



Detección y cuantificación de proteínas animales en piensos por micrografía y reflectancia en el infrarrojo cercano más inteligencia artificial. Diferenciación de especies por polimerasas

Referencia: AGL2002-03131. Organismos financiador y colaborador: Ministerio de Educación y Ciencia. Y Laboratorio Agroalimentario del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Importe: 96.600 €. Duración: 2003–2005.

<i>Equipo investigador</i>	<i>Organismo</i>
Begoña de la Roza Delgado	SERIDA
Adela Martínez Fernández	SERIDA
Ana Belén Soldado Cabezuelo	SERIDA
Fernando Vicente Mainar	SERIDA
Félix María Goyache Goñi	SERIDA
Antonio Bahamonde Rionda	Univ. Oviedo
José Ramón Quevedo Pérez	Univ. Oviedo
Pablo Presa Martínez	Univ. Vigo
Montserrat Pérez Rodríguez	Univ. Vigo

Equipo técnico

Sagrario Madroño Lozano	SERIDA
-------------------------	--------

Resumen y avance de resultados

Dentro del programa de lucha contra la encefalopatía espongiforme bovina (EEB), se pretende estandarizar una metodología NIR+Inteligencia Artificial para mejorar el límite de detección (0,2%) de la técnica micrográfica oficial de determinación de harina de origen animal en alimentos para el ganado. Asimismo, se pretende diferenciar proteínas de origen animal en función del medio (terrestre o acuático) y la especie de procedencia, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación de ADN.

Modelos cualitativos y cuantitativos

Se desarrollaron modelos de calibración NIR para detectar la presencia/ausencia de harinas de carne- (modelos cualitativos) y cuantificar el porcentaje de éstas en los piensos compuestos (modelos cuantitativos). Ambos modelos fueron validados externamente con un colectivo de 18 muestras reales (10 contaminadas y ocho no contaminadas) de piensos compuestos. Los mejores resultados de clasificación cualitativa se obtuvieron con el pretratamiento de normaliza-

ción estándar y primera derivada de los espectros, utilizando variables "dummy" (piensos libres de harina de carne= -1; piensos con harina de carne= +1). Se obtuvo un error de validación cruzada de 0,20%; y coeficientes de determinación de calibración y validación cruzada de 0,94 y 0,93, respectivamente. En los modelos cuantitativos, los mejores resultados se obtuvieron tras normalización y corrección de la tendencia y segunda derivada. Los modelos permiten discriminar las muestras contaminadas de las no contaminadas.

Clasificación binaria (Support Vector Machine: SVM)

Se desarrolló un modelo de clasificación tras aplicar distintas funciones Kernel (cuadrática, lineal y gaussiana -RBF) en un espacio n-dimensional (n longitudes de onda), capaz de discriminar entre muestras contaminadas y no contaminadas, ponderando (a través del Factor Coste-j) los falsos negativos. La mejor función obtenida fue de tipo lineal que, con un $j=23$, produce 0% de falsos negativos.

PCR y secuenciación de ADN

Con el uso de cebadores específicos se detectaron materiales de riesgo procedentes de diferentes especies: bovino, ovino, caprino, equino, aves, porcino, conejos y peces. La combinación de la amplificación génica con una selección de endonucleasas de restricción permitió establecer un patrón de corte para cada especie en alimentos compuestos y proteínas elaboradas.

Una vez establecida la especificidad de los marcadores moleculares, se comenzó la estimación de la contribución cuantitativa de cada especie en la formulación de alimentos mediante la PCR cuantitativa.