



UNIVERSIDAD
DE
CÓRDOBA

DEPARTAMENTO DE BROMATOLOGÍA
Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS
ORGÁNICOS VOLÁTILES EN QUESOS DE
CABRA EN DIFERENTES ESTADIOS DE
MADURACIÓN MEDIANTE ESPECTROMETRÍA
DE MOVILIDAD IÓNICA (IMS) Y SU
RELACIÓN CON ALGUNOS
MICROORGANISMOS IMPLICADOS EN SU
ELABORACIÓN**

TESIS DOCTORAL

Janneth María Gallegos Núñez

Enero 2017

TITULO: *Determinación de compuestos orgánicos volátiles en quesos de cabra en diferentes estadios de maduración mediante espectrometría de Movilidad Iónica (IMS) y su relación con algunos microorganismos implicados en su elaboración*

AUTOR: *Janneth María Gallegos Núñez*

© Edita: UCOPress. 2017
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS
VOLÁTILES EN QUESOS DE CABRA EN
DIFERENTES ESTADIOS DE MADURACIÓN
MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MOVILIDAD
IÓNICA (IMS) Y SU RELACIÓN CON ALGUNOS
MICROORGANISMOS IMPLICADOS EN SU
ELABORACIÓN

Trabajo presentado para aspirar al Grado de
Doctor por la Universidad de Córdoba.
Programa de Doctorado: Biociencias y
Ciencias Agroalimentarias

LA DOCTORANDA

Fdo. Janneth María Gallegos Núñez
Graduada en Bioquímica y Farmacia por la
Universidad Central del Ecuador.
Máster en Microbiología por la Universidad
Pontificia Javeriana (Bogotá, Colombia).

LOS DIRECTORES

Fdo. Lourdes Arce Jiménez
*Profesora Titular, acreditada al
Cuerpo de Catedráticos, del
Departamento de Química
Analítica de la Universidad de
Córdoba (España)*

Fdo. Luis M. Medina Canalejo
*Catedrático del Departamento
de Bromatología y Tecnología de
Alimentos de la Universidad de
Córdoba (España)*

Luis M. Medina Canalejo, *Catedrático del Departamento de Bromatología y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Córdoba*, y

Lourdes Arce Jiménez, Profesora Titular del Departamento de Química Analítica, de la Universidad de Córdoba,

EN CALIDAD DE:

Directores de la Tesis Doctoral presentada por **Janneth María Gallegos Núñez**, titulada "Determinación de compuestos orgánicos volátiles en quesos de cabra en diferentes estadios de maduración mediante espectrometría de movilidad iónica (IMS) y su relación con algunos microorganismos implicados en su elaboración"

INFORMAN QUE:

- 1) El trabajo experimental de la Tesis Doctoral ha sido desarrollado en los laboratorios del Departamento de Química Analítica y en los del *Departamento de Bromatología y Tecnología de Alimentos*, ambos de la de la Universidad de Córdoba (España).
- 2) A nuestro juicio, esta Tesis Doctoral reúne todos los requisitos exigidos para este tipo de trabajo.
- 3) **Janneth María Gallegos Núñez**, es autora de todos los artículos científicos resultantes de los contenidos de esta Tesis, que relacionamos a continuación:

GALLEGOS J., ARCE C., JORDANO R., ARCE L., MEDINA L.M. 2017. **Target identification of volatile metabolites to allow the differentiation of lactic acid bacteria by gas chromatography-ion mobility spectrometry.** *Food Chemistry*. Vol. 220: 362-370

GALLEGOS J., GARRIDO-DELGADO R., ARCE L., MEDINA L.M. 2015. **Volatile Metabolites of Goat Cheeses Determined by Ion Mobility Spectrometry. Potential Applications in Quality Control.** *Food Analytical Methods*. Vol. 8(7): 1699-1709

ARCE L., GALLEGOS J., GARRIDO-DELGADO R., MEDINA L.M., SIELEMANN S., WORTELMAN T. 2014. **Ion Mobility Spectrometry a Versatile Analytical Tool for Metabolomics Applications in Food Science.** *Current Metabolomics*, Vol. 2(4): 264-271.

Córdoba, 24 de enero de 2017

Lourdes Arce Jiménez

Luis M. Medina Canalejo

ÍNDICE

ACRÓNIMOS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES

1.1.1. Visión general sobre el queso.....	3
1.1.2. Proceso de elaboración del queso.....	6
1.1.3. Clasificación del queso.....	10
1.1.3.1. Quesos de elaboración artesanal y quesos de fabricación industrial.....	13
1.1.4. El queso como ecosistema microbiano y las características sensoriales.....	15
1.1.4.1. Actividad de agua.....	16
1.1.4.2. Concentración de sal.....	17
1.1.4.3. pH y ácidos orgánicos.....	17
1.1.4.4. Temperatura de maduración.....	17
1.1.4.5. Potencial redox.....	18
1.1.4.6. Interacciones microbianas.....	19

1.2. EL AROMA DEL QUESO Y LA MICROBIOTA IMPLICADA

1.2.1. Percepción del aroma y sabor a queso.....	21
1.2.2. La microbiota del queso.....	23
1.2.2.1. Bacterias ácido lácticas.....	24
1.2.2.2. Cultivos iniciadores y cultivos no iniciadores de BAL.....	27
1.2.3. El desarrollo del aroma en el queso.....	28

1.2.3.1. Metabolismo de la lactosa.....	30
1.2.3.2. Utilización del citrato.....	31
1.2.3.3. Metabolismo de lípidos.....	31
1.2.3.4. Proteólisis.....	32
1.2.3.5. Metabolismo de aminoácidos libres.....	32
1.2.4. El desarrollo del aroma y el sabor del queso bajo el enfoque de la biología de sistemas.....	33
1.2.5. Importancia de los compuestos del sabor y aroma en agroalimentación.....	34
1.2.6. Importancia de los compuestos orgánicos volátiles producidos por los microorganismos del queso.....	36

1.3. EL ANÁLISIS DE AROMA EN ALIMENTOS Y MICROORGANISMOS

1.3.1. Cromatografía de gases.....	39
1.3.2. Sistema espacio de cabeza-espectrometría de masas	42
1.3.3. Nariz electrónica.....	44

1.4. ESPECTROMETRÍA DE MOVILIDAD IÓNICA

1.4.1. Generalidades.....	45
1.4.2. Instrumentación y bases para la espectrometría de movilidad iónica.....	46
1.4.2.1. Sistema de introducción de la muestra.....	47
1.4.2.2. Fuentes de ionización.....	49
1.4.2.2.1. Ionización radioactiva.....	49
1.4.2.2.2. Métodos alternativos a la ionización radioactiva tradicional.....	50
a) Ionización por electrospray.....	50
b) Ionización por electrospray secundaria.....	52
c) Ionización/desorción laser asistida por matriz	52

d) Corona descarga ionización química a presión atmosférica.....	53
e) Fotoionización a presión atmosférica.....	53
1.4.3. Reacciones químicas de ionización en el IMS.....	54
1.4.4. Rendija de iones.....	56
1.4.5. Tubo de deriva.....	57
1.4.6. Gases.....	58
1.4.7. Movilidad de los iones.....	59
1.4.8. Secciones transversales de colisión iónica.....	60
1.4.9. El detector.....	60
1.4.10. Poder de resolución.....	62
1.4.11. Columnas multicapilares y de cromatografía de Gases.....	62
1.4.12. Desarrollos instrumentales en IMS.....	63

1.5. LA ESPECTROMETRÍA DE MOVILIDAD IÓNICA COMO UNA HERRAMIENTA ANALÍTICA VERSÁTIL PARA APLICACIONES METABOLÓMICAS EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

1.5.1. Aplicaciones de la espectrometría de movilidad iónica en análisis metabólico agroalimentario.....	70
1.5.1.1. IMS para análisis "target".....	71
1.5.1.2. IMS para perfil metabólico.....	74
1.5.1.3. IMS para huella espectral metabólica.....	76

1.6. USO DE LA ESPECTROMETRÍA DE MOVILIDAD IÓNICA PARA EL ESTUDIO DE COMPUESTOS VOLÁTILES

1.6.1. Determinación de metabolitos volátiles en quesos de cabra mediante el uso de IMS.....	83
--	----

1.6.2. Identificación de metabolitos volátiles para diferenciar bacterias ácido lácticas.....	85
---	----

CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1 Justificación.....	91
2.2 Objetivos.....	95

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Muestras de quesos, selección, preparación y conservación de muestras.....	99
3.2. Preparación de cultivos de bacterias ácido lácticas para el análisis mediante IMS.....	102
3.3. Determinación de VOCs durante el crecimiento de BAL.....	103
3.4. Puesta a punto del método de medida de VOCs usando HS-MCC-IMS.....	104
3.5. Muestreo de VOCs.....	107
3.6. Reactivos usados para la preparación de soluciones stock y estándares de VOCs.....	107
3.7. Otros reactivos, ingredientes y medios de cultivo.....	109
3.8. Material de laboratorio.....	111
3.9. Aparatos y otros instrumentos.....	112
3.10. Espectrómetro de Movilidad Iónica para determinación de VOCs.....	112
3.11. Análisis de datos.....	121

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Puesta a punto del método de medida de compuestos orgánicos volátiles usando HS-MCC-IMS.....	129
4.1.1. Selección preliminar de señales.....	130
4.1.2. Optimización de los parámetros del automuestreador	131
a) Cantidad de muestra.....	131
b) Temperatura de incubación.....	132
c) Tiempo de incubación.....	133
d) Volumen de inyección.....	135
4.1.3. Optimización de los parámetros del IMS.....	135
a) Temperatura del tubo de deriva.....	135
b) Flujo de gas de muestra.....	136
c) Flujo del gas de deriva.....	137
d) Promedio de espectros.....	137
e) Temperatura de la columna.....	138
4.1.4. Estudio de precisión del método HS-MCCC-IMS.....	140
4.1.5. Estudio de mapas topográficos IMS para establecer las diferencias entre las muestras de quesos de cabra en base a huellas de VOCs.....	141
4.2. Determinación de Compuestos Volátiles Orgánicos de quesos de cabra mediante HS-MCC-IMS con potencial uso como marcadores de maduración y su evolución en el tiempo.....	146

4.3. Análisis de muestras de cuatro cepas de BAL por HS-GC-IMS.....	151
4.3.1. Determinación de VOCs de las cepas de referencia de BAL.....	152
4.3.2. Evolución de VOCs producidos por cepas de referencia de BAL durante su crecimiento.....	153
4.3.3. Discriminación de cepas mediante el análisis de componentes principales.....	161
4.4. Valoración del uso de la IMS en matriz quesera.....	165
4.5. Familias de VOCs determinados en quesos de cabra mediante HS-MCC-IMS.....	171
4.6. Estudio de VOCs emitidos por microorganismos.....	174
4.7. Formas de analizar metabolitos volátiles mediante IMS.	176
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.....	181
CAPÍTULO 6. RESUMEN.....	187
CAPÍTULO 7. SUMMARY.....	193
CAPÍTULO 8. REFERENCIAS.....	197

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES

1.1.1. Visión general sobre el queso

La ciencia y arte de la manufactura del queso surgió en el norte y este de Europa 7.000 años antes de Cristo, según evidencias de trazas de grasa láctea encontradas en fragmentos de cerámica (Salque et al., 2013). A mediados del siglo XIX, su elaboración se extiende a todas las granjas de Europa. Originalmente, el objetivo fue ampliar la vida media de un alimento altamente perecedero como la leche, y a la vez preservar sus nutrientes, mediante la producción de ácido y/o la deshidratación. La preservación es debida a la formación de metabolitos inhibitorios tales como ácidos orgánicos (láctico, acético, fórmico, propiónico), etanol, bacteriocinas, etc., en combinación con el decrecimiento de la actividad de agua por el secado o uso de sal (Gaggia et al., 2011).

El queso es uno de los productos de consumo más elevado en el mundo y es fuente de nutrientes esenciales, incluyendo proteínas, aminoácidos, péptidos, lípidos, minerales y vitaminas liposolubles. Se ha evidenciado, además, la presencia de 2 tripéptidos bioactivos: valina-prolina-prolina e isoleucina-prolina-prolina, ácido linoleico conjugado, así como esfingolípidos, una alta concentración de calcio y compuestos polifenólicos como ingredientes específicos que contribuyen a la nutrición y salud humana. El valor nutritivo de este alimento está ligado a las características de la leche y a sus condiciones de elaboración (Walther et al., 2008; Jerónimo y Malcata, 2016). Actualmente, el proceso de elaboración del queso está muy desarrollado desde el punto de vista de la biotecnología alimentaria y su producción se ha incrementado en el mundo

occidental de 15 a más de 18 toneladas métricas entre los años 2005-2014 (FAO, 2014). En relación al queso de cabra, en el año 2013 la producción en España de leche de cabra alcanzó los 472.000 millones de litros. La mayor parte fue transformada en queso, de leche pura, representando un 6,8 % del total de la producción quesera en ese año (MAGRAMA, 2015).

En España se conoce un considerable número de quesos tradicionales. Algunos se producen a gran escala y están protegidos por regímenes de Denominación de Origen Protegida (DOP) o Indicación Geográfica Protegida (IGP). Por el contrario, otros son de producción artesanal o semiindustrial y se consumen en áreas muy limitadas (Martínez et al., 2011). Andalucía es la principal productora de leche de cabra (2500 L/d), procedente de razas autóctonas. Esta producción se transforma principalmente en queso tradicional en queserías artesanales o industriales, usando leche cruda o pasteurizada (de la Haba, 2016). A nivel rural el queso de cabra incide en la satisfacción de necesidades nutricionales mientras en el medio urbano, adicionalmente, es muy apreciado por sus características sensoriales distintivas.

Al mismo tiempo que ha incrementado el consumo global de queso, han aumentado las exigencias sobre su aroma, sabor y consistencia (McCarthy, 2015). España es uno de los países en que existe una cultura gastronómica relacionada con el queso. En el año 2015 la ingesta media de queso por persona y año se situó 7,78 (MAGRAMA, 2015). Un estudio sobre preferencias revela que un queso típico con DOP se compra en los supermercados por lo menos una vez a la semana (Tendero y Bernabéu, 2005). En este sentido, en el año 2014, se comercializaron cerca de 24 millones de Kg de queso protegido elaborados en 492 queserías españolas, tanto en el

mercado nacional como en la UE y países terceros, con un valor económico total de 230,41 millones de euros. Esta cifra indica la importancia del queso para la alimentación tanto en el mercado nacional como el internacional.

En las sociedades occidentales y países del hemisferio sur influidos por la cultura hispánica, como Ecuador, la elaboración de queso tradicional a pequeña escala constituye una oportunidad para mejorar, valorizar este tipo de producción sostenible y buscar un nicho en el mercado de productos diferenciados e innovadores. Adicionalmente, esta forma de producción de queso puede ser considerada un factor de desarrollo social y económico para las poblaciones rurales menos favorecidas, contribuyendo a la permanencia en su territorio. En este contexto, cabe destacar que el aroma, sabor y textura, definen la identidad de un queso y son parámetros de calidad significativos que influyen sobre el consumo preferencial y aceptación de este alimento. El desarrollo de estas características sensoriales se ve afectado por el procesado de la leche. De este modo, tanto la composición de la leche, como los procesos de coagulación, moldeado, prensado, así como las condiciones de maduración, están influidos por las reacciones bioquímicas de transformación de la lactosa, acetato y citrato, proteólisis y lipólisis. Estas reacciones, a su vez, tienen lugar por la actividad enzimática de la microbiota presente en el queso, así como la actividad de enzimas del cuajo y otras nativas de la leche.

El proceso de elaboración es básicamente el mismo para todos los quesos, pudiendo incorporarse cambios a partir de la cuajada para obtener una amplia variedad de quesos que son únicos por su aroma, sabor y textura.

Distintos estudios han tratado de caracterizar algunos quesos de cabra españoles de elaboración artesanal, estudiando

indistintamente sus propiedades físicas, químicas y microbiológicas (Picón et al., 2016). Dos trabajos desarrollados en distintas fases de producción del queso han estudiado las comunidades microbianas presentes en 2 variedades de un mismo tipo de queso (Martín-Platero et al., 2009; Moreno-Rojas et al., 2010), este último examinando aspectos nutricionales del producto. Además, se ha descrito el proceso de elaboración, aunque se han encontrado escasos datos sobre las características sensoriales (Martínez et al., 2011). Un estudio reciente sobre muestras de toda Andalucía determinó pH, grasa, sólidos totales, grasa/ST y NaCl en función de la raza de cabra y el proceso de elaboración a fin de saber si hay un solo tipo de queso tradicional de cabra o varios tipos (de la Haba, 2016). Sin embargo, no se han encontrado aportaciones científicas sobre VOCs responsables del aroma en quesos de cabra caracterizados como tradicionales, lo que sugiere algún tipo de dificultad analítica.

Finalmente, y tal como exponen Kongo y Malcata (2016), la Ciencia de los Alimentos, con la implementación de muchos métodos analíticos y sirviéndose de mejoras instrumentales, ha logrado avances en la comprensión de la dinámica y el desarrollo del aroma, sabor y textura del queso a fin de aplicar estos conocimientos en investigación y desarrollo de nuevos productos.

1.1.2. Proceso de elaboración del queso

El queso se caracteriza por ser una matriz dinámica, donde la microbiota y su actividad bioquímica están influidas por las prácticas de elaboración y las condiciones ambientales.

La Figura 1.1 ilustra el procesado general del queso. La primera fase de su elaboración es la preparación de la leche, lo cual incluye la estandarización de los niveles de caseína y grasa hasta alcanzar las proporciones apropiadas para cada tipo de queso. En el proceso se puede usar leche cruda, que potencia el sabor, o leche pasteurizada, que elimina la microbiota indeseable. Otra alternativa para este fin es usar alta presión, lo que también influye sobre la actividad de la plasmina y la proteólisis (Huppertz et al., 2004).

Para causar un ligero pero importante descenso del pH, a la leche se le pueden adicionar ácidos (láctico, acético, cítrico, málico o glucono- δ -lactona), mientras la adición de CaCl_2 incrementa la firmeza de la cuajada.

La leche preparada se lleva a temperatura adecuada para el desarrollo de los cultivos iniciadores, mesofílicos o termofílicos (a veces cultivos coadyuvantes). Las cepas seleccionadas se adicionan en función del tipo de queso para la conversión de lactosa en ácido láctico y para promover el desarrollo de aroma y sabor durante la maduración.

Otro paso esencial es la coagulación de la caseína, la cual puede desarrollarse siguiendo 3 mecanismos:

- i) coagulación enzimática, con adición a la leche de proteinasas de origen animal (quimosina), fúngicas o de origen vegetal
- ii) adición de ácido
- iii) adición de ácido y calentamiento

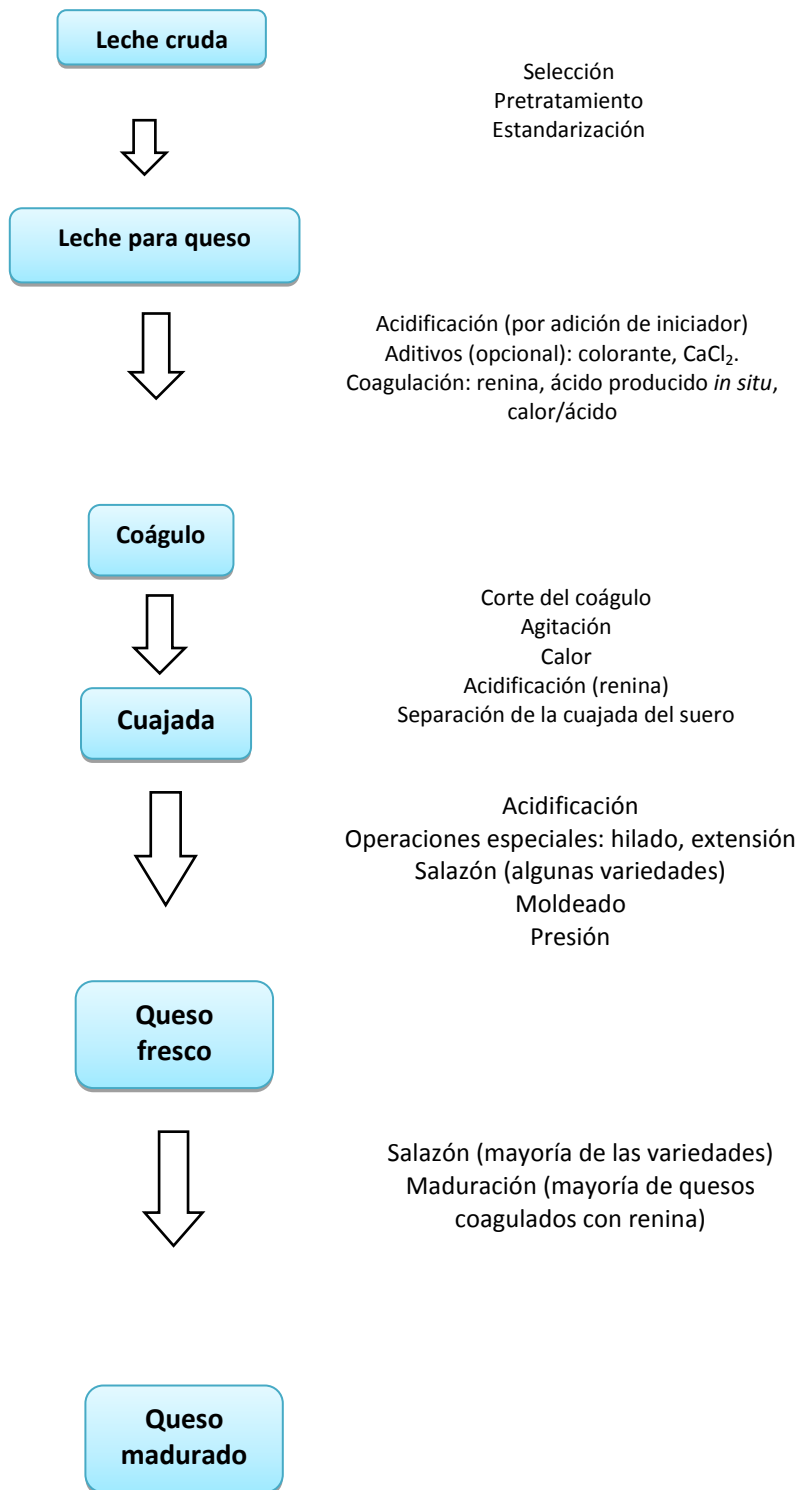


Figura 1.1. Esquema general del procesamiento de queso (modificada de Fox et al., 2000)

La más común es la coagulación con adición de quimosina, cuya acción ocurre en 2 fases. En la fase enzimática desestabilizadora, hidroliza la κ -caseína, formándose para- κ -caseína en las micelas de caseína. En la fase no enzimática, las micelas de caseína pierden la capacidad de interactuar con el agua y son forzadas a interactuar unas con otras para formar agregados micelares y cadenas, lo que produce un gel estable en reposo. Éste, al cortarse o fragmentarse da lugar a la sinéresis con expulsión de suero. La tasa y prolongación de la sinéresis está influida por muchos factores tecnológicos (tamaño del coágulo, composición de la leche, contenidos de calcio y caseína, pH, temperatura de cocción, tasa de agitación de la cuajada, tasa de agitación de la mezcla coágulo-suero de leche y tiempo) (Beresford et al., 2004; Gobbetti et al., 2015). La diferenciación entre un tipo de queso y otro depende en gran medida de la extensión de la sinéresis, aunque influyen también la composición de la leche, el tipo y cantidades del cultivo iniciador y de cuajo. La temperatura de cocción de la cuajada es otra variable y depende del contenido de humedad deseado para el queso, así como de la tolerancia del cultivo iniciador. Este factor suele variar desde 30°C (sin cocción) en quesos frescos, hasta 55°C para quesos con baja humedad. Este tratamiento térmico controla el crecimiento de los cultivos iniciadores y microorganismos indeseables.

Todos los factores tecnológicos nombrados regulan los cambios bioquímicos que pueden ocurrir durante la maduración y determinan el aroma, sabor y textura del producto final (Fox, 2004).

Tras la cocción, la cuajada suele separarse del suero por distintas técnicas específicas. Generalmente la cuajada se transfiere a moldes para drenar el suero, mientras continúa la acidificación. Se aplica presión para expulsar el suero y

mejorar la fusión de las partículas de cuajo. La adición de sal seca o salmuera, por efecto osmótico, ayuda a la expulsión de suero y a la pérdida de humedad del queso (Cocker et al., 2005).

Mientras algunos tipos de quesos se consumen frescos, otros se someten a un período de maduración donde diferentes procesos microbiológicos y bioquímicos convierten la cuajada en un queso con abundantes compuestos que generan sabor y aroma. En esta etapa, la temperatura, humedad relativa y tasas de O₂, CO₂ y amonio inciden en el desarrollo de la microbiota del queso y la actividad enzimática. La maduración tiene lugar en cámaras de temperatura y humedad controladas, siendo la temperatura de maduración característica de cada variedad de queso. El proceso puede durar regularmente entre 2 semanas y más de 2 años, pudiendo prolongarse hasta 10 años (Almena-Aliste y Mietton, 2014).

El envasado del producto final puede someterse a atmósfera protegida para prevenir la alteración o deterioro por causas microbiológicas, o el desarrollo de patógenos alimentarios, cuidando a la vez que el impacto sea el menor posible sobre la calidad del queso (Nduka, 2007).

Cada una de las fases del proceso de elaboración varía en relación al tipo de queso, pero todas afectan también al aroma, sabor y textura del producto terminado, al influir en aspectos de su composición, como el contenido en sal, humedad, grasa y pH (Cocker et al., 2005).

1.1.3. Clasificación del queso

A nivel global, la amplia diversidad de los quesos existentes hace que su categorización sea compleja y basada en diversos

criterios, especialmente de carácter tecnológico. El sistema tradicional de clasificación se basa en criterios de textura, tipo de leche, método de coagulación, temperatura de cocción, composición final del queso o el agente de coagulación. Existen también otros sistemas de clasificación por familias y enfoque didáctico. Dicho enfoque clasifica a los quesos en base a: coagulación, pérdida de humedad y maduración. Otro esquema se basa en la cinética de acidificación y la pérdida de humedad. Así, el sistema Ottogalli (Otogalli, 2000) hace referencia a criterios microbiológicos e integra características tecnológicas, químicas y sensoriales. Este modelo organiza los quesos en 3 grupos: i) Lacticinia, en base a la similitud con la leche, incluyendo productos que derivan de la leche por coagulación ácida (con o sin calentamiento); ii) Formatica, en base a la forma; iii) Miscellanea, es un grupo heterogéneo que incluye a los quesos ahumados, rallados, picantes, con frutas y especias, quesos análogos y a los elaborados con tecnología de ultrafiltración. Almena-Aliste y Mietton (2014) modificaron la versión didáctica para clasificar la mayoría de los quesos de España con DOP. Este modelo integra la naturaleza de los ingredientes crudos (materia prima), las características de la coagulación, los principales pasos del proceso y una mejor descripción de las propiedades de textura del queso.

Otra clasificación, en base a la combinación o adición de cultivos iniciadores, establece los siguientes tipos: (1) quesos elaborados con leche pasteurizada y cultivos iniciadores seleccionados; (2) quesos producidos con leche pasteurizada y cultivo iniciador natural; (3) quesos producidos con leche termizada y cultivo iniciador natural; (4) quesos producidos con leche cruda y cultivo iniciador seleccionado; (5) quesos producidos con leche cruda e iniciador natural; (6) quesos

producidos sólo con leche cruda (Mucchetti et al., 2006; Coppola et al., 2008).

Por otro lado, el catálogo de quesos de España establece una clasificación basada en: el tipo de leche (vaca, oveja, cabra, mixta); el tipo de coagulación (ácida, mixta, enzimática); el aspecto interior (textura cerrada sin ojos, textura de ojos granulares, textura de ojos redondeados), la corteza (sin corteza, untuosa y pimentonada, rugosa y con moho, seca dura y natural, blanca y mohosa, aterciopelada, lisa y cerosa). También establece diferencias según el contenido en humedad (quesos secos, contienen < 40% de agua, quesos muy húmedos > 67% de agua), el contenido en grasa sobre extracto seco (45-50% de grasa y 50%), o el proceso de maduración (maduración desde la superficie al interior del queso, o maduración en toda la masa). El tiempo de maduración define la edad del queso: los quesos tiernos tienen de 1 a 30 días de maduración, los semicurados de 1 a 3 meses, los curados de 3 a 6 meses, los viejos de 6 a 9 meses y los añejos más de 9 meses. En el presente estudio se usaron quesos de leche de cabra, semicurados y curados.

El criterio región de origen distingue quesos con DOP e IOP. De acuerdo con la tecnología de fabricación, y en función de la pasta y el tipo de coagulación, los quesos se encuadran en 3 categorías: pasta láctica, pasta enzimática y pasta mixta (MAGRAMA, 2013).

Por su origen y método de procesamiento los quesos se diferencian en quesos artesanos y quesos de fabricación industrial.

En definitiva, los criterios de clasificación son muchos y muy variados en función de muy diversos criterios. En general, desde cualquier propuesta de clasificación del queso se puede apreciar una lista muy extensa de factores que marcan su

diversidad y además determinan y definen el sabor y aroma del producto final que resulta de la percepción de compuestos orgánicos volátiles, sean de origen microbiano o no, y que han sido objeto de estudio en esta Tesis Doctoral mediante análisis por IMS.

1.1.3.1. Quesos de elaboración artesanal y quesos de fabricación industrial

Los quesos de elaboración artesanal y los de fabricación industrial siguen los pasos básicos del procesado, pero incluyen algunas diferencias. Así, los quesos de elaboración artesanal usan leche mínimamente procesada proveniente de una sola explotación ganadera junto con utensilios tradicionales y métodos manuales. Los quesos de fabricación industrial, por el contrario, se elaboran en plantas automatizadas y mecanizadas con una mezcla de leches provenientes de muchas explotaciones ganaderas. De acuerdo con Donnelly (2014), la pasteurización de la leche puede suponer una mejora del sabor a queso, un rendimiento superior, mayor uniformidad, extensión de la vida útil, simplificación del proceso de elaboración, inocuidad y facilidad de transporte. Por el contrario, también se ha descrito que los quesos de leche cruda contribuyen a una mayor riqueza en sus características organolépticas.

En la elaboración artesanal las técnicas deben acomodarse a los cambios en la composición de la leche y a las tasas de fermentación, mientras que en la producción industrial las variaciones en la composición de la leche se minimizan antes de la producción en serie. En estos últimos, la leche y la actividad del cultivo iniciador son estandarizados.

En cuanto a los aspectos microbiológicos, los quesos artesanales pueden emplear cultivos iniciadores seleccionados,

con amplia diversidad genética, o elaborarse sin ningún cultivo iniciador. En este caso, la microbiota proviene de la resiembra de suero usado en un lote anterior. A dicha microbiota contribuye la leche cruda y el ambiente lechero (piel de la ubre, pasto, suelo del establo, heces del animal, la piel del granjero o quesero, las superficies de contacto o la sal marina de la salmuera, entre otros factores). Esta microbiota desarrolla un papel durante la fermentación y maduración del queso (Escobar-Zepeda et al., 2016). Así, según De Filippis et al. (2016), el comportamiento de la microbiota durante la maduración y los parámetros tecnológicos aplicados pueden influir en la producción de queso y en la calidad del producto final. En este sentido, Casalta et al. (2009), consideran que *Lactococcus* spp. y *Lactobacillus* spp., junto a otras BAL de la microbiota autóctona, son responsables de un sabor y aroma más intenso y fuerte de los quesos de leche cruda en relación a los quesos de leche pasteurizada. En general, en los quesos de leche cruda, los VOCs provienen de la fermentación de la leche por la microbiota natural, a diferencia de los quesos de leche pasteurizada en cuyo proceso se han inoculado una o varias cepas de una o varias especies bacterianas (Ocak et al., 2015).

En base a la percepción de los consumidores europeos, un queso tradicional o de elaboración artesanal se describe como un producto de consumo frecuente o asociado con celebraciones específicas y/o estaciones del año. Se elabora con poca manipulación o ningún procesado, y es un producto diferenciado y conocido por sus peculiaridades en sabor, aroma y consistencia, asociándose a un determinado lugar, región o país. La designación "queso tradicional" también puede aplicarse a los quesos hechos en granjas o en pequeñas lecherías usando leche termizada o pasteurizada, inoculada

con varias combinaciones de inóculos y permitiendo el crecimiento y expresión de la microbiota autóctona (Guerrero et al., 2009). En base a estas diferencias, la microbiota presente contribuye de manera distinta a cada uno de estos tipos de queso. Por todo ello, España y otros países de la Unión Europea protegen sus quesos tradicionales ante potenciales fraudes, centrándose en la legislación del etiquetado, para acreditar un estándar de calidad diferenciada, apareciendo así las categorías de quesos con DOP y la IPG. Estos quesos, por sus peculiaridades y su forma de elaboración, que siguen estrictas especificaciones establecidas a través de conocimientos ancestrales, son de alto valor en el mercado (Tedeschi et al., 2013). El catálogo electrónico de quesos españoles describe en el año 2013, 33 quesos protegidos (MAGRAMA, 2015). Como valor agregado, estos productos contribuyen a la supervivencia de plantas lecheras a pequeña escala en un mundo cada vez más globalizado que promueve el comercio local y hasta internacional de nuevos productos con altas ventajas competitivas.

1.1.4. El queso como ecosistema microbiano y las características sensoriales

El queso como ecosistema se encuentra en flujo continuo en términos de factores externos, factores intrínsecos tales como la composición físico-química y las interacciones entre las diferentes comunidades microbianas. La microbiota de cualquier tipo de queso está afectada por el origen y el tratamiento de la leche, por las prácticas higiénicas aplicadas durante el ordeño, por el proceso de elaboración y, en su caso, por la maduración (Ndoye et al., 2011; Beresford et al., 2001; Caldeo y McSweeney, 2012).

El pH, junto con el potencial redox (Eh), la humedad y la concentración iónica al principio de la maduración, son cruciales al configurar el microambiente químico en el interior y superficie del queso. El ambiente químico junto con los factores extrínsecos (temperatura, humedad relativa, exposición al oxígeno y aire en circulación) y el manejo físico (frotamiento, raspado, torneado), determinan la microbiota que va a ser favorecida o suprimida en la maduración, así como las sucesiones microbianas que afectan profundamente al aroma del queso, su sabor, textura y apariencia.

El entorno químico, junto con el ambiente físico, conforman la ecología microbiana del queso en el curso de la maduración, influyendo también el proceso enzimático y físico-químico. Todos estos cambios transforman el aroma, el sabor, la textura y la apariencia visual de un queso a través del tiempo (Kindsted, 2014).

A continuación se describen los efectos potenciales de los factores ecológicos sobre el queso y su microbiología.

1.1.4.1. Actividad de agua

La actividad de agua (a_w) se define como la relación entre la presión de vapor de agua de un alimento (p) y la presión de vapor del agua pura (p_0) a la misma temperatura (McSweeney y Fox, 2004).

$$a_w = \frac{p}{p_0}$$

La a_w mide la cantidad de agua disponible para el metabolismo microbiano. Sus valores oscilan entre 0 y 1. El umbral mínimo de a_w para las BAL es algo inferior que para otras bacterias. Sin embargo, después del drenaje, salazón y durante la

maduración, la a_w oscila entre 0,917 y 0.998. La a_w disminuye debido a la evaporación del agua, adición de sal, hidrólisis de proteínas y triglicéridos. La pérdida de humedad suele controlarse mediante incremento de la humedad relativa en la sala de maduración o recubriendo el queso con cera o plástico. Diferentes zonas del queso pueden presentar variación en los valores de a_w . En quesos duros y semiduros la a_w es más alta hacia el centro (Beresford et al., 2001).

1.1.4.2. Concentración de sal

La adición de sal al queso aumenta la presión osmótica en la célula bacteriana, a la vez que reduce la a_w , inhibiendo el desarrollo microbiano. La concentración de sal necesaria dependerá del pH y del contenido de humedad. Generalmente 0.7-100 g/100 g es suficiente para el queso, lo cual corresponde a valores de a_w de entre 0.97 y 0.99, respectivamente (Beresford et al., 2001).

1.1.4.3. pH y ácidos orgánicos

Debido a la acumulación de ácidos orgánicos, a un pH comprendido entre 4.5-5.3 no sobrevivirían especies microbianas sensibles a pH ácido, mientras que sí lo hacen las BAL (Beresford et al., 2001). La determinación del pH controla de forma indirecta la fermentación y el crecimiento de BAL (Caldeo y McSweeney, 2012).

1.1.4.4. Temperatura de maduración

Las bacterias relacionadas con la elaboración del queso y su maduración son mesofílicas o termofílicas (principalmente mesófilas) con temperaturas de crecimiento que oscilan entre 30-42°C, respectivamente. La temperatura a la cual se madura un queso es un equilibrio entre la necesidad de

favorecer las reacciones de la maduración y a la vez propiciar el crecimiento de una microbiota secundaria deseable que evite la contaminación por potenciales bacterias patógenas. Temperaturas más elevadas aceleran la maduración, pero los cambios de textura, sabor y aroma son a menudo no deseables (Beresford et al., 2001).

1.1.4.5. *Potencial redox*

El potencial de oxidación-reducción (E_h) es otra característica fisicoquímica que define el microambiente del queso durante su elaboración y maduración. El E_h mide la tendencia del queso a oxidarse o reducirse.

El queso es un sistema esencialmente anaeróbico por el crecimiento del cultivo iniciador que reduce el oxígeno en la leche. Así, en esta matriz pueden crecer microorganismos anaerobios estrictos o facultativos. El E_h selecciona los microorganismos en el queso, pudiendo variar desde +300 mV para aerobios a menos de -400 mV para anaerobios. Algunos estudios demuestran que la leche a 25°C y pH 6.6-6.7 tiene valores positivos de E_h , mientras que diferentes tipos de quesos tienen valores negativos, -180 mV, -300 a -360 mV (Caldeo et al., 2012). El E_h negativo en el interior de un queso excluye a microorganismos aerobios estrictos, como *Pseudomonas*, *Brevibacterium*, *Bacillus* o *Micrococcus* spp., que sí pueden crecer en la superficie (Beresford et al., 2001). El potencial redox negativo de un queso también contribuye al desarrollo del sabor y favorece la estabilidad del aroma. Además, la anaerobiosis y un potencial redox bajo contribuye al desarrollo de un aroma y sabor homogéneos (Caldeo et al., 2012). Por consiguiente, el control del E_h durante la elaboración de queso y su maduración podría ayudar a precisar el desarrollo de aroma en el queso.

1.1.4.6. Interacciones microbianas

En general, la microbiota del queso es una comunidad funcional, formada por la sucesión de grupos microbianos que actúan a lo largo del proceso de elaboración (Achilleos y Berthier, 2013), durante la fermentación de la leche, la maduración de la cuajada y el almacenamiento del producto. Es así como diferentes grupos microbianos, bacterias (sobre todo BAL), levaduras y mohos están presentes simultáneamente en los quesos tradicionales elaborados con leche cruda. Las bacterias encontradas al final de la maduración de un queso son las supervivientes y las mejor adaptadas a los cambios físico-químicos del ambiente y que a la vez han desplazado a los microorganismos competidores. Por tanto, la composición y evolución de esta comunidad definen las características singulares de un queso, su vida media y su seguridad. El conocimiento de estas interacciones microbianas ofrece la base para mejorar el aroma y el sabor del queso, así como controlar y prevenir el desarrollo de patógenos o microorganismos alterantes (Wouters et al., 2002; Irlinger y Mounier, 2009). Finalmente, la función de cada organismo en la comunidad microbiana aún no ha sido totalmente comprendida en términos de producción de compuestos relacionados con el aroma y sabor (Escobar-Zepeda et al., 2016).

1.2. EL AROMA DEL QUESO Y LA MICROBIOTA IMPLICADA

1.2.1. Percepción del aroma y sabor a queso

El aroma y el sabor son atributos esenciales para la aceptación del queso por parte del consumidor. El aroma del queso proviene de una mezcla equilibrada de compuestos orgánicos volátiles, con diversidad de grupos funcionales, mientras que los compuestos no volátiles (ácidos orgánicos, sales minerales, aminoácidos libres o péptidos hidrolizados) se asocian al sabor. La percepción del aroma y el sabor del queso resulta de interacciones sensoriales complejas; éstas ocurren antes, durante y después del consumo e incluyen apariencia, aroma y textura (Niimi et al., 2014a; Niimi et al., 2016).

La percepción de sabor es compleja y se entiende como la sensación que surge en receptores cerebrales a partir de la integración o interacción de señales químicas provenientes de la estimulación simultánea de varios sentidos (Delahunty y Drake, 2004).

En la percepción del sabor son importantes la matriz alimentaria y el valor de actividad odorífera, es decir, la relación entre la concentración de un compuesto en un producto y el umbral nasal o retronasal de ese compuesto cuando se encuentra en el producto o en una matriz muy similar. Por otra parte se ha demostrado que el aroma está influenciado por los sabores dulce, salado, ácido, amargo y umami (los compuesto del sabor umami son glutamato monosódico, inosina 5' monofostato y guanilo 5' monofosfato (Iwaniak et al., 2016); y a la inversa, los sabores influyen el aroma (Fujimaru y Lim, 2013). Es decir, en la mezcla de

sabor y aroma ocurren interacciones sensoriales cruzadas (Niimi et al., 2015).

De acuerdo a lo anterior, el sabor a queso durante el consumo estará determinado no sólo por la percepción de un compuesto individual sino por una mezcla de compuestos volátiles responsables del sabor. Niveles de sabor y aroma conjuntos producen percepciones características y específicas para un tipo particular de queso. Sin embargo, un cambio en la concentración de los componentes volátiles o no volátiles puede cambiar su equilibrio y alterar el sabor percibido. De esta manera las combinaciones anómalas ocasionan sabores anómalos en un producto (Guerrit et al., 2005; Niimi et al., 2016).

Así mismo, la percepción del aroma y otras características sensoriales de un queso reflejan la leche de la cual proviene, el proceso usado en su producción y los cambios físicos y químicos que ocurren durante la maduración. Cabe resaltar que la calidad de la leche usada está determinada por la raza del animal, por su dieta y el estado de lactación. Por otra parte, el tratamiento de la leche antes de la producción de queso, en particular el tratamiento térmico, puede destruir microorganismos y reducir la actividad enzimática, limitando el desarrollo del carácter sensorial durante la maduración. Además, la temperatura y el tiempo de maduración pueden variar e influir sobre el aroma del queso.

Durante la producción de queso, el coagulante usado para formar la cuajada, la cantidad de sal añadida, el tipo de cultivo iniciador y el uso de cultivos adyuvantes establecerán también las características sensoriales (Kindsted, 2014).

Las moléculas odoríferas clave para el olor y el sabor del queso pueden ser analizadas por una técnica instrumental de

vanguardia, la espectrometría de movilidad iónica, la cual se describirá más adelante.

1.2.2. La microbiota del queso

En la leche cruda se han descrito más de cuatrocientas especies microbianas, que incluyen BAL, bacterias Gram positivas-catalasa positivas, bacterias Gram negativas, levaduras y mohos. Esta biodiversidad disminuye hacia el centro del queso, a cuyo nivel domina numéricamente un pequeño número de BAL. La microbiota persiste de manera general en la superficie del queso, donde hay más O₂ disponible. Allí existen numerosas especies de bacterias (*Corynebacteriaceae* y *Micrococcaceae*), levaduras y mohos. La diversidad de la microbiota del queso se explica por una amplia variación en la dinámica de las mismas especies en quesos diferentes (Montel et al., 2014).

Los quesos de cabra contienen microorganismos provenientes de la leche de origen. Se usa para elaborar quesos a nivel de granja o en pequeñas lecherías. Estos quesos son particularmente comunes en el sur de Europa y países del Mediterráneo. La leche de cabra es típicamente dominada por BAL incluyendo especies de *Lactococcus* (3.7×10^6 UFC mL⁻¹), *Lactobacillus* (1.34×10^5 UFC mL⁻¹), *Leuconostoc* (3.27×10^3 mL⁻¹) y *Enterococcus* (2.95×10^2 UFC), como también *Enterobacteriaceae*, *Micrococcaceae*, mohos y levaduras (Montel et al., 2014).

La microbiota típica de la leche de origen en el queso suele encontrarse acompañada de *Corynebacteria* y *Brachybacteria*, y varias especies halófilas no asociadas previamente con la leche. La microbiota también varía de acuerdo a cambios

estacionales, dominando en invierno *Lactococcus* y *Pseudomonas*, en verano *Klebsiella*, o en otoño *Chrysobacterium*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus*, *Corynebacteria* y levaduras. Estas diferencias se atribuyen a cambios en alimentación, condiciones de clima y estado de salud de los animales (Stellato et al., 2015).

Adicionalmente, existe una microbiota asociada a la maquinaria, superficies, agua, es decir al ambiente de la quesería. Dependiendo del tipo de microorganismo, esta microbiota puede ser funcional para la maduración del queso, o al contrario puede significar un peligro para la calidad y seguridad del producto (Stellato et al., 2015). Todas estas bacterias pueden contribuir a configurar la microbiota del queso. Se conoce que cepas específicas aisladas de la leche se han adicionado a cultivos iniciadores o coadyuvantes.

1.2.2.1. Bacterias acidolácticas

Se han catalogado más de mil variedades de queso en el mundo entero. Cada una es única respecto al sabor, aroma y textura (Gobbetti et al., 2015). En realidad, la complejidad, dinámica y diversidad de un queso visto como sistema no puede explicarse sin la intervención de una microbiota que está naturalmente presente en la leche o que haya sido adicionada deliberadamente. Gran parte de esta microbiota está constituida por las BAL, que determinan las características sensoriales, la vida media y la inocuidad de un queso (Gänzle, 2015).

Las BAL típicas son bacterias de pared Gram-positiva, bacilos o cocos no formadores de esporos, no móviles, catalasa negativas, quimiorganotrofos, exigentes en sus requerimientos

nutritivos, ya que necesitan azúcares preformados, aminoácidos, vitaminas del grupo B y bases purínicas y pirimidínicas. En cuanto a los requerimientos ambientales, su rango de temperatura varía entre 5-45°C. Algunas pueden crecer a pH 3.2 y otras a valores altos como 9.6, aunque la mayoría crece entre pH 4.0-4.5. Las BAL, a pesar de su metabolismo anaerobio son aerotolerantes y en presencia de aire pueden formar colonias en medios sólidos. Estas bacterias, gracias a un buen sistema de transporte celular y enzimas hidrolíticas, pueden fermentar la lactosa y otras hexosas. Su principal producto metabólico es el ácido láctico (Pescuma et al., 2008; Holzapfel y Wood, 2014), si bien las heterofermentativas también forman productos adicionales, como el acetato, etanol, CO₂, formato o succinato (Kleerebezem y Hugenholtz, 2003).

Filogenéticamente, las BAL corresponden al filo Firmicutes, clase I: *Bacilli*, orden II: *Lactobacillales* que agrupa 6 familias: *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae*, *Streptococcaceae*, las que en total comprenden 40 géneros, entre los que se encuentran *Lactobacillus* y *Lactococcus* (Crowley et al., 2013; Holzapfel & Wood, 2014). Estas bacterias son generalmente consideradas como seguras: 'Generally Regarded As Safe' (GRAS) y/o de presunción calificada de seguridad 'Qualified Presumption of Safety' (QPS) por la *Food and Drug Administration* (FDA) y la *European Food Safety Authority* (EFSA), respectivamente, por haber demostrado efectos beneficiosos e inocuidad tras largos periodos de consumo (FDA, 2010; Valenzuela et al., 2015). Sin embargo, estudios de bioseguridad han revelado que algunas especies de BAL están implicadas en casos aislados de patogenicidad en individuos predispuestos (Bernardeau et al., 2008).

Desde el punto de vista tecnológico, los géneros más importantes de BAL son *Lactococcus* y *Lactobacillus*. *Lactococcus lactis* incluye dos subespecies, *L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris*, que son muy conocidas por su papel como iniciadores en la industria del queso. Estos microorganismos se distinguen fenotípicamente unos de otros por la utilización de arginina y citrato, por la temperatura de crecimiento, tolerancia a la sal, capacidad de fermentar la maltosa y actividad glutamato decarboxilasa, que son positivas para *L. lactis* subsp. *lactis* (Nomura et al., 2006). Sin embargo, el fenotipo y las designaciones genotípicas no se corresponden necesariamente, introduciendo cierta confusión en su taxonomía (Kelly et al., 2010). Adicionalmente, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (*L. diacetylactis*) asimila el citrato, produciendo diacetilo, un potente compuesto responsable del aroma (Fernández et al., 2011).

Lactococcus está presente de forma natural en las plantas, en la leche y en quesos artesanales, pero también pueden adicionarse a quesos de leche pasteurizada. Su principal función es la acidificación mediante la formación de L-lactato, contribuyendo además a la proteólisis (Mills et al., 2010) y a la conversión de aminoácidos en alcoholes, cetonas y aldehídos, a la utilización del citrato y al metabolismo de las grasas (Quigley et al., 2013).

El género *Lactobacillus* es muy diverso, se encuentra en nichos ricos en carbohidratos y en la leche cruda. Se caracteriza por sus actividades proteolítica y lipolítica, así como por su capacidad para producir compuestos del aroma y exopolisacáridos. Varios lactobacilos agrupados como bacterias acidolácticas no iniciadoras (BALNI) se adaptan a las

condiciones de maduración del queso (depleción de nutrientes, pH ácido, a_w baja) y pueden hidrolizar proteínas y lípidos para generar compuestos que contribuyan al aroma, sabor y textura del queso. Este género incluye: *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum/paraplantarum*, *L. rhamnosus*, *L. curvatus* y *L. brevis*, entre las especies más frecuentes.

En el presente trabajo se usaron *L. casei*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris* para el estudio de metabolitos volátiles específicos para la discriminación de estas bacterias de interés en la tecnología del queso.

1.2.2.2. Cultivos iniciadores y cultivos no iniciadores de BAL

El queso alberga una microbiota altamente diversa. Sin embargo, en su elaboración se usan tres tipos de cultivos: cultivos iniciadores primarios (*starters*), cultivos secundarios o coadyuvantes, y bacterias no iniciadoras (*nonstarters*) (Beresford et al., 2004; Irlinger et al., 2009). Actualmente, la industria quesera utiliza los cultivos iniciadores definidos e indefinidos (Smid et al., 2014).

La función primaria de los cultivos iniciadores durante la elaboración del queso es producir suficiente ácido a través de la producción de L-lactato, para reducir el pH de la leche a un nivel deseado. Igualmente estos cultivos contribuyen a la maduración del queso debido a que sus enzimas están implicadas en la proteólisis, lipólisis y en la conversión de aminoácidos a compuestos responsables del aroma y el sabor (alcoholes, cetonas, aldehídos). *Lactococcus* posee una mayoría de enzimas intracelulares que se liberan por autólisis. Se ha demostrado que los quesos elaborados con estas cepas

son de mejor sabor. Los cultivos secundarios no juegan un papel durante la elaboración del queso pero están implicados con las bacterias iniciadoras en el proceso de maduración (Beresford et al., 2004).

Las bacterias lácticas no iniciadoras conforman la mayoría de la población de lactobacilos en muchas variedades de queso; no contribuyen a la producción de ácido pero contribuyen al desarrollo del sabor durante la maduración del queso. Estas bacterias se subdividen en tres grupos: homofermentativas estrictas, heterofermentativas facultativas y heterofermentativas estrictas (Beresford et al., 2004). Entre los lactobacilos heterofermentativos mesófilos se encuentran principalmente *L. casei*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* y *L. curvatus* (Beresford et al., 2001). Las BAL homofermentativas, por la producción de ácido láctico, influyen sobre la textura, el contenido de humedad y la inhibición de patógenos.

La microbiota mesófila no iniciadora proviene de la leche cruda y del ambiente. Su presencia se incrementa tras la autólisis de la microbiota termófila en la fase de maduración, lo que ocurre cuando toda la lactosa residual del queso ha sido utilizada por los iniciadores. Junto a las BAL no iniciadoras, otras bacterias, levaduras y mohos están implicados en la producción de compuestos del sabor y aroma (Neviani et al., 2009; Quigley et al., 2012).

1.2.3. El desarrollo del aroma en el queso

El aroma y sabor (*flavour*) de un queso resulta de un proceso bioquímico que está influenciado por el tipo y la composición química de la leche, por la forma de procesamiento y por los

microorganismos que contribuyen con su sistema enzimático. En este apartado, y tras revisar el procesamiento y la microbiota del queso, se describirá lo más relevante de la bioquímica del *flavour*.

Las rutas metabólicas que ocurren en el queso durante la maduración se agrupan en: 1) metabolismo de lactosa residual, lactato y citrato; 2) lipólisis y metabolismo de los ácidos grasos resultantes; y 3) proteólisis de la caseína, conversión a péptidos y aminoácidos y el catabolismo de los aminoácidos a compuestos volátiles del olor y sabor.

Por otra parte, la producción de sabor y aroma está condicionada por la actividad de enzimas que degradan la leche así como por la complementación de rutas metabólicas por distintas cepas microbianas. Las Figuras 2.1 y 2.2 muestran las rutas bioquímicas que conducen a la formación de sabor y olor en los quesos (Jelen et al., 2012).

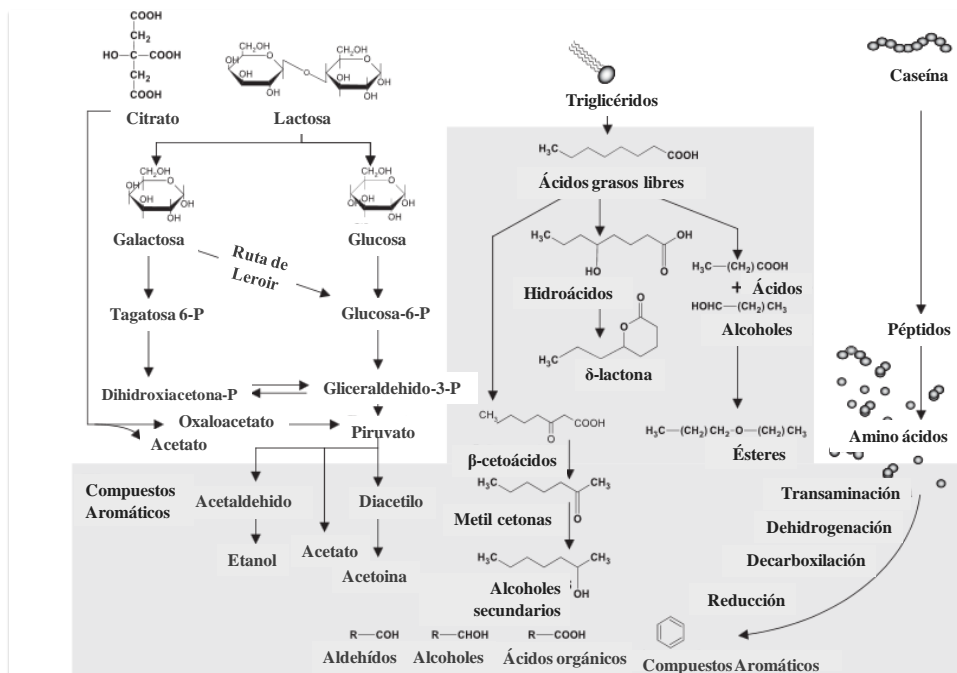


Figura 2.1. Rutas metabólicas en microorganismos conducen a la formación de metabolitos secundarios (superficie gris) responsables del sabor y aroma en el queso (Jelen et al., 2012).

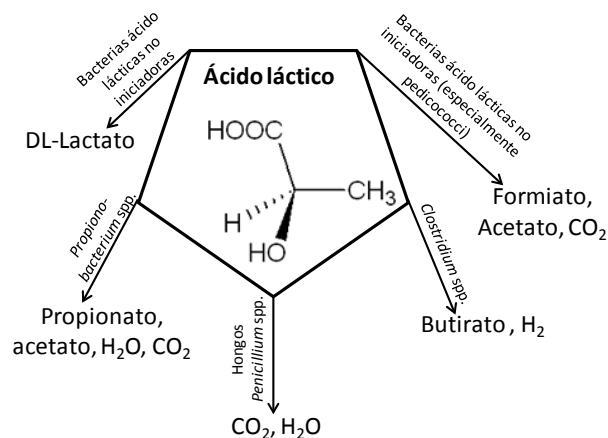


Figura 2.2. Productos derivados del metabolismo de ácido láctico (Jelen et al., 2012).

1.2.3.1. Metabolismo de la lactosa

Un paso clave en la elaboración del queso es el metabolismo de la lactosa a D-Lactato por el crecimiento de cultivos iniciadores o por racemización del L-lactato. La lactosa se hidroliza por un cultivo tipo, el cual produce glucosa y galactosa. La glucosa se oxida a piruvato por la ruta Emden-Meyerhof. La galactosa, por la ruta Leloir pasa a glucosa-6-fosfato y gliceraldehido-3-fosfato hasta convertirse en piruvato, que es el compuesto de partida para la formación de diacetilo, acetoína, acetato, acetaldehído y etanol (Marilley et al., 2004). La extensión de esta ruta depende de la población de cultivos no iniciadores y de la disponibilidad de oxígeno (McSweeney y Sousa, 2004).

El lactato también puede ser metabolizado durante la maduración a propionato, acetato, agua y CO₂. El lactato y el propionato contribuyen al sabor del queso. El metabolismo anaeróbico de lactato produce butirato e hidrógeno y puede ocasionar hinchamiento en el queso. El lactato puede oxidarse

a CO₂ y H₂O; además, se convierte en formato, etanol y acetato (por *Pediococcus*) (McSweeney et al., 2004).

1.2.3.2. Utilización del citrato

El citrato es un importante precursor de compuestos responsables del aroma y el sabor, y es metabolizado por cepas citrato positivo de *Lactococcus*. Los productos del metabolismo del citrato incluyen CO₂, acetolactato y los compuestos diacetilo y acetoína (Marilley et al., 2004).

1.2.3.3. Metabolismo de los lípidos

Los lípidos del queso pueden ser oxidados o hidrolizados, pero la oxidación puede ser muy limitada por un potencial redox negativo (alrededor de -250 mV) (Collins et al., 2003).

Los agentes lipolíticos son proteinasas y lipasas (enzimas presentes en la leche), el coagulante renina y enzimas intracelulares esterolíticas y lipolíticas de la microbiota (cultivos iniciadores, no iniciadores y coadyuvantes). Estas enzimas liberan los ácidos grasos durante el período de maduración (Fernández et al., 2000). Al mismo tiempo, los ácidos grasos son sustratos de reacciones enzimáticas y precursores de compuestos volátiles del sabor y aroma, que se originan por β -oxidación y decarboxilación dando lugar a metilcetonas y alcoholes secundarios, mientras la esterificación de hidroxiácidos produce lactonas. Los ácidos grasos reaccionan con alcoholes para formar ésteres como el butanoato de etilo, hexanoato de etilo y acetato de etilo (McSweeney y Sousa, 2000). Los ácidos grasos del queso tienen bajo umbral de olor y contribuyen al aroma y sabor de

muchas variedades de queso. Sin embargo, la lipólisis también puede producir defectos en el sabor y aroma.

1.2.3.4. Proteólisis

La proteólisis es más compleja, y el proceso de mayor importancia del metabolismo primario durante la maduración del queso. La caseína es hidrolizada por la actividad residual del coagulante (quimosina) y por proteinasas endógenas de la leche (plasmina). Esta hidrólisis afecta a un rango de péptidos de tamaño mediano y pequeño mientras que las proteinasas de la cubierta celular y peptidasas intracelulares de BAL producen péptidos solubles en agua y aminoácidos. Las bacterias iniciadoras tienen mayor actividad proteolítica que las no iniciadoras.

La proteólisis favorece una textura suave del queso debido a la hidrólisis de la caseína de la cuajada y por la disminución de la a_w . Además influye sobre el aroma y el sabor a través de la producción de péptidos cortos y aminoácidos. Por otro lado, la degradación de la caseína durante la maduración de los quesos puede formar péptidos causantes de sabor amargo.

1.2.3.5. Metabolismo de aminoácidos libres

Las BAL usan aminoácidos para sintetizar proteínas. Además, estos compuestos sirven como fuente de energía para obtener el pH interno adecuado en un ambiente ácido, para regenerar co-substratos y para biosíntesis. Por otra parte, los aminoácidos son precursores de reacciones catabólicas de decarboxilación, deaminación, dehidrogenación, reacciones importantes para el aroma y el sabor de los quesos.

Las reacciones catabólicas necesitan decarboxilasas, transaminasas, deaminasas, liasas y dehidratasas, mientras las enzimas requieren de factores ecológicos favorables (pH, a_w , temperatura, sustratos) para su funcionamiento.

Dos rutas principales convierten los aminoácidos en compuestos responsables de aroma y sabor: reacciones de eliminación catalizadas por aminoácido liasas y rutas iniciadas por aminotransferasas. Las aminotransferasas convierten los aminoácidos en sus correspondientes cetoácidos, compuestos intermediarios clave para el desarrollo del aroma. Dichos compuestos pueden ser convertidos a α -hidroxiácidos, a derivados de acetil-CoA y aldehídos, en función de los aminoácidos precursores. Posteriormente, los aldehídos pasan a alcoholes y los alcoholes a ácidos carboxílicos (Steele et al., 2013). Así, a partir de leucina, empezando por una reacción de transaminación para formar α -ceto-iso-caproato, *L. casei*, *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris*, usados en esta Tesis, han producido 3-metil butanal, y por posterior reducción 3-metil butanol, un compuesto con aroma descrito a queso fresco, penetrante, alcohólico, típico del queso de cabra.

1.2.4. El desarrollo del aroma y el sabor del queso bajo el enfoque de la biología de sistemas

Desde el enfoque de la biología de sistemas, el desarrollo del aroma y sabor en el queso puede ser comprendido mejor con los nuevos aportes de la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica. En este contexto, los estudios genéticos han logrado avances en el conocimiento de la evolución de las BAL, su genética, fisiología, diversidad y metabolismo, aspectos que son de interés directo para la

tecnología del queso. Además, el análisis de la transcripción del genoma ha llevado a explorar las funciones de genes desconocidos y los reguladores pleiotrópicos (globales) en la formación de estos compuestos de interés para el aroma y el sabor. Finalmente, la metabolómica, desde el estudio sistemático de una única huella química ligada a procesos celulares específicos, es fundamental para la comprensión del aroma y sabor del queso, debido a que resulta de la acumulación de metabolitos de BAL. Los aportes de la metabolómica en el estudio de estos compuestos han producido una librería de posibles compuestos responsables del aroma y el sabor, así como el estudio de los requerimientos nutritivos de bacterias no iniciadoras y el flujo celular en la producción de los compuestos clave del *flavour* (Steele et al., 2013).

1.2.5. Importancia de los compuestos del sabor y aroma en agroalimentación

Los VOC_s en general, al igual que los VOCs de origen biológico (BVOC_s) desempeñan un papel importante en la ciencia de los alimentos, debido a que originan el aroma y sabor (*flavour*), atributos clave que determinan la calidad organoléptica y aceptabilidad de un alimento (Biasioli et al., 2011). Estos compuestos se caracterizan por su alta presión de vapor, un peso molecular menor a 300 Da, con polaridad variable, pero que pueden ser percibidos por el sistema olfatorio humano cuando su concentración sobrepasa el umbral de olor con valores en ng L⁻¹ o ng Kg⁻¹ aunque estos valores bajos dificultan su identificación y cuantificación (Jelen et al., 2012).

Los compuestos volátiles del aroma se producen y liberan en casi todos los pasos de la cadena de producción “de la granja a la mesa”. En la cadena del queso, el análisis de VOCs es interesante para controlar el procesamiento, la maduración y almacenamiento de este producto.

Un perfil aromático es dinámico, se define por la apreciación sensorial y puede ser una evidencia de calidad. Hay experiencias en que la comparación de un queso original con sus imitaciones, revelan que el perfil del original tiene una mayor cantidad de volátiles y un aroma más desarrollado que los otros quesos. Por otro lado, quesos similares a quesos artesanales (originales) pero producidos industrialmente muestran un sabor menos intenso que los quesos originales (Majcher et al., 2010).

De igual manera, para detectar la existencia de una adulteración y garantizar la autenticidad de un queso se puede determinar la cantidad de uno o más compuestos marcadores en la muestra de ensayo y comparar el resultado con un queso de referencia, siendo importante considerar que la producción de queso puede variar según el sistema de alimentación de los animales proveedores de la leche, los cultivos iniciadores usados, la temperatura de calentamiento, el salazonado y el tiempo de maduración. Estas variables producen diferencias de carácter físico, químico y microbiológico, sensibles de detección y que al ser estudiadas puede indicar el origen de los quesos (Tedeschi et al., 2013).

Respecto a estudios de autenticidad, cabe señalar que la alteración más común en la producción de queso puede ser la sustitución completa o parcial de una leche original por otra, de menor precio y mayor disponibilidad (Hrbek et al., 2014),

lo que podría evidenciarse mediante el perfil de volátiles. Paralelamente, las emisiones de volátiles generadas en el procesado de alimentos, por los cultivos, en las industrias alimentarias, granjas y plantas de compostaje también pueden resultar de interés para el aprovechamiento de residuos de la industria agroalimentaria.

1.2.6. Importancia de los compuestos orgánicos volátiles producidos por los microorganismos del queso

Durante la elaboración y maduración del queso se producen emisiones por un alto número de BAL y otros microorganismos responsables del aroma. Al final, la apariencia de un perfil volátil característico se atribuye al metabolismo específico o ruta metabólica que está activa en la bacteria. También depende del sustrato y de las condiciones de crecimiento, pH, humedad y temperatura por lo que el aroma de compuestos liberados puede variar dando lugar a perfiles diferentes. Además, el metabolismo bacteriano varía en sus sucesivas fases de latencia (lag), exponencial (log) y estacionaria.

La producción bacteriana de volátiles puede ser elevada y muy diversa. Existe una base de datos (Lemfack et al., 2014) que cataloga cerca de mil VOCs identificados a partir de microorganismos, de gran importancia por su relevancia biológica, pues los volátiles además de ser responsables del sabor y aroma de un alimento también pueden mediar interacciones que permitan el crecimiento, la supervivencia o inhibición de poblaciones bacterianas en nichos ecológicos como el queso, así como el desarrollo de comunidades de diferentes microorganismos.

Se asume que los volátiles de origen bacteriano, de modo similar a otros volátiles de origen biológico, también pueden servir como i) infoquímicos, ii) señalizadores celulares, iii) válvula de liberación de carbono y iv) promotores o inhibidores de crecimiento celular (Kai et al., 2009). Durante la maduración del queso, los volátiles producidos por la microbiota láctica, derivados del terpeno, benceno, compuestos alifáticos y sulfuro podrían estar implicados en reacciones antagónicas frente a microbiota indeseable. Desde otro enfoque, la detección de volátiles microbianos también está relacionada con la contaminación de productos alimenticios. Su presencia puede reflejar la condición del crecimiento y el deterioro (Wang et al., 2016).

1.3. EL ANÁLISIS DE AROMA EN ALIMENTOS Y MICROORGANISMOS

El análisis del aroma en alimentos incluye las fases de extracción, separación y cuantificación de los VOCs, lo que representa ciertas dificultades debido a la baja concentración de estos compuestos, por su umbral odorífero muy bajo y la complejidad de la matriz alimentaria. Además, la selección del método de extracción y la instrumentación que se prevé usar deberá estar acorde a las características químicas, polaridad y volatilidad de estos compuestos (Jelen et al., 2012). Finalmente, es indispensable disponer de un programa informático adecuado (*software*) y de métodos estadísticos para el procesamiento de datos, que además requieren una cuidadosa interpretación.

A continuación se comentarán brevemente las técnicas usadas para una caracterización rápida de productos agroalimentarios mediante la obtención de una huella espectral de la fracción volátil.

1.3.1. Cromatografía de gases

La GC es una de las técnicas de separación más comúnmente usadas para analizar sustancias que puedan ser vaporizadas a la temperatura de inyección, incluyéndose en este grupo los compuestos del aroma, del sabor y los causantes de olores anómalos en el queso. La GC es una técnica valiosa usada para caracterizar compuestos activos, compuestos de impacto responsables del olor característico de una muestra de queso (Delgado et al., 2011; Yücen et al., 2009).

Esta técnica permite separar diferentes componentes de una muestra. Al vaporizar la mezcla en una cámara de

calentamiento, los componentes se arrastran por un gas inerte como He o N₂ y pasan a través de la columna interactuando con el material de la cubierta. La columna contiene una fase estacionaria líquida que es adsorbida en la superficie de un tubo capilar delgado fusionado con sílica. Se pueden emplear varios detectores entre ellos, MS o ionización de llama (FID). Actualmente, se usa MS para obtener la huella espectral de un perfil cromatográfico, así como para determinar la autenticidad del producto (Kamal et al., 2015). Además, se pueden realizar análisis cualitativos y cuantitativos (Luykx et al., 2008). El acoplamiento GC-MS tiene una gran capacidad de identificación para el análisis de volátiles de origen microbiano.

El estudio de la evolución del perfil volátil de un queso de cabra elaborado con leche cruda, con DOP, aplicando el método de Microextracción en Fase Sólida-Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (SPME-GC-MS, de sus siglas en inglés) detectó un total de 64 compuestos (14 ácidos, 18 alcoholes, 13 ésteres, 6 cetonas y 13 de otros grupos), siendo los ácidos carboxílicos los más abundantes. El contenido de compuestos volátiles fue modificado significativamente ($P < 0.05$) durante la maduración (Delgado et al., 2011).

Otro estudio posterior evidenció que el perfil de VOCs en quesos variaba según el sistema de ganadería y el estado de lactación (Bergamaschi et al., 2015). Anteriormente se confirmó la variación de ácidos grasos en el queso, según el tipo de pasto consumido para la producción de leche (Falchero et al., 2010).

Con la GC se ha demostrado que la detección de terpenos y el perfil de aromas en quesos están influidos por el sistema de alimentación (pasto o concentrado) del ganado, por lo cual se podrían discriminar los quesos por esta variable (Viallony et

al., 2000) y también por el origen geográfico (Fernández et al., 2003). Además, la composición de ácidos grasos de la leche puede variar según la altura geográfica de localización de los pastos (Tedeschi et al., 2013).

Los contenidos de terpenos también fueron distintos en quesos elaborados con leche pasteurizada y cruda, observándose cambios en estos últimos, atribuibles a la tecnología aplicada como una diferente microbiota o tiempo de maduración (Cornu et al., 2005).

Además, empleando HS-GC con FID o MS como detectores se discriminó queso Emmental elaborado en Suiza de los elaborados en otros países europeos (Pillonel et al., 2003). También se diferenciaron quesos Mozzarella naturales de imitaciones mediante el perfil de ácidos grasos y el contenido de fitosterol (Kim et al., 2014). Las ventajas de la GC como herramienta para el análisis de la fracción volátil en el queso son su alta sensibilidad, versatilidad y reproducibilidad (Kamal et al., 2015). Sin embargo, el sistema requiere de operadores entrenados para realizar análisis e interpretar resultados; aun así se considera su potencialidad para diferenciar volátiles de varios quesos. Cabe mencionar que algunos problemas han impedido su uso generalizado para la autenticación de quesos, entre ellos la variabilidad introducida por los múltiples sistemas que existen para el muestreo del espacio de cabeza. Finalmente, se cree que los volátiles están ligados al origen geográfico de la leche, a la tecnología del queso y a su microbiota de modo que cambios mínimos en estos factores pueden causar impacto en el perfil de volátiles.

1.3.2. Sistema espacio de cabeza-espectrometría de masas

En el sistema espacio de cabeza-espectrometría de masas (HS-MS) la información espectral resulta de la ionización suave (a presión atmosférica o ionización química) y fragmentación simultánea de una mezcla de moléculas que se formaron en la cámara de ionización del espectrómetro de masas, lo que ocurre sin previa separación cromatográfica. El espectro obtenido constituye la huella química característica del producto alimenticio sometido a análisis. La huella espectral se aplica para la clasificación, predicción de propiedades sensoriales o la estimación de parámetros tecnológicos (Péres et al., 2003).

El sistema HS-MS consta de: i) un módulo para extracción-inyección; ii) la línea de transferencia (mantiene vacío de alta calidad en la fuente del espectrómetro); y iii) el espectrómetro de masa.

La extracción de compuestos volátiles se puede hacer de una manera simple, sin preconcentración, aplicando los sistemas estáticos de espacio de cabeza. Dichos sistemas consisten en muestrear el espacio de cabeza una vez que se ha establecido el equilibrio entre la matriz y la fase gaseosa con preconcentración, que mejora la sensibilidad del sistema pero introduce un paso adicional, el cual puede significar un limitante y/o generar artefactos analíticos (Péres et al., 2003).

Entre los métodos clásicos de extracción de volátiles con preconcentración se encuentran el sistema purga y trampa (P&T) y los sistemas dinámicos de espacio de cabeza (DHS). En ambos sistemas, los componentes volátiles se purgan por una corriente de gas inerte y se retienen en un adsorbente. Las moléculas retenidas son desorbidas por calentamiento e

inyección en la cámara de ionización del MS (Péres et al., 2003).

Las técnicas P&T y DHS requieren un equipamiento complejo (válvulas, doble circuito de gas, etc.). Por el contrario la microextracción en fase sólida usa un método de concentración que se basa en la exposición de una fibra en el espacio de cabeza de la muestra para atrapar los componentes volátiles en la fibra. La fibra está recubierta por una fina capa de adsorbente que fija los compuestos que posteriormente son desorbidos por calentamiento e inyección en la cámara de ionización del MS (Majcheret et al., 2015).

La microextracción en fase sólida incluye extracción dinámica en fase sólida, además de espacio de cabeza, desorción, extracción y barra de agitación. Los procesos de desorción-extracción, en la versión comercial, se denominan "twister". Una revisión detallada de estos métodos se puede encontrar en la bibliografía (Pillonel et al., 2002).

En resumen, la técnica HS-MS proporciona una huella espectral de una muestra tras un análisis de pocos minutos de su fracción volátil. Este método de ionización suave (a presión atmosférica con ionización química) asociado a métodos de alta resolución, analizadores de masa (tiempo de vuelo -*time of flight*, TOF- o trampa de iones), permite en la actualidad obtener información sobre el origen molecular de los iones y deducir la identidad de ciertos compuestos.

Al resolver los problemas de deriva instrumental es posible la creación y manejo de bases de datos permanentes, siendo posible transferir la tecnología al sector industrial con fines de clasificación o de control de calidad.

Por lo anterior las huellas espectrales permiten caracterizar el producto dado y también detectar moléculas responsables directas para olores o aromas (Péres et al., 2003).

1.3.3. Nariz electrónica

La nariz electrónica (e-nose) es una técnica que usa un arreglo de sensores químicos para detectar analitos volátiles. Los equipos comerciales han usado diferentes tipos de sensores no específicos tales como óxidos metálicos, polímeros conductores, espectrometría de masas, onda de superficie acústica y la microbalanza de cristales de cuarzo, los cuales producen respuesta cuando las especies químicas alcanzan su superficie generando el perfil de olor o huella dactilar. El dispositivo nariz electrónica acoplado al análisis estadístico ha llegado a identificar géneros microbianos a través de perfiles complicados de volátiles microbianos en muestras de alimentos. En queso se han evaluado los aromas de queso suizo y Cheddar, se ha evaluado la maduración de queso Pecorino Toscano, se han detectado mohos en queso parmesano (Ampuero et al., 2003) y se han realizado también estudios de vida media en quesos y otros relativas al origen geográfico. La técnica ofrece las ventajas de realizar una clasificación instrumental basada en el análisis sensorial (Wang et al., 2016), además de su portabilidad. Sin embargo, su sensibilidad es limitada.

En este apartado se han presentado algunas de las técnicas que normalmente se usan en análisis de quesos, la IMS también podría haberse incluido en este apartado pero dado que es la técnica usada en esta Tesis Doctoral se le ha reservado una sección independiente

1.4. LA ESPECTROMETRÍA DE MOVILIDAD IÓNICA

1.4.1. Generalidades

La espectrometría de movilidad iónica es una técnica instrumental usada para caracterizar y separar sustancias químicas ionizables, volátiles y semivolátiles, teniendo en cuenta la velocidad de los iones en estado gaseoso, factor que depende de la forma, tamaño y carga del ion. La separación ocurre por efecto de un campo eléctrico a presión y temperatura ambiental (Eiceman et al., 2005). Aunque a veces se puede calentar el tubo de deriva para realizar la separación.

Tras la aparición de la MS, hubo un período de declinación de la movilidad iónica hasta que estudios teóricos realizados entre los años 1948 y 1970 crearon la base de la moderna IMS que vislumbró la posibilidad de su uso como herramienta analítica, concretándose al fin en 1970, al surgir como una técnica analítica moderna (Cohen y Karasek, 1970). Sin embargo, los instrumentos comerciales se introdujeron en 1990. Actualmente los nuevos desarrollos instrumentales y los acoplamientos de la IMS con GC y MS han ampliado su campo de aplicación. Más allá de los usos clásicos en la detección de narcóticos, armas químicas y biológicas, la IMS se aplica también al control de procesos y calidad en la industria alimentaria, al control de calidad y validación en la industria farmacéutica (Armenta et al., 2011), en diagnóstico médico a través del análisis del aliento o de fluidos biológicos, en toxicología y en el área de medio ambiente (Márquez-Sillero et al., 2011) y en seguridad ambiental (olor del gas natural) (Baumbach et al., 2006). En los últimos años la IMS ha contribuido a estudios de proteómica (Harvey et al., 2011).

Por otra parte, otros estudios han demostrado su potencialidad para la identificación de metabolitos (Paglia et al., 2014), y se han encontrado varios estudios con microorganismos (Jünger et al., 2012; Maddula et al., 2009; McCooney et al., 2008; Ogden & Strachan, 1993; Perl et al., 2011; Ruzsanyi y Eiceman, 2003; Snyder y Shoff, 1991; Strachan et al., 1995; Tiebe et al., 2009; Vinopal et al., 2002).

En concreto, en el análisis de alimentos la IMS es una técnica que concuerda con las características de un sistema analítico de vanguardia porque mediante un análisis rápido, y con poca o ninguna preparación de la muestra se obtiene información cualitativa (positiva o negativa) sobre aspectos o parámetros de interés para la calidad de un alimento. Por ello, en esta Tesis Doctoral se pretende demostrar la utilidad de la IMS para determinar metabolitos volátiles que contribuyen al aroma de un queso, o que están asociados específicamente al proceso de maduración. En general, la IMS suministra respuestas analíticas rápidas que favorecen la toma inmediata de decisiones conforme a lo que requiere la rutina en los laboratorios de la industria.

Algunas ventajas de esta tecnología son: alta velocidad de análisis, alta sensibilidad, moderada selectividad y portabilidad. Adicionalmente, este sistema genera una reducción de costes analíticos frente a uno tradicional, gracias a la minimización de operaciones en el tratamiento de la muestra.

1.4.2. Instrumentación y bases para la espectrometría de movilidad iónica

El espectrómetro de movilidad iónica usado en este trabajo consta de 3 unidades básicas: una fuente de ionización, un tubo de deriva donde se aplica un campo eléctrico positivo o negativo de gradiente uniforme y un detector. La fuente de ionización produce iones que se aceleran por el campo eléctrico y se separan según su movilidad mientras se dirigen al detector en contracorriente de un gas inerte. Adicionalmente, se debe disponer de un sistema para la introducción de la muestra. En esta Tesis se usó el equipo IMS bajo la configuración comercial FlavourSpec[®] que se detalla en el apartado sobre Materiales y Métodos.

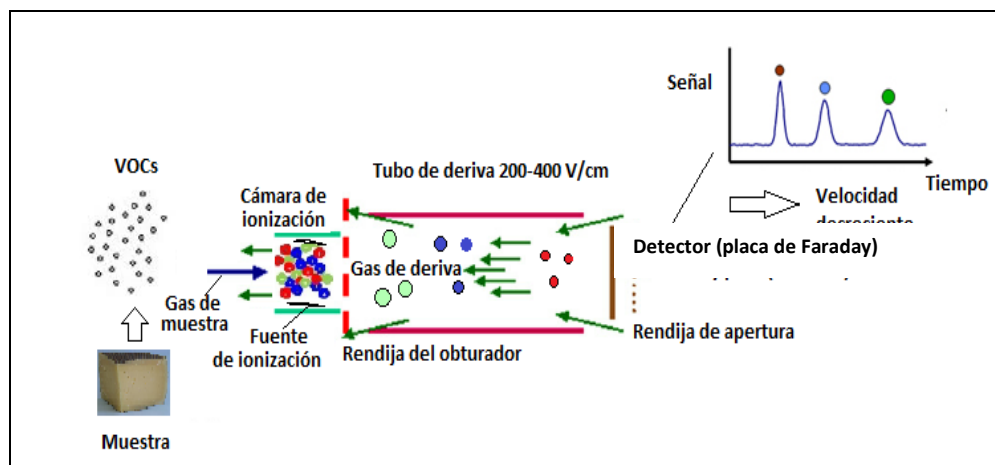


Figura 1.4. Esquema de un equipo de IMS mostrando las tres unidades básicas: fuente de ionización, tubo de deriva y placa de Faraday. Se observa también la deriva de los iones y el flujo de gases.

1.4.2.1. Sistema de introducción de la muestra

El sistema usado para la introducción de la muestra sólida o líquida en el instrumento debe asegurar que la muestra pase a fase gaseosa, y este sistema varía en función de la matriz de la muestra y la aplicación.

Algunos de los sistemas de introducción de la muestra más usados son: inyección directa, o introducción directa de la muestra en el IMS a través del flujo del gas de muestra que se dirige a la región de ionización (Eiceman et al., 2005). También se usan los tubos de permeación, vasos de purga, frascos de dilución, muestreadores de espacio de cabeza, unidades de evaporación. Todos estos sistemas tienen un bajo costo y se usan frecuentemente para volatilizar muestras líquidas o sólidas antes del análisis por IMS (Cumeras et al., 2014).

Además de estos sistemas de introducción de muestras también se ha usado la microextracción en fase sólida que incluye la preconcentración del analito en una fibra y posterior extracción y vaporización del analito en un flujo de gas purificado. Los vapores desorbidos se analizan mediante GC-IMS (Lokhnauth et al., 2005; Naader et al., 2008; Naader et al., 2015). También se usa el método de desorción térmica que permite retener los analitos en un material inerte, como por ejemplo en una columna Tenax[®]. Luego se desorben en un horno y son arrastrados por una corriente de gas de muestra hacia la cámara de ionización (Naader et al., 2008).

Los sistemas basados en spray o ionización por electrospray (ESI) son más complejos y se usan para muestras líquidas, con compuestos semivolátiles o no volátiles. La muestra se nebuliza directamente a través de una aguja de jeringa usando flujos pequeños (del orden de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$) para no saturar el detector. De manera análoga al método anterior, se ha usado la pirólisis térmica que causa descomposición química de la muestra, lo mismo que la ionización/desorción laser asistida por matriz (MALDI de sus siglas en inglés) aplicada en muestras de suelos y bacterias (Eiceman et al.,

2007). Los sistemas ESI y MALDI muestran como principal ventaja el análisis por IMS de compuestos de peso molecular alto y térmicamente lábiles tales como polímeros sintéticos, péptidos y proteínas. En realidad, ambas técnicas son a la vez sistemas de introducción de muestra y de ionización de compuestos que se pueden usar antes de realizar el análisis por IMS o MS (Cumeras et al., 2014).

1.4.2.2. Fuentes de ionización

Los equipos de IMS pueden usar distintas fuentes de ionización como por ejemplo las fuentes radioactivas tales como níquel-63, tritio y ameridium-241. Existen también otras fuentes no radioactivas, como las fuentes de UV.

1.4.2.2.1. Ionización radioactiva

Las fuentes de ionización convierten a las moléculas en iones que se separan en el tubo de deriva. El método más común es la ionización química a presión atmosférica con fuentes radioactivas. Como fuentes radioactivas se usan radiación β obtenida a partir de níquel-63 (Cohen et al., 1970), tritio o radiación α emitida de ameridium-241. La ionización con ^{63}Ni se produce por la emisión de electrones con energía promedio de 19 KeV. Estos electrones colisionan con moléculas neutras de los analitos o del gas de deriva y los ioniza mediante una serie de reacciones de transferencia de carga (Baim et al., 1983).

Muchos equipos comerciales usan ^{63}Ni como fuente de ionización. La respuesta que se obtiene con este tipo de fuentes es no lineal, con un estrecho rango de respuesta (Hill et al., 1997) y, como otras fuentes de ionización, con transferencia de carga pueden darse reacciones de

interferencia. El isótopo radioactivo menos usado es ^{161}Am que emite electrones más energéticos que sobrepasan los 5 MeV (Guharay et al., 2008).

El Tritio, un isótopo radioactivo de hidrógeno (^3H), no constituye una fuente de radiación peligrosa porque las partículas β generadas durante su decadencia son de baja energía (5.7 KeV), teniendo bajo poder de penetración. Sin embargo, el Tritio es adecuado para el uso alternativo al ^{63}Ni como fuente de ionización en IMS (Arce y Valcárcel, 2013).

Las fuentes radioactivas, al no necesitar una fuente de alimentación, pueden usarse en equipos portátiles. Sin embargo, un descuido, como la mala manipulación, puede conducir a contaminación radioactiva. Por esta razón son fuentes de uso controlado por regulaciones gubernamentales.

Las fuentes de ionización radioactivas no funcionan con analitos que son menos electronegativos que el oxígeno o tienen afinidades protónicas más bajas que el agua, debiéndose usar métodos alternativos para formar iones a presión atmosférica (Arce y Valcárcel, 2013).

1.4.2.2.2. Métodos alternativos a la ionización radioactiva tradicional

Otros métodos no radioactivos son la fotoionización a presión atmosférica, basados en la luz ultravioleta (UV), ESI, la ionización secundaria por ESI (SESI), corona de descarga y MALDI.

a) Ionización por electrospray

Este tipo de ionización es suave, se aplica en muestras líquidas y analitos de alto peso molecular, no volátiles. Como resultado se obtiene un espectro simple sin fragmentaciones, a partir del cual se puede determinar fácilmente el peso molecular cuando se aplica IMS acoplado a MS.

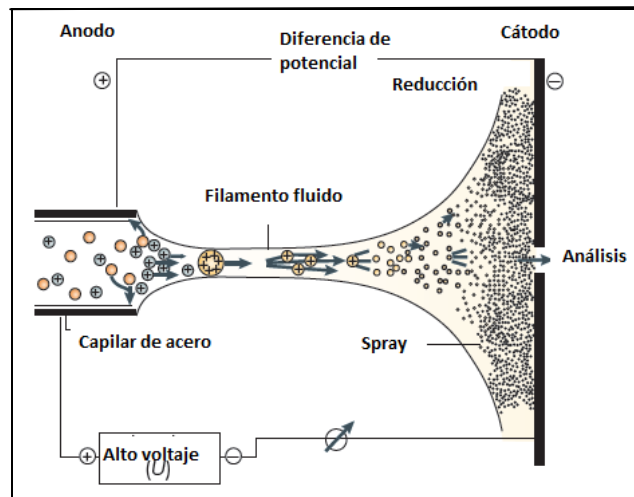


Figura 1.5. Esquema del funcionamiento de una fuente por ESI (Sauer et al., 2010).

En la ionización por electrospray (Figura 1.5) la muestra se disuelve en un solvente orgánico acuoso que es conducido hacia un capilar fino hecho de material conductor. En el capilar se aplica un potencial eléctrico alto que crea cargas eléctricas. El electrospray ocurre cuando el líquido es aspirado por una fuerza coulombica desde el capilar hacia el electrodo objetivo que se mantiene a un voltaje menor (aproximadamente 3.5 KV). El disolvente se evapora a medida que viaja hacia el electrodo objetivo y deja gotitas cargadas cada vez que estallan debido a la repulsión coulombica. En el proceso, el espray se dirige a través de una serie de secciones que tienen presiones que decrecen sucesivamente resultando en la formación de iones del analito en fase gaseosa. Dependiendo

del tamaño de los analitos se pueden generar iones con cargas múltiples (de Hoffman et al., 2001).

b) Ionización por electrospray secundaria

Un equipo ESI produce partículas cargadas que actúan como iones reactantes e ionizan analitos líquidos o gaseosos. Sin embargo SESI aplica chorros de iones con una sonda y recoge los iones secundarios con una segunda sonda a sitios específicos sobre una superficie. De esta manera es posible acceder sin daño significativo a organelos o células. Este método se emplea comúnmente acoplado a IMS-MS (Wu et al., 2000).

A SESI se le considera precursor de otros métodos de ionización usados para analizar compuestos directamente sin previo tratamiento de la muestra, entre ellos: desorción electrospray ionización, análisis directo en tiempo real, análisis de sonda sólida a presión atmosférica, fuente de ionización de plasma distribuido, plasma de baja temperatura y corriente directa descarga de luz (Armenta et al., 2011).

c) Ionización/desorción laser asistida por matriz

La principal ventaja del MALDI (Figura 1.6) como sistema de introducción de la muestra antes de IMS se debe a que este sistema puede analizar compuestos de alto peso molecular al igual que compuestos termolábiles tales como polímeros sintéticos, péptidos, proteínas y ADN, característica que es común también a ESI.

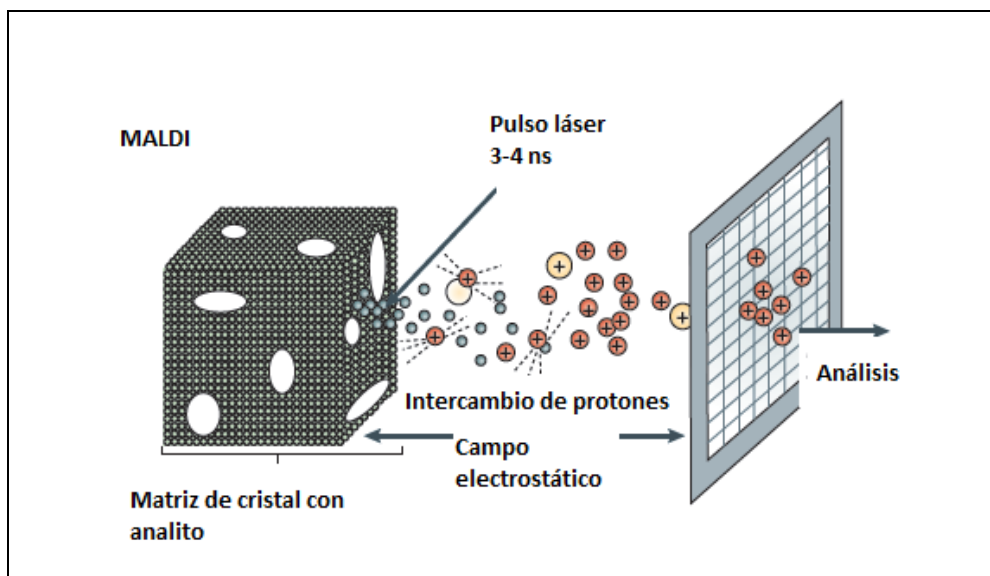


Figura 1.6 Esquema del funcionamiento del sistema MALDI (adaptada de Sauer et al. 2010)

Estos compuestos se disuelven en una solución de pequeñas moléculas orgánicas (matriz). La solución se seca en un objetivo y se aplica un pulso láser. La matriz absorbe el pulso láser y sublima llevando algunos analitos. Durante la sublimación en fase gas se producen solo moléculas protonadas cargadas, con lo cual el análisis es más simple y sensible (Sauer et al., 2010).

d) Corona descarga ionización química a presión atmosférica

El método corona descarga es alternativo a la ionización radioactiva convencional. El método usa un campo eléctrico alto, desarrollado entre una aguja y una placa de metal o electrodo de descarga. Los iones reaccionan con moléculas neutras, las cuales pueden evaporarse desde el líquido hacia la punta de la aguja. En el método corona descarga en modo positivo, los iones reactantes producidos en aire o nitrógeno son $H^+(H_2O)_n$. En este caso, moléculas de muestra con afinidades protónicas más altas que las del agua se ionizan fácilmente mediante reacción de transferencia protónica con

las agrupaciones de agua protonada. Pero cuando este método se usa en aire se producen óxidos de nitrógeno, formándose los iones $\text{NO}_x(\text{H}_2\text{O})_n$. Estos iones de muy alta afinidad electrónica previenen la ionización de otras sustancias, incluso de compuestos halogenados (Tabrizchi et al., 2002).

e) Fotoionización a presión atmosférica

La fotoionización se produce mediante lámparas UV de longitud de onda corta. Su uso es alternativo a los láseres, no es costoso y se puede seleccionar la ionización de un compuesto solo ajustando la longitud de onda. La fotoionización se produce cuando un compuesto con potencial de ionización suficientemente bajo se irradia con luz UV. El potencial de ionización de las moléculas de analito debe ser menor o igual a la energía del fotón, generalmente entre 8 y 12 eV para que el compuesto sea ionizado.

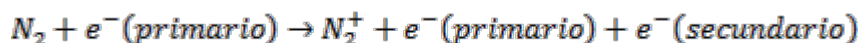
Muchos analitos con afinidades protónicas más bajas que el agua no se ionizan mediante fuentes radioactivas. Sin embargo, son ionizables mediante la radiación UV. Además tienen un mayor rango dinámico lineal que la respuesta al ^{63}Ni .

1.4.3. Reacciones químicas de ionización en el IMS

Los iones se forman en la cámara de ionización del IMS. Ésta es la región separada del tubo de deriva por una puerta de iones. En esta región la colisión entre partículas β y moléculas tales como N_2 y O_2 del aire produce los picos del ion reactante (RIP) en el espectro.

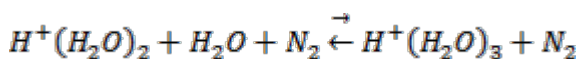
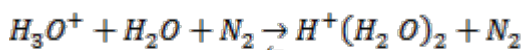
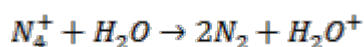
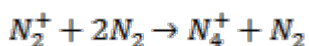


Cuando un electrón de alta energía colisiona con una molécula de N₂ se forma un ion positivo y un electrón secundario.

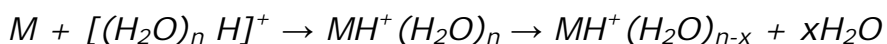


El electrón primario, aunque ha perdido energía, al colisionar con N₂ puede provocar ionizaciones consecutivas, mientras que el electrón secundario ioniza al N₂ a través de colisiones, hasta que su energía sea menor al potencial de ionización del aire (35 eV).

Un ion nitrógeno a presión ambiente se somete a colisiones que dan lugar a reacciones en cascada que tienen lugar hasta que se forman protones hidratados o iones reactantes positivos y negativos.



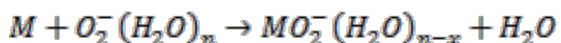
Las moléculas de la muestra colisionan con los iones reactantes y por transferencia de protones se forman intermediarios de reacción inestables, que se estabilizan mediante la pérdida de agua dando lugar a la formación de productos iónicos. La transferencia de protones ocurre cuando las moléculas de la muestra (M) tienen afinidad protónica mayor que los iones reactantes (Creaser et al., 2004). El proceso es una ionización suave porque no ocurre fragmentación durante la ionización.



Cuando la concentración de M (analito) se incrementa también aumentan los iones, lo cual hace disminuir la intensidad del pico del ion reactante y, como es previsible, el monómero protonado puede agruparse con moléculas adicionales del analito formando dímeros, trímeros, etc. (Eiceman, 2002).



En polaridad negativa, los iones reactantes se forman por captura de electrones resonantes, lo cual ocurre entre electrones de baja energía y compuestos neutros como el oxígeno. El producto iónico resulta de la reacción entre una molécula M y el anión oxígeno. La agrupación iónica se estabiliza por desplazamiento de una molécula de agua (Eiceman et al., 2005).



1.4.4. Rendija de iones

Las moléculas ionizadas pasan al tubo de deriva a través de una rendija de iones a la que se aplica un campo eléctrico que favorece el tránsito de las especies ionizadas de manera sincronizada y escalada. Físicamente son conjuntos de cables paralelos que previenen la migración continua a través del espectrómetro.

La compuerta se ubica al principio de la región de deriva y se abre electrónicamente durante décimas de milisegundo para dar paso a un pulso de iones. Los iones pasan cuando cada cable tiene el potencial del campo eléctrico del tubo y los iones no pasan cuando el potencial del campo eléctrico es mayor. La compuerta puede estar abierta progresivamente a grandes

intervalos o a intervalos fijos. La sensibilidad del análisis depende del tiempo durante el cual la rendija permita el paso o no de iones (Baim et al., 1982).

1.4.5. Tubo de deriva

En el tubo de deriva, que se encuentra entre la cámara de ionización y el detector, los iones se separan por efecto de un campo eléctrico débil y se desplazan hacia el detector. En los equipos de IMS comerciales, el tubo de deriva consta de una serie de anillos conductores y anillos aislantes apilados juntos, formando tramos de diferente longitud, según el tipo de tubo de deriva. Los electrodos están conectados por una cadena de resistencias entre 0.5 a 1 M Ω . El potencial eléctrico alto (~ 12 KeV) colocado en el primer anillo, permite producir un campo de 200 a 400 V/cm a través del tubo (Fernández-Maestre et al., 2010a). En la región de deriva, un gas se introduce a la altura del detector y fluye a contracorriente del desplazamiento de los iones. Las especies iónicas colisionan continuamente con las moléculas del gas de deriva, lo que afecta al tiempo que tardan en llegar al detector, que varía en función del tamaño y forma de los iones y área de sección de la colisión.

La resolución de la IMS depende de la raíz cuadrada del voltaje de deriva, pero, en la práctica, y para campos eléctricos constantes, tubos de deriva más largos permiten aplicar voltajes más altos, incrementando así la resolución. La resolución puede ser afectada por la temperatura pero es difícil diseñar tubos de deriva con temperatura del gas también ajustable.

1.4.6. Gases

La muestra se introduce en la región de ionización conjuntamente con el gas de arrastre, mientras el gas de deriva recorre el tubo de deriva a contracorriente y sale a través de un conducto situado en la base del espectrómetro. Como gases de deriva se usan N_2 , aire, He, CO_2 y Ar. La sensibilidad y el poder de resolución están asociados al tipo de gas. El gas de deriva consiste en una matriz inerte y limpia a través de la cual se desplazan los productos iónicos. Además, este gas mantiene limpio el tubo de deriva del espectrómetro. Durante el análisis IMS, normalmente, se usa un gas inerte como el nitrógeno puro o aire sintético. Sin embargo, en casos puntuales de reacciones selectivas ion-molécula se puede usar un gas tampón. La adición de un gas dopante al gas de deriva controla la ionización e incrementa la selectividad en IMS (Arce y Valcárcel, 2013).

En la IMS, los agentes dopantes ionizan selectivamente compuestos. Kim et al. (1978) fueron los primeros que aplicaron estos gases, con la adición de amonio al gas tampón N_2 para ionizar aminas. La adición de un gas dopante al gas conduce a cambios selectivos en las movilidades iónicas y permite separar interferencias aunque no separa analitos con valores de K_0 similares. Los agentes dopantes que se introducen por el final de la región de deriva y no con el analito en la región de reacción se llaman modificadores del gas tampón.

La separación se consigue porque el agrupamiento selectivo de los modificadores con los analitos ocurre con un cambio en la movilidad de los analitos dependiendo del tamaño e impedimento estérico en la carga de los iones.

1.4.7. Movilidad de los iones

Los iones expuestos a un campo eléctrico constante se aceleran siguiendo las líneas del campo hasta que colisionan con moléculas neutras de gas de deriva, que retrasan su movimiento. Tras sucesivas colisiones la nube de iones tiende al equilibrio, crece en tamaño por efecto de la difusión y se dirige a velocidad constante hacia el detector.

En campos eléctricos débiles la velocidad es el resultado de las aceleraciones y las desaceleraciones debidas a la fricción causada por las colisiones. Por consiguiente, la velocidad de deriva (v) en cm/s es directamente proporcional al campo eléctrico E ($V\text{ cm}^{-1}$), siendo K la constante de movilidad o velocidad de deriva del ion en cm/s.

$$v = KE$$

Cada ion tiene su valor de K característico y permite su identificación en los distintos equipos IMS.

Las constantes de movilidad se calculan más fácilmente midiendo el tiempo en el que un ion viaja por el tubo de deriva. Al reemplazar $E = V/L$ y $v = L/t_d$ se obtiene:

$$K = \frac{L^2}{V \cdot t_d}$$

donde L es la distancia (cm) que el ion recorre hasta llegar al detector, V es la caída de voltaje ($V\text{ cm}^{-1}$) total en el tubo de deriva que impulsa a los iones a través del tubo de deriva, y t_d es el tiempo de deriva, o sea el tiempo en segundos que gasta el ion en moverse desde la rendija hasta el detector.

Las movilidades iónicas pueden ocurrir bajo distintas condiciones experimentales, de presión y temperatura. Para compararlas es necesario normalizar los valores aplicando la ecuación de movilidad reducida:

$$K_0 = K \left(\frac{273}{T} \right) \left(\frac{P}{760} \right)$$

donde P es la presión atmosférica en mmHg y T es la temperatura en K.

1.4.8. Secciones transversales de colisión iónica

La constante de movilidad iónica (K) se relaciona con el área de la sección de colisión y puede determinarse directamente a partir del tiempo de deriva y usando parámetros experimentales, de acuerdo a la siguiente ecuación Revercomb-Mason:

$$K = \left(\frac{3q}{16N} \right) \left(\frac{2}{kT} \right)^{\frac{1}{2}} \left(\frac{m+M}{mM} \right)^{\frac{1}{2}} \left(\frac{1}{\Omega} \right)$$

donde K es la constante de movilidad iónica, q es la carga del ion, N es la densidad del gas buffer, k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta, m es la masa del gas buffer, M es la masa del ion y Ω es la sección de colisión.

Esta ecuación se aplica para calcular las secciones de colisión de moléculas. Son de interés especial para macromoléculas como proteínas, que adoptan conformaciones diferentes, las cuales se relacionan estrechamente con su actividad biológica (Eiceman et. al., 2003; Mason et al., 1958).

1.4.9. El detector

Una placa de Faraday (Figura 1.7) es el detector que se emplea normalmente en un equipo de movilidad iónica a fin de detectar los iones positivos o negativos que se separan en el tubo de deriva. El dispositivo consta de un electrodo simple con forma de copa o plato donde impactan los iones a ser

detectados. Inmediatamente se produce una salida de corriente y las señales se amplifican y digitalizan generándose voltajes de entre 1 y 10 V. La carga colectada se almacena y se visualiza como un espectro de movilidad en pocos milisegundos.

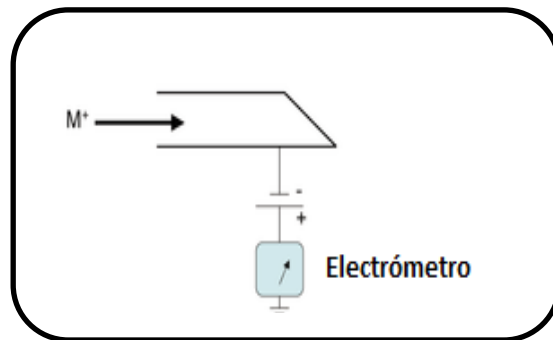


Figura 1.7. Esquema de la Placa de Faraday

La placa de Faraday puede ser reemplazada por detectores como el espectrómetro de masas, posibilitando así la identificación de compuestos de la muestra.

El espectro IMS representa la intensidad de corriente en función del tiempo de deriva o tiempo que tarda el ion en llegar al detector desde que se abre la rendija. Este espectro suministra información cualitativa y cuantitativa de la muestra. La posición de la señal, tiempo de deriva en el eje x, se relaciona con la forma y el tamaño de una molécula, mientras que el eje y refleja la intensidad de la corriente o la intensidad del pico (Eiceman et al., 2005) que se relaciona con la concentración. La medida realizada sobre una muestra está constituida por el promedio de varios espectros y la información se procesa mediante programas informáticos.

1.4.10. Poder de resolución

El poder de resolución de los espectrómetros de movilidad iónica se mide como la relación entre los tiempos de deriva de los iones y su ancho de pico a la mitad de la altura. A veces puede ocurrir que un ion que no esté asociado al analito objeto de estudio se dirige al detector a tiempo similar del analito de interés siendo identificado erróneamente, como un “falso positivo” (Kamu et al., 2008). Los equipos IMS, en presencia de humedad y otros interferentes de la matriz tienen bajo poder de resolución. Una solución a este problema consiste en usar una columna cromatográfica de gases para introducir la muestra en el IMS. Otra alternativa es acoplar el IMS a un espectrómetro de masas.

1.4.11. Columnas multicapilares y de cromatografía de gases

El acoplamiento de la GC con la IMS es directo y simple porque los tubos de deriva a presión atmosférica pueden recibir directamente y de forma completa el efluente de la columna cromatográfica.

La combinación de la etapa de preseparación de la muestra con el detector IMS proporciona algunas ventajas como: *i)* eliminación de interferencias en reacciones de ionización química, mejora la sensibilidad, selectividad y simplicidad de respuesta; *ii)* la medida de movilidad de un pico cromatográfico, idealmente un sola sustancia, reduce las demandas del poder de resolución para IMS, permitiendo una interpretación fiable del espectro, *iii)* matrices con datos bidimensionales dan información detallada de las sustancias, como los patrones de composición o tipos de compuestos no reconocibles con detectores monodimensionales, como el

detector de ionización de llama. Sin embargo, presenta desventajas como: la pérdida de velocidad de respuesta que tiene el IMS y la complejidad de la instrumentación al acoplar un GC a un IMS. Además se debe tener presente que el tiempo de retención varía ligeramente de una columna a otra.

Las columnas multicapilares (MCC) formadas por aproximadamente 900 capilares agrupados en un solo paquete proporcionan una alta capacidad de flujo del gas de muestra. Su tamaño pequeño y la velocidad de separación resultan adecuados para incluirlos en sistemas portátiles, aunque la desventaja principal es su alto coste (Arce y Valcárcel, 2013). Sin embargo las MCC acopladas al IMS se han usado para análisis de muestras biológicas. Su empleo evita los efectos del agrupamiento en la cámara de ionización cuando se analiza aire húmedo (Cumeras et al., 2014). Las columnas de GC también se han acoplado a equipos de IMS mostrando muy buenos resultados (Arce y Valcárcel, 2013).

1.4.12. Desarrollos instrumentales en IMS

El modelo básico del espectrómetro IMS ha sido mejorado a través de desarrollos instrumentales centrados en el diseño de distintos tipos de tubos de deriva con nuevos materiales y fuentes de ionización. Además, en base al principio de la IMS se han puesto en marcha nuevos instrumentos como *field asymmetric waveform ion mobility spectrometry* (FAIMS) y *travelling wave ion mobility spectrometry* (TWIMS), entre otros. En FAIMS, el método de ionización es ESI, la amplitud del campo eléctrico puede variar entre 20.000 y 30.000 V · cm⁻¹, el tubo de deriva es más simple respecto al modelo convencional, los iones se mueven por el flujo de gas y no por campos eléctricos y se determina la diferencia de movilidad en

los extremos de los campos. TWIMS es otro nuevo método de IMS, que ofrece un bajo poder de resolución pero tiene buena sensibilidad.

1.5. LA ESPECTROMETRÍA DE MOVILIDAD IÓNICA COMO UNA HERRAMIENTA ANALÍTICA VERSÁTIL PARA APLICACIONES METABOLÓMICAS EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Los metabolitos son pequeñas moléculas funcionales dentro de la célula y sus cantidades varían por efecto de cambios fisiológicos o genéticos (Yong-Jiang et al., 2014). Estos compuestos moleculares participan o resultan de otros y aparecen como productos finales en muchas rutas metabólicas diferentes de distintas matrices. La polaridad de los metabolitos varía desde lípidos no polares a iones inorgánicos extremadamente polares. Entre estos grupos químicos podemos considerar éteres, aldehídos, ésteres, fosfatos, alcoholes y muchos otros, además de algunos importantes subgrupos metabólicos como glicomas y lipidomas (Diwivedi et al., 2008). En contraste a muchas otras metodologías "ómicas", los procedimientos analíticos para el análisis metabolómico están actualmente en continuo cambio.

La metabolómica puede ser aplicada para mapear o identificar correlaciones entre diferentes enfoques "ómicos" y esto se ha conseguido gracias a diferentes técnicas analíticas disponibles hoy día en los laboratorios de investigación y/o rutina. A continuación se revisarán las más usadas en el ámbito agroalimentario.

La resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés) suministra información cualitativa y cuantitativa acerca de los metabolitos presentes a más alta concentración. Sin embargo, cuando los metabolitos están presentes a bajas concentraciones, la NMR no parece ser lo suficientemente sensible para detectarlos (Dunn et al., 2005). La

Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) también se ha usado en el análisis metabolómico (Harrigan et al., 2004; Johnson et al., 2004). Esta técnica se puede usar para determinar diferencias fenotípicas minoritarias usualmente no detectadas por otras técnicas. La FTIR es químicamente no selectiva, y no se usa para determinar metabolitos específicos. Sin embargo, puede ser adecuada para obtener una rápida huella espectral de un metaboloma (Aharoni et al., 2002; Brown et al., 2005).

El análisis metabolómico también se realiza usando técnicas secuenciales de concentración y separación acoplado a distintos sistemas de detección. El uso combinado de todas estas etapas es adecuado para determinar analitos presentes a bajas concentraciones. Dentro de las técnicas susceptibles de uso, la GC separa metabolitos con altas presiones de vapor. Los compuestos no volátiles no pueden ser medidos por GC a menos que se realice una reacción de derivatización previa del analito (Fiehm, 2002; Koek et al., 2006). Para separar estos metabolitos no volátiles se pueden usar técnicas de cromatografía líquida (LC, por sus siglas en inglés). Generalmente, en metabolómica, estas técnicas (GC y LC) se combinan con MS, realizándose una separación apropiada e identificación de todos los metabolitos de una muestra mediante infusión directa. Además, la técnica MS con analizadores de masa de alta o ultra alta resolución como TOF-MS (exactitud masa < 10 ppm) puede usarse mediante inyección directa, provista de una exactitud de masa <1 ppm, pudiendo detectar límites a niveles inferiores a atomoles o femtomoles (García-Cañas et al., 2010). En general, los MS tienen un potencial más alto para identificar metabolitos que otros detectores, pero para algunas aplicaciones la MS requiere gases especiales tales como He o alto vacío, por lo

tanto con costes operativos relativamente altos y gastos técnicos.

Un instrumento atractivo para propósitos metabolómicos también puede ser la IMS. Esta técnica puede ser vista como complementaria u ortogonal a un análisis de MS.

La IMS puede operar con aire o nitrógeno y a presión y temperatura ambiente. Adicionalmente, la movilidad iónica proporciona separación de compuestos isoméricos e isobáricos que resultaban inseparables incluso con instrumentos de ultra alta resolución (Halbefeld et al., 2014). Generalmente, la IMS puede detectar entidades químicas que pueden ser ionizadas y ha sido aplicada a la determinación de elementos más ligeros o mezclas más complejas tales como metabolomas. La IMS es una técnica simple y no costosa con distinta selectividad de respuesta. Sus principales ventajas son las de operar bajo presión atmosférica, su eficiente ionización de moléculas orgánicas en fase de vapor, el corto tiempo de análisis, la simplicidad y la separación de iones en fase gaseosa. También, los métodos IMS están basados en mediciones sin disolventes (y pueden por eso ser llamados métodos de química "verde"). La selectividad de la IMS puede ser incrementada acoplándola con otras técnicas para separar metabolitos previa detección IMS o para confirmar iones una vez filtrados por IMS. La IMS combinada con MCC (Garrido-Delgado et al., 2012) o con GC es una tecnología reconocida para determinar VOCs. La metodología GC-IMS permite combinar dos métodos de separación interdependientes (cromatografía de gases y movilidad iónica) (Figura 1.8) y por lo tanto permite el análisis de mezclas de compuestos complejos dentro de una sola medida (Marilley et al., 2004; Hauschil et al., 2012).

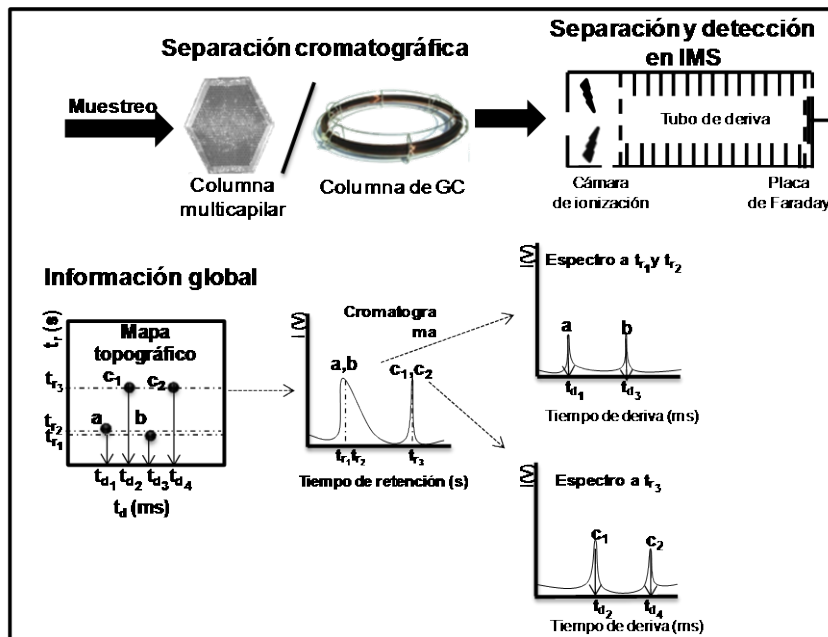


Figura 1.8. Acoplamiento general entre columnas cromatográficas y el dispositivo IMS y la información obtenida en cada separación (adaptada de Arce et al., 2014)

Por esto el análisis mediante GC-IMS puede ser considerado en la vanguardia de sistemas analíticos (Valcárcel et al., 2005), debido a la capacidad de aportar fácilmente información analítica de un alto número de muestras en un corto tiempo. Estos sistemas no requieren preparación de la muestra (o apenas) y pueden reportar resultados cuantitativos, pero especialmente cualitativos. En esta clase de métodos, las propiedades analíticas relacionadas con la productividad tienen una mayor relevancia respecto al nivel de propiedades básicas.

Una de las nuevas metas de los usuarios de la tecnología IMS está siendo el análisis metabolómico en productos alimenticios para resolver problemas específicos con tiempo y coste razonable. Los datos obtenidos de IMS se tienen que combinar con análisis estadístico multivariante para poder realizar un análisis metabolómico completo. La IMS tiene buenas

perspectivas para dar soluciones a diversos problemas para los cuales otras técnicas no resultan adecuadas.

La IMS puede añadir un paso de rápida separación con alta resolución antes del análisis de mezclas de metabolitos por MS sin ampliar el tiempo de preparación de la muestra y elevar mucho el coste por análisis.

La versatilidad de la tecnología IMS ha sido probada exitosamente analizando diferentes clases de alimentos, tales como queso, pescado (Raatikainen et al., 2005), carne (Vestergaard et al., 2007), aceite de oliva (Garrido-Delgado et al., 2012), y vino (Garrido-Delgado et al., 2011). Los resultados de estas investigaciones muestran buenas perspectivas para el análisis metabolómico de alimentos usando la IMS.

Todavía hace falta seguir optimizando métodos usando la tecnología IMS que sean adecuados para poder transferirlos al análisis de rutina ya que el punto débil está ahora en el tratamiento de datos al no existir software que permitan obtener el resultado final con facilidad. La transferencia de esta tecnología al campo agroalimentario requiere un importante esfuerzo sostenible y cooperativo entre los investigadores y los industriales, pero varios ejemplos ya han demostrado que algunas industrias ya han incorporado los equipos de IMS en sus rutinas diarias de trabajo.

En resumen, el análisis metabolómico usando IMS podría alcanzar un papel importante (i) analizando el origen y calidad de materias primas y el almacenamiento en condiciones que pueden influir en las características del producto final, (ii) evaluando el proceso de producción, primordial en el producto terminado y (iii) caracterizando el producto terminado para determinar compuestos directamente involucrados en la

calidad, y aun relacionados a características sensoriales. En resumen se puede afirmar que la IMS es una técnica analítica de gran capacidad, que puede controlar la trazabilidad del alimento durante todo el proceso de producción, desde la materia prima hasta los productos terminados.

Como ya se ha descrito, la IMS es una técnica analítica que separa iones en función de su tamaño, masa, forma y distribución de carga. La separación ocurre en fase gaseosa, gracias a la diferente movilidad iónica bajo un campo eléctrico homogéneo y continuo en el tubo de deriva, en presencia de moléculas de gas neutras. Iones compactos pequeños, ligeros en peso, viajan más rápido que iones grandes y pesados (Cumeras et al., 2014). El movimiento de los iones se produce a velocidad constante que es proporcional al campo eléctrico. La energía ganada desde el campo eléctrico es disipada debido a las colisiones con moléculas neutras del gas de deriva. El espectro de movilidad es un gráfico de la intensidad de corriente iónica frente al tiempo de deriva de cada ion (Karpas, 2013).

1.5.1. Aplicaciones de espectrometría de movilidad iónica en análisis metabolómico agroalimentario

La sensibilidad de la IMS hace de ella una herramienta altamente adecuada para ser utilizada en controles de calidad y seguridad alimentaria, en la caracterización y autenticación de productos alimenticios, como también para análisis metabolómico. Como se ha mencionado anteriormente, la metabolómica se enfoca en el análisis del metaboloma, que se ha definido como un juego completo de metabolitos endógenos o exógenos (peso molecular bajo, aproximadamente <1500Da).

Hay tres maneras diferentes de determinar metabolitos en alimentos: análisis de un determinado compuesto o grupo de compuestos, perfil metabólico y huella espectral metabólica (Figura 1.9). Esta sección resume algunos ejemplos que pueden mostrar el potencial de la IMS para análisis metabolómico, que ha empleado el tubo de deriva lineal y una configuración de campo eléctrico débil, acoplado a otras técnicas analíticas tales como GC y/o MS. Además, también se describen aplicaciones de otras configuraciones IMS empleando TWIMS y FAIMS.

ANÁLISIS DIANA

- Cuantificación de los analitos seleccionados

PERFIL METABÓLICO

- Estudio de familias de analitos

HUELLA METABÓLICA

- Comparación de patrones de analitos entre muestras
- Detección de biomarcadores

Figura 1.9. Diferentes estrategias para determinar metabolitos en alimentos (adaptada de Arce et al., 2014)

1.5.1.1. IMS para análisis "target"

El objetivo de un análisis "target" es la determinación cuantitativa de algunos analitos específicos (Ibáñez et al., 2013). Los alimentos se descomponen a través de degradaciones enzimáticas y microbianas que producen compuestos volátiles incluyendo aldehídos, cetonas y aminas,

entre otras. Un ejemplo interesante es el análisis de muestras de carne por IMS, por el cual el deterioro involucra la descarboxilación lenta de aminoácidos a diaminas, tales como la putrescina de arginina o cadaverina de lisina. En efecto, las aminas volátiles (como la trimetilamina) pueden ser medidas por IMS con un límite de detección de 2 ng en menos de 2 min (Karpas et al., 2002). La composición cualitativa y cuantitativa de las aminas está relacionada directamente con la temperatura o tiempo de almacenamiento (el deterioro de la carne es más rápido a mayor temperatura y tiempo de almacenamiento).

La frescura de la carne (Bota et al., 2006) se ha determinado usando las pendientes de regresión obtenidas con modelos de calibración multivariante. También, los métodos de reconocimiento de patrón de la señal IMS se han usado como herramientas de clasificación. Otro ejemplo para demostrar el potencial de la IMS es la determinación de residuos de drogas veterinarias. La IMS con corona de descarga (CD-IMS) ha sido usada para desarrollar un método cuantitativo para la determinación de algunos antibióticos como la furazolidona, el cloranfenicol y la enrofloxacin en aves de corral (Jafari et al., 2007). Los diferentes analitos fueron extraídos con disolventes apropiados usando la extracción en fase sólida. De acuerdo a estos autores, la determinación de los tres compuestos fue lineal en rangos que abarcan tres órdenes de magnitud, con límites de cuantificación por debajo de 20 g kg^{-1} .

Además, se puede mencionar que algunos tipos de micotoxinas son ejemplos representativos de compuestos "target" determinados por IMS. Por ejemplo, las aflatoxinas B1 y B2 se han determinado con CD-IMS para controlar el estado de deterioro de pistachos (Sheibani et al., 2008). Las

muestras se extrajeron e introdujeron directamente en el puerto de inyección del espectrómetro. La IMS también puede ser una herramienta útil para el análisis de control de calidad y seguridad de muestras de alimentos como en el caso de la determinación de ocratoxina mediante CD-IMS en raíz de regaliz, con una extracción y purificación a través de una columna de inmunoafinidad (Khalesi et al., 2011).

De los compuestos que se pueden determinar por IMS, las aminas provocan generalmente una respuesta intensa libre de interferencias en espectrómetros de movilidad iónica con polaridad positiva, debido a sus altas afinidades protónicas en comparación con productos iónicos de larga vida (Eiceman, 2002). Así, una medida de la concentración de aminas presente en una muestra se realiza en poco tiempo, añadiendo simplemente unas pocas gotas de una solución alcalina a una muestra, incrementando la volatilidad de estos analitos. De esta manera, se pueden obtener resultados cualitativos con una mínima preparación de la muestra. En general, la medida de metabolitos como las aminas biogénicas volátiles puede ser un indicador adecuado para el deterioro o frescura de alimentos (pescado, carne, leche, cerveza, uvas, vino y aceitunas, entre otros) (Karpas et al., 2002).

Con respecto a algunas aplicaciones, existen ciertas limitaciones de la IMS respecto a la selectividad, como una más baja resolución y el riesgo de interferencias mutuas entre analitos (Fraga et al., 2009).

Una posible alternativa para mejorar la selectividad de la IMS es el uso de una columna rellena de Tenax acoplada *online* al equipo IMS para mejorar la sensibilidad y selectividad de la técnica (Garrido-Delgado et al., 2011). Esta metodología permite el análisis cualitativo y cuantitativo de aldehídos

volátiles presentes en el aceite de oliva. El uso de una columna de GC como etapa de preseparación combinada con la IMS está siendo ampliamente aplicada para la medición de diferentes analitos en el campo alimentario. Por ejemplo, el final del proceso de la fermentación de la cerveza puede ser otro ejemplo en este contexto. En este proceso se midió el umbral de concentración para diacetilo y 2,3 pentanodiona. Además, la GC-IMS fue exitosamente aplicada en el análisis de lúpulos aromatizados diferenciando su tipo y origen. Los datos obtenidos se correlacionaron con los resultados obtenidos por análisis sensorial (Kurzweil et al., 2013).

1.5.1.2. IMS para perfil metabólico

El perfil metabólico (una estrategia que requiere el conocimiento previo de la muestra) se centra en el estudio de un grupo de metabolitos relacionados (aminoácidos, alcoholes, etc.) o metabolitos de una ruta metabólica específica (Ibáñez et al., 2013). La medida de metabolitos asociados con la frescura del pescado podría ser un buen ejemplo de este enfoque. En este sentido, el nitrógeno básico volátil total (TVB-N) fue determinado por IMS en el espacio de cabeza de muestras de pescado, con un sistema de introducción de muestra de bajo coste, usando una membrana y dos válvulas de conmutación para análisis en línea (Menéndez et al., 2008). Adicionalmente, para evaluar la vida media y la calidad del pescado, se usaron compuestos volátiles de muestras de agallas extraídas en hexano (Raatikainen et al., 2005). Los resultados demostraron la capacidad de la combinación del análisis IMS-quimiométrico para evaluar la calidad de los alimentos. También se han determinado VOCs como un

marcador de frescura en un producto de pizza con salchichas cocidas (Vestergaar, 2007).

Otro ejemplo interesante relacionado con la determinación de familias de compuestos puede ser la determinación del grupo de monómeros. Los polímeros plásticos usados para el envasado de alimentos se producen con la polimerización de monómeros, potencialmente causantes de severos problemas como las alergias. El análisis IMS de trazas de monómeros demuestra su eficacia a concentraciones límite establecidas (Vautz et al., 2006). El uso de la IMS en el análisis de calidad de los alimentos puede también encontrar aplicación en la detección de metabolitos de olor a rancio formados como subproductos en procesos de producción (Gallegos et al., 2015; Vautz et al., 2008). Usando MCC-IMS, Maddula et al. (2009) encontraron una correlación positiva de etanol, propanona, heptan-2-ona y nonan-2-ona con la actividad metabólica de *Escherichia coli*. Los resultados obtenidos de su crecimiento y la apariencia y área de los picos de aminas biógenas en el espectro de movilidad mostraron una buena correlación.

Muchos microorganismos pueden ser usados como indicadores de maduración y de procesos de alteración. Sin embargo, los microorganismos, alcanzan en su dinámica de crecimiento un máximo en su número y pueden posteriormente decrecer e incluso desaparecer tras alcanzar cierta densidad. Por ello, Karpas et al. (2002) consideran que el pico en el espectro de movilidad puede dar información útil de la frescura de la muestra, mejor que algunos tipos de cultivos bacterianos.

El acoplamiento de IMS con GC o MS ha mostrado interesantes aplicaciones en el estudio del perfil metabólico de diferentes muestras de alimentos. Así, se ha demostrado la capacidad de

HS-MCC-IMS para describir la evolución del perfil de volátiles de muestras de leche y aceite durante 36 días bajo diferentes condiciones de almacenamiento para controlar la oxidación lipídica (Márquez-Sillero et al., 2014). En este artículo, los perfiles de volátiles obtenidos usando polaridad positiva permitieron la cuantificación de algunos compuestos volátiles (hexanal, 2-butanona, acetona y dimetilsulfito) en muestras degradadas y se encontró que el perfil depende de la presencia de ácidos omega-3 poliinsaturados. Otras aplicaciones estudian la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a IMS como preseparación adicional antes de la detección MS. Este acoplamiento ha sido aplicado a diagnósticos tempranos de estrógenos desconocidos en muestras de suplementos dietéticos (Aqai et al., 2013). Además, se detectaron un total de 19 glicósidos de flavonoides y se caracterizaron estructuralmente en extracto de desechos de coliflor usando esta tecnología (González et al., 2014). Finalmente, se puede mencionar que la micotoxina zearalenona y sus 4 metabolitos fueron determinados en harina de maíz aplicando una modalidad de IMS acoplada a MS (McCooye et al., 2008).

1.5.1.3. IMS para huella espectral metabólica

La huella espectral metabólica se centra en la comparación de patrones de metabolitos entre muestras. Ello no tiene como meta la identificación de todos los metabolitos involucrados, pero detecta aquellos considerados biomarcadores (García-Cañas et al., 2010). La industria de alimentos necesita técnicas de rápido tamizaje, como la IMS, para la determinación de la calidad considerando la expectativa de los

consumidores y la autenticidad de la información incluida en la etiqueta de cada producto.

La correlación entre el análisis organoléptico y los analitos químicos obtenidos por IMS puede ofrecer una interesante solución para diferentes análisis de alimentos. Con respecto a la calidad y seguridad de los alimentos, un lote de compuestos volátiles de productos alimenticios se relacionaron con el aroma, sabor, gusto o calidad, lo que es relevante para asociarlo con el origen (Peris et al., 2009). Estos compuestos volátiles pueden ser determinados fácilmente por IMS. También el espacio de cabeza de un queso fue analizado por GC-IMS y se pudo usar para controlar el crecimiento fúngico (Vautz, 2006). También se ha usado exitosamente para evaluar el desarrollo del aroma de fresas durante su vida media, para verificar el grado de infección por *Botrytis cinerea*, basándose en la detección de cambios del perfil de volátiles y para identificar potenciales biomarcadores específicos para *B. cinerea* (3-metilbutanal, cis-4-decenal, 2-metil-1-butanol, 2-metil-1-propanol, 1-octen-3-ona y 1-octen-3-ol (Vandendriessche et al., 2014).

Adicionalmente, se aplicó una modalidad de IMS para la identificación temprana de podredumbre blanda de la patata causada por *Pectobacterium carotovorum* en el campo o durante su almacenamiento. La huella de movilidad iónica se asocia con la podredumbre blanda causada por metabolitos volátiles producidos por el tejido del tubérculo podrido o por la actividad metabólica de la bacteria responsable de los síntomas de la podredumbre (Rutolo et al., 2014).

En el campo de la autenticación de alimentos, actualmente no existen métodos analíticos de bajo coste para autenticar cada pieza puesta en el mercado. Actualmente, es muy

importante seleccionar una técnica fiable para controlar la autenticidad de muchos alimentos altamente apreciados en mercados internacionales (alimentos gourmet, etc.). En este contexto se puede mencionar que para autenticar el régimen de alimentación de cerdos ibéricos, crucial para su consideración comercial, se usaron espectros característicos de movilidad iónica de los compuestos volátiles presentes en la grasa del cerdo (Alonso et al., 2008). El potencial de la IMS para la caracterización de muestras de alimentos se ha demostrado también para el análisis de diferentes tipos de vinos (Garrido-Delgado et al., 2011; Vautz et al., 2006; Vautz et al., 2008). Las muestras de vino contienen habitualmente compuestos volátiles que se pueden usar como marcadores traza relacionados con su origen. Desarrollar sistemas analíticos de vanguardia adecuados para la autenticación varietal de vinos es una cuestión de gran interés, pudiendo usarse para evitar fraudes y ofrecer una alternativa para el análisis sensorial tradicional basado en el panel de expertos entrenados, que a veces tiene estimaciones difíciles, además de no ser siempre factible debido a la subjetividad del análisis, su alto coste y demanda de tiempo. En este sentido, los vinos blancos de características sensoriales similares podrían ser clasificados de acuerdo a su origen, gracias a un sistema de separación de gases que se acopló al dispositivo IMS usando un sistema de inyección de flujo (Garrido-Delgado et al., 2011).

También se demuestra el potencial de la IMS para resolver problemas para los que otras técnicas analíticas no pueden ofrecer soluciones de una manera simple. Así, para evaluar la calidad de un aceite de oliva de alta calidad (aceite de oliva virgen extra) mediante la tecnología IMS, se usó un sistema con espacio de cabeza acoplado en línea a un equipo de GC-

IMS (Garrido-Delgado et al., 2012). También en este caso, la IMS ofrece resultados muy prometedores de cara a la aplicación en la diferenciación de muestras de aceite de oliva de acuerdo a su calidad, en lugar de usar el análisis sensorial. En la Figura 1.10 se muestra el equipo que permite el muestreo directo de los espacios de cabeza de las muestras de aceite.

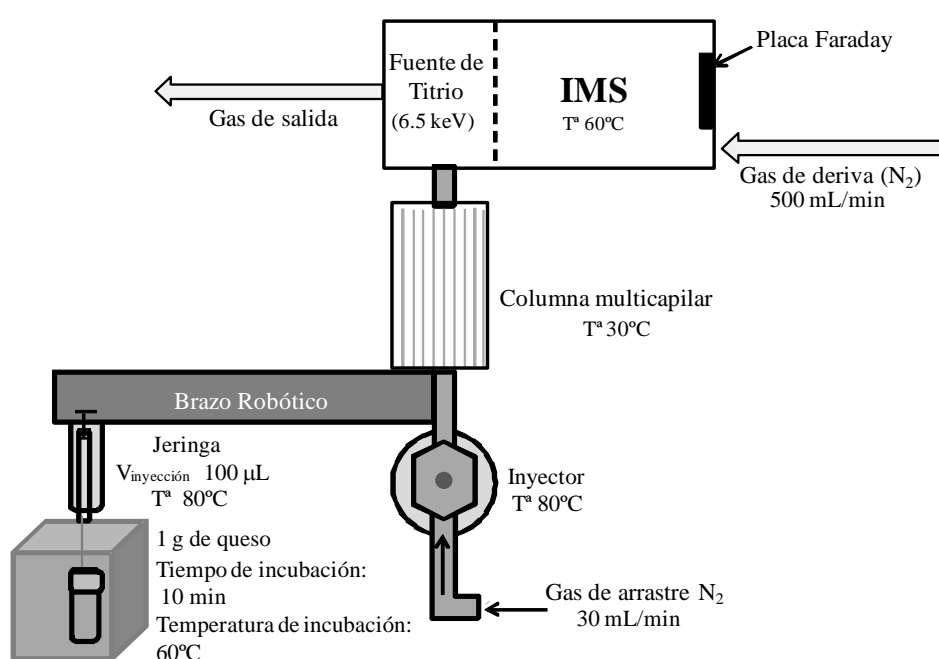


Figura 1.10. Esquema del equipo GC-IMS (FlavourSpec®) y condiciones experimentales para analizar muestras de aceite de oliva virgen (adaptada de Garrido-Delgado et al., 2012)

Los mapas topográficos (Figura 1.11) muestran las señales obtenidas después de analizar tres tipos diferentes de aceite de oliva extra virgen, aceite de oliva virgen y aceite de oliva lampante. Como se puede observar, el patrón principal de los picos para las diferentes clases de calidad son similares, mientras un juego de señales varía. Para determinar un espectro característico (“huella espectral”) de cada tipo de

aceite de oliva, se analizaron varias muestras y los datos obtenidos se estudiaron usando herramientas quimiométricas.

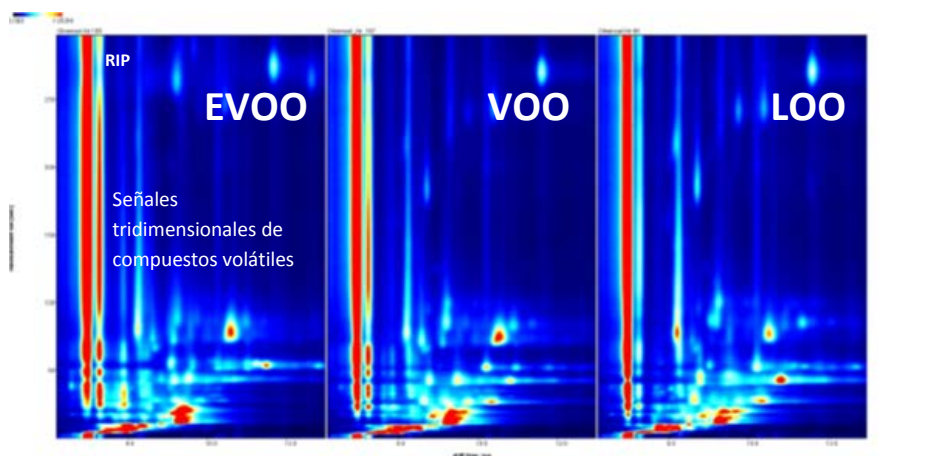


Figura 1.11. Mapa topográfico de aceite de oliva extra virgen (EVOO), aceite de oliva virgen (VOO) y aceite de oliva lampante (LOO). Pico de ión reactante (RIP) (adaptada de Arce et al., 2014)

Finalmente se puede afirmar que la metabolómica se está convirtiendo en un procedimiento interesante para evaluar la calidad de los alimentos, su procesamiento, seguridad y trazabilidad. En base a todos lo considerado en este epígrafe, la IMS puede ser considerada como una nueva herramienta analítica de la química verde para el análisis metabolómico de los alimentos. La IMS no debería ser considerada solamente como un simple sensor, ya que si se acopla con sistemas apropiados de muestreo y columnas de separación respectivamente, podría considerarse como un instrumento rápido, fácil de usar y una herramienta analítica de bajo coste en el campo del análisis metabolómico de alimentos.

Además, la IMS se usa antes de la detección por MS como una etapa de separación. Por lo tanto, la IMS-MS puede suministrar información de una manera bidimensional con la identificación de metabolitos en matrices muy complejas. Por consiguiente, la IMS acoplada a otras técnicas puede proveer

información adicional acerca de problemas no resueltos por otras técnicas analíticas.

1.6. USO DE LA ESPECTROMETRÍA DE MOVILIDAD IÓNICA PARA EL ESTUDIO DE COMPUESTOS VOLÁTILES

1.6.1. Determinación de metabolitos volátiles en quesos de cabra mediante el uso de IMS

Los compuestos del queso responsables del olor pertenecen a varios grupos químicos como alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, lactonas, furanos, compuestos nitrogenados y compuestos del azufre, terpenos y sus derivados, compuestos aromáticos y ácidos grasos libres (d´Acampora et al., 2008).

En cada tipo de queso, la presencia de estos compuestos depende de factores tecnológicos, básicamente relacionados con cultivos microbianos y procesos fermentativos que ocurren durante la formación del queso, especialmente en la maduración, fase en la cual se define el aroma por la conversión de compuestos químicos y bioquímicos de la leche (Smit et al., 2005).

El número de factores que están implicados en el desarrollo del aroma y sabor del queso son múltiples y concuerdan con la diversidad y complejidad de este alimento. A modo de ejemplo, en la elaboración de queso, el origen de la leche y tratamiento (leche cruda o pasteurizada) influyen sobre el aroma (Berard et al., 2007), por la presencia de metabolitos diferentes.

En general, los quesos de leche cruda tienen aromas más intensos y mayor diversidad de compuestos volátiles que los quesos de leche pasteurizada (Rodríguez-Alonso et al., 2009). El uso de leche cruda en la elaboración de queso, puede ampliar la producción de compuestos volátiles, especialmente ácidos, alcoholes y ésteres, probablemente debido a que el tratamiento térmico (pasteurización) inactiva enzimas y microorganismos de la leche, afectando finalmente a la formación del aroma (Hayaloglu y Brechany, 2007).

Desde el punto de vista ecológico, en cada queso, con sus propiedades físicas y químicas, se establecen comunidades microbianas específicas que crean la diversidad de aroma y sabor.

En general, una microbiota típica de alta biodiversidad determina que los quesos de leche cruda sean más propicios para desarrollar sabores más intensos en comparación con los quesos elaborados con leche pasteurizada. Muchas cepas aisladas a partir de quesos de leche cruda se han asociado con la formación de perfiles volátiles complejos, logrando la más alta puntuación para algunos atributos sensoriales. Por el contrario, en algunos casos, la mayor abundancia de compuestos volátiles puede tener poco o ningún significado para el aroma en productos lácteos (Curioni et al., 2002; Delgado et al., 2011; Marilley et al., 2004) y sólo una pequeña fracción de estos compuestos son realmente responsables del aroma del queso.

El sabor y el aroma son atributos de calidad muy importantes para el queso, especialmente en su comercialización, debido a que el consumidor selecciona un queso basándose en primer lugar en las características del aroma/sabor antes que en cualquier otro atributo.

En este contexto, el estudio de los metabolitos volátiles del queso es relevante por sus aplicaciones prácticas, siendo importante puntualizar que:

- i) estos compuestos volátiles son responsables del aroma
- ii) establecen la calidad sensorial
- iii) permiten clasificar los quesos
- iv) permiten establecer el diagnóstico de olores anómalos en caso de haberlos
- v) contribuyen a la trazabilidad

En todo caso, la información disponible sobre el contenido de volátiles específicos de un determinado tipo de queso promueve la estandarización de su elaboración, a través de un mejor control del proceso (Barron et al., 2005; Fox y Wallace, 1997; Mullet et al., 1999).

En particular, este tipo de estudio puede ser útil para definir la calidad del queso, para caracterizarlo y evaluar los cambios durante la maduración y el almacenamiento. Justamente, en la fase de

maduración es deseable acelerar y diversificar el aroma, lo cual resulta de importancia, pues su desarrollo es relativamente lento, costoso y finalmente define la selección del producto por el consumidor, así como el valor comercial de un queso. Igualmente, el sector quesero mantiene el interés en la preservación de aromas típicos de los quesos tradicionales, así como en la formación y el desarrollo de nuevos aromas; de ahí la necesidad de estudiar los aromas de los quesos tradicionales así como los aromas producidos por cepas de BAL de interés tecnológico en quesería.

Desde el punto de vista analítico, el análisis del aroma y sabor de un queso es complejo y difícil de implementar como ensayo de rutina a nivel industrial, situación que se explica por las diferentes etapas a incluir en el protocolo analítico como son la extracción de analitos de la matriz, la separación y su cuantificación. En el primer trabajo experimental realizado en esta Tesis Doctoral, el espacio de cabeza estático se seleccionó para extraer compuestos volátiles de las muestras de queso. El muestreo consiste en extraer la atmósfera alrededor de la matriz del queso colocada dentro de un vial, después de que se haya conseguido un equilibrio. Esta forma de extracción es una herramienta valiosa para el análisis por MCC-IMS, porque combina simplicidad, procedimientos libres de solventes y usa pequeñas cantidades de muestra. Por esta razón el método HS fue el método de extracción seleccionado para el análisis de muestras de queso mediante MCC-IMS.

1.6.2. Identificación de metabolitos volátiles para diferenciar bacterias acidolácticas

Las BAL, gracias a sus características metabólicas y siempre que sean reconocidas generalmente como seguras (GRAS) han determinado variadas aplicaciones a nivel de la industria de la leche, carne, vegetales, cereales y vino, teniendo así mismo otras aplicaciones biotecnológicas, como la producción de probióticos, biopolímeros y enzimas (Temmerman et al., 2004).

Algunas BAL implicadas en el procesamiento de quesos producen cambios químicos en la caseína de la leche, pero la actividad más importante es la fermentación de la lactosa, produciendo ácido láctico, debido a que la tasa de producción de este ácido determina las características químicas del queso, las cuales a su vez seleccionará la microbiota responsable de la maduración. Dicha microbiota empieza a establecerse desde la selección de la leche y está afectada por el ambiente que rodea al queso.

En la microbiota del queso, algunas bacterias permanecerán viables y pueden crecer durante la maduración. Otras serán eliminadas completamente y otras pueden inicialmente ser suprimidas y luego ser favorecidas, o viceversa, según el ambiente químico al cual se hayan expuesto. El proceso en sí es complejo y el entorno químico puede cambiar sustancialmente a medida que progresa la maduración. Los microorganismos viables, la densidad de la población, la sincronización de la muerte celular y la lisis, directa o indirectamente dan lugar a las mencionadas reacciones químicas y bioquímicas que conducen paralelamente el desarrollo de aroma y textura del queso durante la maduración (Kindstedt, 2014).

Por otro lado, los VOCs originados por el metabolismo microbiano son de gran importancia para el perfil aromático de muchos alimentos. Estos compuestos, actualmente, se usan como marcadores para propósitos diversos, especialmente para la detección del deterioro de alimentos (Lemfack et al., 2014). En alimentos fermentados o madurados, como muchos quesos, es de interés conocer y comprender qué componentes del aroma determinan la percepción última por parte del consumidor para llegar a caracterizar estos productos en base a su perfil aromático.

El desarrollo del aroma en el queso madurado resulta de las actividades metabólicas de la microbiota dominante compuesta mayormente por BAL. Estas bacterias caracterizadas por su amplia diversidad ofrecen la posibilidad de enriquecer el aroma y la diversidad de productos lácteos como el queso.

L. lactis subsp. *cremoris* y *L. lactis* subsp. *lactis* suelen ser bacterias lácticas iniciadoras por sus actividad acidificante y proteolítica. En general, *Lactococcus* spp. son acidificantes fuertes (Hussain et al., 2009), mientras *Lactobacillus* spp. son más ampliamente usadas para mejorar el aroma y la textura en varios tipos de quesos (Sahingil et al., 2014).

Durante la maduración del queso, las enzimas liberadas de las BAL iniciadoras y no iniciadoras hidrolizan la caseína en péptidos o aminoácidos, determinando el desarrollo del aroma del queso (Settani et al., 2010), principalmente de VOCs relevantes. En este sentido, el uso de BAL (seleccionadas como cultivos iniciadores) para la producción de queso, así como también las cepas no iniciadoras (para mejorar el sabor y la textura) resulta muy importante. De acuerdo a Cavanagh et al. (2015), *Lactococcus* spp. son las BAL iniciadoras más importantes para la producción de ácido láctico de la lactosa y para convertir la caseína en componentes del aroma. *L. lactis* subsp. *lactis* es capaz de metabolizar arginina vía arginina deaminasa influyendo en el aroma del queso (Brandsma et al., 2012). *Lactococcus* spp. también contribuye al mejoramiento de la textura (Mills et al., 2010). Además, *Lactococcus* se ha asociado a la inhibición de la descomposición del queso y al efecto de microorganismos patógenos, debido a la producción de ciertos agentes químicos (Coelho et al., 2014). *L. lactis* subsp. *cremoris* también se ha incorporado como cultivo iniciador debido a sus actividades acidificante y proteolítica; los aminoácidos se involucran en la producción de metabolitos asociados con el aroma y las propiedades aromáticas (Kamalrul et al., 2012). Además, *Lactobacillus* spp. está implicado en el mejoramiento del aroma y textura en varios tipos de queso. Estas características son difíciles de evaluar a través de análisis de rutina, debido a la complejidad de la metodología analítica y de la instrumentación necesaria para este propósito. Una de las principales técnicas analíticas para determinar VOCs que provengan de microorganismos es la GC-MS. Actualmente la industria alimentaria y los laboratorios analíticos buscan métodos

para determinar a tiempo real los VOCs generados por BAL. La IMS podría ser una técnica apropiada para desarrollar nuevos métodos que se pudieran implantar en los laboratorios agroalimentarios. En esta Tesis Doctoral se ha demostrado el potencial de la GC-IMS para diferenciar distintas cepas de BAL (algunas usadas en el proceso de elaboración de quesos) usando la información global obtenida en los mapas topográficos o usando algunos marcadores.

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1. Justificación

La diversidad en la textura, aroma, sabor y otras propiedades en muchos tipos de quesos como los madurados, dependen de los tipos de leche y del uso de cultivos iniciadores que en conjunto influyen sobre la composición, enzimas y maduración, destacando también los factores tecnológicos, las diferencias en tiempo y la temperatura de almacenamiento. Las propiedades sensoriales de los quesos, la especificidad e intensidad del olor y sabor están determinadas por actividades catabólicas microbianas: el metabolismo de la lactosa, la proteólisis, así como la degradación de aminoácidos, lipólisis y oxidación de ácidos grasos durante la maduración (Duthoita et al., 2005).

Debido a que la actividad microbiana contribuye mediante la producción de compuestos orgánicos volátiles a la tipicidad de un queso, resulta de interés determinar estos compuestos a nivel del proceso tecnológico, en particular en la fase de maduración.

Justamente, la química del aroma/sabor resulta de gran interés porque este atributo refleja la imagen real del producto, y los consumidores esperan un "sabor típico" al comprar un queso. Además, el *screening* del aroma puede aportar información adicional respecto a las prácticas de elaboración, la dieta de los animales o el tiempo de maduración. Estos datos incluso pueden

satisfacer la creciente demanda de la inocuidad y la trazabilidad (Chiofalo et al., 2004).

Por otro lado, la oferta de tecnología que determine y defina los aromas de quesos artesanales o de leche cruda, normalmente asociados a pequeños productores en zonas rurales supone un incentivo a la actividad económica y desarrollo de este tipo de zonas. En el caso de Andalucía, los quesos están asociados a la dieta mediterránea y a la cultura alimentaria de esta región.

Los quesos tradicionales del mundo, tanto de producción artesanal como semiindustrial, no cambian durante siglos y son clave en la economía agrícola de las áreas de producción. Muchos de ellos mantienen una alta calidad y características exclusivas que traen a nuestro tiempo saberes ancestrales, el país de origen, su cultura y su gente. De hecho, los quesos de cabra tienen una perspectiva favorable en países de la Unión Europea, de Oriente, en Estados Unidos y Sudamérica, debido a sus características sensoriales distintivas. En la Unión Europea, como resultado de programas de desarrollo rural, la producción de leche ha incrementado rápidamente en las últimas décadas, aunque globalmente el número de animales esté disminuyendo (Picon et al., 2016). Desde este escenario, la producción de queso artesanal puede suponer nuevas oportunidades para el trabajador del campo y mejores productos para la mesa.

Por estas razones, es necesario preservar la peculiaridad de estos quesos, aspecto que requiere la identificación del aroma y el sabor

que describen mucho mejor al producto que las cualidades físico químicas y microbiológicas y adicionalmente generan un valor añadido para su comercialización.

El estudio del aroma del queso es útil para definir su calidad, para caracterizarlo en relación a sus propiedades sensoriales, a su ambiente original y variedad, para evaluar los cambios durante la maduración y diferenciar entre productos aceptables o defectuosos.

La aceptabilidad del consumidor depende de las características sensoriales y en este contexto el aroma es determinante. El sabor y aroma típico del queso depende básicamente de la actividad bioquímica microbiana y de la tecnología empleada en la elaboración, que a la vez promueven la formación de un amplio rango de compuestos volátiles de diferente polaridad y reactividad.

En la práctica, los compuestos volátiles son importantes en la evaluación y preservación de la calidad del queso. Sin embargo su análisis en productos lácteos es un problema evidente, debido a la complejidad de la matriz, y a la variedad de compuestos orgánicos presentes. A esto se suma el coste que representa la aplicación del análisis sensorial con resultados a veces subjetivos o el coste del uso de técnicas analíticas estándar y de tecnologías para la concentración y extracción de compuestos en la fase preparativa.

Los estudios sobre aromas en la industria quesera son amplios. La técnica de referencia en la mayoría de los casos ha sido la Cromatografía de Gases (GC, de su nombre en inglés) acoplada a la

Espectrometría de Masas (MS, de su nombre en inglés). Sin embargo, se necesitan protocolos analíticos que contribuyan a diferenciar objetivamente los compuestos químicos y que además ofrezcan ventajas frente al análisis sensorial. Este último precisa de un panel de cata entrenado, no siempre accesible para la industria. En este sentido, el empleo de la Espectrometría de Movilidad Iónica (IMS, de su nombre en inglés) surge como una alternativa analítica adecuada al uso del detector MS para el rastreo y control de Compuestos Orgánicos Volátiles (VOCs, de su nombre en inglés) en quesos y cultivos de Bacterias Ácido Lácticas (BALs) por ser una técnica analítica instrumental que suministra alta densidad de información y límites de detección excelentes.

Estas características instrumentales se evidenciaron en ensayos preliminares realizados en el grupo de investigación FQM-215 de la Universidad de Córdoba. Analizando algunos tipos de queso de cabra, oveja y vaca comercializados en la ciudad de Córdoba se obtuvieron mapas topográficos de IMS que mostraron particularidades según el grupo, observándose señales con tiempos de deriva y de retención con repetibilidad adecuada e intensidades con RSD menor al 10%, datos que fueron útiles para la presente Tesis Doctoral.

2.2. Objetivos

Objetivo general

El presente estudio se centró en determinar los compuestos volátiles responsables del aroma en quesos de cabra de distinta variedad así como en diferenciar cultivos de BAL (usadas ampliamente en quesería) empleando la información global obtenida del mapa topográfico o usando solamente los VOCs específicos. Para alcanzar estos objetivos se aplicaron técnicas microbiológicas y se usó la IMS como herramienta analítica a fin de evaluar su potencial de aplicación en ensayos de rutina para el control de calidad en la industria quesera.

Objetivos específicos

- Desarrollar un método usando el sistema Espacio de Cabeza-Columna Multicapilar-Espectrometría de Movilidad Iónica (HS-MCC-IMS, de su nombre en inglés) para describir la huella espectral o aroma global que resulta de un balance entre compuestos orgánicos volátiles presentes en diferentes concentraciones en muestras de quesos procesados con leche de cabra cruda o pasteurizada.
- Determinar en queso de cabra los metabolitos volátiles con potencial uso como marcadores de maduración y controlar su evolución a través del tiempo.

- Analizar muestras de cuatro cepas de BAL (*L. casei*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris*) por IMS y verificar si es posible diferenciar entre las 4 cepas usando la información global encontrada en las huellas espectrales IMS o usando solo algunos compuestos volátiles específicos.
- Establecer la evolución de VOCs relevantes producidos por las cepas de referencia de *Lactobacillus* y *Lactococcus* durante el crecimiento microbiano.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En el trabajo experimental desarrollado en esta Tesis Doctoral se usaron muestras de queso y de cultivos de BAL, estándares, reactivos, materiales de laboratorio, aparatos y el equipo FlavourSpec[®], para el análisis de VOCs provenientes de queso y de cultivos de BAL. En este apartado se enumeran los materiales y reactivos usados, se describe el muestreo seguido, el equipo para IMS y brevemente el análisis de datos.

3.1. Muestras de quesos, selección, preparación y conservación de muestras

Para determinar volátiles en muestras de quesos de cabra se seleccionaron muestras de 10 quesos de diferentes localidades de España. Todos estos quesos se compraron en supermercados. En la etiqueta de estos quesos se indicaba que los quesos fueron elaborados a partir de leche cruda o pasteurizada mediante procesado industrial o tradicional (ver Tabla 2.1).

Adicionalmente, otros 2 tipos de quesos (C1 y C2) elaborados con leche cruda de cabra fueron suministrados directamente por los fabricantes (ver Tabla 2.2). Los quesos C1 fueron de tipo graso, elaborados con cuajo, fermentos lácticos, lisozima y sal. Su etiqueta especificaba un contenido de grasa mínimo del 30% y extracto seco mínimo 65%. Los quesos C1 fueron seleccionados para realizar un seguimiento a lo largo de 150, 180, 210, 240 y 270 días de maduración. Los quesos C2 contenían cuajo y sal, cultivos no iniciadores, extracto seco mayor al 45% y la relación materia grasa/ extracto seco \geq

45%. En este caso, las muestras se tomaron de distintos lotes y tenían 60 días de maduración.

Tabla 3.1. Quesos de cabra comprados en supermercados para el estudio del aroma global de muestras de queso.

Muestra	Tipo de procesamiento*	Tiempo de maduración	Origen geográfico
1	Tradicional	60-120 días	Andalucía
2	Tradicional	20-60 días	Islas Canarias
3	Tradicional	30-60 días	Andalucía
4	Industrial	60-120 días	Andalucía
5	Tradicional	20-60 días	Islas Canarias
6	Industrial	n.d	Castilla-La Mancha
7	Tradicional	60-120 días	Andalucía
8	Tradicional	60-120 días	Castilla-La Mancha
9	Tradicional	60-120 días	Andalucía
10	Industrial	n.d	Castilla-León

nd: no declarado. *Tradicional significa que se ha incorporado el conocimiento ancestral a la tecnología moderna. En todos los casos la leche usada fue pasteurizada.

Para la toma de muestra de queso en el laboratorio se consideraron simultáneamente varios factores, tales como: representatividad, homogeneidad de las muestras y posible alteración de la matriz durante el almacenamiento. Así, debido a que la alteración de la muestra puede ser ocasionada por la actividad enzimática, oxidación de lípidos, crecimiento microbiano y cambios físicos y que además todos estos factores pueden afectar a su uniformidad, se aplicó un muestreo adecuado que garantizara que el procedimiento analítico no se viera afectado y asegurara un perfil de volátiles que corresponda a la realidad, libre de olores anómalos por

deterioro de las muestras, o emisiones procedentes del ambiente.

Tabla 3.2. Quesos de cabra suministrados por productores para la determinación de la evolución de volátiles durante el tiempo de maduración mediante HS-MCC-IMS.

Código de laboratorio	Queso*	Productor	Tiempo de maduración
C2-M2-1	Montes de Málaga	AGAMMA	60 días
C2-M2-2	Montes de Málaga	AGAMMA	60 días
C1-S5-1	El Pinsapo	AGASUR	150 días
C1-S5-2	El Pinsapo	AGASUR	150 días
C1-S6-1	El Pinsapo	AGASUR	180 días
C1-S6-2	El Pinsapo	AGASUR	180 días
C1-S7-1	El Pinsapo	AGASUR	210 días
C1-S7-2	El Pinsapo	AGASUR	240 días
C1-S8-1	El Pinsapo	AGASUR	240 días
C1-S8-2	El Pinsapo	AGASUR	270 días

*Quesos tipo graso madurados y procesados con leche cruda.

Durante el muestreo, los quesos se transportaron al laboratorio en bolsas isotérmicas. Posteriormente se cortaron en piezas triangulares eliminando la corteza (1 cm desde el exterior del queso), se envasaron en láminas de aluminio y en bolsas plásticas de cierre hermético y se congelaron a -18°C hasta el análisis. Con esta forma de almacenamiento se aseguró sobre todo la estabilidad de los compuestos volátiles en la matriz. Antes del análisis, las muestras se descongelaron manteniéndolas durante toda la noche a 4°C. Después se fraccionaron en pequeños gránulos y una porción representativa de cada tipo de queso (100 g) se conservó a temperatura ambiente durante al menos 1 hora antes de la pesada. Este muestreo garantiza la homogeneización de los

VOCs que pueden encontrarse en distintos gradientes de concentración en la matriz.

3.2. Preparación de cultivos de bacterias ácidolácticas para el análisis mediante IMS

Se usaron cepas liofilizadas de *L. paracasei* subsp. *paracasei* CECT 4022, *L. lactis* subsp. *lactis* CECT 185, y *L. lactis* subsp. *cremoris* CECT 7100 procedentes de la colección española de cultivos tipo CECT (Burjassot, Valencia, España). La otra cepa, de *L. casei*, se aisló de una leche fermentada comercial.

Las cepas liofilizadas se reactivaron adicionando 0.5 mL de caldo de *Man Rogosa Sharpe* (MRS) (Oxoid CMO359) al cultivo deshidratado, dejando humectar durante 30 minutos antes de subcultivar simultáneamente en 5 mL del mismo caldo, en placas y en tubos inclinados de agar MRS (Oxoid CMO 361). Estos subcultivos se incubaron a 33°C ó 37°C según lo requerido por la cepa, durante 24-48 horas, siendo necesario realizar tres cultivos sucesivos en caldo y agar MRS para que las BAL recuperen su metabolismo normal.

L. casei se aisló diseminando 0.1 mL de la dilución 1×10^5 UFC/g en la superficie de agar MRS. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 24-48 horas y se aislaron colonias. Las cepas de referencia se almacenaron a 4°C para uso diario, y para su conservación a largo plazo se criopreservaron se adicionó glicerol al 30%, almacenándolos a -20°C.

Para la determinación de VOCs emitidos por las BAL se procedió de acuerdo al siguiente orden: las cepas se reactivaron estriando 1 µL de cultivo fresco en caldo, en agar MRS, incubándose posteriormente a 33°C durante 24 h. Una colonia de cada BAL se suspendió en 60 mL de caldo MRS y se

incubó durante 24 horas. Se anotó la densidad óptica ($O.D._{540nm}$) de cada cultivo como una medida indirecta de concentración celular, dato que sirvió como referencia para determinar los VOCs a partir de cultivos en caldo con similar crecimiento y actividad bacteriana. El esquema del proceso está resumido en la Figura 3.1

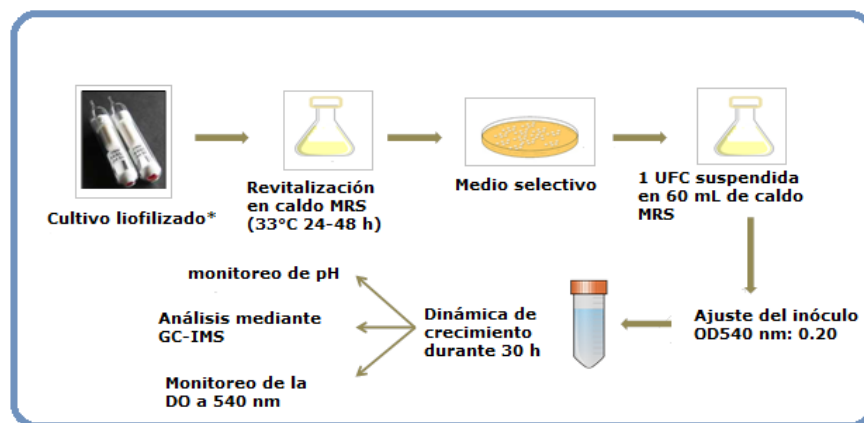


Figura 3.1. Esquema de la preparación de cepas de BAL para análisis mediante GC-IMS. *Excepto las cepas aisladas de una leche comercial fermentada. UFC= unidad formadora de colonia. OD= densidad óptica.

3.3. Determinación de VOCs durante el crecimiento de las BAL

Se tomaron medidas de GC-IMS para evaluar las huellas espectrales y sus metabolitos volátiles durante el crecimiento en caldo MRS (24-30 h). Los cultivos se prepararon diluyendo una alícuota de un cultivo fresco en caldo MRS hasta asegurar una $D.O._{540 nm}$ de alrededor de 0.20 (aproximadamente 15×10^6 UFC mL^{-1}). Alícuotas de 7 mL de este cultivo se vertieron en tubos diferentes y se incubaron en un baño de agua a 33°C durante el período de estudio. Durante el tiempo de incubación se mantuvieron cerrados los tubos. Se tomó un tubo para cada medida GC-IMS, primero cada 30 minutos (durante las 2

primeras horas) y después cada 90 minutos durante un total de 24 a 30 h. Al final de cada tiempo de incubación, se transfirió 1 mL de cultivo a un vial de 20 mL para ser analizados mediante GC-IMS. Cada medida se realizó por duplicado para cada cepa. Al mismo tiempo se determinaron la $D.O_{540nm}$, el pH, la viabilidad celular y la ausencia de contaminantes. Estas dos últimas se determinaron estriando 10 μ L de cultivo en MRS agar.

Se analizó también una mezcla de VOCs estándar usando el mismo método GC-IMS. Adicionalmente se analizaron blancos de viales vacíos así como con medio de cultivo, a fin de descartar señales interferentes que puedan afectar a las mediciones GC-IMS de interés.

3.4. Puesta a punto del método de medida de VOCs usando HS-MCC-IMS

En primer lugar, usando el equipo IMS con columna multicapilar (Figura 3.2) se analizaron muestras de quesos de cabra ($n=6$) y se realizó una inspección visual de los mapas topográficos a fin de reconocer las señales IMS más frecuentes y representativas (señales de interés) de los VOCs emitidos por estas matrices. De cada análisis se obtuvieron 3 datos: tiempo de deriva (ms), tiempo de retención (s) y la intensidad (V) de las señales.

Previamente a la determinación de VOCs en las muestras de quesos de leche cruda o pasteurizada de cabra fue necesario encontrar las mejores condiciones de operación del equipo HS-MCC-IMS en términos de la máxima sensibilidad, resolución y selectividad de las señales de interés.

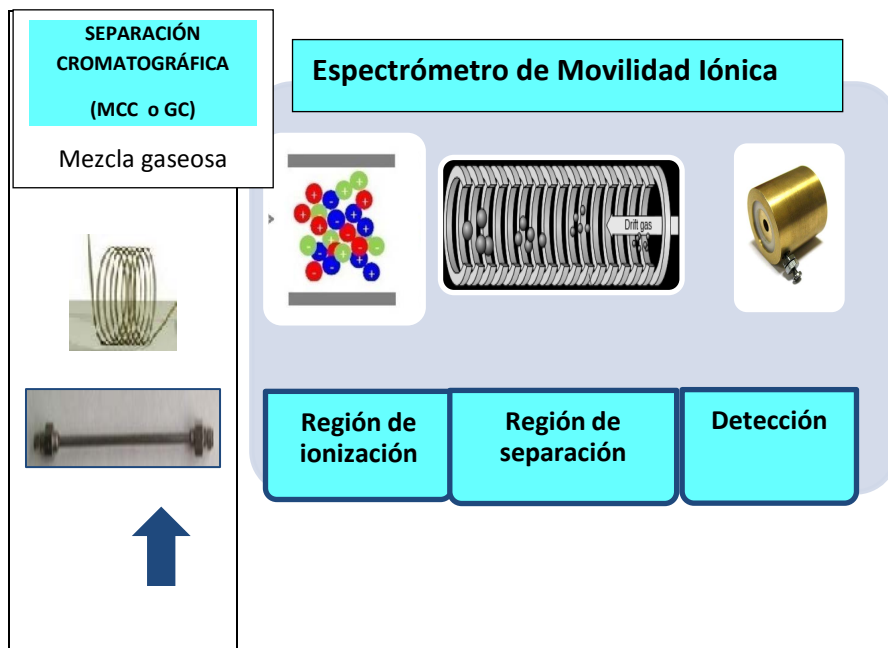


Figura 3.2. Esquema del equipo IMS con sus componentes: columnas MCC o GC (uso alternativo), tubo de deriva IMS, placa de Faraday como detector.

Se usaron dos réplicas de cada queso para optimizar las variables relacionadas con el funcionamiento del sistema de inyección de la muestra, la columna de separación y los parámetros propios de la IMS, según se ilustra en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Parámetros del automuestreador y de la IMS usados en la puesta a punto del método para queso.

Parámetros del automuestreador	
Cantidad de muestra (g)	0.5, 1, 2, 3
Temperatura de incubación (°C)	40, 50, 60, 70, 80
Tiempo de incubación (min)	2, 5, 8, 10
Volumen de inyección (µL)	100, 250, 500
Parámetros IMS	
Temperatura del tubo de deriva (°C)	40, 45, 50, 55, 60
Flujo del gas de muestra (mL/min)	10, 20, 30, 40, 50
Media	16, 32

Para la determinación de VOCs emitidos por las BAL se realizó una reoptimización del método IMS aplicado al queso, y los

parámetros del automuestreador e IMS se ajustaron a los valores señalados en la Tabla 3.4. En este caso la principal diferencia fue que se mejoró la selectividad del método cambiando la columna MCC por una de GC de 30 m.

Tabla 3.4. Parámetros experimentales para la determinación de VOCs de BAL mediante HS-GC-IMS.

Variables	Condiciones
Sistema de introducción de volátiles	
Espacio de cabeza del vial	20 mL
Tiempo de incubación	5 min
Cantidad de muestra	1 mL
Temperatura de incubación	35°C
Temperatura del inyector	80°C
Volumen de inyección	500 µL
Velocidad de agitación	500 rpm
Columna	
Columna cromatográfica	Apolar
Longitud de la columna	30 m
Temperatura de la columna	40°C
Tiempo de análisis	30 min
IMS	
Fuente de ionización	Tritio
Voltaje	Positivo
Flujo del gas de muestra	5 mL/min (N ₂ 5.0)
Flujo del gas de deriva	150 mL/min (N ₂ 5.0)
Temperatura del tubo de deriva	65°C
Media de espectros	32
Tiempo de retardo	100 ms
Número de espectros	1298
Longitud del espectro	3000
Ancho del pulso	100 µs
Intervalo de repetición de la medida	21 ms
Frecuencia de muestreo	150000 Hz

3.5. Muestreo de VOCs

Los compuestos de la fracción volátil de los quesos estudiados se muestrearon mediante el método HS, para lo cual se pesaron por duplicado 1 ± 0.1 g de cada tipo de queso en viales de 20 mL que se cerraron con un septo de silicona y tapa con rosca magnética. Después de 8 minutos de calentamiento a 70°C y velocidad de agitación de 500 rpm se inyectaron 100 μL de muestra del espacio de cabeza de manera automática en el inyector (a 80°C) del equipo IMS.

Los VOCs procedentes de cultivos bacterianos se muestrearon por el mismo método estático HS colocando 1 mL de cultivo en un vial de 20 mL herméticamente cerrado con septo de silicona y tapa con rosca, con calentamiento a 35°C durante 5 min y velocidad de agitación de 500 rpm.

3.6. Reactivos usados para la preparación de soluciones stock y estándares de VOCs

Los reactivos de alta pureza fueron suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO. USA) y fueron conservados en el laboratorio conforme a las condiciones especificadas en sus instrucciones de uso. A continuación se describen los reactivos por grupos funcionales.

- **Alcoholes:** 2-propanol, 2-butanol pentanol, 1-hexanol, 2-metil butanol, 3-metil butanol, 2-3 butanodiol, 1-octen-3-ol.
- **Aldehídos:** acetaldehído, diacetilo, hexanal, heptanal, octanal, nonanal, decanal, trans-2-heptenal, benzaldehído.
- **Ácidos:** ácido propiónico.
- **Cetonas:** 2-butanona, 2-pentanona, 2-hexanona, 2-heptanona, 2-octanona, 2-nonanona.

- **Ésteres:** etil acetato, hexil acetato, etil butanoato, etil hexanoato, propil butanoato.

Estos compuestos son característicos de la fracción volátil del aroma de quesos (Delgado y col., 2011), entre ellos el queso madurado de cabra. Además, al ser producidos por el metabolismo de las BAL, algunos de estos compuestos fueron también determinados en los cultivos de bacterias. Todos los compuestos objeto de estudio en este trabajo se pueden medir con un Espectrómetro de Movilidad Iónica con fuente de tritio ya que tienen una afinidad protónica mayor que el agua (ver Figura 3.3).

		Familias de Compuestos Orgánicos Volátiles	KJ/mol	Compuesto
Afinidad protónica		Aminas aromáticas	930.0	Piridina
		Aminas	899.0	Metil Amina
		Compuestos Fosforados	890.6	Trimetilfosfato
		Sulfóxidos	844.4	Dimetilsulfóxido
			853.6	Amonio
		Cetonas	832.7	2-Pentanona
		Ésteres	821.6	Acetato de metilo
		Alquenos	805.2	1-Hexeno
		Alcoholes	789.2	Butanol
		Aromáticos	750.4	Benceno
			691.0	Agua
		Alcanos	543.5	Metano

Figura 3.3. Afinidad protónica de algunas familias de compuestos químicos (Gary Eiceman & Zeev Karpas, Ion Mobility Spectrometry, CRC Press, 2005).

Para el análisis de queso, las soluciones stock se prepararon diluyendo el respectivo compuesto a 5000 mg Kg^{-1} y luego se diluyó a 100 mg Kg^{-1} en aceite refinado para usarlo como disolución de trabajo. El aceite refinado se usó para la preparación de diferentes soluciones stock debido a su similitud con el alto contenido de grasa de las muestras de queso. Cabe indicar que la matriz aceite no interfiere con los metabolitos estudiados mediante IMS.

Los diferentes patrones de VOCs en cultivos bacterianos se escogieron por su interés en la producción de sabor y olor en el queso (Marilley & Casey, 2004) y son los mismos a los descritos anteriormente.

Las soluciones stock de los analitos se prepararon en agua Milli-Q (Millipore, Madrid, España) a una concentración de 1000 mg L^{-1} y se mantuvieron en la oscuridad a 4°C . Las soluciones estándar de 0.1 mg L^{-1} y 1 mg L^{-1} se prepararon diluyendo las soluciones stock en el mismo solvente.

Los compuestos químicos de referencia se usaron para confirmar inequívocamente la presencia de algunos VOCs. En las muestras de queso, así como en los cultivos de BAL se adicionó una cantidad establecida de cada analito puro en la matriz (queso o medio de cultivo) seguido por el análisis GC-IMS.

3.7. Otros reactivos, ingredientes y medios de cultivo

- El agua usada para preparar las disoluciones de los distintos compuestos orgánicos volátiles de distinta concentración fue de calidad ultrapura, obtenida mediante un sistema de purificación Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

- El agua para la preparación de medios de cultivo fue agua destilada.
- Nitrógeno 5.0 suministrado por Abelló Linde (Barcelona, España). Se usó como gas de deriva y de muestreo para el equipo de IMS.
- Medios de cultivo comerciales "agar M17" y "agar MRS" (Oxoid).
- Lactosa (+) monohidrato extrapura (Scharlau) para suplementar el medio M17.
- Ciclohexamida 0.1 g L⁻¹ como agente selectivo para inhibir el crecimiento de levaduras en el medio MRS.
- Ácido acético glacial para preparar una disolución 5 M para acidificar el pH del medio MRS.
- Triptona (Oxoid) como diluyente de los quesos.
- Citrato de sodio al 2%, como diluyente de queso, preparado a partir de citrato de trisodio di-hidratado PA-ACS (Panreac Quimic S.A., Barcelona).
- Peróxido de hidrógeno al 1%, preparado por dilución de H₂O₂ al 33% (Panreac Quimic S.A., Barcelona).
- Kit para tinción de Gram (Panreac Quimic S.A., Barcelona).
- Jarras de anaerobiosis GasPak BBL y Anaerogen (Thermo scientific).
- Glicerol (Panreac Quimic S.A., Barcelona).
- Aceite de inmersión (Panreac Quimic S.A., Barcelona).

3.8. Material de laboratorio

- Matraces aforados de 10, 50, 100 y 250 mL.

- Probetas de 100 y 250 mL.
- Micropipetas de 10, 100 y 1000 μ L.
- Aspiradores de seguridad para pipetas.
- Pipetas de serología, estériles, 10 mL.
- Pipetas Pasteur.
- Frascos de vidrio con tapa de polipropileno, 10, 50 y 100 mL.
- Viales de 20 mL con septum de silicona y tapa con rosca magnética.
- Tubos de ensayo.
- Tubos de cultivo de poliestireno, 12 mL.
- Tubos de cultivo de vidrio con tapa rosca, 12 mL.
- Frascos de vidrio autoclavable con tapa rosca de 100 mL y 500 mL.
- Placas de Petri 90 cm de diámetro.
- Tubos Eppendorf de 1.5 mL.
- Gradillas desmontables, autoclavables con y sin referencia numérica.
- Cajas para conservación de cepas a -80°C .
- Espátula e instrumentos para muestreo de alimentos.
- Espátula de Digraskly.
- Asas y agujas de Ni-Cr para inoculación.
- Parafilm[®] M.
- Bolsas estériles para Stomacher.
- Bolsas de plástico con cierre hermético.
- Guantes de nitrilo.

- Varios: mechero, pinzas, varilla y barras magnéticas.
- Contenedores de seguridad de diferentes características para la correcta disposición de los residuos biológicos y químicos.

3.9. Aparatos y otros instrumentos

- Cámara de flujo laminar Burdinaba AV-100.
- Espectrofotómetro Biopharmacy.
- Autoclave vertical P Selecta.
- Contador de Quebec.
- Baño de agua termostatzado Indelab 0-100°C.
- Balanza analítica OHAUS Explorer 0.01 a 110 mg, con un error de 0.0001 g (OHAUS, Nänikon, Suiza).
- Balanza digital Blauscal AH-30.
- Potenciómetro Basic 20 Crison.
- Homogeneizador de laboratorio Stomacher 400.
- Placa calentadora Agimatic-N P Selecta.

3.10. Espectrómetro de Movilidad Iónica para determinación de VOCs

El instrumento utilizado para el análisis de VOCs procedentes de quesos y de cultivos de BAL fue el espectrómetro de movilidad iónica (FlavourSpec[®]), que permite el análisis directo de la fracción volátil de muestras sólidas y líquidas.

El equipo de medida usado tiene tres partes bien diferenciadas (ver Figura 3.4): el automuestreador de espacio de cabeza (CTCPAL, CTC Analytics AG, Zwingen, Suiza), la columna

cromatográfica (MCC o GC) y un tubo de deriva lineal con una placa de Faraday usada como detector. El automuestreador de espacio de cabeza tiene una bandeja para 32 viales de muestra, una cámara de calentamiento y agitación y un brazo mecánico que introduce automáticamente los viales en la cámara para generar el espacio de cabeza, que se inyecta en el inyector del equipo IMS.

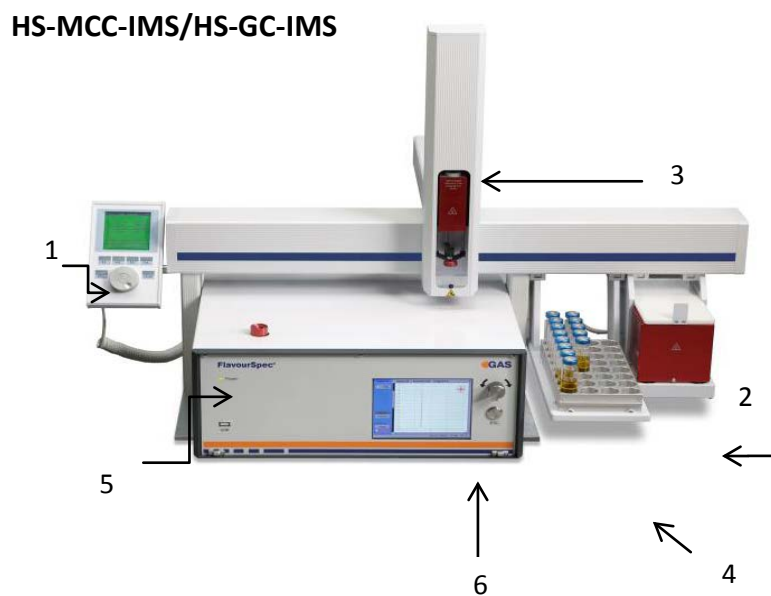


Figura 3.4. Fotografía del equipo FlavourSpec® 1) control del automuestreador, 2) cámara de calentamiento con agitación, 3) brazo mecánico, 4) bandeja de muestras 5) puerto de inyección, 6) botones de control manual.

En el FlavourSpec® la fuente de ionización es de tritio (6.5 KeV) que genera iones positivos o negativos. En el tubo de deriva de 5 o de 10 cm de longitud las especies ionizadas son aceleradas por efecto del campo eléctrico de 400 V cm^{-1} (ver Figuras 3.5 y 3.6 E). El equipo funciona a presión atmosférica y se pueden seleccionar las temperaturas del: *i)* inyector, *ii)* columna de separación cromatográfica (ver Figuras 3.6 A, 3.6 C y 3.6 D) y la del *iii)* tubo de deriva (ver Figura 3.6 E).

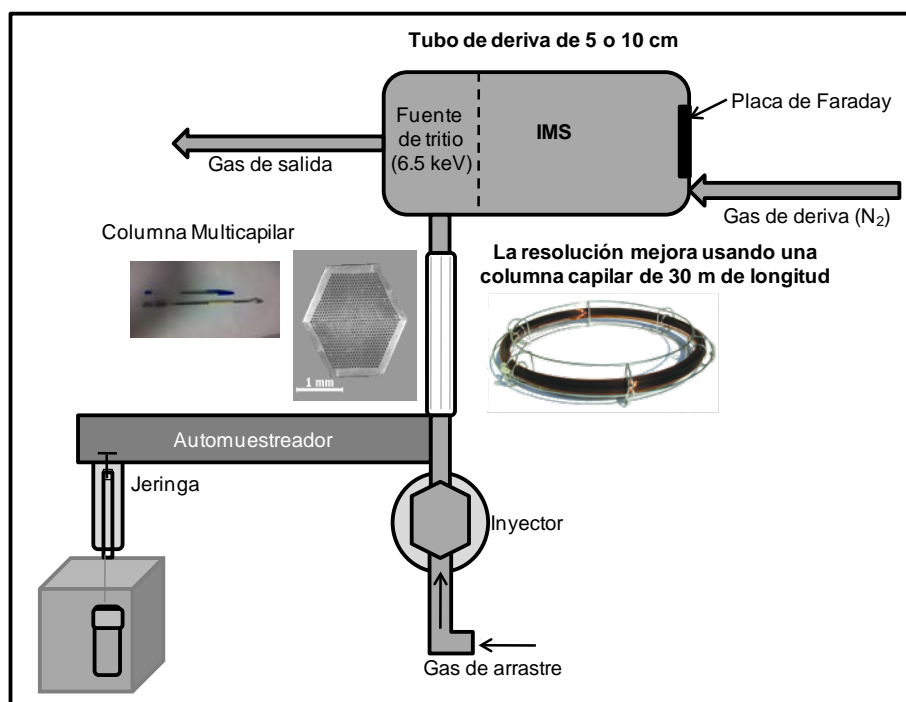
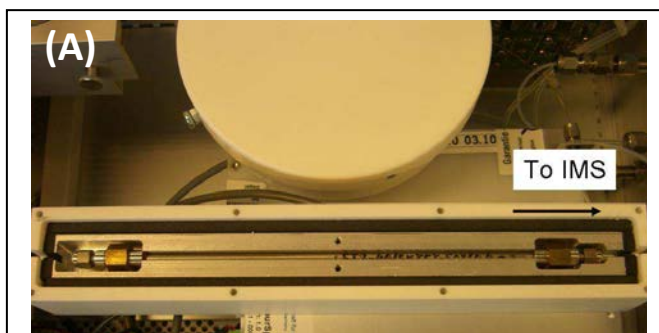


Figura 3.5. Esquema del equipo “Espacio de cabeza-columna de separación-Espectrómetro de Movilidad Iónica”.

En los trabajos de esta Tesis, se han utilizado: a) una columna MCC de 20 cm de longitud conformada por aproximadamente 1000 capilares de vidrio, paralelos, rellenos con 25% trifluoropropil y 75% de polidimetil polisiloxano (Multichrom Ltda. Novosibirsk, Russia) para la separación de los VOCs de queso y b) una columna cromatográfica SE-54 (5% difenil y 98% dimetilpolisiloxano), no polar de 30 m de longitud x 0,2 mm de diámetro usada para la detección de VOCs en cultivos de BAL.



114



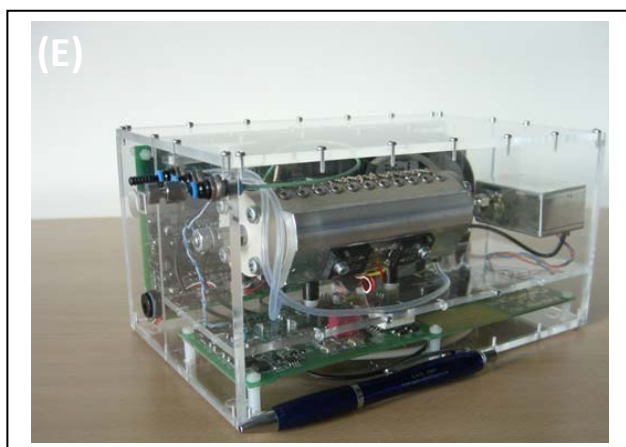
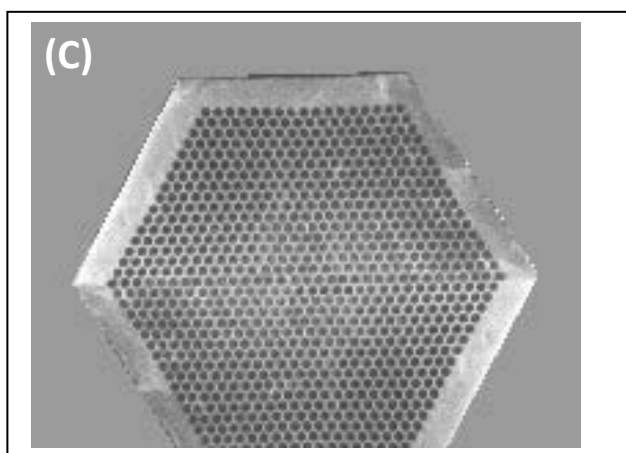


Figura 3.6. (A) Horno para la MCC o GC (B) Interior del Flavourspec[®] (C) sección transversal de la columna multicapilar, (D) longitud de una MCC (E) imagen del tubo de deriva.

Los datos generados se reciben a través de un procesador integrado al equipo IMS, para su posterior tratamiento mediante un programa asociado al sistema; LAV 2.0.0 (G.A.S. mbH. Dortmund, Alemania) que permite visualizar los datos de

MCC-IMS y GC-IMS. En la Figura 3.7 se muestra un espectro obtenido con el equipo Flavourspec®.

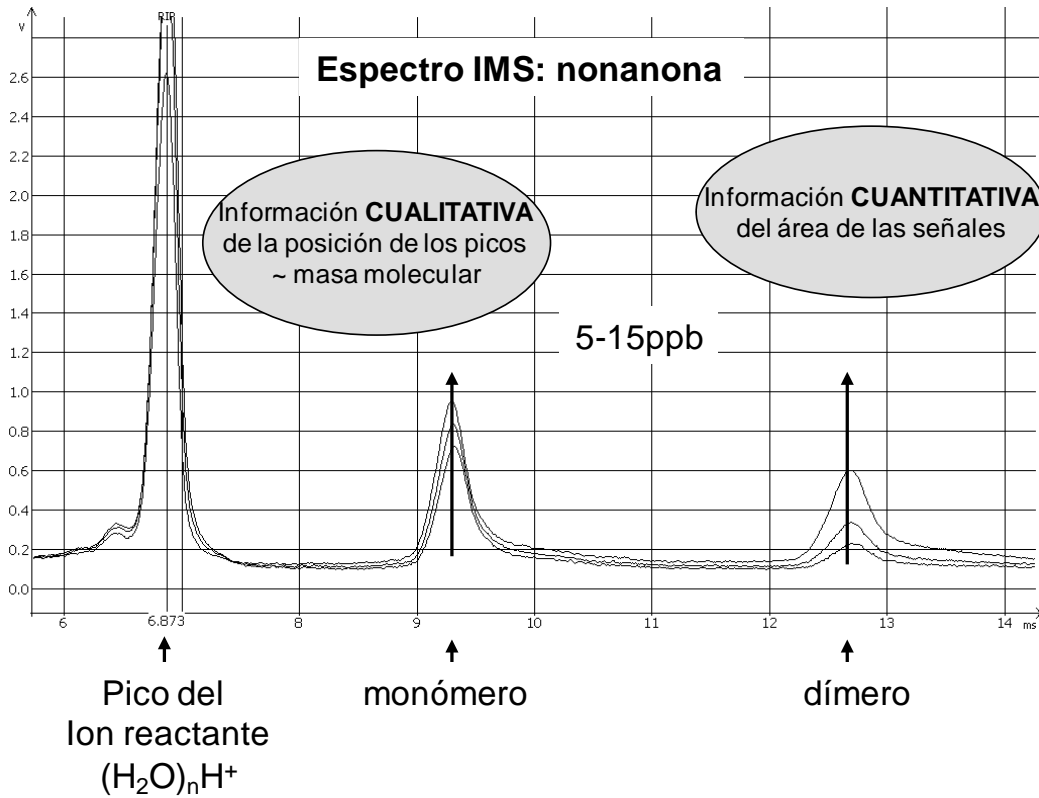


Figura 3.7. Espectro de la nonanona, los compuestos ionizados dan señales características en los espectros de IMS.

Un detector de IMS a veces no tiene poder de resolución suficiente para separar una mezcla compleja de analitos, tal y como se observa en la Figura 3.8. Algunos compuestos de esta mezcla se separan si la masa y forma de los iones es diferente, pero algunos de ellos pueden migrar al mismo tiempo.

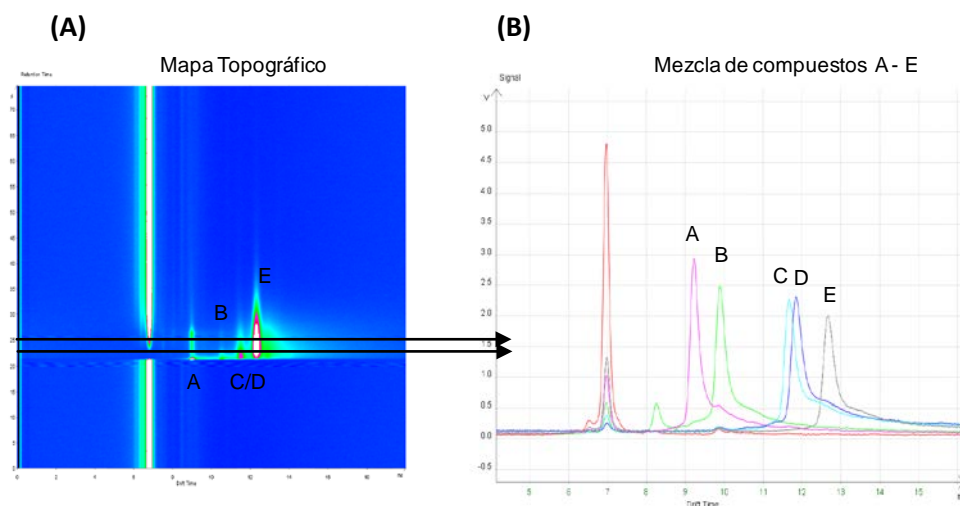


Figura 3.8. (A) Mapa topográfico de un IMS. Eje y: número de espectro; eje x: tiempo de deriva y eje z: intensidad de cada pico (B) Superposición de espectros.

Al acoplar una columna de separación a un detector de IMS se aumenta el poder de separación del IMS al realizarse una separación previa de los compuestos a analizar por IMS. En la Figura 3.9 se muestra cómo una mezcla de compuestos no resuelta usando sólo un IMS (todos los compuestos aparecen al mismo tiempo de deriva) se podrían separar al incluir una columna de separación previa al tubo de deriva. Por otra parte, dos o más compuestos que migran por la columna al mismo tiempo (eluyen al mismo tiempo de retención) se pueden separar en el IMS si la masa y forma de los iones de la mezcla es diferente.

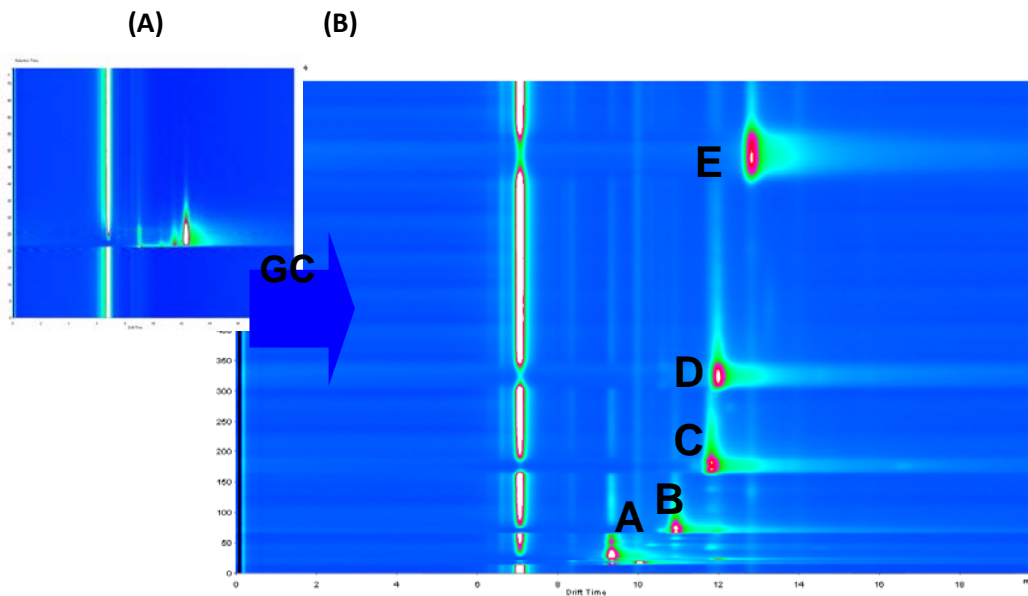


Figura 3.9. (A) Mapa topográfico cuando no se acopla una columna de GC al IMS. (B) Mapa topográfico de un GC-IMS o MCC-IMS para la misma mezcla de compuestos. Eje y: tiempo de retención; eje x: tiempo de deriva y eje z: intensidad de pico.

En resumen, de una sola medida en un equipo de GC-IMS o MCC-IMS se obtienen tres gráficos distintos (mapa topográfico, espectro y cromatograma) como se muestran en la Figura 3.10.

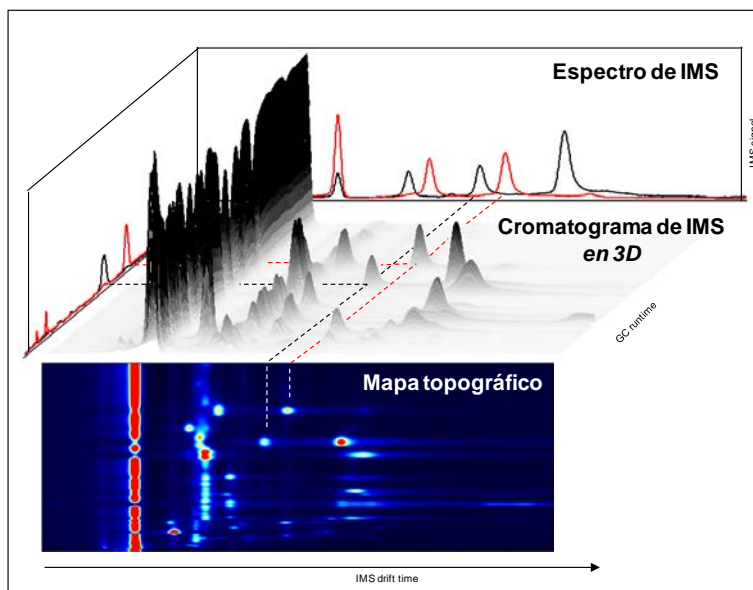


Figura 3.10. Conjunto de gráficos que se obtienen de un análisis por GC-IMS

En la Figura 3.11 se aprecia que el equipo es muy repetitivo en término del tiempo de deriva, seguido por los valores obtenidos con respecto al tiempo de retención. El valor de desviación estándar es ligeramente más alto en términos de intensidad de pico.

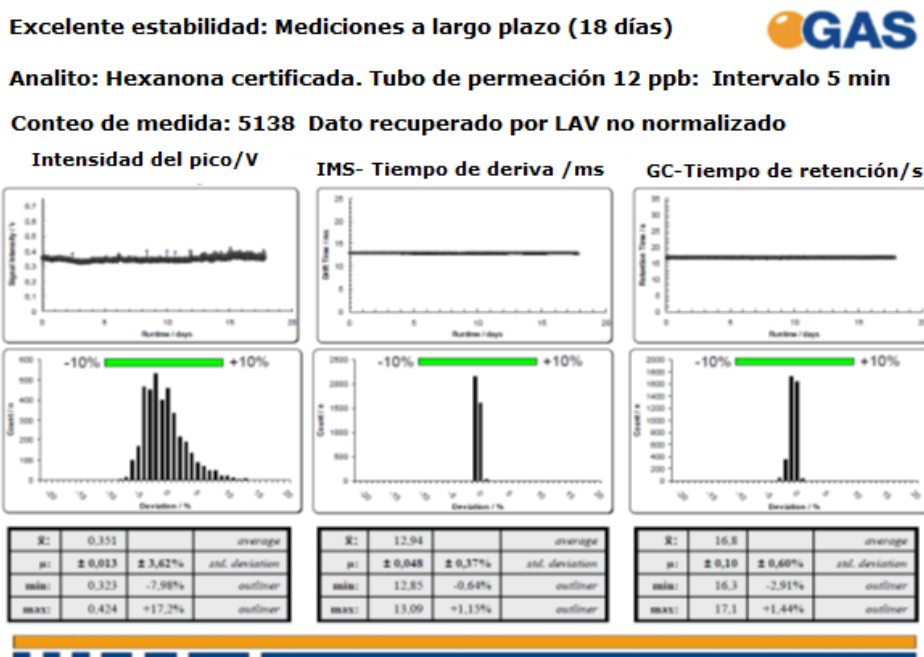


Figura 3.11. Valores medios y desviación estándar de un patrón de hexanona ($12 \mu\text{g L}^{-1}$).

Debido a las reacciones ion molécula que ocurren en la cámara de ionización, una identificación precisa de una mezcla de compuestos no es posible con el 100 % de seguridad. El poder de identificación aumenta al acoplar este detector de IMS a un MS. Sin embargo existen bases de datos en las que es posible identificar una señal con un compuesto químico usando los valores de tiempo de retención y deriva de cada señal como se muestra en la Figura 3.12.

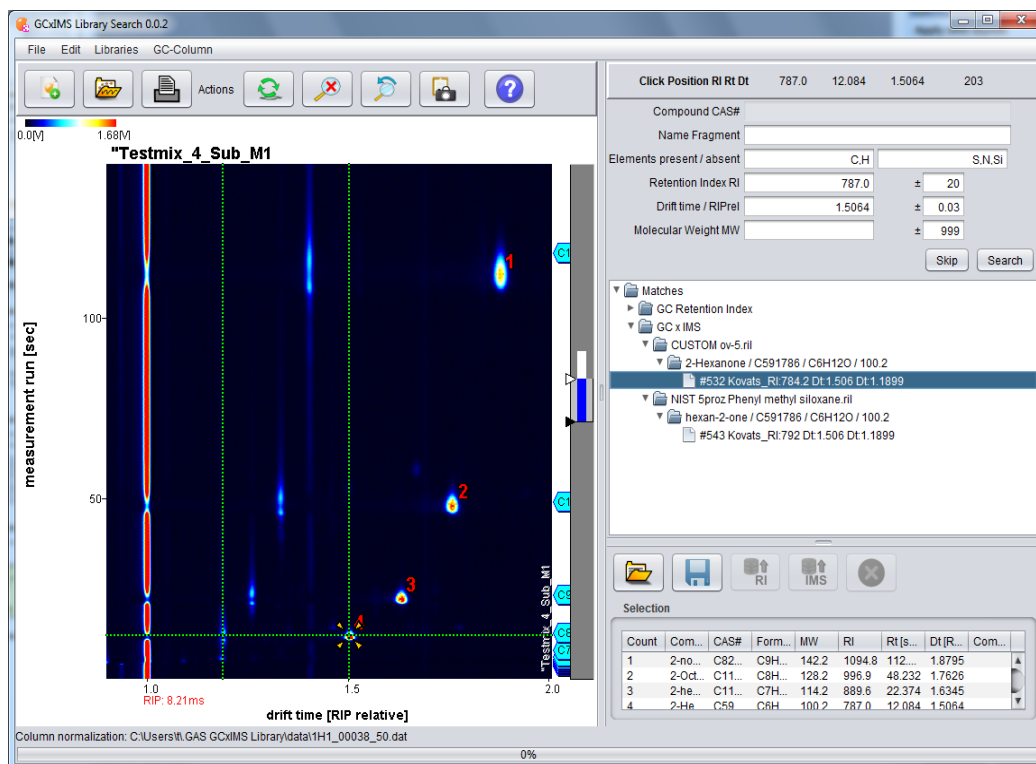


Figura 3.12. Software (GC x IMS Library Search) de la casa comercial G.A.S. para la identificación de compuestos.

Adicionalmente, se usó también el programa MATLAB (The Mathworks Ins, Natick, MA, USA, 2007) para realizar el análisis multivariante.

3.11. Análisis de datos

Las muestras de quesos y cultivos de BAL analizadas mediante MCC-IMS o GC-IMS generaron información que se procesó mediante análisis multivariante. Previamente se aplicó un preprocesado para mejorar la relación señal-ruido asegurando una mejor calidad del análisis. El preprocesado comprendió las fases de: alineamiento de espectros, eliminación de la línea de base, reducción de ruido mediante el filtrado de datos usando el filtro de Savitzky-Golay y el centrado de la media.

Inicialmente, las señales IMS se estudiaron manualmente a fin de identificar los picos característicos y más representativos, y para eliminar señales no deseables o anómalas que pudieran distorsionar la información relevante. Con este fin se comparó la similitud de las réplicas y se alinearon los espectros en relación al RIP y a una señal característica. Esta fase es la más crítica para realizar un análisis de componentes principales (PCA), porque si ocurren errores en la alineación, el PCA no clasificará las muestras correctamente. El alineamiento se basa en un ajuste polinómico de posición de los picos observados a la posición del pico de referencia.

El ajuste a la línea de base permite determinar adecuadamente el pico de interés e interpretar adecuadamente los resultados. Es importante tener en cuenta que los espectros pueden desalinearse por cambios de presión, temperatura y humedad. En la Figura 3.13 se muestra un ejemplo de una misma muestra de patrones analizada durante cinco días. Las señales del mismo patrón sufren ligeras variaciones sobre todo en el eje de la y (tiempo de retención).

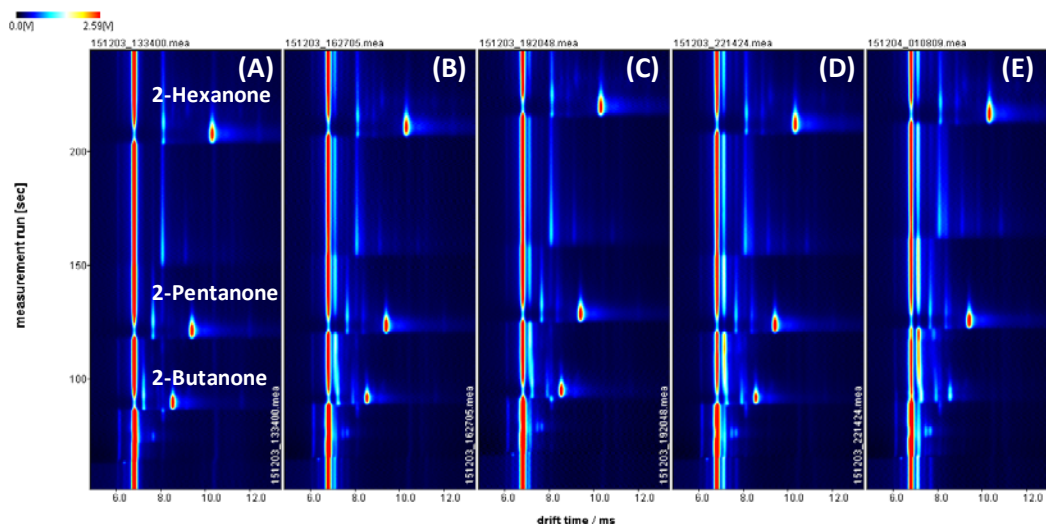


Figura 3.13. Medida de la mezcla de patrones en 5 días diferentes. Los mapas topográficos (C) y (E) evidencian un t_r ligeramente más alto para la señal de 2-hexanona observada en el mapa topográfico (A).

Para la reducción del ruido se usó el algoritmo de Savitzky y Golay (1964), que realiza una regresión polinómica para determinar un valor suavizado para cada punto (dato). Se usó el filtro con los coeficientes 15,2 para preservar la altura y el ancho de los picos. La media centrada establece un valor medio para cada variable. Este valor se restará de cada dato para crear una matriz centrada en el medio. Después del preprocesamiento de datos se procedió al análisis multivariado aplicando el PCA.

La Figura 3.14 resume como se alinean las muestras y se concatenan los espectros obtenidos a cada tiempo de retención para realizar los distintos tratamientos quimiométricos.

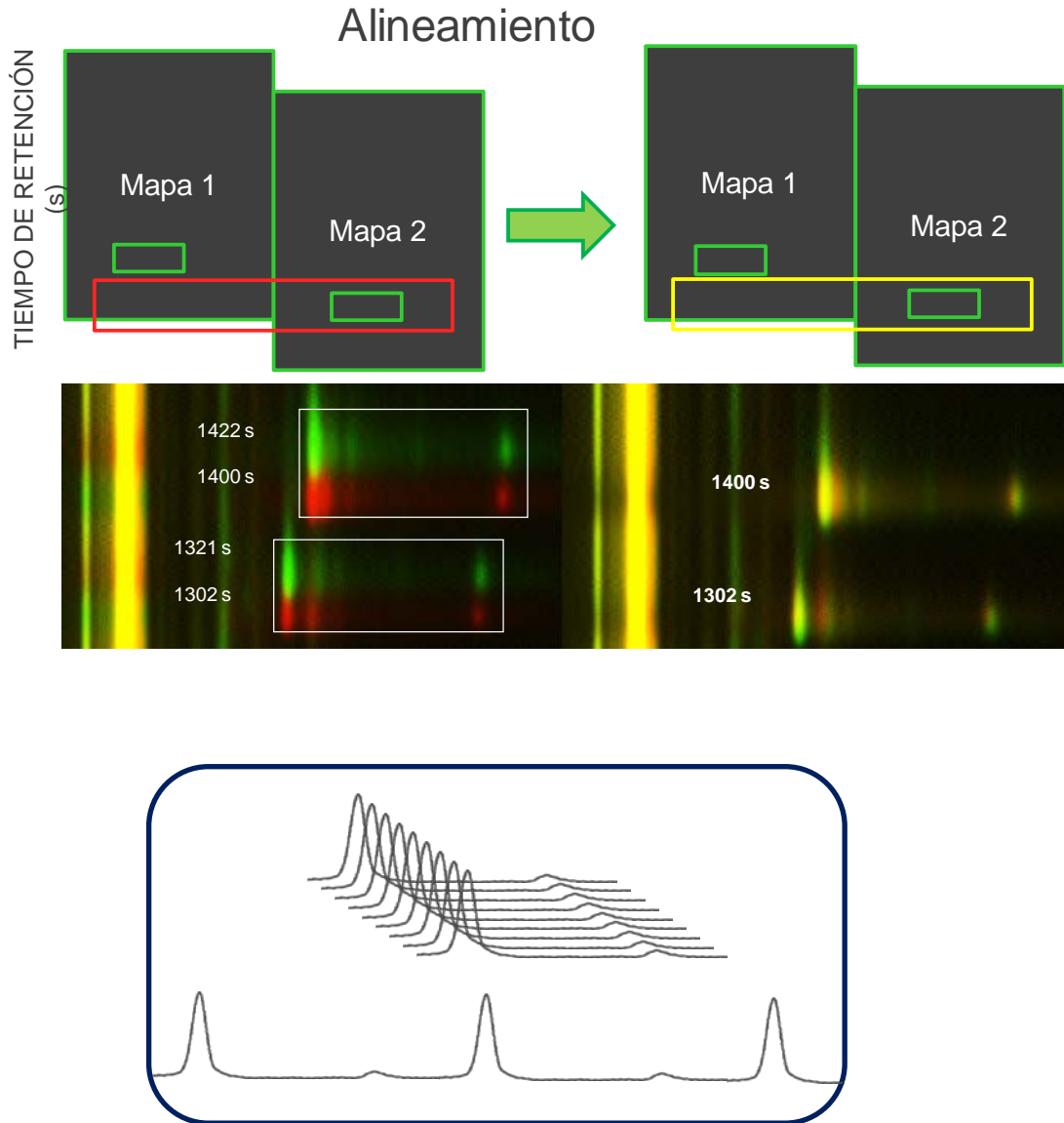


Figura 3.14. Alineamiento de espectros y concatenación de espectros

Como se ha mencionado anteriormente la técnica IMS para la determinación óptima de VOCs en cualquier tipo de muestra y particularmente en el queso necesita de métodos estadísticos multivariantes que permitan relacionar las variables y considerarlas simultáneamente. Un método común para este fin es el PCA. El PCA es un procedimiento matemático muy conocido y usado ampliamente para evaluar

la calidad de productos lácteos a partir de un número de datos extenso y complejo. En esta Tesis se usó el PCA para discriminar entre quesos elaborados con leche cruda y pasteurizada y también para discriminar entre cepas de BAL de interés tecnológico.

En la práctica, al hacer el PCA, se combinaron las variables originales interdependientes (como es el caso de la altura de los picos de las señales IMS) y se obtuvieron nuevas variables ortogonales, es decir independientes, no correlacionadas, que son combinaciones lineales de las variables originales (Cocker et al., 2005). En el proceso, se descompuso una matriz de datos con n filas (muestras) y p columnas (variables) en el producto de una matriz de puntos. Los puntos (*scores*) son la posición de las muestras en el espacio de los componentes principales (PCs), mientras las cargas (*loadings*), son las contribuciones de las variables originales a las componentes principales PCs (Tistaert et al., 2012). Finalmente, el número de componentes principales debe ser mucho menor al número de variables originales, facilitando de esta manera la visualización y sobre todo el manejo de datos, pues este análisis estadístico reduce notablemente la dimensionalidad del espacio sin reducir el número original de variables y los datos se pueden interpretar fácilmente (Guo et al., 2002; Cheng et al., 2013).

Cada componente principal explica una cantidad de variación en los datos originales, enumerándolos en orden descendente, de tal manera que el componente principal uno recoge la mayor variación posible y las subsiguientes componentes la variación restante. Es deseable que la mayor variación de los datos pueda ser explicada por dos o tres componentes.

Hay dos formas para aplicar un PCA, estandarizando los datos antes del análisis o usando una matriz de covarianza. En este caso se usó la segunda opción, por lo que los datos se centraron alrededor de la media de una variable particular y es útil para mantener la relatividad de la variancia de las variables y permitir usar la información obtenida al determinar volátiles en los quesos y en los cultivos de BAL. Esta forma de análisis fue utilizada por Cooker et al. (2003) para investigar proteólisis en quesos.

Los resultados del PCA pueden destacar las relaciones entre casos (volátiles de queso con leche pasteurizada y volátiles de queso con leche cruda) y también dentro de variables y casos (volátiles de quesos de leche pasteurizada). Los resultados también pueden demostrar la aparente pérdida de cualquier relación (Coker et al., 2005). De ahí que, previo al tratamiento de datos es importante saber que las variables a considerar estén altamente correlacionadas, porque en caso contrario, los resultados del PCA no serían de utilidad.

Finalmente, el PCA, como técnica exploratoria y método no supervisado, muestra los datos "tal como son", a diferencia de un método supervisado que busca determinadas características dentro de un dato para orientarlo hacia un problema particular (Kamal et al., 2015).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. Resultados y discusión

En este apartado se presentan los resultados de los experimentos diseñados para alcanzar los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral.

Los resultados se describen y discuten en los siguientes epígrafes:

4.1. Puesta a punto de un método de medida de VOCs usando HS-MCC-IMS y la descripción de mapas topográficos (asociados a la huella espectral) de quesos de cabra procesados con leche cruda y leche pasteurizada.

4.2. Determinación de metabolitos volátiles en quesos de cabra y las potenciales aplicaciones como marcadores de maduración y su evolución a través del tiempo.

4.3. Análisis de muestras procedentes de cuatro cepas de BALs, su diferenciación y la evolución de VOCs relevantes relacionados con el crecimiento celular.

4.1. Puesta a punto del método de medida de compuestos orgánicos volátiles usando HS-MCC-IMS

Antes de poner a punto el método HS-MCC-IMS se realizaron ensayos a fin de conocer el comportamiento de los VOCs a estudiar en el sistema de medida seleccionado. Posteriormente a la ejecución de estos ensayos se optimizaron todas las variables instrumentales que afectan a los resultados de las determinaciones. Del flujo de trabajo experimental se recogió la información que se describe a continuación.

4.1.1. Selección preliminar de señales

En un primer, estudio se compararon las señales de los quesos de oveja y vaca con las que generan los quesos de cabra objeto de estudio en este trabajo. La inspección visual de los mapas topográficos obtenidos a partir de muestras de quesos de cabra, oveja y vaca (n total =6) reveló las señales IMS más frecuentes y representativas de los VOCs emitidos por estas matrices (Figura 4.1).

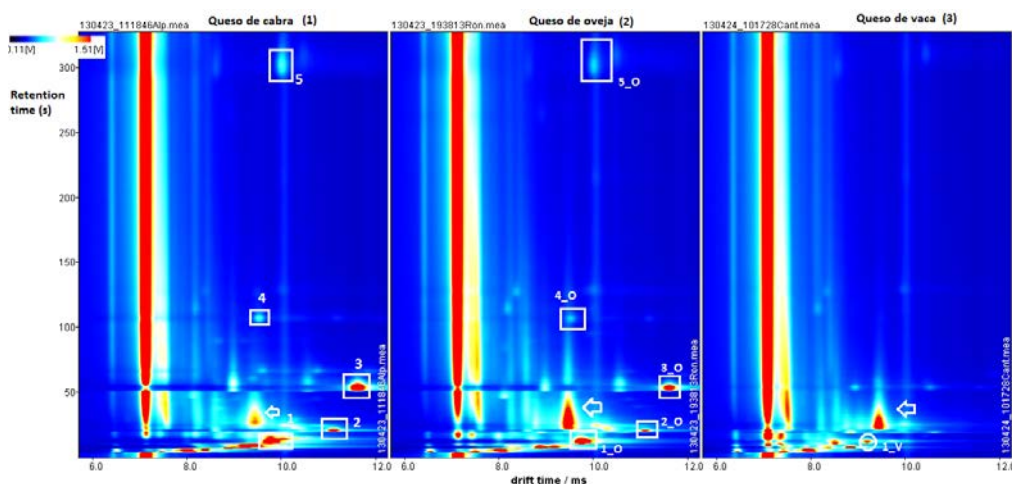


Figura 4.1. Mapas topográficos IMS de 1) queso de cabra con las señales (1, 2, 3, 4 y 5); 2) queso de oveja con las señales (1_O,2_O,3_O,4_O, 5_O) y 3) queso vaca (V₁). Las señales indicadas con flechas son comunes a los 3 tipos de quesos pero difieren en intensidad. El eje x muestra el tiempo que tarda cada compuesto en atravesar el tubo de deriva (tiempo de deriva, t_d en ms). El eje y corresponde al tiempo de retención (t_r en s) en la columna multicapilar. La intensidad de cada señal expresada en V representa la abundancia de cada compuesto.

Los picos seleccionados (Figura 4.1) se usaron para llevar a cabo la optimización del método. A cada señal le corresponde un tiempo de retención, un tiempo de deriva y una intensidad expresada en V que, en conjunto, son las características MCC-IMS. El estudio del efecto de cada variable instrumental sobre

las señales permitió encontrar las condiciones óptimas para lograr una mejor sensibilidad selectividad y repetitividad de respuesta.

Las variables del automuestreador con mayor efecto sobre los volátiles generados desde los quesos de cabra, vaca u oveja fueron: cantidad de muestra, temperatura de incubación, tiempo de incubación y volumen de inyección. Además, entre las variables instrumentales, se estudiaron la temperatura de la columna, el caudal del gas portador de la muestra y el promedio de barrido ("average"). A continuación, se describen los efectos de estas variables sobre las señales IMS y se representan algunos de los mapas topográficos o gráficas donde se pueden apreciar dichos cambios.

4.1.2. Optimización de los parámetros del automuestreador

a) Cantidad de muestra

La cantidad de la muestra, comprendida entre 0.5 y 3 g, se estableció considerando la capacidad máxima del vial. Los resultados demostraron que con valores de 0.5 a 1 g de peso, las señales características de los quesos de cabra (1), oveja (2) y vaca (3) se distinguen claramente. La Figura 4.2. muestra las señales de los quesos de cabra. Los resultados indican que usando 2 y 3 g de queso las señales más débiles podrían no apreciarse a causa de su superposición con los compuestos mayoritarios. Además, una mayor cantidad de muestra incrementa la humedad en el espacio de cabeza y la señal puede decrecer en algunos casos. Finalmente, se

seleccionó 1 g para asegurar una buena precisión en la pesada de cada muestra.

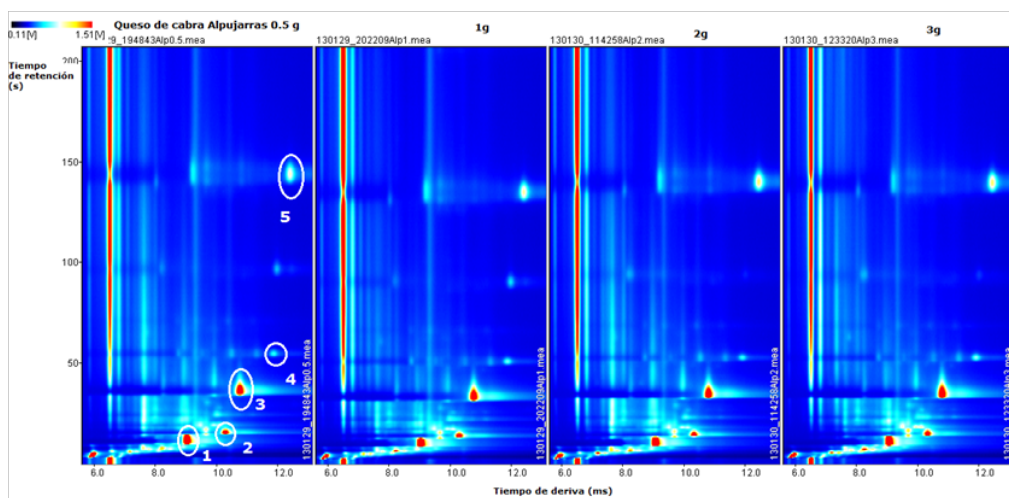


Figura 4.2. Mapas topográficos del queso de cabra Alpujarras con cantidades de muestra de 0.5, 1, 2 y 3 g. Se observan cinco señales intensas y potencialmente características para este tipo de queso. Señal 1 (t_d : 9,063 ms, tiempo de retención (t_r): 10,391 s). Señal 2 (t_d : 10,278 ms; t_r : 14,553 s). Señal 3 (t_d : 10,759 ms, t_r : 33,957 s). Señal 4 (t_d : 11,898 ms, t_r : 49,396 s). Señal 5 (t_d : 12,023 ms, t_r : 200,380 s). En este caso las señales no cambian en t_d , t_r o intensidad al variar la cantidad de muestra.

b) Temperatura de incubación

La temperatura tiene una gran influencia en la composición del espacio de cabeza. Al aumentar la temperatura, incrementa la presión de vapor en el vial y en consecuencia la concentración de soluto en el gas, así como la intensidad de la señal IMS. La temperatura de incubación de queso de cabra se varió entre 40 y 80°C (Figura 4.3). Se observaron señales más intensas cuando se calentó la muestra a 60 y 70°C. El valor óptimo seleccionado fue 70°C debido a que permitió obtener picos con mejor resolución y las mayores diferencias espectrales entre los diferentes tipos de quesos analizados.

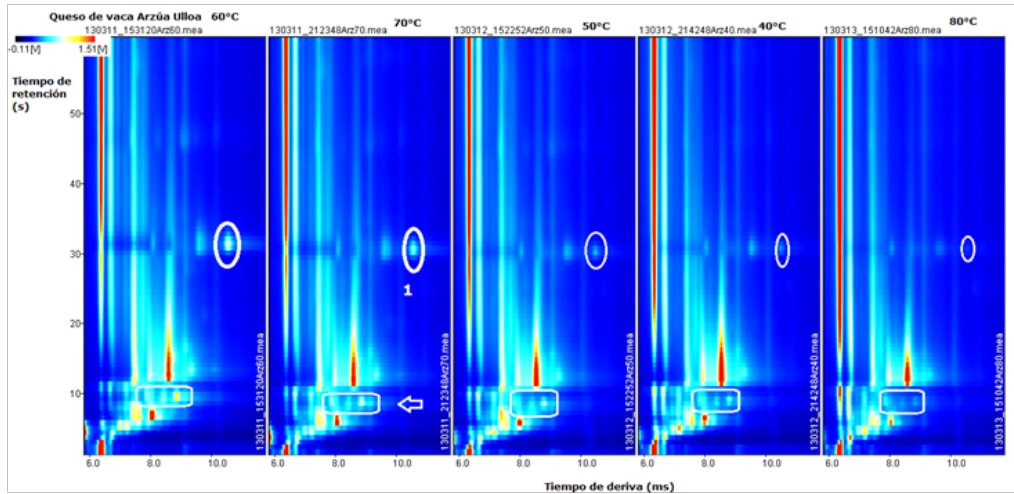


Figura 4.3. Mapa topográfico IMS de queso vaca (Arzúa- Ulloa) expuesto a diferentes temperaturas de incubación. La flecha señala una mejor resolución de señales a 70°C.

Las temperaturas de calentamiento de la muestra que están bajo el punto de ebullición de los VOCs objeto de estudio pueden impedir la vaporización de ellos, al afectar adversamente el equilibrio del espacio de cabeza. Por el contrario, las temperaturas extremadamente altas podrían inducir reacciones químicas indeseables e interferir con la matriz (Gursoy et al., 2009).

c) Tiempo de incubación

El tiempo de incubación se monitorizó durante, 2, 5, 8 y 10 min. En el queso de cabra Alpujarras a los 2 y 5 min la señal 4 decrece y a los 8 min se evidencia mejor que a los 10 min de calentamiento (Figura 4.4a), mientras en un queso de vaca (Figura 4.4b) no se observaron señales IMS a los 2 y 5 min, fijándose el tiempo de incubación en 8 min.

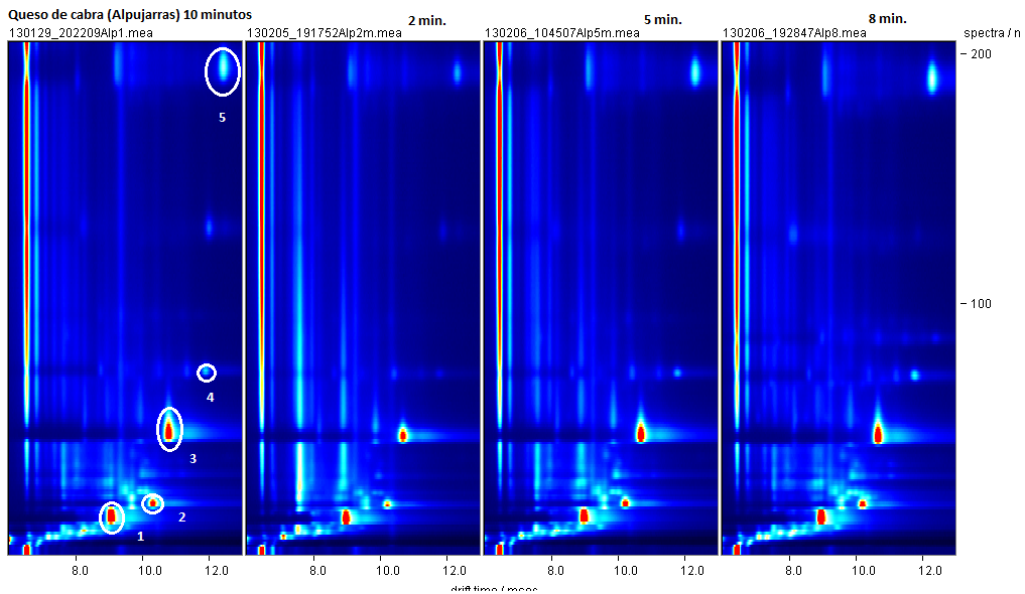


Figura 4.4a. Mapas topográficos IMS de queso cabra (Alpujarras) bajo el efecto de distintos tiempos de incubación de la muestra.

La señal 4 (t_d : 11,899, t_r 50,589), a los 10 min de calentamiento de la muestra presentó una intensidad de 0,7 V, pero cuando se calentó sólo 2 min la intensidad descendió a 0,3 V. Aparentemente, no hay diferencia entre calentar la muestra 8 o 10 min.

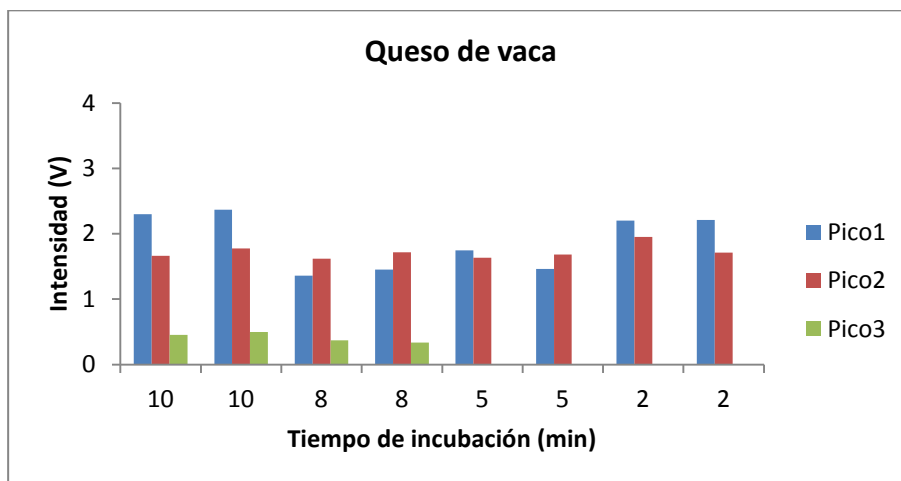


Figura 4.4b. Efecto de la incubación de la muestra sobre las señales IMS en un queso de vaca. En el queso de vaca Arzúa Ulloa, a los 2 y 5 min de incubación, no se observó el pico 3. Cada tiempo se midió por duplicado.

d) Volumen de inyección

Otro parámetro a controlar fue el volumen de inyección. Para optimizarlo se realizaron ensayos con 100 μL , 250 μL , y 500 μL de volumen de muestra. Con 500 μL se observó una pérdida de resolución de las señales, que se corrigió con 250 μL y con 100 μL , apreciándose una buena resolución de los picos. Además 100 μL evita la contaminación del equipo y la presencia de señales residuales o de memoria procedentes de análisis previos al ensayo actual. La Figura 4.5 representa los efectos del volumen de muestra sobre la intensidad de las señales de un queso de oveja.

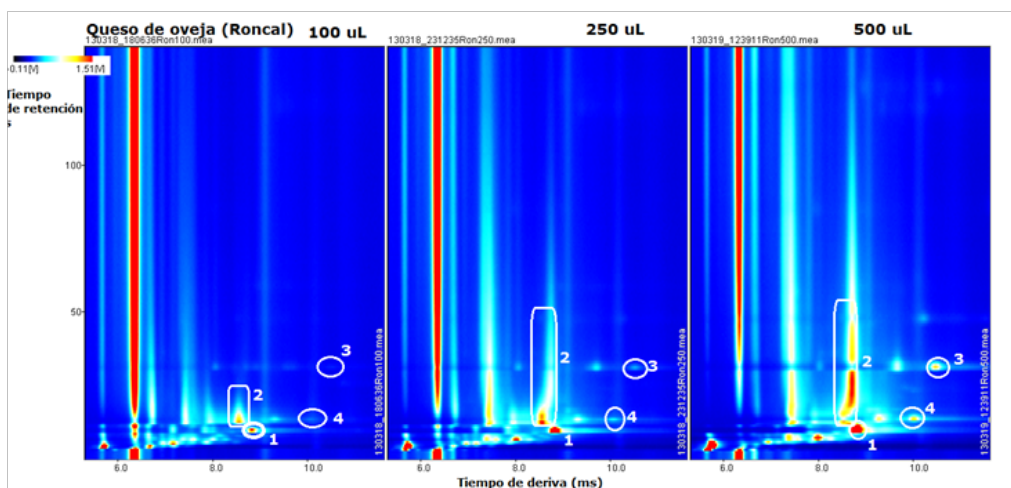


Figura 4.5. Mapa topográfico IMS del queso Roncal (oveja), al variar el volumen de inyección de la muestra de 100 a 500 μL .

4.1.3. Optimización de los parámetros del IMS

a) Temperatura del tubo de deriva

El intervalo de temperatura estudiado fue de 40 a 60°C. En general, seleccionando las temperaturas más altas en el tubo de deriva, se obtuvo la intensidad de la señal más alta pero la resolución decreció. La intensidad de la señal 1 (pico 1) se

redujo en un 50% al cambiar la temperatura del tubo de deriva de 60°C a 40°C (Figura 4.6). Sin embargo, algunas otras señales decrecieron en intensidad a 60°C. Teniendo en cuenta el comportamiento observado en otros quesos y el compromiso entre la intensidad de la señal y la resolución se seleccionó una temperatura de 45°C.

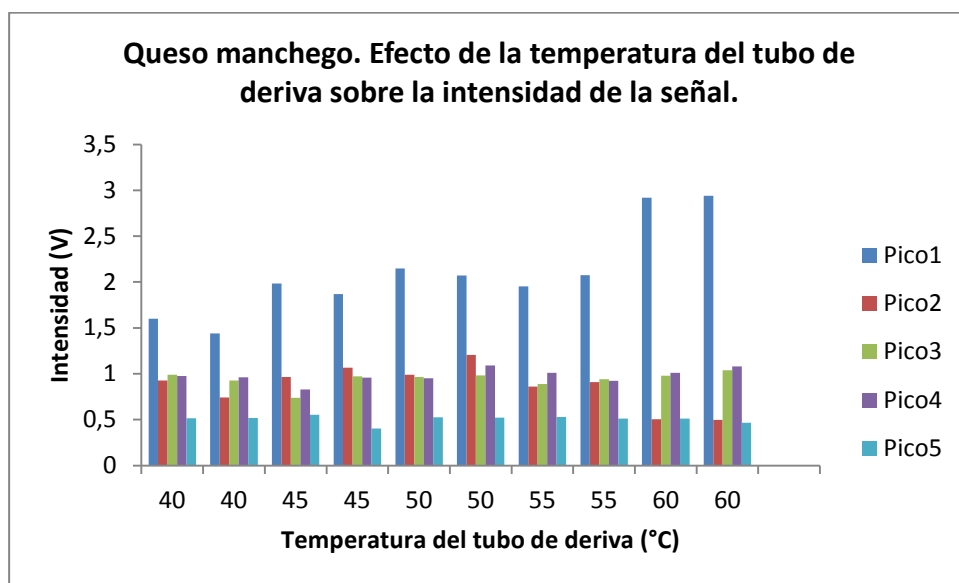


Figura 4.6. Efecto de la variación de la temperatura del tubo de deriva entre 40°C a 60°C, con incrementos de 5°C.

b) Flujo de gas de muestra

El flujo de gas de muestra se examinó para valores entre 10 y 50 mL min⁻¹. Este parámetro tiene un efecto significativo sobre la respuesta del sensor. A valores altos de flujo, los VOCs pueden pasar la columna de separación y el tubo de deriva muy rápidamente. A mayor flujo, menor tiempo de retención de los compuestos en la columna. En este caso, el flujo óptimo seleccionado para obtener el mejor tiempo de análisis y la mejor resolución fue de 30 mL min⁻¹ (Figura 4.7).

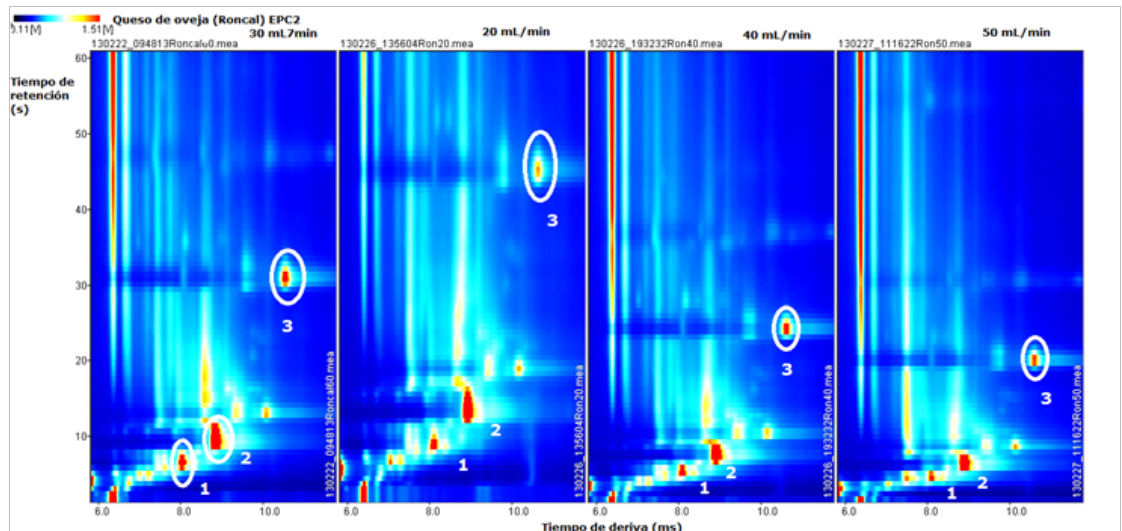


Figura 4.7. Mapas topográficos IMS de un queso de oveja (Roncal) bajo el efecto de diferentes valores de flujo de gas portador EPC₂.

c) Flujo del gas de deriva

En un trabajo previo del grupo de investigación, el efecto del gas de deriva se examinó exhaustivamente en el rango de 100 a 500 mL min⁻¹ y se observó que el cambio de caudal del gas en orden decreciente no causó disminución análoga en la intensidad de los picos (Garrido-Delgado et al., 2012). Se escogió 250 mL min⁻¹ como valor estándar corroborando la recomendación del fabricante del equipo.

d) Promedio de espectros

Los valores promedio del número de barridos del espectro se seleccionaron entre 16 y 32. Con cada uno de estos valores los datos de tiempo de deriva e intensidad de la señal fueron muy similares. Sin embargo, cuando se seleccionó un valor medio de espectros de 32, los tiempo de retención disminuyeron, observándose señales localizadas en un área espectral más

pequeña, mientras que las mismas señales ocuparon una área de mayor tamaño con el promedio 16 (Figura 4.8).

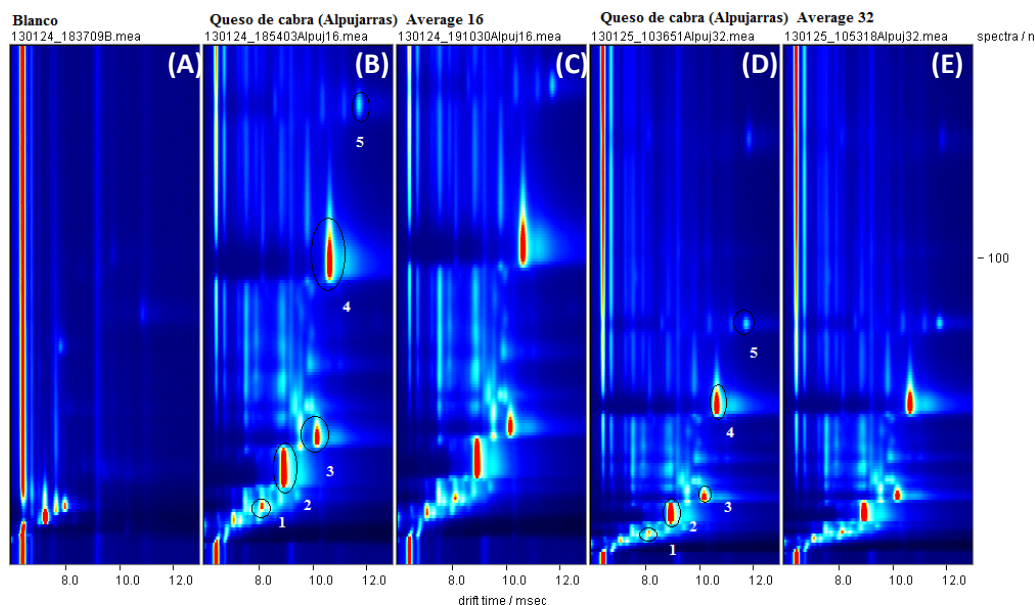


Figura 4.8. Efecto del promedio de barrido (*average*) 16 o 32 sobre los espectros IMS de queso de cabra Alpujarras. En esta figura se muestran cinco mapas topográficos: (A) blanco (B) y (C) el mismo queso medido con un valor de “average” de 16 y (D) y (E) medido a 32.

e) Temperatura de la columna

La temperatura de la columna seleccionada fue de 40°C para asegurar la mejor sensibilidad, resolución y selectividad de las señales IMS características del queso de cabra, lo que resulta de interés para el presente trabajo, aunque las variables encontradas también se pueden aplicar para el estudio de quesos de oveja y de vaca dado que muestras de estos quesos fueron usadas durante el proceso de optimización. La Tabla 4.1 resume las variables seleccionadas para el método HS-MCC-IMS que se usará para analizar quesos de cabra.

Tabla 4.1. Condiciones experimentales para el análisis de queso mediante HS-MCC-IMS.

	Condiciones iniciales	Rango de estudio	Variables óptimas
Sistema de introducción de muestra			
Espacio de cabeza	20 mL		20 mL
Tiempo de incubación	10 min	2-10 min	8 min
Cantidad de muestra	1 g	0.5-3 g	1 g
Temperatura de incubación	60 °C	40-80°C	70°C
Temperatura del inyector	80 °C	-	80°C
Volumen de inyección	100 µL	100-500 µL	100 µL
Velocidad de agitación	500 rpm	-	500 rpm
Columna			
Columna multicapilar	Semipolar	-	Semipolar
Longitud de la columna	20 cm	-	20 cm
Temperatura de la columna	40 °C	-	40°C
Tiempo de análisis	20 min		20 min
IMS			
Voltaje	Positive drift	-	Positive drift
Flujo del gas de muestra	30 mL/min (N ₂ 5.0)	10-50 mL/min	30 mL/min
Flujo del gas de deriva	250 mL/min (N ₂ 5.0)	100-500 mL/min	250 mL/min
Temperatura del tubo de deriva	45 °C	40-60 °C	45 °C
Promedio de espectros	32	16, 32	32
Tiempo de retardo	100 µs	-	100 µs
Número de espectro	1298	-	1298
Longitud del espectro	3000	-	3000
Ancho de la rendija	100 µs	-	100 µs
Tasa de repetición	21 ms	-	21 ms
Frecuencia de muestreo	150000 Hz	-	150000 Hz

4.1.4. Estudio de precisión del método HS-MCCC-IMS

La Figura 4.9 muestra las cinco señales seleccionadas en un mapa topográfico de una muestra de queso para realizar el estudio de precisión y así poder evaluar si el método seleccionado era lo suficientemente repetitivo para realizar los análisis estadísticos posteriores.

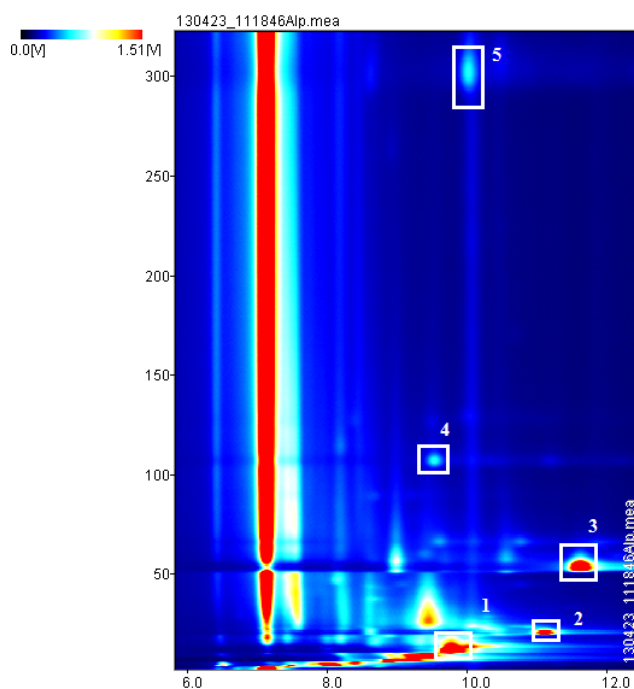


Figura 4.9. Mapa topográfico de una muestra de queso de cabra.

La Tabla 4.2 muestra el rango de valores absolutos de la repetitividad y la reproducibilidad de los tiempos de deriva, de retención e intensidad de las señales marcadas en el mapa topográfico IMS seleccionadas para el estudio. Calculando la desviación estándar relativa (RSD) expresada en tanto por ciento, se obtuvo que en todos los casos los valores fueron menores al 8%. Este valor está dentro del rango de 2-20 % en términos de RSD establecido para equipos que trabajan en un ambiente de laboratorio. En consecuencia, todos los resultados indican la robustez del método HS-MCC-IMS propuesto para el análisis de quesos.

Tabla 4.2. Precisión del método para el análisis de quesos mediante HS-MCC-IMS.

Parámetro de estudio	n	Tiempo de Retención	Tiempo de deriva	Altura del pico
Repetibilidad (%RSD)	9	0.3-2.3	0.3-0.6	1.5-5.6
Reproducibilidad (%RSD)	9	0.6-2.8	0.4-2.5	2.3-7.7

Los estudios realizados permitieron conseguir las condiciones instrumentales adecuadas para la determinación de VOCs del queso.

4.1.5. Estudio de mapas topográficos IMS para establecer las diferencias entre las muestras de quesos de cabra en base a huellas de VOCs.

Después de obtener las condiciones óptimas en el equipo, los VOCs extraídos de las muestras de queso se estudiaron para encontrar señales que caracterizaran a cada tipo de queso. Las señales más frecuentes, así como las señales minoritarias dan una imagen integrada de las diferencias entre los aromas de los quesos.

Se analizaron diez muestras comerciales de quesos usando el método optimizado HS-MCC-IMS. La Figura 4.10 muestra los mapas topográficos característicos obtenidos para los diferentes quesos analizados.

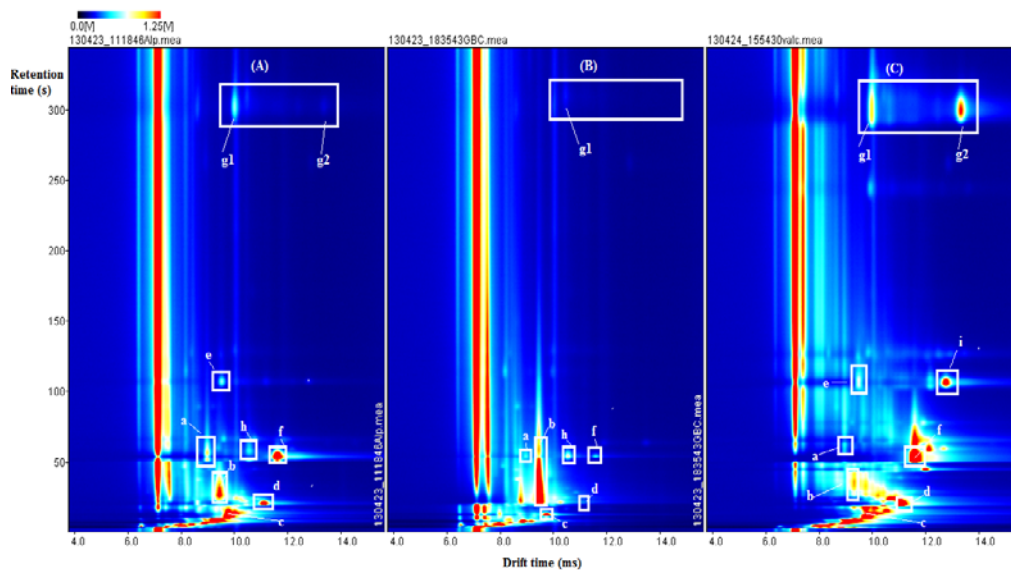


Figura 4.10. Mapas topográficos de quesos de cabra (muestras comerciales). A) quesos hechos con leche pasteurizada y elaboración tradicional. B) queso hecho con leche pasteurizada y elaboración industrial. C) muestras con leche cruda y procesamiento tradicional.

Como se puede observar, se obtuvieron tres huellas espectrales diferentes para los quesos de cabra analizados de acuerdo al tipo de leche usada, leche pasteurizada (Figura 4.10 A, B) o leche cruda (Figura 4.10 C) o el tipo de elaboración, sea tradicional (Figura 4.10 A, C) o industrial (Figura 4.10 B) para la elaboración de quesos diferentes. Las señales marcadas en la Figura 4.10 son comunes a las muestras de queso de cabra elaborado con leche pasteurizada de manera tradicional (Tabla 2.1 muestras 1, 2, 3, 5 y 7). En quesos de cabra no-tradicionales (Tabla 2.1 muestras 4, 6 y 10), la señal "b" aparece como la señal más intensa, y la señal "c" aparece aislada de otras señales en los quesos de fabricación industrial y leche pasteurizada, mientras que en otras muestras esta señal aparece afectada por interferencias.

En los quesos de leche cruda aparecen otras señales que no han sido identificadas en quesos con leche pasteurizada (Figura 4.10 C, señal "i"). Otra señal aparece en el queso

elaborado siguiendo el proceso tradicional (Figura 4.10 A, C; señal "e"), mientras la señal "h" se identificó sólo en quesos elaborados con leche pasteurizada. Las señales "g", "g1" y "g2", aparecen en los tres tipos de quesos de cabra que se destacaron en este análisis y se demostró más intensidad en los quesos elaborados con leche cruda. También se observó que la señal "f" y la "d" tenía menor intensidad en los quesos de leche pasteurizada en relación con los quesos de leche cruda. Las muestras de leche cruda con procesamiento tradicional fueron más ricas en señales (Figura 4.10 C) en contraste con los quesos industriales hechos con leche pasteurizada (Figura 4.10 A, B).

El número más bajo de señales IMS observadas en algunas muestras es coherente con la pasteurización de la leche ya que este tratamiento promueve cambios que afectan a los VOCs del queso. Esto puede explicarse porque algunas enzimas endógenas de la leche, como la lipoproteína lipasa, son inactivadas por durante la pasteurización, así como también la microbiota autóctona, la cual es también eliminada parcialmente, con una consecuente reducción en la fermentación y producción de reacciones de degradación que afectan a los VOCs y al *flavour*. Los quesos de leche cruda, generalmente tienen aromas más intensos y contienen un grupo más diverso de compuestos volátiles que los quesos hechos de leche pasteurizada (Rodríguez-Alonso et al., 2009). Las huellas espectrales complejas obtenidas de IMS han sido analizadas usando una técnica de análisis de datos multivariante no supervisada conocida como PCA. Esto describe el patrón sistémico de variación entre las muestras. El PCA se aplicó para comprobar la posibilidad de diferenciar subtipos entre los quesos de cabra basados en señales IMS asociados al tipo de leche. En la Figura 4.11 se puede observar

que dos agrupaciones formadas (A + B, C) han discriminado quesos elaborados con leche pasteurizada de quesos elaborados con leche cruda (Figura 4.11, muestras 8 y 9).

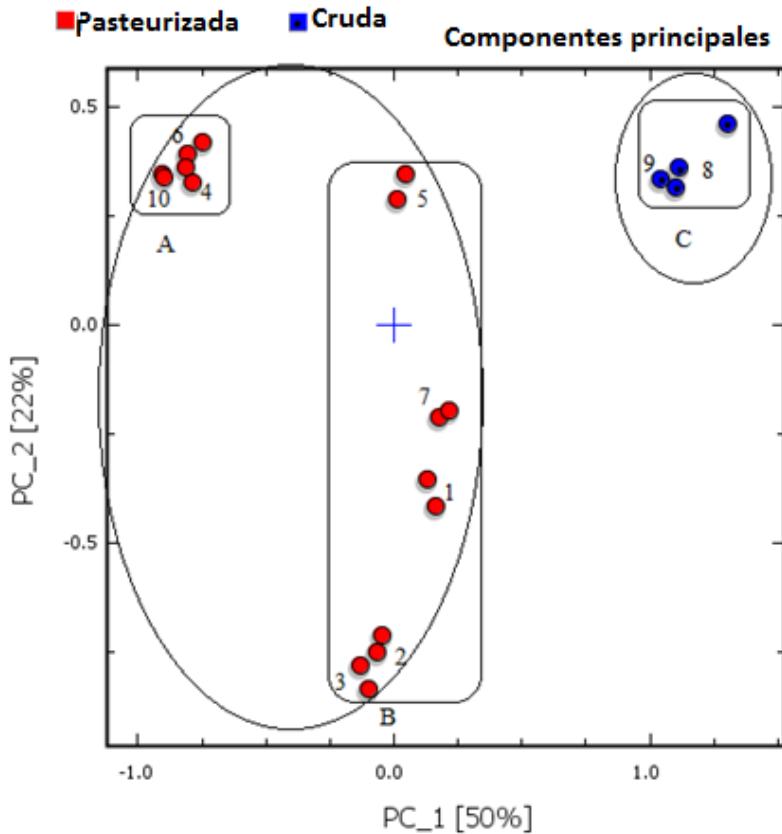


Figura 4.11. Gráfica de PCA representando PCA2 vs PCA1. Los números del 1 al 10 corresponden a muestras comerciales de quesos de cabra.

Adicionalmente, el grupo A contiene muestras elaboradas con leche pasteurizada y procesamiento industrial; el grupo B muestras de quesos de leche pasteurizada y procesamiento tradicional; mientras el grupo C incluye muestras de leche cruda y procesamiento tradicional. De esta manera, el PCA indica que las diez muestras analizadas por duplicado no fueron agrupadas al azar. Los quesos elaborados con leche cruda o pasteurizada tuvieron una separación significativa.

Las muestras también mostraron similitudes o dis-similitudes de señales IMS, de acuerdo a su tipo de elaboración

(tradicional o industrial). Las muestras de elaboración industrial (Figura 4.11 grupo A, muestras 4, 6, y 10) mostraron patrones muy similares, con tendencias a la estandarización, debido probablemente al uso de cuajo comercial. Así mismo, se ha descrito que la pasteurización puede destruir algunos VOCs asociados con alimentos ingeridos por las cabras (Horne et al., 2005), reduciendo su influencia en los VOCs del queso. Por el contrario, después del tratamiento térmico, pueden aparecer nuevos compuestos. El agrupamiento observado en los quesos del grupo B (Fig. 4.11, muestras 1, 2, 3, 5 y 7) fue coherente con los volátiles comunes producidos por comunidades microbianas establecidas después de la pasteurización y por el efecto de prácticas involucradas en la elaboración de queso tradicional.

La muestra 5 mostró un agrupamiento irregular probablemente debido a información no incluida en la etiqueta comercial. Es posible que el procesamiento tradicional en este caso, involucre algún paso del procesamiento industrial. Se esperaba que esta muestra se situara próxima a la muestra 2 por su origen geográfico (Islas Canarias). Sin embargo, las distancias indican también diferencias entre quesos de leche de un mismo origen. De acuerdo con Guillén y Abascal (2012), hay muchos factores que podrían contribuir a una distribución diferente de los VOCs en quesos similares. De hecho, estos autores en un estudio sobre los compuestos volátiles de un queso madurado durante dos meses, encontraron una distribución distinta de volátiles en cada estrato de la masa del queso, lo cual atribuyeron al origen de los VOCs, a las condiciones de su formación, a sus grupos funcionales, factores que a la vez se asocian a la ecología microbiana, a reacciones químicas e incluso a efectos físicos.

Finalmente, el agrupamiento demostrado por los quesos marcados como 8 y 9 (Figura 5, grupo C) puede ser atribuido al procesamiento del queso tradicional con leche cruda. Se ha descrito ampliamente que, la microbiota de la leche a la que se le atribuye la formación de VOCs, puede ser influida por la manera tradicional de fabricación del producto, así como a las destrezas de los maestros queseros. De acuerdo a Montel et al. (2014), aspectos tales como la inoculación, combinaciones de cultivos iniciadores, equipamiento de la lechería, las prácticas usadas y los cultivos de suero, proporcionan poblaciones activas de microorganismos que están involucrados en la singularidad de los VOCs de quesos de leche cruda que definen este agrupamiento. Todos estos factores diferentes podrían explicar el agrupamiento por PCA debido al tipo de leche y procesamiento de quesos de cabra.

4.2. Determinación de VOCs de quesos de cabra mediante HS-MCC-IMS con potencial uso como marcadores de maduración y su evolución en el tiempo

El proceso de maduración de un queso genera cambios en la matriz alimentaria, que contribuyen al *flavour* típico de este producto. El control de esta fase de elaboración es crítica para definir entre un producto perfecto en aroma y sabor de otro con defectos por olores anómalos. Además, esto tiene implicaciones en la inocuidad alimentaria, debido a que el tiempo mínimo de 60 días de maduración controla a potenciales patógenos, hecho determinante, por ejemplo, para permitir el uso de leche cruda en este tipo de productos, según la legislación española. Por todo esto, en este trabajo se buscaron metabolitos volátiles que fueran marcadores potenciales de la maduración de quesos de cabra tradicionales,

al evidenciar el aumento de la intensidad de una señal a través del tiempo.

La Figura 4.12 muestra la evolución de compuestos volátiles (marcados con las letras de la "a" a la "g"), incluyendo el butanoato de etilo, a partir de cinco muestras de queso de cabra con diferentes días de maduración, durante los tiempos de maduración estudiados (60, 150, 180, 210, 240 y 270 días).

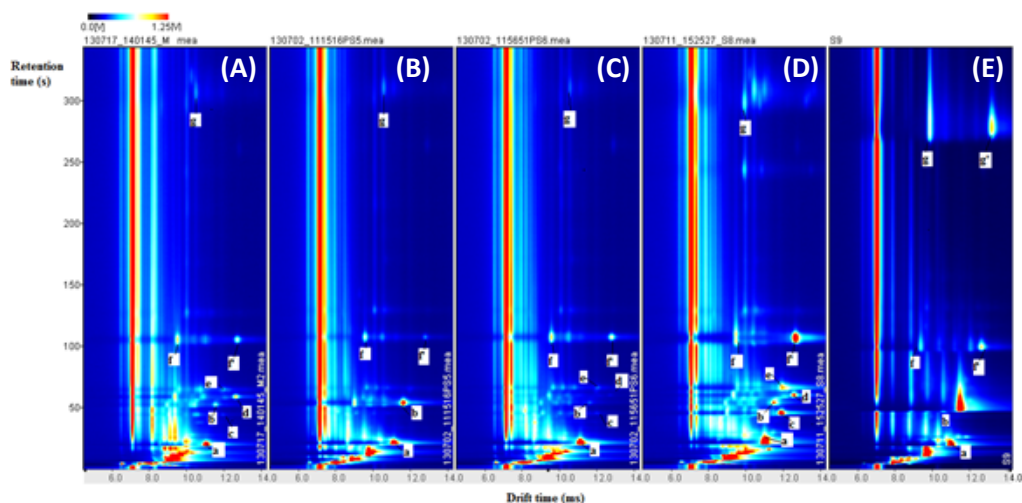


Figura 4.12. Mapas topográficos del queso C1 elaborado con leche cruda de cabra durante el proceso de maduración (A) 60 días, (B) 150 días, (C) 180 días, (D) 240 días y (E) 270 días. a: butanoato de etilo, b: 1-hexanol, c: butanoato de propilo, d y e: señales no identificadas, f y f': trans-2-heptenal (monómero y dímero respectivamente), g y g': 2-nonanona (correspondiente a monómero y dímero).

Los niveles más altos de butanoato de etilo se detectaron a los 240 días. Compuestos como: butanoato de etilo, 2-nonanona, 1-hexanol, butanoato de propilo, trans-2-heptenal y octanal, se identificaron en algunas de las muestras de queso de cabra analizadas durante los tiempos de maduración específicos usando el método HS-MCC-IMS optimizado.

También se detectaron 2-butanona y 2-butanol, pero estos compuestos mostraron señales cerca de otras señales interferentes lo cual dificultó el análisis cuantitativo. La

sensibilidad del método propuesto para la determinación selectiva de seis compuestos identificados en muestras de quesos se estudió calculando los límites de detección y cuantificación (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Límites de detección y cuantificación de los compuestos identificados.

Compuesto volátil Identificado	Límite de detección (mg Kg ⁻¹)	Límite de cuantificación (mg Kg ⁻¹)
Butanoato de etilo	0.025	0.084
Butanoato de propilo	0.03	0.1
1-Hexanol	0.15	0.5
t-2-Heptenal	0.1	0.4
Octanal	0.8	2.6
2-Nonanona	0.4	1.3

De los seis compuestos identificados en las muestras de queso, solo algunas señales mostraron una evolución regular de acuerdo al tiempo de maduración (butanoato de etilo, octanal y 2-nonanona), mientras que otros compuestos no cambiaron de esta manera, aunque mostraron crecimientos o decrecimientos a lo largo del tiempo de maduración (Figura 4.13).

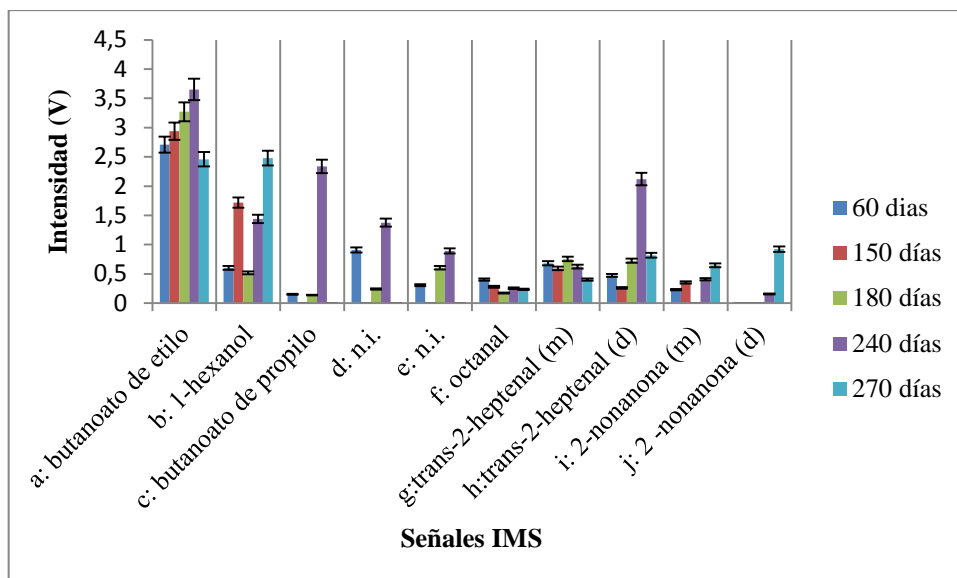


Figura 4.13. Evolución de VOCs en quesos elaborados con leche cruda de cabra, durante 60, 150, 180, 240 y 270 días de maduración, ni: no identificado, m: monómero, d: dímero.

También se demostró que el butanoato de propilo se presenta ocasionalmente, en particular tras 240 días de maduración. Además, algunas señales no identificadas (Figura 4.13, señales "d" y "e" también mostraron una evolución durante el tiempo de maduración.

Finalmente, aunque otros compuestos (1-octen-3-ol, 2-metil butanol, hexanal, decanal) fueron identificados por el método optimizado, no se detectaron en los quesos de cabra analizados en este trabajo, aunque otros autores los han detectados en otros tipos de queso (Husson et al., 2005; Palencia et al., 2014; Marilley y Casey, 2004).

4.3. Análisis de muestras de cuatro cepas de BAL por HS-GC-IMS

En los quesos madurados, el desarrollo del aroma resulta de la actividad metabólica de la microbiota dominante, compuesta mayormente por BALs. Este grupo bacteriano se caracteriza por su alta diversidad, lo que se traduce en buenas posibilidades para ampliar y diversificar el aroma y sabor de un queso (Steele et al., 2013). En la práctica, la adición de un cultivo seleccionado de BALs a leche pasteurizada podría recrear el aroma/sabor de un queso tradicional elaborado con leche cruda (Mills et al., 2010). De igual manera, la adición de un nuevo cultivo de BALs a un cultivo no iniciador puede complementar rutas metabólicas que conduzcan a una mayor intensidad de dicho aroma/sabor.

En general, este aspecto establece la importancia de seleccionar cepas de BAL para usarlas como cultivo iniciador o no iniciador, y el interés de encontrar y caracterizar nuevas cepas de utilidad tecnológica, donde es crucial la producción de aroma, por lo cual se sugiere que ésta puede ser la primera característica a determinar en bacterias con potencial para la producción de queso.

Para optimizar recursos, la búsqueda puede iniciarse con el tamizaje de cepas nuevas tomando como modelos los perfiles aromáticos de aislamientos previos, purificados y analizados por IMS. En este contexto, el experimento se enfocó en primer lugar a la discriminación de 4 cepas estándar de BAL. Para el cumplimiento de este objetivo, se desarrollaron las actividades que se discuten a continuación.

4.3.1. Determinación de compuestos orgánicos volátiles de las cepas de referencia de BAL

Los mapas topográficos representativos que se aprecian en la Figura 4.14 fueron generados a partir de cuatro cepas diferentes de BAL (*L. casei*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris*) analizadas mediante GC-IMS.

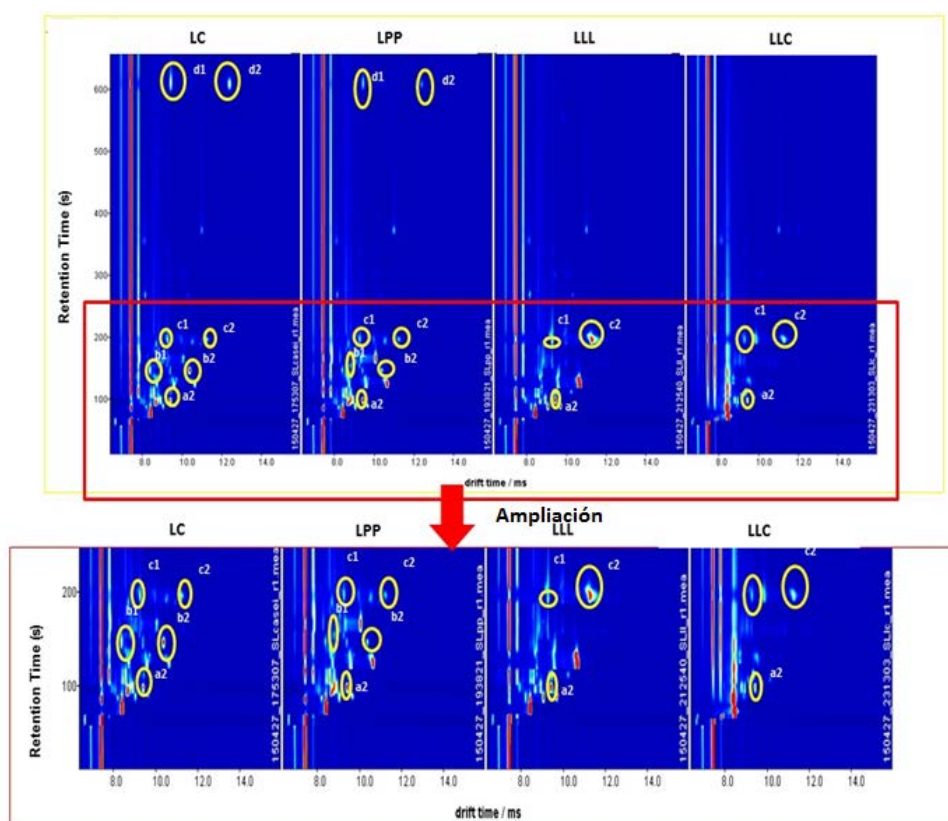


Figura 4.14. Mapas topográficos IMS correspondiente a GC-IMS. Señales detectadas en LC: *L. casei*, LPP: *L. paracasei* subsp. *paracasei*, LLL: *L. lactis* subsp. *lactis* y LLC: *L. lactis* subsp. *cremoris*. Eje x: tiempo de deriva en ms; Eje y: tiempo de retención en s. La intensidad de la señal (V) se aprecia por el área y color de la señal IMS. Los VOCs identificados fueron: (a2) 2-butanona dímero, (b1) 2-pentanona monómero, (b2) 2-pentanona dímero, (c1) 3-metil-1-butanol monómero, (c2) 3-metil-1-butanol dímero, (d1) 2-heptanona monómero, (d2) 2-heptanona dímero. RIP: pico del ion reactante.

Del estudio realizado a las señales obtenidas al analizar las cuatro BAL se puede afirmar que las dos cepas de *Lactobacillus* (*Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*) presentaron huellas espectrales similares. Los compuestos que permitieron la diferenciación entre las dos cepas de *Lactobacillus*, de acuerdo a la intensidad de sus señales IMS, fueron: 2-butanona, 2-pentanona, 2-heptanona y 3-metil-1-butanol. Estos cuatro analitos se identificaron calculando la movilidad reducida de cada uno (Tabla 4.4).

Las cepas de *Lactococcus* también se analizaron bajo las mismas condiciones y sólo se identificaron 2-butanona y 3 metil-1-butanol. Los VOCs detectados a partir de *Lactococcus* mostraron diferente intensidad de señal en cada cepa. Además, se observó que los metabolitos aparecen como monómeros y dímeros en los mapas topográficos de GC-IMS (Figura 4.14). En algunos casos, el monómero de 2-butanona apareció en una región junto a otras señales, siendo muy difícil identificar esta señal claramente y por esta razón los datos no se incluyeron en la Tabla 4.4. La formación de dímeros junto a monómeros fue previamente descrita por Borsdorf y Eiceman (2006).

4.3.2. Evolución de VOCs producidos por cepas de referencia de BAL durante su crecimiento

Para demostrar que la 2-butanona, 2-pentanona, 2-heptanona y el 3 metil-1-butanol se producen por el metabolismo de BALs, se controlaron estos VOCs durante el crecimiento bacteriano y se pudo observar que la intensidad de sus señales varió a través del tiempo de cultivo (24-30 h) para cada bacteria estudiada. La evolución de los VOCs producidos.

Tabla 4.4. Identificación de VOCs en cepas de referencias de BAL usando GC-IMS

Compuestos			<i>Lactobacillus casei</i>				<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>				<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>				<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>			
	Valor medio K_o		monómero		dímero		monómero		dímero		monómero		dímero		monómero		dímero	
	monómero	dímero	t_d	t_r	t_d	t_r	t_d	t_r	t_d	t_r	t_d	t_r	t_d	t_r	t_d	t_r	t_d	t_r
2-butanona	-	1,72 ±0,01	-	-	9,44 ±0,03	100,72 ±0,96	-	-	9,42 ±0,03	98,32 ±0,36	-	-	9,51 ±0,05	100,7 ±0,9	-	-	9,42 ±0,05	100,98 ±1,05
2-pentanona	1,93 ±0,01	1,56 ± 0	8,40 ±0,03	144,96 ±1,79	10,39 ±0,03	147,33 ±0,05	8,45 ±0,04	146,16 ±1,58	10,39 ±0,05	148,51 ±0,65	-	-	-	-	-	-	-	-
3-metil-1-butanol	1,72 ±0,01	1,31 ± 0	9,29 ±0,04	196,39 ±1,76	11,29 ±0,03	198,77 ±1,26	9,34 ±0,05	197,88 ±0,98	11,36 ±0,08	195,89 ±1,00	9,29 ±0,06	197,58 ±2,72	11,32 ±0,02	199,97 ±1,26	9,29 ±0,0	197,58 ±1,04	11,32 ±0,03	197,58 ±0,99
2-heptanona	1,75 ±0,01	1,43 ± 0	9,42 ±0,03	607,76 ±2,45	12,42 ±0,05	607,76 ±1,26	9,50 ±0,05	611,35 ±1,26	12,42 ±0,02	610,15 ±1,61	-	-	-	-	-	-	-	-

t_d : tiempo de deriva en ms; t_r : tiempo de retención en s; K_o : movilidad del ión reducida en $\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$

por las BAL estudiadas durante diferentes fases de crecimiento se demuestra en la Figura 4.15. Las señales GC-IMS emitidas por BALs durante el tiempo de cultivo revelaron metabolitos volátiles liberados por células bacterianas. Estos compuestos están asociados con cambios de concentración en la producción de biomasa.

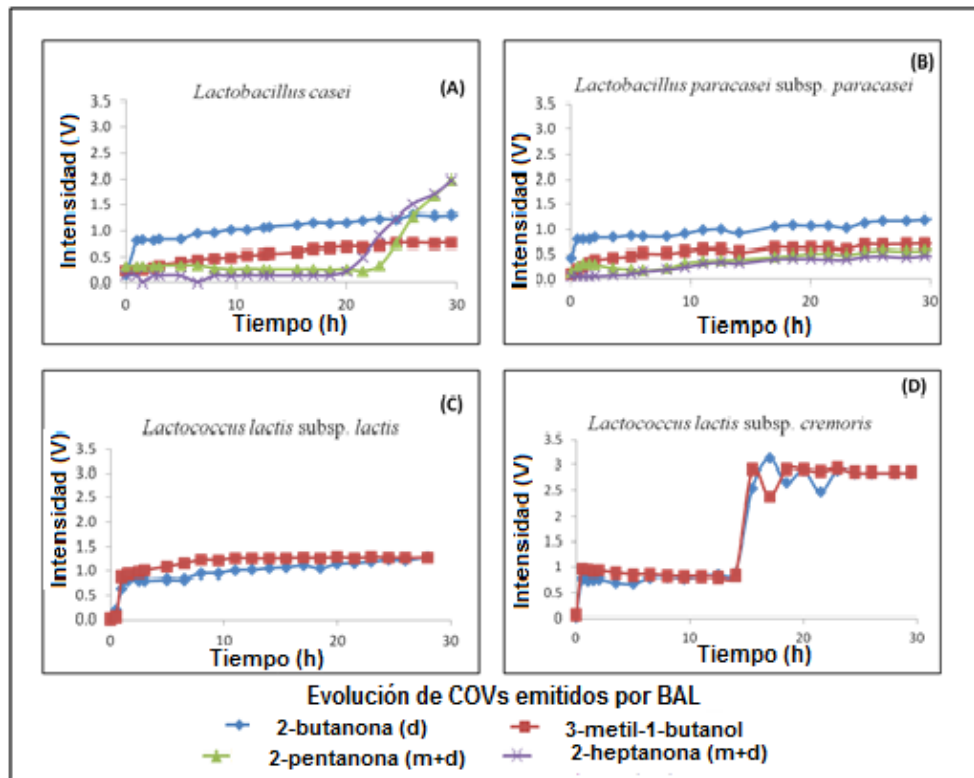


Figura 4.15. Evolución de VOCs emitidos por (A) *Lactobacillus casei*, (B) *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, (C) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y (D) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* en caldo MRS. m: monómero, d: dímero. Intensidad en V se corresponde con la intensidad de las señales IMS de cada compuesto identificado en cada BAL (Figura 4.14).

En el caso de *Lactobacillus casei* (Figura 4.15 A), la 2-butanona y el 3-metil-1-butanol mostraron la misma tendencia ascendente con un moderado incremento durante el período estudiado. La 2-butanona mostró valores más altos que el 3-metil-1-butanol, 2-pentanona y 2-heptanona y también mostraron una tendencia similar, con un incremento alto en

los valores de intensidad después de 20 horas de incubación. El valor más alto de intensidad (2 V) fue alcanzado por la 2-pentanona y la 2-heptanona después de 30 h de incubación.

La evolución del *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (Figura 4.15 B) mostró una tendencia muy similar para 3-metil-1-butanol, 2-pentanona y 2-heptanona. Los 2 últimos compuestos alcanzaron prácticamente los mismos valores. Para esta bacteria también alcanzó los valores más altos la 2-butanona.

En el caso de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Figura 4.15 C), se identificaron sólo dos señales: 2-butanona y 3-metil-1-butanol. La cinética del cultivo indicó que los dos compuestos alcanzaron casi 1 V de intensidad antes de la primera hora. Los dos compuestos presentaron su máxima intensidad (1.2 V) a las 7 horas y permanecieron con este valor prácticamente hasta el final del experimento.

En el caso de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (Figura 4.15 D), se identificaron los mismos VOCs como aquellos encontrados en *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Sin embargo los valores más altos se alcanzaron más tarde (a las 15.5 h) y ambos compuestos alcanzaron exactamente los mismos valores durante prácticamente toda la experiencia.

En resumen, se puede decir que las cepas de *Lactococcus* y *Lactobacillus* en fermentaciones lácticas producen acidificación y actividades proteolíticas relacionadas con la producción de *flavour*. La proteólisis es el primer proceso bioquímico involucrado en la degradación de substratos y puede dar compuestos tales como 3-metil-1-butanol, mientras la lipólisis genera compuestos tales como: 2-butanona, 2-pentanona y 2-

heptanona. En este estudio, el sustrato fue el medio de cultivo selectivo.

La Figura 4.16 A muestra las tendencias del crecimiento de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. La producción de biomasa y actividad bioquímica a través del tiempo puede observarse por cambios en la densidad óptica (OD_{540 nm}) de los cultivos. La medida de la actividad óptica ayuda a obtener evidencia cualitativa acerca del comportamiento cinético de la bacteria en un proceso fermentativo, siendo el comportamiento sólo una estimación. En este caso, permite conocer el estadio de máxima actividad con respecto a la emisión de metabolitos volátiles. Como se describió ampliamente en todos los casos, el crecimiento de las BAL sigue una curva exponencial, como se ha visto en *Lactobacillus casei*. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, sin embargo, sólo muestra crecimiento exponencial y fase estacionaria.

Los VOCs descritos durante el crecimiento de *Lactobacillus casei* (Figura 4.14 A) reflejan un alto incremento de 2-pentanona y 2-heptanona durante la fase estacionaria. En contraste, los VOCs producidos por *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (Figura 4.14 B) parecen ser independientes del crecimiento celular a través del tiempo.

La Figura 4.15 B muestra a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* crecer durante el tiempo de estudio. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* muestra una fase estacionaria después de 15 h (Figura 4.14 C). Esto es coherente con la producción de 2-butanona y 3-metil-1-butanol (Figura 4.14 D), cuya producción se incrementó rápidamente durante esta fase.

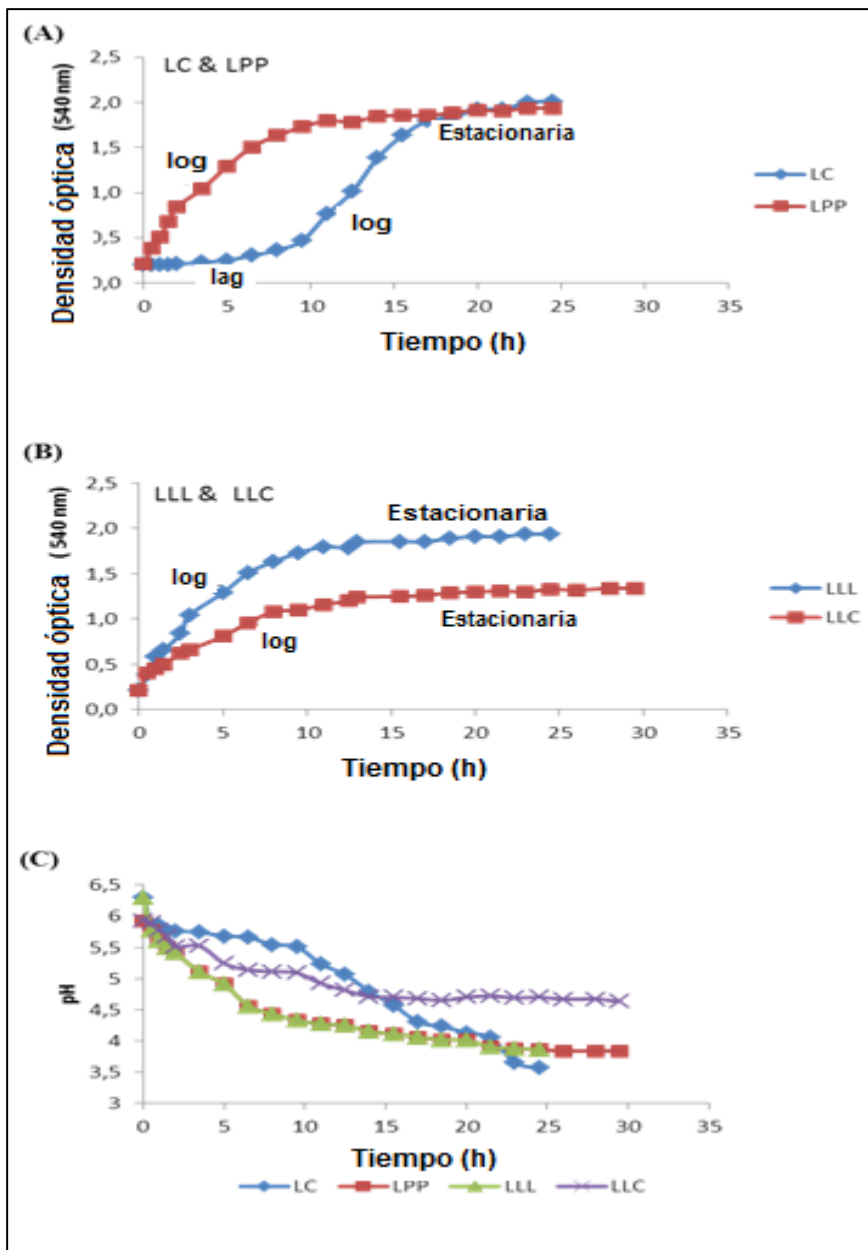


Fig. 4.16. (A) Evolución del crecimiento celular de *Lactobacillus casei* (LC) y *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (LPP). El crecimiento celular fue controlado determinando la OD_{540 nm} del caldo de cultivo. Los datos representan el promedio de dos experiencias independientes. (B) Evolución del crecimiento celular de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (LLL) y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (LLC). (C) Evolución del pH de crecimiento de cultivos de BAL a 25°C. LC (*Lactobacillus casei*), LPP (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*), LLL (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*), LLC (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*).

En el caso de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, el primer incremento significativo (a 1 V) fue durante la fase logarítmica, mientras el otro incremento (3 V) se observó

durante la fase estacionaria. Las cepas de *Lactococcus* y *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* inician el crecimiento sin una fase de latencia pero *Lactobacillus casei* muestra una fase de latencia, aunque todos los cultivos fueron estandarizados a la misma densidad celular. Esto puede deberse a las condiciones fisiológicas de *L. casei*, que puede presentar una actividad metabólica más baja comparada con otras cepas.

En resumen, las señales IMS emitidas por BALs durante su cultivo revelan claramente cambios en la producción de metabolitos volátiles liberados por las células. Conclusiones similares fueron obtenidas por Maddula et al., (2009). Ellos confirmaron que los metabolitos volátiles producidos por *Escherichia coli* fueron productos asociados con la biodegradación de sustratos suministrados por el medio de cultivo, y su concentración podría incrementar en paralelo al crecimiento celular. Una tendencia similar se puede observar en *Lactobacillus* y *Lactococcus*. Ellos también reportaron que los cambios en concentración de compuestos volátiles durante el crecimiento bacteriano pueden ser debidos a la variación de actividad en las rutas metabólicas, cambios en la solubilidad y volatilidad de los analitos en el medio de cultivo, aunque probablemente esté más correlacionado con el incremento de biomasa.

En esta experiencia se ha encontrado que la producción de 2-butanona y 3-metil-1-butanol por *Lactobacillus* y *Lactococcus* sigue la tendencia del crecimiento bacteriano durante el estadio de adaptación (*L. casei*) y las fases exponencial y estacionaria de la curva de crecimiento (Figuras 4.16 A y B). De esta manera, y en general, los metabolitos de las BAL aumentan al principio del crecimiento exponencial, sin cambiar

cuando se alcanza la fase estacionaria. En contraste, la producción de 2-pentanona y 2-heptanona por parte de *Lactobacillus casei* mantiene una intensidad constante de señal, aumentando a las 21 h (Figura 4.14 A), y demostrando que la ruta involucrada no depende enteramente del crecimiento celular. También, en su defecto, puede ser debido a que la fase lag afecta a la velocidad de crecimiento. El final de la fase exponencial empieza más tarde en el tiempo y los metabolitos también aumentan su concentración a este ritmo. Los diferentes perfiles de VOCs emitidos por cepas de *Lactobacillus* y *Lactococcus*, sugieren que el crecimiento bacteriano no explica todo el proceso que podría estar implicado en la producción de estos metabolitos por BAL en el medio de cultivo, a lo cual ya han hecho referencia otros autores (Maddula et al., 2009).

La Figura 4.16 C muestra la evolución del pH durante el cultivo de las BAL. Se aprecia un decrecimiento de los valores iniciales de pH durante 24 h, de 6 a 3.57 (*Lactobacillus casei*), 3.86 (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*), y 4.7 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*). La acidificación del medio indica la rápida utilización de carbohidratos con la acumulación de ácidos láctico y acético. A pH bajo (como 4.6), el metabolismo de fermentación de las hexosas se complementa con la utilización de aminoácidos, lo cual es favorable para la producción de aroma en quesos madurados durante un largo período (Gerrit et al., 2005; Gänzel, 2015).

En la elaboración de queso son críticos el grado y la velocidad de descenso del pH. El pH afecta de manera importante al control de la humedad, la retención de los coagulantes, la pérdida de minerales y las interacciones electroquímicas entre

las moléculas de proteínas. Todos estos factores afectan al desarrollo del *flavour* y a las propiedades físicas (textura y cuerpo) de los quesos (Hou et al., 2017).

4.3.3. Discriminación de cepas mediante el análisis de componentes principales

El potencial del método GC-IMS para identificar diferentes BALs puede destacarse usando un análisis global (incluyendo todos los datos en la región de deriva de 8 a 14 ms y tiempo de retención de 90 a 650 s) del mapa topográfico de cada muestra (Figura 4.14). Los datos usados para construir el PCA se obtuvieron incubando las BAL a 35°C. Los datos se normalizaron con respecto al área del pico del ion reactante.

De acuerdo a la Figura 4.17 A, las muestras de referencia de las BAL pueden ser categorizadas en cuatro grupos diferentes. Los dos primeros componentes explicaron el 82.06% de la varianza; el componente PC1 contribuyó con 54.75% y el componente PC2 con el 27.31%.

Las huellas de *Lactococcus* fueron claramente diferentes, como se demuestra en los grupos C y D de la Figura 4.17 A. La diferencia entre los grupos A y B (*Lactobacillus*) no fue tan clara como en el caso de *Lactococcus*.

Los *Lactobacillus* se diferenciaron más claramente cuando un análisis de compuestos marcadores o "*target analysis*" (usando los datos de las áreas de 20 señales asignadas en el mapa topográfico de las cepas de referencia de BAL) para construir el PCA.

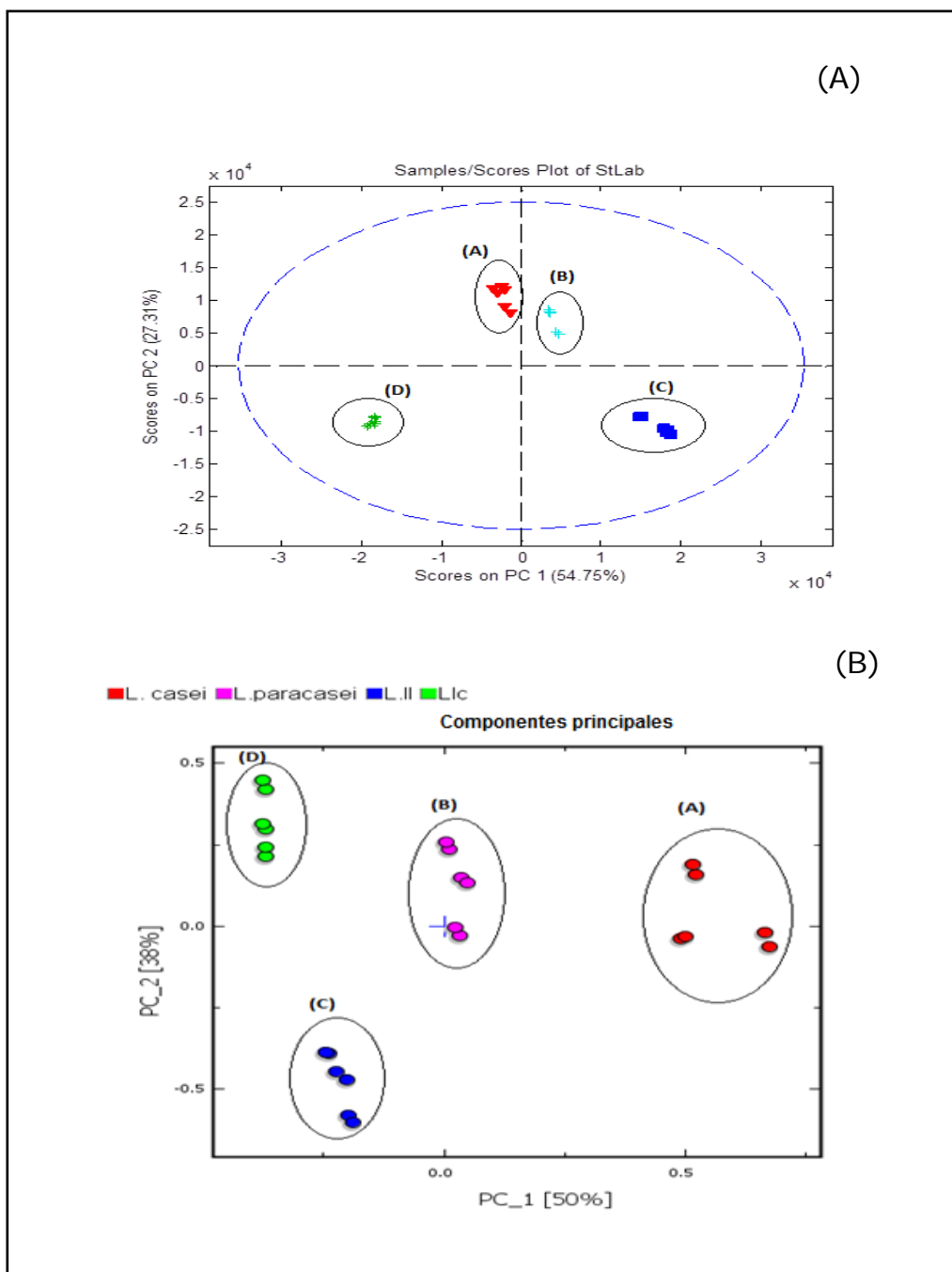


Figura 4.17. (A) PCA de las cepas de referencia de BALs usando la información de la región espectral de tiempo de deriva de 8 a 14 ms y tiempo de retención de 90 a 650 s. PCA construido con el software Matlab. Se han dibujado elipses alrededor de (A) *Lactobacillus casei*, (B) *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, (C) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, (D) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. (B) PCA usando los datos de las áreas de veinte picos del mapa topográfico de las BAL de referencia. Este PCA se construyó con el software LAV. Se han dibujado elipses alrededor de (A) *Lactobacillus casei*, (B) *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, (C) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, (D) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.

Este PCA (Figura 4.17 B) demostró que el 88% de la varianza de los datos fue explicado por los dos primeros componentes con valores propios ≥ 1 (Tabla 4.5). Las variables altamente ponderadas bajo PC1 y PC2 con el peso más alto de los factores de carga fueron b1 (2-pentanona monómero), b2 (2-pentanona dímero), c1 (3-metil-1-butanol monómero), d1 (2-heptanona monómero) y d2 (2-heptanona dímero). PC1 puede explicar algunas diferencias entre cepas de *Lactobacillus* y *Lactococcus* cuando estas BAL producen metabolitos volátiles bajo las condiciones de este estudio.

Tabla 4.5. Resultados del PCA de las señales GC-IMS seleccionadas

	PC1	PC2
Valores propios	3.244	2.888
% de varianza	50	38
% acumulativo	50	88
Señales GC-IMS seleccionadas	Factor de carga	
a2: 2-butanona (d)	-0.199	0.875
b1: 2-pentanona (m)	0.013	-0.904
b2: 2-pentanona (d)	0.944	0.256
c1: 3-metil-1-butanol (m)	0.146	0.921
c2: 3-metil-1-butanol (d)	-0.599	0.614
d1: 2-heptanona (m)	0.985	0.096
d2: 2-heptanona (d)	0.982	0.084

(m) monómero, (d) dímero. Las variables en negrita son los pesos más altos del factor de carga, es decir, los metabolitos que contribuyen a la separación.

En contraste, PC2 muestra *Lactobacillus* agrupados en (A), separados claramente de los grupos (B), (C) y (D). Las disimilitudes entre los grupos (C) y (D) están en concordancia con otras características taxonómicas que clasifican *Lactococcus lactis* en subespecies, entre ellas *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (Nomura et

al., 2006). Los metabolitos volátiles son también considerados como características fenotípicas de *Lactococcus lactis*. Ciertamente, los perfiles volátiles de GC-IMS de estas cepas comparten los mismos compuestos volátiles pero difieren en la intensidad de las señales. Éstas también difieren en su evolución durante el crecimiento de los cultivos. La posibilidad de distinguir las huellas entre subespecies de *Lactococcus lactis* amplía el significado de estos resultados.

Se debería tener en cuenta que el género *Lactobacillus* es taxonómicamente complejo; sus especies (sobre 170) no se pueden diferenciar fácilmente de acuerdo a sus propiedades fenotípicas (Goldstein et al., 2015). Sin embargo, este estudio presenta la posibilidad de discriminar *Lactobacillus casei* de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, de acuerdo a sus huellas espectrales.

El presente estudio comprendió una aproximación de carácter exploratorio y descriptivo a la composición de metabolitos volátiles de las cepas de BAL sometidas a ensayo. Puede aplicarse a un tamaño de muestra más grande y que incluya aislamientos de BAL de origen distinto al lácteo. Como se ha descrito, 2-butanona, 2-pentanona, 2-heptanona y 3-metil-1-butanol son compuestos del aroma/sabor elaborados por BAL y encontrados en el perfil aromático de un importante número de quesos.

4.4. Valoración del uso de la IMS en matriz quesera

Los resultados expuestos evidencian que los VOCs del queso, y los metabolitos volátiles de las cuatro cepas de BAL consideradas de interés tecnológico son susceptibles de estudio aplicando los sistemas HS-MCC-IMS y HS-GC-IMS. Se establece la importancia de los resultados encontrados en los ámbitos de control de calidad del queso y de la microbiología, esto último por la viabilidad de realizar búsquedas de nuevos aislamientos de BAL con potencial biotecnológico para la industria del queso.

Los resultados definen que es posible abordar el estudio del *flavour* del queso con la contribución de la Espectrometría de movilidad iónica. Los ensayos exploratorios demostraron la diferenciación entre quesos de cabra elaborados con leche cruda y leche pasteurizada en base a señales específicas particulares que conforman la huella espectral de cada tipo de queso.

También se ha identificado el butanoato de etilo como marcador de maduración en quesos de cabra elaborados artesanalmente. En este sentido, en base a la inspección visual sistemática de mapas topográficos IMS de distintas muestras de quesos tomadas de locales comerciales y de quesos de cabra de elaboración tradicional provenientes de distintos lotes, se encontró que es posible usar señales específicas para verificar la consistencia de los productos en cada lote de elaboración, o según el tipo de queso.

Asumiendo que las señales más frecuentes representan la peculiaridad de un queso, dichas señales se caracterizaron mediante el tiempo de retención y el tiempo de deriva. Este último es un parámetro importante para calcular la movilidad iónica y poder identificar compuestos desconocidos junto con

el tiempo de retención. Aunque, con el fin de poder comparar sus resultados y para minimizar los efectos de presión y temperatura ambientales sobre el equipo, las medidas mencionadas suelen expresarse también como movilidad reducida.

De esta manera, se apreció que los distintos tipos de queso presentan una diversidad de metabolitos volátiles conformando una variedad de perfiles, y se ratificó que los quesos, dentro de una variedad particular, muestran perfiles similares, mientras que un solo queso puede revelar su propio perfil, como en el caso de los quesos tradicionales. Sin duda, estos perfiles provienen de la actividad de la microbiota presente y los factores externos e internos que influyen en el proceso.

Los cambios en los patrones de señales resultan de especial interés en la tecnología del queso debido a que los metabolitos volátiles, al formar parte del sabor y aroma, y al caracterizarlo, definen la calidad de este producto en lo que a la composición de volátiles se refiere. Efectivamente, se espera que un perfil de volátiles resultante de un análisis por IMS también sea característico de un queso, como ya se ha evidenciado en este trabajo. Cualquier disconformidad respecto al patrón esperado puede alertar sobre la presencia de aromas anómalos procedentes de contaminantes químicos o de la actividad de microorganismos indeseables.

Las señales IMS detectadas en treinta quesos distintos conformaron huellas similares para algunos grupos, lo que sugiere que son parecidos respecto a criterios de composición y calidad que, a su vez, son determinados por los eventos bioquímicos asociados a los procesos de elaboración.

En este trabajo se comprobó que el perfil aromático de un queso, determinado por IMS, resulta característico de cada

tipo particular siendo posible identificar los metabolitos volátiles y compuestos aromáticos que definen su aroma y sabor natural, algo contrastado por Zuljan et al. (2016).

Además, el perfil aromático de un queso puede estar conformado por compuestos volátiles muy representativos, de impacto en el aroma o al contrario, con compuestos con poco o ningún significado para el *flavour* (Curioni y Bosset, 2002; Delgado et al., 2011). Pero en todo caso, los compuestos volátiles están ligados a un significado y utilidad práctica. Efectivamente, los metabolitos volátiles pueden determinar la calidad de un queso y contribuir a la estandarización de los quesos a través de un mejor control del proceso (Barron et al., 2005; Fox y Wallace, 1997; Mullet et al., 1999).

Como ya hemos mencionado, la GC acoplada a detectores convencionales (como los de ionización de llama o MS) es la técnica de referencia para el análisis de compuestos volátiles. En el queso, este análisis siempre fue problemático debido a la complejidad de las muestras y a la naturaleza de los analitos, a la baja concentración de algunos analitos de interés y a sus interacciones. En el presente trabajo, hemos defendido el uso de la IMS como opción para la investigación analítica del aroma, permitiendo avanzar estudios sobre su desarrollo en nuevos productos, o resolver problemas en la industria del queso incluso sin la necesidad de caracterizar el perfil completo de compuestos volátiles presentes en una muestra, haciendo solamente uso de metabolitos marcadores. Sin embargo, el estudio instrumental del aroma no descarta incorporar estudios de evaluación sensorial, necesarios en muchos otros aspectos, relacionados fundamentalmente con estudios de aceptabilidad y análisis comparativos, entre otras muchas e importantes aplicaciones.

Frente a la GC-MS, la IMS resulta una alternativa adecuada para el análisis del aroma del queso, y de control de la actividad de BAL en la producción de compuestos volátiles. La IMS es un instrumento simple, portátil, de menor coste y excelente sensibilidad que puede cubrir la necesidad actual de disponer de métodos analíticos simplificados con suficiente velocidad de respuesta y fiabilidad de resultados. Todo esto se resume en las Tablas 4.6 (A y B). La técnica IMS, su instrumentación, sus bases y aplicaciones han sido ya expuestas en el primer capítulo de esta Tesis.

En el presente trabajo se ha usado la técnica IMS usando un tubo de deriva lineal acoplado a un módulo de extracción de volátiles por espacio de cabeza y con el acoplamiento de una columna de separación para mejorar la selectividad del IMS. La preseparación usando columnas (MCC o GC) es importante porque permite obtener información adicional para la identificación de los analitos a partir de los tiempos de retención (Vautz et al., 2006) y evita también el agrupamiento de iones en la cámara de ionización. El HS aporta una mejora de la selectividad del IMS a través de la selección de la temperatura para que el analito pase a la fase de vapor. En cambio, en las columnas multicapilar o cromatográfica la selección depende de la interacción del analito con la fase estacionaria.

Tabla 4.6. A. Análisis DAFO de la técnica GC-IMS

Fortalezas	Debilidades
<ul style="list-style-type: none"> - Alto grado de sensibilidad para un amplio rango de analitos. - Resultados obtenidos en pocos minutos. - Equipo portátil. - Útil para incluir en procesos de control de calidad. - Los métodos se pueden validar completamente. - Los resultados son comparables a los obtenidos en un análisis sensorial. - Moderado coste de mantenimiento. 	<ul style="list-style-type: none"> -Una interpretación completa de los datos es difícil de obtener al no existir bases de datos completas. -El poder de resolución no es muy elevado y puede que algunos compuestos solapen.
Oportunidades	Amenazas
<ul style="list-style-type: none"> - Interpretación de señales usando patrones analíticos ayudará a interpretar resultados ya obtenidos y complementar las bases de datos. - Hay muchos tipos de muestras que se pueden analizar con GC-IMS. - Este equipo se puede integrar en línea en una fábrica. - Nuevos modelos de IMS con mejores prestaciones que se podrían acoplar a GC. 	<ul style="list-style-type: none"> -No hay muchos técnicos con experiencia en esta técnica. -Solo existe una casa comercial que venda equipos de GC-IMS.

Tabla 4.6. B. Análisis DAFO de la técnica GC-MS

Fortalezas	Debilidades
<ul style="list-style-type: none"> - Alto grado de selectividad y sensibilidad para un amplio rango de analitos. - Los resultados son comparables a los obtenidos en un análisis sensorial. - Los métodos se pueden validar completamente. - La tecnología es ampliamente conocida y usada. 	<ul style="list-style-type: none"> - Los datos no se pueden evaluar automáticamente, hace falta un especialista. - El desarrollo de métodos y el mantenimiento del equipo lo debe hacer un especialista. - No es portátil.

Oportunidades	Amenazas
<ul style="list-style-type: none"> - Los resultados obtenidos se pueden integrar en softwares que se pueden ir mejorando con el tiempo. - Se pueden identificar compuestos desconocidos. - Existen distintos sistemas de muestreo que pueden mejorar la sensibilidad del equipo y reducir los costes de operación. 	<ul style="list-style-type: none"> - Alto coste de los equipos. - Alto coste de mantenimiento.

Es importante mencionar que para cada aplicación hay que optimizar un nuevo método MCC-IMS o GC-IMS para lograr la mejor separación y maximizar la sensibilidad y selectividad de los analitos objeto de estudio. Los factores clave a controlar son la temperatura de incubación de la muestra que influye en la vaporización de los analitos, el flujo de gas de muestra y de gas de deriva. El flujo de gas de muestra determina la cantidad de analito que llega hasta la región de ionización. Cuando la concentración es alta pueden producirse fragmentos (dímeros, trímeros) y aductos, en el espectro de movilidad, con lo cual aparece un mayor número de señales, complicando el análisis.

La potencialidad de la IMS como técnica analítica para el sector alimentario ha sido reflejada en publicaciones que recogen estudios sobre metabolitos de bacterias y hongos, micotoxinas, compuestos del sabor y aroma, ácidos grasos y otros determinados mediante varias modalidades de IMS: UV-IMS, ^{63}Ni -IMS, ^{241}Am -IMS y CD-IMS. En la mayoría de los casos estas técnicas se han acoplado a HS-GC, HS-MCC, HS-membrana, extracción con hexano, a columnas de extracción en fase sólida o de inmovinoafinidad para extraer los analitos a detectar por IMS (Armenta et al., 2011).

La IMS ya había sido usada para discriminar varios tipos de quesos en base a su contenido de agua, grasa y tiempo de maduración (Gursoy et al., 2009). También se usó GC-UV-IMS para controlar el proceso de elaboración de queso Camembert y se logró diferenciar entre los metabolitos de *Penicillium candidum* específicos de su aroma y los metabolitos del queso sin el hongo, aspecto crucial para controlar el crecimiento del hongo deseado (Armenta et al., 2011; Vautz et al., 2006).

Adicionalmente, estudios clásicos sobre determinación de volátiles en queso de cabra, aplicando GC acoplada a MS en la mayoría de los casos, realizados por Chioffalo et al. (2004), Barron et al. (2005), Arqués et al. (2007) y Attaie (2009), determinaron un buen número de compuestos químicos que se pueden identificar en los quesos. Sin embargo, en este trabajo usando HS-GC-IMS se detectó un número de volátiles menor al esperado, lo que puede ser atribuido al diseño de la instrumentación disponible, la IMS lineal con HS para introducción de la muestra y con preseparación mediante MCC o GS. También los distintos microorganismos involucrados en cada experiencia proporcionan distintos compuestos evaluables. En contraste, Denawaka et al. (2014), usando IMS (Flavorspect®) configurado como SHS-MCC-GC-IMS, detectaron treinta y dos VOCs en una matriz inerte cuyo aroma podría ser similar al del queso.

4.5. Familias de VOCs determinados en quesos de cabra mediante HS-MCC-IMS

Ésteres

El butanoato de etilo, así como otros ésteres pueden ser sintetizados via alcoholisis o reacciones de esterificación (Cadwallader & Singh, 2009). Como se puede ver en la Figura

4.12, el butanoato de etilo (señal a) apareció en una región espectral libre de interferencias (tr, 21.7 s; td 11.1 ms). La evolución de butanoato de etilo durante el estadio de maduración ha sido demostrado por el análisis mediante HS-MCC-IMS. En este estudio los niveles más altos de butanoato de etilo se detectaron a los 240 días.

El butanoato de etilo podría contribuir al *flavour* de la fresa, lo cual es deseable y característico en muchos quesos (Cadwallader y Singh 2009), aunque su presencia podría también enmascarar el impacto de olores anómalos (pungente, penetrante, etc.) debido a altos niveles de ácidos grasos de cadena corta. Sin embargo, niveles excesivos de este compuesto causan un *flavour* frutal detectado en algunas leches crudas y pasteurizadas y en el queso cheddar (Abeijón Mukdsi et al., 2009).

Cetonas

Las metilcetonas son productos intermedios en la degradación de ácidos grasos o aminoácidos. Debido a las actividades enzimáticas de los microorganismos en el queso, las metilcetonas son reducidas progresivamente a 2-alcanoles. Por lo tanto, sus niveles dependen del balance entre producción y degradación, lo cual está ligado al grado de madurez del queso (Beuvier y Buchin 2004). 2-Butanona se deriva del 2,3-butanodiol, y esta conversión puede solo tener lugar cuando organismos no iniciadores están presentes. La 2-butanona se detectó en los quesos C1 y C2, aunque este compuesto no ha sido cuantificado debido a que apareció junto a interferentes.

De otro lado, la 2-nonanona también se ha encontrado en quesos madurados por hongos. Este compuesto se forma probablemente por decarboxilación enzimática oxidativa de ácidos grasos por las BAL presentes (Garde et al. 2007; Lelles

Nogueira et al., 2005). La Figura 4.13 muestra un incremento de 2-nonanona a través del tiempo de maduración, alcanzando su máxima intensidad a los 270 días de maduración.

Aldehídos

Los aldehídos son compuestos intermediarios en la degradación de ácidos grasos o aminoácidos; esos compuestos se oxidan rápidamente a ácidos o se reducen a n-alcanoles por la actividad microbiana. Aunque los aldehídos no son los compuestos principales en el queso, se considera que juegan un papel clave en el desarrollo del *flavour* del queso de cabra (Attaie, 2009; Medina et al., 2011). El bajo nivel de aldehídos indica una maduración óptima del queso porque una alta concentración de aldehídos puede causar olores anómalos (Moio y Addeo, 1998). Generalmente, los aldehídos se forman de aminoácidos, ya sea por transaminación catalizada enzimáticamente, que produce una imida intermediaria seguida por decarboxilación. Estos compuestos también pueden formarse por degradación de Strecker (etapa de la reacción de pardeamiento no enzimático), que genera aldehídos y cetonas de bajo peso molecular de fácil detección por el olfato. Los aldehídos también podrían estar presentes en quesos como un resultado de la autooxidación de los lípidos (Munning y Nursten, 1985).

En quesos de cabra se han identificado dos aldehídos (octanal y trans-2-heptenal) usando HS-MCC-IMS. El octanal disminuye su concentración a través del tiempo de maduración (Figura 4.13). De acuerdo con Cadwallader y Singh (2009), el octanal puede ser producido por la autooxidación de ácido oleico y se caracteriza por su aroma herbáceo como a pasto verde. El trans-2-heptenal mostró una concentración alta a los 240 días (Figura 4.13). Su presencia en el queso podría provenir del

aceite de oliva que se usa en la limpieza superficial durante la maduración de queso.

Alcoholes

Los alcoholes, junto con el amonio, los ácidos, cetoácidos y carbonilos se pueden producir como resultado de la deaminación de aminoácidos durante la maduración (Fox et al., 2004). Estos compuestos se podrían formar rápidamente de aldehídos bajo fuertes condiciones reductoras presentes en quesos. Además, éstos pueden también resultar de otras rutas metabólicas, como el metabolismo de la lactosa y el catabolismo de aminoácidos. Los alcoholes secundarios se forman mediante reducción enzimática (alcohol deshidrogenasa) de las metilcetonas correspondientes (Molimard y Spinnler, 1996).

El nivel de alcohol incrementa durante el primer mes de almacenamiento pero decrece después de 30 días. Esta disminución se debe probablemente al incremento de ésteres que se formaron de la esterificación de ácidos y alcoholes.

El 1-hexanol fue identificado en la muestra C1 y se observó que incrementó entre los 60 y 270 días de maduración (Figura 4.13). Este alcohol primario se produce principalmente mediante la reducción de sus aldehídos y metilcetonas correspondientes.

4.6. Estudio de VOCs emitidos por microorganismos

En sentido global, la importancia del estudio de compuestos volátiles emitidos por microorganismos se debe a las funciones que estos cumplen dentro de distintos procesos de elaboración. En Microbiología, el interés de estos compuestos se relaciona con la búsqueda de métodos más rápidos que los convencionales encaminados a la identificación microbiana, y

al control de la actividad microbiana en procesos de maduración o fermentación, entre otras posibilidades. En otro orden de cosas, debido a que estos metabolitos secundarios influyen en la calidad sensorial de los alimentos, las nuevas aplicaciones de la IMS se orientan a estudios de autenticación de productos de alto valor en el mercado.

En este mismo campo alimentario, el control de volátiles también aporta al diseño de bioprocesos, en la fase de caracterización de microorganismos de interés para la producción de aromas, o incluso microorganismos con alguna otra actividad biológica relacionada. Por ejemplo, y en relación con la actividad antimicrobiana de los compuestos volátiles, se conoce que diacetilo producido por *Lactobacillus paracasei* DGCC 2132 fue activo contra dos cepas de *Penicillium* spp. (Aunbjerg et al., 2015). Cabe señalar que los quesos artesanales pueden albergar cepas únicas, lo que puede significar una peculiaridad aromática o una actividad biológica particular, especialmente si proceden de localidades geográficas aisladas.

Todos los VOCs detectados se consideran productos del metabolismo de BAL y podrían ser usados para la diferenciación entre las cepas examinadas. Las cetonas (2-butanona, 2-pentanona y 2-heptanona) son los compuestos detectados con mayor frecuencia por GC-IMS en este estudio. Las cetonas son constituyentes comunes de un amplio rango de productos lácteos y tienen influencia notoria en el aroma del queso y bajo umbral de percepción (Curioni y Bosset, 2002). 2-heptanona se ha detectado en algunos tipos de quesos, como Emmental o Gorgonzola (Moio et al., 2000).

La ruta general de la producción de cetonas se explica por el hecho de que los ácidos grasos liberados por lipólisis podrían

ser oxidados y decarboxilados a cetonas o alcoholes con un átomo de carbono menos (McSweeney y Sousa, 2000). La presencia de metil cetonas en quesos tradicionales se explica por la acción lipolítica de microorganismos como los hongos y la 2-butanona probablemente derive del alimento de la vaca (Ordiales et al., 2013).

Adicionalmente a las cetonas, en este estudio también se encontraron compuestos alcohólicos: 3-metil-1-butanol (producido por la degradación de leucina), lo cual está relacionado con el aroma agradable de queso fresco (Randazzo et al., 2007; Smit y Engels, 2005). En algunos quesos madurados, en cambio, produce aromas a alcohol o afrutados (Ordiales et al., 2013). Por otro lado, no se conoce claramente si 3-metil-1-butanol se usa como suministro de carbono y energía o puede funcionar como molécula de señalización que cambia el metabolismo o activa el ciclo de vida bacteriano (Díaz-Pérez et al., 2016).

Además, 3-metil-1-butanol ha sido reconocido como clave para el *flavour* en diferentes quesos de elaboración tradicional. El compuesto es producido comúnmente por cepas silvestres de BAL (Morales et al., 2003), aunque la ruta metabólica más frecuente para la producción de alcoholes por *Lactobacillus casei* es el catabolismo de aminoácidos, que incluye la degradación de ácidos linoleico y linolénico. La biosíntesis de 3-metil-1-butanol también incluye el metabolismo de lactosa o lactato y la reducción de aldehído (Sgarbi et al., 2013).

4.7. Formas de analizar metabolitos volátiles mediante IMS

Cuando se aplica IMS al análisis de metabolitos de origen alimentario o microbiano los ensayos a realizar se enmarcan en tres categorías *i)* ensayos para análisis específico de

marcadores (*target analysis*) que permite detectar o cuantificar analitos seleccionados, indicadores de alguna bioactividad. *ii*) estudios que se centran en un grupo de metabolitos relacionados que conforman un perfil metabólico. En cambio, *iii*) la huella metabólica (*metabolic fingerprint*) tiende a comparar patrones de metabolitos entre muestras dentro de un mismo grupo o entre distintos grupos de una misma clase, por lo que no hace falta identificar todos los metabolitos implicados, aunque se detectan los compuestos biomarcadores de alguna actividad en particular (Arce et al., 2014).

Partiendo de este enfoque, cualquiera de los 6 metabolitos (1-hexanol, 2-nonanona, octanal, *trans*-2-heptanal, butanoato de etilo y butanoato de propilo) identificados en el trabajo donde se analizaron quesos de cabra, se pueden ver como analitos “específicos” u objeto de potencial interés en otros quesos similares. Particularmente, se puede seguir la evolución del butanoato de etilo, octanal o 2-nonanona en la maduración de los quesos de cabra analizados, o se puede seleccionar por ejemplo la 2-nonanona como metabolito “específico” y analizarlo con cierta frecuencia para saber cómo evoluciona la maduración del queso. En este trabajo, como se ha puesto de manifiesto, se analizó la evolución del butanoato de etilo en la maduración de quesos tradicionales de cabra.

El estudio de un perfil metabólico requiere el conocimiento de la muestra; en esta Tesis, la detección mediante IMS de metabolitos específicos procedentes de BAL (2-butanona, 2-pentanona, 2-heptanona y 3-metil-1-butanol identificados en *Lactobacillus* -*L. casei* y *L. paracasei* subsp. *paracasei*- y 2-butanona y 3 metil-1-butanol identificados en *Lactococcus* -*L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris*-) reflejan la presencia “*in vitro*” de productos del metabolismo de BAL que

generan perfiles distintos para las cuatro especies bacterianas bajo las condiciones especificadas de análisis.

Con este antecedente, al hacer un cribado en otros aislamientos de una misma cepa conocida, por ejemplo *L. casei*, a través de la caracterización de señales IMS (tiempo de deriva, tiempo de retención e intensidad de las señales), o teniendo en cuenta su constante de movilidad iónica y en base a su perfil metabólico, se puede verificar la identidad de la cepa, es decir si corresponde o no a *L. casei*. También la huella puede contribuir a estimar su estado fisiológico.

Sobre esta base, es posible comparar entre el perfil metabólico de una cepa conocida de BAL y un nuevo aislamiento para analizar similitudes y así discriminar en el laboratorio potenciales cepas productoras de un metabolito de interés.

Por su parte, los análisis globales no selectivos o integrales se centran en la detección de muchos grupos de metabolitos de modo que es posible obtener patrones o huellas sin identificar o sin cuantificar de un compuesto específico (Mozzi et al., 2013). Esto, en la práctica, supone la ventaja de acortar el tiempo de análisis y reducir su coste en comparación con la GC, y es especialmente importante cuando hay dificultades para la identificación de los compuestos, y a la vez la identificación no es estrictamente indispensable de acuerdo al objetivo previsto.

Respecto a las dificultades mencionadas, a veces ocurre que los picos de un espectro o mapa topográfico, debido a reacciones ion molécula, muestran solapamiento de señales que no se resuelven suficientemente (aspecto que evidencia una limitación de la IMS). Sin embargo, este problema puede resolverse cambiando las condiciones instrumentales; por ejemplo, acoplado una columna de GC o MCC a un IMS, o con

tubos de deriva de mayor longitud, modificando el sistema para obtener el espacio de cabeza,

En esta Tesis, la determinación de señales más frecuentes, y su movilidad iónica en las muestras de ensayo, revelaron un patrón diferente de huella espectral para cada una de las siguientes cepas: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Esta respuesta caracteriza estos cultivos de referencia por IMS aun sin necesidad de identificar los metabolitos responsables de las señales como se puede apreciar en la Figura 4.16 A donde se ven los PCA hechos con toda la información obtenida en una zona del espectro o los PCA obtenidos con algunas señales seleccionadas (Figura 4.16 B).

Por último, la incertidumbre respecto a si el origen de una señal es o no un metabolito se solucionó siguiendo la evolución de la señal con el tiempo, sobre la hipótesis de que un cambio en la intensidad de la señal estaría asociado a la presencia de células y su actividad "*in vitro*". Este ensayo permitió distinguir al analito entre señales generadas por el sustrato de crecimiento o por efecto memoria, es decir, VOCs que se adhieren a la columna de separación o al tubo de deriva y son liberados posteriormente contaminando una muestra.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

PRIMERA.- El método HS-MCC-IMS puesto a punto para la determinación de VOCs en quesos de cabra funciona como una alternativa útil a las técnicas convencionales como la GC para medir volátiles del *flavour* en el queso. La metodología comprende análisis cortos y muestra alta sensibilidad y suficiente selectividad hacia los compuestos analizados.

SEGUNDA.- El método desarrollado puede ser una alternativa adecuada para determinados parámetros frente al análisis sensorial, que es costoso y requiere personal con experiencia cuya capacidad analítica se restringe a períodos limitados de tiempo. Aunque será idóneo desarrollar trabajos complementarios entre paneles de cata y análisis instrumentales con IMS en la detección de VOCs responsables del aroma en alimentos.

TERCERA.- Los resultados del presente estudio sugieren el uso potencial de HS-MCC-IMS para diferenciar entre quesos manufacturados con leche cruda y quesos elaborados con leche pasteurizada. Este hecho es importante porque el tipo de leche empleado en quesería tiene gran influencia en la apreciación del producto por parte del consumidor y por aspectos relacionados con el control de calidad.

CUARTA.- De igual manera, el método es aplicable para controlar la evolución de volátiles durante la maduración del queso, en este caso el comportamiento del butanoato de etilo en queso de cabra lo señala como un compuesto apropiado para este fin.

QUINTA.- La evolución de los VOCs durante la maduración de un queso es susceptible de realizarse por la técnica propuesta. El método permite un control en línea durante el procesamiento del queso porque tan sólo con la inspección visual de espectros y en base a las características IMS (td, tr, e intensidad) de las señales de interés es posible distinguir y alertar sobre similitudes o diferencias entre muestras. Para igual propósito sirve la constante de movilidad iónica y sencillas pruebas estadísticas de comprobación.

SEXTA.- También es factible la detección de aromas anómalos, lo que resulta de utilidad para controlar la consistencia del producto y las potenciales diferencias entre lotes.

SÉPTIMA.- La GC-IMS es una tecnología que permite detectar VOCs de BAL de manera rápida y no costosa en comparación con otras metodologías clásicas, con la ventaja adicional de facilitar el control de un proceso biotecnológico en base a la detección inmediata, en tiempo real, sin la necesidad de realizar tratamientos previos a la muestra o emplear accesorios complejos para el muestreo, lo cual implica riesgo de contaminación de los cultivos microbianos y pérdida de metabolitos.

OCTAVA.- Los resultados del *screening* de volátiles producidos por BAL son de utilidad en estudios de bioprospección o búsqueda de nuevas cepas productoras de perfiles aromáticos interesantes para a la selección y desarrollo de cultivos iniciadores. En el mismo sentido, este conocimiento puede aportar a estudios prospectivos en la producción de metabolitos secundarios implicados en el aroma del queso.

NOVENA.- Los metabolitos volátiles: 2-butanona, 2-pentanona, 2 heptanona y 3-metil-1-butanol resultan

relevantes para *L. casei*, y *L. paracasei* subsp. *paracasei*, mientras que 2 butanona y 3-metil butanol lo son para *L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris* en la caracterizaron por IMS. Los VOCs generados condujeron a su discriminación en 4 agrupaciones usando PCA. El cambio en intensidad de las señales IMS durante el crecimiento de las cepas demostró que los VOCs provienen de la actividad bioquímica de las células, posiblemente de intermediarios de rutas metabólicas, puesto que estos metabolitos secundarios aparecen desde la fase de crecimiento exponencial.

DÉCIMA.- De acuerdo con la metodología HS-GC-IMS, estos compuestos identificados estarían contribuyendo en mayor medida a la percepción aromática de un queso donde esta microbiota sea la predominante.

UNDÉCIMA.- Las huellas químicas generadas por las cuatro cepas de BAL estudiadas se pueden usar como patrones para buscar cepas con huella y capacidad aromática similares o idénticas. Además esta metodología puede usarse para la identificación o autenticación de estas cepas específicas, en el laboratorio, a partir de cultivos o matrices alimentarias específicas y analizadas previamente.

CAPÍTULO 6

RESUMEN

RESUMEN

El perfil aromático del queso es útil para definir su calidad, sus propiedades sensoriales y su variedad. Igualmente, permite evaluar los cambios durante la maduración y diferenciar entre productos aceptables o defectuosos. Fundamentalmente, la aceptabilidad de un queso por parte del consumidor depende de las características sensoriales, entre ellas el sabor/aroma (*flavour*) que resulta de la actividad bioquímica y microbiana y de la tecnología empleada en la elaboración. En una primera parte de esta Tesis Doctoral se determinaron algunos compuestos orgánicos volátiles (VOCs) presentes en quesos de cabra de elaboración artesanal. Para la extracción e identificación de los metabolitos volátiles se empleó la técnica de espacio de cabeza acoplada a espectrometría de movilidad iónica con columna multicapilar (HS-MCC-IMS de su nombre en inglés). Previa a su aplicación fue necesario realizar estudios exploratorios sobre señales IMS detectadas con mayor frecuencia para la puesta a punto de la metodología analítica, aspecto que conllevó cierta complejidad. Sin embargo, el análisis permitió una rápida y simple diferenciación entre quesos de cabra elaborados con leche cruda y leche pasteurizada. La hibridación HS-MCC-IMS produjo espectros multidimensionales de movilidad iónica con picos a diferentes tiempos de retención y de intensidad de señal variable para algunos metabolitos individuales. En los quesos analizados se identificaron un total de seis metabolitos: un alcohol (1-hexanol), una cetona (2-nonanona), dos aldehídos (octanal, trans-2-heptanal) y dos ésteres (etil butanoato y propil butanoato). Adicionalmente, se monitorizó la evolución de etil butanoato a través de diferentes tiempos de maduración (60, 150, 180, 210, 240 y 270 días). Los

resultados preliminares mostraron que la concentración de etil butanoato incrementó durante el tiempo de maduración, de acuerdo a la dinámica bioquímica y microbiana de la matriz, por lo cual este compuesto podría ser un marcador potencial del tiempo de maduración en los quesos artesanales de cabra examinados. El método optimizado se puede usar para el control de calidad en la producción de este tipo de queso.

Por otro lado, al ser la producción de un queso madurado un proceso sistémico relacionado e interactuante con la actividad de una comunidad microbiana, una segunda parte de este trabajo se orientó al estudio de los VOCs generados por *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Cepas de bacterias acidolácticas (BAL) de interés en la tecnología del queso por sus características como iniciadoras de fermentación y productoras de aroma. En este caso el propósito fue diferenciar las cepas tipificadas de BAL a través de la información sobre el aroma suministrado por metabolitos (marcadores) identificados en cada uno de los cultivos bacterianos y que conforman su huella IMS. Para ello, cultivos bacterianos estandarizados se examinaron mediante HS-GC-IMS, encontrándose que la 2-butanona, 2-pentanona, 2-heptanona y 3-metil-1-butanol fueron relevantes para *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* mientras que la 2-butanona y 3-metil butanol se identificaron en *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. El continuo control de las señales IMS durante 24-30 h de cultivo demostró también el crecimiento paralelo de estas BAL "in vitro", evidenciando así que los VOCs señalados son producto de su metabolismo.

El hecho de haber logrado la diferenciación entre cepas sugiere la posibilidad de aplicar modelos estadísticos tendentes a facilitar la búsqueda de nuevas cepas ambientales de BAL que sean fundamentales para la producción de aroma en el queso u otros productos lácteos.

CAPÍTULO 7

SUMMARY

SUMMARY

The aromatic profile of cheeses is useful to assess their quality, sensorial properties and variety. Also, it permits to evaluate the changes during the maturation, and to differentiate between acceptable or spoiled products. Mainly, the acceptability of a cheese by the consumer depends on the sensorial characteristics, such flavour, result of the biochemical and microbial activity, as well as the technology used in cheese manufacture. In the first part of this Doctoral Thesis, different Volatile Organic Compounds (VOCs) founded in artisanal goat cheeses were determined. To extract and identify those VOCs, Headspace - Multicapillary Column - Ion Mobility Spectrometry (HS-MCC-IMS) was used. Previously, exploratory studies on most frequent IMS signals detected were carried out for tuning the analytical methodology. This aspect is complex. However, the analysis showed a rapid and simple differentiation between goat cheeses elaborated with raw milk and those elaborated using pasteurized milk. HS-MCC-IMS showed multi-dimensional IMS spectra, reporting peaks in different retention times and with variable signal intensity for diverse metabolites. For the cheeses studied, six metabolites were identified: an alcohol (1-hexanol), a ketone (2-nonanone), two aldehydes (octanal, trans-2-heptenal) and two esters (ethyl butanoate and propyl butanoate). Also, the evolution of ethyl butanoate through maturation (60, 150, 180, 210, 240 and 270 days) was monitored. Preliminary results showed the increasing of the ethyl butanoate concentration during maturation period, according to the biochemical and microbial dynamics of the food matrix. For this reason, this compound could be a potential marker of maturation time for the artisanal goat cheeses studied. The

optimized method can be used for quality control in this type of cheeses.

In the other hand, and taking into account that the matured cheese production is a systemic process interactive and related to the activity of a microbial population, a second part of this work was focused on the study of VOCs generated by *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. These lactic acid bacteria (LAB) are considered of interest as starters for cheese technology, due to their fermentative and flavour characteristics. In this case, the main goal was to differentiate the LAB strains using the flavour information obtained thanks to the identified metabolites (markers) for each microbial culture and their IMS fingerprint. To that goal, standardized bacterial cultures were examined by HS-GC-IMS. 2-butanone, 2-pentanone, 2-heptanone and 3-methyl-1-butanol were found as relevant compounds for *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei*, while 2-butanone and 3-methyl butanol were determined for *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. The control of IMS signals during a 24-30 h culture also reported the parallel increasing of counts of these LABs "in vitro", showing that those VOCs are products of their metabolism.

On the basis of the differentiation of the strains studied, we can suggest the application of statistical models trending to make easier the searching of new wild strains of LAB of interest in the production of flavours in cheeses and other dairy products.

CAPÍTULO 8

REFERENCIAS

8.- REFERENCIAS

- Abeijón Mukdsi M.C., Medina R.B., Álvarez M.F., González N.S. Ester synthesis by lactic acid bacteria isolated from goat's and ewes milk. *Food Chemistry*. 117(2009) 242-247.
- Achilleos C. y Berthier F. Quantitative PCR for the specific quantification of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei* and its interest for *Lactococcus lactis* in cheese samples. *Food Microbiology*. 36(2013) 286–295.
- Aharoni A., Ric de Vos C.H., Verhoeven-Harrie A., Maliepaard C.A., Kruppa G., Bino R., Goodenowe-Dayana B. Nontargeted metabolome analysis by use of Fourier Transform Ion Cyclotron Mass Spectrometry. *Omics: A Journal of Integrative Biology*. 6(2002) 217–234.
- Almena-Aliste M. y Mietton B. Cheese classification, characterization and categorization: A global perspective. *Microbiology Spectrum* 2. 2014. (1): CM-0003-2012. Doi:10.1128/microbiolspec.
- Aprea E., Biasioli F., Gasperi F., Mott D., Marini F., Tilman D Märk. Assessment of Trentingrana cheese ageing by proton transfer reaction-mass spectrometry and chemometrics. *International dairy journal*. 17(2007) 226-234.
- Arce L., Valcarcel M. The Role of Ion Mobility Spectrometry to Support the Food Protected Designation of Origin. In *Comprehensive Analytical Chemistry*. 60(2014) 221-249.
- Armenta S., Alcalá M., Blanco M. A review of recent, unconventional applications of ion mobility spectrometry (IMS). *Analytica Chimica Acta*. 703(2011) 114-123.
- Attia R. Quantification of volatile compounds in goat milk Jack cheese using static headspace gas. *Journal of Dairy Science*. 92(2009) 2435-2443.

- Barron L.J., Redondo Y., Flanagan C.E., Pérez-Elortondo F.J., Albisu M. Nájera A.I., de Renobales, M., Fernández-García E. Comparison of the volatile composition and sensory characteristics of Spanish PDO cheeses manufactured from ewes' raw milk and animal rennet. *International Dairy Journal*. 15(2005) 371–382.
- Beresford T.P., Fitzsimons N.A., Brennan N.L., Cogan Tim M. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*. 11(2001) 259–274.
- Berard J., Bianhi F., Careri M., Chatel A., Mangia A. Musci M. Characterization of the volatile fraction and of free fatty acids of "Fontina Valle d' Aosta". A protected designation of origin Italian cheese. *Food Chemistry*. 105(2007) 293-300.
- Beresford T., Willians A. The microbiology of cheese ripening in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Third edition. Volume 1: General Aspects. Elsevier 2004. Pp 287-317.
- Bernardeau M., Vernoux J.P., Henri-Dubernet S., Guéguen M. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus *International Journal of Food Microbiology*. 126(2008) 278–285.
- Beuvier E., Buchin S. Raw Milk Cheeses. In: Fox P.F., McSweeney P.L.H., Cogan T.M., Ginee T.P. (eds). *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol 1 3rd edn. Elsevier Academic Press. (2004) 319-345.
- Biasioli F., Yeretzián C., Gasperi F., Tilmann D. M. PTR-MS monitorin of VOCs and BVOCs in food science and technology. *Trends in Analytical Chemistry*. 30 (2011) 968-977.
- Borsdorf H. y Eiceman G.A. Ion mobility spectrometry: principles and applications. *Applied Spectroscopy Reviews*, 41(2006) 323-375.

- Bota G.M., Harrington P.B. Direct detection of trimethylamine in meat food products using ion mobility spectrometry. *Talanta*. 68(2006) 629-635.
- Brandsma J.B., Van de Kraats I., Abee T., Zwietering M.H., Meijer W.C. Arginine metabolism in sugar deprived *Lactococcus lactis* enhances survival and cellular activity, while supporting flavour production. *Food Microbiology*. 29(2012) 27-32.
- Cadwallader K.R. y Singh T.K. Flavours and off-flavours in milk and dairy products. In: Mc Sweeney PLH, Fox PF (eds) *Advance Dairy Chemistry*. Vol III, 3rd edn. Springer. University College, Cork, Ireland. (2009) 209.
- Caldeo V. y McSweeney P.L.H. Changes in oxidation-reduction potential during the simulated manufacture of different cheese varieties. *International Dairy Journal*. 25(2012) 16-20.
- Casalta E., Sorba J.M., Aigle M., Ogier J.C. Diversity and dynamics of the microbial community during the manufacture of Calenzana, an artisanal Corsican cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 133(2009) 243–251.
- Catálogo Electrónico de quesos de España. http://www.alimentacion.es/es/conoce_lo_que_comes/bloc/queso/default/principal/default.aspx. [en línea] consultado 2016-03-20.
- Cavanagh D., Fitzgerald G.F., McAuliffe O. From field to fermentation: The origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. *Food Microbiology*. 47(2015) 45-61.
- Cheng H., Qin Z.H., Guo X.F., Hu X.S., Wu J.H. Geographical origin identification of propolis using GC-MS and electronic nose combined with principal component analysis. *Food Research International*. 51(2013) 813-822.
- Cocker C.J., Crawford R.A., Johnston H., Singh L.K., Creamer T. The classification of cheese variety and maturity on the basis of

- statistical analysis of proteolysis data-a review. *International Dairy Journal*. 15(2005) 631-643.
- Coelho M.C., Silva C.C.G., Ribeiro S.C. Dapkevicius M.L.N.E., Rosa H.J.D. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 191(2014) 53-59.
- Collins Y.F., McSweeney P.L.H., Wilkinson M.G. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*. 13(2003) 841-846.
- Crowley S., Mahony J. van Sinderen D. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio.preservatives. *Trends in Food Science and Technology*. (2013) 93-109.
- Cumeras R., Figueras E., Davis C.E., Baumbach J.I., Gracia I. Review on Ion Mobility Spectrometry. Part 1: current instrumentation. *Analyst*. 140(2015) 1376-1390.
- Curioni P.M.G. y Bosset J.O. Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal*. 12(2002) 959-984.
- d'Acampora Z.B., Dugo P., Dugo G., Mondello L. Gas chromatography-olfactometry in food flavour analysis. *Journal of Chromatography A*. 1186(2008) 123-143.
- De Filippis F., Genovese A., Ferranti P., Gilbert J.A., Ercolini D. Metatranscriptomics reveals temperature-driven functional changes in microbiome impacting cheese maturation rate. *Scientific Reports*. 6(2016) 1-11.
- de la Haba Ruiz M.A., Ruiz Pérez-Cacho P., Dios Palomares R., Galán-Soldevilla H. Classification of artisanal Andalusian cheeses on physicochemical parameters applying multivariate statistical techniques. *Dairy Science y Technology* 96 (2016) 95.
- Delahunty C.M. y Drake M.A. Sensory character of cheese and its evaluation. Fox P.F., McSweeney P.L.H., Cogan T.M., Guinee

T.P. (Eds.), Cheese: Chemistry, physics and microbiology, Elsevier Academic Press, London, UK. (2004).

Delgado J.F., González-Crespo J., Cava R., García-Parra Ramírez R. Formation of the aroma of a raw goat milk cheese during maturation analysed by SPME-GC-MS. Food Chemistry. 129(2011) 1156-1163.

Díaz-Pérez A., Díaz-Pérez C., Campos-García J. Bacterial L leucine catabolism as a source of secondary Metabolites Reviews in Environmental Science and Biotechnology. 15 (2016):1–29.

Donnelly C.W. From Pasteur to probiotics: a historical overview of cheese and microbes in: Cheese and Microbes. ASM press.Washington, DC. (2014) 1-15.

Duthoit F., Callon C., Tessier L., Montel M.C. Relationships between sensorial characteristics and microbial dynamics in "Registered Designation of Origin salers cheese". International Journal of Food Microbiology. 103(2005) 259-270.

Eiceman G.A. Ion-mobility spectrometry as a fast monitor of chemical composition. Trac-Trends in Analytical Chemistry. 21(2002) 259-275.

Eiceman G.A., Nazarov E.G., Stone J.A. Chemical standards in ion mobility spectrometry. Analytical Chemical Acta. 493(2003) 185-194.

Eiceman G.A. & Karpas Z. Ion Mobility Spectrometry. (second ed.) CRC Taylor and Francis Group, Boca Raton (2005).

Eiceman G.A., Young D., Schmidt H., Rodriguez J.E., Baumbach J.I., Vautz W., Lake D.A., Johnston M.V. Ion mobility spectrometry ablation of solids in air at gas-phase ions from laser ambient pressure Applied Spectroscopy. 61(2007) 1076-1083.

Endo A. y Dicks Leon M.T. Physiology of the LAB in Lactic Acid Bacteria Biodiversity and Taxonomy. Wiley Blackwell. 1st Edition. 2014 John Wiley and Sons Ltda.Oxford U.K.

- Escobar-Zepeda A., Sanchez-Flores A., Quirasco Baruch, M. Metagenomic Analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiology*. 57(2016) 116-127.
- Fabris A., Biasioli F., Granitto P.M., Aprea E., Cappellin L., Schuhfried E. PTR-TOF-MS and data-mining methods for rapid characterization of agro-industrial samples: influence of milk storage conditions on the volatile compounds profile of Trentingrana cheese. *Journal of Mass Spectrometry* 45(2010) 1065-1074.
- FAO. Depósito de Documentos de la FAO. Perspectivas agrícolas OCDE-FAO, 2005-2014.
<http://www.fao.org/docrep/008/y9492s/y9492s09.htm#TopOfPage> [en línea]. Consultado 15-08-13.
- FDA. 2010. Generally Recognised as Safe (GRAS) Notifications. FDA.
<http://www.fda.gov/ANimalVeterinary/Products/AnimalFoodFeeds/>
- Fernández E., Alegría A., Delgado S., Cruz Martín M., Mayo B. Comparative Phenotypic and Molecular Genetic Profiling of Wild *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Strains of the *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris* Genotypes, Isolated from Starter-Free Cheeses Made of Raw Milk. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(2011) 5324–5335.
- Fernández L., Beerthuyzen M.M., Brown J., Sieze R.J., Coolbear T. Holland R. Kuipers O.P. Cloning, characterization, controlled overexpression, and inactivation of the major tributyrin esterase gene of *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(2000) 1360-1368.
- Fox P.F. y Wallace J.M. Formation of flavour compounds in cheese. *Advance Applied Microbiology*. 45(1997) 17-85.
- Fox P.F., Guinee T.P., Cogan T.M., McSweeney P.L.H. *Fundamentals of Cheese Science*. Aspen Publishers, Inc, Gaithersburg, MD. 2000.

- Fox P.F., McSweeney P.L.H., Cogan T.M., Guinee T.P. Biochemistry of cheese ripening. In: Fox P.F., McSweeney P.L.H., Cogan T.M., Guinee T.P. (eds) Cheese Chemistry, Physics and Microbiology. (2004) Vol 1 3rd edn. Elsevier Academic Press.
- Fujimaru T., Lim J. Effects of stimulus intensity on odor enhancement by taste. *Chemosensory Perception*. 6(2013) 1–7.
- Gaggia F., Di Gioia D., Baffoni L., Biavati B. The role of protective and probiotic cultures in food and feed and their impact in food safety. *Trends in food science and technology*. 22(2011) S58-S66.
- Gallegos J., Garrido-Delgado R., Arce L., Medina L.M. Volatile Metabolites of Goat Cheeses Determined by Ion Mobility Spectrometry. Potential Applications in Quality Control. *Food Analytical Methods*. 8(2015) 1699-1709.
- Gänzel M. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*. 2(2015) 106-117.
- Garde S., Ávila M., Fernández-García E., Medina M., Núñez M. Volatile compounds and aroma of Hispánico cheese manufactured using lacticin 481-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* INIA 639 as an adjunct culture. *International Dairy Journal*. 17(2007) 717-726.
- Gerrit S., Smit B.A., Engels W.J.M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*. 29(2005) 591-610.
- Gobbetti M., de Angelis M., di Cagno R., Mancini L., Fox., P.F. Pros and cons for using non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) as secondary/adjunct starters for cheese ripening. *Trends in Food Science y Technology*. 45 (2015) 167-178

- Goldstein E.J.C., Tyrrell K.L., Citron D.M. *Lactobacillus* Species: Taxonomic Complexity and Controversial Susceptibilities. *Clinical Infectious Diseases*. 60(2)(2015) S98-S107.
- Guerrero L., Guardia M.D., Xicola J., Verbeke W., Vanhonacker F., Zakowska-Biemans S., Sajdakowska M., Sulmont-Rosse C., Issanchou S., Contel M., Scalvedi M.L., Granli B.S., Hersleth M. Consumer-driven definition of traditional food products and innovation in traditional foods. A qualitative cross-cultural study. *Appetite*. 52(2009) 345-354.
- Guillen M.D. y Abascal B. Nature and distribution of the volatile components in the different regions of an artisanal ripened sheep cheese. *Journal of Dairy Research*. 79(1)(2012) 102-109.
- Guo Q., Wu W., Massart D.L., Boucon C., de Jong S. Feature selection in principal component analysis of analytical data. *Chemometric Intelligent Laboratory System*. 61(2002) 123-132.
- Gursoy O, Somervuo P, Alatossava T. Preliminary study of ion mobility based electronic nose MGD-1 for discrimination of hard cheeses. *Journal of Food Engineering*. 92(2009) 202-207.
- Hayaloglu A.A., Brechany E.Y. Influence of milk pasteurization and scalding temperature on the volatile compounds of Malatya, a farmhouse. Halloumi-type cheese. *Lait*. 87(2007) 39-57.
- Holzapfel W.H., Wood Brian J.B. *Lactic Acid Bacteria Biodiversity and Taxonomy*. Wiley Blackwell. 1st Edition. 2014 John Wiley and Sons Ltda.Oxford U.K 632 pp.
- Horne J., Carpino S., Tuminello L., Rapisarda T., Corallo L., Licitra G. Differences in volatiles, and chemical, microbial and sensory characteristics between artisanal and industrial Piacentinu Ennese cheeses. *International Dairy Journal*. 15(2005) 605-617.

- Hou J., Hannon J.A., McSweeney P.L.H., Beresford T.P., Guinee T.P. Effect of galactose metabolising and non-metabolising strains of *Streptococcus thermophilus* as a starter culture adjunct on the properties of Cheddar cheese made with low or high pH at whey drainage. *International Dairy Journal*. 65(2017) 44-55.
- Hrbek V., Vaclavik L., Elich O., Hajslova J. Authentication of milk and milk-based foods by direct analysis in real time ionization-high resolution mass spectrometry (DART-HRMS) technique: a critical assessment. *Food Control*. 36(2014) 138-145.
- Huppertz T., Fox P.F., Kelly A.L. Effects of high pressure treatment on the yield of cheese curd from bovine milk. *Innovative Food Science y Emerging Technologies*. 5(2004) 1-8.
- Hussain M.A., Rouch D.A., Britz M.L. Biochemistry of non-starter lactic acid bacteria isolate *Lactobacillus casei* GCRL163: Production of metabolites by stationary-phase cultures. *International Dairy Journal*. 19(2009) 12-21.
- Husson F., Krumov K.N., Cases E., Cayot P., Bisakowski B., Kermasha S., Belin J.M. Influence of medium composition and structure on the biosynthesis of the natural flavour 1-octen-3-ol by *Penicillium camemberti*. *Process Biochemistry*. 40(3-4)(2005) 1395-1400.
- Irlinger F. y Mounier, J. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*. 20(2009) 142-148.
- Iwaniak A., Minkiewicz P., Darewicz M., Hrynkiewicz M. Food protein-originating peptides as tastants - Physiological, technological, sensory, and bioinformatic approaches. *Food Research International*. 89(2016) 27-28
- Jelén H.H., Majcher M., Dziadas M. Microextraction techniques in the analysis of food flavor compounds: A review. *Analytica Chimica Acta*. 738(2012) 13-26.

- Jerónimo E. and Malcata F.X. Cheese: Composition and Health Effects, In Encyclopedia of Food and Health, Academic Press, Oxford. (2016) 741-747.
- Kai M., Haustein M., Molina F., Petri A., Scholz B., Piechulla B. Bacterial volátiles and their action potential. Applied Microbiology Biotechnology. 81(2009) 1001-1012.
- Kamal M., Karoui R. Analytical methods coupled with chemometric tools for determining the authenticity and detecting the adulteration of dairy products: A review. Trends in Food Science and Technology. 46(2015) 27-48.
- Kamalrul A.A., Syarul N.B., Normah M.N. Metabolic profiling of *Lactococcus lactis* under different culture conditions. Molecules. 17(2012) 8022-8036.
- Kelly W.J, Ward L.J., Leahy S.C. Chromosomal diversity in *Lactococcus lactis* and the origin of dairy starter cultures Genome Biology and Evolution. 2(2010) 729–744.
- Kindsted P.S. The basics of cheesemaking. In: Cheese and Microbes. Edited by Catherine W. Donnelly. 2014. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Kleerebezem M., Hugenholtz J. Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. Current Opinion of Biotechnology. 14(2003) 232-237.
- Kongo J.M y Malcata F.X. Cheese: Processing and Sensory Properties, In: Encyclopedia of Food and Health, Academic Press, Oxford (2016) 748-754.
- Lelles Nogueira M.C., Lubachevsky G., Rankin S.A. A study of the volatile composition of Minas cheese. LWT. 38(2005) 555-563.

- Lemfack M.C., Nickel J., Dunkel M., Preissner R., Piechulla B. mVOC: a database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Research*. 42(1)(2014) D744-748.
- Maddula S., Blank L.M., Schmid A., Baumbach J.I. Detection of volatile metabolites of *Escherichia coli* by multi capillary column coupled ion mobility spectrometry. *Analytical Bioanalytical Chemistry*. 394(2009) 791-800.
- MAGRAMA. (2015). Agricultural statistics, Spanish Ministry of Agriculture, Food and Environment. Food and Environment. <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias>. [en línea] consultado 15-06-01.
- MAGRAMA (2015) Informe del consumo de alimentación en España http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/informeconsumoalimentacion2015_tcm7-422694.pdf. [en línea] consultado 16-10-10.
- Marilley L. y Casey M.G. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International journal of Food Microbiology*. 90(2)(2004) 139-159.
- Martín-Platero A.M., Maqueda M., Valdivia E., Purswani J. y Martínez-Bueno M. Polyphasic study of microbial communities of two Spanish farmhouse goats' milk cheeses from Sierra de Aracena. *Food Microbiology*. 26(2009) 294-304.
- Martinez S., Franco I., Carballo, J. Spanish goat and sheep milk cheeses. *Small Ruminant Research*. 101(2011) 41-54.
- McCarthy C.M., Wilkinson M. G., Kelly P.M., Guinee T.P. Effect of salt and fat reduction on the composition, lactose metabolism, water activity and microbiology of Cheddar cheese. *Dairy Science y Technology*. 95(2015) 587-611.

- McSweeney P.L.H. y Sousa M.J. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening. *Lait*. 80(2000) 293-324.
- McSweeney P.L.H. y Fox P.F. Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol1: General Aspects*, 3rd edn (2004). Elsevier pp 361-372.
- Majcher M., Ławrowski P., Jeleń H. Comparison of original and adulterated Oscypek cheese based on volatile and sensory profiles. *Acta Scientiarum Polonorum Technology Alimentaria*. 9(2010) 265-275.
- Medina R.B., Oliszewski R., Abeijón M.C., Van Nieuwenhove C.P., González S.N. Sheep and goats dairy products from South America: Microbiota and its metabolic activity. *Small Ruminant Research*. 101(2011) 84-91.
- Mills S., O'Sullivan O., Hill C., Fitzgerald G., Ross R.P. The changing face of dairy starter culture research: from genomics to economics. *International Journal of Dairy Technology* 63(2010) 149-170.
- Moio L. y Addeo F. Grana Padano cheese aroma. *Journal of Dairy Research*. 65(1998) 317-333.
- Moio L., Piombino P., Addeo F. Odour-impact compounds of Gorgonzola cheese. *Journal of Dairy Research*. 67(2000) 273-285.
- Molimard P. y Spinnler H.E. Compounds involved in the flavour of surface mold-ripened cheeses: Origins and properties. *Journal of Dairy Science*. 79(1996) 169-184.
- Montel M.C., Buchinb S., Mallet A., Delbes-Pausa C., Dominique A., Vuitton D.A., Desmasures N., Berthier F. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology*. 177(2014) 136-154.

- Morales P., Fernández-García E., Gaya P., Núñez M. Formation of volatile compounds by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewes' milk cheese. *International Dairy Journal*. 13(2003) 201-209.
- Moreno-Rojas R., Sánchez-Segarra P.J., Cámara-Martos F., Amaro-López M.A. Multivariate analysis techniques as tools for categorization of Southern Spanish cheeses: nutritional composition and mineral content. *European Food Research and Technology*. 231(2010) 841-851.
- Mucchetti G. y Neviani E. 2006 *Microbiologia e tecnologia lattiero casearia. Qualità e sicurezza*. eds Tecniche Nuove, Milan
- Mullet A., Escriche I., Rosello C., Tarrazo J. Changes in the volatile fraction during ripening of Mahon cheese. *Food Chemistry*. 65(1999) 219-225.
- Munning D.J. y Nursten H.E. Flavour of milk and milk products in *Development in Dairy Chemistry*. Springer (1985) 217-285.
- Ndoye B., Andriamahery R.E., La Pointe G., Roy D. A review of the molecular approaches to investigate the diversity and activity of cheese microbiota. *Dairy Science y Technology*. 91(2011) 495-524.
- Neviani E., De Lindner J., Bernini V., Gatti M. Recovery and differentiation of long ripened cheese microflora through a new cheese-based cultural médium. *Food Microbiology*. 26(3)(2009) 240-245.
- Nomura M., Kobayashi M., Narita T., Kimoto-Nira H., Okamoto T. Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. *Journal of Applied Microbiology*. 101(2006) 396-405.
- Niimi J., Andrew I.E, Overington A.R., Heenan S.P., Silcock P., Bremer P.J., Delahunty C.M. Cheddar cheese taste can be reconstructed in solution using basic tastes. *International Dairy Journal*. 34(2014) 116–124.

- Niimi J., Andrew I.E., Overington A.R., Silcock P., Bremer P.J., Delahunty C.M.B. Sensory Interactions Between Cheese Aroma and taste sensory interactions. *Journal of sensory studies*. 30(2015) 247-257.
- Niimi J., Overington A.R., Silcock P., Bremer P.J., Delahunty C.M. A Cross-modal taste and aroma interactions: Cheese flavour perception and changes in flavour character in multicomponent mixtures. *Food Quality and Preference*. 48(2016) 70–80.
- Ocak E., Javidipour I., Tuncturk Y. Volatile compounds of Van Herby cheeses produced with raw and pasteurized milks from different species. *Journal of Food Science and Technology*. 52(2015) 4315–4323.
- Ottogalli G. A global comparative method for the classification of world cheeses (with special reference to microbiological criteria). Revised edition. *Annals of Microbiology*. 50(2000)
- Palencia G., Ibargoitia M.L., Fresno M., Sopelana P., Guillen M.D. Complexity and Uniqueness of the Aromatic Profile of Smoked and Unsmoked Herreno Cheese. *Molecules*. 19(6)(2014) 151-155.
- Pescuma M., Hébert E.M., Mozzi F., Font de Valde G. Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content. *Food Microbiology*. 25(3)(2008) 442–451.
- Picon A., Garde S., Avila M., Núñez, M. Microbiota dynamics and lactic acid bacteria biodiversity in raw goat milk cheeses. *International Dairy Journal*. 58(2016) 14-22.
- Quigley L., O'Sullivan O., Beresford T.P., Ross R.P., Fitzgerald G.F. Cotter P.D. High-throughput sequencing for detection of subpopulations of bacteria not previously associated with artisanal cheeses. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(2012) 5717–5723.

- Quigley L., O'Sullivan O., Stanton C., Beresford T.P., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Cotter P.D. The complex microbiota of raw milk. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Review*. 37(2013) 664-698.
- Randazzo C.L., De Luca S., Todaro A., Restuccia C., Lanza C.M., Spagna G., Caggia, C. Preliminary characterization of wild lactic acid bacteria and their abilities to produce flavor compounds in ripened model cheese system. *Journal of Applied Microbiology*. 103(2)(2007) 427-35.
- Rodríguez-Alonso P., Centeno J.A., Garabal J.I. Comparison of the volatile profiles of Arzúa-Ulloa and Tetilla cheese manufactured from raw and pasteurized milk. *Food Science and Technology*. 44(2009) 1722-1728.
- Sahingil D., Hayaloglu A.A., Simsek O., Ozer B. Changes in volatile composition, proteolysis and textural and sensory properties of white-brined cheese: effects of ripening temperature and adjunct culture. *Dairy Science y Technology*. 94(2014) 603-623.
- Salque M., Bogucki P., Pyzel J., Sobkowiak-Tabaka I., Grygiel R., Szmyt M., Evershed R.P. Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium bc in northern Europe. *Nature*. 493(7433)(2013) 522-525.
- Savitzky A. y Golay M.J.E. Smoothing + differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analytical Chemistry*. 36(1964) 1627-1639.
- Sgarbi E., Lazzi C., Tabanelli G., Gatti M., Neviani E., Gardini F. Nonstarter lactic acid bacteria volatiles produced using cheese components. *Journal of Dairy Science*. 96(7)(2013) 4223-4233.
- Smid E.J., Erkus O., Spus M., Wolkers-Rooijackers J.C.M., Alexeeva S., Kleerebezem M. Functional implications of the microbial

- community structure of undefined mesophilic starter cultures. *Microbial Cell Factories*. 13(1)(2014) S2.
- Smit G., Smit B.A., Engels W.J.M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*. 29(2005) 591-610.
- Steele J., Broadbent J., Kok J. Perspectives on the contribution of lactic acid bacteria to cheese flavor development. *Current Opinion in Biotechnology*. 24(2013) 135–141.
- Stellato G., de Filippis F., La Stora A., Ercolini D. Coexistence of lactic acid bacteria and potential spoilage microbiota in a dairy processing environment. *Applied Environmental Microbiology*. 81(2015) 7893–7904.
- Tedeschi T., Galaverna G., Dossena A., Sforza S. Cheeses chapter 19 in *Comprehensive Analytical Chemistry*. 60(2013) 479-509.
- Temmerman R., Huys G., Swings J. Identification of Lactic Acid Bacteria: culture dependent and culture independent methods. *Trends in Food Science & Technology*. 15(2004) 348-359.
- Tendero A. y Bernabéu R. Preference structure for cheese consumers: A Spanish case study. *British Food Journal*. 107(2)(2005) 60-73.
- Tistaer C., Dejaegher B., Chataignév G., Rivière C., Nguyen Hoae N., Chau Van M., Quetin-Leclercq J., Heyden Y.V. Potential antioxidant compounds in *Mallotus* species fingerprints. Part II: Fingerprint alignment, data analysis and peak identification. *Analytica Chimica Acta*. 721(2012) 35-43.
- Valenzuela J.F., Pinuer L.A., Garcia Cancino A., Bórquez Yáñez R. Metabolic Fluxes in Lactic Acid Bacteria. *Food Biotechnology*. 29(2015) 185-217.

- Vautz W., Zimmermann D., Hartmann M., Baumbach J.I., Nolte J., Jung, J. Ion mobility spectrometry for food quality and safety. *Food Additives and Contaminants*. 23(2006) 1064-1073.
- Walther B., Schmid A., Sieber R. Cheese in nutrition and health Conference 5th IDF Symposium on Cheese Ripening Dairy Science y Technology. 88(2008) 389-405.
- Wang Y., Li Y., Yang J., Ruan J., Sun C. Microbial volatile organic compounds and their application in microorganism identification in foodstuff. *Trends in Analytical Chemistry*. 78(2016) 1-16.
- Wolf I.V., Perotti M.C., Bernal S.M., Zalazar C.A. Study of the chemical composition, proteolysis, lipolysis and volatile compounds profile of commercial Reggianito Argentino cheese: Characterization of Reggianito Argentino cheese. *Food Research International*. 43(2010) 1204-1211.

Artículos publicados

Ion Mobility Spectrometry a Versatile Analytical Tool for Metabolomics Applications in Food Science

Lourdes Arce^{1,*}, Janneth Gallegos^{2,3}, Rocío Garrido-Delgado¹, Luis M. Medina², Stephanie Sielemann⁴ and Thomas Wortelmann⁴

¹Department of Analytical Chemistry, Annex C-3 Building, Campus of Rabanales. Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry, University of Córdoba, 14071 Córdoba, Spain; ²Department of Food Science and Technology, Annex Darwin Building, Campus of Rabanales, University of Córdoba, 14071 Córdoba, Spain; ³Facultad de Ciencias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba-Ecuador; ⁴G.A.S. Gesellschaft für analytische Sensorsysteme mbH, Otto-Hahn-Str.15, 44227 Dortmund, Germany



Lourdes Arce

Abstract: Linear Ion Mobility Spectrometry (IMS) is a *vanguard* analytical technique for the determination of volatile and semi-volatile compounds, thanks to the gas-phase separation of the different ions under a weak electric field at atmospheric pressure. The ions migrate through a drift tube with defined length. Monitoring of the ion current reveals the ion drift time. The drift time correlates to the specific ion-mobility, a function of the ion mass, charge and collision cross section with the ambient gas.

In this article, IMS, a technology initially developed for detecting traces of explosive and narcotic residues, as well as chemical warfare agents will be presented to meet the special requirements of metabolomics analysis. With the right sampling approach, IMS enables the detection of a wide number of compounds from different chemistry families, including alcohols, aldehydes, aromatics, amines, esters and ketones, among others, even from most complicated and problematic matrices. The selectivity of IMS can be improved by coupling to Gas Chromatography or Mass Spectrometry in order to improve separation or detection of analytes respectively. Other types of IMS such as, Travelling Wave IMS (TWIMS) and High Field Asymmetric Waveform IMS (FAIMS) have also enhanced the analytical possibilities of this technique.

Keywords: Ion mobility spectrometry, volatile, and semi-volatile compounds, foodomics.

INTRODUCTION

Metabolites are molecular compounds that participate or result as end products in many different metabolomic pathways of different matrices (see Fig. 1). The polarity of the metabolites varies from non-polar lipids to extremely polar inorganic ions. Between these chemical groups, ethers, aldehydes, esters, phosphates, alcohols and many others can be considered, as well as some important metabolic subgroups as glycome and lipidome [1]. In contrast to many other “omics” methodologies, analytical procedures for metabolomic analysis are currently in a considerable flux. Metabolomics could be applied to map or identify correlations between different “omics” approaches.

Nuclear magnetic resonance (NMR) has reported qualitative and quantitative information about the more concentrated metabolites. However, when metabolites are present in low concentrations, NMR does not seem enough sensitive [2, 3]. Also, to spectroscopically probe the metabolome, Fourier transform-infrared spectroscopy (FT-IR) has been carried out [4, 5]. This method can determinate minor phenotypic differences usually not detected by other techniques. FT-IR is

chemically non-selective, and better than used it to determinate specific metabolites, it should be suited for a rapid fingerprinting of a metabolome [6, 7]. Usually, sequential approaches of concentration, separation, and detection methods are adequate to lower concentrations. By Gas Chromatography (GC), we can separate metabolites with high vapor pressures or produce volatile compounds. Non-volatile compounds cannot be measured unless a time-consuming sample derivatization routine is used. [8, 9]. To separate these non-volatile metabolites, liquid chromatographic (LC) techniques can be used. Usually, in metabolomic, these techniques (GC and LC) are combined with Mass Spectrometry (MS), adequate for a proper separation and identification of all metabolites of a sample by direct infusion. Moreover, MS technique with high or ultra-high-resolution mass analyzers as TOF-MS (mass accuracy < 10 ppm) can be used by direct injection, providing a mass accuracy < 1 ppm. It can detect limits lower than attomole or femtomole levels [10]. In general, mass spectrometers represent a higher potential to identify the metabolites, but for some applications MS requires special gases such as helium and high vacuum, hence with relatively high operating costs and technical expenditure.

An attractive instrument for metabolomics purposes can also be Ion Mobility Spectrometry (IMS). This technique can be seen as complementary or orthogonal to an MS analysis. IMS can operate with air or nitrogen and at atmospheric

*Address correspondence to this author at the Department of Analytical Chemistry, Annex C-3 Building, Campus of Rabanales. Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry, University of Córdoba, 14071 Córdoba, Spain; Tel: 957218562; Fax: 957218616; E-mail: Lourdes.arce@uco.es

Volatile Metabolites of Goat Cheeses Determined by Ion Mobility Spectrometry. Potential Applications in Quality Control

Janneth Gallegos · Rocío Garrido-Delgado ·
Lourdes Arce · Luis M. Medina

Received: 28 July 2014 / Accepted: 11 November 2014 / Published online: 21 November 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract Headspace sampling coupled with multi-capillary column-ion mobility spectrometry (HS-MCC-IMS) has been used for extraction and identification of some volatile metabolites from different types of goat cheese samples. The only manual operation carried out in this method was the introduction of samples into vials; the following steps (headspace generation, injection of the volatiles compounds into MCC and IMS detection) were fully automated. The analysis by MCC-IMS allowed rapid and simple differentiation of goat cheeses made with raw and pasteurized milk. MCC-IMS produced multidimensional ion mobility spectra with different retention times and intensity information different for some individual metabolites. A total of six metabolites were identified in goat cheeses including 1 alcohol (1-hexanol), 1 ketone (2-nonanone), 2 aldehydes (octanal, *trans*-2-heptanal) and 2 esters (ethyl butanoate and propyl butanoate). Furthermore, the evolution of one targeted metabolite (ethyl butanoate) was monitored through different ripening times (60, 150, 180, 210, 240, 270 days). These preliminary results showed that this volatile compound increased during cheese ageing according to biochemical and microbial dynamic of the matrix, and therefore ethyl butanoate could be a potential marker of ripening time in these kinds of cheese samples.

Therefore, the method could be used for quality control purposes in goat cheese producers.

Keywords Volatile compounds · Goat cheeses · Raw milk cheeses · Pasteurized milk cheeses · IMS · Ethyl butanoate

Introduction

Cheese is the result of three primary biochemical processes: metabolism of lactose, lactate and citrate, lipolysis and proteolysis. These occur during ripening and are mainly responsible of its basic flavour, while many secondary catabolic reactions are related to the finer aspects of this trait, being responsible for the unique aroma profile of a particular variety (Cadwallader and Singh 2009; Marilley and Casey 2004; Muir et al. 1997). All these biochemical aspects together with different production processes result in a wide variety of cheese types, which are defined by more than 600 volatile metabolites (Maarse and Visscher 1989). According to the type of milk employed in the elaboration of the cheese, it could have different volatile metabolites. Raw milk cheeses generally have more intense aromas and contain a more diverse group of volatile compounds than cheeses made from pasteurized milk (Rodríguez-Alonso et al. 2009). In fact, the use of raw milk in cheese making enhances the production of volatile compounds, especially acids, alcohols and esters, probably because heat treatment inactivates enzymes and microorganisms present in milk which are related to the formation of aroma compounds (Hayaloglu and Brechany 2007). In many cases, the most abundant volatile compounds may have little, if any, odour significance in dairy products (Curioni and Bosset 2002; Delgado et al. 2011; Marilley and Casey 2004), and only a small fraction of these compounds are really responsible for cheese flavour. The

R. Garrido-Delgado · L. Arce
Department of Analytical Chemistry, University of Córdoba,
Campus de Rabanales, 14071 Córdoba, Spain

J. Gallegos · L. M. Medina (✉)
Food Science and Technology Department, University of Córdoba,
Campus de Rabanales, 14071 Córdoba, Spain
e-mail: luismedina@uco.es

J. Gallegos
Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador



Target identification of volatile metabolites to allow the differentiation of lactic acid bacteria by gas chromatography-ion mobility spectrometry

Janneth Gallegos^{a,b}, Cristina Arce^d, Rafael Jordano^a, Lourdes Arce^{c,*}, Luis M. Medina^a

^a Food Science and Technology Department, University of Córdoba, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba, Spain

^b Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Riobamba, Ecuador

^c Analytical Chemistry Department, University of Córdoba, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba, Spain

^d Animal Production Department, University of Córdoba, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 May 2016

Received in revised form 3 October 2016

Accepted 4 October 2016

Available online 5 October 2016

Keywords:

Lactic acid bacteria

Metabolites

Volatile organic compounds

IMS fingerprints

Lactobacillus

Lactococcus

ABSTRACT

The purpose of this work was to study the potential of gas chromatography-ion mobility spectrometry (GC-IMS) to differentiate lactic acid bacteria (LAB) through target identification and fingerprints of volatile metabolites. The LAB selected were used as reference strains for their influence in the flavour of cheese. The four strains of LAB can be distinguished by the fingerprints generated by the volatile organic compounds (VOCs) emitted. 2-butanone, 2-pentanone, 2-heptanone and 3-methyl-1-butanol were identified as relevant VOCs for *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. 2-Butanone and 3-methyl-1-butanol were identified in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus cremoris* subsp. *cremoris*. The IMS signals monitoring during a 24–30 h period showed the growth of the LAB *in vitro*. The results demonstrated that GC-IMS is a useful technology for bacteria recognition and also for screening the aromatic potential of new isolates of LAB.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Bacteria produce volatile organic compounds (VOCs) by metabolism, which are of great importance in the aroma profile of many foods. Microbial VOCs are currently used as markers for several purposes, especially for rotten food detection (Lemfack, Nickel, Dunkel, Preissner, & Piechulla, 2014). In fermented or matured foods, such as cheese, it is highly important to know and understand which flavour components determine the ultimate perception by the consumer. Aroma development in ripening cheese results from the metabolic activities of the dominant microbiota, largely composed of lactic acid bacteria (LAB). These types of bacteria are characterised by a wide biodiversity, offering good possibilities to extend the flavour and diversity of dairy products, i.e. cheeses. Considering their role in cheese production, LAB can be divided into two groups: starter LAB (SLAB) and nonstarter LAB (NSLAB) (Steele, Broadbent, & Kok, 2013). *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* are included in starters for their acidifying and proteolytic activities. In general, *Lactococcus* spp. are strong acidifiers (Hussain, Rouch, & Britz, 2009), while *Lactobacillus* spp. are the most widely used genus to

improve flavour and texture in various types of cheeses (Sahingil, Hayaloglu, Simsek, & Ozer, 2014).

During cheese ripening, enzymes released from starter and non-starter LAB hydrolyse caseins in peptides or amino acids (aa), resulting in the development of cheese flavour (Settanni & Moschetti, 2010), mainly from relevant VOCs. In this sense, for cheese production the use of LAB (selected as started culture) as well as NSLAB strains (to improve flavour and texture) is very important. According to Cavanagh, Fitzgerald, and McAuliffe (2015), *Lactococcus* spp. are the most important SLAB responsible for the production of lactic acid from lactose and for converting casein into flavour components. *L. lactis* subsp. *lactis* is able to metabolise arginine *via* arginine deiminase pathway influencing cheese flavour (Brandsma, van de Kraats, Abee, Zwietering, & Meijer, 2012). *Lactococcus* spp. also contribute to the development of improved texture (Mills, O'Sullivan, Hill, Fitzgerald, & Ross, 2010). Furthermore, *Lactococcus* has also been linked to the inhibition of rotten cheese and the pathogenic microorganism effect, due to the production of certain chemical agents (Coelho, Silva, Ribeiro, Dapkevicius, & Rosa, 2014). *L. lactis* subsp. *cremoris* has also been incorporated as starter because of its acidifying and proteolytic activities; the aa being involved in the production of metabolites associated with flavour and aromatic properties (Kamalrul, Syarul, & Norma, 2012). Moreover, *Lactobacillus* spp. are involved in the improvement of flavour and texture in various types of

* Corresponding author.

E-mail address: lourdes.arce@uco.es (L. Arce).

