



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

**SENSORES ENZIMATICOS COMO HERRAMIENTAS
PARA EL CONTROL RAPIDO DE LA CALIDAD DE LA
CARNE Y PRODUCTOS CARNICOS**

Tesis Doctoral

Presentada por:

Felipe Arturo Jadán Piedra

Dirigida por:

Prof. Dr. Fidel Toldrá Vilardell
Dra. M^a Concepción Aristoy Albert
Valencia, Septiembre 2015



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



INSTITUTO DE AGROQUÍMICA Y TECNOLOGÍA
DE ALIMENTOS (IATA)

FIDEL TOLDRÁ VILARDELL, DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS Y PROFESOR DE INVESTIGACIÓN Y M^a CONCEPCIÓN ARISTOY ALBERT, DOCTORA EN FARMACIA E INVESTIGADORA TITULAR AMBOS DEL INSTITUTO DE AGROQUÍMICA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS.

HACEN CONSTAR: que el trabajo de investigación titulado “*Sensores enzimáticos como herramientas para el control rápido de la calidad de la carne y productos cárnicos*” que presenta D. Felipe Jadán Piedra por la Universidad Politécnica de Valencia, ha sido realizado en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC) bajo nuestra dirección y que reúne las condiciones para optar al grado de doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos la presente en Paterna a 21 de Septiembre de 2015.

iata@iata.csic.es

Domicilio: Avda. Agustín Escardino, 7
46980 PATERNA. VALENCIA
Dirección Postal: APARTADO DE CORREOS 73
46100 BURJASSOT. VALENCIA
TEL.: +34 96 390 00 22
FAX.:+34 96 363 63 01

|

Resumen

Durante el proceso de curado del jamón y de los embutidos fermentados se producen cambios a nivel bioquímico entre los que destacan la proteólisis, la lipólisis y la glucólisis, y que van a definir la calidad que se espera en este tipo de productos.

La evaluación de ciertos compuestos derivados de dichas reacciones, pueden servir como marcadores del proceso. Es el caso de los aminoácidos libres y en concreto la lisina como marcador de proteólisis, o el ácido láctico, producto de la fermentación de los carbohidratos como marcador de una fermentación adecuada de embutidos por bacterias acidolácticas. Por otro lado, la adición de algún ingrediente como la sal o aditivos como son los nitratos, van a asegurar la higiene del producto. Así, los nitratos tras su transformación en nitritos durante el proceso, tienen la capacidad de inhibir al *Clostridium botulinum* pero también colaboran en el desarrollo de las características sensoriales, aroma y color fundamentalmente, de los productos curados. Sin embargo, en este caso concreto, y a pesar de ser un ingrediente indispensable para asegurar sanitariamente el producto, debe mantenerse en niveles permitidos por ser potencialmente perjudicial para la salud.

Existen diversas técnicas para el análisis de estos compuestos marcadores del proceso, siendo la más utilizada la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Sin embargo, esta técnica es cara, conlleva tiempo y no siempre resulta accesible para un laboratorio de una industria alimentaria. El desarrollo de biosensores en los que se utilizan enzimas como elemento de bioreconocimiento, ha alcanzado una gran expansión en algunos sectores como son la industria sanitaria y farmacéutica. Estos sensores combinan la selectividad de las enzimas con la sensibilidad de la

detección electroquímica. Además, son de manejo sencillo, los análisis son rápidos, no requiere personal especializado, y es económico. En esta tesis nos planteamos pues la posibilidad de utilizar un biosensor amperométrico simple compuesto por un oxímetro y una enzima, que se seleccionará en función del compuesto clave que se quiera analizar para monitorizar los procesos. Así, para la determinación de lisina se ha elegido la lisina- α -oxidasa, para la determinación de nitrato la nitrato reductasa, y para la determinación de ácido láctico la lactato oxidasa. Los sensores se han optimizado tanto para su uso con la enzima libre como inmovilizada en una membrana (en el caso del sensor de ácido láctico se desarrolló únicamente para la enzima libre) y en todos los casos se compararon los resultados de los biosensores con la cromatografía líquida de alta resolución como método de referencia.

Estos sensores han sido aplicados a muestras reales de jamón y embutido curados permitiendo una determinación fiable de lisina, nitrato y ácido láctico con las respectivas enzimas.

Resum

Durant el procés de curat del pernil i dels embotits fermentats es produïxen canvis a nivell bioquímic entre els que destaquen la proteólisi, la lipolisi i glucòlisi, i que definiran la qualitat que s'espera en este tipus de productes.

L'avaluació de certs compostos derivats de les dites reaccions, poden servir com a marcadors del procés. És el cas dels aminoàcids lliures i en concret la lisina com a marcador de proteólisi, o l'àcid làctic, producte de la fermentació dels carbohidrats com a marcador d'una fermentació adequada d'embotits per bacteris acidolàctics. D'altra banda, l'adició d'algun ingredient com la sal o aditius com són els nitrats, asseguraran la higiene del producte. Així, els nitrats després de la seua transformació en nitrits durant el procés, tenen la capacitat d'inhibir al *Clostridium botulinum* però també col·labora en el desenvolupament de les característiques sensorials, aroma i color fonamentalment, dels productes curats. No obstant això, en este cas concret, i a pesar de ser un ingredient indispensable per a assegurar sanitàriament el producte, ha de mantindre's en nivells permesos per ser potencialment perjudicial per a la salut.

Hi ha diverses tècniques per a l'anàlisi d'estos compostos marcadors del procés, sent la més utilitzada la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) . No obstant això, esta tècnica és cara, comporta temps i no sempre accessible per a un laboratori d'una indústria alimentària. El desenvolupament de biosensors en què s'utilitzen enzims com a element de biorecoeixement, ha aconseguit una gran expansió en alguns sectors com són la indústria sanitària i farmacèutica. Estos sensors combinen la selectivitat dels enzims amb la sensibilitat de la detecció electroquímica. A més, són de maneig senzill, les anàlisis són ràpides, no requerix personal especialitzat, i

és econòmic. En esta tesi ens plantegem la possibilitat d'utilitzar un biosensor amperomètric simple compost per un oxímetre i un enzim, que se seleccionarà en funció del compost clau que es vullga analitzar per a monitoritzar els processos. Així, per a la determinació de lisina s'ha triat la lisina- α -oxidasa, per a la determinació de nitrat la nitrat reductasa, i per a la determinació d'àcid làctic la lactat oxidasa. Els sensors s'han optimitzat tant per al seu ús amb l'enzim lliure com immobilitzada en una membrana (en el cas del sensor d'àcid làctic es va desenvolupar únicament per a l'enzim lliure) i en tots els casos es van comparar els resultats dels biosensors amb la cromatografia líquida d'alta resolució com a mètode de referència.

Estos sensors han sigut aplicats a mostres reals de pernil i embotit curats permetent una determinació fiable de lisina, nitrat i àcid làctic amb els respectius enzims.

Abstract

During the ripening of ham and dry sausages, biochemical changes are produced, the main changes are proteólisis, lipólisis, and glucólisis, that are going to define the quality that is normal in this type of products.

The evaluation of certain components that are derivatives of these reactions, can be used as markers of the process. This is the case of free amino acids like lysine, that is a marker of proteólisis, another example lactic acid, a product of glycogen fermentation, like a marker of correct fermentation carried out by lactic acid bacteria. Another way to assure the food quality is the addition of some ingredients like salt or additives like nitrate. Thus, nitrate after its transformation in nitrite during the process has the capacity of inhibition of *Clostridium botulinum*, and it helps in the development of sensorial characteristics like flavor, color and texture, specially in fermented meat. Although the nitrate is a necessary ingredient to assure food safety, must be according to allowed levels, because it can be potentially harmful for health.

There are different techniques for the analysis of those products of the process, being High Performance Liquid Chromatography (HPLC) the most used. However, this technique is expensive and not accessible for a food laboratory. The development of biosensors that use enzymes and elements of biorecognition has achieved a great expansion in pharmaceutical and sanitary industries. These sensors combine the selectivity of enzymes with the selectivity of electrochemical detection. In addition, they are economic, easy to use and the measurements are fast and do not require specialized people.

In this thesis our main objective is the possibility to use amperometric biosensors, comformed by an oximeter and an oxide reductase enzyme selected in function of the interest component that is going to be analyzed for monitoring the process. Thus, by the determination of lysine it has been choose the lysine- α - oxidase, for the determination of lactic acid, the lactate oxidase have been chosen and for the determination of nitrate, the nitrate reductase have been selected. Sensors have been optimized, for been used in a soluble and immobilized form. (For acid lactic sensor, just a soluble form has been developed) in all cases, the results of biosensor was compared with HPLC like reference method.

Those sensors have been applied in real samples of ham and dry sausages allowing reliable determination of lysine, nitrate and lactic acid, with their respective enzymes.

AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento a mis directores de tesis al Prof. Dr. Fidel Toldrá y a la Dra. M^a Concepción Aristoy, por haberme permitido realizar esta tesis en su laboratorio ya que sin su ayuda y apoyo el presente trabajo no se estaría presentando el día de hoy.

A la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) de Ecuador por la beca otorgada y hacer posible la realización de mis estudios de Doctorado.

A las Doctoras Mónica Flores y Leticia Mora por su colaboración y disponibilidad para resolver mis inquietudes.

Al personal técnico del grupo de Bioquímica, Tecnología e Innovación de la Carne y Productos Cárnicos: Xavier, Gema, y Carolina así como a todas las personas de prácticas y proyectos fin de carrera por los buenos momentos que compartimos.

Al personal del departamento de biblioteca y documentación del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, quienes siempre estuvieron dispuestos a ayudarme durante el proceso de esta Tesis Doctoral.

A mis compañeros de laboratorio con quienes compartí todo este tiempo: Marta, Cécile, y Sara, por su amistad, ayuda y colaboración en este trabajo.

A mis amigos de barrio Manuel, Salvador, Jesús, David, Jose, Mauro, Marga, Meri, Susana, Pilar, Mercedes por ser como una extensión de mi familia en tierras valencianas.

A mis padres por haberme dado su cariño y apoyo total para emprender esta nueva etapa de mi vida, a mis hermanos Grace, Vanessa y Carlos. Y a mis sobrinos Isaac e Isabella.

El asumir responsabilidades debe ser el objetivo de todo ser humano; para sólo así, poder romper con un pasado injusto y poder alcanzar por fin un futuro prometedor.

El Autor.



ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1 Productos 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 Enzimática.....	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. $[S]/v = 1/V_{max} * [S] + K_m/V_{max}$, 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 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

|

1. Introducción

1 INTRODUCCIÓN

El intenso y continuo desarrollo de la industria cárnica a nivel mundial, requiere de métodos rápidos, económicos y eficaces para verificar *in situ* la calidad y seguridad de sus productos. La industria cárnica en España exportó en 2013 un total de 1.43 millones de toneladas de productos frescos, y 138,736 toneladas de elaborados, lo que representó unas ventas exteriores de 4,189 millones de euros, un 3.9 % superiores a los 4,034 millones de euros de 2012, que a su vez habían crecido un 11 % respecto a los 3,644 millones facturados en 2011 (Fuente: Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España, 2015).

Dada la importancia económica del sector, el control de calidad de sus productos, especialmente realizado en línea de producción, adquiere una especial relevancia.

En este sentido, la ciencia aplicada intenta dar solución a esta demanda aumentando así la sensación de seguridad en el consumidor mediante el desarrollo de métodos analíticos alternativos, como es el caso de los biosensores, ya utilizados en medicina, y que se podrían aplicar en la industria de la alimentación, convirtiéndose en herramientas útiles de control.

Lo que se busca en un biosensor es economía, rapidez, sensibilidad y selectividad, requisitos que se pueden cumplir empleando principios electroquímicos y bioquímicos. Así los electrodos de tipo amperométricos - enzimáticos reúnen todos los requisitos al combinar la sensibilidad de uno y la selectividad del otro.

Las enzimas poseen la característica de ser altamente selectivas hacia determinados sustratos y así pueden ser utilizadas como bioelementos de reconocimiento de ciertos analitos (sustratos), pero además, y en concreto, las enzimas oxidoreductasas generan en su interacción con el sustrato diferencias de potencial medibles en sensores amperométricos. Esta selectividad permite la cuantificación del componente de interés a pesar de hallarse en mezclas complejas y además, en concentraciones pequeñas, por la alta sensibilidad de los electrodos de medida, lo

que simplifica el proceso de análisis ya que no será necesario utilizar técnicas previas de separación. La estabilidad de la enzima, que revertirá en beneficio económico, y la selectividad hacia el sustrato o analito de interés, dependerá de factores como las condiciones de reacción (pH y temperatura), técnicas de inmovilización del enzima, concentración del enzima y del sustrato entre otras, por lo que establecer las mejores condiciones de operación para cada analito en el biosensor se convierte en un importante objetivo. En este contexto, la medida de la actividad enzimática por ejemplo, sirve para determinar la afinidad de dicha enzima, para una concentración específica de sustrato lo que a su vez permitirá obtener parámetros técnicos de utilidad, como el uso de un intervalo lineal de medición u operación. Así, el estudio y optimización de dichos parámetros técnicos para el análisis de algunos marcadores de calidad y seguridad, como son la lisina, el nitrato y el ácido láctico, en productos cárnicos curados y fermentados, empleando un biosensor amperométrico; es el objetivo principal de esta tesis.

1.1 PRODUCTOS CURADOS DEL CERDO

1.1.1 Jamón Curado

Se entiende por jamón curado al producto elaborado con la extremidad posterior, cortada al nivel de la sínfisis isquiopubiana, con pata y hueso, que incluye la pieza osteomuscular íntegra (pernils), procedente de cerdos adultos, y sometido al correspondiente proceso de salazón, y curado-maduración.

El proceso está integrado por dos fases bien diferenciadas: i) Una primera fase incluye el salado de las piezas, empleando sal y otros aditivos, como los nitratos y nitritos, con lo que se pretende la absorción y difusión de las sales dentro de éstas

durante un período de reposo denominado *post salado*. Esta fase es necesaria para la correcta conservación del producto por disminución de la actividad de agua y la presencia de nitritos. ii) Una segunda fase, en la que se somete a la pieza a un proceso de desecación y maduración, en los que se ven implicados fenómenos físico-químicos, y bioquímicos, fundamentalmente de proteólisis y lipólisis, que conducen al desarrollo de unas propiedades organolépticas características (Olmo et al., 2013). De esta forma, se puede decir que el jamón no solo es el proceso de salado de la pieza porcina con el objetivo de reducir toda posible alteración microbiana, sino que se trata de una verdadera transformación a nivel de su composición química y, por lo tanto, de sus propiedades sensoriales.

A continuación se describen brevemente las etapas del proceso de elaboración del jamón curado.

1.1.1.1 Proceso de Fabricación del Jamón Curado

Se parte de perniles refrigerados o congelados. Se ha demostrado que la congelación presenta alguna ventaja frente a la refrigeración pues al formarse pequeños cristales de hielo dentro de las estructuras musculares se facilita la posterior penetración de las sales durante la salazón. También se ha observado que la congelación facilita la aparición de “pintas blancas” que son debidas a la cristalización del aminoácido tirosina durante el proceso de maduración posterior. Sin embargo, para algunas denominaciones de origen es obligatorio que las piezas se mantengan refrigeradas a temperaturas entre 0-3 °C, no estando permitido el uso de materia prima congelada.

Los perniles se preparan en función de las características específicas propias de cada tipo de jamón confiriendo a las piezas formas redondeadas características. Al realizar esta operación se delimita, dejando libre de corteza, la superficie por donde

ha de tener lugar la absorción de las sales de curado y se elimina la mayor cantidad posible de sangre de las piezas, mediante presión lo que evita el crecimiento de microorganismos contaminantes, que pueden producir problemas tecnológicos en procesos posteriores.

A continuación se realiza el pre-salado de los perniles que consiste en la aplicación, por masajeado en la superficie libre de la corteza, de las sales de curado constituídas por una mezcla de sal y sales nitrificantes; nitratos (E-251 nitrato sódico, E-252 nitrato potásico) y nitritos (E-249 nitrito sódico, E-250 nitrito potásico), que puede contener también otros coadyuvantes como azúcares y/o ácido ascórbico. La cantidad de nitratos y nitritos depende del peso de la pieza, siendo aproximadamente de 150 ppm de nitrato sódico o potásico y 100 ppm de los correspondientes nitritos. La adición de sales nitrificantes refuerza el efecto conservante de la sal por inhibir el crecimiento de *Clostridium botulinum*, pero además, contribuye a la generación del color y aroma típicos del jamón curado (Toldrá y Flores, 1998). Es por ello esencial conseguir una penetración correcta de las sales de curado, así como una conversión gradual de nitrato en nitrito, que es la forma activa, durante el proceso. Esto se consigue en las posteriores etapas de salado y post salado, en las que la sal y sales de curado difundirán hasta el interior de las piezas persiguiendo una disminución de la actividad de agua (a_w) y con ello la estabilización microbiológica de la materia prima.

El salado es una etapa decisiva para la calidad higiénico-sanitaria del producto curado. La operación se realiza en cámaras frías con temperaturas de entre 1 y 5 °C y con una humedad relativa normalmente entre 80 y 90 %. En estas condiciones se forma en la superficie del jamón una solución salina que penetra más fácilmente en la masa muscular. Existen varias tecnologías de salado que se agrupan en dos tipos: Salado por vía seca; que puede ser mediante salado individual, con una cantidad controlada de sal, o por exceso de sal y disposición de los jamones “*en pila*”, en el que

la cantidad de sal que penetra en los perniles se controla por tiempo, (entre 0.7 y 2 días por Kg); o salado por vía húmeda, bien por inmersión o por inyección de salmuera en la pieza.

A continuación se retira el exceso de sal, se da forma a las piezas y se cuelgan en cámaras refrigeradas denominadas de postsalado o reposo, para que las sales acaben de distribuirse homogéneamente por la pieza y se inicie la deshidratación o secado. Esta etapa, dura aproximadamente 2 meses, y en ella adquiere una gran importancia el control de la temperatura (3-5 °C) y la humedad relativa (75-85 %).

La siguiente etapa es el secado y maduración, que transcurren en una serie etapas en las que se va disminuyendo la humedad (entre 65 y 75 %) y aumentando la temperatura (entre 15 y 18 °C), y durante las cuales se desarrollan las características organolépticas de color, textura, aroma y sabor típicas del producto curado. El final del proceso lo marca una pérdida de peso respecto al inicial, de entre el 30 y 35 % (Narváez- Rivas et al., 2013). El proceso se resume en la figura 1.

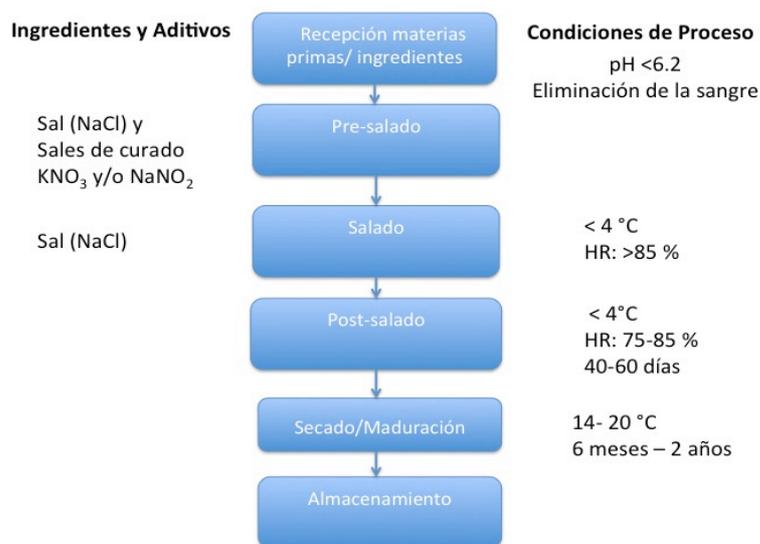


Figura 1. Diagrama de flujo de la elaboración del jamón curado (Modificado de Nam Seong et al; 2014).

1.1.1.2 Principales Cambios Bioquímicos durante el Proceso de Curado de Jamón

Los cambios bioquímicos que se inician en la carne tras el sacrificio, se modulan durante los procesos de curado para conseguir productos saludables y deseables desde el punto de vista sensorial.

El desarrollo de las características sensoriales del jamón curado, concretadas en la textura, jugosidad, olor, sabor y aroma se deben, fundamentalmente a transformaciones que experimentan las proteínas y los lípidos contenidos en la materia prima (Toldrá et al., 2000). Estos cambios dependen por un lado de las características de la materia prima como son la composición de los lípidos, (Kim et al., 2014), línea genética y potencial proteolítico (Flores et al., 1994; Toldrá et al., 1996, Guerrero et al., 1996; Armero et al., 1999), el valor del pH (Arnau et al., 1998), edad y sexo de los animales (Tabilo et al., 1999) y por otro lado del proceso tecnológico en cuanto al tratamiento de la materia prima (refrigerada o congelada, Flores et al., 2009), composición de las sales de curado (Armenteros et al., 2012, Ripollés et al., 2011), tipo de salado, temperatura, humedad, y duración de las distintas etapas del proceso. En definitiva, a cualquier factor que pueda afectar a la actividad enzimática responsable de dichos cambios bioquímicos, proteólisis y lipólisis, los cuales se describen a continuación.

1.1.1.2.1 Proteólisis

La proteólisis es un fenómeno enzimático que contribuye en gran manera al sabor y aroma del jamón curado. El proceso consiste en la degradación enzimática de las proteínas miofibrilares y sacoplásmicas del tejido muscular porcino. Las

enzimas proteolíticas pueden clasificarse en dos tipos en función de que actúen en el interior o en los extremos de las proteínas, y así las primeras son las endoproteasas o endopeptidasas (catepsinas, calpainas, proteasoma y caspasas) y las segundas son las exoproteasas o exopeptidasas (peptidilpeptidasas, aminopeptidasas, carboxipeptidasas y peptidasas).

Todos estos enzimas, que actúan tanto simultáneamente como secuencialmente, han sido claramente identificadas en sus funciones durante el proceso de curado como se resume a continuación. En la figura 2 se indica la forma de actuación de estas enzimas.

Endopeptidasas: La catepsina D es una aspartil peptidasa, activa a pH ácido, las catepsinas B, L y H, son cisteín peptidasas activas a pH ligeramente ácido-neutro y necesitan un ambiente reductor para expresar su máximo de actividad, por lo que la glicólisis anaeróbica en el músculo *post mortem* es, un ambiente adecuado para ellas (O'Halloran et al., 1997). La actividad de catepsina D durante el curado es muy relevante aunque se inactiva en etapas tempranas del proceso (Toldrá et al., 1993, Sentandreu et al., 2007), a diferencia de las catepsinas B y L que son muy estables y mantienen su actividad a lo largo de todo el proceso (Toldrá et al., 1993). La adición de sal y el consiguiente descenso de la a_w durante el secado produce la disminución en la actividad de las catepsinas. (Toldrá et al., 1992). Por su parte; las calpaínas (μ -calpaína y la m-calpaína), trabajan a pHs neutros y son estables únicamente en las primeras 2 semanas, por lo que tienen mayor importancia en la etapa de maduración *post mortem* de la carne.

El proteasoma es un complejo multienzimático muy abundante en el músculo y activo a pH entre 7 y 9. Su función está relacionada con la regulación del recambio de las proteínas musculares, aunque ciertos resultados indican que el proteasoma no degrada miofibrillas intactas (Goll et al., 1991). Por su parte las caspasas son un grupo de enzimas perteneciente al grupo de las cisteín peptidasas con una

especificidad de sustrato limitada a la hidrólisis de aquellos enlaces peptídicos que contienen un ácido aspártico en posición P1. Son enzimas involucradas en la apoptosis o muerte celular y en la activación de citoquinas proinflamatorias (Earnshaw et al., 1999). Así pues, no parece que el papel del proteasoma y las caspasas vaya a ser relevante en los procesos de curado.

Los péptidos resultantes de la acción de las endopeptidasas anteriormente descritas son degradados posteriormente por la acción de las exopeptidasas, que actúan sobre las cadenas peptídicas a partir de sus extremos.

Exopeptidasas: Se libera dipéptidos, por la acción de dipeptidil peptidasas (DPP I, II, III y IV) y tripéptidos, por la acción de tripeptidilpeptidasas (TPP I y II), desde el extremo amino terminal de proteínas y péptidos. Estas enzimas presentan diferentes pHs óptimos de actuación, diferentes localizaciones dentro del tejido muscular y diferente grado de estabilidad aunque permanece estables durante gran parte o todo el proceso de curado (Sentandreu y Toldrá, 2000). La actividad de estas enzimas en etapas avanzadas del proceso ha sido demostrado (Mora et al., 2010). Menos estudiadas son las peptidildipeptidasas que realizan la misma función pero desde el extremo carboxiterminal.

También con actividad exopeptidásica mantenida a lo largo de todo el proceso, pero en este caso liberando gran cantidad de aminoácidos libres por el extremo amino terminal, son la alanil (AAP), arginil (RAP), metionil (MAP) y piroglutamil (PGAP) aminopeptidasas, activas a pHs neutros (AAP, RAP) o básicos (MAP, PGAP) y que se encuentran en el citosol (Toldrá et al, 1992b, 1993a, Flores et al., 1996, 1997a ; Mora et al., 2009). Existe otro grupo de exopeptidasas en los lisosomas (activas a pH ácido), que actúan liberando aminoácidos desde el extremo carboxi terminal de péptidos y proteínas, denominadas carboxipeptidasas. Aunque han sido menos estudiadas en carnes y productos cárnicos, sí que se ha detectado su actividad en etapas avanzadas del proceso de jamón curado (Mora et al., 2011). Por último,

estarían las dipeptidasas y tripeptidasas que hidrolizan di y tripéptidos (Toldrá, 1997).

Existe pues una gran cantidad de enzimas que liberan aminoácidos libres y que se mantienen activas durante todo el proceso de curado. Parte de estos aminoácidos sufrirán reacciones posteriores con generación de aromas, pero la mayoría se acumulan conforme avanza el proceso. Esta acumulación de aminoácidos, y en especial de aquellos mayoritarios en la estructura primaria de las proteínas de los perniles frescos, y que son el ácido glutámico, la alanina, y la lisina se ha observado en todo tipo de jamones tanto Ibérico, como Serrano (Córdoba et al., 1994; Flores et al., 1997), lo que puede considerarse un buen indicador de la magnitud y avance de la proteólisis.

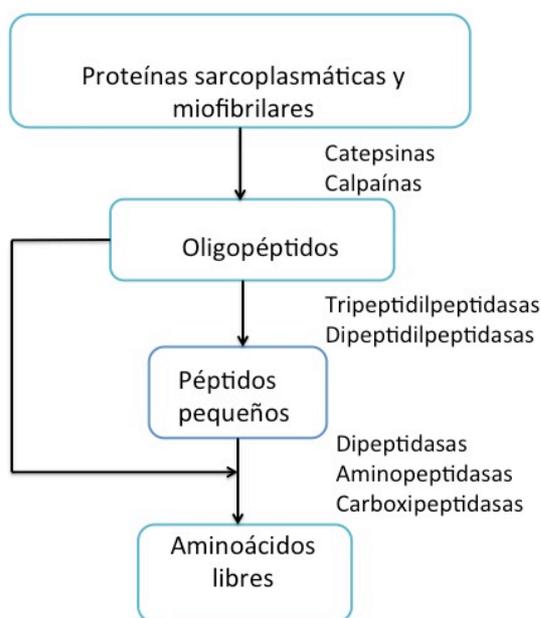


Figura 2. Esquema general de la proteólisis (Modificado de Toldrá, 1998).

1.1.1.2.2 Lipólisis

La fracción lipídica del músculo la forman los triglicéridos (mayoritarios en la grasa de depósito) y fosfolípidos (más abundantes en la grasa intermuscular). Durante el proceso de curado se producen importantes cambios en los lípidos consistentes en primer lugar en la hidrólisis con liberación de ácidos grasos por acción de lipasas sobre los triglicéridos y fosfolipasas sobre los fosfolípidos (Toldrá, 2006a). Dichas enzimas pueden tener un origen endógeno al proceder del tejido muscular, y también exógeno al ser aportadas por los microorganismos lipolíticos que se encuentran en la grasa de cobertura. La materia prima y la tecnología aplicada influyen en la lipólisis de tal manera que al final del proceso los niveles de ácidos grasos libres pueden representar desde el 8 % hasta el 10 % de los lípidos totales (Coutron-Gambotti et al., 1999).

Posteriormente, los ácidos grasos se verán involucrados en reacciones de oxidación y condensación con otros compuestos (aminas, azúcares, etc.), que llevarán a la generación de compuestos volátiles responsables del aroma característico del jamón curado (Storrustlokken et al., 2015). El sabor y aroma del jamón curado están directamente relacionados con los fenómenos de lipólisis y posterior oxidación que experimentan sus lípidos, de tal forma que las reacciones oxidativas pueden generar efectos positivos sobre estas características sensoriales. Por ello existe una relación positiva entre ciertos marcadores de la oxidación como cetonas, aldehídos, y alcoholes y la intensidad del aroma característico del jamón curado (Estévez et al., 2009), siendo éste, uno de los pocos productos en los que la oxidación de lípidos tiene un efecto positivo desde el punto de vista sensorial.

En la figura 3 se muestra un esquema de la lipólisis en el músculo durante el curado.

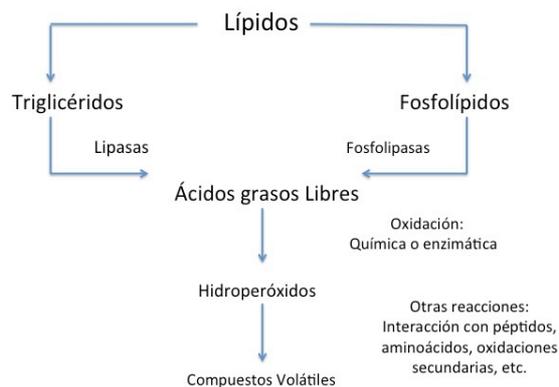


Figura 3. Esquema general de la lipólisis (Toldrá, 2002).

1.1.2 Embutidos Crudo-Curados

Son productos elaborados mediante el troceado o picado de carnes y grasas, a los que se incorporan especias, aditivos y condimentos autorizados, sometidos a un proceso de maduración (secado) y opcionalmente ahumados.

1.1.2.1 Proceso de Fabricación de Embutidos Crudo-Curados

Aunque existen diferencias en la elaboración de los distintos productos todos siguen un proceso similar que se describe a continuación:

- El proceso empieza con el picado en frío de la carne y de la grasa, adición de azúcares, sal, nitratos, nitritos, materias auxiliares, condimentos y *starters* y amasado para homogenizar la mezcla. El amasado no debe ser muy intenso para evitar el embarramiento por aumento en la temperatura. Para ello hay que mantener la mezcla en frío (2 °C) y hacerla a vacío.

- La mezcla amasada, se deja reposar durante 24h a 4 °C lo que constituye la pre-maduración. En este momento la carga microbiana es todavía baja; principalmente compuesta de microorganismos aerobios psicrófilos.
- Se lleva la pasta a la embutidora utilizando tripas del calibre adecuado, y ejerciendo presión suficiente para que no queden burbujas en el interior, que darían lugar a agujeros en la masa del embutido resultante.
- Tras el embutido, se inicia el curado durante el cual se desarrollarán las características propias de cada tipo de embutido mediante la acción de las bacterias iniciadoras (*starters*) que crecerán en las condiciones fijadas de humedad, temperatura y ventilación. El curado tiene lugar a través de varias etapas: fermentación, maduración y secado.

La fermentación o estufaje tiene lugar a 20-27 °C, con humedades relativas de entre 90-95 % y un tiempo de estancia que varía entre 1 y 2 días según el calibre del producto y que tras el cual se debe llegar a una $a_w < 0.9$ (Hospital et al., 2014). Es importante fijar bien los parámetros tecnológicos ya que una temperatura elevada acompañada de una humedad próxima a la saturación aumenta la velocidad de desarrollo de los *starters*, y con ella la acidez, dificultando el desarrollo de la flora de micrococcos que, durante las primeras 24 horas, es la que reduce los nitratos a nitritos, responsables últimos del desarrollo de la coloración roja característica de los embutidos. La mínima cantidad de nitrito necesaria para la formación de un suficiente color “de curado” en los embutidos ha sido planteada entre 30 y 50 ppm.

Las bacterias lácticas (componentes mayoritarios de los *starter*) por su parte juegan un papel clave en esta etapa al ser responsables de la fermentación de los azúcares presentes con producción de ácido láctico y consecuente bajada del pH. Dichos *starters* están constituidos fundamentalmente por bacterias lácticas homofermentativas - *Lactobacillus* (*Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Lb. Sake*) y

Pedicoccus (*P. acidilactici*, *P. pentosococcus*) y pueden contener *Micrococcus* y mohos (*Aspergillus* y *Penicillium*) (Fonseca et al., 2013). La implantación de estas bacterias y la reducción rápida del pH tienen como efecto la inhibición de microorganismos no deseables pero también la reducción de la capacidad de retención de agua por desnaturalización de las proteínas lo que ayudara a la maduración y secado.

Tras el estufaje, los embutidos se someten a la maduración en secaderos a 10-14 °C con humedades relativas entre 70 y 80 %. En esta etapa se produce la deshidratación del producto y tienen lugar los fenómenos de proteólisis y lipólisis que, como en el caso del jamón curado darán lugar a la generación de las características sensoriales de aroma sabor y textura típicos de cada variedad de embutido. El proceso se termina con el secado hasta alcanzar las mermas buscadas y durante el que se terminan de generar los aromas buscados. Todo el proceso se resume en la figura 4.

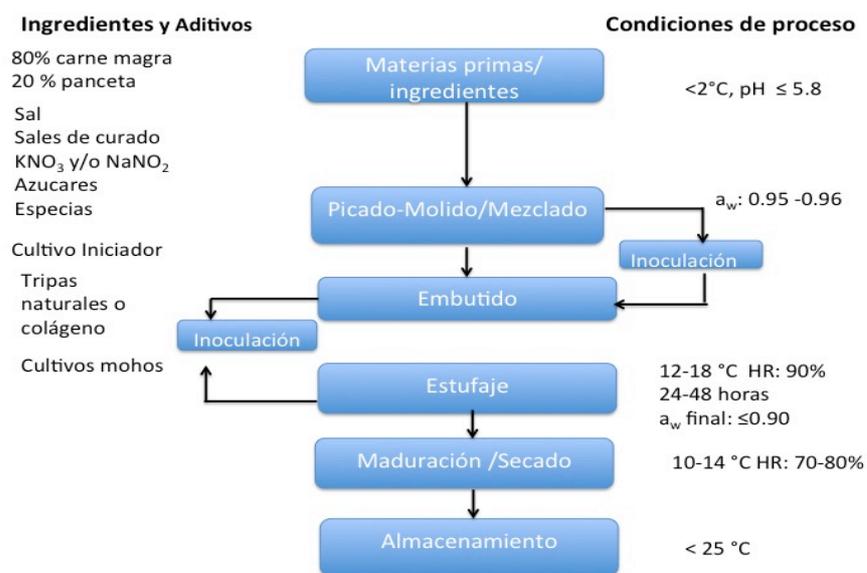


Figura 4. Diagrama de flujo para la elaboración de embutidos crudo curados fermentados (Adaptada de Fonseca et al., 2015).

1.1.2.2 Principales Cambios Bioquímicos en Embutidos Crudo-Curados

Los cambios que se producen durante el curado de embutidos son parecidos a los que ocurren durante el curado de jamón excepto que en los embutidos está presente una mayor cantidad de grasa y además, hay microorganismos que aportarán enzimas microbianas que intervendrán en los procesos de proteólisis y lipólisis junto con los enzimas endógenos de la carne. Estos procesos se verán afectados también por el pH más ácido de los embutidos. Las principales diferencias se verán en que la presencia de actividad microbiana puede, potencialmente generar aminas biógenas, pero además, la presencia de azúcares aportará una mayor influencia de la glucólisis en la generación de sabor y aroma en estos productos, especialmente por la generación de ácido láctico.

1.1.2.2.1 Proteólisis

En este alimento la degradación de las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares se producen por acción de proteasas endógenas así como de enzimas procedentes de microorganismos exógenos adicionados (cultivos iniciadores). Las bacterias ácido lácticas poseen una variada actividad proteolítica diferente a la de las enzimas proteolíticas musculares y que además deben actuar a pHs más ácidos de los que se encuentran en el jamón curado. Esta diferente actividad dará un perfil peptídico y de amino ácidos diferente, que serán sustrato para la generación de aromas (Flores et al., 1998; Fadda et al., 1999; Bolumar et al., 2005; Casaburi et al., 2007). Todo este proceso tiene lugar mayoritariamente durante el secado y la maduración debido a que las condiciones tecnológicas son las propicias para el desarrollo de la proteólisis.

1.1.2.2.2 Lipólisis

Este tipo de productos contienen una carga importante de materia grasa repercutiendo la hidrólisis de estos lípidos de forma importante en la calidad sensorial del producto. La lipólisis se inicia durante la fermentación y continúa en la maduración donde los ácidos grasos libres generados sufren diversas reacciones oxidativas que conducen a la aparición de sustancias volátiles y no volátiles que contribuyen al aroma y sabor del embutido. *Staphylococcus* y *Micrococcaceae*, y levaduras son los que contribuyen mayoritariamente a la hidrólisis lipídica. (Sanz et al., 1988; Hammes & Knauf, 1994; Sorensen & Samuelsen, 1996; Sorensen, 1997; Ordoñez et al., 1999).

1.1.2.2.3 Glucólisis y Fermentación de los Hidratos de Carbono

La glucólisis es la vía metabólica encargada de generar energía para la célula. Es la ruta principal en el metabolismo de la glucosa o del glucógeno para sintetizar ATP en condiciones aerobias o anaerobias. A través de una serie de reacciones, la glucosa se transforma en piruvato que, previa conversión en acetil coenzima A, pasa al ciclo de Krebs. En condiciones anaeróbicas, que son las que se dan en la carne, el piruvato, en presencia de lactato deshidrogenasa y ausencia de oxígeno se reduce y se transforma en ácido láctico (glucólisis *post-mortem*) con la consiguiente reducción del pH.

En los productos fermentados, se dan además reacciones glucolíticas de origen exógeno que darán también como resultado ácido láctico y que son debidas al aporte de hidratos de carbono adicionados a la masa cárnica que sirven de sustrato a los microorganismos iniciadores de las reacciones de fermentación. En los embutidos fermentados se dan dos tipos de fermentación la homofermentativa y la

heterofermentativa. La primera sólo va a generar ácido láctico mientras que la segunda puede generar productos como el acetato, etanol, acetoina o incluso ácidos grasos de cadena corta como el acético, propiónico, y butanoico que afectarán a la calidad sensorial de los productos crudo curados. (Toldrá et al., 2008; Kameník et al., 2013).

1.1.2.2.4 Otros Cambios

1.1.2.2.4.1 Generación de Aminas Biógenas

Las aminas biógenas son compuestos orgánicos nitrogenados que se producen fundamentalmente por descarboxilación microbiana de sus aminoácidos precursores, o por aminación o transaminación de aldehídos y cetonas. Tienen estructura alifática o aromática y pueden ser monoaminas (histamina, feniletilamina o tiramina), diaminas (putrescina, cadaverina) o poliaminas (espermina, espermidina). Las poliaminas son de origen natural o fisiológico, e indispensables, a bajas concentraciones en células vivas en las que realizan diversas funciones. Por su parte, las aminas biógenas (AB) tienen origen microbiano, se generan en alimentos con alto contenido proteico (pescado, carne) que han sufrido degradación con crecimiento microbiano (*Escherichia coli*, *Enterobacteriaceae*, *Hafnia alvei*, o *Klebsiella pneumoniae*) o fermentación con gran liberación de aminoácidos como sucede en los embutidos (también en queso, vino, cerveza, etc), en los que el medio ácido estimula la síntesis y actividad de la descarboxilasa, proveniente tanto de la microbiota responsable de la fermentación como de microorganismos contaminantes de la materia prima (Maijala et al, 1993). El consumo de altas concentraciones de AB puede tener efectos nocivos por tener propiedades vasoactivas o psicoactivas (histamina, tiramina) o por formar nitrosaminas

(putrescina y cadaverina). Además las aminas biógenas pueden ser indicadoras de falta de higiene o mal procesamiento de los alimentos (Bover-Cid et al., 1999). De hecho, se ha observado una menor generación de AB en embutidos en los que se adicionó nitratos (Hernández-Cázares et al., 2012), a diferencia de lo que ocurre en algunos embutidos de elaboración tradicional en los que no se adiciona nitratos.

1.1.2.2.4.2 Reacciones de Transformación de Aminoácidos

Además de la generación de aminas biógenas, los aminoácidos liberados en el proceso de proteólisis también pueden sufrir cambios que generan compuestos volátiles por acción de ciertas bacterias y levaduras. Así por ejemplo Olesen et al (2004), señalaron un aumento del ácido 3-metilbutanoico y α -hidroxi-isocaproico al incubar leucina con cepas de *S. xylosus* y *S. carnosus* y las levaduras *D. Hansenii* fueron capaces de generar alcoholes, aldehídos ramificados, compuestos ácidos y ésteres a partir del metabolismo de la leucina, isoleucina y valina (Demeyer et al., 2000).

1.1.2.2.4.3. Degradación y Oxidación de los Lípidos

Los ácidos grasos se oxidan de forma natural en presencia de catalizadores como el oxígeno, la luz, iones metálicos, y temperatura. La oxidación depende en gran manera del grado de insaturación de los ácidos grasos ya que la presencia de dobles enlaces genera desequilibrios en las moléculas que favorecen su oxidación. En el caso de los embutidos curados de lo que se trata es de dirigir la oxidación de los ácidos grasos mediante la utilización de ciertos microorganismos como el caso de los *Staphylococcus* los cuales producen compuestos volátiles deseables que conforma, un aroma característico (Berdagué et al., 1993; Johansson et al., 1994).

1.2 CALIDAD

El concepto de calidad aplicado a alimentos es muy amplio y puede abarcar desde el valor en nutrientes que puede aportar a la dieta, las características sensoriales que hacen de él un producto deseable para el consumo pero también, la fidelidad de los procesos tecnológicos a las normas establecidas para la elaboración de alimentos con características físico-químicas y microbiológicas seguras durante toda su vida útil. El conjunto de estas características proporcionan una sensación de bienestar y seguridad en el consumidor. Las normas ISO definen calidad como la "capacidad de satisfacer a través de unas propiedades o características unas necesidades declaradas por el consumidor, o simplemente implícitas.

En relación a los productos curados, la calidad incluye los siguientes aspectos:

a) Calidad nutricional.- Los productos curados proporcionan una interesante variedad de componentes a la dieta, destacando su aporte proteico, mineral, y su contenido en vitaminas. En general, el jamón contiene un 20-30 % de proteínas y 3-6 % de lípidos, mientras que en los embutidos, la grasa puede alcanzar hasta el 40 %. Las proteínas del cerdo se consideran de alta calidad por su excelente digestibilidad y alto valor biológico, con una gran cantidad de aminoácidos esenciales (Leo M.L et al., 2009). En los productos curados, y en especial en el jamón, gran parte de los aminoácidos están en forma libre debido a la intensa proteólisis que ha tenido lugar (Toldrá et al., 1992b). Contiene también gran abundancia de dipéptidos naturales de histidina (carnosina, anserina y balenina), de los que se han descrito interesantes propiedades bioactivas (Aristoy et al., 2015). Durante los procesos de curado se generan además multitud de péptidos con propiedades antioxidantes (Mora et al., 2014) y antihipertensivas que han demostrado su actividad tanto *in vitro* como *in vivo* (Escudero et al., 2012). Posee también ácidos grasos mono y poliinsaturados, siendo la carne de cerdo muy rica en ácido oleico, y en especial el cerdo Ibérico cuyo

contenido en ácido oleico supera el 65 %, debido a su modo de explotación o crianza, diferente a otras razas.

También el jamón curado destaca por su riqueza en minerales como hierro y zinc, ambos en formas biodisponibles gracias a las proteínas que facilita su absorción. El zinc es necesario en los sistemas biológicos ya que colabora al normal funcionamiento de reacciones enzimáticas y cumple un papel importante en el sistema inmunitario por lo que su ingesta en las primeras etapas de la vida es indispensable. El jamón contiene además cantidades importantes de fósforo y potasio y pequeñas cantidades de calcio y magnesio (Lozano et al., 1998; Nam Seong et al., 2014). Hay que destacar que debido a las características de su procesamiento, las cantidades de sodio son muy altas, alrededor del 2.3 % (para una concentración de sal del 5.8 %), que, teniendo en cuenta las recomendaciones de la OMS que indican que no se debe superar el consumo diario de 6 g NaCl (2.3 g Na) por su relación con la hipertensión, hace que el jamón curado deba consumirse con precaución en especial por personas hipertensas o con tendencia a la hipertensión. Esta recomendación, sin embargo, no tiene en cuenta la presencia de compuestos intrínsecos del jamón con propiedades antihipertensivas (péptidos) que pueden neutralizar el efecto negativo de la sal, especialmente cuando no se ha demostrado una relación directa entre hipertensión y consumo de jamón curado en el caso de que el resto de la dieta sea saludable. En cualquier caso, la tendencia actual es reducir el contenido de sal, bien por reducción de la cantidad de sal, NaCl empleada y/o por sustitución por otras sales (Barat et al., 2013).

Asimismo, el jamón curado destaca por su contenido en vitaminas del grupo B, en especial la tiamina (B₁), riboflavina (B₂), niacina, (B₆) y cianocobalamina (B₁₂) (Jiménez-Colmenero et al., 2010).

b) Calidad Organoléptica.- Los alimentos se someten a análisis físicos, químicos y microbiológicos con el fin de conocer su valor nutricional y garantizar su

seguridad. Pero los productos destacan también por sus propiedades organolépticas como el aspecto, sabor, olor, aroma o la textura que pueden ser determinantes de la calidad del producto en cuanto que tienen un efecto decisivo en el consumidor a la hora de adquirir dicho producto. Estas particularidades se estudian mediante un análisis que mide las sensaciones producidas por los alimentos. El análisis sensorial de los alimentos parte de parámetros básicos: aspecto, olor, sabor o gusto, aroma y textura, haciendo referencia ésta última a las sensaciones durante la masticación. A través de estos parámetros pueden identificarse posibles alteraciones del producto, excesiva proteólisis o defectos en la fabricación, que sin ser peligrosos desde el punto de vista sanitario, sí que devalúan o menoscaban la aceptación del producto; pero además, un alimento se distingue por numerosas características de las que depende, en gran medida, su elección y aceptación por parte del consumidor. Estas peculiaridades definen la calidad sensorial, una disciplina que con el desarrollo de la tecnología alimentaria ha ganado fuerza en el sector y que persigue como objetivo profundizar en el estudio de las cualidades sensoriales específicas para cada alimento.

Es por esto que el análisis sensorial dependerá del tipo de producto y así, a modo de ejemplo, en el jamón curado podrían valorarse especialmente los siguientes aspectos (Pena et al., 2013):

Apariencia: Color
Uniformidad de la loncha
Veteado
Presencia de pintas blancas
Encortezado

Olor: Característico a curado

	A carne
	Olores extraños: olor sexual
Sabor:	Salado
	Amargo
Aroma:	Característico a curado
	A carne
	Persistencia de la sensación retronasal
Textura:	Pastosidad
	Jugosidad
	Dureza
	Fibrosidad

c) Calidad higiénico-sanitaria.- Este aspecto de la calidad guarda relación con un posible riesgo de intoxicación o enfermedad por el consumo de alimentos contaminados con microorganismos patógenos (*Listeria*, etc.), por residuos de fármacos (antibióticos u hormonas) que han sido administrados durante la crianza del animal y que pueden llegar a causar problemas alérgicos o de resistencia, o por tóxicos o sustancias que a dosis determinadas puedan ser perjudiciales para la salud. Este podría ser el caso de una excesiva adición de nitratos en las sales de curado y que cuando generan nitritos están considerados como formadores de nitrosaminas (Honikel, 2008).

La calidad puede ser medida durante el proceso de fabricación, en el producto terminado o durante su etapa de comercialización para lo que es necesario disponer de métodos objetivos que sean rápidos, fiables y económicos.

1.2.1 Parámetros para el Control de la Calidad

En base a todos los aspectos descritos y que condicionan la calidad de los productos curados, se concretan los parámetros de control.

1.2.1.1 Controles en Jamones Curados

El principal control que se realiza en el proceso de curado de jamón es el control de las mermas. La pérdida de peso permite seguir fácilmente el proceso de secado, de modo que una merma del 30-35 % indica un producto terminado, sin olvidar que durante todo el proceso se controla la humedad, temperatura y ventilación de las cámaras dónde se realiza el salado, secado y curado de las piezas.

Control de la penetración de las sales de curado.- Para lograr las características específicas de apariencia, aroma, sabor y textura, propias del jamón curado, (1.2b) así como asegurar la calidad higiénica de éstos (1.2c), es esencial la aplicación y difusión correcta de la sal y de los agentes de curado (nitratos y nitritos) en los perniles.

Como primer punto está la utilización de la sal común que junto con el uso de sales curantes, nitratos y nitritos, ayudarán a conseguir las características deseadas del producto. La sal se ha utilizado desde tiempo inmemorial como agente conservador de los alimentos sobre todo de la carne, y su acción se debe a que disminuye la a_w dificultando el crecimiento microbiano. La sal tiene también un efecto regulador de la actividad de las proteasas musculares para obtener un producto de calidad en cuanto al desarrollo de las características sensoriales. Por su parte, el nitrito actúa inhibiendo el crecimiento del *Clostridium botulinum* y, siendo esta su principal misión no es la única ya que es también responsable del desarrollo del color característico de los productos curados afectando además a su aroma (Toldrá et al.,

2009). La adición de nitratos se debe a que sirven de fuente de obtención lenta de los nitritos por reducción durante el curado.

El control, tanto de la penetración de la sal como de los nitritos y nitratos (como fuente de nitritos), es así muy importante para garantizar tanto la calidad sensorial como la seguridad microbiológica de los productos curados. Sin embargo, nitritos y nitratos, que cumplen un papel tecnológico necesario, deben permanecer dentro de los límites de concentración permitidos para evitar riesgos para la salud que su abuso puede provocar. La ingesta diaria aceptable (IDA) de nitratos recomendada por el comité conjunto de la FAO/OMS es de 0- 3.7 mg/Kg peso corporal. Puesto que la toxicidad de los nitratos proviene de su conversión en nitritos y su posible formación endógena en N-nitrosocompuestos debe tenerse en cuenta también la IDA de nitritos, fijada en 0-0.06 mg/Kg de peso corporal (EFSA, 2010). El análisis para el control de los nitratos se verá al final del apartado.

Control de proteólisis. El desarrollo de las características deseables de textura, aroma y sabor de los productos cárnicos curados, se debe fundamentalmente a la proteólisis controlada que tiene lugar durante el proceso. El control de dicha proteólisis se realiza con la sal, ya que ésta regula por inhibición, la actividad de las proteasas musculares (catepsinas) (Armenteros et al., 2009).

El parámetro que mejor describe el grado de proteólisis durante el proceso es el índice de proteólisis que relaciona el nitrógeno amínico no proteico, proveniente de los aminoácidos libres, con el nitrógeno amínico total, que incluye además a las proteínas.

El índice de proteólisis aumenta conforme avanza el proceso de maduración, por lo que su medida nos da idea del avance del mismo, o de su duración y por tanto de la calidad del producto. Sin embargo, índices de proteólisis anormalmente altos pueden indicar el uso de materias primas (animales) no adecuadas por tener genéticas con una excesiva actividad de catepsinas o el uso de cantidades de sal

excesivamente bajas, (Toldrá et al 1996). La tendencia actual es a reducir la sal en los alimentos, pero esto en la fabricación de jamón debe controlarse con mucho cuidado ya que, los jamones con mayor índice de proteólisis presentan menor dureza y mayor cohesividad que se asocia a una textura blanda y/o pastosa indeseable.

El avance de la proteólisis únicamente a partir de la medida de los aminoácidos libres que se generan, puede ser también indicativo de la calidad del jamón curado. Se ha observado aumento de todos los aminoácidos libres excepto de la ornitina, β -alanina y glutamina, hasta el final del proceso (procesos de 12 a 15 meses), siendo el ácido glutámico la lisina, alanina, leucina, y arginina los que más crecen, por lo que podrían ser indicativos de la longitud o avance del proceso (Toldrá et al., 2000a). Al final del apartado, se describen métodos de análisis de aminoácidos libres.

1.2.1.2 Controles en Embutidos Crudo-Curados

Los principales parámetros de control en la fabricación de embutidos crudo-curados, giran en torno a la seguridad microbiológica del producto, que está relacionada con la implantación de los cultivos iniciadores, y con un secado adecuado. Los controles que se realizan son los siguientes:

El control del pH en los embutidos curados nos indicará que los cultivos iniciadores se han implantado correctamente y que la generación de ácido láctico progresa.

La determinación de la actividad de agua, principalmente al final del proceso, es importante para la seguridad microbiológica del producto final.

La calidad microbiológica de salchichones se evalúa mediante los recuentos de *Staphylococcus aureus*, clostridios sulfito reductores, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* y la presencia/ ausencia de Salmonella. Los estudios realizados por Smith et al., (1975), reportan la incidencia de embutidos crudos-curados con

presencia de *Salmonella* en productos elaborados por el sistema tradicional, e indican que cuando el patógeno está presente después del estufaje es difícil asegurar su ausencia en el producto final mediante la disminución de actividad de agua que tiene lugar durante el proceso de secado. Frente a esta problemática se elaboró el Reglamento de criterios microbiológicos EC 2073/2005 que requiere ausencia de *Salmonella* en 25 g para este tipo de productos (Official Journal of the European Union, 2005).

Un control alternativo o complementario de los tradicionales descritos, sería la medida del ácido láctico, puesto que de su concentración depende la bajada de pH en los embutidos y además sería indicativo del establecimiento de las bacterias ácido lácticas deseables, garantizando una buena calidad higiénica y alargando la vida útil en el producto terminado. Al final del apartado se describen los métodos de determinación de ácido láctico.

1.2.2 Determinación de Nitrato

Los nitratos y nitritos son compuestos iónicos que se encuentran en la naturaleza formando parte del ciclo del nitrógeno. El nitrato NO_3^- es la forma estable de las estructuras oxidadas del nitrógeno, y a pesar de su baja reactividad química puede ser reducido a nitrito por acción microbiana. De hecho, el nitrato se transforma en nitrito por reducción bacteriana tanto en los alimentos (durante el procesado y almacenamiento), como en el propio organismo (en la saliva y el tracto gastrointestinal). El nitrito es la forma activa capaz, por un lado de inhibir el crecimiento de *C. botulinum*, y sus esporas y también de, a través de la formación de óxido nítrico, unirse al Fe^{++} de la mioglobina para formar nitrosomioglobina que da color rojizo a los productos cárnicos curados (Honikel, 2008).

Sin embargo, la reducción del nitrato a nitrito condiciona también su toxicidad ya que puede originar metahemoglobinemia por oxidación del Fe^{++} de la hemoglobina, la cual tiene una excesiva afinidad por el O_2 , quedando bloqueada la misión transportadora de O_2 de la hemoglobina pudiendo tener efectos tóxicos e incluso llevar a la muerte. Este efecto es especialmente importante en los lactantes. Sin embargo, el riesgo más importante para la salud derivado de la exposición a estas sustancias se debe a que el nitrito puede reaccionar con aminas o amidas para formar “nitrosocompuestos” (figura 5), muchos de los cuales como las nitrosaminas son potentes carcinógenos. Las reacciones de nitrosación pueden tener lugar durante la maduración o el procesado de los alimentos o bien en el tracto gastrointestinal (ecuación 1).

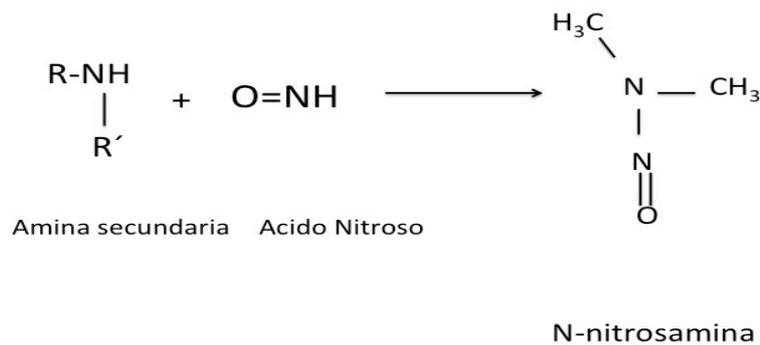
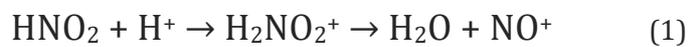


Figura 5. Formación de Nitrosaminas

Así pues, tanto por su acción beneficiosa en el alimento como por su posible acción perjudicial en el organismo, su concentración en los productos curados debe

controlarse y mantenerse por debajo de los límites permitidos.

Por todo ello, se hace necesario disponer de métodos de medida de nitratos en los alimentos y en concreto en los productos cárnicos curados. En la preparación de la muestra para su análisis, lo más habitual es la extracción en agua caliente, desproteinización de la muestra y filtrado. Tras ello, se reducen los nitratos obtenidos a nitritos empleando cadmio metálico y se determinan los nitratos como nitritos empleando reacciones de óxido reducción que dan productos coloreados medibles a determinadas longitudes de onda por espectrofotometría visible (Bianchi et al., 1995).

También se puede analizar por cromatografía de intercambio iónico. Dado que se trata de aniones, los nitratos y nitritos pueden analizarse fácilmente por esta técnica empleando un detector de conductividad o por detección ultravioleta a 210 o 215nm (De Mey et al., 2014).

Se ha utilizado también la electroforesis capilar en zona (ECZ) para análisis de nitritos y nitratos en alimentos infantiles (Della Betta et al., 2014) y en carnes y productos cárnicos curados (Zhang et al., 2014). Esta técnica ha permitido analizar conjuntamente iones inorgánicos y orgánicos (ácidos orgánicos). En estos casos es frecuente la detección UV indirecta que consiste en añadir un cromóforo al electrolito, de manera que la elución del analito se detecta por una señal negativa (menor absorción) que será transformada por el software en positiva. Una buena revisión sobre este método es la publicada por Galli et al., (2003), aunque en ella no aparece ninguna aplicación a los productos cárnicos. El método se empleó recientemente para seguir la fermentación durante el ensilado (Ayarza et al., 2015). Los métodos enzimáticos utilizando enzimas oxidoreductasas permiten también el análisis de nitratos y, aprovechando el intercambio de electrones que se dan en este tipo de reacciones y colocando estas enzimas en un sensor amperométrico, podemos rentabilizar los análisis. Esta aplicación se describirá más adelante.

1.2.3 Determinación de Aminoácidos Libres

Los aminoácidos libres son el producto de la hidrólisis de las proteínas del cerdo durante los procesos de curado y su cantidad aumenta de manera muy importante en dichos productos, pero en especial en el jamón curado. Los índices de proteólisis dan idea del avance de la proteólisis, pero los resultados son muy variables pues tienen muchas interferencias. El análisis de los aminoácidos particulares es más fiable. En los embutidos crudos curados es difícil tomar como marcador de curado alguno de los aminoácidos, ya que el espectro de éstos varía mucho en función del tipo de embutido en cuanto a proceso y composición de la flora microbiana (Fadda et al, 1999; Bolumar et al., 2006; Casaburi et al., 2007). En el caso del jamón sí que hay unanimidad, e independientemente del proceso, la lisina es junto con el ácido glutámico, los aminoácidos que más aumentan, lo que facilita su uso como índices del avance de la proteólisis.

El análisis de aminoácidos en alimentos está muy desarrollado. Se utilizan normalmente métodos de cromatografía líquida o de gases, y los análisis, especialmente de los aminoácidos libres es muy complejo por el gran número de picos que aparece en el cromatograma y porque la preparación de la muestra es larga y/o complicada ya que los aminoácidos requieren una derivatización para poder ser analizados y/o detectados.

El análisis de aminoácidos concretos por métodos enzimáticos, sin embargo, es una alternativa sensible, más selectiva y rápida no requiere derivatización como índice de proteólisis en productos fermentados. Suelen utilizarse enzimas oxidasas, L-aminoácido oxidasas, como la glutamato oxidasa para el análisis de glutamato o la lisina oxidasa para el análisis de lisina, que además, asociándose con sensores amperométricos, constituye una buena opción para el seguimiento de la proteólisis en jamón curado.

1.2.4 Determinación de Acido Láctico

El ácido láctico es un ácido carboxílico con un grupo hidróxilo en posición α y su presencia en embutidos se debe a que es producto de la fermentación láctica de los azúcares en presencia de bacterias lácticas. La presencia de ácido láctico produce una bajada de pH que protege a los embutidos crudo-curados del crecimiento de bacterias perjudiciales y además, ayuda a la desecación del producto por provocar la desnaturalización de proteínas y salida de agua interna.

Los métodos analíticos para la determinación de ácido láctico incluyen métodos colorimétricos, cromatografía líquida de alta resolución, espectroscopia infrarroja y métodos enzimáticos (Naidoo y Simpson, 2012; Liaud et al., 2014; De Sena Aquino et al 2015; Lu et al., 2015).

Por su carácter ácido se separa bien en columnas de intercambio iónico, lo que permite su análisis por cromatografía líquida de alta resolución empleando este tipo de columnas y con detección ultravioleta a 210 nm. También se ha analizado, del mismo modo que el nitrato, por electroforesis capilar (Galli et al., 2003).

Existen además kits comercializados para el análisis de ácido láctico, basados en el método enzimático de la lactato deshidrogenasa, que transforma el ácido láctico en ácido pirúvico y NADH. La cantidad de NADH formada, proporcional al ácido láctico presente en la muestra, se mide a 340nm. Este método enzimático, se puede también acoplar a sensores amperométricos, aplicación de la que se hablará en la sección siguiente.

Hasta ahora hemos centrado el control de los productos curados del cerdo, en el análisis de determinados parámetros objetivos: i) análisis de aminoácidos libres y en concreto lisina, para hacer un seguimiento del proceso de curado, tanto de jamón como de embutidos crudo-curados ii) análisis de nitratos para asegurar la calidad microbiológica de ambos tipos de productos, y iii) análisis de ácido láctico para

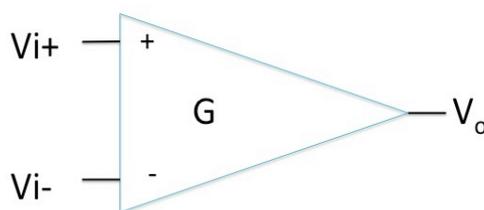
hacer un seguimiento de la implantación de las bacterias ácido lácticas en los embutidos fermentados para asegurar la calidad higiénica del producto. En los 3 analitos, se ha mencionado la posibilidad de analizarlos empleando sensores enzimáticos como describiremos a continuación y que será objeto de esta tesis.

1.3 BIOSENSORES

Los biosensores son dispositivos analíticos conformados por un elemento biológico de reconocimiento que están asociados a un mecanismo que garantiza la detección e interpretación de la variación de las propiedades eléctricas obtenidas de la interacción entre el dispositivo y el material biológico.

Según la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) un sensor se define como un dispositivo analítico que incorpora un elemento biológico, íntimamente asociado con un transductor fisicoquímico que en presencia del analito produce una señal eléctrica que es proporcional a la cantidad presente del mismo (Turner et al 1987). El principio de detección se basa en la interacción específica entre el compuesto de interés y el bioelemento de reconocimiento (enzimas, anticuerpos, tejidos, receptores celulares, microorganismos, o ácidos nucleicos). Dicha interacción produce variación en una o varias propiedades físico-químicas (pH, transferencia de electrones, calor, cambios de masa, variación de las propiedades ópticas, cambios de potencial etc.) estos cambios son detectados por un transductor específico que debe ser capaz de convertir esa reacción biológica en una señal detectable (Prodromidis y Karayannis, 2002). La señal es amplificada para su posterior tratamiento (Thakur y Ragavan 2013) (Figura 6).

La elección del material biológico de reconocimiento estará determinado por las características físico-químicas que lo hacen afín al analito de interés, y su interacción



$$V_o = G \times (V_{i+} - V_{i-})$$

Figura 6. Amplificación de la señal de tensión en un sensor electroquímico donde V_{i+} y V_{i-} representan la caída de tensión, G , la conductancia, V_o , la tensión.

con el sistema transductor. Como método de análisis, además de sus aplicaciones en alimentos, se ha podido utilizar para cuantificar determinados componentes como residuos agroquímicos, toxinas, presencia de patógenos, contaminantes ambientales y se han aplicado al control de procesos de fabricación en tiempo real. Como ventajas principales presentan: una alta sensibilidad, ya que los analitos, en muchas ocasiones se encuentran a nivel de trazas, selectividad, y reproducibilidad, así como un fácil manejo y bajo costo de operación.

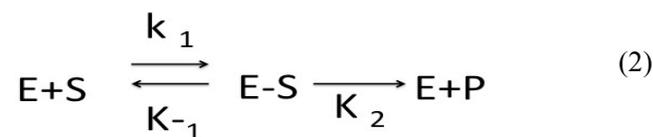
1.3.1 Clasificación de los Biosensores

Los biosensores se pueden clasificar en base a su elemento de reconocimiento o el tipo de transductor.

1.3.1.1. Clasificación de los Biosensores por su Elemento de Reconocimiento

1.3.1.1.1 Biosensores Catalíticos

Los biosensores catalíticos utilizan material biológico (enzimas, anticuerpos, tejidos o microorganismos) que va a reaccionar selectivamente con un analito o familia de analitos y lo transformará, acelerando la reacción química sin consumirse. Las enzimas son las que en los últimos años se han utilizado más frecuentemente debido a su disponibilidad, bajo costo y fácil manipulación (Eggins, et al 2002). Este tipo de biosensores son conocidos como sensores enzimáticos. El mecanismo básico de la catálisis enzimática implica la unión del enzima con el sustrato con la consiguiente transformación de éste en producto, y liberación de la enzima que quedará de nuevo disponible como se muestra en la ecuación 2. Un ejemplo sería la reacción de oxidación de la lisina, catalizada por la lisina oxidasa.



1.3.1.1.2 Biosensores por Afinidad

En este tipo de biosensores el analito de interés interactúa con macromoléculas o ensamblajes moleculares organizados en los que intervienen ácidos nucleicos, anticuerpos, o carbohidratos. Estos biosensores monitorizan la unión del analito con su receptor sin llevar a cabo transformaciones de orden químico (Jiménez y León, 2009), pero produciendo una reacción de equilibrio en la que se forma un complejo analito-receptor (Mello y Kubota, 2002). Esta interacción genera

una variación físico-química en el entorno (cambio de pH, de masa, variación de las propiedades ópticas, etc.) que es captada por el transductor. Entre ellos están los inmunosensores o los sensores basados en quimiorreceptores.

1.3.1.2 Clasificación de los Biosensores por el Tipo de Transductor

1.3.1.2.1 Biosensores Electroquímicos

La característica principal de este tipo de sensores químicos es la robustez con la que trabajan; además su fabricación es simple y económica comparada con el resto de transductores, poseen un amplio intervalo de linealidad, y tiempos de respuesta cortos. El proceso genera productos y consume sustratos generándose una señal electroquímica transformada, la cual es detectada y amplificada para su posterior tratamiento (Figura 6). En función del tipo de señal electroquímica se pueden clasificar en amperométricos, potenciométricos, y conductimétricos.

1.3.1.2.1.1 Amperométricos

Este tipo de biosensores se basa en la transferencia electrónica directa entre la enzima y el electrodo. Las características principales de estos sensores son su naturaleza catalítica, así como la transferencia electrónica directa desde el electrodo hacia la molécula de sustrato y viceversa a través del centro activo de la enzima, sin portadores.

De acuerdo con la teoría de la transferencia de electrones, la constante de velocidad de la interacción electroquímica directa entre el donante y el aceptor se determina por la caída de potencial entre el centro redox de la enzima y el electrodo, por la

energía de transformación en la transferencia de electrones, y por la distancia entre el sitio activo de la enzima y la superficie del electrodo (Dzyadevych et al., 2008).

1.3.1.2.1.2 Potenciométricos

Este tipo de sensores se basa en la diferencia de potencial o voltaje entre un electrodo de trabajo y un electrodo de referencia. La diferencia de potencial entre los electrodos, tiene relación directa con la concentración del analito de acuerdo con la ecuación de Nernst-Donnan (ecuación 3), en la que se tiene también en cuenta la actividad de iones interferentes.

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln a_i + \sum_j K_{i,j}^{pot} * a_j^{\frac{z_i}{z_j}} \quad (3)$$

donde a_i es la actividad del ion principal, a_j la actividad del ion interferente, z_i y z_j , las cargas de los iones principal e interferentes, y $K_{i,j}^{pot}$ es el coeficiente de selectividad.

Como ejemplo están los sensores denominados voltamperométricos, que generan curvas de intensidad-potencial, y son iones selectivos. Estos pueden disponer de un dispositivo de medida de potencial, un electrodo de referencia y una membrana selectiva de iones (ISE) o de gases, como electrodo de trabajo (Terry et al., 2005). La aplicación más extendida de estos sensores es el uso de electrodos selectivos de iones, que consiste en que el electrodo de trabajo se une a una membrana selectiva a un ión (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , H^+ , o NH_4^+) determinado.

1.3.1.2.1.3. Conductimétricos

Se basan en los cambios de conductividad, (o alguna propiedad asociada a ésta) mediante las medidas de resistividad en corriente continua, y medidas de

impedancia cuando se utiliza corriente alterna a voltaje constante que se produce en el sistema del sensor debido a la generación o consumo de iones durante una reacción química (Chaubey y Malhotra, 2002). El cambio en la conductividad es proporcional a la concentración de iones según la ecuación 4.

$$\Lambda = \frac{K}{C} \quad (4)$$

donde K es la conductividad específica ($S \text{ cm}^{-1}$) y C es la concentración de iones (mol cm^{-3}).

1.3.1.2.2 Biosensores Físicos

1.3.1.2.2.1 Ópticos

Se basan en los cambios de las propiedades ópticas como la absorbancia, reflectancia, fluorescencia, índice de refracción, dispersión de luz, y efecto optotérmico por interacción del analito y el receptor. Estos dispositivos no necesitan electrodos de referencia, y presentan inmunidad ante interferencias eléctricas. Algunos sensores de fibra óptica se han utilizado para determinar la calidad microbiológica, por ejemplo en embutidos, mediante la detección de *Listeria monocytogenes* (Geng et al., 2004) o *Escherichia Coli* O157:H7 (Radke y Alocilja, 2005), o presencia de contaminantes como es la detección de antibióticos en suero de oveja (Carrasco et al., 2015).

1.3.1.2.2.2 Térmicos

En este tipo de sensores la interacción entre el analito y el receptor produce una

variación de entalpía que se convierte en una señal eléctrica que es proporcional a la concentración del analito. Un esquema de este tipo de biosensores se muestra en la figura 7. Pueden utilizarse combinados con enzimas inmovilizados que por transformación del sustrato (sensores catalíticos), se liberan o consumen calorías que pueden detectarse por termistores o dispositivos piroeléctricos. Se han utilizado también para la detección de interacciones antígeno-anticuerpo (sensores por afinidad).

En este tipo de sensores la reacción se produce en dispositivos termoaislados por lo que los cambios ambientales no afectan a los cambios de temperatura detectados. Tienen el inconveniente de ser muy costosos.

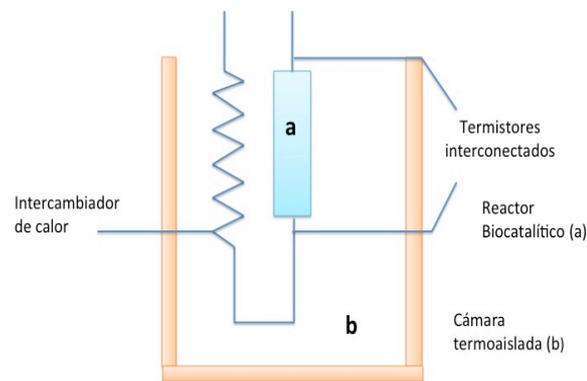


Figura 7. Esquema de un sensor térmico.

1.3.1.2.2.3 Piezoeléctricos

El funcionamiento de este tipo de sensores se basa en el efecto piezoeléctrico que tienen los cristales de cuarzo. Este efecto consiste en la aparición de una carga eléctrica cuando el cristal es sometido a algún tipo de deformación. Detectan la variación de la frecuencia de resonancia, que se produce sobre la superficie de un

cristal piezoeléctrico, o un dispositivo de onda acústica superficial, debido a una variación de masa (Terry et al., 2005). En alimentos se han optimizado recientemente para detectar *S. aureus* en leche utilizando como elemento de reconocimiento, un aptámero para el *S. aureus* (Lian et al., 2015).

1.3.2 Sensores Enzimáticos

Los sensores enzimáticos son biosensores electroquímicos de tipo catalítico en los que el receptor es una enzima cuya función es catalizar específicamente la reacción correspondiente. La enzima permanece inalterada después de la reacción, lo que al estar inmovilizada permite utilizarla en múltiples mediciones. En este tipo de sensores el transductor más frecuente es el electrodo tipo Clark o electrodo de oxígeno. El principio de operación se detalla en el apartado 1.3.2.4.

Estos sensores presentan características como la alta selectividad, especificidad y versatilidad de las enzimas para reconocer moléculas particulares, combinado con un transductor capaz de medir la concentración de un analito a partir de variaciones de corriente (intensidad, diferencia de potencial o conductividad) que se producen en una célula electrolítica como consecuencia de la reacción enzimática.

Como se indicó, las enzimas son proteínas capaces de catalizar una reacción química. Reaccionan de manera selectiva con un analito o familia de analitos, acelerando la reacción y sin consumirse.

El mecanismo básico de la catálisis enzimática se indicó en la ecuación 2, donde S es el sustrato, E la enzima, E-S el complejo enzima-sustrato y P el producto, K_1 , k_2 , k_{-1} , son las constantes cinéticas para cada una de las etapas de reacción.

La velocidad máxima de la reacción enzimática y la constante de Michaelis-Menten se determinan mediante la ecuación de Hanes-Woolf (ecuación 5).

$$\frac{S}{V} = \frac{S}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \quad (5)$$

donde V es la velocidad de reacción, V_{\max} es la velocidad máxima de reacción, K_m es la constante de Michaelis-Menten y S corresponde a la concentración de sustrato.

La actividad de una enzima está regulada por el pH y la fuerza iónica del medio de reacción y temperatura, por lo que determinar estos parámetros constituye el primer paso a seguir en la caracterización de una enzima. Las enzimas poseen una estructura tridimensional en cuyo interior se localiza el sitio activo que es el que confiere la especificidad.

Las enzimas se clasifican por el tipo de reacción que catalizan (Tabla 1).

Las enzimas son los elementos más comúnmente utilizados en la fabricación de biosensores, debido a su bajo coste, disponibilidad en el mercado, y fácil manipulación. Son muy selectivas y su principal ventaja es su velocidad de respuesta en relación a otros bioreceptores (ácidos nucleicos, antígenos, células de tejidos, microorganismos).

Las enzimas más utilizadas como bioreceptores son las de tipo oxido-reductasas, ya que en la conversión enzimática del sustrato (oxidación) tiene lugar una reacción de transferencia de electrones (Reviejo y Pingarrón, 2000; Thévenot et al., 2001; Liang et al., 2015) y con ello el cambio de la enzima a estado reducido, que dependiendo de la capacidad de la enzima para tomar dos o cuatro electrones del oxígeno, el producto final puede ser agua o peróxido de hidrógeno (Figura 8).

Tabla 1. Clasificación de las enzimas por el tipo de reacción que catalizan.

Enzima	Tipo de reacción
Transferasas	Catalizan la transferencia de un grupo químico de un sustrato a otro.
Hidrolasas	Catalizan las reacciones de hidrólisis. Rompen biomoléculas con moléculas de agua.
Liasas	Catalizan adiciones de grupos a dobles enlaces o formaciones de dobles enlaces por eliminación de grupos.
Isomerasas	Catalizan la interconversión de isómeros.
Ligasas	Catalizan la formación de enlaces C-C, C-S, C-O, y C-N por reacciones de condensación.
Oxidoreductasas	Catalizan reacciones de oxidorreducción. Transferencia de hidrógeno o electrones de un sustrato a otro.

Fuente: Nelson y Cox, 2001.

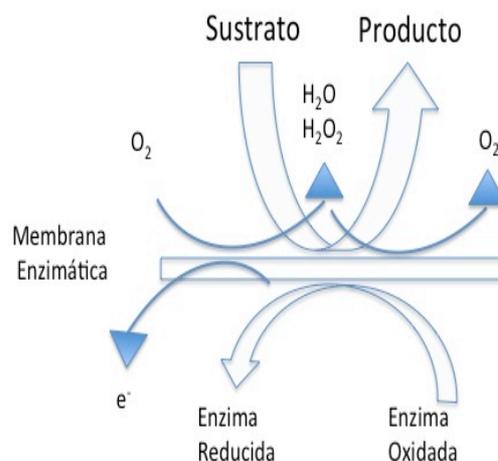


Figura 8. Secuencia de la reacción de oxidación catalizada por una enzima oxidasa empleando oxígeno molecular como aceptor de electrones (Modificado de Reviejo y Pingarrón, 2000).

En la configuración de los sensores enzimáticos, la enzima puede encontrarse libre en solución o inmovilizada sobre el transductor (directamente o sobre una membrana), lo que es más frecuente, pues permite la reutilización con el consiguiente beneficio económico.

1.3.2.1 Métodos de Inmovilización

La inmovilización de la enzima es un proceso decisivo en la construcción del sensor ya que aumenta la estabilidad del enzima y el tiempo de vida. En contrapartida, la inmovilización puede cambiar la conformación de la enzima (estructura cuaternaria) disminuyendo su sensibilidad.

En general, los métodos de inmovilización de enzimas se clasifican en dos grandes grupos: retención física (atrapamiento y microencapsulación), y retención química (adsorción a la superficie, acoplamiento covalente, o entrecruzamiento o cross-linking) (Dornelles Mello y Kubota 2002; Eggins, 2002, Sharma et al, 2003; Nunes y Marty 2006).

Tipos de inmovilización más empleados:

- Atrapamiento. Es la retención de la enzima en el interior de una matriz sólida porosa (polímeros de poliacrilamida, celulosa, colágeno, alginato, carragenato, resinas de poliuretano o membranas de diálisis grafito más agente aglutinante). La enzima no sufre ningún cambio en su estructura, Sin embargo, se crea una barrera que dificulta la difusión de analito hasta el centro activo de la enzima aumentando el tiempo de respuesta.
- Microencapsulación. Se encapsulan gotas de una solución enzimática en microcápsulas semipermeables fabricadas de polímeros orgánicos que permiten el paso de moléculas de sustrato y productos pero no de la enzima.

El material biológico permanece en contacto con el transductor, manteniendo a su vez la alta sensibilidad de las enzimas, pues no se ven afectadas por los cambios de pH, temperatura o fuerza iónica del medio.

- Adsorción en superficie. Mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno, la enzima se asocia a un soporte (alúmina, arcilla, grafito o sílica gel). La adsorción se obtiene por volatilización del tampón que contiene la enzima, no requiere de reactivos químicos, pero no es muy estable y la unión con el soporte es muy débil. El pH, la fuerza iónica y la presencia de iones como cofactores influyen en la desorción de la enzima.
- Entrecruzamiento (*cross-linking*). Esta técnica utiliza reactivos bi funcionales (glutaraldehído, hexametildisocianato, 1,5-dinitro-2,4-diflorobenzeno) que originan uniones intermoleculares entre moléculas de enzima. El agente bifuncional tiene dos grupos aldehídos en sus extremos que reaccionan con el grupo amino de una enzima o proteína.
- Enlace covalente. El enlace covalente entre el transductor y la enzima se basa en la activación de grupos químicos del soporte (membrana o reactor) para que reaccionen los nucleófilos de las enzimas grupos amino carboxílicos, alcoholes, tioles, o imidazol. Es importante el control del pH y la fuerza iónica, y tiene como ventaja el que se suelen conseguir tiempos de vida muy largos.

1.3.2.2 Materiales Soporte para la Inmovilización de la Enzima

Entre los materiales más comúnmente utilizados están los siguientes:

- Polímeros electropolimerizados o preformados. En los primeros, la enzima se incorpora en solución junto con un monómero (polipirrol, polianilina y

politiofeno), sobre la superficie del electrodo y mediante electropolimerización se forma una película polimérica que se adhiere firmemente sobre el electrodo, proporcionando una matriz tridimensional que atrapa la enzima. (Ghosh et al 1998). Los polímeros preformados son películas delgadas de materiales como el nafion, acetato de celulosa, policarbonato, nylon o poliuretano, sobre los que se inmoviliza el enzima, y después se coloca directamente sobre la superficie del electrodo. Algunas de estas membranas, además de ser un material de soporte para la inmovilización son selectivas, y evitan interferencias electroquímicas.

Debido a sus características conductoras los polímeros pueden ser utilizados directamente como electrodos, o para modificar a otro tipo de electrodos como es el caso de la pasta de carbono.

- Materiales conductores. Se utilizan *composites* a base de un material sólido-conductor; oro, platino, teflón, polvo de grafito, carbono vitrificado, o grafito pirolítico, disperso en una matriz polimérica de características aislantes que le confiere el agente aglutinante (aceite de parafina o silicona) al cual, se le puede añadir la enzima o los mediadores electroquímicos. Así se obtienen biosensores con un depósito tridimensional de la enzima que permite, mediante un simple pulido, la renovación de la superficie del biosensor (Reviejo y Pingarrón, 2000).
- Sistemas sol-gel. Son sales inorgánicas de metales o compuestos organometálicos que se someten a reacciones de hidrólisis y polimerización hasta formar una suspensión coloidal o sol, que mediante diversos procesos de pulverización o centrifugado, llegan a condensar las partículas en una nueva fase (gel). La enzima se añade durante esta transición y queda retenida en las cavidades de la matriz (Prodomidis y Karayannis, 2002).
- Electrodos modificados. Se basa en la modificación del electrodo

principalmente los de pasta de carbono, con polímeros conductores, partículas coloidales, otro tipo de nanomateriales (nanotubos, nanocables de carbono y nanopartículas de oro).

1.3.2.3. Materiales de Construcción del Transductor

Los materiales más utilizados en la construcción de los biosensores electroquímicos son: los metales nobles (oro, platino), carbono (pasta o varillas), conductores composite (polvo de grafito, dispersado sobre polímeros de resina epoxi, silicona, metacrilato, o poliuretano), sales y polímeros orgánicos conductores o metales sintéticos, con cualidades eléctricas y ópticas (polipirrol, polifuranos, poliindoles, policarbazoles, y polianilinas) (Gerard et al., 2002; Li et al., 2015).

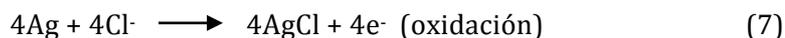
1.3.2.4 Principio de Operación

La mayoría de los sensores enzimáticos que utilizan enzimas oxidoreductasas y detección de oxígeno disuelto, se basan en el modelo de Clark que consiste en una sonda sensor amperométrica, que tiene como cátodo un metal noble, generalmente platino y un ánodo de plata sumergidos en un electrolito, solución de cloruro potásico, y separados de la disolución de muestra por una membrana de poli-tetrafluoretileno (teflón) permeable al oxígeno. Al aplicar un potencial de -0.6 V al electrodo de Pt, se genera una corriente entre ambos que es el resultado de las reacciones que se esquematizan en las ecuaciones 6 y 7 y que se relaciona con el consumo de oxígeno.

Cátodo de platino



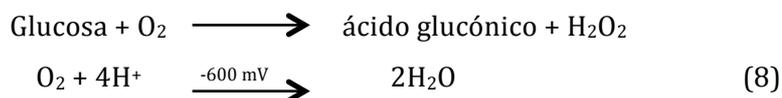
Ánodo de plata



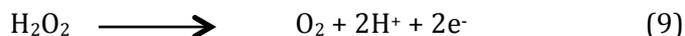
Así, el consumo de oxígeno, que es proporcional a la corriente generada, se relaciona directamente con la concentración del analito.

Se han desarrollado diferentes métodos para la transferencia de electrones entre la enzima y el transductor amperométrico, lo que ha dado lugar a tres generaciones de biosensores amperométricos:

- En los de primera generación, la concentración del analito se relaciona con la reducción de oxígeno en el cátodo de platino (consumo de oxígeno) (ecuación 8).



También puede medirse la corriente generada por la posterior reducción del agua oxigenada (ecuación 9).



Por otra parte, la reducción del peróxido de hidrógeno (ecuación 9) ocurre al aplicar altos potenciales sobre los electrodos como el platino (0.65 V vs Ag/AgCl) (Prodomidis y Karayannis, 2002). Lo que conlleva a reacciones interferentes de compuestos orgánicos electroactivos (ascorbatos, urato, ácido úrico, paracetamol). Las corrientes de fondo que podrían generarse en estas condiciones pueden verse neutralizadas por el uso de membranas permeables al oxígeno y utilizando

cantidades o volúmenes pequeños de electrolitos (Falck, 1997; Plumeré et al., 2013).

- La segunda generación de biosensores incorpora un mediador que se encarga de la transferencia electrónica entre el centro activo del enzima y la superficie del electrodo. La enzima y el mediador se inmovilizan juntos. La presencia de peroxidasa, facilita el proceso. En la figura 9 se esquematiza el proceso poniendo como ejemplo la determinación de glucosa con glucosa oxidasa (GOx) empleando ferroceno como mediador.

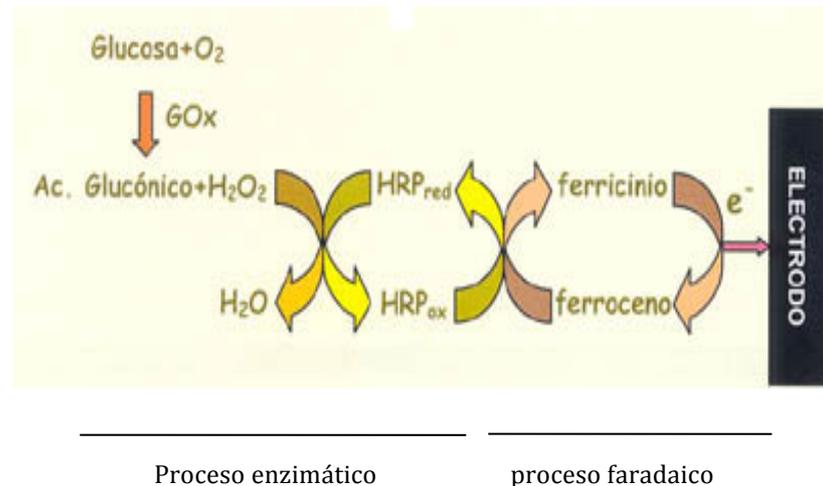


Figura 9. Esquema del funcionamiento de los sensores segunda generación.

- En los biosensores de tercera generación, la transferencia electrónica entre el centro activo del enzima y la superficie del electrodo se realiza de forma directa, no se utilizan mediadores, el potencial que se utiliza es el adecuado al intrínseco del enzima por lo que la medida es más selectiva. El inconveniente es que los centros activos del enzima suelen estar en el interior y esto dificulta el contacto con la superficie del transductor.

1.3.3 Aplicaciones de los Biosensores

Actualmente existen multitud de biosensores en los cuales se combinan la amplia diversidad de componentes biológicos (enzimas, ácidos nucleicos, receptores celulares, anticuerpos y células intactas) con los diferentes tipos de transductores (electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos, termométrica); éstos se pueden utilizar en numerosos sectores como el análisis clínico, de alimentos, aguas, vigilancia del medio ambiente, industria, defensa y seguridad.

La aplicación de biosensores a la industria agroalimentaria se ha dirigido a los siguientes campos de aplicación, de los que algunos ejemplos se muestran en la Tabla 2.

- Evaluación de la calidad en cuanto al análisis de componentes interesantes desde el punto de vista nutritivo como son aminoácidos, azúcares, alcoholes, vitaminas, colesterol, etc.
- Análisis de contaminantes y residuos como pesticidas, metales pesados, fosfatos, nitratos, nitritos, etc.
- Evaluación de la vida útil y control de procesos como la determinación de la frescura en carnes y pescados (hipoxantina, aminos, etc.) o el enranciamiento de aceites o de la leche, deterioro de vinos, seguimiento de procesos fermentativos (ácido láctico), evaluación de la madurez de frutas (azúcares, etc).

Tabla 2. Aplicación de los biosensores en la industria alimentaria

Analito	Matriz	Enzima de Biorreconocimiento	Transductor	Referencias
Evaluación de la Calidad				
Lisina	Queso mozzarella, preparados farmacéuticos	Lisina- α -oxidasa	Amperométrico	Guerrieri et al., 2013
Glucosa	Jarabes, miel, bebidas energéticas	Glucosa oxidasa	Amperométrico	Samphao et al., 2015
Citrato	Jugo de frutas	Citrato liasa; oxaloacetato descarboxilasa	Potenciométrico	Kim, 2006.
Etanol	Bebidas alcohólicas	Alcohol oxidasa	Amperométrico	Angeloni et al., 2015
Colesterol	Pescado, carne, y huevos	Colesterol oxidasa	Amperométrico	Cao et al., 2013
Lactosa	Leche	Celobiosa deshidrogenasa	Termométrico / Amperométrico	Yakovleva et al., 2012
Hipoxantina	Carne de cerdo	Xantina oxidasa	Amperométrico	Hernández Cázares et al., 2010
Evaluación de la vida útil				
Polifenoles	Vinos	Lacasas	Amperométrico	Di Fusco et al., 2010
Lactato	Vinos y cidras	Lactato oxidasa	Amperométrico	Loaiza et al., 2015
Ácidos grasos	Aceite de oliva y de girasol	Glicerol deshidrogenasa	Amperométrico	Ben Rejeb et al., 2007
Aminas	Embutidos crudo-curados	Diamino oxidasa	Amperométrico	Hernández-Cázares et al., 2012
Indicador de maduración				
Glucosa	Frutas	Glucosa oxidasa	Amperométrico	Fung Ang et al., 2015
Sucrosa	Zumo de frutas	Glucosa oxidasa; Invertasa.	Amperométrico	Majer-Baranyi et al., 2008

En esta tesis se aportan tres aplicaciones más sobre el uso de los sensores enzimáticos al control de calidad de los productos cárnicos, como son el análisis de lisina para el seguimiento de la proteólisis, el análisis de los nitratos para el control de la seguridad y el análisis de ácido láctico para el control de la fermentación de embutidos.

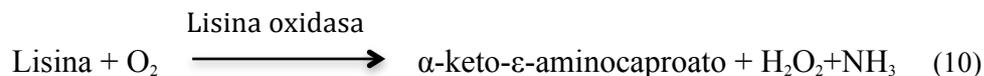
1.3.3.1 Sensores Enzimáticos para la Determinación de Lisina

La lisina es un aminoácido esencial que debe formar parte de la dieta ya que su función es básica para la construcción de todas las proteínas y no puede sintetizarse en el organismo humano. Además, desempeña un papel esencial en la absorción de calcio, y en la producción de hormonas, enzimas y anticuerpos. La carne y los productos cárnicos son una fuente muy rica de lisina biodisponible. Sin embargo, el interés en el análisis de lisina no tiene que ver, únicamente, con su papel nutritivo, sino en cuanto que puede constituir un indicador del correcto almacenamiento de determinados alimentos (Curulli et al., 1998), de la fraudulenta adición a quesos, de derivados lácteos sometidos a tratamientos térmicos en los que la lisina resulta dañada (Guerrieri et al., 2013). La lisina también puede servir como indicador del progreso de procesos fermentativos que incluyan proteólisis, como es el caso de los productos cárnicos fermentados, como se indicó en el apartado 1.2.3, y por extensión, en otros productos fermentados como quesos, vino, etc.

En la tabla 3 se recogen algunas aplicaciones de los sensores enzimáticos al análisis de lisina. Cuatro son las enzimas que se han utilizado para este tipo de determinaciones: lisina deshidrogenasa, (Dempsey et al., 1992) lisina monooxigenasa (Privman et al., 2013), lisina descarboxilasa (Bóka et al., 2015) y lisina α -oxidasa, siendo esta última la más empleada. El uso de una enzima u otra o incluso la fuente de obtención de la enzima, influirá en la selectividad de la reacción

en relación a otros aminoácidos (Endo et al., 2008).

La lisina α -oxidasa cataliza la siguiente reacción:



Esta reacción es seguida por la reducción electroquímica del peróxido de hidrógeno en el electrodo de trabajo de modo que la señal de corriente observada se correlaciona con la concentración de lisina en la muestra, directamente o a través del oxígeno consumido, como se explicó en el apartado 1.3.2.4.

Los sensores de lisina utilizan mayoritariamente un electrodo de platino como electrodo de trabajo y varía lo que es la técnica de inmovilización. En la mayoría de los trabajos se utiliza inmovilización por entrecruzamiento, empleando glutaraldehído y/u otros reactivos bifuncionales (diaminas, dialdehidos, diisocianatos, polioles, etc.), capaces de formar uniones intermoleculares dentro del enzima. En algunos casos, se recurre a entrecruzamientos con alguna proteína, sin actividad enzimática, siendo frecuente la albúmina de suero bovina (BSA). También hay ejemplos de inmovilización por absorción en matrices (alúmina, gel de sílice, celulosa, etc) o atrapamiento en matrices sólidas porosas (alginato, colágeno, gelatina, carragenato, poliuretano, etc). Sin embargo, lo más frecuente es recurrir a técnicas mixtas de absorción, atrapamiento, o enlace iónico o covalente, todas ellas con posterior entrecruzamiento (Olschewsky et al., 2000; Chauhan et al., 2013). También pueden añadirse mediadores del tipo de los ferricianuros (Dempsey, 1992; Sahin, 2013) que actúan facilitando el transporte de electrones.

En algunos casos, se recurre a modificar o cubrir el electrodo de trabajo con polímeros de 1,2 diamino benzeno o pirrol, que por permeación selectiva impide el paso de moléculas mayores que el peróxido de hidrógeno, para disminuir

interferencias en la medida de éste, por la presencia de compuestos electroactivos como la cisteína o el ácido ascórbico en la matriz de muestra (Curulli et al., 1998; Kelly et al., 2000; Guerrieri et al., 2013). Las condiciones de reacción las determina la enzima, en cuanto a temperatura y pH óptimos, que va desde 7 a 8.2.

Tabla 3. Biosensores amperométricos utilizados para determinar lisina.

Enzima	Transductor	Inmovilización	Aplicación	Referencia
LyDH	Amperométrico Electrodo de Pt	Inmovilización con gelatina en una membrana de celulosa	Disoluciones patrón	Dempsey et al., 1992
LOx	Amperométrico Electrodo de Pt	Co-inmovilización con catalasa sobre una membrana de nylon o de colágeno	Extractos de Trigo	Vrbová et al., 1992.
LOx	Amperométrico Electrodo de Pt	Atrapamiento en una resina de poliuretano y entre dos láminas, de celulosa y polipropileno.	Fermentación en medios de cultivo	Siegler et al., 1994
LOx	Amperométrico Electrodo de Pt	Inmovilización mediante enlace covalente sobre gel de sílice	Fermentación en medios de cultivo	Simonian et al., 1994
LOx	Amperométrico Electrodo modificado por electrodeposición de un polímero de 1,2 diamino benzeno	Entrecruzamiento con glutaraldehído y adsorción en el polímero	Leche y pasta	Curulli et al., 1998
LOx	Amperométrico Electrodo de Pt	Atrapamiento en un gel de poliuretano	Fermentación en medios de cultivo	Olschewski et al., 2000
LOx	Amperométrico Electrodo de Pt	Método de impregnación en pasta de diamante	Suero y Preparados farmacéuticos	Stefan-van Staden et al., 2012

LOx	Amperométrico Electrodo modificado por electrodeposición de un polímero de pirrol	Entrecruzamiento con glutaraldehído + BSA	Queso	Guerrieri et al., 2013
LOx	Amperométrico Electrodo modificado por electrooxidación de polivinilferroceno (mediador)	Enlace iónico sobre los electrodos modificados	Suero y Preparados farmacéuticos	Sahin et al., 2013
LOx	Amperométrico Electrodo de Au y Pt modificados con amino propiltriatoxisilano	Inmovilización mediante enlace covalente y entrecruzamiento con glutaraldehído	Preparados farmacéuticos, leche, suero	Chauhan et al., 2013

LOx: Lisina oxidasa; LyDH: Lisina deshidrogenasa

1.3.3.2 Sensores Enzimáticos para la Determinación de Nitrato

El papel del nitrato y nitrito en los productos cárnicos así como la necesidad de analizarlos y controlar su presencia durante el procesado y su ausencia en el producto final ha quedado ampliamente descrito, ver apartado 1.2.2. Además, los diferentes gobiernos han establecido límites a la cantidad de nitratos y nitritos empleados en los productos cárnicos por lo que el control de nitratos en alimentos resulta de interés para la industria alimentaria y en concreto para la industria cárnica o los organismos de control.

Existen en la bibliografía muy pocas aplicaciones del uso de sensores enzimáticos al análisis de nitratos en alimentos. El enzima que se utiliza mayoritariamente es la nitrato reductasa. Esta enzima que reduce selectivamente el nitrato a nitrito, acoplado a la oxidación de NADH, tiene 2 ó 3 cofactores en sus centros activos Mo, hemo y/o FAD. Se ha descrito que según el origen: eucariota (plantas, algas y hongos) o procariota (de bacterias) la estructura del centro activo de la enzima es diferente, lo que condicionará los resultados en cuanto a estabilidad, especificidad, y sensibilidad (Kalimuthu et al., 2015). Los análisis se realizan en sensores

amperométricos en los que la corriente generada entre el electrodo de trabajo y el de referencia se produce por la transferencia de electrones durante la reducción de nitrato a nitrito mediada por la nitrato reductasa, y posterior reducción de la enzima oxidada que suele ser asistida por un mediador. El papel de los mediadores es facilitar la transferencia de electrones entre el enzima y el electrodo para suplir a los cofactores intrínsecos del enzima que quedan inaccesibles tras la inmovilización. Los mediadores deben ser moléculas pequeñas y de respuesta rápida y suelen inmovilizarse junto con la enzima, de modo que la elección del mediador (sulfonato de antraquinona, benzil o metil viológeno) y el método de inmovilización afectará también a la efectividad del biosensor.

En cualquier sensor basado en reductasas, el oxígeno y otras especies reducibles van a producir una reducción competitiva con falsos positivos y que es difícil de evitar. La primera medida sería purgar bien las disoluciones. También se ha intentado minimizar utilizando mediadores de alto potencial como el sulfonato de antraquinona (Kalimuthu et al., 2015), pero la interferencia del oxígeno sigue siendo importante. También, si el nitrito está presente, como es el caso de los productos curados, podría conducir a errores en la determinación.

1.3.3.3 Sensores Enzimáticos para la Determinación de Acido Láctico

Durante la maduración, los embutidos crudo-curados se convierten en alimentos más estables y seguros como consecuencia de “barreras de crecimiento microbiano”, en las que las bacterias ácido lácticas (BAL) son las principales protagonistas por prevenir el crecimiento de microorganismos indeseables, mediante la generación de ácido láctico y consiguiente reducción del pH. Así pues, en la industria de los alimentos el ácido láctico es un parámetro indicador de la higiene

y fresca de los productos cárnicos fermentados, sin embargo no hay muchas aplicaciones de sensores enzimáticos al análisis de ácido láctico.

Por esta razón surge el interés de investigar un método analítico-enzimático alternativo, para monitorizar el desarrollo de este analito en este tipo de alimentos.

La reacción enzimática es simple, lo cual implica a su vez un fácil diseño del biosensor (Rassaei et al., 2014). En presencia de oxígeno disuelto la lactato oxidasa cataliza la oxidación de ácido láctico a piruvato y forma peróxido de hidrógeno, la corriente que se obtiene debido a la formación del peróxido de hidrógeno o del consumo del oxígeno es proporcional a la concentración de ácido láctico (Shimomura et al., 2012).

La reacción se indica a continuación:



El oro y el platino son los materiales de los electrodos más comúnmente usados en el diseño de los biosensores de ácido láctico, especialmente los basados en L-lactato oxidasa debido a sus características electroquímicas hacia la oxidación del peróxido de hidrógeno.

Así, se han construido sensores de lactato por inmovilización con enlace covalente de la lactato oxidasa sobre el electrodo de platino modificado (Pagán et al., 2015) que resultó más efectivo (más sensible y estable) que la simple inmovilización física de la enzima. Otro trabajo desarrolló un sensor en el que se combinaba la medición amperométrica y potenciométrica, para el análisis simultáneo de L-lactato y glucosa utilizando un microelectrodo de platino, y las respectivas enzimas lactato y glucosa oxidasa inmovilizadas por entrecruzamiento con BSA, empleando glutaraldehído. Son microsensors electroquímicos en fase líquida (Diallo et al., 2013). En otro

trabajo se inmovilizó la lactato oxidasa sobre un film de polianilina y fluoroanilina utilizando el Pt como electrodo auxiliar (Suman et al., 2005).

Los electrodos de carbón son lentos en la transferencia de electrones y requieren un alto potencial para la reducción del peróxido de hidrógeno y, por tanto, su aplicación a sensores L-Lactato es de poco valor (Salimi et al., 2007). A pesar de ello, se ha desarrollado un sensor en el que modificaron los electrodos de carbono (su superficie activa) con nanopartículas de platino para conseguir una mayor sensibilidad, y en el que inmovilizaron la enzima por simple adsorción (Lamas-Ardiana et al., 2014).

Se ha diseñado un sensor para determinar ácido láctico en productos lácteos, mediante un sistema de inyección de flujo; y en el que la enzima esta inmovilizada sobre una capa delgada de proteína natural (Bori et al., 2012).

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

La industria alimentaria actual requiere mantener un control continuo de calidad en la producción diaria de lotes, los cuales quedan inmovilizados antes de su salida al mercado hasta que se verifican los parámetros de calidad que deben cumplir. Por esta razón los análisis deben ser rápidos, precisos, y de bajo coste. Es en este contexto que la presente Tesis Doctoral se plantea el siguiente objetivo:

Desarrollo de sensores enzimáticos de tipo amperométrico como técnicas rápidas de control de la calidad de productos cárnicos curados.

Para la realización de este objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos:

- 1) Desarrollo y optimización de un sensor enzimático para analizar lisina y su aplicación al análisis de lisina como índice de proteólisis en el control de la maduración de jamones y de embutidos curados.
- 2) Desarrollo y optimización de un sensor enzimático para analizar nitrato y su aplicación al análisis de nitratos en jamón como método de control del proceso de nitrificación.
- 3) Desarrollo y optimización de un sensor enzimático para analizar ácido láctico y su aplicación al análisis de ácido láctico como indicador del grado de fermentación en embutidos curados.

3. Plan de Trabajo

3. PLAN DE TRABAJO

Para cumplir con los objetivos propuestos en esta Tesis Doctoral se planteó la realización de las siguientes actividades:

- 1) Puesta a punto del sensor enzimático con la enzima lisina- α -oxidasa para la determinación de lisina.
 - a. Estudio de la actuación de la enzima siguiendo la desaparición del sustrato de la reacción (lisina) mediante HPLC.
 - b. Estudio del comportamiento electroquímico del oxímetro en combinación con la enzima durante dicha reacción y optimización de las condiciones de operación (cantidad de enzima, pH y temperatura) del sensor con la enzima libre .
 - c. Optimización del método de inmovilización de la enzima y de las condiciones de operación en un sistema con la enzima inmovilizada.
 - d. Estudio de la cinética enzimática en ambos sistemas; con la enzima libre e inmovilizada.
 - e. Estudio de la linealidad, sensibilidad, repetibilidad en ambos sistemas y estudio de la estabilidad de la enzima en solución e inmovilizada en la membrana.
 - f. Estudio de posibles interferencias de otros aminoácidos, sobre la medida de la lisina con la lisina- α -oxidasa .
 - g. Aplicación del sensor de lisina al análisis de muestras de jamón durante el proceso de curado.

- 2) Puesta a punto del sensor enzimático con la enzima nitrato reductasa para la determinación de nitrato. En dicho sensor se realizarán las actividades a, b, c, d y e, descritas para el sensor de lisina. La aplicación del sensor de nitrato al

análisis de muestras se realizó sobre diluciones de un extracto de jamón tras la etapa de postsalado (2 meses de curado).

- 3) Puesta a punto del sensor enzimático con la enzima lactato oxidasa, para la determinación de ácido láctico. En dicho sensor se realizarán las actividades a, b, d y e, descritas para el sensor de lisina, pero únicamente en el sensor con la enzima libre. La aplicación del sensor de ácido láctico al análisis de muestras se realizó utilizando extractos de salchichón y chorizo.

4. Materiales y Métodos

4.1 MATERIALES

4.1.1 Materias Primas

Para las experiencias con el jamón curado se utilizaron muestras del músculo *Biceps femoris* de 21 jamones a distintos tiempos del proceso de curado: carne fresca, 2, 3.5, 5, 6.5, 9 y 10 meses. Los jamones se habían fabricado para un proyecto anterior, en la planta piloto del Instituto a partir de perniles de cerdos del cruce Landrance x Duroc, utilizando la metodología tradicional de curado de jamón serrano. Tras realizar el muestreo, dichas muestras de músculo se habían envasado a vacío y conservado a -80°C hasta la realización de los análisis.

Los embutidos curados (5 muestras de chorizo y 5 de salchichón) se obtuvieron de un supermercado local.

4.1.2 Reactivos Químicos

4.1.2.1 Determinación de Lisina

Todos los patrones utilizados: lisina, fenilalanina, histidina, ornitina, arginina, isoleucina y tirosina, fueron de Sigma- Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Para desarrollar y operar el sensor enzimático se utilizó la enzima lisina- α - oxidasa (EC 1.4.3.14) de *Trichoderma viride* y glutaraldehído grado I al 70 % de Sigma- Aldrich. Para la preparación de la solución enzimática, los 4.6 mg de enzima contenida en el envase comercial se disolvieron en 25 mL del tampón fosfato 0.05M pH 7.5, resultando tener una actividad de 6.8 U/mL. La membrana preactivada Immunodyne ABC (Nylon 66, con un tamaño de poro de 0.45 μm) fue adquirida de

Pall Europe (Porsmouth, United Kingdom) y la membrana de Teflón (12.7 μm) permeable al oxígeno de Thermo Fisher Scientific Inc (Madrid, España).

Todas las sales para la preparación de las disoluciones tampón; fosfatos mono y disódico, acetato de sodio anhidro y otros reactivos como ácido fosfórico, ácido acético glacial, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) e hidróxido sódico fueron de Panreac (Panreac Química, S.A, Barcelona, España).

El reactivo de derivatización, se preparó con o-ftalaldehído (*OPA*), ácido 3-mercaptopropiónico, éter polioxietileno laurílico (Brij 35) y ácido bórico, todos de Sigma-Aldrich.

Los disolventes para la cromatografía; tetrahidrofurano (THF), la trietilamina, acetonitrilo, y metanol; estos dos últimos de grado HPLC, para gradiente fueron de Sigma- Aldrich.

4.1.2.2 Determinación de Nitrato

El patrón utilizado, nitrato potásico fue de Sigma-Aldrich.

Para desarrollar y operar este sensor se utilizó la enzima comercial nitrato reductasa (EC 1.6.6.1-3) de *Aspergillus niger*, de Sigma-Aldrich. Para la preparación de la solución enzimática, los 7.8 mg de la enzima contenida en el envase se disolvieron en 15 mL de tampón fosfato 0.1M pH 7.1 con una actividad enzimática de 2.57 U/mL y la membrana fue la misma utilizada para el sensor con la lisina- α -oxidasa.

Las sales para preparar los tampones fueron de Panreac excepto el ácido 3-(*N*-morpholino) propanosulfónico MOPS (99.5 %) que fue de Sigma-Aldrich. El ácido ortofosfórico para la fase móvil de la cromatografía fue Scharlau (Sharlab Chemie, S.A., Barcelona España).

4.1.2.3 Determinación de Acido Láctico

El patrón utilizado fue L-(+)ácido láctico para la cromatografía y lactato sódico como sustrato para las medidas con el sensor, fueron ambos de Sigma-Aldrich.

Para desarrollar y operar este sensor se utilizó la enzima comercial lactato oxidasa (EC, 232-841-6) de *Pediococcus sp*, de Sigma-Aldrich. Para la preparación de la solución enzimática, los 2.9 mg de la enzima contenida en el envase se disolvieron en 15 mL de un tampón fosfato 10mM pH 7.0, conteniendo flavín adenín dinucleótido (FAD) 0.01mM, con una actividad enzimática de 10.1 U/mL y la membrana fue la misma utilizada para el sensor con lisina - α -oxidasa.

Las sales para preparar los tampones (Panreac) y el ácido sulfúrico para la fase móvil de la cromatografía (Scharlau) fueron los mismos empleados para el análisis de nitratos.

4.1.3 Instrumentación

4.1.3.1 Sensor Enzimático

El sensor enzimático consiste en un oxímetro Modelo 20 de Rank Brothers Ltd (Bottisham, Cambridge, England) equipado con un registrador ADC-16 conectado a un ordenador provisto con el programa Pico Log (Pico Technology Limited, St. Netos, Cambridgeshire, United Kingdom). El oxímetro consta de un electrodo de oxígeno constituido a su vez por un disco central de platino (cátodo) de 2 mm de diámetro y un anillo del plata (ánodo), una cámara de incubación acoplada a un baño maría, para controlar la temperatura de reacción, y con una celda de reacción de 2.5 mL de capacidad, un sistema de agitación y un controlador que

exhibe la corriente en porcentaje de saturación de oxígeno (% saturación); mg de oxígeno/L y/o mV (variación de la corriente eléctrica en mili voltios)(Figura 10).

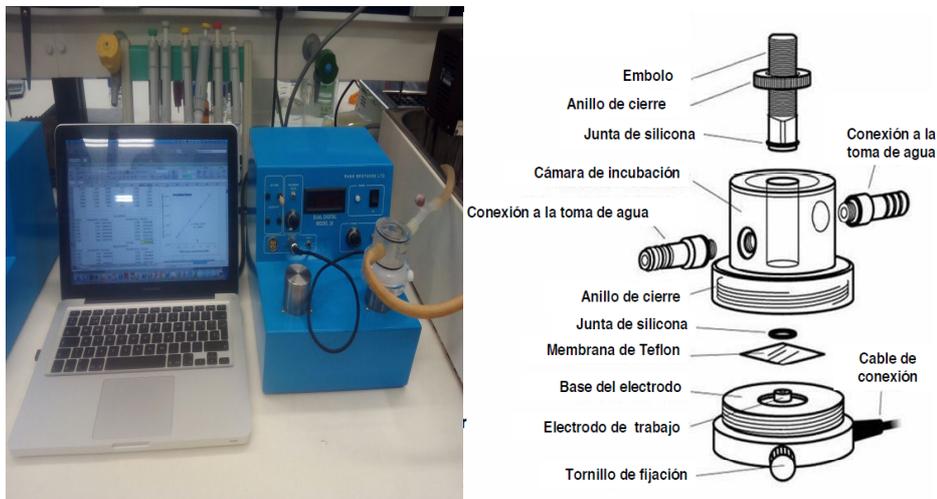


Figura 10. Esquema del Oxímetro Mod. 20 Rank Brothers Ltd (Bottisham, Cambridge, England).

4.1.3.2 Cromatógrafo HPLC

El método que se utilizó de referencia y validación del sensor enzimático, fue la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando un cromatógrafo de líquidos Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), equipado con un auto inyector y dos detectores; un detector ultravioleta que se utilizó para el análisis de nitrato y ácido láctico y un detector de fluorescencia que se utilizó para el análisis de lisina.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Extracción de la Muestra

Para todos los análisis (lisina, nitrato y ácido láctico) se realizó simultáneamente la extracción y desproteización de la muestra. Cinco gramos de muestra (ver apartado 4.1.1.) se trituraron y se homogeneizaron con 15 mL de ácido perclórico 0.6M, durante 10 minutos utilizando un masticador (IUL Instrument, Barcelona, España). El homogenizado se centrifugó a 10,000 x g y 4 °C durante 20 minutos, el sobrenadante se filtró por lana de vidrio y el filtrado se neutralizó con carbonato de potasio (hasta pH 6.5 - 7) dejándolo reposar hasta la completa precipitación de perclorato potásico. Previo a su análisis por HPLC y por el sensor enzimático, los extractos cárnicos se descongelaron y se filtraron a través de un filtro de membrana de nylon de 0.22µm.

4.2.2 Determinación de Lisina y otros Aminoácidos por Cromatografía

La lisina y otros aminoácidos fueron analizados por HPLC de fase reversa (RP-HPLC) previa derivatización con OPA, según la metodología propuesta por Schuster (1988) excepto en que no se realizó la segunda derivatización con 9-fluorenilmetilcloroformato (FMOC) indicada para prolina (aminoácidos secundarios). La derivatización de los aminoácidos se realizó en el auto inyector de la siguiente manera: se tomó 1 µL de extracto o disolución patrón y se mezcló con 5 µL de reactivo OPA (orto-ftalaldehído), se agitó, se esperó 2 min y se inyectó en una columna Hypersil C18 (150 x 3.0) mm y 3 µm de tamaño de partícula (Agilent Technologies), acondicionada a una temperatura de 45°C. La separación

cromatográfica se realizó utilizando los disolventes y el gradiente que se detalla en la tabla 4 y a un caudal de 1.0 ml/min. Después de cada análisis la columna se lavó con 100 % de B durante 5 min y se estabilizó durante 5 min más, en las condiciones iniciales, antes de la siguiente inyección. La detección por fluorescencia se realizó a una $\lambda_{ex}=230$ y $\lambda_{em}=455$ nm. Para la cuantificación se elaboró la recta de calibrado con 5 concentraciones por triplicado de disoluciones patrón de lisina en el intervalo de concentraciones comprendidas entre 0.05 y 1mM.

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

Tiempo (min)	Fase móvil (%)	
	A	B
0	0	0
10	40	60
15	0	100

A: Tampón acetato de sodio 20mM, pH 7.2

B: Tampón acetato de sodio, 100mM, pH 7.2 : acetonitrilo : metanol 20:40:40 (v:v:v)

4.2.3 Determinación de Nitrato por Cromatografía

El nitrato se analizó por cromatografía HPLC empleando una columna Spherisorb S5 SAX (5 μ m, 250 x 4.6mm) de Waters (Wexford, Ireland). El extracto cárnico o patrones (20 μ L) se inyectaron en la columna y se eluyeron con ácido ortofosfórico 7.5 mM, a un caudal de 0.8 mL/min y una temperatura de 35°C. La detección fue por ultravioleta a 215nm. Para la cuantificación se elaboró una recta de calibrado con 5 concentraciones por triplicado de disolución patrón de nitrato potásico en el intervalo de concentraciones del ion nitrato comprendidas entre 0.06 y 0.3mM.

4.2.4 Determinación de Ácido Láctico por Cromatografía

La determinación de ácido láctico se realizó utilizando una columna Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (300 x 7.8 mm y 8 μm de tamaño de partícula) de Phenomenex (Torrance, CA, USA) que combina el intercambio iónico con la cromatografía de filtración (separación por tamaño). Los patrones y los extractos de los embutidos (20 μl) fueron inyectados en dicha columna y se eluyeron con ácido sulfúrico 0.009 N, a un caudal de 0.7 mL/min y una temperatura de 50 °C. La detección fue por ultravioleta a 210nm. Para la cuantificación se elaboró una recta de calibrado con 5 concentraciones por triplicado en el intervalo de concentraciones de ácido L-láctico comprendidas entre 15 y 100mM.

Las fases móviles utilizadas en cada una de las técnicas cromatográficas se filtraron a vacío a través de un filtro membrana de nylon de 0.45μm de tamaño de poro.

4.2.5 Determinación de Lisina con el Sensor Enzimático

La medida amperométrica de la lisina se llevó a cabo con el oxímetro descrito en el apartado 4.1.3.1 y con la enzima lisina- α -oxidasa, libre e inmovilizada lo que denominaremos respectivamente, sistema enzimático con la enzima libre, o sistema enzimático con la enzima inmovilizada.

La calibración inicial del oxímetro se consiguió dejando estabilizar la corriente de entrada al controlador tras conectarlo a la fuente de electricidad durante 1 hora. Sobre el electrodo de oxígeno, cátodo de platino y ánodo de plata, se colocó un papel Whatman 1 (1.5 cm² con un hueco de 2 mm de diámetro en el centro) humedecido con cloruro de potasio 3M a fin de conseguir un puente eléctrico entre cátodo y ánodo y con ello, cerrar el circuito. Sobre éste se colocó una membrana de teflón (1.5 cm²) asegurando que esté bien centrada y que no queden burbujas de aire ocluidas. En el caso de enzima inmovilizada además, sobre la membrana de teflón se colocó la

membrana con la enzima inmovilizada tal como se describe más adelante. Ver figura 10.

Al sistema se le acopló la cámara de incubación que, a su vez se conectó a un baño de agua con recirculación para el control de la temperatura de reacción (Figura 10). Finalmente, el electrodo de oxígeno se conectó al controlador y el potencial de polarización se fijó a - 600 mV con respecto al electrodo de referencia de Ag/AgCl.

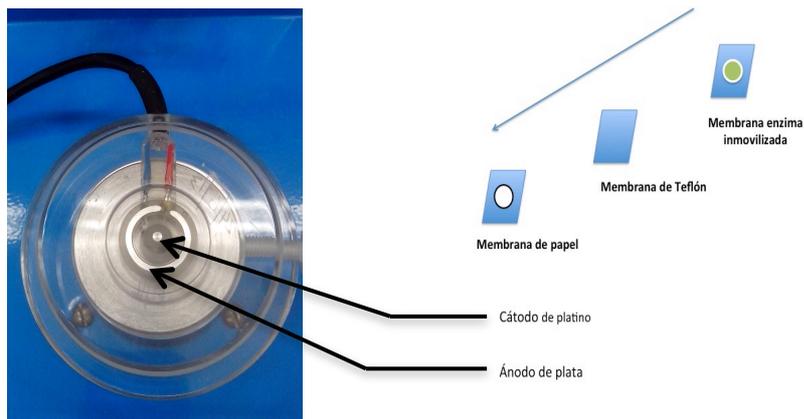


Figura 11. Esquema de montaje de las membranas en el sensor de oxígeno.

La sensibilidad del equipo se ajustó llenando la celda de reacción con agua bidestilada saturada con oxígeno (1 mL) en condiciones de agitación hasta conseguir una lectura del 100% de saturación. Así, el potencial aplicado al oxímetro, específicamente al electrodo de platino (cátodo), es un voltaje suficientemente negativo respecto al electrodo de plata (ánodo) para que todo el oxígeno que haya en la disolución en la celda de reacción, difunda a través de la membrana de teflón, alcance el electrodo de platino y se reduzca (ecuaciones 7 y 8). Así, la corriente resultante que fluye entre los electrodos es proporcional a la presión parcial de oxígeno en el sistema, relación establecida por la Ley de difusión de Fick. El equipo

recibe esta señal, y la exhibe como porcentaje de saturación y/o $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de oxígeno consumido).

4.2.5.1 Mecanismo de Actuación de la Lisina- α -Oxidasa sobre la Lisina

Para este estudio se tomaron 1.5 mL de una disolución patrón de lisina 1mM (0.1mM en la disolución de reacción) o extracto de jamón (1/50) y se inyectaron, junto con 1.5 mL de la solución enzimática (10.2 U) y se llevaron a 15 mL con tampón fosfato potásico 0.05M, pH 7.6 dejando reaccionar a 37 °C con agitación lenta. Durante la reacción enzimática se iban extrayendo alícuotas de 900 μL cada 40 s que se mezclaban con 100 μL de TCA (12.5 %) para detener la reacción. Como tiempo cero de la reacción se mezclaron en paralelo y en frío todos los reactivos y, nada más adicionar la enzima, se tomó una alícuota que se mezcló con el TCA de manera que no hubiera tiempo para la reacción.

Los extractos neutralizados se centrifugaron en una microcentrífuga a 12,000 r.p.m. durante 5 min a 4 °C y los sobrenadantes se analizaron por triplicado por cromatografía en las condiciones descritas en el apartado 4.2.2. A partir de las concentraciones de lisina, obtenidas en el cromatógrafo para cada tiempo de reacción, se dibujaron las curvas de desaparición de la lisina.

4.2.5.2 Actividad Específica de la Lisina- α -Oxidasa

Para caracterizar la enzima utilizada en estos ensayos (ver apartado 4.1.2.a.), se midió la actividad específica (concentración de actividad del enzima o cantidad de enzima por mg de proteína, que cataliza la transformación de un μmol de sustrato por minuto) siguiendo el protocolo "Enzymatic Assay of Lysine Oxidase" (Sigma-Aldrich), basado en Kusakabe et al. (1980). En este ensayo, la lisina en presencia de

la lisina- α -oxidasa y catalasa forma piperidina 2-carboxilasa, que haciéndolo reaccionar con 3-metil-2-benzotialinona hidrazona (MBTH) forma un compuesto que absorbe en el ultravioleta a 317nm.

4.2.5.3 Determinación de Lisina con la Enzima Libre

La determinación de lisina utilizando el sensor en el modo de enzima libre se realizó de la siguiente manera. La celda de reacción (termostata a 37 °C) se llenó con 2,000 μ L de la disolución de reacción (tampón fosfato sódico 0.05M, pH 6.6) agitando suavemente con una varilla magnética hasta que la señal se estabilizó en el monitor. Inmediatamente se inyectaron 250 μ L del extracto cárnico o del patrón de lisina (en distintas concentraciones) manteniendo la agitación unos 20 s más. Posteriormente se inyectaron 250 μ L de la solución enzimática (1.7 U de la enzima disuelta en tampón fosfato sódico 0.05M pH 6.6) y se registró el consumo de oxígeno durante la reacción enzimática hasta que la señal de respuesta se mantuvo constante.

En estas condiciones se optimizaron diversos parámetros de manejo del sensor, como el voltaje aplicado sobre el cátodo (Pt) y la concentración óptima de enzima. Se determinó el tiempo óptimo de respuesta en base a la zona lineal de la curva de respuesta y se ensayaron diversas condiciones de reacción: pHs, 5.6, 6, 6.6, 7.1 y 7.6 y temperaturas, 27, 32, 37, 39 y 42 °C.

La elaboración de la recta de calibrado se hizo con concentraciones de lisina entre 0.2 y 1.5mM y la medida de la concentración de lisina en las muestras se realizó con el sensor y por análisis cromatográfico. El contenido de lisina en las muestras se calculó a partir del consumo acumulado de oxígeno, obteniendo la velocidad de reacción ($\text{mg O}_2/\text{L} \cdot \text{s}^{-1}$) a los 20 s y extrapolándolo en la recta de calibrado.

Por último se hicieron los ensayos de validación; linealidad, repetibilidad y estabilidad, que se describen en el apartado 4.2.8.

4.2.5.3.1 Estudio de la Cinética Enzimática

Para el estudio de la cinética enzimática utilizando el sensor con la enzima libre se inyectaron 250 μL de una disolución patrón de lisina (entre 0.2 y 9mM en el medio de reacción final) con 2,000 μL del tampón fosfato sódico 0.05M pH 6.6 junto con 250 μL de la solución enzimática (1.7 U) dejando reaccionar a 37 °C.

A partir de las curvas de consumo de oxígeno con el tiempo ($\text{mg O}_2 / \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$, velocidad de reacción), obtenidas tras la inyección de patrones de lisina, se determinó la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato y utilizando la ecuación de Hanes-Woolf se obtuvo el valor de la K_m .

4.2.5.4 Determinación de Lisina con la Enzima Inmovilizada

Para trabajar en el sistema con la enzima inmovilizada, hubo que optimizar previamente, el procedimiento de inmovilización.

La inmovilización de la enzima lisina- α -oxidasa se desarrolló en base a lo descrito por Hernández-Cazares et al. (2010), con algunos cambios. La membrana de lisina- α -oxidasa se preparó por entrecruzamiento o *cross-linking* de la enzima con glutaraldehído y su posterior unión covalente con la membrana preactivada Immunodyne ABC. Para ello se mezcló 50 μL de una disolución que contenía 15 μL de la solución enzimática (0.102 U), 29 μL del tampón fosfato sódico (0.05M, pH 7.6) y 6 μL de una disolución de glutaraldehído al 50 %, y se depositó gota a gota sobre la membrana Immunodyne ABC preactivada (1 cm^2). Se dejó secar durante 1 hora tras lo cual, se añadió sobre la enzima inmovilizada, 5 μL de acetato de celulosa al 2 % (en acetona) como lámina de protección. Finalmente, la membrana se dejó secar al aire (5 min) para evaporar el disolvente y se almacenó en el tampón fosfato sódico 50mM pH 7.6, a 4 °C hasta su utilización.

Para realizar los análisis, la membrana con la enzima inmovilizada se colocó sobre la membrana de teflón como se describió en el apartado 4.2.5 (Figura 11). Sobre la membrana se inyectaron 1,800 μL del tampón fosfato pH de 7.6, y se dejó estabilizar el sistema manteniéndolo en agitación suave durante 20 s tras lo cual se inyectó 200 μL del extracto (previa dilución adecuada para que la señal quede dentro de la recta de calibración) o patrón de lisina (o cualquiera de los otros aminoácidos) en diferentes concentraciones. Después de cada inyección se sustituyó la membrana y se lavó el sistema con el tampón fosfato.

Se determinó el tiempo óptimo de respuesta en base a la zona lineal de la curva de respuesta y se determinaron de nuevo el pH y temperatura óptimos. Se ensayaron los valores de pH 5.6, 6.6, 7.6 y 8.6 mientras que las temperaturas fueron 25, 27, 30, 37 y 43 °C.

La elaboración de la recta de calibrado se hizo con concentraciones de lisina entre 0.01 y 0.25mM y la medida de la concentración de lisina en las muestras se realizó con el sensor y por análisis cromatográfico. El contenido de lisina en las muestras se calculó a partir del consumo acumulado de oxígeno, obteniendo la velocidad de reacción ($\text{mg O}_2/\text{L} \cdot \text{s}^{-1}$) a los 5 s, y extrapolándolo en la recta de calibrado.

4.2.5.4.1 Estudio de la Especificidad de la Enzima Lisina- α - oxidasa

El estudio de la selectividad de la lisina- α -oxidasa hacia la lisina se realizó en el sistema inmovilizado inyectando diversas disoluciones con una concentración fija de 0.01 mg/mL de una serie de aminoácidos, comúnmente presentes en los productos cárnicos curados (Phe, His, Arg, Orn, Ile, y Tyr) y que se han descrito como posibles interferentes de la reacción (Kelly et al., 2000; Gokdogan Sahin et al., 2013), y comparando la respuesta del sensor con la de la lisina.

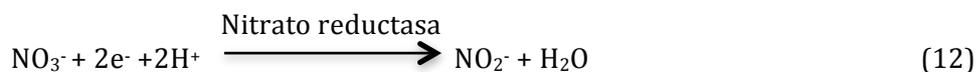
4.2.5.4.2 Estudio de la Cinética con la Enzima Inmovilizada

Para el estudio de la cinética enzimática utilizando el sensor con la enzima inmovilizada se inyectaron sobre la membrana 1,800 μL del tampón fosfato (pH 7.6 y 37 °C) y se dejó estabilizar el sistema manteniéndolo en agitación 20 s tras lo cual, se inyectaron 200 μL del patrón de lisina (concentraciones entre 0.01 y 15mM en el medio de reacción final) y se registró el cambio del consumo de oxígeno hasta que la señal de respuesta se mantuvo constante. Después de cada inyección se sustituyó la membrana, lavando el sistema con el tampón fosfato.

A partir de las curvas de consumo de oxígeno con el tiempo ($\text{mg O}_2 / \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$, velocidad de reacción), obtenidas tras la inyección de patrones de lisina, se determinó la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato, y el valor de la K_m , utilizando la ecuación de Hanes-Woolf. El tiempo de medida en este sistema, en función de la zona recta de respuesta, se fijó en 5 s.

4.2.6 Determinación de Nitrato con el Sensor Enzimático

La preparación y estabilización del sensor para la determinación de nitrato fue la misma que la que se empleó para determinar la lisina, pero en este caso, la enzima fue la nitrato reductasa y la señal que se utilizó tras la reacción enzimática fue la variación de potencial eléctrico (mV) que se origina tras la reducción del ión nitrato a ión nitrito en presencia de la enzima. La reacción catalizada por la nitrato reductasa supone la movilización de dos electrones (Conrado Moreno et al., 1999), produciéndose la siguiente reacción:



4.2.6.1 Actividad Específica de la Nitrato Reductasa

Para determinar la actividad de la nitrato reductasa comercial (ver apartado 4.1.2.b.) se utiliza un ensayo colorimétrico descrito en el protocolo “Enzymatic Assay of Nitrate Reductase” (Sigma-Aldrich) y que está basado en los trabajos de Smarrelli y Campbell (1983). En este ensayo, el nitrato en presencia de NADH y de la enzima nitrato reductasa, se reduce a nitrito que reacciona con sulfanilamida y la naftiletilendiamina dando un complejo coloreado que se midió a 540nm.

4.2.6.2 Determinación de Nitrato con la Enzima Libre

La celda de reacción, termostata a 20 °C, se llenó con 2,000 µL del tampón de reacción (MOPS 100mM, pH 7.1) y se agitó suavemente con una varilla magnética hasta que la señal se estabilizó en el monitor. Inmediatamente se inyectaron 250 µL del extracto cárnico o del patrón de nitrato manteniendo la agitación unos 20 s más. Posteriormente se inyectaron 250 µL de la solución enzimática (0.64 U de la enzima disuelta en tampón fosfato potásico 0.1M, pH 7.5) y se registró la variación del potencial (ΔmV) hasta que éste se mantuvo constante (fin de la reacción).

En este caso también se optimizaron diversos parámetros de manejo del sensor como son la concentración de enzima, tiempo de respuesta, pH y temperatura. Los valores de pH ensayados fueron 6.6, 6.8, 7.1, 7.3 y 7.6, mientras que la temperaturas de ensayo fueron 14, 17, 20, 23, 27 y 33 °C. También se hicieron ensayos de validación; linealidad, repetibilidad y estabilidad que se describen en el apartado 4.2.8.

La elaboración de la recta de calibrado se hizo con concentraciones de nitrato comprendidas entre 0.1 y 0.01mM y la medida de la concentración de nitrato en las muestras se realizó con el sensor y por análisis cromatográfico.

4.2.6.2.1 Mecanismo de Actuación de la Nitrato Reductasa sobre el Nitrato

El estudio de la actuación de la nitrato reductasa sobre el nitrato se hizo como en el caso de la lisina (4.2.5.1), pero con el correspondiente patrón de nitrato 0.1mM (0.01mM en la disolución de reacción) como sustrato. La enzima nitrato reductasa tenía 3.85 U. El pH y temperatura de reacción fueron 7.1 (100mM MOPS) y 20 °C. Las alícuotas neutralizadas y centrifugadas se analizaron por triplicado por cromatografía en las condiciones descritas en el apartado 4.2.3. A partir de las concentraciones de nitrato medidas en el cromatógrafo para cada tiempo de reacción, se dibujaron las curvas de desaparición del nitrato.

4.2.6.2.2 Estudio de la Cinética Enzimática

Para el estudio de la cinética enzimática utilizando el sensor con la enzima libre se inyectaron 250 μL de una disolución patrón de nitrato (entre 0.01 y 1mM en el medio de reacción final) con 2,000 μL del tampón MOPS 100mM, pH 7.1, junto con 250 μL de la solución enzimática (0.64 U) dejando reaccionar a 20 °C. La reducción del nitrato a nitrito bajo estas condiciones se traduce en un cambio de señal, cambio de potencial (mV). Las variaciones de señal tras la inyección de patrones de nitrato, se utilizaron para determinar la velocidad de reacción (mV/s^{-1}) a cada concentración de nitrato, y el valor de la K_m , utilizando la ecuación de Hanes-Woolf. El tiempo de medida en este sistema, en función de la zona recta de respuesta, se fijó en 10 s.

4.2.6.3 Determinación de Nitrato con la Enzima Inmovilizada

El procedimiento en la inmovilización de la enzima nitrato reductasa se desarrolló de igual forma que en el caso de la lisina- α - oxidasa (apartado 4.2.5.4.) con alguna diferencia. En este caso se tomaron 8 μ L de la disolución de glutaraldehído (50 %), 27 μ L de MOPS (100mM, pH 7.1) y 15 μ L de la solución enzimática (0.038 U) y se depositaron gota a gota en la membrana Immudoyne ABC preactivada (1 cm²). Se dejó secar durante 1 hora tras lo cual, se añadió sobre la enzima inmovilizada, 5 μ L de acetato de celulosa al 2 % (en acetona) como lámina de protección. Finalmente, la membrana se dejó secar al aire (5 min) para evaporar el disolvente y se almacenó a 4 °C en tampón MOPS 100mM, pH 7.1, hasta su utilización.

Para realizar los analisis, la membrana se colocó en el sistema (ver Figura 10) y se aplicó un voltaje de -600 mV y tras su estabilización a 20 °C, se inyectó la muestra. Después de cada inyección se lavó la membrana con el tampón MOPS.

Empleando este sistema (enzima inmovilizado) se obtuvo el tiempo óptimo de respuesta 10 s, en base a la zona lineal de la curva de respuesta y se determinaron los valores de pH y temperatura óptimos. Los valores de pH ensayados fueron 4.1, 5.1, 6.1, 6.5 y las temperaturas 18, 20, 22, 25 °C.

La elaboración de la recta de calibrado se hizo con concentraciones de nitrato entre 0.01 y 0.07 mM, y la medida de la concentración de nitrato en las muestras se realizó con el sensor y por análisis cromatográfico.

4.2.6.3.1 Estudio de la Cinética con la Enzima Inmovilizada

Para el estudio de la cinética enzimática utilizando el sensor con la enzima inmovilizada se inyectó sobre la membrana 1,800 μ L del tampón MOPS 100mM, pH 7.1 y se dejó estabilizar el sistema manteniéndolo en agitación 10 s, tras lo cual se

inyectaron 200 μL del patrón de nitrato (en un rango de una disolución entre 0.01 y 4mM en el medio de reacción final). Después de cada inyección se sustituyó la membrana, lavando el sistema con el MOPS y se registró el cambio en el potencial de la corriente eléctrica hasta que la señal de respuesta se mantuvo constante.

A partir de las curvas de variación de potencial obtenidas tras la inyección de patrones de nitrato, se determinó la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato y utilizando la ecuación de Hanes-Woolf se obtuvo el valor de K_m .

4.2.7 Determinación de Acido Láctico con el Sensor Enzimático

La preparación y estabilización del sensor para la determinación de ácido láctico fue la misma que la que se empleó para determinar la lisina, pero en este caso, la enzima que se utilizó fue la lactato oxidasa. El principio de operación es el mismo, y así tras la adición de la muestra al reactor que contenía la enzima y el tampón, se produce la reacción y consiguiente cambio en la presión parcial de oxígeno que se exhibe como oxígeno consumido (mg/L). La reacción involucrada es la siguiente:



4.2.7.1 Actividad Específica de la Lactato Oxidasa

Para determinar la actividad de la lactato oxidasa comercial (ver apartado 4.1.2.c.) se utiliza un ensayo colorimétrico descrito en el protocolo “Enzymatic Assay of Lactate Oxidase” (Sigma-Aldrich) basado en el método de Lockridge et al. (1972). En este ensayo, el lactato en presencia de la enzima lactato oxidasa, se oxida dando piruvato y agua oxigenada. Esta última se hace reaccionar con antipirina y

dimetilanilina en presencia de peroxidasa, dando un compuesto coloreado que se midió a 565nm.

4.2.7.2 Determinación de Acido Láctico con la Enzima Libre

La celda de reacción (termostatizada a 31 °C) se llenó con 800 µL de la disolución de reacción (fosfato de potasio 0.1M, pH 7.0) agitando suavemente con una varilla magnética hasta que la señal se estabilizó en el monitor. Inmediatamente se inyectaron 100 µL del extracto cárnico o del patrón de ácido láctico, y 100 µL de la solución enzimática (1.01 U) registrándose el consumo de oxígeno durante la reacción enzimática.

En este caso también se optimizaron diversos parámetros de manejo del sensor, la concentración de enzima, tiempo de respuesta, pH y temperatura. Los valores de pH ensayados fueron 6.5, 6.7, 7, 7.5, 8 y 8.5, las temperaturas de 20, 23, 25, 31, 34 y 37 °C, y se hicieron ensayos de validación; linealidad, repetibilidad y estabilidad que se describen en el apartado 4.2.8.

La elaboración de la recta de calibrado se hizo con concentraciones de lactato entre 0.03 y 0.3mM (expresado en ácido láctico) y la medida de la concentración de ácido láctico en las muestras se realizó con el sensor y mediante análisis cromatográfico.

4.2.7.2.1 Mecanismo de Actuación de la Lactato Oxidasa sobre el Acido Láctico

El estudio de la actuación de la lactato oxidasa sobre el ácido láctico se hizo como en el caso de la lisina (4.2.5.1), pero en este caso se utilizó patrón de ácido láctico 0.1mM (0.01mM en la disolución de reacción) como sustrato y 15.15 U de la enzima (4.1.2c).

Las alícuotas neutralizadas y centrifugadas se analizaron por triplicado por cromatografía en las condiciones descritas en el apartado 4.2.4. A partir de las concentraciones de ácido láctico medidas en el cromatógrafo para cada tiempo de reacción, se dibujaron las curvas de desaparición del ácido láctico.

4.2.7.2.2 Estudio de la Cinética Enzimática

Para el estudio de la cinética enzimática utilizando el sensor con la enzima libre se inyectaron 100 μL de una disolución patrón de lactato (entre 0.02 y 11mM en el medio de reacción final) con 800 μL del tampón fosfato potásico 0.1M, pH 7, junto con 100 μL de la solución enzimática (1.01 U) dejando reaccionar a 31 °C. A partir de las curvas de consumo de oxígeno con el tiempo ($\text{mg O}_2 / \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$, velocidad de reacción), obtenidas tras la inyección de patrones de lactato, se determinó la concentración de sustrato y utilizando la ecuación de Hanes-Woolf se determinó el valor de la K_m .

4.2.8 Ensayos de Validación de los Sensores

Los ensayos de validación que se realizaron fueron los siguientes:

a. Linealidad. La linealidad en ambos sistemas enzimáticos (libre e inmovilizado) se evaluó para cada sensor enzimático en base al análisis por triplicado de series de concentraciones de lisina, nitrato y ácido láctico, respectivamente. Se seleccionó el rango lineal y se obtuvieron las rectas de ajuste (recta de calibrado) para cada sistema por el método de mínimos cuadrados.

b. Repetibilidad.- La medida de la repetibilidad de cada sistema enzimático se determinó por inyección repetida ($n=25$) de una misma concentración de un patrón de lisina, nitrato o ácido láctico y de muestras de jamón curado para la lisina, jamón post salado para el nitrato y salchichón para el ácido láctico. Los análisis se

realizaron en el mismo día, con el mismo equipo y bajo las mismas condiciones de operación en ambos sensores (enzima libre o inmovilizado). La medida de la repetibilidad se calculó obteniendo el coeficiente de variación (%).

c. Estabilidad.- La estabilidad de las respectivas enzimas durante el almacenamiento en refrigeración (4 °C) se evaluó tanto en forma soluble en tubos tipo eppendorf como inmovilizada en la membrana. Para la enzima libre, se analizaba cada semana por triplicado, una solución de lisina, nitrato o ácido láctico, y se ensayaba la actividad de la enzima respectiva al objeto de determinar su estabilidad.

En el sistema con la enzima inmovilizada se evaluó la estabilidad operacional de las membranas mantenidas a diferentes temperaturas. Se realizaron inyecciones semanales de patrón de lisina y nitrato en el sensor con la respectiva enzima inmovilizada, por triplicado, tomando una membrana cada vez y se ensayó su actividad al objeto de determinar su estabilidad a cada una de las temperaturas de almacenamiento ensayadas.

4.2.9 Análisis Estadístico de Resultados

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el paquete Statgraphics Plus (v 5.1) bajo el procedimiento ANOVA. En el caso en que el efecto de las interacciones fueran significativas, las medias fueron comparadas utilizando el método de la diferencia mínima significativa de Fisher (LSD) ($p < 0.05$ o $p < 0.001$). Previamente, se verificó la normalidad de la distribución de los datos y la homogeneidad de las varianzas. Para correlacionar y validar los valores de lisina, nitrato y ácido láctico obtenidos en los diferentes sistemas enzimáticos respecto a aquellos obtenidos mediante HPLC se realizó un análisis de correlación lineal.

5. Resultados y Discusión

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La necesidad de desarrollar nuevos métodos, más rápidos y económicos, que resulten, más eficientes para el análisis y control de la calidad de los productos cárnicos entra dentro del área de innovación en este sector industrial. Se ha comentado que las características principales de los sensores enzimáticos son su especificidad, sensibilidad, su corto tiempo de análisis, su capacidad de portabilidad y, por tanto, facilidad de uso, así como la capacidad de trabajar en tiempo real (Dzyadevych, et al., 2008).

En el presente trabajo se han desarrollado tres sensores enzimáticos, con una metodología sencilla de funcionamiento para su aplicación en la detección de marcadores de calidad en jamón curado y embutidos fermentados. En particular se ha puesto a punto para la determinación de lisina, nitrato y ácido láctico, para el análisis de indicadores de maduración y/o higiene. Como punto de partida se tiene que considerar la elección de la enzima. Las enzimas más utilizadas son las óxido-reductasas por su rápida acción sobre el sustrato. Así, cuando la enzima actúa sobre el sustrato, se detecta una variación en la corriente eléctrica debido a la corriente de electrones que se genera y que se relaciona con la concentración de dicho sustrato. La especificidad del sistema la confiere la enzima, mientras que la sensibilidad la otorga el sistema de transducción y la técnica electroquímica empleada, pudiendo influir también estas últimas en la selectividad. En este sentido se han elegido la lisina- α -oxidasa, nitrato reductasa, y la lactato oxidasa para la determinación de lisina, nitrato y ácido láctico, respectivamente. Para obtener la mayor eficacia es necesario optimizar diferentes parámetros de uso para cada una de estas enzimas como son el pH, la temperatura, concentración de enzima y forma de inmovilización, entre otros. Se ha examinado el comportamiento electroquímico del sensor operando con la enzima libre en solución o inmovilizada en un soporte (membrana). Se ha realizado una validación mediante el estudio de la linealidad y repetibilidad, se

ha estudiado la estabilidad así como la correlación de los resultados obtenidos con un método cromatográfico de referencia, y por último se han aplicado los sensores optimizados al estudio de muestras reales de jamón curado, y salchichón para comprobar su aplicabilidad.

5.1 Sensor Enzimático para el Análisis de Lisina

La construcción del sensor enzimático para lisina se desarrolló de acuerdo a lo descrito en el apartado 4.2.5 y los análisis de acuerdo al apartado 4.2.5.3 empleando un sensor amperométrico.

Uno de los problemas que se puede plantear en los sensores amperométricos son las interferencias debidas a la presencia en la muestra de compuestos como el ácido ascórbico o el glutatión, que son fácilmente oxidables a potenciales positivos. Es por ello, que si se fija un potencial eléctrico altamente negativo como -600mV se pueden evitar este tipo de interferencias. También el uso de la membrana de teflón evita que lleguen a los electrodos, moléculas mayores, electroactivas (proteínas y péptidos con cisteína, etc) que pueden interferir en la señal eléctrica. De esta manera, se incrementa la selectividad del sensor (Falck, 1997; Dzyadevych et al., 2008).

Una vez que un patrón de lisina o un extracto cárnico, es inyectado en la celda de reacción en presencia de la enzima lisina- α -oxidasa se produce la oxidación de la lisina y el oxígeno se consume, formándose ácido aminocaproico, amoníaco y peróxido de hidrógeno (ecuación 11). La corriente resultante de la reducción del oxígeno sobre el electrodo de Pt (cátodo) es proporcional a la cantidad de oxígeno consumido (presión parcial de oxígeno) que le llega, y que dependerá de la concentración de lisina de la muestra.

En la figura 12 se representa la acumulación de oxígeno consumido (mg O₂/L) en función del tiempo de reacción durante la oxidación de un patrón de lisina 10 mM (1 mM en el medio de reacción) en un sistema con la enzima libre en solución. En la

curva de evolución se puede observar un primer tramo lineal, útil desde el punto de vista analítico ya que su pendiente se corresponde con la velocidad de reacción ($\text{mg/L de O}_2 \cdot \text{s}^{-1}$) a esa concentración de sustrato y, a medida que avanza la reacción la curva se va haciendo asintótica, ya que se va agotando el contenido de lisina y, por lo tanto, disminuye la velocidad de reacción.

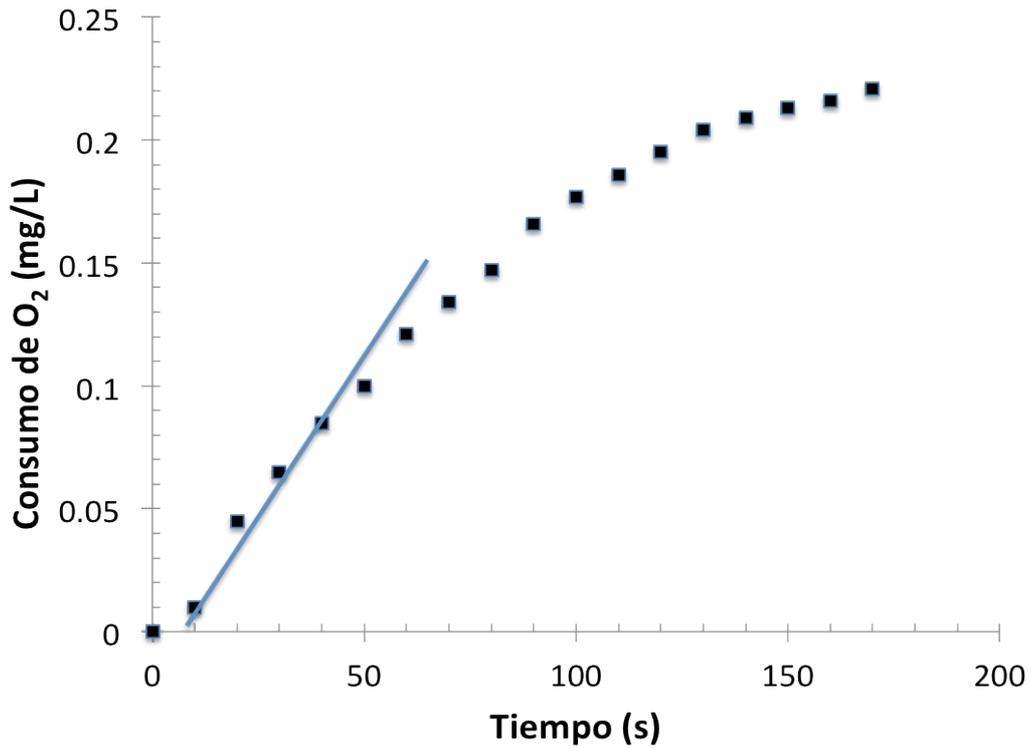


Figura 12. Respuesta del sensor enzimático representada como oxígeno consumido en función del tiempo de reacción en presencia de lisina 1.0mM y 1.7 U de lisina- α - oxidasa, en tampón fosfato sódico (50mM , $\text{pH } 7.6$) a $37\text{ }^\circ\text{C}$.

5.1.1 Mecanismo de Actuación de la Lisina- α -Oxidasa

El estudio de la oxidación de la lisina por la lisina- α -oxidasa se realizó según el apartado 4.2.5.1. Se sometió la lisina a la acción de la lisina- α -oxidasa en las

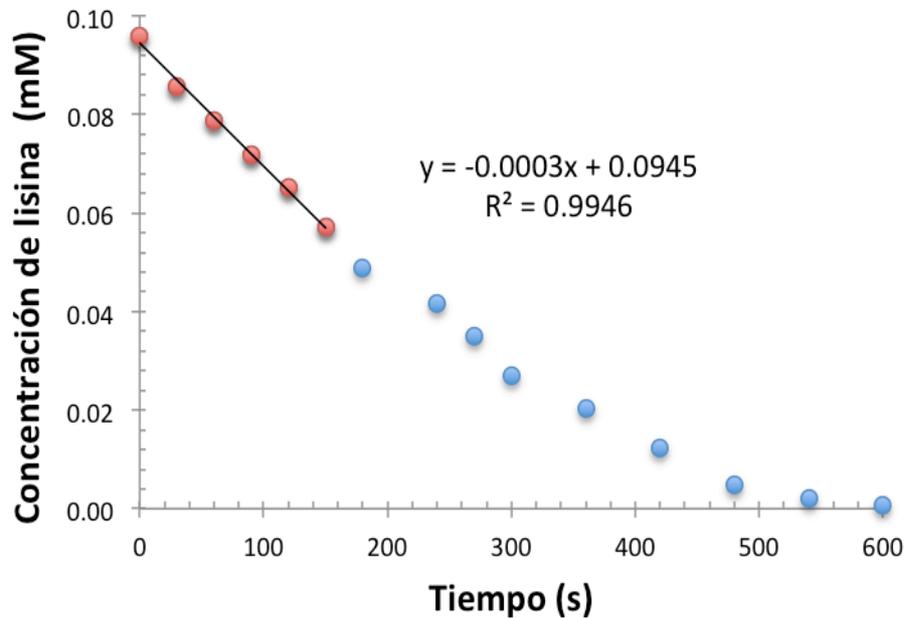


Figura 13. Estudio de la desaparición de lisina en presencia de lisina- α -oxidasa, utilizando HPLC para la medida de la lisina.

condiciones de pH (7.6) y temperatura (37 °C) obtenidas de la bibliografía (Gokdogan Sahin et al., 2013) y midiendo por HPLC (apartado 4.2.2) el avance de la reacción con el tiempo. La desaparición de lisina se muestra en la figura 13. La oxidación de la lisina ocurrió de forma gradual y fue total a los 600 segundos.

En otro ensayo se evaluó el comportamiento de la enzima lisina- α -oxidasa, sobre un extracto de jamón curado para caracterizar el comportamiento sobre una muestra real. Se pudo observar una tendencia similar de actuación, ya que el

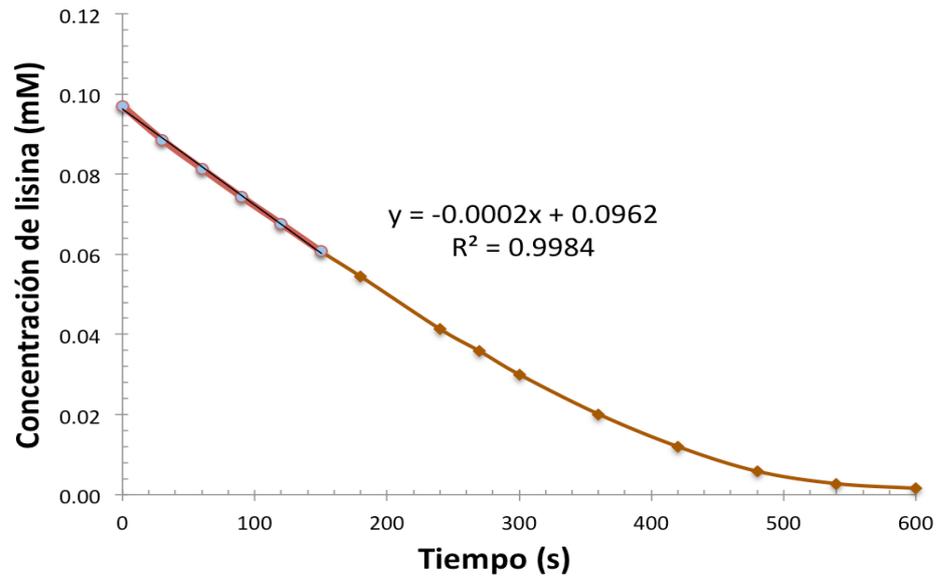


Figura 14. Desaparición de lisina en un extracto de jamón curado, en presencia de lisina- α -oxidasa a 37 °C y medida por HPLC.

sustrato se agotó de forma gradual hasta su desaparición total también a los 600 segundos (Figura 14).

5.1.2 Sistema Enzimático con la Enzima Libre

El sistema libre indica el estado de la enzima en solución. Se procedió a la optimización de las condiciones como cantidad de enzima, pH, temperatura, y tiempo de respuesta, entre otros se realizó en el sistema con la enzima libre.

Tras la determinación de la actividad específica de la enzima comercial (apartado 4.2.5.2), se determinó la cantidad de enzima a utilizar adicionando diferentes concentraciones de enzima hasta obtener una respuesta detectable y reproducible, manteniendo constante la concentración de sustrato (lisina). Resultó ser de 1.7 U a 37 °C (no se muestran los resultados).

El pH óptimo del medio de reacción se evaluó en el intervalo 5.6-7.6 y los resultados se muestran en la figura 15. La máxima velocidad de reacción se obtuvo a pH 6.6, disminuyendo mucho a valores menores de pH no siendo tan importante el descenso de actividad a valores de pH superiores a 6.6.

La dependencia del pH se presenta en general en todas las enzimas y se debe a que afecta al nivel de protonación, lo que alteraría la velocidad de formación o rotura del complejo enzima-sustrato (Nakatani et al., 2005).

La temperatura óptima de reacción se evaluó ensayando diferentes temperaturas (27, 32, 37, 39, y 42 °C) al pH óptimo (6.6) y observando la velocidad enzimática para una concentración 1mM de lisina. Los resultados (Figura 16), reflejan que conforme se aumenta la temperatura, aumenta la velocidad de reacción alcanzando un máximo a 37 °C, sobre esta temperatura, la estabilidad del enzima disminuye y, por tanto, se ve reducida su actividad (Karube et al., 1984).

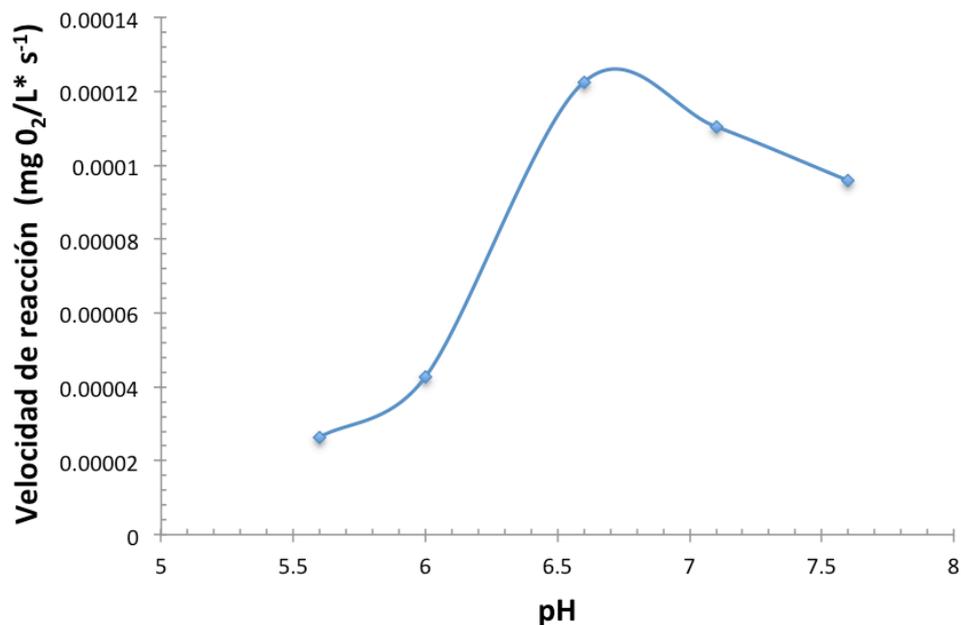


Figura 15. Efecto del pH sobre la velocidad de reacción de la enzima lisina- α -oxidasa determinado en el sensor enzimático con la enzima libre (1.7 U). Patrón de lisina 1mM, en tampón fosfato sódico 50mM a 37 °C.

La actividad de la enzima a diferentes temperaturas se estudió también, analizando la lisina por HPLC, a diferentes tiempos de reacción, y con diferentes temperaturas (10, 20, 30, y 37 °C), como se hizo en el apartado 5.1.1 pero con las condiciones de pH y concentración de enzima optimizadas. Los resultados se muestran en la figura 17. Se observa que a temperaturas altas la velocidad de reacción es mayor. Así, a 37 °C la oxidación total de la lisina se produjo en 40 segundos, respecto a los 100 s a 10 °C. Confirmando así la conveniencia de seleccionar los 37°C como temperatura óptima de reacción.

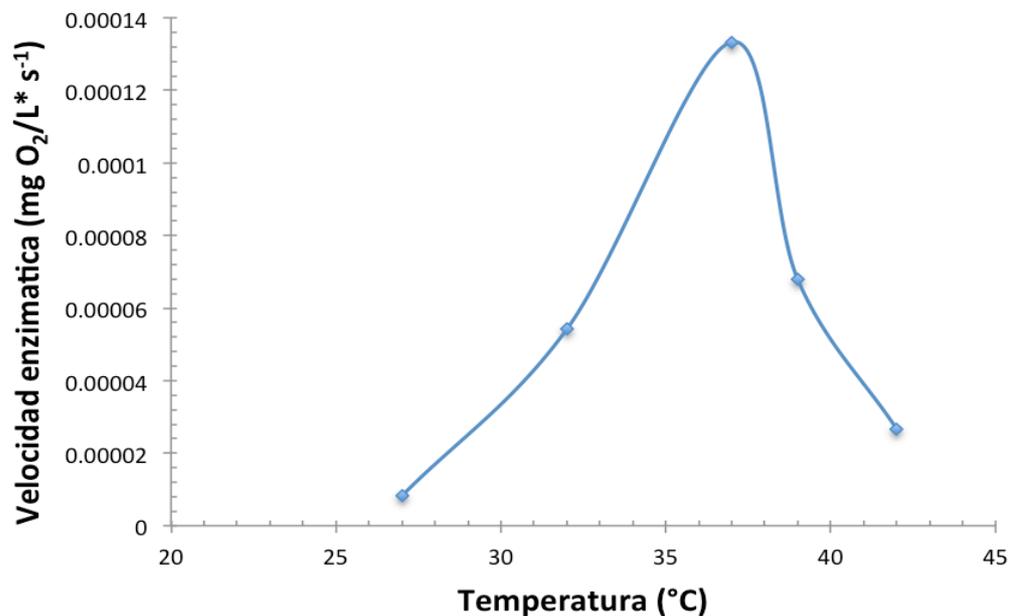


Figura 16. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción de la enzima lisina- α -oxidasa determinado con el sensor enzimático con la enzima libre (1.7 U). Patrón lisina 1mM en tampón fosfato sódico a pH 6.6, lisina- α -oxidasa a diferentes temperaturas.

También se obtuvo la recta de calibrado por inyección de series de patrones de lisina por triplicado, y se fijó el tiempo de respuesta para los análisis. Ambos ensayos se muestran en el apartado de validación cuando se hable de linealidad del

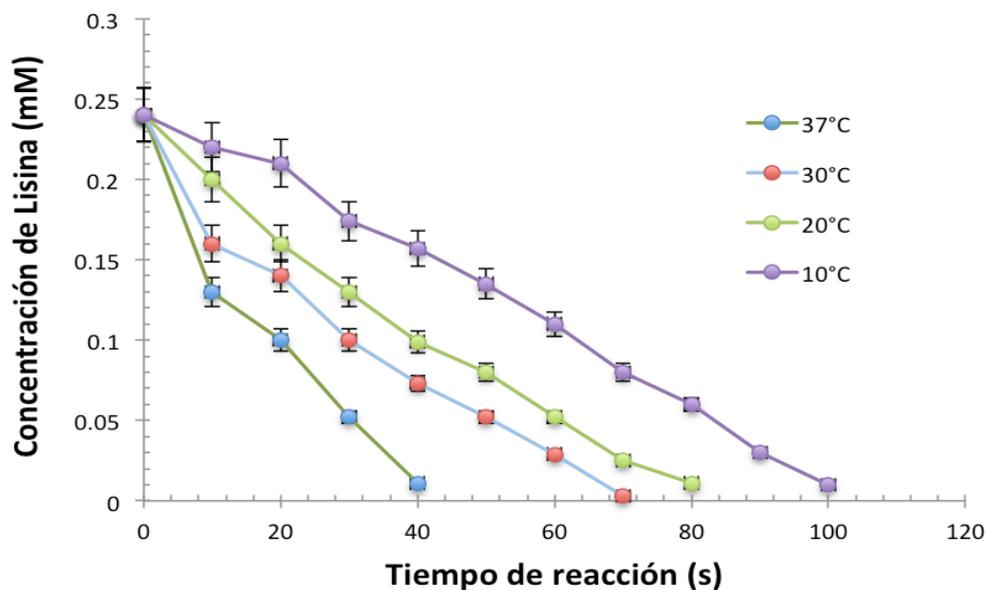


Figura 17. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción de la enzima lisina- α oxidasa libre. La concentración de lisina se determinó por HPLC.

sensor (5.1.2.2 a).

5.1.2.1 Estudio de la Cinética Enzimática

El estudio de la cinética enzimática se realizó como se describe en el apartado 4.2.5.3.1. En las condiciones fijadas se obtuvo el valor de la constante de Michaelis Menten (K_m) utilizando la ecuación de Hanes-Woolf (ecuación 6). Para el sistema libre el valor K_m fue de 2.14 mM (Figura 18).

5.1.2.2 Ensayos de Validación

Se realizaron los siguientes ensayos de validación:

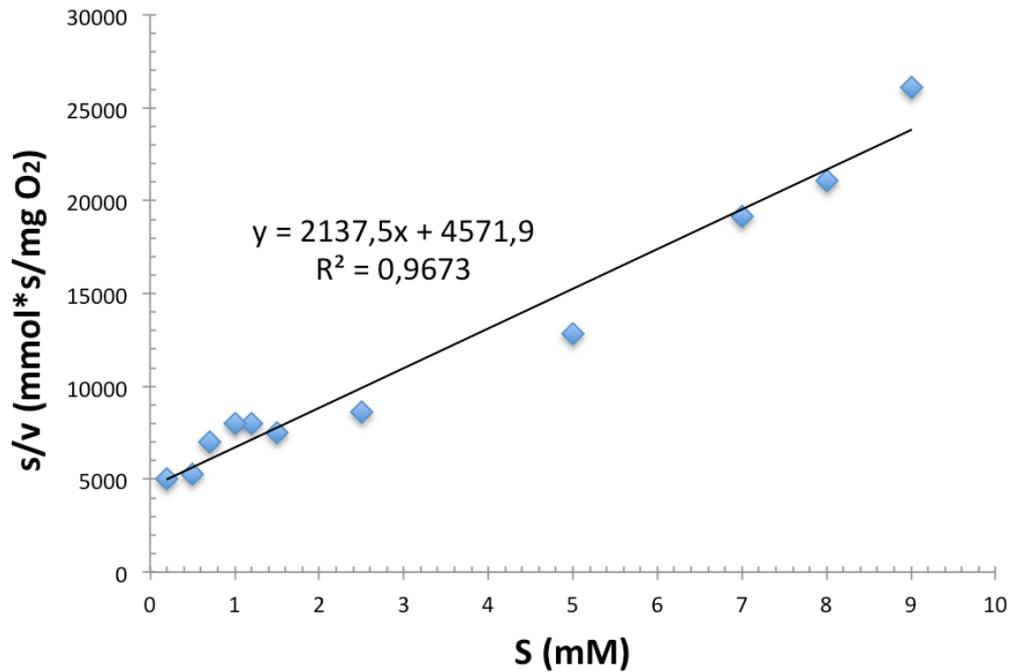


Figura 18. Ecuación de Hanes-Woolf para la obtención de la K_m , con la enzima lisina oxidasa libre. $[S]/v=1/V_{max}*[S]+K_m/V_{max}$, donde S: concentración de sustrato; v: velocidad de reacción.

a) Linealidad: Fijando las condiciones optimizadas previamente, se obtuvieron las curvas de respuesta a distintas concentraciones de lisina, y a partir de ellas se seleccionó el tiempo óptimo de respuesta en base a la zona lineal de dichas curvas y se determinaron las pendientes respectivas, velocidad de reacción, para cada concentración de lisina, por triplicado. La representación gráfica de las pendientes frente a la respectiva concentración de lisina permite obtener, por el método de mínimos cuadrados, la recta de calibración y la determinación del rango lineal del sensor. El tiempo de respuesta se fijó en 20 s y el rango lineal fue de 0.2 a 1.5mM de lisina.

La recta obtenida fue muy reproducible como puede apreciarse en la figura 19.

La sensibilidad de detección del sensor enzimático ante concentraciones elevadas

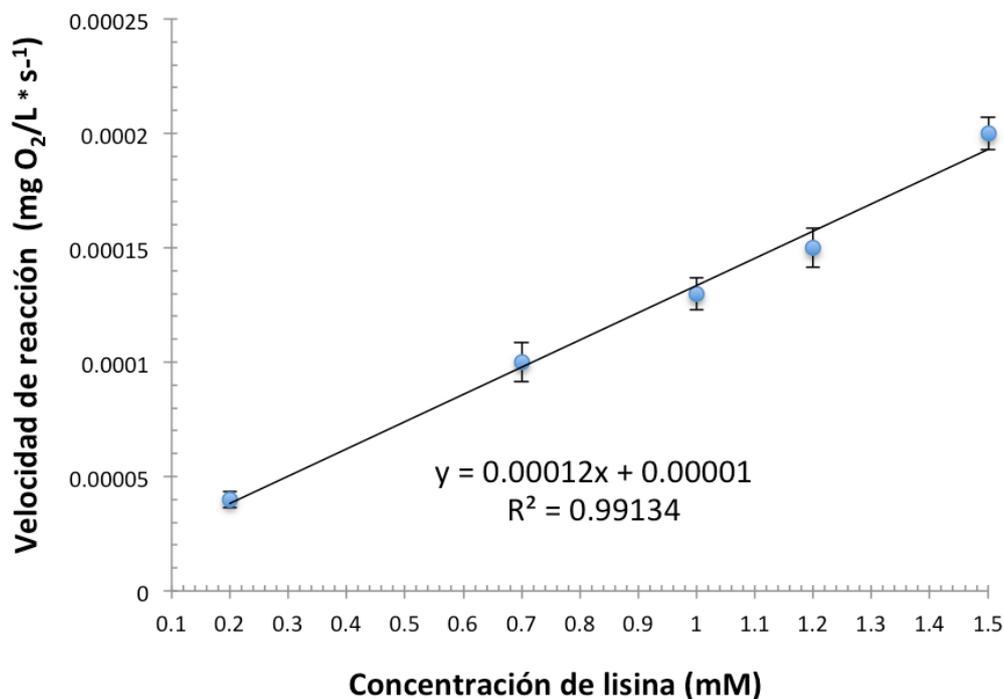


Figura 19. Recta de calibrado de lisina en el sensor enzimático con la enzima libre. Las barras de error indican la desviación estándar de la medida de tres repeticiones.

de lisina puede verse afectado por la propia concentración de lisina, inhibiendo la enzima por exceso de sustrato o producto formado (NH_3 ; H_2O_2) o bien por la limitación de oxígeno en el medio. Así, lecturas superiores a 0.074 mg/L de oxígeno consumido o velocidades de reacción mayores de 0.0002 $\text{mgO}_2/\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$ sugieren un exceso de lisina y la muestra cárnica deberá ser diluida para adecuarse al intervalo lineal de detección.

b) Repetibilidad.- Se determinó la actividad de forma repetida (25 inyecciones) usando como sustrato tanto el patrón de lisina 1mM y un extracto de jamón curado de 10 meses. Los valores de los coeficientes de variación obtenidos con cada tipo de sustrato se muestran en la tabla 6.

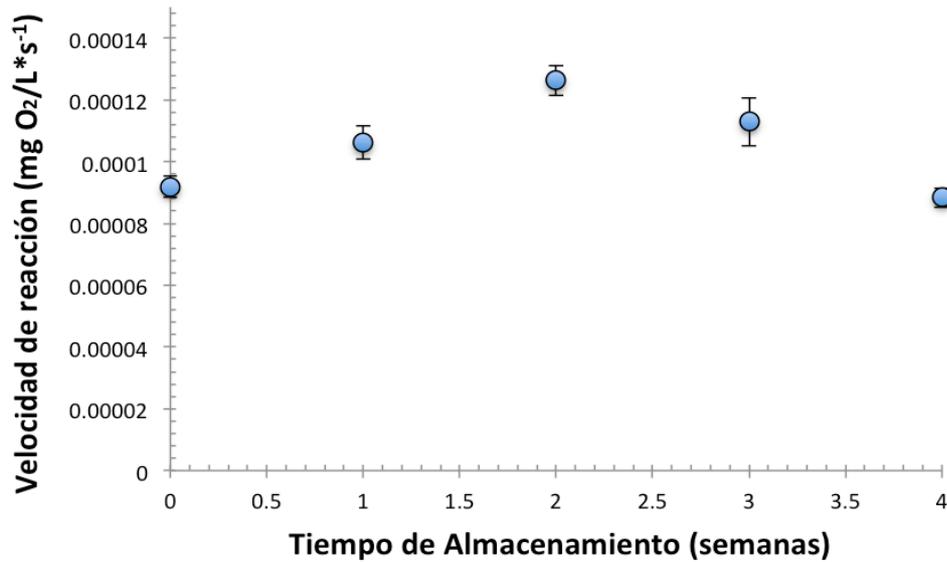


Figura 20. Estabilidad de la lisina- α -oxidasa en solución. Almacenada en refrigeración (4 °C). Las barras de error indican la desviación estándar de 3 repeticiones.

c) La estabilidad de la solución enzimática de lisina- α -oxidasa durante el almacenamiento a 4 °C fue buena durante un período de hasta 4 semanas como demostró el hecho de que no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) en el análisis de una misma concentración de lisina (1mM) durante este período de tiempo, como se refleja en la figura 20.

5.1.3 Sistema Enzimático con la Enzima Inmovilizada

La principal desventaja de trabajar con los enzimas libres en solución es que suponen un gasto alto de enzima ya que ésta no se puede re-utilizar y además se emplea en una cantidad relativamente alta. La inmovilización de la enzima sobre un soporte se desarrolló con la intención de mejorar el rendimiento de los sensores enzimáticos a base de aumentar la estabilidad, eficiencia y rendimiento.

El proceso de inmovilización tendrá así, como objetivo, fijar una cantidad determinada de la enzima sobre un soporte, (generalmente membranas de nylon, y polímeros diseñados para este fin), manteniendo su actividad de forma óptima. El proceso de inmovilización es pues decisivo. En el apartado 1.3.2.1 se describen los métodos de inmovilización de los enzimas más utilizados, de los que cabe destacar el método de entrecruzamiento con glutaraldehído y enlace covalente sobre un soporte. El soporte seleccionado en esta tesis, fue ya utilizado con éxito en nuestro laboratorio para la inmovilización de las enzimas xantina oxidasa y diamino oxidasa en una tesis anterior (Hernández-Cázares et al., 2010). Se trata de una membrana Immunodyne ABC (Nylon 66, con un tamaño de poro de 0.45 μm) preactivada. Esta membrana mejoró la retención y estabilidad de la enzima mediante unión covalente de ésta sobre su superficie.

El glutaraldehído se ha utilizado para insolubilizar las proteínas por entrecruzamiento y, generalmente, el procedimiento requiere utilizar bajas concentraciones de proteína (enzima) y exceso de reactivo (Payne, 1973). Sin embargo, una concentración de glutaraldehído excesivamente alta puede modificar la estructura de la proteína afectando su actividad. El grado de entrecruzamiento y la actividad de la enzima inmovilizada dependerá de la relación (ratio) entre enzima y reactivo. La optimización de este ratio se consigue variando la cantidad de enzima (Payne, 1973), o la concentración de glutaraldehído (Saurina et al., 1998) para una mejor respuesta. Se ensayaron diferentes concentraciones de glutaraldehído; desde 0.15 a 8 % y la mayor respuesta (cantidad de oxígeno consumido) tras el análisis de lisina 0.1mM, se observó cuando se utilizaba el 6 % de glutaraldehído para una misma cantidad de lisina- α -oxidasa (0.1 U). Los resultados se muestran en la figura 21. La escasa actividad observada a menores porcentajes de glutaraldehído (0.15 %) se puede deber a que se retiene poca enzima por el escaso grado de entrecruzamiento mientras que a mayores concentraciones de glutaraldehído

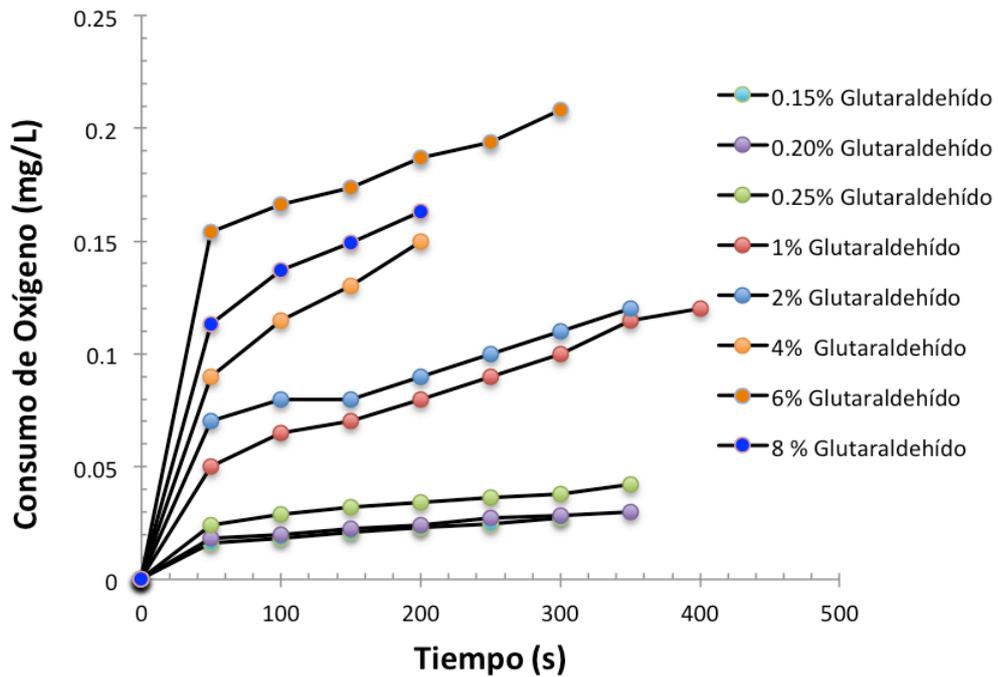


Figura 21. Estudio de la respuesta de la lisina- α -oxidasa inmovilizada en función de las diferentes concentraciones de glutaraldehído. Se utilizó 0.1 U de actividad enzimática y 0.1 mM de lisina.

(8 %), la polimerización de la enzima ocurre muy rápido produciéndose irregularidades sobre la membrana que podrían impedir la interacción del sustrato con el centro activo de la enzima o la difusión del oxígeno hacia el electrodo de platino (Pt), disminuyendo así la sensibilidad de detección. (Karimi Shervedani et al., 2009).

La cantidad de enzima utilizada en el proceso de inmovilización se optimizó utilizando 5, 7, 15, y 20 μ L de la solución enzimática preparada en el apartado 4.1.2a que contenían 0.034, 0.047, 0.102 y 0.136 U respectivamente, y una concentración de glutaraldehído del 6 % y la concentración de sustrato de 0.1mM de lisina. La actividad óptima se observó cuando se tomaban 15 μ L (0.102 U) de la

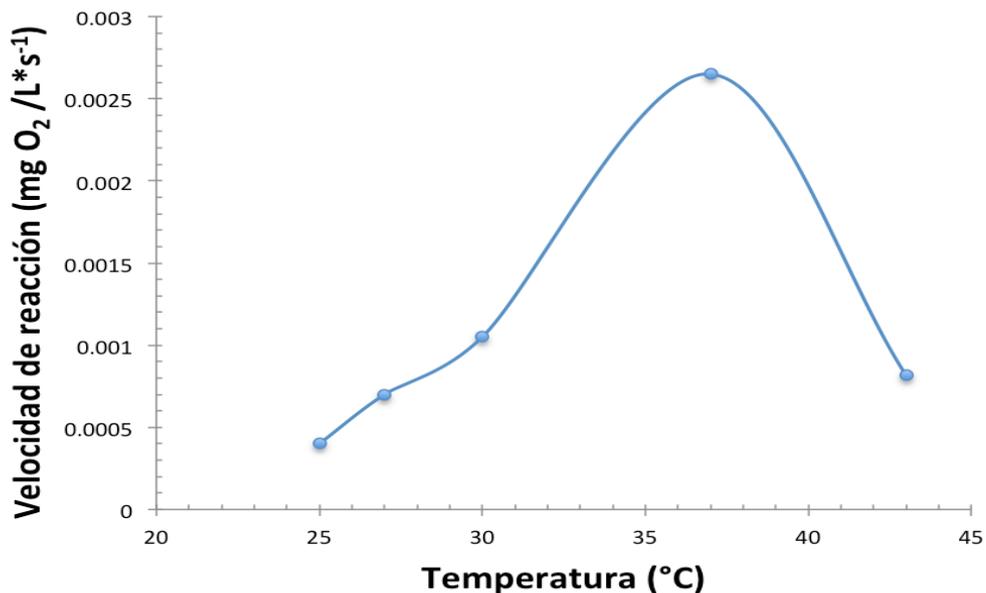


Figura 22. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la lisina- α - oxidasa, en el sistema inmovilizado.

solución enzimática.

También se determinó la temperatura óptima que fue de 37 °C como en el sistema con la enzima libre (Figura 22). El pH se evaluó en un intervalo de 5.6-8.6 frente a la velocidad catalítica de la enzima, observándose que el pH óptimo fue 7.6 (Figura 23) que aunque difería respecto al de la enzima libre, era muy cercano al pH 7.5 que es el se indicaba con mayor frecuencia en la bibliografía (Guerrieri et al., 2007; Chauhan et al 2013). Como resultado de este estudio, la disolución de reacción a pH 7.6 se utilizó para las siguientes experiencias, con el sistema inmovilizado.

5.1.3.1 Estudio de la Cinética con la Enzima Inmovilizada

El estudio de la cinética enzimática con la enzima inmovilizada se desarrolló según el apartado 4.2.5.4.2 y bajo estas condiciones la especificidad de la enzima

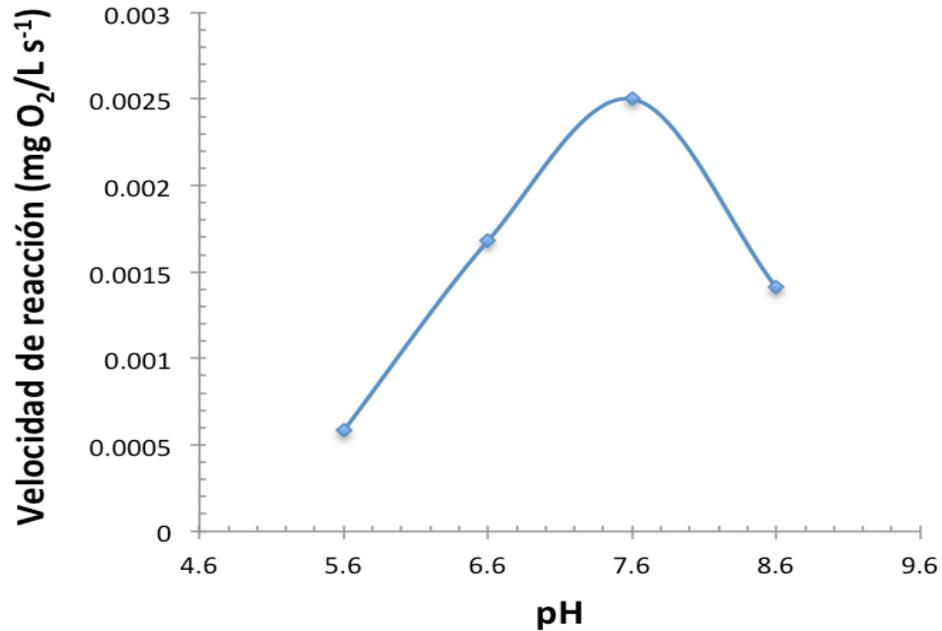


Figura 23. Efecto del pH sobre la actividad de la lisina α -oxidasa, en el sistema inmovilizado.

inmovilizada mejoraba en relación a la enzima libre con una constante aparente ($K_{m\text{ app}}$) de 0.36mM. Este valor indica una buena afinidad de la enzima por el sustrato, mejor que con la enzima libre y, por tanto, condiciones de operación fiables con la enzima inmovilizada. Lo habitual es encontrar valores de K_m para la enzima libre menores que en el inmovilizado debido a que el proceso de inmovilización puede disminuir la actividad de la enzima. Sin embargo una tendencia similar fue reportada por Vrbová y Marek (1992), quienes obtuvieron una $K_{m\text{ app}}$ de 1.33mM para el sistema inmovilizado sobre el mismo soporte de nylon, mientras que la K_m para la lisina α -oxidasa libre fue de 3.0mM.

Para el cálculo de la K_m aparente se utilizó la ecuación de Hanes-Woolf ecuación representada en la figura 24.

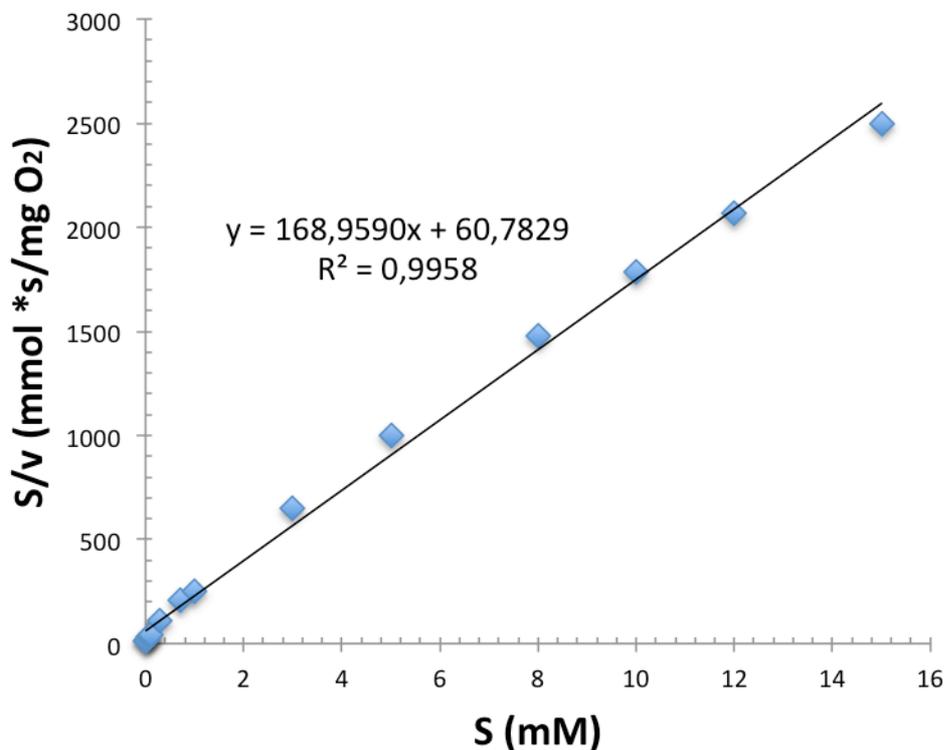


Figura 24. Representación de Hanes-Woolf para la obtención de la K_m , con la enzima lisina oxidasa inmovilizada. $[S]/v = 1/V_{max} * [S] + K_m/V_{max}$, donde S: concentración de sustrato; v: velocidad de reacción.

5.1.3.2 Ensayos de Validación

Se realizaron los siguientes ensayos de validación:

a) Linealidad. El ensayo de linealidad se hizo en las condiciones optimizadas. La recta de calibrado se obtuvo, a partir de las velocidades enzimáticas a distintas concentraciones de lisina, con un tiempo de respuesta óptimo a los 5 s. Se obtuvo un intervalo lineal de 10 a 250 μ M lisina que fue más amplio que con el sistema libre (Figura 25), y en un rango de menores concentraciones de lisina, llegando a 10 μ M. Este rango, implica una mayor operatividad (rango más amplio) y sensibilidad

(límite inferior mucho menor) que en el sistema libre (Tabla 5), pero hay que tener en cuenta que habrá que diluirla mucho más la muestra, para no saturar la capacidad de la enzima y para que la señal entre en dicho intervalo.

b) Repetibilidad.- Se determinó la actividad de forma repetida (25 inyecciones con 25 membranas) usando como sustrato el patrón de lisina 0.1mM y un extracto de jamón curado de 10 meses. Los valores de los coeficientes de variación obtenidos con cada tipo de sustrato se muestran en la tabla 5.

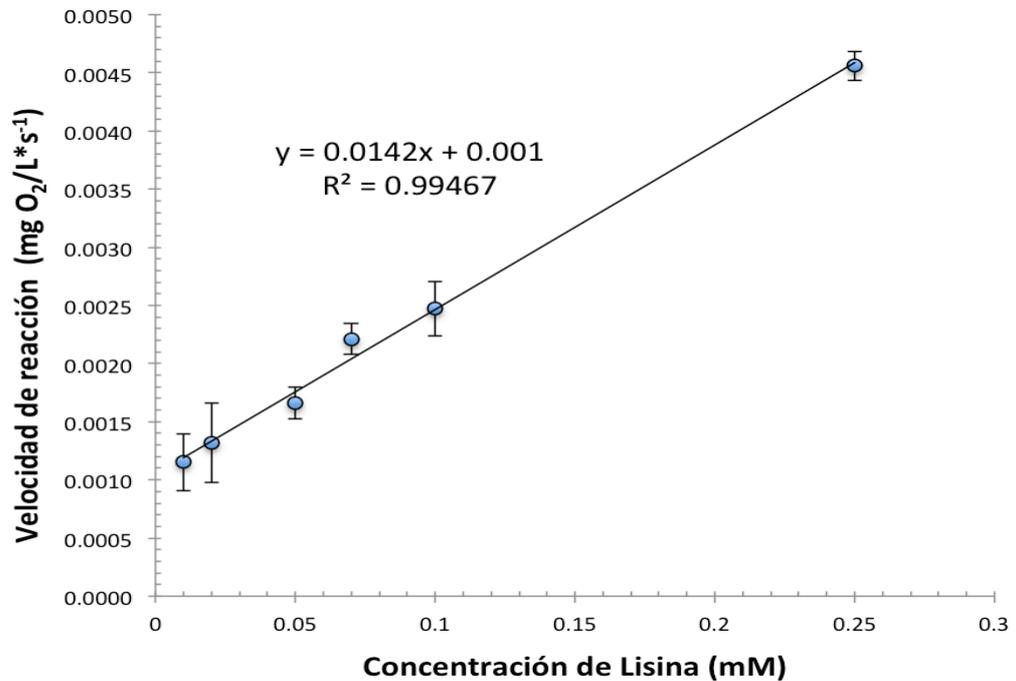


Figura 25. Recta de calibrado utilizando el sensor enzimático con la enzima lisina oxidasa inmovilizada. Las barras de error indican la desviación estándar de la medida de tres membranas para cada punto.

c) Estabilidad.- Se evaluó la estabilidad de la membrana con la enzima inmovilizada y almacenada a diferentes temperaturas 4, 10, 20, 30, y 37 °C, en tampón fosfato a pH 7.6.

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

Sensor Enzimático		
Parámetro*	Sistema con la enzima Libre	Sistema con la enzima Inmovilizada
Intervalo Lineal (μM)	200 - 1500 ($R^2=0.9913$)	10-250 ($R^2=0.9946$)
Repetibilidad, CV (%)		
Patrón	8.81	7.7
Jamón curado (10m)	9.25	9.0
Estabilidad a 4°C	Mantiene la actividad inicial a los 28 días	La vida media fue 42 días. Mantiene el 90% de la actividad inicial a los 7 días
Correlación con la medida por HPLC (R^2)	0.9920	0.9994

* Excepto para los estudios de estabilidad, todos los parámetros se midieron empleando una solución enzimática o membrana de lisina- α -oxidasa, recién preparadas.

Para el ensayo se utilizó un patrón de lisina 0.1mM. Se fijaron para cada temperatura los intervalos de lectura más adecuados para poder hacer el seguimiento. Así, cuando se analizó la enzima inmovilizada almacenada a 4 °C no se observó una variación en su actividad antes de 7 días. En el caso de la enzima inmovilizada almacenada 10 °C, el descenso de su actividad obligó que se midiera cada 24 horas y la frecuencia de medidas tuvo que ser mayor conforme aumentaba la temperatura de almacenamiento de las membranas, de modo que los ensayos con membranas almacenadas a 20, 30 y 37 °C, tuvieron que realizarse cada 10 minutos o menos. Así a 37 °C, se obtuvo una vida media (pérdida del 50 % de su actividad inicial) de 19 minutos. Esto explica el que no se puedan re-utilizar estas membranas, ya que la reacción es a 37 °C y la estabilidad en estas condiciones es muy baja. En la tabla 5 se puede observar los resultados sobre la estabilidad durante el almacenamiento a 4 °C de la enzima inmovilizada, y puede verse que ésta fue mucho menor si se compara

con la enzima libre (solución enzimática), reteniendo el 90 % de la actividad tras 7 días a 4 °C.

5.1.3.3 Estudio de la Especificidad de la Lisina- α -Oxidasa

Los alimentos proteicos suelen contener aminoácidos libres y entre ellos aquellos por los que también muestra cierto grado de afinidad la lisina- α -oxidasa y, por tanto, se pueden producir interferencias en la determinación de lisina con este sensor. Los productos cárnicos curados son especialmente ricos en aminoácidos libres (Toldrá et al., 2000) debido a la intensa proteólisis que han experimentado durante su fabricación, por lo que este tipo de interferencia debe ser evaluada. En concreto, los aminoácidos fenilalanina, arginina, ornitina y tirosina han sido señalados como los que presentan mayor interferencia cuando se trabaja con la lisina- α -oxidasa (Saurina, et al 1998; Kelly et al., 2000; Matsuda y Asano 2010; Guerrieri, Ciriello y Cataldi, 2013). Para evitar este problema se han propuesto algunas estrategias que, en general, pasan por un ajuste fino de las parámetros experimentales (Chen et al., 1996; Kelly et al., 2000; Guerrieri et al., 2013), o por cambiar la fuente de origen de la enzima (Kelly et al., 2000).

El nivel de oxidación de algunos aminoácidos fue ensayado tras su incubación con la enzima en solución a 37 °C y posterior análisis por cromatografía. Los resultados, mostrados en la tabla 6, indican que la arginina y la fenilalanina fueron los aminoácidos que presentaron mayor afinidad, aunque los otros aminoácidos también dieron una ligera respuesta significativa. Cabe esperar pues cierta interferencia aunque será menor en soluciones problema con presencia de lisina.

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

Sustrato	Tasa de oxidación relativa (%) HPLC	Tasa de oxidación relativa (%) Sensor*
Lisina	100.0	100.0
Arginina	25.0	0.0
Fenilalanina	18.8	53.8
Ornitina	9.4	9.1
Tirosina	9.4	0.0
Histidina	6.3	0.0
Leucina	3.1	0.0

*Sistema con la enzima inmovilizada.

El ensayo se realizó también con el sensor en el sistema inmovilizado y los resultados obtenidos fueron diferentes (Tabla 6), porque en este caso mostró la mayor afinidad hacia la fenilalanina y muy ligera hacia la ornitina. El resto de aminoácidos no dio señal, incluido la arginina.

El sistema inmovilizado demostró ser muy específico en su respuesta a la lisina excepto por la fenilalanina, cuya interferencia parece que puede ser muy importante. Sin embargo, cuando se analizó una mezcla equimolar (0.1mM) de ambos aminoácidos (lisina y fenilalanina), la respuesta no difirió de la obtenida al analizar una disolución que contenía solo lisina 0.1mM, lo que indicó que en presencia de lisina, la enzima actúa preferentemente sobre ella, no notándose la interferencia mientras hay lisina disponible. Este resultado evidencia la mayor afinidad de la enzima por la lisina que para el resto de aminoácidos y confirma el

hecho de que la lisina se degrada casi selectivamente (Saurina et al., 1998; Lukasheva y Berezov, 2002).

5.1.4 Actividad Específica de la Lisina- α -oxidasa en sus formas Libre e Inmovilizada

Se determinó la actividad específica de la enzima libre e inmovilizada dividiendo la actividad por la cantidad de proteína presente en el medio de reacción y en la membrana; 0.0167 y 0.00276 mg respectivamente. Para la enzima libre la actividad específica fue $7.06 \cdot 10^{-4}$ U/mg proteína y la inmovilizada 0.0608 U/mg proteína.

5.1.5 Aplicación del Sensor de Lisina al Análisis de Muestras

Para comprobar la fiabilidad del sensor al análisis de muestras reales se empezó evaluando el sistema con la enzima libre. Las técnicas ensayadas, medidas con el sensor y con el HPLC, se describieron en los apartados 4.2.5.3 y 4.2.2 respectivamente. Como puede observarse en la figura 26, se obtuvo una buena correlación entre ambas medidas con un valor $R^2=0.9921$ y una pendiente muy cercana a 1. Estos valores indican que no hubo interferencias en la medida con el sensor, y que éste puede servir de manera fiable como método alternativo a la cromatografía para la medida de la lisina en productos cárnicos.

Cuando se realizó esta correlación empleando el sistema con enzima inmovilizada se obtuvo también un buen resultado, $R^2=0.9995$ que se muestra en la figura 27.

5.1.5.1 Curado de Jamón

La aplicación del sensor enzimático para el análisis de muestras de jamón

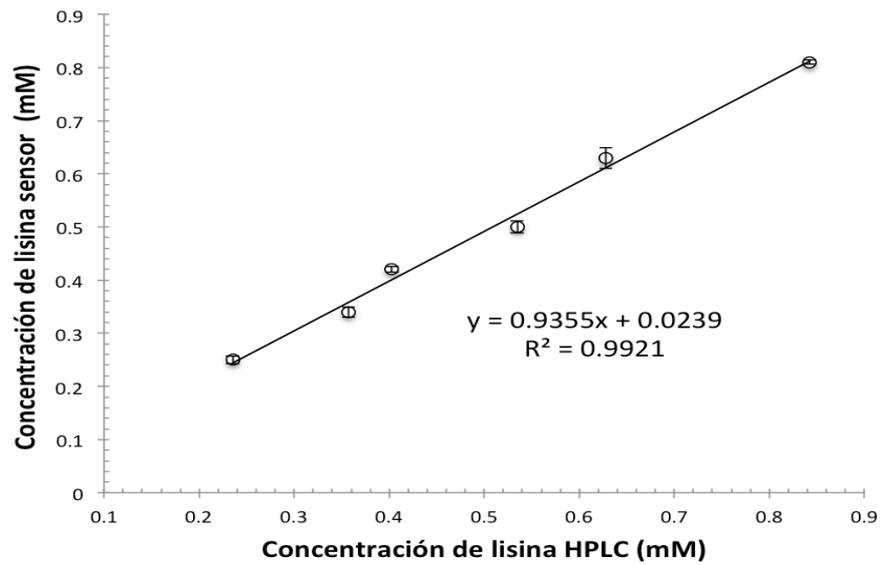


Figura 26. Correlación entre los contenidos de lisina obtenidos en extractos cárnicos utilizando el sensor con la enzima libre y por HPLC. El estudio se realizó por triplicado.

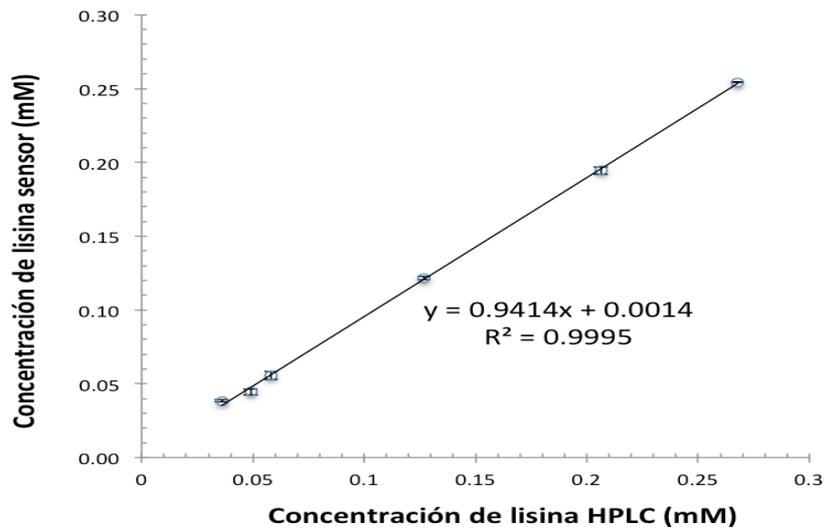


Figura 27. Correlación entre los contenidos de lisina obtenidos en extractos cárnicos utilizando el sensor con la enzima inmovilizada y por HPLC. El estudio se realizó por triplicado.

curado se evaluó determinando el contenido de lisina en músculo *B femoris* de jamón a diferentes tiempos de curado (0, 2, 3.5, 5, 6.5, 9, 10 meses), utilizando el sistema inmovilizado según el procedimiento descrito (5.1.3). Además, el método fue validado comparando los resultados con los obtenidos en las mismas muestras por HPLC (apartado 4.2.2). A partir de la señal amperométrica transformada en oxígeno consumido ($\text{mg O}_2/\text{L}$), obtenida al inyectar los extractos cárnicos en el sistema, se obtuvo la velocidad de reacción ($\text{mg O}_2/\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$) a los 5 s, y por extrapolación de ésta en la recta de calibrado se calculó la concentración de lisina en las muestras. Los resultados se muestran en la figura 28.

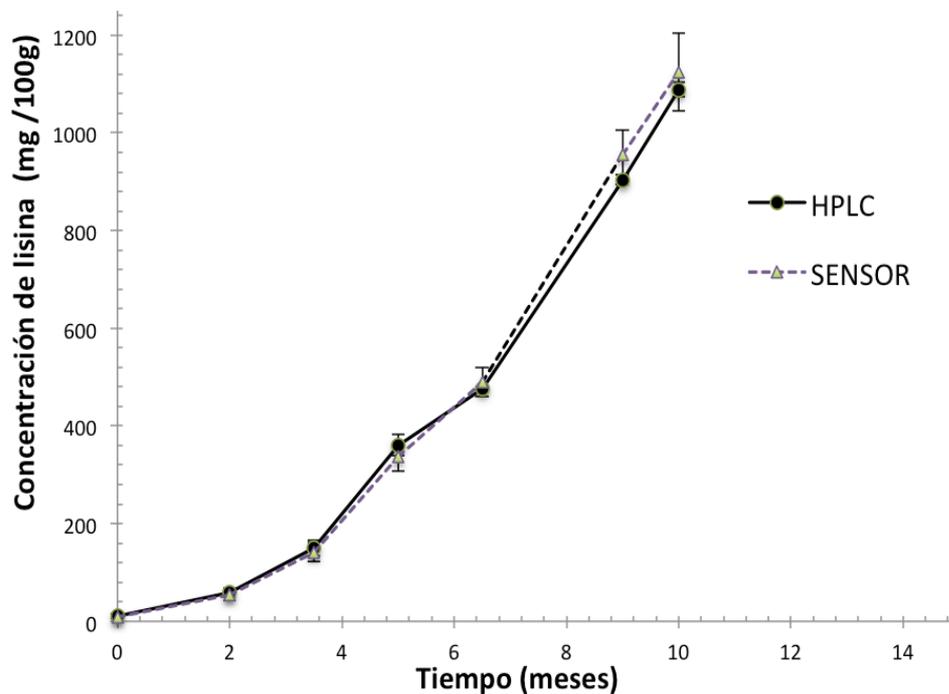


Figura 28. Evolución del contenido de lisina durante el proceso de curado de jamón analizado con el sensor con la enzima inmovilizada y por HPLC.

El análisis demostró un gran incremento de la lisina a lo largo del proceso de curado. La concentración de lisina obtenida con el sensor y HPLC fueron de 9.1 y 10.4 mg/100 g respectivamente en *B. femoris* fresco, y se incrementaron hasta 1124.5 y 1088.4 mg/100 g tras 10 meses de curado. La lisina es uno de los aminoácidos que se genera en mayor cantidad en el curado de jamón y podría servir como indicativo del tiempo de proceso, y del grado de proteólisis. En la figura 28 se observa que las curvas de incremento de la lisina analizada por los dos métodos, se correlacionan perfectamente a todos los tiempos de proceso analizados.

5.1.5.2 Maduración de los Embutidos Fermentados

La aplicación del sensor enzimático con el enzima inmovilizado al análisis de lisina se ensayó también durante el proceso de curado de embutidos a 0, 15, 35, y 65 días, y los resultados se muestran en la figura 29. De igual forma se validó el método comparando los resultados con los obtenidos en el HPLC.

El contenido de lisina aumentó hasta 36.5 mg/100g al final del proceso de maduración (65 días), analizado por cualquiera de los dos métodos que también se correlacionan muy bien. En este proceso la proteólisis no es tan intensa como en el jamón curado. Los resultados demostraron que el sensor enzimático es una buena alternativa para el análisis de lisina en los embutidos.

En resumen la enzima lisina- α -oxidasa demostró una buena afinidad y especificidad por la lisina, aun en presencia de otros aminoácidos en los extractos cárnicos. El sensor demostró ser útil tanto con la enzima libre como con la enzima inmovilizada para la determinación de lisina, obteniéndose intervalos de medida de entre 200-1.500 μ M; y 10-250 μ M de lisina respectivamente. La membrana con la lisina- α -oxidasa inmovilizada se pudo utilizar solamente una vez.

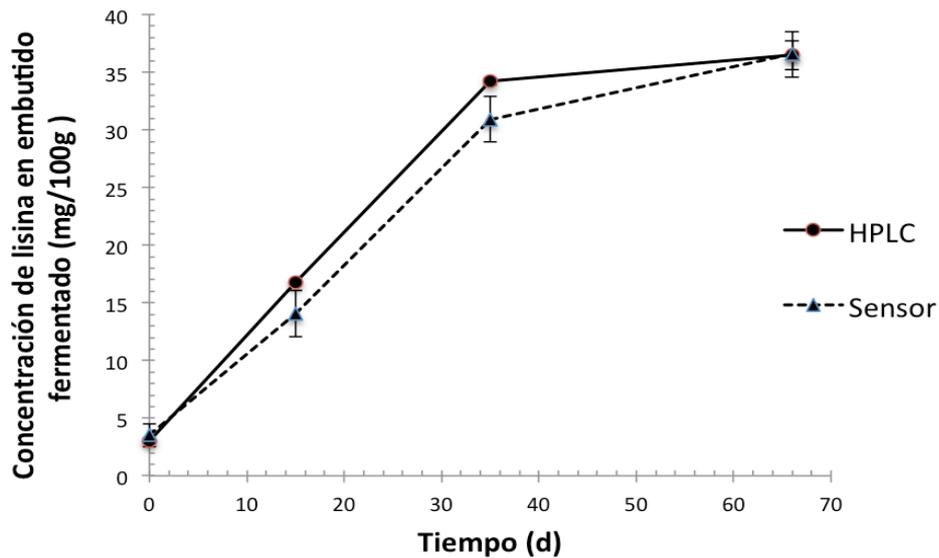


Figura 29. Evolución del contenido de lisina durante el proceso de curado de embutidos analizado por el sensor con enzima inmovilizada y por HPLC.

La linealidad en ambos sensores (libre e inmovilizado) fue cercana a 1 lo que indica niveles de interferencia bajos. El coeficiente de variación en ambos sensores fue menor al 10 %. En base a los resultados presentados se puede considerar a esta técnica como método alternativo para la cuantificación de lisina en muestras de productos cárnicos.

5.2 Sensor Enzimático para el Análisis de Nitrato

La construcción del sensor enzimático se desarrolla de acuerdo a lo descrito en el apartado 4.2.6.2. El principal objetivo de esta sección es evaluar el uso de la nitrato reductasa combinada con el sensor enzimático para cuantificar la cantidad de nitrato en productos cárnicos curados.

Para este fin se seleccionó la nitrato reductasa comercial de *Aspergillus niger* que se describió en el apartado 4.1.2.2. Durante la reacción enzimática en el sensor, se produce una diferencia en el potencial eléctrico (ΔmV), por la transferencia de electrones durante la reducción de NO_3^- a NO_2^- . De este modo, la velocidad de reacción medida como $mV \cdot s^{-1}$, es función de la concentración de sustrato (NO_3^-) y permite la obtención de una recta de calibrado para la cuantificación del nitrato en las muestras.

En la figura 30 se representa la variación de potencial (ΔmV) en función del tiempo de reacción durante la reducción de un patrón de nitrato 1mM (0.1mM en el medio de reacción) en el sistema con la enzima libre en solución. En la curva de evolución se puede observar un primer tramo lineal, útil desde el punto de vista analítico ya que su pendiente se corresponde con la velocidad de reacción ($mV \cdot s^{-1}$) a esa concentración de sustrato y, a medida que avanza la reacción, la curva se va haciendo asintótica, ya que se va agotando el contenido de nitrato y, por lo tanto, disminuye la velocidad de reacción.

En este tipo de sensores es importante considerar posibles interferencias que se pueden presentar con el oxígeno durante la reacción enzimática, ya que éste puede convertirse en un competidor al reducirse junto con el nitrato. Por ello, se han desarrollado diversas alternativas para la eliminación del oxígeno tales como el uso de secuestradores de oxígeno como el sulfito de sodio que reaccionaría con él dando sulfato (De Quan et al., 2005) o el purgado de la solución enzimática con gases inertes como el nitrógeno así como la utilización de pequeños volúmenes durante el ensayo para mantener condiciones de anaerobiosis durante la reacción (Gu et al., 2008; Plumeré 2013). En este trabajo se ha conseguido controlar este problema utilizando pequeños volúmenes de tampón, muestra y/o patrón así como de enzima en el reactor, minimizando así, la interferencia del oxígeno durante la reacción enzimática.

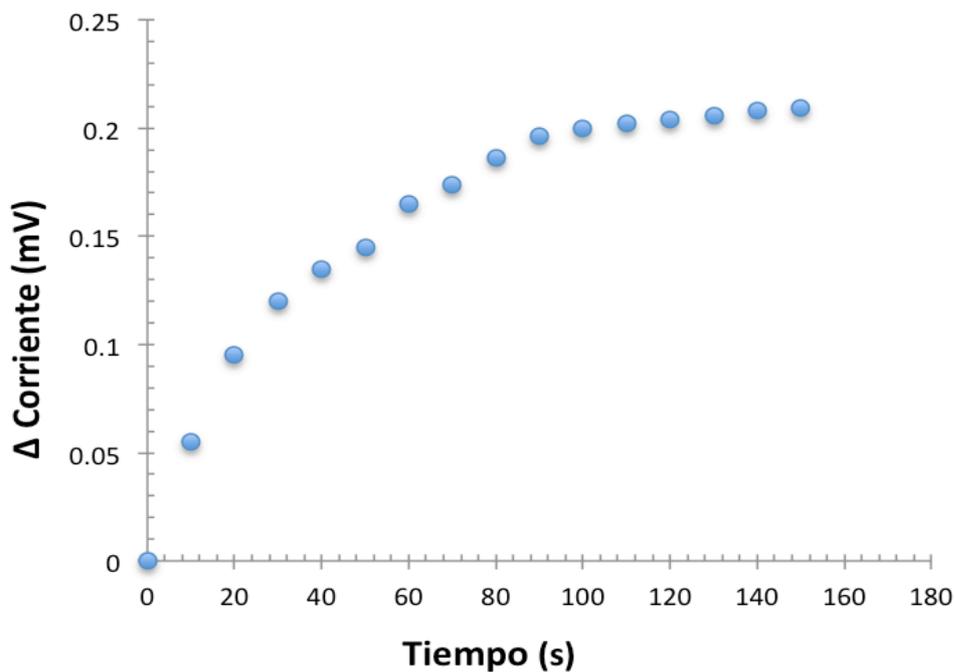


Figura 30. Respuesta del sensor enzimático representada como variación de la corriente en función del tiempo de reacción en presencia de nitrato 0.1mM y 0.64 U de nitrato reductasa, en MOPS 100mM pH 7.1

5.2.1 Sistema Enzimático con la Enzima Libre

En primer lugar se procedió a la optimización de las condiciones como cantidad de enzima, pH, temperatura, y tiempo de respuesta, entre otros, en el sistema con la enzima libre (enzima en solución).

Tras la determinación de la actividad específica de la enzima comercial (Apartado 4.2.6.1) se observó que la adición de 250 μ L de la solución enzimática (Apartado 4.1.2.2), que contenía 0.64 U proporcionaba una señal medible y reproducible.

El pH óptimo del medio de reacción se evaluó en un intervalo de 6.6-7.6 para una concentración 0.1mM de nitrato a 20 °C (Figura 31). La máxima velocidad de reacción se obtuvo a un pH de 7.1, mientras que a valores diferentes la actividad de

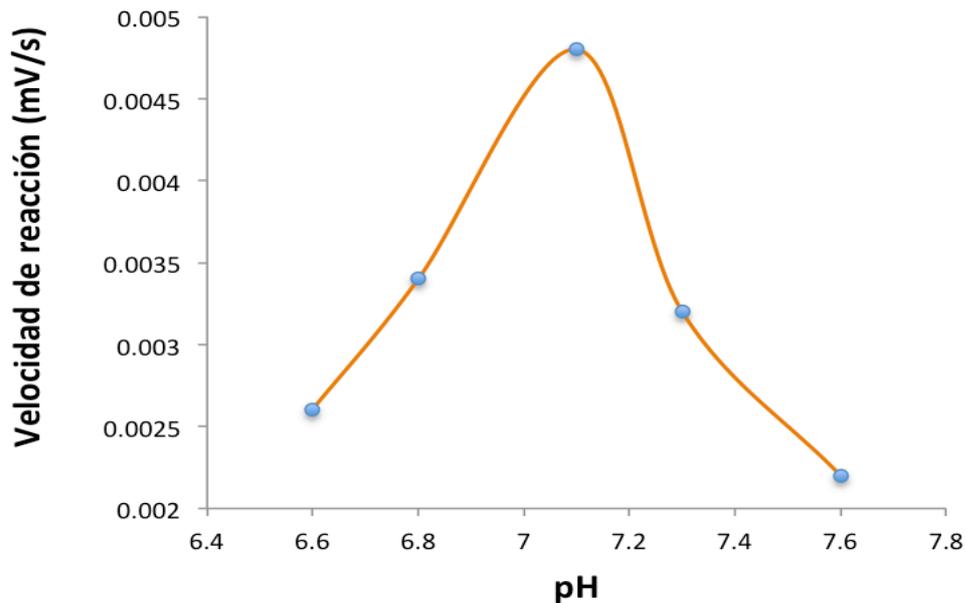


Figura 31. Efecto del pH sobre la velocidad de reacción de la enzima nitrato reductasa, determinado con el sensor enzimático sistema libre a 20 °C.

la enzima disminuyó drásticamente.

La temperatura óptima del sistema se seleccionó tras ensayar diferentes temperaturas; 14, 17, 20, 23, 27 y 33 °C, al pH óptimo 7.1 y observando la actividad enzimática para una concentración 0.1mM de nitrato. Los resultados se muestran en la figura 32. Se observa un máximo de actividad a 20 °C. En estudios recientes con nitrato reductasa de *Aspergillus niger* se ensayaron temperaturas de reacción comprendidas entre 20 y 40 °C, e indicaron que a 40 °C se producía la desnaturalización de la enzima lo cual confirmaría la rápida disminución de actividad a temperaturas mayores a 25 °C (Ntoko y Senwo, 2012).

Con la condiciones optimizadas se obtuvo la recta de calibrado por inyección de series de patrones de nitrato por triplicado, y se fijó el tiempo de respuesta para los análisis en base a la zona lineal de respuesta en 10 s. Ambos ensayos se

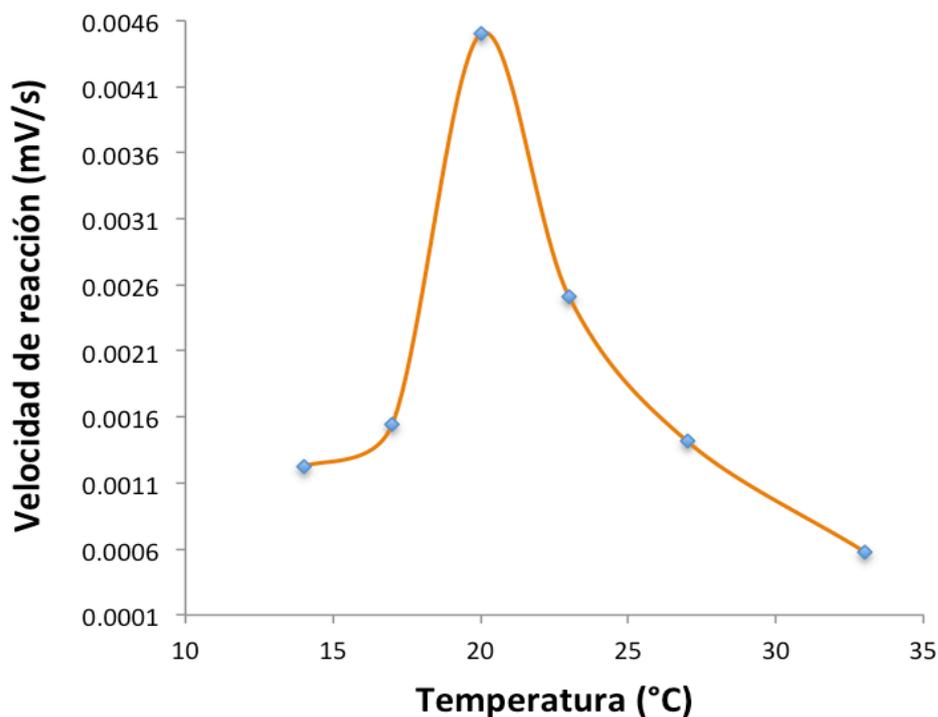


Figura 32. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción de la enzima nitrato reductasa determinado con el sensor enzimático con el sistema libre, a pH 7.1.

muestran en el apartado de validación cuando se hable de linealidad del sensor apartado 5.2.2.2 a.

5.2.2 Mecanismo de Actuación de la Nitrato Reductasa sobre el Nitrato

Con las condiciones de trabajo (pH, temperatura y cantidad de enzima) optimizadas, se estudió la reducción del nitrato (0.15mM) en presencia de la nitrato reductasa como se describió en el apartado 4.2.6.2.1. Así, se tomaron alícuotas de la reacción y se analizaron por HPLC, hasta la desaparición del sustrato, que tuvo lugar a los 70 s de iniciada la reacción (Figura 33).

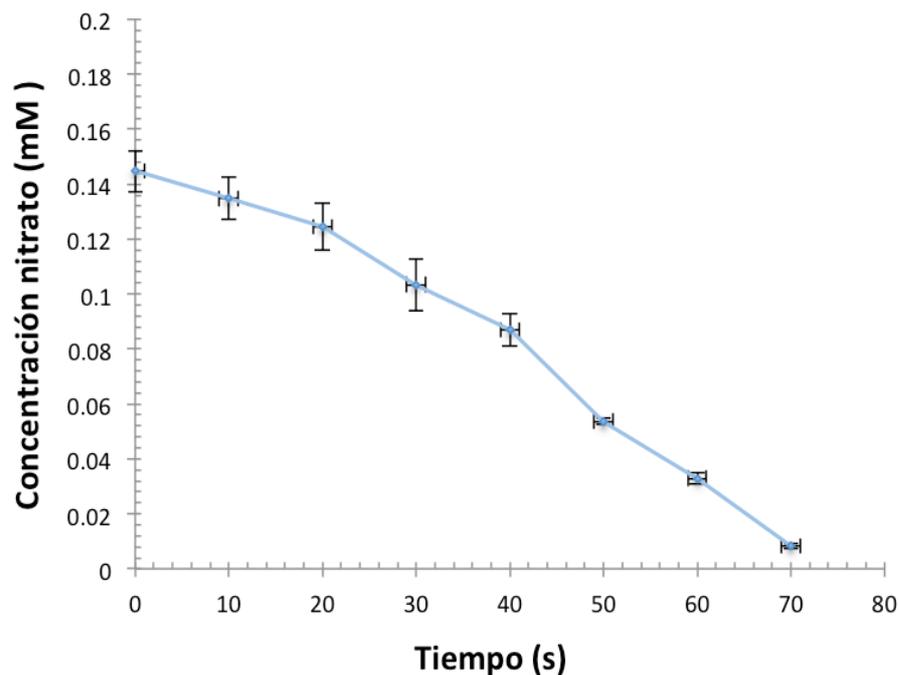


Figura 33. Estudio de la desaparición del nitrato en presencia de nitrato reductasa en su forma libre. El estudio se realizó por triplicado.

5.2.2.1 Estudio de la Cinética Enzimática

El estudio de la cinética enzimática se desarrolló siguiendo el apartado 4.2.6.2.2 y bajo condiciones optimizadas, se obtuvo el valor de la constante K_m utilizando la ecuación de Hanes-Woolf. Para el sistema libre, la K_m fue de 0.11mM (Figura 34). Otros autores (Gilliam et al 1993; Ntoko y Senwo, 2012), describen valores similares de K_m comprendidos en un intervalo entre 0.062 a 0.291mM empleando distintas sales de nitrato como sustrato, lo cual confirma una alta afinidad de esta enzima hacia el sustrato.

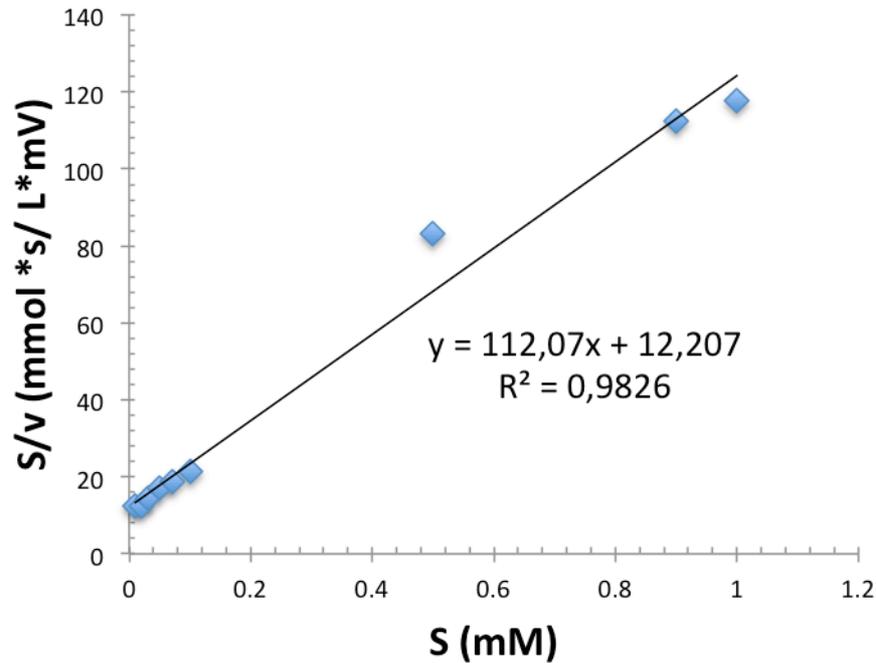


Figura 34. Ecuación de Hanes-Woolf para la obtención de la K_m con la enzima nitrato reductasa libre. $S/v = 1/V_{max} * [S] + K_m/V_{max}$, donde S: concentración de sustrato; v: velocidad de reacción.

5.2.2.2 Ensayos de Validación en el Sistema Libre con el Sensor de Nitrato

Se realizaron los siguientes ensayos de validación:

a) Linealidad.- El estudio de la linealidad del sensor enzimático con la enzima nitrato reductasa libre se desarrolló en las condiciones de uso optimizadas previamente. Para ello, se construyó una recta de calibrado utilizando patrones de nitrato, en un intervalo de concentraciones seleccionadas (apartado 4.2.6.2). El intervalo lineal estuvo en 0.02-0.1mM de nitrato con un valor $R^2 = 0.9961$. El tramo lineal en donde se obtienen los diferentes puntos fue estable, como lo demuestran las barras de error. La reducción completa del nitrato ocurrió durante un período de tiempo de 70 s. Bajo estas consideraciones se obtuvo la recta típica de

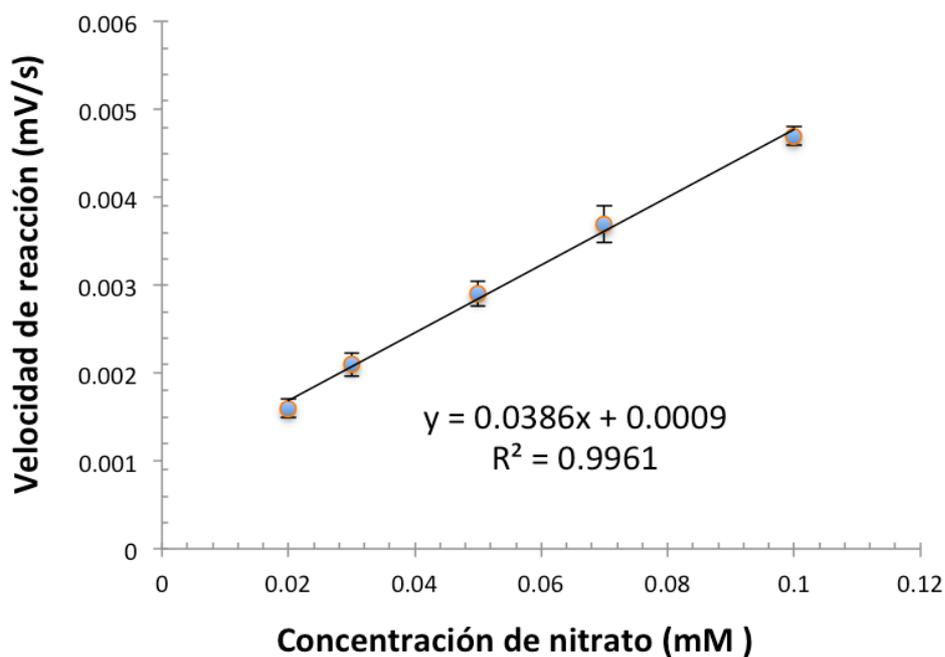


Figura 35. Recta de calibrado de nitrato en el sensor enzimático con la enzima libre. Tiempo de respuesta 10 s. Las barras de error indican la desviación estándar de tres mediciones.

saturación de la enzima en función de la concentración de nitrato (Figura 35).

b) Repetibilidad.- La repetibilidad del análisis de nitrato en el sistema con la enzima libre se determinó por inyecciones sucesivas (n=25) de una disolución patrón de nitrato 0.1mM y de un extracto de jamón tras la etapa de postsalado (2 meses de curado). Los resultados, que se muestran en la tabla 7, reflejan coeficientes de variación de 8.75 y 9.65 % en patrón y muestra, respectivamente. Estos datos reflejan que el efecto de la matriz no fue muy importante.

c) La estabilidad del almacenamiento a 4 °C de la solución enzimática de nitrato reductasa se ensayó repitiendo el análisis (por triplicado en cada análisis) una vez cada 7 días durante 5 semanas (apartado 4.2.8c). Los resultados indican (Figura

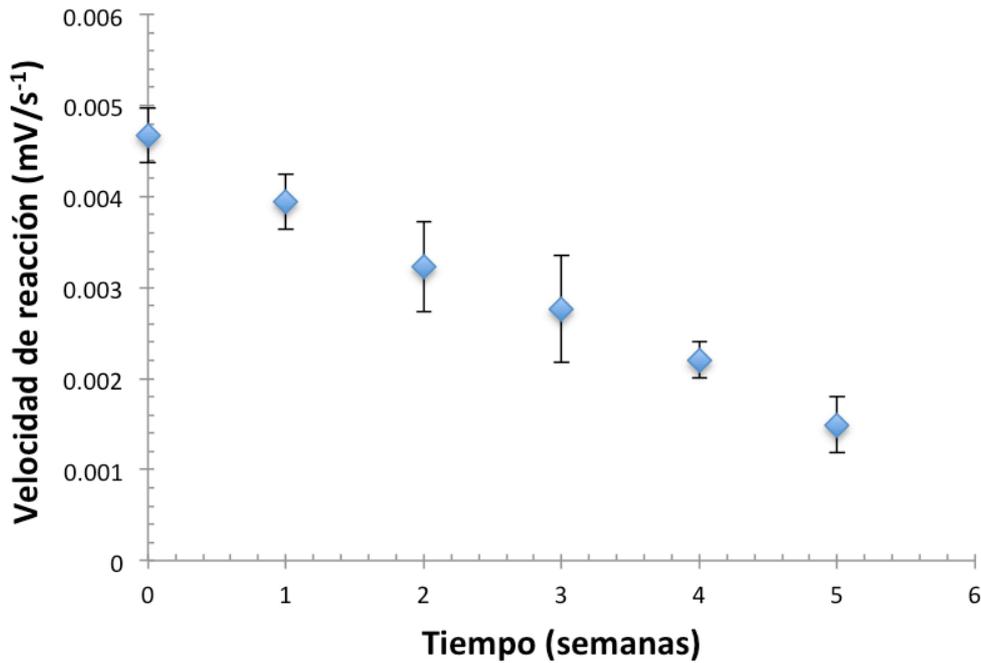


Figura 36. Estabilidad de la nitrato reductasa durante el almacenamiento a 4 °C en solución. Las barras de error indican la desviación estándar de tres repeticiones.

36) que al final de la primera semana se mantuvo el 90 % de su actividad inicial y su vida media fue de 25.5 días.

5.2.3 Sistema con la Enzima Inmovilizada

La inmovilización se realizó por entrecruzamiento de la nitrato reductasa empleando glutaraldehído y unión covalente sobre la membrana preactivada Immunodyne ABC (Nylon 66, con un tamaño de poro de 0.45 μm). El proceso de inmovilización se optimizó para la enzima nitrato reductasa como se hizo con la lisina oxidasa y para ello se ensayó un volumen fijo (8 μL) de distintas concentraciones de glutaraldehído; 2, 4, 6, 8, y 10 % sobre la membrana de nylon.

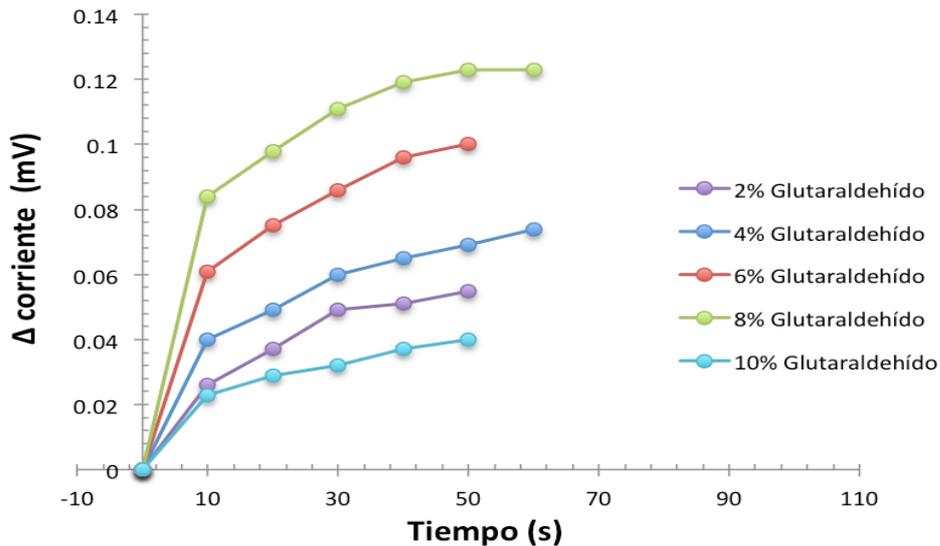


Figura 37. Estudio de la actividad de la nitrato reductasa empleando diferentes concentraciones de glutaraldehído en el sensor enzimático, manteniendo constantes el volumen de la enzima (15 μ L) con una actividad de 0.038 U, y un patrón de nitrato 0.07mM.

Así, se observó que a medida que se incrementaba la concentración de glutaraldehído, mejoraba la actividad de la nitrato reductasa (Figura 37) hasta una concentración del 8%. Concentraciones mayores de glutaraldehído condujeron a una disminución drástica de la respuesta en el sensor probablemente debido a un excesivo entrecruzamiento que afectaba a la actividad de la enzima. Asimismo se optimizó la cantidad de enzima para el proceso de inmovilización utilizando 5, 7, 15, 18 y 20 μ L, de la solución enzimática preparada en el apartado 4.1.2b, que aportaban 0.012, 0.018, 0.038, 0.046, 0.05 U, respectivamente. Los resultados indicaron una actividad óptima cuando se emplearon 15 μ L (0.038 U) de solución enzimática, no observándose mejora por adiciones mayores de enzima.

La temperatura óptima en el sistema inmovilizado fue de 22 °C (Figura 38), algo superior a la encontrada en el sistema libre (20 °C).

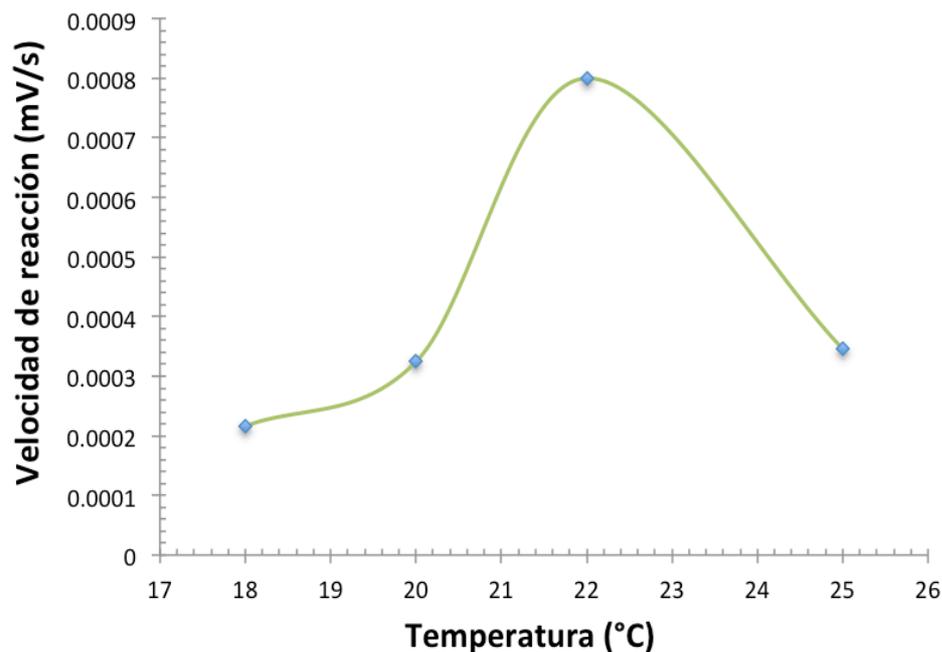


Figura 38. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción de la enzima nitrato reductasa (0.038 U) en el sistema inmovilizado. Patrón de nitrato 0.01mM en tampón MOPS 100mM, pH 7.1.

El pH de la solución de reacción (tampón MOPS, 100mM) se evaluó en un intervalo de 6.5-8.1 frente a la velocidad de reacción de la enzima. El pH óptimo fue 7.1 (Figura 39) coincidiendo en este caso con el óptimo del sistema libre. Valores superiores o inferiores disminuyeron la señal de respuesta y, por tanto, la sensibilidad en la detección para una misma concentración de nitrato.

5.2.3.1 Estudio de la Cinética con la Enzima Inmovilizada

El estudio de la cinética enzimática en el sistema inmovilizado se desarrolló según

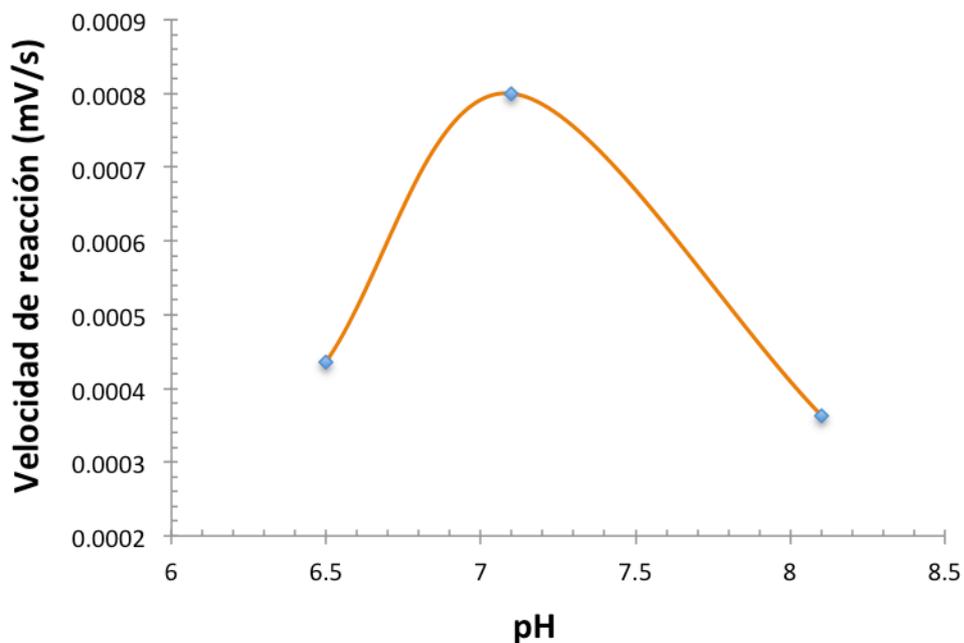


Figura 39. Efecto del pH sobre la velocidad de reacción de la enzima nitrato reductasa, (0.038 U) en el sistema inmovilizado. Patrón de nitrato 0.01mM, en tampón MOPS 100mM, a 22 °C.

se describe en el apartado 4.2.6.2.2. Bajo estas condiciones la $K_{m\text{ap}}$ de la nitrato reductasa resultó ser de 0.23mM (ver figura 40), que indica una buena afinidad de la enzima por el sustrato a pesar de haber sufrido el proceso de inmovilización. Resultados similares de $K_{m\text{ap}} = 0.21\text{mM}$ fueron reportados (Da Silva 2004.)

5.2.3.2 Ensayos de Validación con la Nitrato Reductasa Inmovilizada

Se realizaron los siguientes ensayos de validación:

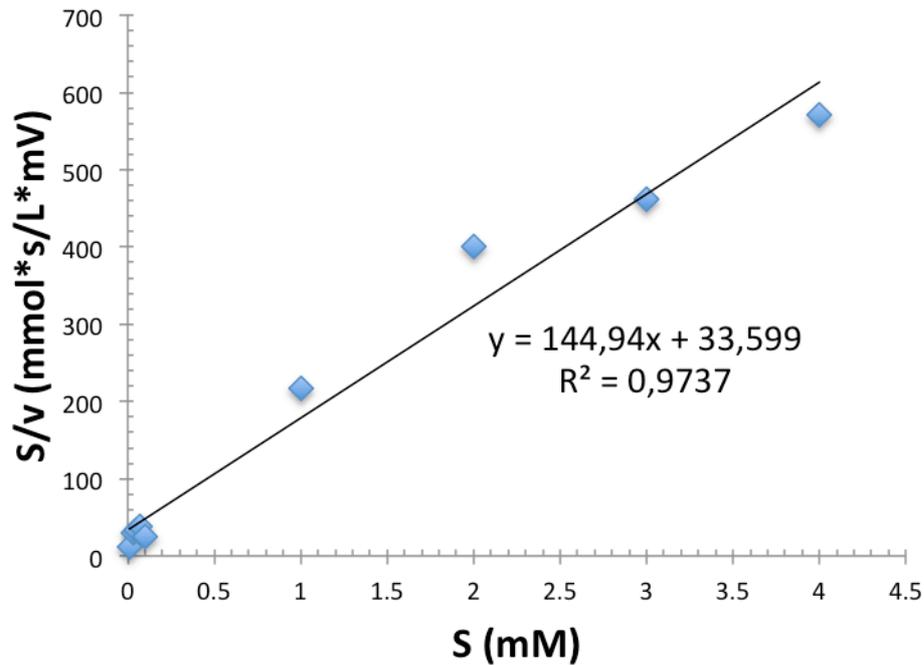


Figura 40. Ecuación de Hanes- Woolf para la obtención de la K_m , con la enzima nitrato reductasa inmovilizada. $S/v=1/V_{max}*[S]+K_m/V_{max}$, donde S: concentración de sustrato; v: velocidad de reacción.

a)Linealidad.- El ensayo de la linealidad se realizó en las condiciones optimizadas mediante la inyección, por triplicado y utilizando una membrana cada vez, de concentraciones crecientes de patrón de nitrato.

Las velocidades de reacción, a los 10 s, obtenidas tras la inyección de las diferentes concentraciones de nitrato se representaran frente a la correspondiente concentración, y se obtuvo el intervalo lineal cuya ecuación de ajuste se corresponde con la recta de calibrado y que estuvo entre 0.01 y 0.07mM de nitrato con un valor $R^2=0.9761$. Los resultados se muestran en la figura 41.

b)Repetibilidad.- Se determinó la repetibilidad por inyección repetida (n=25) de un patrón de nitrato 0.05mM y de un extracto de jamón curado de

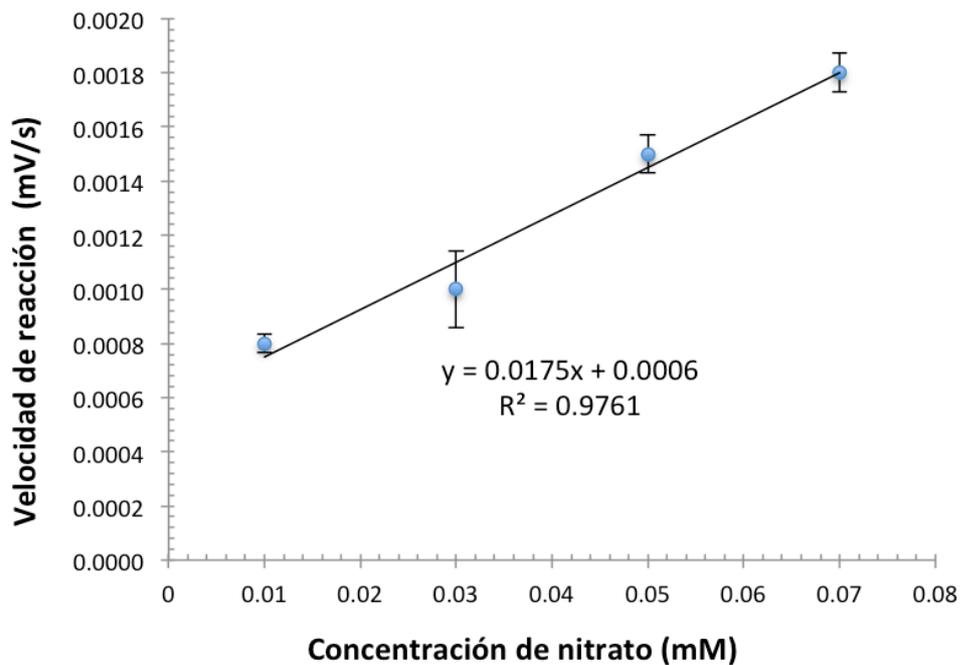


Figura 41. Recta de calibrado de nitrato en el sensor con la enzima nitrato reductasa inmovilizada. Tiempo de respuesta 10 s frente a la concentración de nitrato. Las barras de error indican la desviación estándar de la medida de tres membranas para cada punto.

2 meses. Los coeficientes de variación obtenidos de ambas determinaciones se muestran en la tabla 7. El acetato de celulosa depositado sobre la membrana con la enzima inmovilizada la protegió ante posibles interferencias provenientes de la matriz del jamón, disminuyendo así la variabilidad y la pérdida de sensibilidad (Qiong et al., 1998).

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

Sensor Enzimático		
Parámetro	Sistema con la Enzima Libre	Sistema con la Enzima Inmovilizada
Intervalo Lineal (μM)	20 – 100 ($R^2=0.9961$)	10-70 ($R^2=0.9761$)
Repetibilidad, CV (%)		
Patrón	8.75	5.14
Jamón curado (2m)	9.65	6.49
Estabilidad a 4 °C	La vida media fue de 25.5 días. Mantiene un 90% de su actividad inicial a los 7 días.	La vida media fue de 21.2 días. Mantiene el 90% de su actividad inicial a los 6.6 días.
Correlación con la medida por HPLC (R^2)	0.9983	0.9710

5.2.3.3 Estudio de la Estabilidad de la Nitrato Reductasa Inmovilizada durante el Almacenamiento a diferentes Temperaturas

Se evaluó la estabilidad de la membrana con la enzima inmovilizada y almacenada a diferentes temperaturas 4, 10, 15, 22, y 30 °C. Para el ensayo se colocó la correspondiente membrana en el sensor y tras su estabilización a 22 °C (temperatura de ensayo) se evaluó su actividad analizando un patrón de nitrato 0.05mM (dilución final en el reactor). Al examinar la membrana con la enzima almacenada a 4 °C, no se observó una variación de su actividad antes de los

primeros 6.6 días. Sin embargo, en las membranas almacenadas a mayores temperaturas, los análisis tuvieron que realizarse con una frecuencia mayor debido a que la pérdida de actividad fue rápida. Así, la membrana almacenada a 22 °C, tuvo una vida media de 70 minutos lo que permitía reutilizar las membranas ocho veces. En la tabla 7 se muestran los resultados de estabilidad en almacenamiento a 4 °C de la enzima inmovilizada en la membrana. La vida media fue de 21.2 ligeramente menor si se compara con la enzima libre en solución.

5.2.3.4 Aplicación del Sensor de Nitrato al Análisis de Muestras

De igual forma que con el sensor de lisina, se evaluó la fiabilidad del sensor para el análisis de nitrato en muestras reales. Las mayores concentraciones de nitrato en el jamón se dan tras el salado, con la aplicación de las sales de curado, y durante el post salado, ya que es en esta etapa en la que el nitrato difunde desde el musculo externo "semimembranoso" hacia el interior, llegando al musculo interno Biceps Femoris, que es el que se analiza, ya que lo que buscamos es el control de una correcta penetración. Sin embargo, durante el proceso de difusión y secado, parte del nitrato se transforma en nitrito. El resultado de ambos efectos: penetración del nitrato y reducción a nitrito, se ha estudiado por HPLC a lo largo de todo el proceso (10 meses) de curado de jamón. Los resultados muestran que la máxima concentración de nitrato ocurre a los 2 meses de haber empezado el proceso de curado (Figura 42). A partir de este mes la disminución es gradual hasta prácticamente desaparecer al final del proceso.

Para evaluar la capacidad del sensor para analizar los niveles de nitrato en muestras de jamón, se han utilizado diluciones de extractos de jamón en el postsalado (2 meses de curado). Las muestras se han analizado utilizando el sensor en sus dos formas, libre e inmovilizada, y el método de cromatografía como referencia. Como puede observarse en las figuras 43 y 44, se obtuvo una buena correlación entre

ambos sistemas, libre e inmovilizado, con HPLC, ($R^2= 0.9983$ y 0.9710 , respectivamente), con una pendiente cercana a 1 en ambos sistemas.

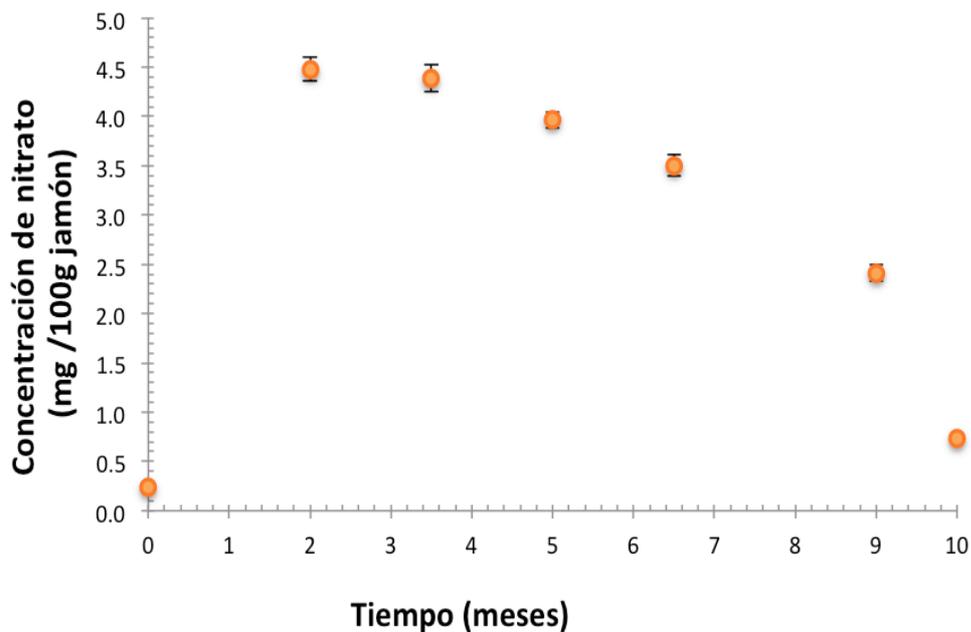


Figura 42. Evolución del contenido de nitrato durante el proceso de maduración en un jamón curado. Las barras de error indican la desviación estándar de la medida de tres muestras.

Estos valores indican que este sensor puede servir de manera fiable como método alternativo a la cromatografía para medir el nitrato presente en las muestras cárnicas. La pendiente cercana a 1 en la correlación indica que no hubo interferencias en las medidas con el sensor, debidas a una posible reducción del oxígeno, o de algún componente de la muestra, simultáneamente al nitrato.

En resumen, el sensor demostró ser útil, tanto en el sistema libre como en el inmovilizado para la detección selectiva del ion nitrato en matrices complejas, obteniéndose intervalos de medida de entre $20\text{-}100\mu\text{M}$; y $10\text{-}70\mu\text{M}$ de nitrato respectivamente.

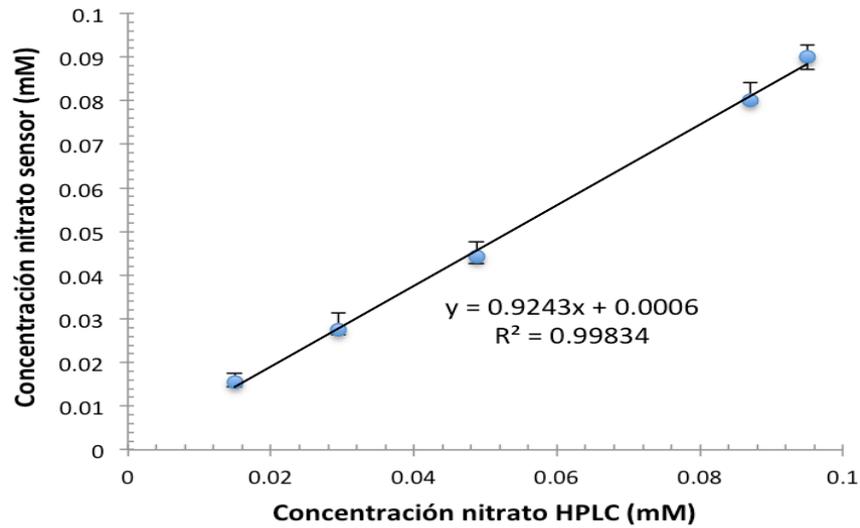


Figura 43. Correlación entre el resultado del análisis de nitrato por HPLC y el sensor enzimático con la nitrato reductasa libre, utilizando diferentes diluciones de un extracto de jamón en el postsalado. Cada punto corresponde a la media de tres determinaciones.

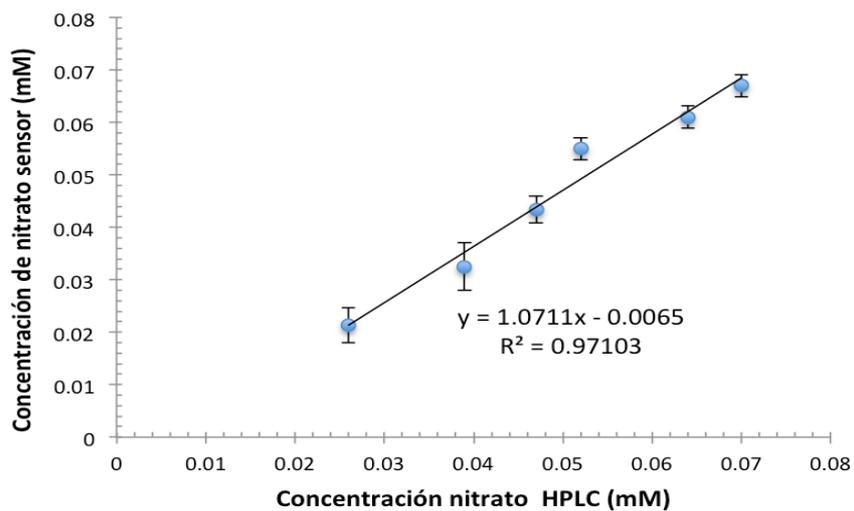


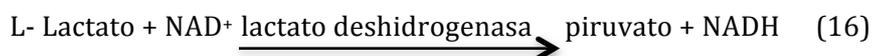
Figura 44. Correlación entre el resultado del análisis de nitrato por HPLC y el sensor enzimático con la nitrato reductasa inmovilizada, utilizando diferentes diluciones de un extracto de jamón en el postsalado. Cada punto corresponde a la media de tres determinaciones.

La membrana con la nitrato reductasa inmovilizada se puede reutilizar hasta 8 veces. El coeficiente de variación fue menor al 10% tanto en el sistema libre como en el inmovilizado. Los resultados fueron comparables con el HPLC por lo que se puede considerar a este sensor como método alternativo para la cuantificación de nitrato en muestras de productos cárnicos.

5.3 Sensor Enzimático para el Análisis de Acido Láctico

El control por monitorización de los parámetros de fermentación de embutidos crudo curados por métodos instrumentales como pueden ser los sensores, implementa la seguridad y rentabilidad en la producción de los mismos. El contenido en azúcares fermentables condiciona el contenido en ácido láctico y el pH de los embutidos que van a ser sometidos a fermentación (Lücke 1994), y puede variar considerablemente dependiendo del origen de la carne, cultivo iniciador usado y de las condiciones del proceso. Es prioritario el control del ácido láctico para una fermentación segura conducida por bacterias acidolácticas que, por un lado bajen el pH impidiendo crecimiento de patógenos sensibles y, por otro, que permitan un desarrollo adecuado de las características organolépticas de color, textura, aroma y sabor asegurando una calidad uniforme.

Para la construcción de un sensor enzimático para ácido láctico, las enzimas que suelen utilizarse como elemento de bioreconocimiento son lactato deshidrogenasa y lactato oxidasa ya que, en ambos casos, tanto la reacción enzimática como el diseño del sensor son sencillos y simples. En el caso de la lactato deshidrogenasa se necesita la presencia de un coenzima que puede ser NADH o NADPH de acuerdo con la siguiente reacción:



Estas coenzimas actúan como mediadores para el transporte de electrones entre la enzima y la superficie del electrodo. Sin embargo, su uso requiere utilizar altos potenciales de oxidación para su regeneración, lo que plantea inconvenientes, no solo en cuanto que añaden parámetros que tienen que ser optimizados, sino además, estos potenciales son origen de interferencias por la oxidación de otros componentes de la matriz de muestra.

Este inconveniente hace que resulte más atractiva la utilización de la lactato oxidasa como enzima de bioreconocimiento para la construcción de sensores amperométricos de ácido láctico (Rassaei et al., 2014). La lactato oxidasa en presencia de oxígeno disuelto cataliza la oxidación del ácido láctico a piruvato produciendo peróxido de hidrógeno como se describió en la ecuación 12. La medida del oxígeno consumido o del peróxido de hidrógeno generado se relaciona así, con la concentración del analito.

La construcción del sensor se desarrolló empleando un sensor amperométrico de acuerdo a lo escrito en el apartado 4.2.7.2. Como en el caso del sensor de lisina- α -oxidasa, el oxígeno forma parte de la reacción y, por tanto, hay que partir de una cantidad de oxígeno tasada y en equilibrio, para poder registrar correctamente su consumo durante la reacción. Así, previo al análisis del ácido láctico, se procedió a saturar la celda de reacción con oxígeno (100% de saturación) y, una vez que un patrón de lactato de sodio (expresado como ácido láctico), o un extracto cárnico (salchichón o chorizo), se inyectan en la celda de reacción del sensor, en presencia de la lactato oxidasa, se produce la oxidación del lactato con el correspondiente consumo de oxígeno. La corriente resultante de la reducción del oxígeno sobre el electrodo de Pt es proporcional a la cantidad de oxígeno consumido (presión parcial de oxígeno) que le llega, y que dependerá de la concentración de ácido láctico presente en la muestra.

En la figura 45, se representa la cantidad de oxígeno consumido ($\text{mg O}_2/\text{L}$), en función del tiempo de reacción durante la oxidación de un patrón de ácido láctico

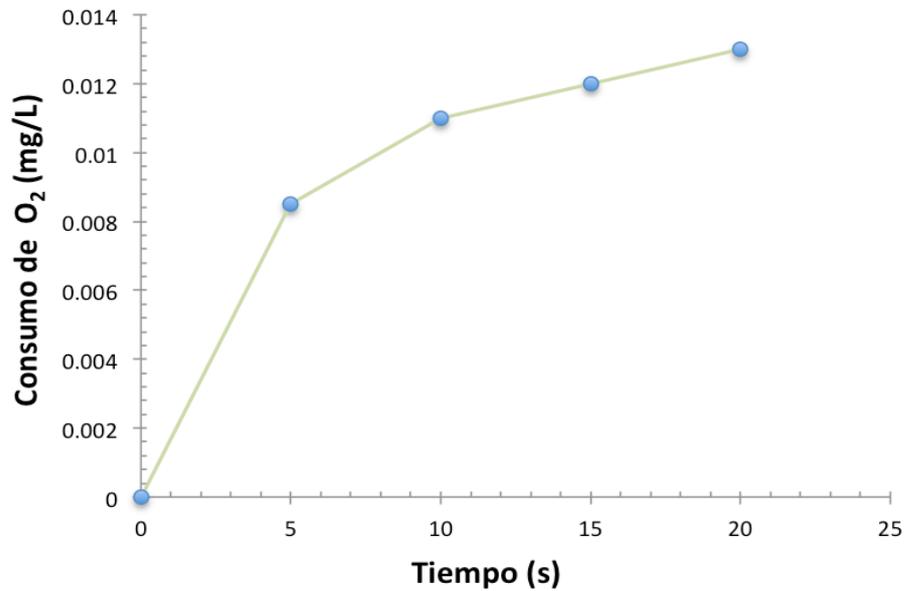


Figura 45. Respuesta del sensor enzimático representada como oxígeno consumido en función del tiempo de reacción en presencia de ácido láctico 0.1mM y 1.01 U de lactato oxidasa, en tampón fosfato potásico (0.1M, pH 7.0) y T=37 °C.

1mM (0.1mM en el medio de reacción), en un sistema con la enzima libre en solución. La curva es característica para este tipo de enzimas, observándose el tramo lineal, útil desde el punto de vista analítico ya que su pendiente se corresponde con la velocidad de reacción ($\text{mg O}_2/\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$), para posteriormente adoptar una forma asintótica por agotamiento del sustrato ácido láctico.

5.3.1 Mecanismo de Actuación de la Lactato Oxidasa sobre el Ácido Láctico

El estudio de la oxidación del ácido láctico por acción de la lactato oxidasa, se realizó según el apartado 4.2.7.2.1. Para ello, se sometió al ácido láctico a la acción

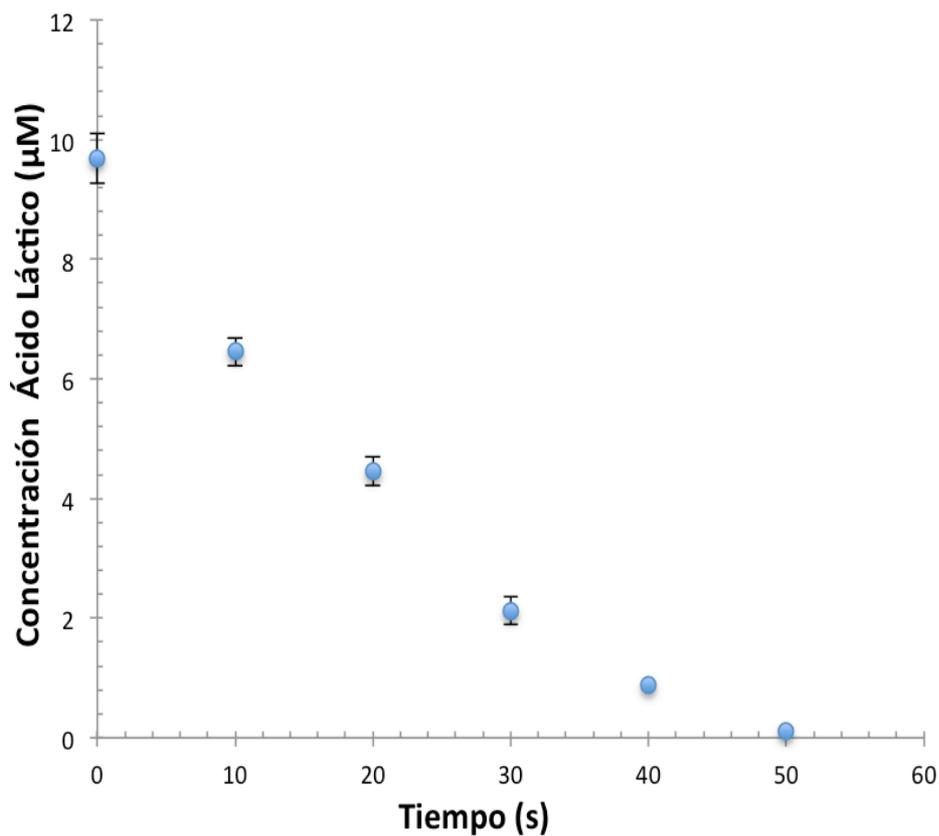


Figura 46. Estudio de la desaparición de ácido láctico a pH 7.0 y 37 °C, en presencia de la lactato oxidasa, utilizando HPLC para la medida del ácido láctico.

de la enzima en las condiciones de pH (7.0) y temperatura (37 °C) obtenidas de la bibliografía (Curto et al., 2014; Casero et al., 2014) y se midió por HPLC (apartado 4.2.4) el avance de la reacción con el tiempo. La desaparición del ácido láctico fue rápida llegando a desaparecer el sustrato después de 50 s de haber empezado la reacción (Figura 46).

5.3.2 Sensor Enzimático con la Enzima Libre

Se procedió a la optimización de las condiciones de ensayo determinando la cantidad de enzima, pH, temperatura y tiempo de respuesta con el sistema libre.

La actividad de la solución enzimática de lactato oxidasa (apartado 4.1.2.c), calculada como se describe en el apartado 4.2.7.1, era de 10.1 U/mL. Con este valor se determinó la cantidad de enzima a utilizar adicionando diferentes volúmenes de la solución enzimática hasta obtener una respuesta adecuada, a una concentración de sustrato (ácido láctico) 0.1mM . La señal fue detectable, estable, y reproducible cuando se utilizaron 100 μ L de la solución enzimática, es decir, 1.01 U de enzima (no se muestran los resultados).

El pH óptimo del medio de reacción se evaluó en un intervalo de 6.5-8.5, empleando la cantidad óptima de enzima (1.01 U) y 0.1mM de ácido láctico, a 31 °C, los resultados se muestran en la figura 47. La máxima velocidad de reacción se obtuvo a un pH 7.0, perdiendo de manera significativa la actividad cuando nos alejamos de este pH.

La temperatura óptima de reacción para este sensor, se evaluó ensayando diferentes temperaturas; 20, 23, 25, 31, 34, y 37 °C, al pH óptimo de 7.0, y observando la velocidad enzimática ante una concentración 0.1mM de ácido láctico y 1.01 U de enzima. Los resultados (Figura 48), indican que la actividad fue óptima a los 31 °C, disminuyendo mucho al alejarnos de esta temperatura.

5.3.3 Estudio de la Cinética Enzimática

El estudio de la cinética enzimática se realizó como se describe en el apartado 4.2.7.2.2. En las condiciones previamente optimizadas se obtuvo el valor de la constante de Michaelis Menten (K_m) utilizando la ecuación de Hanes-Woolf y que fue de 0.12mM (Figura 49), lo cual indica una alta afinidad

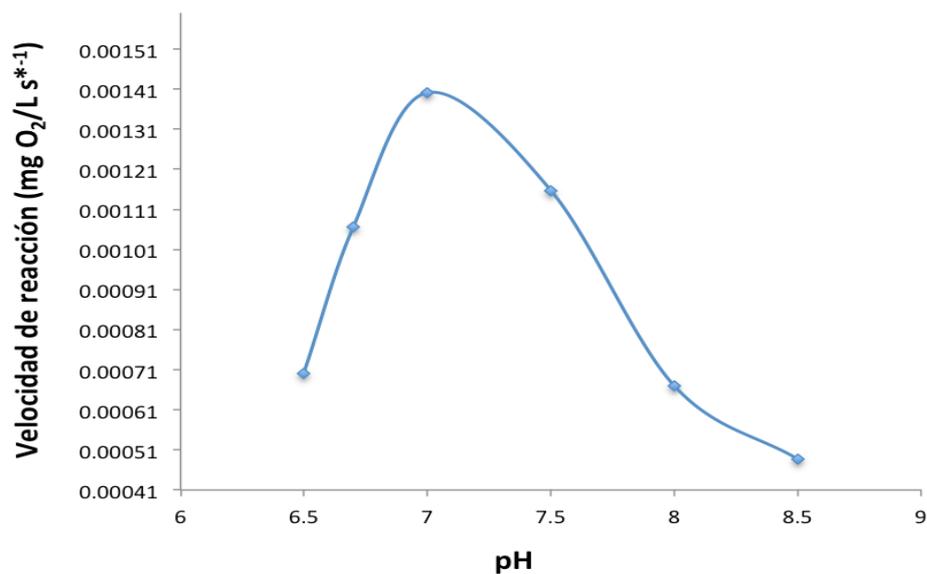


Figura 47. Efecto del pH sobre la velocidad de reacción de la enzima lactato oxidasa determinado en el sensor enzimático con la enzima libre. Patrón de ácido láctico 0.1mM, en tampón fosfato potásico 0.1M, a 31 °C.

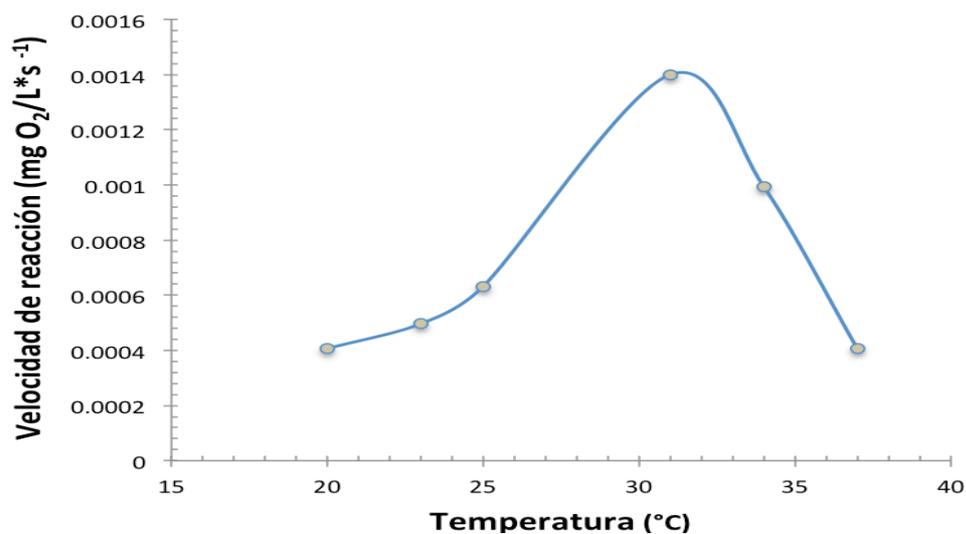


Figura 48. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción de la enzima lactato oxidasa determinado con el sensor enzimático con la enzima libre. Patrón ácido láctico 0.1mM en tampón fosfato potásico 0.1M a pH 7.0.

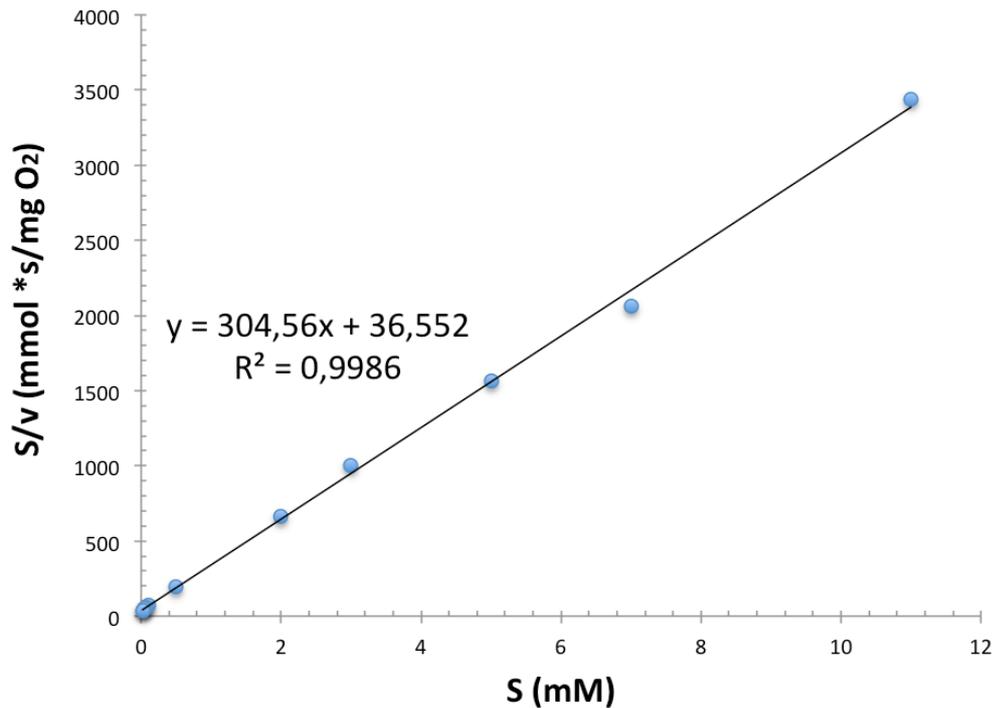


Figura 49. Ecuación de Hanes-Woolf para la obtención de la K_m , con la enzima lactato oxidasa libre. $S/v = 1/V_{max} * [S] + K_m/V_{max}$, donde S: concentración de sustrato; v: velocidad de reacción.

de esta enzima por el sustrato.

5.3.4 Ensayos de Validación

Se realizaron los siguientes ensayos de validación:

- Linealidad: Con las condiciones óptimas descritas previamente, se obtuvieron las curvas de respuesta a distintas concentraciones de ácido láctico, y a partir de ellas se seleccionó el tiempo óptimo de respuesta en base a la zona lineal de dichas curvas y se determinaron las velocidades de reacción para cada concentración de ácido láctico por triplicado. La representación gráfica de las pendientes frente a la respectiva concentración de ácido láctico

permite obtener, por el método de mínimos cuadrados, la recta de calibración y la determinación del rango lineal del sensor. El tiempo de respuesta se fijó en 5 s, y el intervalo lineal fue desde 0.03 a 0.3 mM de ácido láctico.

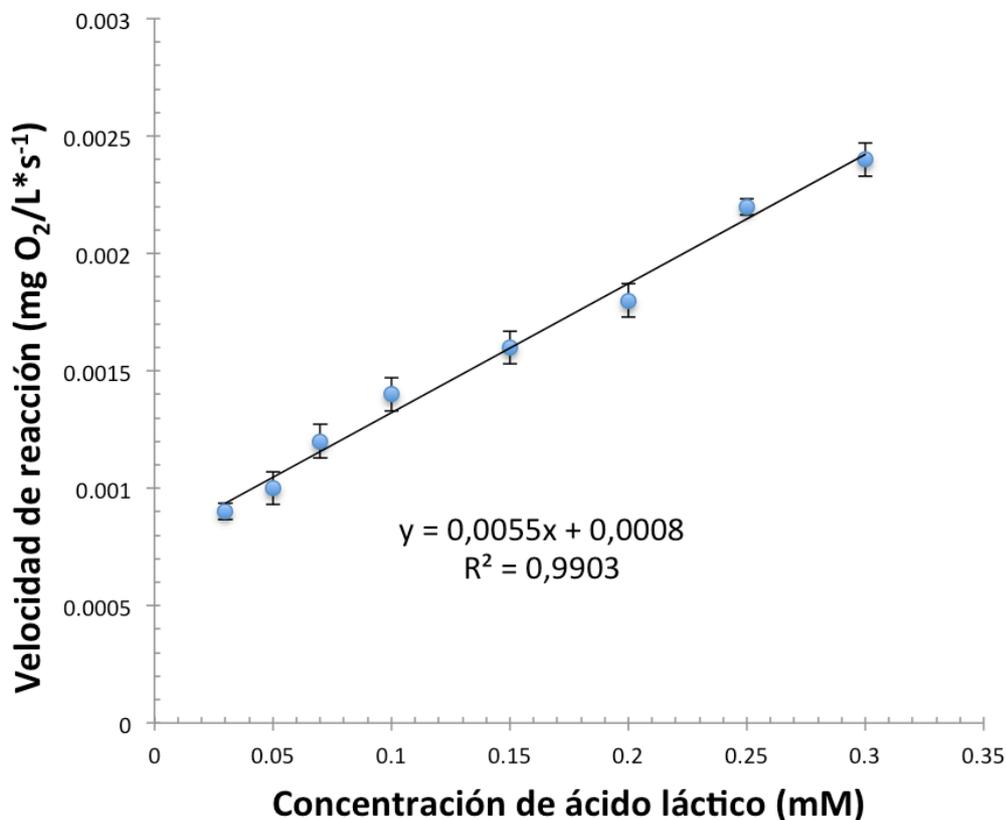


Figura 50. Recta de calibrado de ácido láctico en el sensor enzimático con la enzima libre. Tiempo de respuesta 5 s frente a la concentración de ácido láctico. Las barras de error indican la desviación estándar de la medida de tres repeticiones.

La recta obtenida fue muy reproducible como puede observarse en la figura 50. La sensibilidad de detección del sensor enzimático ante concentraciones elevadas de ácido láctico (> de 0.3 mM) puede verse afectado por la propia concentración de ácido láctico, inhibiendo la enzima por exceso de sustrato o

producto formado (H_2O_2), o por el limitante del oxígeno en el medio. Así, lecturas superiores a 0.012 mg/L de oxígeno consumido o velocidades de reacción mayores de 0.024 mg $O_2/L \cdot s^{-1}$ sugieren un exceso de ácido láctico y la muestra de extracto cárnico debe ser diluida para adecuarse al intervalo lineal de detección.

- b) Repetibilidad.- Este parámetro se determinó por inyección repetida (n=25) tanto del patrón de ácido láctico 0.1 mM como de un extracto de salchichón y chorizo, respectivamente. Los resultados se muestran en la tabla 8 y muestran coeficientes de variación de 5.24, 6.24 y 7.12%, respectivamente.

La variabilidad observada al analizar muestras, en relación a la obtenida al analizar la disolución patrón fue algo superior, aunque sigue siendo un valor de CV bajo (<8% en cualquier caso). Esto indica que la matriz no afectó de manera importante a la medida del ácido láctico en las muestras.

- c) Estabilidad.- La lactato oxidasa no fue muy estable durante el almacenamiento a 4 °C ya que la enzima presentó una vida media muy corta, que fue de 3.2 días (Figura 51).

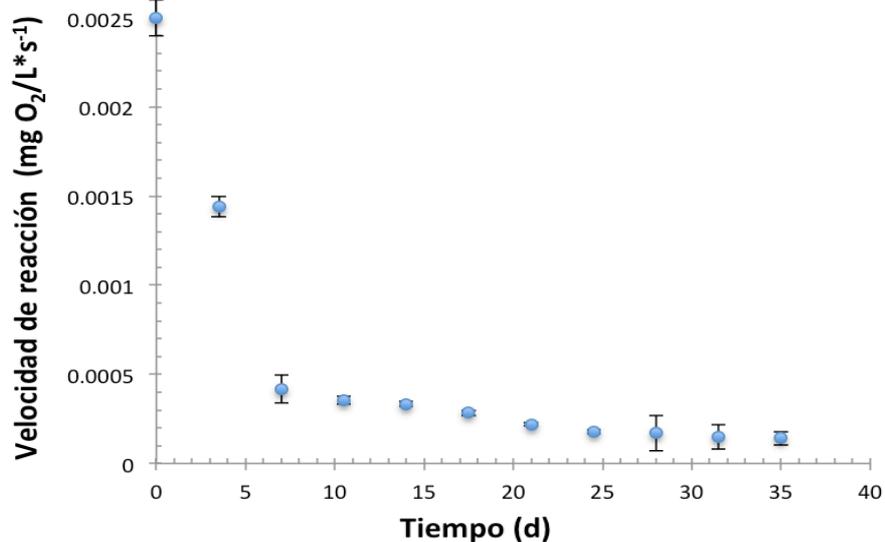


Figura 51. Estabilidad de la lactato oxidasa en solución. Almacenamiento a 4°C. Las barras de error indican la desviación estándar de 3 repeticiones.

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

Parámetro	Sistema con la enzima Libre
Intervalo Lineal (μM)	30 – 300 ($R^2=0.9903$)
Repetibilidad, CV (%)	
Patrón ácido láctico	5.25
Salchichón	6.24
Chorizo	7.12
Estabilidad a 4°C	La vida media fue de 3.2 días. Mantiene el 90 % de la actividad inicial a las 21.6 horas.
Correlación con la medida por HPLC (R^2)	0.9869

5.3.5 Aplicación del Sensor de Acido Láctico al Análisis de Muestras

Para evaluar la fiabilidad del sensor enzimático de lactato oxidasa en sistema libre para el análisis de ácido láctico en muestras reales de extractos de embutidos curados (salchichón y chorizo), se utilizó el sensor y el método HPLC como referencia (apartados 4.2.7 y 4.2.4). Como puede verse en la figura 52, se obtuvo una buena correlación entre ambos, con un valor $R^2= 0.9870$ y una pendiente cercana a 1. Estos valores indican que no existen interferencias en la medida con el sensor, lo que hace de él un método fiable como alternativa a la cromatografía para la medida de ácido láctico en embutidos curados.

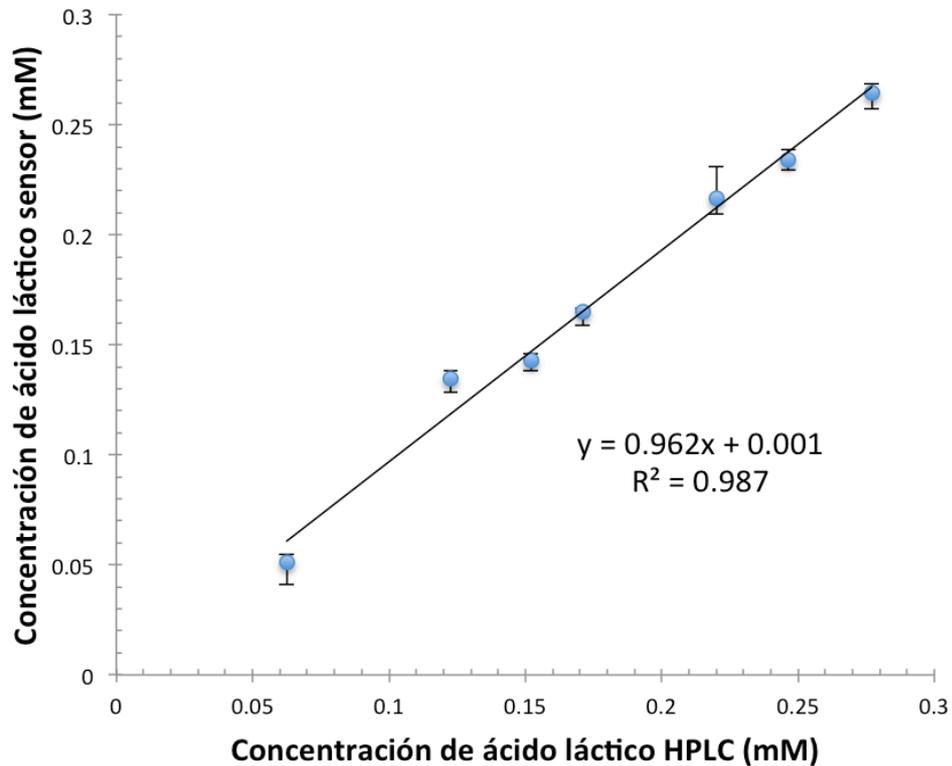


Figura 52. Correlación entre los contenidos de ácido láctico en salchichón obtenidos con el sensor enzimático con el sistema libre y por HPLC. El estudio se realizó por triplicado.

El análisis de ácido láctico por medio de sensores enzimáticos se ha propuesto como método de control de productos cárnicos fermentados (Lücke 1994), pero también para la medida de lactato como indicador de desarrollo de anaerobiosis en carnes de ternera recién sacrificada (Hart et al., 1999). En este último caso, el sensor desarrollado disponía la enzima embebida en una matriz (copolímero de polivinil pirrolidona y metacrilato) que aumentó en gran medida la estabilidad de la enzima, aunque la variabilidad de las medidas fue alta y no muy fiable en relación a las concentraciones de lactato obtenidas con un método espectrofotométrico de referencia (Wahlefeld 1983).

En este sentido en el presente trabajo se ha optimizado la determinación de ácido láctico en muestras reales con un sensor amperométrico que utiliza la enzima

lactato oxidasa libre. La respuesta fue lineal en un intervalo de concentración de entre 30 y 300 μM de ácido láctico con un coeficiente de variación menor al 8%. Los resultados obtenidos fueron comparables con el método de referencia, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), demostrado así su utilidad para el control de ácido láctico en la fermentación de la carne y de los embutidos curados.

6. Conclusiones

6. CONCLUSIONES

1) El sensor enzimático basado en la lisina- α -oxidasa resultó ser una técnica válida para la cuantificación de la lisina como índice de la proteólisis para el control del tiempo de curado de jamón y embutidos. En el sistema optimizado, la enzima actuó de manera específica sobre la lisina, no observándose interferencias por la presencia de otros aminoácidos.

El sistema con la enzima inmovilizada resultó más sensible que el sistema con la enzima libre.

Los resultados obtenidos tanto con el enzima libre como inmovilizada cuando se analiza lisina en jamones y en embutidos curados fueron comparables ($R^2 > 0.99$) a los obtenidos por cromatografía (HPLC) como método de referencia.

2) El sensor enzimático basado en la nitrato reductasa con la enzima inmovilizada demostró ser útil en la cuantificación de nitrato en muestras de jamón curado para el control del nitrato residual en producto terminado. Los resultados fueron similares a los obtenidos con el método de referencia HPLC ($R^2 > 0.97$). La posibilidad de reutilización de la membrana hasta ocho veces, hace que este método sea rentable y muy rápido.

3) El sensor enzimático basado en la lactato oxidasa libre resultó ser válido para la cuantificación de ácido láctico como parámetro para el control de la fermentación de embutidos curados. Los resultados obtenidos con el sensor se correlacionaron bien con los obtenidos con el método de referencia HPLC ($R^2 > 0.96$).

7. Bibliografía

7. BIBLIOGRAFIA

Angeloni, R., Tomassetti, M., Castrucci, M., Campanella, L. 2015. Ethanol Determination in Alcoholic Beverages Using Two Different Amperometric Enzyme Sensors. *Current Analytical Chemistry*, 11, 56-67.

Aristoy, M.C., Mora, L., Toldrá, F. 2015. Histidine containing dipeptides: Properties and occurrence in food. In: *Encyclopedia of Food and Health 1st Edition*. Eds. Caballero, B., Finglas, P., Toldrá, F. en prensa. Elsevier Ltd.

Armenteros, M., Aristoy, M.C., Toldrá, F. 2009. Effect of sodium, potassium, calcium and magnesium chloride salts on porcine muscle proteases. *European Food Research and Technology* 229: 93-98.

Armenteros, M., Toldrá, F., Concepción Aristoy, M., Ventanas, J., Estévez, M. 2012. Effect of the Partial Replacement of Sodium Chloride by Other Salts on the Formation of Volatile Compounds during Ripening of Dry-Cured Ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7607-7615.

Armero, E., Flores, M., Toldrá, F., Barbosa, J-A., Olivet, J., Pla, M., Baselga, M. 1999. Effects of pig sire type and sex on carcass traits, meat quality and sensory quality of dry-cured ham. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Volume 79, 1147-1154

Arnau, J., Guerrero, L., Sárraga, C. 1998. The effect of Green Ham pH and NaCl Concentration on Cathepsin Activities and the Sensory Characteristics of Dry -cured Hams. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77, 387-392.

Bibliografía

Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España [en línea]. Dirección URL: <http://www.anice.es/v_portal/informacion/informacionver.asp?cod=9776&te=7&idage=11909&vap=0&npag=1>

[Consulta: 10 Abril 2015]

Ayarza N., Góngora, J., Alonso, R. 2015. Quality Control of Industrial Fluorinated inorganic Acids by ion Chromatography. *Analytical Letters*, 48: 1367-1379.

Barat, J.-M., Pérez-Esteve, E., Aristoy, M-C., Toldrá, F. 2013. Partial replacement of sodium in meat and fish products by using magnesium salts. A review. *Plant Soil*, 368:179-188.

Ben Rejeb, I., Arduini, F., Amine, A., Gargouri, M., Palleschi, G. 2007. Amperometric biosensor based on Prussian Blue-modified screen-printed electrode for lipase activity and triacylglycerol determination. *Analytica Chimica Acta* 594, 1-8.

Berdagué, J.L., Monteil, P., Montel, M.C., Talon, R. 1993. Effects of Starter Cultures on the Formation of Flavour Compounds in Dry Sausage. *Meat Science* 35, 275-287.

Bianchi, E., Bruschi, R., Draisci, R., Lucentini, L. 1995. Comparison between ion chromatography and a spectrophotometric method for determination of nitrates in meat products. *Z Lebensm Unters Forsch*, 200:256-260

Bóka, B., Korózs, M., Nánási, M., Adányi, N. 2015. Novel Amperometric Tri-Enzyme Biosensor for Lysine Determination in Pharmaceutical Products and Food Samples. *Electroanalysis*, 27, 817-824.

Bolumar, T., Sanz, Y., Aristoy, M-C, Toldrá, F. 2005. Protease B from *Debaryomyces hansenii*: purification and biochemical properties. *International Journal of Food Microbiology*. 98, 167- 177.

Bolumar, T., Sanz, Y., Aristoy, M-C., Toldrá, F. 2006. Protease (PrA and PrB) and prolyl and arginyl aminopeptidase activities from *Debaryomyces hansenii* as a function of growth phase and nutrient sources. *International Journal of Food Microbiology* 107, 20- 26.

Bori, Z., Csiffáry, G., Virág, D., Tóth-Markus, M., Kiss, A., Adányi, N. 2012. Determination of L-Lactic Acid Content in Foods by Enzyme-Based Amperometric Bioreactor. *Electroanalysis* vol.:24 núm.:1 pág.: 158-164

Bover-Cid, S., Schoppen, S., Izquierdo- Pulido, M. & Vidal- Carou, M.C. 1999. Relationship between biogenic amine contents and the size of dry fermented sausages. *Meat Science*. 51, 305-311.

Cao, S., Zhang, L., Chai, Y., Yuan, R. 2013. Electrochemistry of cholesterol biosensor based on a novel Pt-Pd bimetallic nanoparticle decorated grapheme catalyst. *Talanta* 109, 167-172.

Carrasco, S., Benito-Peña, E., Walt, D., Moreno-Bondi, M. 2015. Fiber-optic array using molecularly imprinted microspheres for antibiotic analysis. *Chemical Science* 6, 3139-3147.

Casaburi, A., Aristoy, M-C., Cavella, S., Di Monaco, R., Ercolini, D., Toldrá, F., Villani, F. 2007. Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of

Vallo di Diano (Southern Italy) as affected by the use of starter cultures. *Meat Science* 76, 295-307.

Casero, E., Alonso, C., Petit-Domínguez, MD., Vázquez, L., Parra-Alfambra, AM., Merino, P., Alvarez-Garcia, S., De Andres, A., Suárez, E., Pariente, F., Lorenzo, E. 2014. Lactate biosensor based on a bionanocomposite composed of titanium oxide nanoparticles, photocatalytically reduced graphene, and lactate oxidase. *Microchimica Acta*, 181, 79-87.

Conrado Moreno, V., Cabello, P., Martínez-Luque, M., Blasco, R., Castillo, F. 1999. Prokaryotic Nitrate Reduction: Molecular Properties and Functional Distinction among Bacterial Nitrate Reductases. *Journal of Bacteriology*, 181, 6573-6584

Córdoba J.J., Antequera, T., Garcia, C., Ventanas, J., López, C., Asensio, A. 1994. Evolution of free aminoacids and amines during ripening of Iberian cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 2296-2301.

Coutron-Gambotti, C., Gandemer, G. 1999. Lipolysis and oxidation in subcutaneous adipose tissue during dry- cured ham processing. *Food Chemistry* 64, 95-101.

Curto, V., Scheuermann, S., Owens, R., Ranganathan, V., MacFarlane, D., Benito Lopez, F., Diamond, D. 2014. Probing the specific ion effects of biocompatible hydrated choline ionic liquids on lactate oxidase biofunctionality in sensor applications. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16, 1841-1849.

- Curulli, A., Kelly, S., O'Sullivan, C., Guilbault, G.G., Palleschi, G. 1998. A new interference-free lysine biosensor using a non-conducting polymer film. *Biosensor & Bioelectronics* 13, 1245-1250.
- Chaubey, A. & Malhotra, B. D. 2002. Mediated biosensor. *Biosensors and Bioelectronic*. 17, 441-456.
- Chauhan, N., Narang, J., Sunny., Pundir, C.S. 2013. Immobilization of lysine oxidase on a gold-platinum nanoparticles modified Au electrode for detection of lysine. *Enzyme and Microbial Technology* 52, 265-271.
- Chen, R.L.C., Lee, M-H., Matsumoto, K. 1996. Selective Biosensing of L-Lysine by a Low-Temperature Flow- Injection Technique Using an Immobilized Lysine Oxidase Reactor. *Analytical Sciences*, Vol.12.
- Da Silva, S., Shan, D., Cosnier, S. 2004. Improvement of biosensor performances for nitrate determination using a new hydrophilic poly (pyrrole- viologen) film. *Sensors and Actuators B*, 103, 397-402.
- Della Betta, F., Vitali, L., Fett, R., Oliviera Costa, AC. 2014. Development and validation of a sub-minute capillary zone electrophoresis method for determination of nitrate and nitrite in baby foods. *Talanta*. 122, 23-29.
- Demeyer, D., Raemaekers, M., Rizzo, A., Holck, A., De Smedt, A., et al. 2000. Control of bioflavour and safety in fermented sausages: first results of a European project. *Food Research International* 33, 171-180.

Dempsey, E., Wang, J., Wollenberger, U., Ozsoz, M. 1992. A lysine dehydrogenase-based electrode for biosensing of L-lysine. *Biosensors & Bioelectronics*, 7, 323-327.

De Mey, E., De Klerck, K., De Maere, H., Dewulf, L., Derdelinckx, G., Peeters, M-C., Fraeye, L., Vander Heyden, Y., Paelinck, H. 2014. The occurrence of N-nitrosamines, residual nitrite and biogenic amines in commercial dry fermented sausages and evaluation of their occasional relation. *Meat Science*, 96, 821-828.

De Quan, Ho Shim, J., Dae Kim, J., Soo Park, H., Sig Cha, G., Nam, H. 2005. Electrochemical Determination of Nitrate with Nitrate Reductase- Immobilized Electrodes under Ambient Air. *Analytical Chemistry*. 2005, 77, 4467-4473.

De Sena Aquino, A.C., Stremel Azevedo, M., Baggio Ribeiro, D., Oliveira Costa, A.C., Regina Amante, E. 2015. Validation of HPLC and CE methods for determination of organic acids in sour cassava starch wastewater. *Food Chemistry* 172, 725-730.

Diallo, A.K., Djeghlaf, L., Mazenq, L., Launay, J., Sant, W., Tempe-Boyer, P. 2013. Development of pH-based ElecFET biosensors for lactate ion detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 40, 291-296.

Di Fusco, M., Tortolini, C., Deriu, D., Mazzei, F. 2010. Laccase-based biosensor for the determination of polyphenol index in wine. *Talanta* 81, 235-240.

Dornelles Mello, L., Kubota, L-T. 2002. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry* 77, 237-256.

Durá, M.A., Flores, M., Toldrá, F. 2004. Effect of *Debaryomyces* spp. on the proteolysis of dry-fermented sausages. *Meat Science* 68, 319, 328.

Dzyadevych, S.V., Arkhypova, V.N., Soldatkin, A.P., El'skaya, A.V., Martelet, C. & Jaffrezic- Renault, N. 2008. Amperometric enzyme biosensors: Past, present, and future. *ITBM-RBM*. 29, 171-180.

Earnshaw, W. 1999. Apoptosis: A cellular poison cupboard. *Nature* 397, 387-389.

EFSA Journal 2010. Statement on nitrites in meat products. 8(5): 1538.

Eggs, B. 2002. Chemical sensor and biosensor. Ed. John Wiley & Sons Ltd. England. 291p.

Endo, H., Hayashi, Y., Kitani, Y., Ren, H., Hayashi, T., Nagashima, Y. 2008. Optical enzyme sensor for determining L- lysine content using L-lysine oxidase from the rockfish *Sebastes schlegeli*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391: 1255- 1261

Escudero, E., Concepción Aristoy, M., Nishimura, H., Arihara, K., Toldrá, F. 2012. Antihypertensive effect and antioxidant activity of peptide fractions extracted from Spanish dry-cured ham. *Meat Science* 91, 306-311.

Estévez, M., Morcuende, D. & Ventanas, S. 2009. Determination of oxidation. In: *Handbook of processed meats and poultry analysis*. Eds. L.M.L. Nollet and F. Toldrá. pp 141-162. CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Ratón, FL, USA.

Fadda, S., Sanz, Y., Vignolo, G., Aristoy, MC., Oliver, G., Toldrá, F. 1999. Characterization of muscle sarcoplasmic and myofibrillar protein hydrolysis caused by *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3540-3546.

Bibliografía

Falck, D. 1997. Amperometric oxygen electrodes. *Current Separations*. 16,19-22.

FAO "Documento técnico de pesca 1999" [en línea]. Dirección URL:
<<http://www.fao.org/docrep/v7180s/v7180s00.htm#Contents>>
[Consulta : 10 Mayo 2015]

Flores, M., Romero, J., Aristoy, M.C., Toldrá, F. 1994. Differences in muscle proteolytic activities among pork breed types. *Food Science & Technology*, vol 14, Issue:4, 469-474

Flores, M., Alasnier, C., Aristoy, M.C., Navarro, J.L., Gandemer, G., & Toldrá, F. 1996. Activity of aminopeptidase and lipolytic enzymes in five skeletal muscles with various oxidative patterns. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 70, (1), 127- 130.

Flores, M., Aristoy, M.C., & Toldrá, F. 1997a. Curing agents affect aminopeptidase activity from porcine skeletal muscle. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung Und – Forschung A- Food Research and Technology* 205(5), 343-346.

Flores, M., Aristoy, M.C., Spanier, A.M., Toldrá, F. 1997. Non-Volatile Components Effects on Quality of Serrano Dry-cured Ham as Related to Processing Time. *Journal of Food Science* Volume 62, No 6, 1997.

Flores, M., Spanier, A.M. & Toldrá, F. 1998. Flavour analysis of dry- cured ham. In: *Flavour of meat, products and seafood*. Ed F. Shahidi. pp 320-341. Blackie A&P, Chapman and Hall. London, UK.

Flores, M., Aristoy, M-C., Antequera, T., Barat, J.M., Toldrá, F. 2009. Effect of prefreezing hams on endogenous enzyme activity during the processing of Iberian dry-cured hams. *Meat Science* 82, 241-246.

Fonseca, S., Cachaldora, A., Gómez, M., Franco, I., Carballo, J. 2013. Effect of different autochthonous starter cultures on the volatile compounds profile and sensory properties of Galician chorizo, a traditional Spanish dry fermented sausage. *Food Control* 33, 6-14.

Fonseca, S., Gómez, M., Domínguez, R., Lorenzo, J.M. 2015. Physicochemical and sensory properties of Celta dry-ripened "salchichón" as affected by fat content. *Grasas y Aceites* 66 (1), article number: e059.

Fung Ang, L., Yee Por, L., Fei Yam, M. 2015. Development of an Amperometric-Based Glucose Biosensor to Measure the Glucose Content of Fruit. *PLOS ONE*. DOI: 10.1371/journal.pone.0111859

Galli, V., Garcia, A., Saavedra, L., Barbas, C. 2003. Capillary electrophoresis for short-chain organic acids and inorganic anions in different samples. *Electrophoresis*. 24, 1951-1981.

Geng, T., Morgan, M. T. & Bhunia, A. K. 2004. Detection of low levels of *Listeria monocytogenes* cells by using a fiber-optic immunosensor. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, 6138-6146.

Gerard, M., Chaubey, A. & Malhotra, B. D. 2002. Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. 17, 345-359.

- Ghosh, S., Sarker, D. & Misra, T. N. 1998. Development of an amperometric enzyme electrode biosensor for fish freshness detection. *Sensor and Actuators B*. 53, 58-62.
- Gilliam, M., Sherman, M., Griscavage, J., Ignarro, L. 1993. A Spectrophotometric Assay for Nitrate Using NADPH Oxidation by *Aspergillus* Nitrate Reductase. *Analytical Biochemistry*, 212, 359-365.
- Gokdogan Sahin, O., Gulce, H., Gulce, A. 2013. Polyvinylferrocenium based platinum electrodeposited amperometric biosensors for lysine detection. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 690, 1-7.
- Goll, D., Dayton, W., Singh, I., Robson, R. 1991. Studies of the α -Actinin/Actin Interaction in the Z-disk by Using Calpain. *Journal of biological Chemistry*, Vol 266, núm.:13 pág.: 8501-10.
- Gu, Y., Chung Chen., Ch. 2008. Eliminating the Interference of Oxygen for Sensing Hydrogen Peroxide with the Polyaniline Modified Electrode. *Sensors*. 8, 8237-8247.
- Guerrero, L., Gou, P., Alonso, P., Arnau, J. 1996. Study of the Physicochemical and Sensorial Characteristics of Dry -Cured Hams in Three Pig Genetic Types. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 70, 526-530
- Guerrieri, A., Cataldi, T., Ciriello, R. 2007. The Kinetic and analytical behaviours of an L-lysine amperometric biosensor based on lysine oxidase immobilised onto a platinum electrode by co- crosslinking. *Sensors and Actuators B* 126, 424-430.

Guerrieri, A., Ciriello, R., Cataldi, R.I. 2013. A novel amperometric biosensor based on a co-crosslinked L-lysine- α -oxidase/overoxidized polypyrrole bilayer for the highly selective determination of L-Lysine. *Analytica Chimica Acta* 795, 52-59.

Hammes, W.P., Knauf, H.J. 1994. Starters in the Processing of Meat Products. *Meat Science* 36, 155-168.

Hart, A.L., Matthews, C., Collier, W.A. 1999. Estimation of lactate in meat extracts by screen-printed sensors. *Analytica Chimica Acta* 386, 7-12.

Hernández- Cázares, A., Aristoy, M-C., Toldrá, F. 2010. Hypoxanthine-based enzymatic sensor for determination of pork meat freshness. *Food Chemistry* 123, 949-954.

Hernández- Cázares, A., Aristoy, M-C., Toldrá, F. 2012. Reprint of: An enzyme sensor for the determination of total amines in dry- fermented sausages. *Journal of Food Engineering* 110, 324-327.

Honikel, K.O. 2008. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science* 78, 68-76.

Hospital, X.F., Hierro, E., Fernández, M. 2014. Effect of reducing nitrate and nitrite added to dry fermented sausages on the survival of *Salmonella Typhimurium*. *Food Research International* 62, 410-415.

Jiménez, C. C. & León, P. D. 2009. Biosensores: aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimentarios. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. 16, 144-154.

Jiménez-Colmenero, F., Ventanas, J., Toldrá, F. 2010. Nutritional composition of dry-cured ham and its role in a healthy diet. *Meat Science*, 84, 585-593.

Johansson, G., Berdagué, J-L., Larsson, M., Tran, N., Borch, E. 1994. Lypolysis, Proteolysis and Formation of Volatile Components during Ripening of a Fermented Sausage with *Pediococcus pentosaceus* and *Staphylococcus xylosus* as Starter Cultures. *Meat Science* 38, 203-218.

Kalimuthu, P., Fischer-Schrader, K., Schwarz, G., Bernhardt, P.V. 2015. A sensitive and stable amperometric nitrate biosensor employing *Arabidopsis thaliana* nitrate reductase. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 20:385-393.

Kameník, J Dusková, M., Saláková, A., Sedo, O. 2013. Heterofermentative process in dry fermented sausages-a case report. *Acta Veterinaria. BRNO.* 82: 181-186.

Karimi Shervedani, R., Hemmatian, Z., Hatefi-Mehrjardi, A. 2009. Immobilization of L-lysine α -oxidase on gold-mercaptopropionic acid self-assembled monolayer: Preparation and electrochemical characterization. *Bioelectrochemistry* 75, 124-129.

Karube, I., Matsuoka, H., Suzuki, S., Watanabe, E., Toyama, K.1984. Determination of Fish Freshness with an Enzyme Sensor System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 32, 314-319.

Kelly, S.C., O'Connell, P.J., O'Sullivan, C.K., Guilbault, G.G. 2000. Development of an interferent free amperometric biosensor for determination of L-Lysine in food. *Analytica Chimica Acta* 412: 111-119

Kim, M. 2006. Determining citrate in fruit juices using a biosensor with citrate lyase and oxaloacetate decarboxylase in a flow injection analysis system. *Food Chemistry* 99, 851-857.

Kim, J.S., Ingale, S-L., Lee, S.H., Choi, Y.H., Kim, E.H., Lee, D.C., Kim, Y.H., Chae, B.J. 2014. Impact of dietary fat sources and feeding level on adipose tissue Fatty acids composition and lipid metabolism related gene expression in finisher pigs. *Animal Feed Science and Technology* 196, 60-67.

Kusakabe, H., Kodama, K., Kuninaka, A., Yoshino, H., Misono, H., Soda, K. 1980. A new Anti-Tumor enzyme, L-lysine α -oxidase from *Trichoderma viride*: Purification and enzymological properties. *Journal of Biological Chemistry* 255, 976-981.

Lamas-Ardisana, P.J., Loaiza, O., Añorga, L., Jubete, E., Borghei, M., Ruiz, V., Ochoteco, E., Cabañero, G., Grande, H.J. 2014. Disposable amperometric biosensor based on lactate oxidase immobilised on platinum nanoparticle-decorated carbon nanofiber and poly(diallyldimethylammonium chloride) films. *Biosensors and Bioelectronics* 56, 345-351.

Leo M.L. Nollet; Fidel Toldrá. (2009). Essential Amino Acids. En *Hand Book Of Processed Meats and Poultry Analysis* (215-232). Estados Unidos: CRC Press.

Lian, Y., He, F., Wang, H., Tong, F. 2015. A new aptamer/grapheme interdigitated gold electrode piezoelectric sensor for rapid and specific detection of *Staphylococcus aureus*. *Biosensors and Bioelectronics* 65, 314-319.

Liang, B., Guo, X., Fang, L., Hu, Y., Yang, G., Zhu, Q., Wei, J., Ye, X. 2015. Study of direct electron transfer and enzyme activity of glucose oxidase on graphene surface. *Electrochemistry Communications* 50, 1-5.

Liaud, N., Navarro, D., Vidal, N., Sigoillot, J-C., Raouche, S. 2014. High throughput automated colorimetric method for the screening of L- Lactic acid producing microorganisms. *MethodsX* 1, 254- 257.

Li, L., Shi, Y., Pan, L., Shi, Y., Yu, G. 2015. Rational desing and applications of conducting polymer hydrogels as electrochemical biosensors. *Journal of Materials Chemistry . B*, 3, 2920-2930.

Loaiza, O-A., Lamas-Ardisana, P-J., Añorga, L., Jubete, E., Ruiz, V., Borghei, M., Cabañero, G., Grande, H-J. 2015. Graphitized carbon nanofiber-Pt nanoparticle hybrids as sensitive tool for preparation of screen printing biosensors. Detection of lactate in wines and ciders. *Bioelectrochemistry* 101, 58-65.

Lockridge, O., Masset, V., Sullivan, P.A. 1972. Mechanism of Action of Flavoenzyme Lactate oxidase. *Journal of Biological Chemistry* 247, 8097- 8106.

Lozano, M., Vidal-Aragon, M.C., Sabio, E., Montero de Espinosa, V. 1998. Fe, Cu, Mn, and Zn mineral content evolution in the bicepsfemoris muscle from Iberian am during curing processing. *Alimentaria*, 294, 39-43.

Lu, J., Pulsipher, B., Grenache, D. 2015. Development of an enzymatic assay to measure lactate in perchloric acid-precipitated whole blood. *Clinica Chimica Acta* 444, 208-211.

Lücke, F-K. 1994. Fermented meat products. *Food Research International* 27, 299-307.

Lukasheva, E.V., Berezov, T.T. (2002). L-lysine- α -oxidase: Physicochemical and Biological Properties. *Biochemistry* 67, 1152-1158.

Maijala, R., & Eerola, S. 1993. Contaminant lactic acid bacteria of dry sausages produce histamine and tyramine. *Meat Science*. 39, 387-395.

Majer-Baranyi, K., Adányi, N., Váradi, M. 2008. Investigation of a multienzyme based amperometric biosensor for determination of sucrose in fruit juices. *European Food Research and Technology* 228: 139-144

Matsuda, M., Asano, Y. (2010). Determination of plasma and serum L-lysine using L-lysine ϵ -oxidase from *Marinomonas mediterranea* NBRC 103028. *Analytical Biochemistry* 406, 19-23.

Mello, L. D. & Kubota, L.T. 2002. Review of the use of biosensores as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry*. 77, 237-256.

Mora, L., Sentandreu, M.A., Fraser, P.D., Toldrá, F. 2009. Oligopeptides Arising from the Degradation of Creatine Kinase in Spanish Dry- Cured Ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* . 57, 8982- 8988.

Mora, L., Sentandreu, M.A., Toldrá, F. 2010. Identification of small troponin T peptides generated in dry-cured ham. *Food Chemistry* 123, 691- 697.

Mora, L., Sentandreu, M.A., Toldrá, F. 2011. Intense Degradation of Myosin Light Chain Isoforms in Spanish Dry- Cured Ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 3884-3892

Mora, L., Escudero, E., Fraser, P., Concepción Aristoy, M., Toldrá, F. 2014. Proteomic identification of antioxidant peptides from 400 to 2500 Da generated in Spanish dry-cured ham contained in a size-exclusion chromatography fraction. *Food Research International*, 56, 68-76.

Naidoo, Y., Simpson, R. 2012. Can near infrared spectroscopy (NIRS) be used to predict lactic acid, acetic acid and ethanol in sugarcane mixed juice?. *International Sugar Journal* 114, 414-417.

Nakatani, H. S., Dos Santos, L. V., Peralta, P., Marques, G. S., Matsushita, M., de Souza, E.N. & Visentainer, J.V. 2005. Biosensor based on xanthine oxidase for monitoring hypoxanthine in fish meat. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 1(2):85-89.

Nam Seong, P., Mi Park, K., Moon Kang, S., Ho Kang, G., Hyun Cho, S., Young Park, B., Van Ba, H. 2014. Effect of Particular Breed on the Chemical Composition, Texture, Color, and Sensorial Characteristics of Dry-cured Ham. *Journal of Animal Science* Vol 27, No.8: 1164-1173

Narváez-Rivas, M., Gallardo, E., León-Camacho, M. 2013. The changes in gliceridic fractions of sweaty fat and weight loss during ripening time of Iberian dry-cured ham. *Food Research International* 54, 1657-1669.

Nelson, D. L . & Cox, M. M. 2001. Lehninger. Principios de bioquímica. Editorial Omega.1264p.

Ntoko, F., Senwo, Z. 2012. Nitrate reduction by commercially available nitrate reductases: Bio-catalytic potentials and enzymatic activities in the presence of metals ions. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 47, 2028-2034.

Nunes, G. S. & Marty, J-L. 2006. Immobilization of enzymes on electrodes. In : *Methods in Biotechnology*. Ed J. M. Guisan. Pp 239-250. Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA.

O'Halloran, G.R., Troy, D.J., D.J. Buckley & W. J. Reville. 1997. The Role of Endogenous Proteases in the Tenderisation of Fast Glycolysing Muscle. *Meat Science*, Vol.47 187-210

Olesen, P., Meyer, A., Stances, L. 2004. Generation of flavor compounds in fermented sausages the influence of curing ingredients, *Staphylococcus* starter culture and ripening time. *Meat Science* 66, 675-687.

Olmo, A., Calzada, J., Gaya, P., Nuñez, M. 2013. Proteolysis, Texture, and Sensory Characteristics of Serrano Hams from Duroc and Large White Pigs during Dry-Curing. *Journal of Food Science*, 78, Vol 3, C416-C424.

Official Journal of the European Union. 2005. Commission Regulation (EC) No 2073 on microbiological criteria for foodstuffs. L 338/1.

Olschewski, H., Erlenkotter, A., Zaborosch, Ch., Chemnitz, G-Ch. 2000. Screen-printed enzyme sensors for L-lysine determination. *Enzyme and Microbial Technology* 26, 537-543.

Ordoñez, J., Hierro, E., Bruna, J., De la Hoz, L. 1999. Changes in the Components of Dry-Fermented Sausages during Ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39(4): 329-367.

Payne, JW. 1973. Polymerization of proteins with glutaraldehyde-soluble molecular-weight markers. *Biochemical Journal*. 135(4):867-73

Pagán, M., Suazo, D., del Toro, N., Griebenow, K. 2015. A comparative study of different protein immobilization methods for the construction of an efficient nanostructured lactate. *Biosensors and Bioelectronics* 64, 138- 146.

Pena, R.N., Gallardo, D., Guardia, M.D., Reixach, J., Arnau, J., Arnills, M., Quintanilla, R. 2013. Appearance, flavor, and texture attributes of pig dry -cured hams have a complex polygenic genomic architecture. *Journal of Animal Science*, 91, 1051- 1058.

Plumeré, N. 2013. Interferences from oxygen reduction reactions in bioelectroanalytical measurements: the case study of nitrate and nitrite biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405: 3731-3738.

Privman, V., Zavalov, O., Simonian, A. 2013. Extended Linear Response for Bioanalytical Applications Using Multiple Enzymes. *Analytical Chemistry*. 85, 2027-2031.

Prodromidis, M.I., Karayannis, M.I. 2002. Enzyme Based Amperometric Biosensors for Food Analysis. *Electroanalysis*, vol.:14 núm .: 4 pag.: 241-261.

Qiong, Ch., Tuzhi, P., Liju, Y. 1998. Silk fibroin/cellulose acetate membrane electrodes incorporating xanthine oxidase for the determination of fish freshness. *Analytica Chimica Acta* 369, 245-251.

Radke, S. M. & Alocilja, E. C. 2005. A high density microelectrode array biosensor for detection of *E. coli* O157:H7. *Biosensors and Bioelectronics*. 20, 1662-1667.

Rassaei, L., Olthuis, W., Tsujimura, S., Sudholter, E., Van den Berg, A. 2014. Lactate biosensors: current status and Outlook. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406: 123-137. Review.

Reviejo, A.J. & Pingarrón, J. M. 2000. Biosensores electroquímicos. Una herramienta útil para el análisis medioambiental, alimentario, y clínico. Pp. 5-15. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*. España.

Ripollés, S., Bastianello Campagnol, P-C., Armenteros, M., Concepción Aristoy, M., Toldrá, F. 2011. Influence of partial replacement of NaCl with KCl, CaCl₂ and MgCl₂ on lipolysis and lipid oxidation in dry-cured ham. *Meat Science* 8, 58-64.

Sahin, O.G., Gulce, H., Gulce, A. 2013. Polyvinylferrocenium based platinum electrodeposited amperometric biosensors. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 690, 1-7.

Salimi, A., Noorbakhsh, A., Mamkhezri, H., Ghavami, R. 2007. Electrocatalytic Reduction of H₂O₂ and Oxygen on the Surface of Thionin Incorporated onto MWCNTs

Modified Glassy Carbon Electrode: Application to Glucose Detection. *Electroanalysis*, vol.:19 núm.: 10 pág.: 1100-1108.

Samphao, A., Butmee, P., Jitcharoen, J., Svorc, L., Raber, G., Kalcher, K. 2015. Flow-injection amperometric determination of glucose using a biosensor based on immobilization of glucose oxidase onto Au seeds decorated on core Fe₃O₄ nanoparticles. *Talanta* 142, 35-42.

Sanz, B., Selgas, D., Parejo, I., Ordóñez, J. 1988. Characteristics of lactobacilli isolated from dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* 6, 199-205.

Saurina, J., Hernández-Cassou, S., Fàbregas, E., Alegret, S. 1998. Potentiometric biosensor for lysine analysis based on a chemically immobilized lysine oxidase membrane. *Analytica Chimica Acta*. 371, 49-56.

Schuster, R. 1988. Determination of Amino Acids in Biological, Pharmaceutical, Plant and Food Samples by Automated Precolumn Derivatization and High - Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography*, 431, 271-284.

Sentandreu, M.A., Toldrá, F. 2000. Purification and Biochemical Properties of Dipeptidyl Peptidase I from Porcine Skeletal Muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5014-5022.

Sentandreu, M.A., Armenteros, M., Calvete, J.J., Ouali, A., Concepción Aristoy, M., Toldrá, F. 2007. Proteomic Identification of Actin-Derived Oligopeptides in Dry-Cured Ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55, 3613-3619.

Sharma, S. K., Sehgal, N. & Kumar, A. 2003. Biomolecules for development of biosensors and their applications. *Current Applied Physics*. 3, 307-316.

Shimomura, T., Sumiya, T., Ono, M., Itoh, T., Hanaoka, T. 2012. An electrochemical biosensor for the determination of lactic acid in expiration. *Procedia Chemistry* 6, 46-51.

Siegler, K., Weber, B. 1994. A Lysine Sensor for Process Control. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* , 59, 279-287.

Simonian, A.L., Badalian, I.E., Berezov, T.T., Smirnova, I.P., Khaduev, S.H. 1994. Flow-Injection Amperometric Biosensor based on Immobilized L-Lysine - α - Oxidase for L-Lysine Determination. *Analytical Letters*, 27(15),2849-2860

Smarrelli, J., Campbell, WH. 1983. Heavy-Metal Inactivation and Chelator Stimulation of Higher-Plant Nitrate Reductase. *Biochimica Biophysica Acta* 742, 435-445.

Smith, JL., Huhtanen, CN., Kissinger, JC., Palumbo, SA. 1975. Survival of Salmonellae during pepperoni manufacture. *Applied Microbiology*, 30, 759-763

Sorensen, B., Samuelsen, H. 1996. The combined effects of environmental conditions on lipolysis of pork fat by lipases of the meat starter culture organisms *Staphylococcus xylosus* and *Debaryomyces hansenii*. *International Journal of Food Microbiology* 32, 59-71.

Sorensen, B., Jakobsen, M. 1997. The combined effects of temperature, pH and Na Cl on growth of *Debaryomyces hansenii* analyzed by flow cytometry and predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology* 36, 83-84.

Stefan-van Staden, R-I., Nejem, R', Frederick van Staden, J., Aboul-Enein, H. 2012. Amperometric biosensor based on diamond paste for the enantioanalysis of L-Lysine. *Biosensors and Bioelectronics* 35, 439-442.

Storrustlokken , L., Devle, H., Haseth, T., Egelanddal, B., et al. 2015. Lipid degradation and sensory characteristics of M. biceps femoris in dry-cured hams from Duroc using three different processing methods. *International Journal of Food Science and Technology*, Volume 50, 2, 522-531.

Suman, S., Singhal, R., Sharma, A.L., Malthotra, B.D., Pundir, C.S. 2005. Development of a lactate biosensor based on conducting copolymer bound lactate oxidase. *Sensors and Actuators B* 107, 768-772.

Tabilo, G., Flores, M., Fiszman, S.M., Toldrá, F. 1999. Postmortem meat quality and sex affect textural Properties and protein breakdown of dry-cured ham. *Meat Science*, 51, 255-260.

Terry, L. A., White, S. F. & Tigwell, L. 2005. The application of biosensors to fresh produce and the wider food industry. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 53, 1309-1316.

Thakur, M.S., Ragavan, K.V. 2013. Biosensors in food processing. *Journal of Food Science and Technology* , 50(4): 625-641.

Thévenot, D.R., Toth, K., Durst, R. A. & Wilson, G.S. 2001. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*. 16, 121-131.

Toldrá, F., Rico, E. & Flores, J. 1992. Activities of pork muscle proteases in model cured meat systems. *Biochimie*. 74, 291-296.

Toldrá, F., Aristoy, M.C., Part, C., Cerveró, C., Rico, E., Motilva, M. J., & Flores, J. 1992b. Muscle and adipose-tissue aminopeptidase activities in raw and dry-cured ham. *Journal of Food Science* 57 (4), 816.

Toldrá, F., Rico, E. & Flores, J. 1993. Cathepsin B, D, H and L activities in the processing of dry-cured ham. *Journal Science Food and Agriculture*. 62, 157-161.

Toldrá, F., Cerveró, M.C., & Part, C. 1993a. Porcine aminopeptidase activity as affected by curing agents. *Journal of Food Science* 58, (4), 724.

Toldrá, F., Flores, M., Concepción Aristoy, M. 1996. Pattern of Muscle Proteolytic and Lipolytic Enzymes from Light and Heavy Pigs. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71, 124-128.

Toldrá, F., Flores, M. & Sanz, Y. 1997. Dry-cured ham flavour: Enzymatic generation and process influence. *Food Chemistry*. 59, 523-530.

Toldrá, F., Flores, M. 1998. The role of muscle proteases and lipases in flavor development during the processing of dry-cured ham. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 38(4): 331-352.

Toldrá, F., Concepción Aristoy, M., Flores, M. 2000a. Contribution of muscle aminopeptidases to flavor development in dry-cured ham. *Food Research International* 33, 181-185.

Bibliografía

Toldrá, F., Concepción-Aristoy, M., Flores, M. 2000. Contribution of muscle amoniopetidases to flavor development in dry-cured ham. *Food Research International* 33, 181-185.

Toldrá, F. 2002. *Dry-cured meat products*. 244 p. Food and Nutrition Press, INC. Trumbul, Connecticut, USA.

Toldrá F. 2006a *Meat: Chemistry and Biochemistry* . In: *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*. Ed Y. H., Hui. pp 28-1 – 28-18. CRC Press, Boca Ratón, FL, USA.

Toldrá, F. 2008. *Biotechnology of flavour generation in fermented meats*. In: *Meat Biotechnology*. Ed. F. Toldrá. Chapter 9, pp. 199-215. Springer Science + Business Media. Spring Street, New York, NY, USA.

Toldrá, F., Aristoy, MC., Flores, M. 2009. Relevance of nitrate and nitrite in dry-cured ham and their effects on aroma development. *Grasas y Aceites*. 60, 291-296.

Turner, A. P. F., Karube, I. & Wilson, G. S. 1987. *Biosensor: Fundamental and applications*. Oxford University Press, Oxford. 770p.

Vrbová, E., Marek, M. 1992. Biosensor for the determination of L-Lysine. *Analytica Chimica Acta*, 270, 131-136.

Wahlefeld, A-W. 1983. UV-method with Lactate and NAD. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Eds. Bergmeyer, J and GraBl, M. pp 126-133. Third Edition. Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida.

Yakovleva, M., Buzas, O., Matsumura, H., Samejima, M., Igarashi, K., Larsson, P-O., Gorton, L., Danielsson, B. 2012. A novel combined thermometric and amperometric biosensor for lactose determination based on immobilized cellobiose dehydrogenase. *Biosensors and Bioelectronics* 31, 251-256.

Zhang, Y., Tian, X., Guo, Y., Li, H., Yu, A., Deng, Z., Baoguo Sun, B., Zhang, S. 2014. Analysis of Nitrites and Nitrates in Hams and Sausages by Open-Tubular Capillary Electrochromatography with a Nanolatex- Coated Capillary Column. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62, 3400-3404.