ÍNDICE

1. Introducción 1

1.1Productos Curados del Cerdo 4
1.1.1 Jamón Curado 4
1.1.1.1 Proceso de Fabricación del Jamón Curado 5
1.1.1.2 Principales Cambios Bioquímicos durante el Proceso de Curado de Jamón 8
1.1.1.2.1 Proteólisis 8
1.1.1.2.2 Lipólisis 12
1.1.2 Embutidos Crudo Curados 13
1.1.2.1 Proceso de Fabricación de Embutidos Crudo-Curados 13
1.1.2.2 Principales Cambios Bioquímicos en Embutidos Crudo- Curados 16
1.1.2.2.1 Proteólisis 16
1.1.2.2.2 Lipólisis 17
1.1.2.2.3 Glucólisis y Fermentación de los Hidratos de Carbono 17
1.1.2.2.4 Otros Cambios 18
1.1.2.2.4.1 Generación de Aminas Biogenas 18
1.1.2.2.4.2 Reacciones de transformación de Aminoácidos 19
1.1.2.2.4.3 Degradación y oxidación de los Lípidos 19
1.2 Calidad 20
1.2.1 Parámetros para el Control de la Calidad 24
1.2.1.1 Controles en Jamones Curados 24
1.2.1.2 Controles en Embutidos Crudo-Curados 26
1.2.2 Determinación de Nitrato 27
1.2.3 Determinación de Aminoácidos Libres 30
1.2.4 Determinación de Acido Láctico 31
1.3 Biosensores 32
1.3.1 Clasificación de los Biosensores 33
1.3.1.1. Clasificación de los Biosensores por su Elemento de Reconocimiento 34
1.3.1.1.1 Biosensores Catalíticos 34
1.3.1.1.2 Biosensores por Afinidad 34
1.3.1.2 Clasificación de los Biosensores por el tipo de Transductor 35
1.3.1.2.1 Biosensores Electroquímicos 35
1.3.1.2.1.1 Amperométricos 35
1.3.1.2.1.2 Potenciométricos 36
1.3.1.2.1.3 Conductimétricos 36

1.3.1.2.2 Biosensores Físicos 37
1.3.1.2.2.1 Ópticos 37
1.3.1.2.2.2 Térmicos 37
1.3.1.2.2.3 Pizoeléctricos 38
1.3.2 Sensores Enzimáticos 39
1.3.2.1 Métodos de Inmovilización 42
1.3.2.2 Materiales Soporte para la Inmovilización de la Enzima 43
1.3.2.3 Materiales de Construcción del Transductor 45
1.3.2.4 Principio de Operación 45
1.3.3 Aplicaciones de los Biosensores 48
1.3.3.1 Sensores Enzimáticos para la Determinación de Lisina 50
1.3.3.2 Sensores Enzimáticos para la Determinación de Nitrato 53
1.3.3.3 Sensores Enzimáticos para la Determinación de Acido Láctico 54

2. Objetivos 57

3. Plan de Trabajo 61

4. Materiales y Métodos 65

4.1 MATERIALES 67
4.1.1 Materias Primas 67
4.1.2 Reactivos Químicos 67
4.1.2.1 Determinación de Lisina 67
4.1.2.2 Determinación de Nitrato 68
4.1.2.3 Determinación de Ácido Láctico 69
4.1.3 Instrumentación 69
4.1.3.1 Sensor Enzimático 69
4.1.3.2 Cromatógrafo HPLC 70
4.2 MÉTODOS 71
4.2.1 Extracción de la Muestra 71
4.2.2 Determinación de Lisina y otros Aminoácidos por Cromatografía 71
4.2.3 Determinación de Nitrato por Cromatografía 72
4.2.4 Determinación de Acido Láctico por Cromatografía 73
4.2.5 Determinación de Lisina con el Sensor Enzimático 73
4.2.5.1 Mecanismo de Actuación de la Lisina-α-Oxidasa sobre la Lisina 75
4.2.5.2 Actividad Específica de la Lisina-α-Oxidasa 75
4.2.5.3 Determinación de lisina con la Enzima Libre 76
4.2.5.3.1 Estudio de la Cinética Enzimática 77
4.2.5.4 Determinación de lisina con la Enzima Inmovilizada 77

4.2.5.4.1 Estudio de la especificidad de la Enzima-α- oxidasa…… ……78
4.2.5.4.2 Estudio de la cinética con la enzima inmovilizada……79
4.2.6 Determinación de Nitrato con el Sensor Enzimático 79
4.2.6.1 Actividad Específica de la Nitrato Reductasa..... .80
4.2.6.2 Determinación de Nitrato con la Enzima Libre..... 80
4.2.6.2.1 Mecanismo de Actuación de la nitrato reductasa sobre el nitrato …….. 81
4.2.6.2.2 Estudio de la Cinética Enzimatica…… ……..81
4.2.6.3 Determinación de Nitrato con la Enzima Inmovilizada..... 82
4.2.6.3.1 Estudio de la Cinética con la Enzima Inmovilizada…… 82
4.2.7 Determinación de Acido Láctico con el Sensor Enzimático 83
4.2.7.1 Actividad Específica de la Lactato Oxidasa 83
4.2.7.2 Determinación de Ácido Láctico con la Enzima Libre..... 84
4.2.7.2.1 Mecanismo de Actuación de la Lactato Oxidasa sobre el Ácido Láctico……84
4.2.7.2.2 Estudio de la Cinética Enzimática……85
4.2.8 Ensayos de Validación de los Sensores..... 85
4.2.9 Análisis Estadístico de Resultados..... 86

5. Resultados y Discusión 87

5.1 Sensor Enzimático para el Análisis de Lisina 90
5.1.1 Mecanismo de Actuación de la Lisina-α-Oxidasa 92
5.1.2 Sistema Enzimático con la Enzima Libre 93
5.1.2.1 Estudio de la Cinética Enzimática 96
5.1.2.2 Ensayos de Validación..... 96
5.1.3 Sistema Enzimático con la Enzima Inmovilizada 99
5.1.3.1 Estudio de la Cinética con la Enzima Inmovilizada 102
5.1.3.2 Ensayos de Validación.....104
5.1.3.3 Estudio de la Especificidad de la Lisina-α-Oxidasa 107
5.1.4 Actividad Específica de la Lisina-α-oxidasa en sus formas Libre e Inmovilizada 109
5.1.5 Aplicación del Sensor de Lisina al Análisis de Muestras 109
5.1.5.1 Curado de Jamón 109
5.1.5.2 Maduración de los Embutidos Fermentados 112
5.2 Sensor Enzimático para el Análisis de Nitrato.....113
5.2.1 Sistema Enzimático con la Enzima Libre 115
5.2.2 Mecanismo de Actuación de la Nitrato Reductasa sobre el Nitrato 117
5.2.2.1 Estudio de la Cinética Enzimática 118

5.2.2.2 Ensayos de Validación en el Sistema Libre con el Sensor de Nitrato 119
5.2.3 Sistema con la Enzima Inmovilizada 121
5.2.3.1 Estudio de la Cinética con la Enzima Inmovilizada 123
5.2.3.2 Ensayos de Validación con la Nitrato Reductasa Inmovilizada 124
5.2.3.3 Estudio de la Estabilidad de la Nitrato Reductasa Inmovilizada durante el Almacenamiento a diferentes Temperaturas 127
5.2.3.4 Aplicación del Sensor de Nitrato al Análisis de Muestras 128
5.3 Sensor Enzimático para el Análisis de Acido Láctico 131
5.3.1 Mecanismo de Actuación de la Lactato Oxidasa sobre el Acido Láctico 133
5.3.2 Sensor Enzimático con la Enzima Libre 135
5.3.3 Estudio de la Cinética Enzimática 135
5.3.4 Ensayos de Validación 137
5.3.5 Aplicación del Sensor de Acido Láctico al Análisis de Muestras 140

6. Conclusiones 143

7. Bibliografía 147

Índice de figuras

Figura		Página
1	Diagrama de flujo de la elaboración del jamón curado……	7
2	Esquema general de la proteólisis ……	11
3	Esquema general de la lipólisis……	13
4	Diagrama de flujo para la elaboración de embutidos crudo curados fermentados ……	15
5	Formación de Nitrosaminas ……	28
6	Amplificación de la señal de tensión en un sensor electroquímico……	33
7	Esquema de un sensor térmico……	38
8	Secuencia de la reacción de oxidación catalizada por una enzima oxidasa empleando oxígeno molecular como aceptador de electrones……	41
9	Esquema del funcionamiento de los sensores segunda generación……	47
10	Esquema del Oxímetro Mod. 20 Rank Brothers Ltd (Bottisham, Cambridge, England)……	70
11	Esquema de montaje de las membranas en el sensor de oxígeno……	74
12	Respuesta del sensor enzimático representada como oxígeno consumido en función del tiempo de reacción en presencia de lisina 1.0 mM y 1.7 U de lisina-α- oxidasa en tampón fosfato sódico (50mM, pH 7.6) a 37 °C ……	91
13	Estudio de la desaparición de lisina en presencia de	

lisina-α-oxidasa, utilizando HPLC para la medida de la lisina…… 92

14 Desaparición de lisina en un extracto de jamón curado, en presencia de lisina-α- oxidasa a 37°C y medida por HPLC…… 93

15 Efecto del pH sobre la velocidad de reacción de la enzima lisina-α-oxidasa determinado en el sensor enzimático con la enzima libre (1.7 U). Patrón de lisina 1mM, en tampón fosfato sódico 50mM a 37 °C …… 94

16 Efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción de la enzima lisina-α-oxidasa determinado con el sensor enzimático con la enzima libre (1.7U). Patrón de lisina 1mM en tampón fosfato sódico a pH 6.6, lisina-α- oxidasa a diferentes temperaturas…… 95

17 Efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción de la enzima lisina-α-oxidasa libre. La concentración de lisina se determino por HPLC …… 96

18 Ecuación de Hanes-Woolf para la obtención de la K_m, con la enzima lisina oxidasa libre. $S/v=1/V_{max}*[S]+K_m/V_{max}$, donde S: concentración de sustrato; v: velocidad de reacción …… 97

19 Recta de calibrado de lisina en el sensor enzimático con la enzima libre. …… 98

20 Estabilidad de la lisina-α-oxidasa en solución. Almacenada en refrigeración (4°C)…… 99

21 Estudio de la respuesta de la lisina-α-oxidasa inmovilizada

en función de las diferentes concentraciones de glutaraldehído. Se utilizó 0.1 U de actividad enzimática y 0.1 mM de lisina…… 101

22 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la

lisina-α- oxidasa en el sistema inmovilizado…… 102

23 Efecto del pH sobre la actividad de la lisina-α- oxidasa en el sistema inmovilizado…… 103

24 Representación de Hanes-Woolf para la obtención de la K_m con la enzima lisina oxidasa inmovilizada. [S]/v= 1/Vmax * [S] +K_m/Vmax, donde S: concentración de sustrato; v: velocidad de reacción …… 104

25 Recta de calibrado utilizando el sensor enzimático con la enzima lisina oxidasa inmovilizada…… 105

26 Correlación entre los contenidos de lisina obtenidos en extractos cárnicos utilizando el sensor con la enzima libre y por HPLC…… 110

27 Correlación entre los contenidos de lisina obtenidos en extractos cárnicos utilizando el sensor con la enzima inmovilizada y por HPLC…… 110

28 Evolución del contenido de lisina durante el proceso de curado de jamón analizado con el sensor con la enzima inmovilizada y por HPLC…… 111

29 Evolución del contenido de lisina durante el proceso de curado de embutidos analizado por el sensor con la enzima inmovilizada y por HPLC…… 113

30 Respuesta del sensor enzimático representada como variación de la corriente en función del tiempo de reacción en presencia de nitrato 0.1 mM y 0.64 U de nitrato reductasa en MOPS 100 mM, pH 7.1…… 115

31 Efecto del pH sobre la velocidad de reacción de la enzima nitrato reductasa, determinado con el sensor enzimático sistema libre a 20°C…… 116

32 Efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción de la enzima nitrato reductasa determinado con el sensor enzimático con el sistema libre, a pH 7.1…… 117

33 Estudio de la desaparición del nitrato en presencia de nitrato reductasa en su forma libre…… 118

34 Ecuación de Hanes-Woolf para la obtención de la K_m con la enzima nitrato reductasa libre. $S/v=1/V_{max}*[S]+K_m/V_{max}$, donde S: concentración de sustrato; v: velocidad de reacción …… 119

35 Recta de calibrado de nitrato en el sensor enzimático con la enzima libre. Tiempo de respuesta 10 s…… 120

36 Estabilidad de la nitrato reductasa durante el almacenamiento a 4 °C en solución…… 121

37 Estudio de la actividad de la nitrato reductasa empleando diferentes concentraciones de glutaraldehído en el sensor enzimático manteniendo constantes el volumen de la enzima (15µL) con una actividad de 0.038 U y un patrón de nitrato 0.07 mM. …… 122

38 Efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción de la enzima nitrato reductasa (0.038 U) en el sistema inmovilizado. Patrón 0.01 mM en tampón MOPS 100mM, pH 7.1 …… 123

39 Efecto del pH sobre la velocidad de reacción de la enzima nitrato reductasa (0.038 U) en el sistema inmovilizado. Patrón de nitrato 0.01 mM en tampón MOPS 100mM a 22 °C…… 124

40 Ecuación de Hanes- Woolf para la obtención de la K_m con la enzima nitrato reductasa inmovilizada. $S/v=1/V_{max}*[S]+K_m/V_{max}$, donde S: concentración de sustrato; v: velocidad de reacción …… 125

41 Recta de calibrado de nitrato en el sensor con la enzima nitrato reductasa inmovilizada. Tiempo de respuesta 10s frente a la concentración de nitrato…… 126

42 Evolución del contenido de nitrato durante el proceso de maduración en un jamón curado…….…….…….. 129

43 Correlación entre el resultado del análisis de nitrato por HPLC y el sensor enzimático con la nitrato reductasa libre, utilizando diferentes diluciones de un extracto de jamón en el postsalado.……..…….. 130

44 Correlación entre el resultado del analisis de nitrato por HPLC y el sensor enzimático con la nitrato reductasa inmovilizada utilizando diferentes diluciones de un extracto de jamón en el postsalado…….…….. 130

45 Respuesta del sensor enzimático representada como oxígeno consumido en función del tiempo de reacción, en presencia de ácido láctico 0.1mM y 1.01 U de lactato oxidasa, en tampón fosfato potásico (0.1 M), pH 7.0 y T= 37 °C ……..…….…… 133

46 Estudio de la desaparición de ácido láctico a pH 7.0 y 37°C, en presencia de la lactato oxidasa, utilizando el HPLC para la medida del ácido láctico……..…… 134

47 Efecto del pH sobre la velocidad de reacción de la enzima lactato oxidasa determinado con el sensor enzimático con la enzima libre. Patrón de ácido láctico 0.1mM, en tampón fosfato potásico 0.1 M, a 31°C ……..…….…….. 136

48 Efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción de la enzima lactato oxidasa determinado con el sensor enzimático con la enzima libre. Patrón ácido láctico 0.1mM en tampón fosfato potásico 0.1 M a pH 7.0 …….…….. 136

49 Ecuación de Hanes-Woolf para la obtención de la K_m, con la enzima lactato oxidasa libre. $S/v=1/V_{max}*[S]+K_m/V_{max}$, donde S: concentración de sustrato; v: velocidad de reacción……..…….. 137

50 Recta de calibrado de ácido láctico en el sensor enzimático con la la enzima libre. Tiempo de respuesta 5 s frente a la concentración de ácido láctico ……..……..…….. 138

51 Estabilidad de la lactato oxidasa en solución. Almacenamiento

a 4°C…… …… 139

52 Correlación entre los contenidos de ácido láctico en salchichón obtenidos con el sensor enzimático con el sistema libre y por HPLC…….…… 141

Índice de Tablas

Tabla **Página**

1 Clasificación de las enzimas por el tipo de reacción que catalizan…… 41

2 Aplicación de los biosensores en la industria alimentaria…….... 49

3 Biosensores amperométricos utilizados para determinar lisina…….…… 52

4 Composición de la fase móvil y gradiente en el análisis de lisina por RP-HPLC…….…….…… 72

5 Resultados de validación para el sensor de lisina con ambos sistemas, libre e inmovilizado…….... 106

6 Tasa de oxidación relativa de la lisina-α-oxidasa sobre algunos aminoácidos……..... 108

7 Resultados de validación para el sensor de nitrato con ambos sistemas, libre e inmovilizado…….…….…….... 127

8 Resultados de validación para el sensor de ácido láctico con el sistema libre……..... 140