

# ORIGEN DEL DIACETILO EN LAS MANTEQUILLAS INTERÉS DE SU DETERMINACIÓN

*C. Fernández y M. Rafecas*

*Departamento de Bromatología, Toxicología y Análisis Químico Aplicado.  
Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona*

## RESUM

Aquest treball consisteix en la revisió i origen del diacetil en les mantegues, així com en la descripció d'un mètode analític per C.G. amb addició de patró intern. En les

mateixes condicions cromatogràfiques s'hi identifiquen d'altres compostos de la fermentació, com són l'acetaldehid, l'acetona i l'etanol.

## RESUMEN

Este trabajo consiste en una revisión del origen e interés del diacetilo en las mantequillas, así como la descripción de un método de determinación de diacetilo por cromatografía de gases con adición de estándar in-

terno. En las mismas condiciones cromatográficas se identifican otros productos resultantes de la fermentación, como son acetaldehido, acetona y etanol.

## SUMMARY

This article revise the origin and interest of dyacethyl in butter-milk and describe an method for determination of dyacethyl by C.G. with addition of internal standard. In

the same chromatographical conditions we identified other products of fermentation such as acetaldehyde, acetone and ethanol.

## INTRODUCCIÓN

Los principales responsables del aroma de los productos lácteos, en especial mantequillas, quesos y yogures, son entre otros el acetaldehído, etanol, acetona, diacetilo y acetoina (Hild, J. 1978, Lindsay, R.C. et al., 1967, Mitchell, G.E. 1981, Biede, S.L. et al., 1979).

El conocimiento del aroma de estos productos tiene cada día mayor importancia en la apreciación de la calidad de estos alimentos, ya que este factor es responsable en definitiva de la aceptación del producto.

### Origen de los componentes del aroma

El aroma de la mantequilla, cuya calidad desde un cierto punto de vista está en función del mismo, se atribuye a un equilibrio entre los ácidos orgánicos y productos volátiles que se producen como metabolitos durante la fermentación.

La fermentación y el desarrollo de este aroma es debido a la acción que realizan dos tipos de bacterias (Vedamuthy et al., 1977, Speckman, R.A. et al., 1968). Las bacterias productoras de ácido son normalmente cepas de *Streptococcus cremoris* que fermenta la lactosa produciendo ácidos láctico, acético, propiónico, fórmico, pirúvico y trazas de acetaldehído, etanol y dióxido de carbono. Las bacterias productoras de aroma son principalmente cepas de *Leuconostoc citrovorum*. Estas bacterias fermentan el ácido cítrico y producen diacetilo (2,3-butanodiona) que es el componente característico del aroma de las mantequillas.

El crecimiento de las cepas de *Leuconostoc citrovorum* es estimulado por el acetaldehído según estudios de Lindsay et al. (1965), aunque este compuesto sirve de sustrato, asimismo, para cepas de *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus*

*diacetylactis* y *Leuconostoc citrovorum* (Badigns, H.T. et al., 1962, Keenan, T.V., 1966 a y 1966 b). Sin embargo, desde el reconocimiento de que el diacetilo es el principal componente del aroma de la mantequilla según Van Niel et al., (1929), la mayor parte de los estudios realizados se han dirigido a investigar el origen y evolución de este compuesto.

Parece ser que hay cepas de *S. diacetylactis*, *L. citrovorum* y algunas de *L. dextranicum* que producen cantidades significativas de diacetilo (Galesloot, Th. E., 1962; Marth, E.H., 1963; Seitz, E.W., et. al., 1963).

La ruta del diacetilo ha sido completamente investigada; parte de la utilización del citrato por cepas *L. citrovorum*, según Galesloot (1962), el  $\alpha$ -acetolactato que deriva del catabolismo del citrato, es descarboxilado para dar acetoina. El *S. diacetylactis* y *L. citrovorum* desdoblan el citrato en acetato y oxalacetato y descarboxilan el oxalacetato a piruvato.

Sin embargo, un estudio de Speckman y Collins (1968), demostró que ni el  $\alpha$ -acetolactato, ni la acetoina son los precursores del diacetilo. Estos trabajos se basan en que la acetoina se produce estequiométricamente a partir del piruvato y  $\alpha$ -acetolactato y que, concluyendo, el diacetilo se forma por el acetaldehído-TPP y el acetil CoA (Figura 1).

### Antecedentes bibliográficos

En la composición del aroma de las mantequillas según Siek, T.J. et al., (1970) hay que destacar que a pesar de no encontrar concentraciones elevadas de diacetilo, este constituye sin duda el mayor responsable del aroma característico de este producto. (Tabla I).

Sin embargo, Lindsay, R.C. et al., (1966) realizan unas pruebas de degustación de productos lácteos fermentados de alta calidad y productos sintéticos a los que añade los compuestos más característicos del aroma (acetaldehído, diacetilo...). Una vez ordenados los diferentes productos según la proporción de diacetilo que contienen (desde 0,05 ppm hasta 3,42 ppm) se observa que no existe una correlación clara en las puntuaciones obtenidas. Otros estudios anteriores habían indicado que concentraciones más altas de 2,5 ppm de diacetilo, ocasionarían aromas no deseados al producto. Luego, Lindsay (1966), llega a la conclusión de que sustancias como el sulfito de dimetilo pueden contrarrestar el exceso de otros aromatizantes.

No es pues sólo el diacetilo el que juega un papel importante en el aroma, sino un amplio conjunto de productos resultantes de todo el proceso de fermentación.

Refiriéndose a los ésteres volátiles, Lindsay, R.C. et al. (1966) da un valor total de 1 ppm expresados en acatato de etilo, siendo el umbral aromático de 10 ppm. Sin embargo, no se puede desechar la posibilidad de que estos productos aunque en muy bajas concentraciones contribuyan junto con otros compuestos al aroma total de las mantequillas.

Es también conocida la importancia del acetaldehído, así como la relación diacetilo/acetaldehído. Marsili, R.T. (1981) en un estudio sobre la evolución de los principales

compuestos volátiles que se desarrollan a lo largo de la fermentación de los productos lácteos obtiene datos muy significativos (Tabla II). En el punto cero de la fermentación se observan concentraciones elevadas de acetaldehído. En un período intermedio se obtiene diacetilo disminuyendo los valores de acetaldehído. En el punto final, establecido a las 18 h., la concentración de este último es casi despreciable respecto al diacetilo, pudiendo justificarse este fenómeno por la condensación de dos moléculas de acetaldehído para obtener el diacetilo (Figura 2).

El diacetilo continúa su vía metabólica dando lugar a acetoina y 2,3-butanodiol, siendo responsable de este proceso la dime-til reductasa, presente en las cepas de *L. citrovorum* y *S. diacetylactis*.

El conjunto de todos estos productos, obtenidos en una proporción idónea, en un estado determinado en el proceso de fermentación, son los que nos indicarán el punto final de la misma.

La analítica centra pues su interés hacia estos productos finales, acetoina, acetaldehído, diacetilo... Para ello se han propuesto diversos métodos como de destilación, cromatografía en capa fina (C.C.F.), espectrofotometría, etc. Nosotros en un primer paso en el estudio del aroma, centramos nuestra atención en la cuantificación del diacetilo sin olvidar los demás componentes volátiles.

## MATERIAL Y MÉTODO

El método que se propone, tiene como fundamento la volatilización del diacetilo (2,3-butanodiona) de la muestra, contenida en un vial cerrado herméticamente y la posterior inyección del llamado «espacio de cabeza» (fase gaseosa del vial) en un cromató-

grafo de gases debidamente acondicionado.

El método permite además, en las condiciones de la experiencia, el análisis de otros componentes volátiles cuyo punto de ebullición no es elevado, tales como etanol, acetona, acetaldehído, etc. Sin embargo, para

la acetoina, cuyo punto de ebullición es de 140 °C, sería necesario la reoxidación previa por medio de  $\text{FeCl}_3$  para obtener el diacetilo (Figura 3).

### Material

- Vial de 12,5 ml. de capacidad, provistos de tapón de goma de butilo y cápsula de aluminio.
- Material volumétrico habitual.
- Baño termostático (que aprecie  $\pm 0,5^\circ\text{C}$ ), ajustado a 75 °C.
- Cromatógrafo de gases, equipado con detector de ionización de llama y acoplado a un sistema integrador. Columna cromatográfica de vidrio de 2 mt. de longitud, con relleno de Carbowax 20 M al 20%, sobre Chromosorb GAW. DMCS de 80-100 mallas.
- Jeringa tipo Hamilton (Gastight) mod. 1001 LTN de 1 ml.

### Reactivos

- Diacetilo (Merck) p.a.
- Acetaldehído, etanol, acetona (Merck).
- Agua destilada.

### Método analítico

Colocar los viales, que más adelante se detallan y a intervalos de 15 minutos, en un baño termostático a 75 °C. Pasados 30 minutos tomar, con la jeringa Hamilton, 1 ml. del espacio de cabeza del vial e inyectar rápidamente en el cromatógrafo en las siguientes condiciones:

- temperatura del horno: ..... 70 °C.
- temperatura del detector e inyector: ..... 120 °C.

- flujo gas portador (Nitrógeno): ..... 20 ml/min.
- atenuación: .....  $5 \times 1$

La tiempos de retención obtenidos para cada uno de los patrones (en segundos), son los siguientes:

-acetaldehído.....	83
-acetona.....	147
-etanol.....	288
-diacetilo.....	386

### Preparación de la muestra

La determinación cuantitativa se realiza por el procedimiento de adición de estándar interno de concentración conocida.

#### a) Preparación de la solución concentrada estándar

Debido a la volatilidad del diacetilo y los otros productos acetona, etanol, acetaldehído, la preparación se efectuará de la siguiente forma: colocar en un vial unos 5 ml de agua, tapar y tararlo. Añadir, pesando por diferencia, unos 50 mg. de acetaldehído. Pasar el contenido a un matraz aforado de 1.000 ml, lavando el vial y el tapón 2-3 veces con agua destilada. Efectuar la misma operación con otros tres viales, a los que se añadirán respectivamente 50 mg. de acetona, 250 mg. de etanol y 250 mg. de diacetilo. Pasar el contenido de estos viales al mismo matraz de litro utilizado anteriormente, y enrasar. Esta solución concentrada así preparada contiene:

- 50 ppm de acetaldehído;
- 50 ppm de acetona;
- 250 ppm de etanol;
- 250 ppm de diacetilo.

b) Preparación de la solución diluida estándar.

Tomar 10 ml de la solución concentrada y diluir a 100 ml con agua destilada en un matraz aforado. Esta solución contiene:

- 5 ppm de acetaldehído;
- 5 ppm de acetona;
- 25 ppm de etanol;
- 25 ppm de diacetilo.

c) Preparación de la muestra y recta de regresión.

Colocar cinco viales, rotulados 1, 2, 3, 4 y problema —1 g. de mantequilla— y las cantidades de solución estándar diluidas, que se indican en la Tabla III, a continuación se completa el volumen hasta 1 ml. con agua destilada.

Los viales así preparados contienen las cantidades indicadas en la Tabla IV de las sustancias estándar añadidas.

d) Cálculos.

Hacer un gráfico colocando en abscisas las cantidades adicionadas al vial y en or-

denadas la respuesta del integrador, (deben construirse tantas gráficas como estándar se hayan adicionado). Calcular la ecuación de la recta que define los distintos puntos de cada gráfico y hallar matemáticamente el punto de intersección de la recta con el eje de abscisas ( $y = 0$ ). La distancia de este punto y el origen de ordenadas, nos da la cantidad de sustancia problema en 1 g. de muestra.

Para el cálculo del contenido en diacetilo de una muestra se han obtenido los siguientes resultados:

	<b>Cantidad de diacetilo añadida</b>	<b>Área integrador</b>
P + 1	6.25	4725
P + 2	12.50	6200
P + 3	18.75	10200
P + 4	25.00	12600

Ecuación de la recta  $y = 442 \times 1525$  ( $r = 0.9863$ )  
 Para  $y = 0$ , nos da el contenido de diacetilo en 1 g. de muestra, por tanto  $x = 1525/442$ . De donde  $x = 3.4$  ppm., cuya resolución gráfica se observa en la Figura 4.

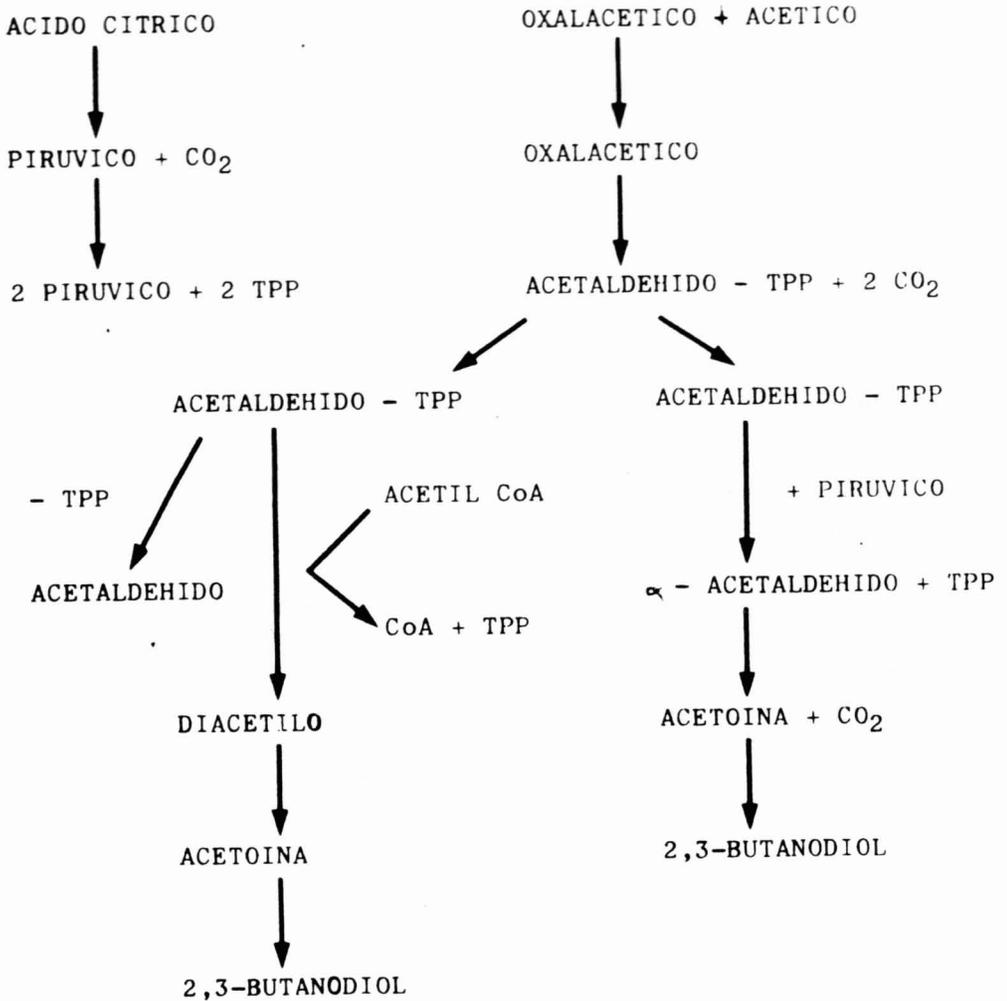


Figura 1.— Vías metabólicas a considerar en la formación del diacetilo.

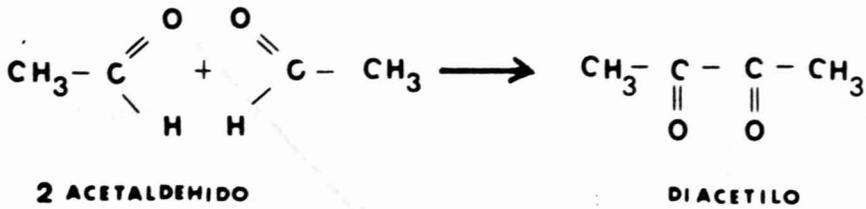


Figura 2.— Condensación de dos moléculas de acetaldehido para obtener el diacetilo.

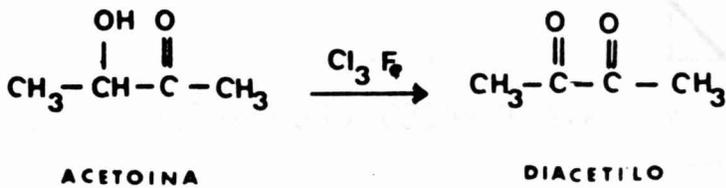


Figura 3.— Oxidación de la acetoina para obtener el diacetilo.

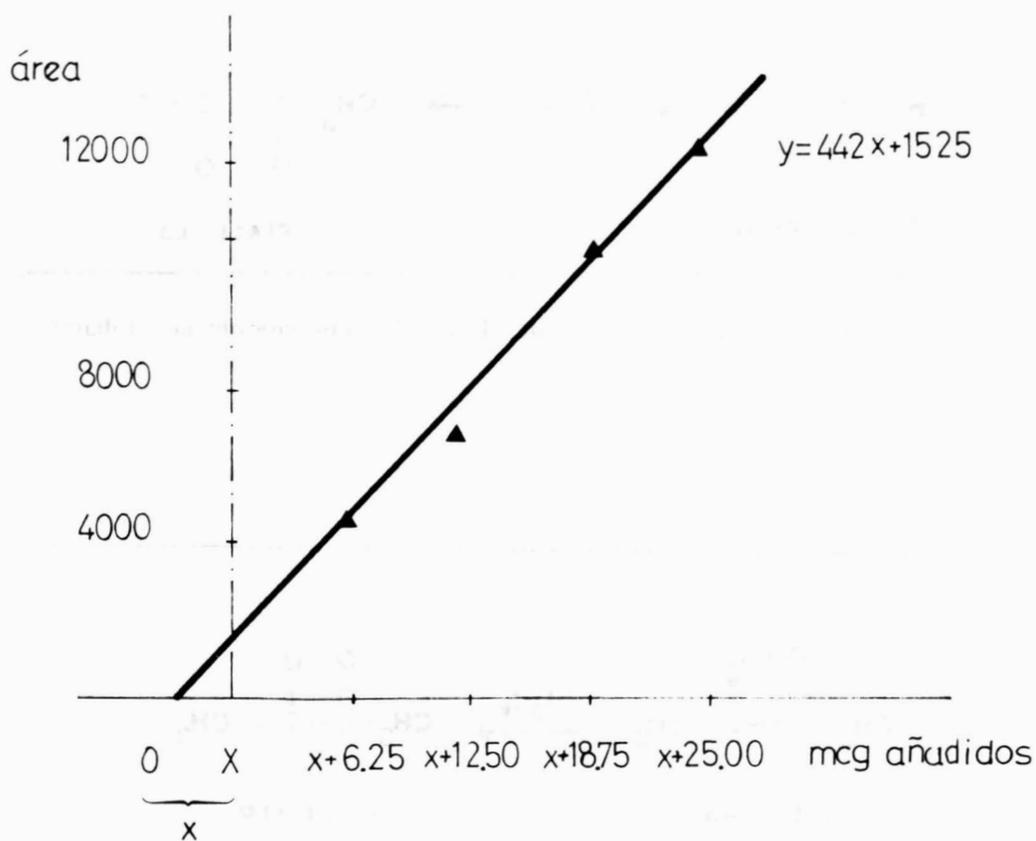


Figura 4.— Gráfico correspondiente al ejemplo citado en el texto.

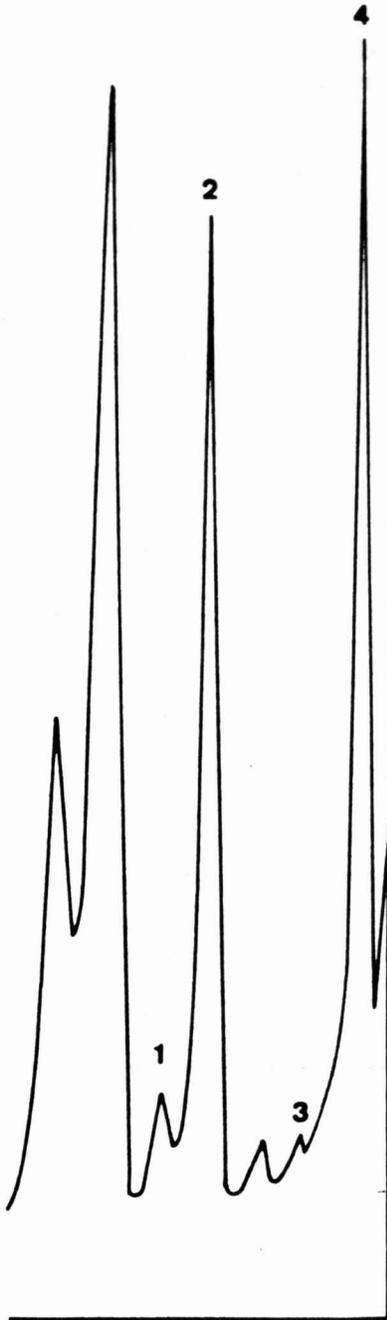


Gráfico 1.— Cromatograma obtenido con una muestra de mantequilla problema. 1) diacetilo, 2) etanol, 3) acetona, 4) acetaldehido.

**TABLA I**  
**Concentración de los compuestos volátiles de la mantequilla por C.G.,**  
**según Siek y Lindsay (1970)**

Compuesto	Concentración en p.p.m.	
	Hallados	Valores bibliográficos
Acetona	0.13	>0.01
Butanona	0.16	<0.01
2-Pentanona	0.14	0.01, >0.02
2-Hexanona	0.004	0.02
2-Heptanona	0.35	0.01, >3.4
2-Octanona	0.013	≈ 0.01
2-Nonanona	0.21	> 0.01
2-Decanona	0.08	
2-Undecanona	0.24	3.6, 0.13
2-Tridecanona	0.35	0.88
Etanal	0.45	0.7
n-Propanal	0.07	0.07, 2.8, 0.16
n-Butanal	0.06	0.04
n-Pentanal	0.04	0.71, 0.005
n-Hexanal	0.20	0.14, 0.24
n-Heptanal	0.03	0.16, 1.3
n-Decanal	0.01	0.10
n-Undecanal	0.08	
Diacetilo	0.10	0.04, <0.01
α-Octalactona	0.40	2.6, >0.01
α-Decalactona	2.0	15, 9, <0.01
α-Undecalactona	0.10	0.6, 0.7
α-Dodecalactona	5.0	28.5, 35
α-Tetradecalactona	4.0	21.5, 34
α-Undecalactona	0.05	0.5, 0.2
α-Decalactona	0.1	1.2, 0.6
α-Dodecalactona	0.3	1.6, 1.8

.../...

Compuesto	Hallado	Compuesto	Hallado
Formiato de etilo	0.99	Benceno	0.0005
Acetato de etilo	2.0	Tolueno	0.011
Butirato de etilo	0.01	Etilbenceno	0.007
Hexanoato de etilo	0.02	p-Xileno	0.002
Octanoato de etilo	0.03	m-Xileno	0.004
Acetato de metilo	0.01	o-Xileno	0.003
Etanol	0.53	metiletilbenceno	0.005
Cloroformo	0.02	p-Cimeno	0.0006
n-Octano	0.006	Benzoaldehido	0.002
n-Nonanona	0.006	p-Diclorobenceno	0.005
n-Decano	0.006	o-Diclorobenceno	0.05

TABLA II

Compuestos orgánicos obtenidos en la fermentación a 23 °C, según Marsili, F.T. (1981)

Compuesto	Concentraciones ( $\mu$ g/g)		
	0 h. a 23 °C.	18 h. a 23 °C.	168 h. a 3 °C.
Orótico	79.1	42.2	34.7
Cítrico	730.0	176.0	20.0
Pirúvico	1.3	33.0	<0.2
Láctico	45.0	7410.0	5820.0
Úrico	20.4	18.8	19.7
Acético	5	610.0	730.0
Propiónico	<10	90.0	40.0
Acetaldehido	0.02	0.77	1.46
Acetona	2.10	1.98	2.14
Etanol	1.00	24.15	37.30
Diacetilo	<0.05	11.50	1.90

TABLA III  
Preparación de los viales problema y estándar

	Problema	P + 1	P + 2	P + 3	P + 4
g. mantequilla	1 g.	1 g.	1 g.	1 g.	1 g.
ml. de agua	1 ml.	0,75 ml.	0,50 ml.	0,25 ml.	0 ml.
ml. sol. diluida	0 ml.	0,25 ml.	0,50 ml.	0,75 ml.	1 ml.

TABLA IV  
Concentración de los distintos estándar añadidos en los viales

	P + 1	P + 2	P + 3	P + 4
mcg. acetaldehido	1,25	2,5	3,75	5
mcg. acetona	1,25	2,5	3,75	5
mcg. etanol	6,25	12,5	18,75	25
mcg. diacetilo	6,25	12,5	18,75	25

### BIBLIOGRAFIA

- BADINGS, H.T. and GALESLOOT, Th. E. (1962).— *Studies on the flavor of different types of butter starters with reference to the defect «yougourt flavor» in butter.* Proc. 16th. Inter. Dairy Congress. vol. B. p. 199.
- BIEDE, S.L. and HAMMOND, E.G. (1979).— *Swiss Cheese Flavor: I Chemical analysis.* J. Dairy Sci, 62. 227-237.
- GALESLOOT, Th. E. (1962).— *The bacteriology and biochemistry of starters and ripened cream.* Proc. 16th. Inter. Dairy Congress. vol. Dp. 143.
- HILD, J. (1978).— *Determination of some aroma compounds in dairy products by headspace analysis en Applied Headspace Gas Chromatography.* Ed. B. Kolb. p. 89-94. Bristol. Great-Britain.
- KEENAN, T.W.; LINDSAY, R.C.; MORGAN, M.E.; DAY, E.A. (1966).— *Acetaldehyde production by single-strain lactic streptococci.* J. Dairy Sci 49 (1) 10-14.
- KEENAN, T.W.; LINDSAY, R.C.; DAY, E.A. (1966).— *Acetaldehyde utilization by Leuconostoc species.* Appl. Microbiol 14 (5) 802-806.
- LINDSAY, R.C.; DAY, E.A.; SANDINE, W.E. (1965).— *Rapid quantitative method for determination of acetaldehyde in lactic starter cultures.* J. Dairy Sci 48 (12) 1566-1574.
- MARSILI, R.T. (1981).— *Monitoring Bacterial metabolites in cultured buttermilk by High Performance Liquid Chromatography and headspace Gas Chromatography.* J. Chrom. Sci 19. 451-456.

- MARTH, E.H. (1962).— *Certain aspects of starter-culture metabolism*. J. Dairy Sci 45. 1271-1281.
- MITCHELL, G.E. (1981).— *The production of selected compounds in a Swiss-Tye cheese and their contribution to cheese flavor*. The Austr. J. Dairy Techn. 36 (1) 21-25.
- SEITZ, E.W.; SANDINE, N.E.; ELLIKER, P.R.; DAY, E.A. (1963).— *Distribution of diacetyl reductasa among bacteria*. J. Dairy Sci 46. 186-189.
- SIEK, T.J.; LINDSAY, R.C. (1970).— *Semiquantitative analysis of fresh sweet-cream butter volatiles*. J. Dairy Sci 53. 700-703.
- SPECKMAN, R.A.; COLLINS, E.B. (1968).— *Diacetyl biosynthesis in Streptococcus diacetylactis and Leuconostoc citrovorum*. J. Bacteriol 95. 174. en J. Dairy Sci 51. 1561-1567.
- VASAVADA, P.C.; WHITE, C.H. (1979).— *Quality of Commercial Buttermilk*. J. Dairy Sci 62. 802-806.
- VEDAMUTHU, E.R. (1978).— *Microbiologically induced desirable flavors in the fermented food of the west*. Dev. Ind. Microbiol. 20. 187-202.