad fish products by sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis, urea isoelectric focusing and native isoelctric focusing: a collaborative study. *Food Chemistry*, 71, 1-7.

-Mafra, I., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Faria, M.A., Oliveira, M.B.P.P. (2004). A novel approach to the quantification of bovine milk in ovine cheeses using a dúplex polymerase chain reaction method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 52, 4943-4947.

-Mafra, I., Roxo, A., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Oliveira, M.B.P.P. (2007). A duplex polymerase chain reaction for the quantitative detection of cows' milk in goats' milk cheese. *International Dairy Journal,* 9, 1132-1138.

-Mafra, I., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Oliveira, M.B.P.P. (2008). Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology*, 227, 649–665.

-Maudet, C., Taberlet, P. (2001). Detection of cows' milk in goats' cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism*. Journal of Dairy Research,* 68, 229-235.

-Mayer, H.K., Heidler, D., Rockenbauer, C. (1997). Determination of the percentages of cows', ewes' and goats' milk in cheese by isoelectric focusing and cation-exchange HPLC of γ- and para-κ-caseins. *International Dairy Journal,* 7, 619-628.

-Mayer, H.K. (2005). Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques. *International Dairy Journal,* 15, 595-604.

-Molina, E., Martín-Álvarez, P.J., Ramos, M. (1999). Analysis of cows', ewes' and goats' milk mixtures by capillary electrophoresis: Quantification by multivariate regression analysis. *International Dairy Journal,* 9, 99-105.

-Momcilovic, D., Rasooly, A., (2000). Detection and analysis of animal materials in food and feed. *Journal of Food Protection,* 63 (11), 1602–1609.

-Moskova, E., Paulickova, I. (2006). PCR-based detection of cow's milk in goat and sheep cheeses marketed in the Czech Republic. *Czech Journal of Food Science,* 24 (3), 127-132.

-Nicolau, N., Xu, Y., Goodacre, R. (2011). MALDI-MS and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.,* 399, 3491-3502.

-Pellegrino, L., De Noni, I., Tirelli, A., Resmini, P. (1991). Detection of cow milk in non-bovine cheese by HPLC of whey proteins. *Science Technology Latte Cas.* 42, 87-94.

-Pfeiffer, I., Burger, J., Brenig, B. (2004). Diagnostic polymorphisms in the mitochondrial cytochrome b gene allow discrimination between cattle, sheep, goat, roe buck and deer by PCR–RFLP. *BMC Genetics.* 5, 30.

-Popelka, Pe., Popelka, Pa., Horská, D., Golian, J., Marcincak, S. (2002). Detection of sheep milk and cheeses adulteration using enzyme immunoanalysis (ELISA). *Slovenian Veterinary Research,* 27 (3), 36-37.

-Price, C.W., Leslie, D.C., Landers, J.P. (2009). Nucleic acid extraction techniques and application to the microchip. *Lab on a Chip.* 9 (17), 2484–2494.

-Ramos, M., Juarez, M. (1986). Chromatographic, electrophoretic and immunological methods for detecting mixtures of milks from different species. *International Dairy Federation. Document, 202*, 175-187.

-Rea, S., Chikuni, K., Branciari, R., Sukasi Sangamayya, R., Ranucci, D., Avellini, P. (2001). Use of duplex polymerase chain reaction (duplex PCR) technique to identify bovine and water buffalo milk used in making Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Research,* 68, 689-698.

-Rehbein, H., Mackie, I. M., Pryde, S., Gonzales-Sotelo, C., Medina, I., Pérez-Martin, R., Rey-Mendez, M. (1999). Fish species identification in canned tuna by PCR-SSCP: validation by a collaborative study and investigation of intra-species variability of the DNA-patterns. *Food Chemistry*, 64 (2), 263-268.

-Ritcher, W., Krause, I., Graf, C., Sperrer, I., Schwarza, C., Klostermeyer, H. (1997). An indirect competitive ELISA for the detection of cows' milk and caseinate in goats' and ewes' milk and cheese using polyclonal antibodies against bovine γ-caseins. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung,* 204, 21-26.

-Rodríguez, M., García, T., González, I., Asensio, L., Hernández, P., Martín, R. (2004). PCR identification of beef, sheep, goat and pork in raw and heat-treated meat mixtures. *Journal of Food Protection*, 67, 172-177.

-Saavedra, C., Reyero, M. I., Zouros, E. (1997). Male-dependent doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA and female-dependent sex-ratio in the mussel Mytilus galloprovincialis. *Genetics,* 145 (4), 1073-1082.

-Seçkin, K., Yilmaz, B., Tosun, H. (2017). Real-time PCR is a potential tool to determine the origin of milk used in cheese production. *Food Science and Technology,* 77, 332-336.

-Snirc, M., Fekete, T., Belej, L., Zidek, R., Golian, J., Hascik, P. Zajác, P., Capla, J. (2017). Detection of ovine milk adulteration using TaqMan Real-Time PCR assay. *Slovak Journal of Food Sciences,* 11, Nº1, 338-343.

-Spink, J., Moyer, D.C. (2011). Defining the public health threat of food frauds. *Journal of Food Science,* 75 (9), 57-63.

-Špoljarić, A., Plav-ljanić, D., Radeljević, B., Kesić, I.H., Antu-nac, N., Havranek, J., Mikulec, N. (2017). Control of Ewe and Goat Cheeses Labelling on the Croatian Market. *Food and Nutrition Sciences*, 8, 379-391.

-Stanciuc, N., Rapeanu, G. (2010). Identification of adulterated sheep and goat cheeses marketed in Romania by immunochromatographic assay. *Food and Agricultural Immunology,* 21, 157-164.

-Taylor, L.S., Nordlee, A.J., Niemann, M. (2009). Allergen immunoassays-considerations for use of naturally incurred standards. *Analytical and Bioanalytical Chemistry,* 395 (1), 83-92.

-Urbanke, W., Luft, W., Brandl, E. (1992). Use of HPLC for control of the adulteration of milk and milk products of different species. *Zeitschrift fur lebensmittel-untersuchung und-forschung,* 195 (2), 137-142.

-Vallejo-Córdoba, B., Cota-Rivas, M. (1998). Meat species identification by linear discriminant analysis of capillary electrophoresis protein profiles. *Electrophoresis*, 5 (5-6), 171-175.

-Vallejo-Córdoba, B. González-Córdova, A. F. (2010). Capillary electrophoresis for the analysis of contaminants in emerging food safety issues and food traceability. *Electrophoresis*, 31, 2154–2164.

-Volk, H., Piskernik, S., Kurinčič, M., Klančnik, A., Toplak, N., Jeršek, B. (2014). Evaluation of different methods for DNA extraction from milk. *Food and Nutrition Research*, 53 (2), 97-104.

-Xue, H., Hu, W., Son, H., Han, Y., Yang, Z. (2010). Indirect ELISA for detection and quantification of bovine milk in goat milk. *Journal of Food Science and Tech*nology, 31 (24), 370-373.

-Zachar, P., Šoltés, M., Kasarda, R., Novotný, J., Novikmecová, M., Marcinčáková, D. (2011). Analytical methods for the species identification of milk and milk products. *Mljekarstvo*, 61, 199-207.

-Zarei, M., Maktabi, S., Yousefvand, A., Tajbakhsh, S. (2016). Fraud identification of undeclared milk species in composition of sheep yogurt and cheese using multiplex PCR assay. *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 3, 15-19.

-Zeleňáková, L., Golian, J., Zajác, P. (2008). Application of ELISA tests for the detection of goat milk in sheep milk. *Milchwissenschaft*, 63 (2), 137-141.

-Zeleňáková, L., Sestak, M., Židek, R. (2009). Monitoring of sheep milk and milk products adulteration on common european food market. *Potravinarstvo*, 3, 69-74.

- Zeleňáková, L., Židek, R., Čanigová, M. (2010). Reliability of cow casein quantitation in sheep milk and cheese by ELISA method. *Journal of Food Physics*. 23, 22-26.