

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN  
ANIMAL Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

TESIS DOCTORAL



FACULTAD DE VETERINARIA

EFEECTO DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA  
GRASA Y DE FACTORES POST-PROCESADO  
EN LAS PROPIEDADES SENSORIALES Y  
FÍSICO-QUÍMICAS DEL JAMÓN IBÉRICO LONCHEADO.

*Verónica Fuentes Del Castillo*

*Cáceres, 2013*





UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

FACULTAD DE VETERINARIA  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL Y CIENCIA DE  
LOS ALIMENTOS

ÁREA DE TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

---

**Efecto de las características de la grasa y de factores post-  
procesado en las propiedades sensoriales y físico-químicas del  
jamón Ibérico loncheado.**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por la Licenciada Verónica Fuentes Del  
Castillo para optar al grado de Doctor de Veterinaria.

Cáceres, 2013

**Edita: Universidad de Extremadura**  
**Servicio de Publicaciones**  
Caldereros 2. Planta 3ª  
Cáceres 10071  
Correo e.: [publicac@unex.es](mailto:publicac@unex.es)  
<http://www.unex.es/publicaciones>



UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

FACULTAD DE VETERINARIA  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL Y CIENCIA DE  
LOS ALIMENTOS

ÁREA DE TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

La Dra. Sonia Ventanas Canillas, Profesora Titular del Área de Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura,

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral presentada por la Lda. Verónica Fuentes Del Castillo “Efecto de las características de la grasa y de factores post-procesado en las propiedades sensoriales y físico-químicas del jamón Ibérico loncheado”, ha sido realizada bajo mi dirección en el Área de Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria. Hallándose concluida y reuniendo a mi entender las condiciones necesarias, autorizo su presentación para su defensa ante el tribunal pertinente.

Cáceres, a 3 de Junio de 2013

Fdo. Sonia Ventanas Canillas



*A mis padres y a mi hermana*





## AGRADECIMIENTOS

Una vez finalizada esta Tesis doctoral puedo contemplar con satisfacción el trabajo realizado y el esfuerzo que ésta ha supuesto. Solo aquellos que previamente han tenido la oportunidad de afrontar el reto de una tesis doctoral saben que aunque ésta pueda parecer un trabajo individual, nada está más lejos de la realidad. Los apoyos recibidos para el buen fin de esta etapa han sido muchos, por eso quisiera dedicar estas primeras líneas del manuscrito a expresar mi más sincero agradecimiento a quienes a lo largo de todos estos años me han prestado su apoyo tanto personal como profesional, y han contribuido de una forma u otra al desarrollo de la presente Tesis Doctoral.

Al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte por la concesión de una beca de Formación de Profesional Investigador (FPI), que me ha permitido realizar este trabajo de investigación. Esta Tesis Doctoral se ha realizado dentro del proyecto de investigación titulado: "Estudio sensorial e instrumental de la liberación de compuestos olor-activos en jamón ibérico loncheado: efecto del contenido y características de la grasa" (Project AGL2007-65923-C02-01), concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad.

Del mismo modo, al contrato de personal asociado al proyecto: "Optimización y control de la calidad tecnológica, nutricional y organoléptica de jamones serranos e ibéricos (RTA 2010-00029-004-03)", concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad.

A la Universidad de Extremadura, y en especial, al Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos por permitirme desarrollar este trabajo en las dependencias del Área de Tecnología de los Alimentos.

A la Dra. Sonia Ventanas Canillas, tutora y directora de esta tesis, por las oportunidades que me ha brindado, su confianza, el interés mostrado, por todo lo que he aprendido de ella, y sobre todo, por todo el tiempo dedicado.

Al Dr. Jesús Ventanas Barroso, por su amabilidad, por sus valiosos conocimientos en el sector del jamón y por dadme la oportunidad de iniciarme en este ámbito, junto a Sonia Ventanas, a quienes siempre he encontrado dispuestos a ayudar. Esta tesis ha sido posible gracias a vuestro esfuerzo.

Al Dr. David Morcuende y al Dr. Mario Estévez, por su eficiencia, sus acertadas recomendaciones, su disponibilidad para atender mis dudas en cualquier momento, y principalmente, por compartir sus conocimientos conmigo; gracias por la ayuda que habéis prestado. A la Dra. Ana Carrapiso por su ayuda y sabiduría, muchas gracias.

Así como al resto de participantes, a Javier Hidalgo por la proporción de los jamones, a la compañía Mobepack por su loncheado y envasado a vacío, al CENTA-IRTA por el tratamiento con altas presiones hidrostáticas, y finalmente, al panel de catadores por su colaboración desinteresada, muchas gracias por dejar un momento vuestra tarea para hacer un hueco a esas evaluaciones sensoriales. Me gustaría señalar que parte de esta tesis ha sido posible gracias a vuestra participación.

A todos mis compañeros de las Unidades de Tecnología e Higiene de los Alimentos; profesores, técnicos y becarios, con quienes he compartido todos o algunos de estos años de trabajo. Por el cordial ambiente de trabajo que me han brindado, por su ayuda, y por los buenos momentos que he compartido con algunos de ellos, dentro y fuera de las horas de trabajo. Especialmente a Ana Antúnez y Raquel Reina por vuestra amistad desde el primero hasta el último día.

A todos mis amigos, a todos aquellos que han compartido una gran parte de mi vida, y han vivido mi evolución desde la infancia. Y a aquellas amigas que se cruzaron en mi camino gracias al destino, que hizo que una chica de un pueblecito de Toledo parase en estas tierras del buen jamón para estudiar Veterinaria, desde donde hoy está escribiendo estas palabras. A mi compañera de piso por compartir conmigo estos últimos meses. A todos muchas gracias

por vuestros consejos, palabras, y sobre todo, por los buenos momentos vividos y los que me quedan por compartir junto a vosotros.

A todos gracias por el grato recuerdo que guardo y guardaré de mi permanencia por tierras extremeñas.

Y por supuesto a mi familia, porque ellos son lo primero en mi vida. A mi hermana, por todos tus consejos, por nuestra complicidad y la admiración de hermana pequeña que siento hacia ti. A mis padres, a quienes admiro por la humildad, la perseverancia, y la generosidad que les caracteriza. Gracias por haber hecho de mí la persona que soy, con unos valores sólidos y firmes, por haber hecho con vuestros consejos, cariño, esfuerzo y otras tantas cosas más, que yo pudiera llegar a este momento.

A todos vosotros, *GRACIAS*.



ÍNDICE



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

LISTA DE ABREVIATURAS.....	19
RESUMEN.....	27

---

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>33</b>
------------------------------	-----------

**1.1. La carne y los productos cárnicos derivados del cerdo Ibérico.**

**1.2. Situación actual del sector cárnico de los productos derivados del cerdo Ibérico.**

**Bibliografía.**

---

<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>45</b>
--	-----------

**2.1 La calidad del jamón Ibérico.**

*2.1.1 Factores determinantes de la calidad del jamón ibérico*

*2.1.1.1 Características de la grasa intramuscular (GIM).*

*2.1.1.1.1 Influencia del contenido en grasa sobre el aroma y el flavor de los productos curados.*

*2.1.1.2 Influencia de los procesos oxidativos en los productos cárnicos curados.*

*2.1.1.3 Factores post-procesado.*

*2.1.1.3.1 Tecnología del deshuesado y loncheado del jamón.*

*2.1.1.3.2 Efecto de las altas presiones hidrostáticas (APH).*

*2.1.1.3.3 Efecto de la temperatura de consumo.*

**2.2 Evaluación sensorial en productos cárnicos curados derivados del cerdo Ibérico.**

*2.2.1 Tipos de pruebas en el análisis sensorial.*

*2.2.2 Técnicas dinámicas de análisis sensorial: Tiempo-Intensidad.*

*2.2.2.1 Entrenamiento del panel para la técnica TI.*

**Bibliografía.**

---

**3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....97**

**Bibliografía.**

---

**4. DISEÑO EXPERIMENTAL .....107**

**Bibliografía.**

---

**5. MATERIAL Y MÉTODOS ..... 119**

**5.1 Material: ..... 121**

*5.1.1 Reactivos.*

*5.1.2 Equipos.*

*5.1.3 Compuestos volátiles.*

*5.1.4 Carne de cerdo y tocino dorsal.*

*5.1.5 Manteca y aceite de girasol.*

*5.1.6 Jamones Ibéricos curados.*

**5.2. Métodos: .....126**

*5.2.1 Elaboración de los sistemas modelo tipo salchichas.*

*5.2.2 Deshuesado, loncheado y envasado a vacío de los jamones Ibéricos.*

*5.2.3 Tratamiento con altas presiones hidrostáticas (APH).*

*5.2.4 Contenido en humedad.*

*5.2.5 Contenido en proteínas.*

*5.2.6 Contenido en grasa total.*

*5.2.7 Contenido en cloruros.*

*5.2.8 Contenido en pigmentos totales.*

*5.2.9. Análisis instrumental del color.*

*5.2.10 Análisis del perfil de textura (TPA).*

*5.2.11 Análisis de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).*

*5.2.12 Determinación del total de carbonilos de proteína por la técnica del 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH).*

*5.2.13 Síntesis y derivatización de los semialdehídos  $\alpha$ -aminoadípico (AAS) y  $\gamma$ -glutámico (GGS).*

*5.2.13.1 Cuantificación de los semialdehídos AAS y GGS por LC-ESI-MS.*



- 5.2.13.2 *Cuantificación de los semialdehídos AAS y GGS por HPLC-FLD.*
- 5.2.14 *Análisis del perfil de ácidos grasos.*
- 5.2.15 *Análisis de compuestos volátiles por técnicas instrumentales.*
- 5.2.16 *Evaluación sensorial.*
  - 5.2.16.1 *Catadores.*
  - 5.2.16.2 *Entrenamiento del panel para el ACD.*
  - 5.2.16.3 *Entrenamiento del panel para la técnica TI*
  - 5.2.16.4 *Diseño experimental de las sesiones de evaluación sensorial.*
  - 5.2.16.5 *Preparación de las muestras para las evaluaciones sensoriales.*
- 5.2.17 *Análisis estadístico.*

## **Bibliografía.**

---

<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	173
<b>6.1 Listado de manuscritos.</b>	
<b>6.2 Capítulo I.</b> <i>Static and dynamic sensory methods to evaluate the flavour and texture in dry- cured meat model products varying the fat content.</i>	
<b>6.3 Capítulo II.</b> <i>Impact of lipid composition on dynamic sensory perception of flavour and texture in experimental fermented sausages.</i>	
<b>6.4 Capítulo III.</b> <i>Effect of lipid content and composition on volatile compounds release from experimental fermented sausages.</i>	
<b>6.5 Capítulo IV.</b> <i>Impact of lipid content and composition on lipid oxidation and protein carbonylation in experimental fermented sausages.</i>	
<b>6.6 Capítulo V.</b> <i>Lipid and protein oxidation and sensory properties of vacuum-packaged dry-cured ham subjected to high hydrostatic pressure.</i>	
<b>6.7 Capítulo VI.</b> <i>Impact of high pressure treatment and intramuscular fat content on colour changes and protein and lipid oxidation in sliced and vacuum-packed Iberian dry-cured ham.</i>	
<b>6.8 Capítulo VII.</b> <i>Application of time-intensity method to assess the sensory properties of Iberian dry-cured ham: effect of fat content and high pressure treatment.</i>	
<b>6.9 Capítulo VIII.</b> <i>Effect of intramuscular fat content and serving temperature on temporal sensory perception of sliced and vacuum packaged dry-cured ham.</i>	

---

---

<b>7. DISCUSIÓN CONJUNTA</b> .....	403
<b>7.1 Influencia del contenido en grasa.</b> .....	405
7.1.1 <i>Influencia del contenido en grasa sobre la estabilidad oxidativa.</i>	
7.1.2 <i>Influencia del contenido en grasa sobre la dinámica de liberación/retención de compuestos volátiles.</i>	
7.1.3 <i>Influencia del contenido en grasa sobre la calidad sensorial.</i>	
<b>7.2 Influencia de las características de la grasa.</b> .....	418
7.2.1 <i>Influencia de las características de la grasa en el perfil de ácidos grasos de los sistemas modelo elaborados.</i>	
7.2.2 <i>Influencia de las características de la grasa sobre la estabilidad oxidativa.</i>	
7.2.3 <i>Influencia de las características de la grasa sobre la dinámica liberación/retención de volátiles.</i>	
7.2.4 <i>Influencia de las características de la grasa sobre la textura instrumental.</i>	
7.2.5 <i>Influencia de las características de la grasa sobre la calidad sensorial.</i>	
<b>7.3 Factores post-procesado.</b> .....	427
7.3.1 <i>Influencia de la forma de presentación del jamón Ibérico.</i>	
7.3.2 <i>Tratamiento con altas presiones hidrostáticas.</i>	
7.3.2.1 <i>Influencia de las APH sobre la estabilidad oxidativa.</i>	
7.3.2.2 <i>Influencia de las APH sobre parámetros relacionados con el color instrumental.</i>	
7.3.2.3 <i>Influencia de las APH sobre parámetros relacionados con la calidad sensorial.</i>	
7.3.3 <i>Influencia del tiempo de almacenamiento.</i>	
7.3.4 <i>Influencia de la temperatura de consumo.</i>	

## **Bibliografía.**

---

<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	451
------------------------------	-----

## **Bibliografía.**

---

ABREVIATURAS



## LISTA DE ABREVIATURAS

### *Abreviaturas generales:*

AAU	Unidades arbitrarias de área.
ACD	Análisis Cuantitativo Descriptivo
AGMI	Ácidos grasos monoinsaturados.
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados.
AGS	Ácidos grasos saturados.
ANICE	Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España.
APH	Altas Presiones Hidrostáticas.
ASICI	Asociación Interprofesional del Cerdo Ibérico.
$a_w$	Actividad de agua.
BEUC	Organización Europea de Asociaciones de Consumidores
BOE	Boletín Oficial del Estado.
°C	Grados centígrados.
DOP	Denominaciones de Origen Protegido.
ETG	Especialidad Tradicional Garantizada.
eV	Electronvoltio.
FIZZ	Software que te permite diseñar estudios sensoriales, analizar resultados, almacenar datos, explorar las respuestas.
ICEX	Instituto español del comercio exterior.
FSO	Food Safety Objectives.
GDL	Glucono-delta-lactona.
GIM	Contenido en grasa intramuscular.
HR	Humedad relativa.
IGP	Indicaciones Geográficas Protegidas.
ISO	Organización Internacional para la estandarización.
Log $P_{o-w}$	Coefficiente de partición octanol-agua indica la polaridad o hidrofobicidad de un compuesto volátil.

MAGRAMA	Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
M Pa	Megapascales.
m/z.	Masa/carga.
PIB	Producto Interior Bruto.
PV	Presión de vapor.
ppm	Partes por millón.
RAE	Real Academia Española.
RIBER	Registro Informativo del Ibérico.
rpm	Revoluciones por minuto.
RTE	Alimentos listos para comer.
T <sup>a</sup>	Temperatura.
Tm	Toneladas.
TI	Tiempo-Intensidad.
UE	Unión Europea.
UNE	Una Norma Española.

*Abreviaturas de estadística:*

ACP	Análisis de Componentes Principales.
ANOVA	Análisis de la varianza.
MLG	Modelo Lineal General.
<i>r</i>	Coefficiente de Pearson.
SPSS	Programa estadístico muy usado en las ciencias sociales.

*Abreviaturas de medidas instrumentales:*

a*	Eje rojo-verde.
b*	Eje amarillo-azul.
CG-EM	Cromatografía de gases/espectrometría de masas.
DVB/CAR/PDMS	Divenilbenzeno-Carboxen-Polidimetilsiloxano.
ΔE	Diferencia total de color.
EIC	Cromatograma de iones extraídos.
FID	Detector de ionización de llama.
HPLC	Cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

HPLC-FPD	Cromatografía de líquidos acoplada a un detector de fluorescencia.
L*	Coordenada de luminosidad.
LC-ESI-MS	Cromatografía de líquidos- ionización electrospray- espectrometría de masas.
SPME	Microextracción en fase sólida.
TPA	Análisis del perfil de textura.

*Abreviaturas de determinación de oxidación de proteínas:*

AAS	Semialdehído $\alpha$ -aminoadípico.
ABA	Ácido <i>para</i> -aminobenzoico.
BSA	Seroalbúmina bovina.
DNPH	Dinitrofenilhidrazina.
DTPA	Ácido dietilentriaminopentaacético.
GGs	Semialdehído $\gamma$ -glutámico.
HCl	Ácido clorhídrico.
MES	(N-morfolino) ácido etanosulfónico.
NaCl	Cloruro sódico.
NaCNBH <sub>3</sub>	Cianoborohidruro de sodio.
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato trisódico.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
TCA	Ácido tricloroacético.

*Abreviaturas de determinación de oxidación de lípidos:*

MDA	Malonaldehído.
BHT	Butilato hidroxitolueno.
HClO <sub>4</sub>	Ácido perclórico.
TBA	Ácido tiobarbitúrico.
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.
TEP	1,1,3,3- tetraetoxipropano.

*Abreviaturas determinación de la composición físico-química:*

AgNO <sub>3</sub>	Nitrato de Plata.
AOAC	Asociación Oficial de Química Analítica.
C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	Acetona.
CH <sub>3</sub> ONa	Metilato sódico.
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	Ácido cítrico.
Cu-Se	Cobre-Selenio.
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Ácido bórico.
HCl	Ácido clorhídrico.
HNO <sub>3</sub>	Ácido nítrico.
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico.
NaCl	Cloruro sódico.
NaOH	Hidróxido de sodio.
(NH <sub>4</sub> )Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Sulfato férrico amónico.

*Abreviaturas de envasado:*

EVA	Etil vinil acetato.
EVOH	Etilen vinil alcohol.
LDPE	Polietileno de baja densidad.
MAP	Envasado en atmósferas modificadas.
PA	Poliamida.
PE	Polietileno.
VDC	Cloruro de vinilideno.



*Abreviaturas de los lotes planteados de los loncheados de jamón:*

ASF	Alternative Sliced Format; Formato loncheado apilado.
C	Muestras no sometidas al tratamiento con altas presiones hidrostáticas.
CSF	Conventional Sliced Format; Formato loncheado tradicional.
BF	Muestras procedentes de la maza.
Flank	Muestras procedentes de la babilla.
HHP	Muestras tratadas con altas presiones hidrostáticas.
Hip	Muestras procedentes de la cadera.
IF	Intact Format; Formato intacto, jamón sin lonchear.
QF	Muestras procedentes de la babilla.

*Abreviaturas de los lotes planteados de los sistemas modelo:*

CF Muestras elaboradas con tocino de cerdos Ibéricos alimentados con piensos.

MF Muestras elaboradas con tocino de cerdos Ibéricos alimentados en montanera.

LF Muestras elaboradas con manteca comercial de cerdo.

SOF Muestras elaboradas con aceite de girasol.

~ 4% Muestras con aproximadamente un 4 % de grasa final.

~ 10% Muestras con aproximadamente un 10 % de grasa final.

~ 15% Muestras con aproximadamente un 15 % de grasa final.





RESUMEN



## RESUMEN

**Título:** “Efecto de las características de la grasa y de factores post-procesado en las propiedades sensoriales y físico-químicas del jamón Ibérico loncheado”.

### **Hipótesis de trabajo:**

Sobre la base de estudios preliminares, la grasa intramuscular (GIM) tiene una marcada influencia sobre la generación de compuestos volátiles derivados de las reacciones de oxidación, así como, en la percepción de dos de los atributos sensoriales de mayor significado en la calidad del jamón Ibérico (el olor y el aroma). Por lo tanto, los loncheados de jamón Ibérico con un alto contenido en GIM deberían presentar diferencias con aquellos loncheados con un menor contenido en GIM, en relación a la estabilidad oxidativa y a la calidad sensorial. Considerando que una de las principales causas de deterioro de la calidad sensorial de los productos cárnicos, es la oxidación de los lípidos y las proteínas de la carne. Y que las nuevas tendencias de mercado fomentan la diversificación en el sector cárnico, desde las características de la materia prima hasta el modo de preparar y suministrar el producto final, fenómeno que no excluye a estos productos de la calidad. Es por ello que surge la necesidad de explorar nuevos aspectos, desconocidos hasta ahora, de las características sensoriales más determinantes de la calidad del jamón Ibérico dirigidas por primera vez investigar el efecto del contenido en GIM y los factores post-procesado sobre las características sensoriales mediante el empleo de técnicas analíticas novedosas que se acercan más a la percepción real del aroma por los consumidores. Así como, las posibles repercusiones que puede tener la estabilidad oxidativa (lípidos y proteínas) sobre la calidad final del producto.

### **Objetivos:**

El objetivo global de la presente Tesis Doctoral es conocer la influencia que el contenido y la composición de la GIM tienen sobre la liberación de

compuestos volátiles olor-activos en jamón Ibérico, así como, sobre las características sensoriales de este producto. Para lo cual, la elaboración de un producto cárnico modelo con diferentes contenidos y composición grasa (sólido/líquido) podría ser interesante para evaluar su influencia sobre la dinámica de liberación/retención de los compuestos volátiles olor-activos más representativos del jamón Ibérico. Posteriormente, se estudiará en jamones Ibéricos loncheados el efecto tanto del contenido en GIM como de otros factores post-procesado, sobre; la estabilidad oxidativa, la dinámica de liberación de compuestos volátiles, y las características sensoriales de este producto mediante técnicas dinámicas de evaluación sensorial. Por lo que, un objetivo específico sería la puesta a punto y optimización de la aplicación de la técnica de tiempo-intensidad (TI) para el estudio de la percepción temporal del flavor y la textura en jamón curado Ibérico loncheado envasado a vacío.

### **Material y métodos:**

#### Material:

Tejidos (lomo de cerdo y tejido adiposo procedente de cerdos Ibéricos con diferente régimen de alimentación), manteca, aceite de girasol, aditivos, tripas artificiales de colágeno, y compuestos volátiles que se obtuvieron de Sigma-Aldrich (SAFC®), fueron utilizados para el desarrollo de un producto cárnico modelo. Un total de 30 jamones Ibéricos con un peso final de unos 7.5 kg se obtuvieron de cerdos Ibéricos de campo (DOP Dehesa de Extremadura). Todas las piezas se deshuesaron, lonchearon, envasaron a vacío, y se sometieron a diferentes tratamientos post-procesado. Se distribuyeron en diversos lotes con la finalidad de responder a los objetivos planteados en la presente Tesis Doctoral.

#### Métodos:

*Análisis químicos: caracterización química* de todas las muestras mediante los métodos desarrollados en la AOAC. Oxidación lipídica (TBARS) y oxidación proteica (DNPH). *Análisis instrumentales:* perfil de textura –TPA-, medida instrumental del color -CIE L\* a\* b\*- , perfil de ácidos grasos mediante cromatografía gaseosa (CG), liberación de volátiles al espacio de cabeza

mediante microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía gaseosa (SPME-CG), determinación de dos carbonilos específicos de la oxidación de proteínas por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-ESI-MS) y cromatografía de líquidos acoplada a un detector de fluorescencia (HPLC-FLD). *Análisis sensoriales*: la evaluación sensorial se llevó a cabo mediante el empleo de las técnicas de análisis cuantitativo descriptivo y tiempo-intensidad (ACD y TI) con un panel entrenado de 12 catadores, haciendo uso de escalas lineales horizontales de 10 cm de longitud, valorándose aspectos relacionados con el aspecto, textura táctil, textura, olor y flavor. *Análisis estadístico*: el análisis de los datos fue llevado a cabo con el paquete estadístico SPSS.

## **RESULTADOS MÁS RELEVANTES:**

Los resultados mostraron que la influencia que puede tener el contenido en GIM sobre la calidad sensorial de los loncheados de jamón, a su vez, es condicionada por el resto de parámetros composicionales que lleva consigo la diferente localización anatómica de los músculos empleados, especialmente en atributos relacionados con la textura, como la dureza. Mostrando los loncheados con una mayor contenido en GIM una mayor dureza. Del mismo modo, estos loncheados con un mayor contenido en GIM mostraron una mayor inestabilidad oxidativa, en relación a las reacciones de oxidación lipídica, que junto con el tratamiento con APH comprometieron la estabilidad oxidativa a lo largo del almacenamiento. Del mismo modo que la GIM, las APH implicaron modificaciones en la calidad sensorial promoviendo principalmente alteraciones en la apariencia como una coloración más marronácea del magro, en la textura como una mayor dureza, y en el flavor percibido con un aumento de la intensidad y del sabor salado, como consecuencia de una mayor susceptibilidad a las reacciones de oxidación de los lípidos y las proteínas. No obstante, se observó que estas modificaciones en la calidad sensorial son menores tras el tratamiento con APH del jamón en bloque, el cual, mostró una mayor estabilidad ante las reacciones de oxidación de lípidos y proteínas, en comparación con un loncheado previo. Por lo tanto, el loncheado previo supuso, una mayor alteración de calidad, especialmente en la presentación

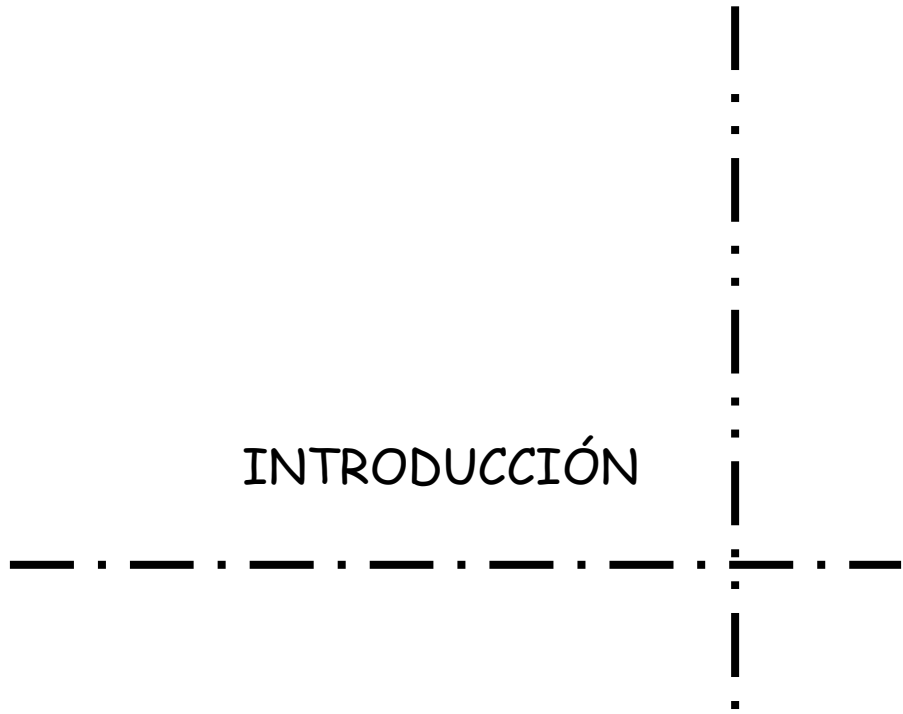
cuyas lonchas van apiladas horizontalmente, como consecuencia de una mayor susceptibilidad a dichas reacciones de oxidación. Otro de los parámetros que mostró su influencia sobre la calidad sensorial del jamón loncheado envasado a vacío, fue la temperatura de consumo, la cual, tras un atemperado a 20 °C optimiza las características consideradas relevantes en la calidad del jamón Ibérico.

Respecto a los sistemas modelo tanto el contenido como las características de la grasa tuvieron influencia sobre la estabilidad oxidativa y la calidad sensorial. El contenido en grasa y la oxidación de lípidos mostraron una relación positiva, mientras que, en la oxidación de proteínas su influencia no fue tan clara. Por el contrario, su efecto sobre la liberación de los compuestos olor-activos no fue significativo, los resultados mostraron la influencia o repercusiones que puede tener el proceso de maduración sobre la dinámica de liberación/retención. Del mismo modo, su influencia sobre la percepción del flavor no fue marcada y característica. Finalmente destacar, que los resultados obtenidos de la percepción del flavor mediante técnicas estáticas o dinámicas, manifestaron la influencia de la metodología empleada por ambas técnicas.

No obstante, las características de la grasa tuvieron un efecto significativo sobre la liberación de los compuestos olor-activos seleccionados y sobre la percepción temporal del flavor, así como en la textura evaluada instrumental y sensorialmente. Sin embargo, los resultados evidenciaron que esta influencia no solamente se debe a variaciones en el perfil de ácidos grasos de los sistemas modelo, sino que, variaciones en la naturaleza de la grasa podrían ocasionar modificaciones en la estructura de la matriz cárnica. Además, la temperatura en la percepción temporal del flavor también mostró su influencia. Del mismo modo, se observó un efecto significativo sobre la susceptibilidad oxidativa, aunque este efecto no solamente se debió a las diferencias en el perfil de ácidos grasos, sino, a la presencia de sustancias con actividad antioxidante en las diferentes grasas empleadas (endógenos o incorporados). De manera que las reacciones de oxidación de lípidos fueron moduladas por el perfil en ácidos grasos y por la presencia de sustancias con actividad antioxidante, mientras que, este primero no mostró un efecto significativo sobre las reacciones de oxidación de las proteínas.



# INTRODUCCIÓN





# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1 SITUACIÓN ACTUAL DEL SECTOR DE LOS PRODUCTOS CÁRNICOS DERIVADOS DEL CERDO IBÉRICO.**

El sector cárnico es el mayor subsector alimentario y es, por sí mismo, uno de los cinco mayores sectores industriales, representa alrededor del 20 % de todo el sector alimentario (2 % de todo el PIB español y el 14 % del PIB industrial de España). Este sector es el que con mayor energía resiste el embate de la difícil situación económica que se desencadenó ya en 2009 con toda su crudeza, y lo hace en gran medida gracias al gran incremento de sus exportaciones que ya representan en la actualidad más de 2.500 millones de euros (Fuente: ANICE).

El estancamiento del mercado interior ha forzado a nuestras empresas a abrir y consolidar nuevos mercados y, por consiguiente, a exportar una proporción cada vez mayor de su producción. Las exportaciones de carne realizadas por nuestra industria representan alrededor del 30 % de la producción cárnica, pero sólo un poco más del 7 % de la producción de elaborados, aunque en los últimos años se ha producido un ligero pero progresivo incremento de estas exportaciones.

El jamón curado se considera un producto de calidad, que presenta unas características organolépticas muy agradables y diferentes a las del resto de productos cárnicos, o las que encontramos en la carne fresca. Convirtiéndose en una de las principales señas de identidad de nuestro país en el extranjero.

Lo que nos indica que el jamón curado puede considerarse como un prototipo de producto de calidad diferenciada, por lo que los jamones curados han sido objeto de protección bajo distintas figuras de calidad de la Unión Europea (UE) a través de las DOP (Denominaciones de Origen Protegido), IGP (Indicaciones Geográficas Protegidas) y ETG (Especialidad Tradicional Garantizada). El reconocimiento por la UE de esa calidad diferenciada y su vinculación a los sistemas de producción existentes en determinadas zonas geográficas del Suroeste de la Península Ibérica, hace que existan 4 DOP que

ampan los jamones y paletas Ibéricos (DOP Dehesa de Extremadura, DOP Guijuelo, DOP Jamón de Huelva, y DOP Los Pedroches), en base al Reglamento 510/2006 de la UE. También en el jamón de cerdo blanco se persigue cada vez más como objetivo prioritario el obtener un producto de calidad. Ya poseemos algunos tipos de jamón de cerdo blanco amparados por figuras de calidad de la UE; DOP Jamón de Teruel, IGP Jamón de Trévez y ETG del Jamón Serrano.

Los productos nobles (jamones, paletas y lomos) de cerdo Ibérico, así como la carne fresca, están regulados en su conjunto en nuestro país por la Norma de Calidad (Real Decreto 1469/2007 del 2-11-2007, BOE 3-11-2007).

Este Real Decreto (1469/2007) tiene por objeto establecer las características de calidad que deben reunir los productos procedentes del despiece de la canal que se comercializan en fresco, así como, el jamón, la paleta y la caña de lomo Ibéricos comercializados en España, para poder usar las denominaciones de venta establecidas en la Norma de Calidad sin perjuicio del cumplimiento de la normativa general que les sea de aplicación. Estableciéndose diferentes designaciones de calidad de estos productos, dos designaciones en función de la genética (Ibérico puro o Ibérico) y cuatro designaciones en función de la alimentación recibida por los animales durante la fase de cebo (De bellota o terminado en montanera, de recebo o terminado en recebo, de cebo de campo y de cebo), constituyendo un total de ocho denominaciones.

Sin embargo, con el objetivo de proteger a los productores que utilizan la dehesa para criar sus cerdos se ha propuesto establecer una nueva Norma de Calidad del Ibérico (2013), pendiente de entrar en vigor, que propone simplificar la vigente actualmente (BOE, 2007). Algunas fuentes citaban la posibilidad de reducir a dos las denominaciones por raza y alimentación de los cerdos Ibéricos. Finalmente, y tras la polémica suscitada, el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA), ha concluido la redacción del proyecto final de la Norma de Calidad de los productos Ibéricos con el propósito de garantizar la conservación de la raza Ibérica y la dehesa, la defensa del consumidor, y facilitar el mantenimiento de los diferentes modelos productivos. Esta nueva Norma de Calidad del Ibérico (2013), propone

simplificar y reducir a tres las denominaciones de venta en función de la alimentación y el manejo del ganado.

-Designaciones por alimentación y manejo:

“de bellota”: para productos procedentes de animales sacrificados inmediatamente después del aprovechamiento exclusivo de bellota, hierba y otros recursos naturales de la dehesa, sin aporte de pienso suplementario. El aprovechamiento de los recursos de la dehesa en época de montanera deberá realizarse teniendo en cuenta la superficie arbolada cubierta de la parcela o recinto y la carga ganadera máxima admisible. La edad mínima al sacrificio será de 14 meses con un peso mínimo de 115 kg, excepto para los animales 100 % Ibéricos que será de 108 kg. Con una reposición mínima en montanera de 46 kg, durante más de 60 días.

“de cebo de campo”: tratándose de animales que aunque hayan podido aprovechar los recursos de la dehesa o del campo, han sido alimentados con piensos constituidos fundamentalmente por cereales y leguminosas, y cuyo manejo se realice en explotaciones extensivas o intensivas al aire libre pudiendo tener parte de la superficie cubierta. La edad mínima al sacrificio será de 12 meses con un peso mínimo de 115 kg. Con una estancia mínima en dichas explotaciones previas a su sacrificio de 60 días, en una superficie mínima de suelo libre total por animal de 100 m<sup>2</sup>, en su fase de cebo.

“de cebo”: en caso de animales alimentados con piensos constituidos fundamentalmente por cereales y leguminosas, cuyo manejo se realice en sistemas de explotación intensiva en una superficie mínima de suelo libre total por animal de 2 m<sup>2</sup> en los animales de producción de más de 110 kg de peso vivo. La edad mínima al sacrificio será de 10 meses con un peso mínimo de 115 kg.

-Designaciones por tipo racial:

“100 % Ibérico”: cuando se trate de productos procedentes de animales con un 100% de pureza genética de la raza Ibérica, cuyos progenitores tengan así mismo un 100 % de pureza racial Ibérica, y estén inscritos en el correspondiente libro de genealógico.

“Ibérico”: cuando se trate de productos procedentes de animales con al menos el 50 % de su porcentaje genético correspondiente a la raza porcina Ibérica, con progenitores que reúnan las características detalladas en el artículo 3 del Real Decreto pendiente de entrar en vigor.

## **1.2 COMERCIALIZACIÓN DEL JAMÓN.**

España es tradicionalmente un país elaborador de estos productos cárnicos curados, siendo el jamón el producto más destacado, y por lo tanto, un pilar fundamental de la economía española. Por su volumen de producción y también por su calidad diferenciada convierte a nuestro país en el primer productor mundial con 32.7 millones jamones de cerdo blanco, y 5.1 millones de jamones Ibéricos en el año 2011 (Fuente: MAGRAMA).

En el transcurso del 2012, las exportaciones nacionales de jamón y paleta curados han crecido un 8.7 % en volumen y un 10.5 % en valor según los datos facilitados por la Agencia Tributaria, y analizados por el Consorcio del Jamón Serrano Español. Al cierre del pasado ejercicio se exportó un total de 26.688 toneladas de jamón y paletas curados, 2.136 toneladas más que en 2011. En una clasificación por destinos de exportación, la Unión Europea sigue siendo el enclave más importante registrando el 78.6 % de las ventas españolas en el exterior. Los mercados alemán, francés, luso, junto a Bélgica e Italia engloban el 70.2 % (Fuente: ICEX).

Con respecto a la producción de piezas Ibéricas, los datos aportados por el Registro Informativo de organismos independientes de control del Ibérico (RIBER) del MAGRAMA, la comercialización de piezas amparadas por la Norma de Calidad del Ibérico durante el 2012 fueron de 4.80 millones de jamones Ibéricos curados, y 4.67 millones de paletas curadas. En Extremadura el volumen de productos certificados comercializados durante ese año supuso un total de 854.355 piezas etiquetadas de jamón, y 786.625 piezas etiquetadas de paleta.

De acuerdo con los datos del Panel de Hogares del MAGRAMA, el gasto total de los hogares españoles en productos derivados del cerdo Ibérico en el año 2012 ascendió a 742.437 millones de euros. La mayor parte de este valor correspondió al gasto en jamón, 433.348 millones de euros (58.36 %), seguido

de la paleta con 104.716 millones de euros (14.10 %). Esto supone que el consumo del jamón Ibérico crece un 4.75 % en volumen respecto a 2011 para situarse en 21.844 millones de kg.

La mayor parte del jamón se comercializa en piezas enteras, aunque la demanda de nuevos formatos de jamón curado que faciliten su consumo ha mostrado una tendencia al alza en los últimos años, y actualmente, suponen casi el 50 % del jamón comercializado en nuestro país. Tras los jamones enteros, las presentaciones de mayor importancia cuantitativa son, por este orden, los productos deshuesados con un 35 %, bien sea jamón completo (centros o bloques de jamón) o por partes (en tacos de jamón), los loncheados que se sitúan en el 15 %, y por último, el 5 % que va destinado a los recortes como taquitos o tiras (Sánchez, 2009).

La principal evolución ha tenido lugar, mayoritariamente, en el cerdo blanco donde los jamones deshuesados y loncheados ya están muy bien implantados en el mercado. En el caso de los jamones Ibéricos, especialmente en los productos de alta gama, siguen dominando más claramente las piezas enteras o el consumo de jamón cortado a cuchillo en el lugar de venta y que se expende envuelto en papel o envasado. No obstante, estas nuevas presentaciones van incrementándose también en el mercado español, y durante el año 2012 si atendemos a la distribución por formatos del jamón Ibérico, se observa que el consumo de jamón Ibérico entero ha crecido con respecto al 2011 un 2.65 %, después de 2 años de caídas, alcanzando los 16.506 millones de Kg. Mientras que el consumo de jamón Ibérico loncheado, ha tenido un crecimiento considerable con un 11.83 % respecto a 2011, llegando a los 5.338 millones de kg (Fuente: ASICI).





BIBLIOGRAFÍA



- ANICE Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España. El sector cárnico. (<http://www.anice.es>).
- ASICI. Asociación Interprofesional del Cerdo Ibérico. *Consumo de productos Ibéricos en hogares en el año 2012*. (<http://www.ibérico.com>).
- BOE (2007). Real Decreto 1469/2007, de 2 de noviembre, por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibéricos. *Boletín Oficial del Estado*, 264.
- ICEX. Instituto Español de Comercio Exterior. *Estudios de Mercado y otros documentos de comercio exterior*. (<http://www.icex.es>).
- MAGRAMA. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (<http://www.magrama.gob.es>).
- Reglamento (CE) nº 510/2006 del Consejo de 20 de marzo de 2006 sobre la protección de las indicaciones geográficas y de las denominaciones de origen de los productos agrícolas y alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 93.
- Sánchez, C., (2009). Elaborados cárnicos loncheados: comiendo terreno al corte. *Alimarket*, Septiembre (2009), 193-215.



REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 LA CALIDAD DEL JAMÓN IBÉRICO.**

Las características excepcionales de la carne y la grasa procedente de los cerdos Ibéricos, tanto para su venta en fresco como para la producción de productos curados, hace que, a pesar de su precio más elevado la producción de dichos animales sea sostenible. Esto se debe a diversos factores, entre los que sobresale la propia genética del cerdo Ibérico o el sistema de explotación que implica una mayor edad y peso al sacrificio, y obliga a los animales a realizar una mayor actividad física en busca del alimento en la fase de cebo (Cava y cols., 2000; Carrapiso y cols., 2003), lo que determina que estos productos destaquen por su elevado grado de veteado e intensidad del color del magro, consideradas de las características más sobresalientes de su aspecto (Ventanas y cols., 2005). Como consecuencia del elevado grado de veteado estos productos también destacan por su jugosidad, como avalan diferentes estudios llevados a cabo en jamón (Ruiz y cols., 2000), en lomo (Ventanas y cols., 2007b) y en paletas (Reina y cols., 2011a). Por otro lado, su composición en ácidos grasos destacada por el elevado porcentaje en ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), origina que otra de las características destacables de los productos del cerdo Ibérico, y en particular, los procedentes de cerdos Ibéricos “de bellota”, sea el intenso brillo y la fluidez de la grasa al corte (Ruiz y cols., 2000; Cava y cols., 2000; Ventanas y cols., 2007c). No obstante, lo que más apreciado y destacado por los consumidores es su intenso y particular flavor (sabor y aroma) (Ruiz y cols., 2002a). Al sabor del jamón Ibérico además de la sal (potenciador del sabor), contribuyen aminoácidos y pequeños péptidos (Córdoba y cols., 1994a; Ruiz y cols., 1999b).

Durante el proceso de maduración de los productos curados se produce un aumento en los niveles de nitrógeno no proteico, de aminoácidos libres y péptidos, como resultado de la actividad proteolítica de enzimas endógenas como catepsinas, peptidasas y aminopeptidasas (Toldrá, 1998). En relación al

aroma, éste es fruto de la generación de compuestos volátiles con un bajo umbral de percepción y con unas notas aromáticas muy particulares, como resultado de las numerosas transformaciones químicas y bioquímicas que acontecen durante el proceso de maduración, y que tienen como precursores los lípidos y las proteínas de la materia prima, (García y cols., 1991; Antequera y cols., 1992; Ventanas y cols., 1992; Córdoba y cols., 1994a,b; Antequera y cols., 1994; Toldrá, 1998; Jurado y cols., 2009). En este sentido, se han identificado los compuestos volátiles olor-activos del jamón Ibérico que presentan un mayor impacto en el aroma de este producto (Carrapiso y cols., 2002a,b).

La calidad sensorial de los alimentos es el criterio que condiciona de una manera más determinante las preferencias de los consumidores, y ello es particularmente importante en un producto como el jamón Ibérico (Cruz., 2006).

De todas las características sensoriales distintivas mencionadas que espera encontrar el consumidor, la jugosidad y el aroma intenso, persistente, característico con notas a curado, a frutos secos, y una moderada rancidez, son las que muestran una mayor correlación, positiva y significativa, con la aceptabilidad de los jamones Ibéricos (Ruiz y cols., 2002a).

### **2.1.1 Factores determinantes de la calidad del jamón Ibérico.**

Para la obtención de un producto de calidad se debe considerar tanto las características particulares de la materia prima de partida, como las condiciones y duración de su proceso de curación. Son numerosos los trabajos que han acreditado la influencia de diferentes parámetros como la genética, la alimentación, y el proceso de elaboración sobre la calidad sensorial de los productos curados del cerdo Ibérico (Tabla 1). Las características de la carne de los cerdos Ibéricos (contenido en GIM, composición en ácidos grasos de la GIM, presencia de antioxidantes y una alta tasa de mioglobina), junto con un prolongado proceso de curación en condiciones termo-higrométricas características de la zona Suroeste de la Península Ibérica, producen un jamón curado con unas características muy particulares y con una gran variedad de matices en el flavor, que hacen que el jamón Ibérico sea el producto cárnico



más valorado y con un excelente grado de aceptación entre los consumidores españoles (Ruiz y cols., 1998c).

**Tabla 1.** Resumen de los diferentes estudios realizados para evaluar la influencia de los factores relacionados con la materia prima y con el procesado sobre la calidad de los productos curados derivados del cerdo Ibérico, ordenados cronológicamente.

<b>Factor estudiado</b>	<b>Producto</b>	<b>Referencia</b>
Condiciones de procesado (Duración 420 d vs. 600 d) (Localización anatómica)	Jamón curado	Ruiz y cols., 1998c
Condiciones de procesado (Duración 420 d vs. 600 d)	Jamón curado	Ruiz y cols., 1999a
Condiciones de procesado (Duración 420 d vs. 600 d)	Jamón curado	Ruiz y cols., 1999b
Alimentación (Extensivo vs. Intensivo) (Localización anatómica)	Jamón curado	Cava y cols., 2000
Alimentación y genética (Extensivo vs. Intensivo) (Ibérico puro vs. Ibérico x Duroc)	Jamón curado	Carrapiso y cols., 2003
Condiciones de procesado (6 % de sal vs. 3 % de sal) (Temperatura de procesado)	Jamón curado	Andrés y cols., 2004b
Alimentación y genética (Montanera vs. Pienso) (Ibérico puro vs. Ibérico x Duroc)	Jamón curado	Carrapiso y García, 2005
Alimentación y genética (Ibérico puro vs. Ibérico x Duroc y recíproco) (Montanera vs. diferentes piensos)	Lomo curado	Ventanas y cols., 2006a
Genética (Ibérico puro vs. Ibérico x Duroc y recíproco)	Jamón curado	Ventanas y cols., 2006b
Alimentación y genética (Extensivo vs. Intensivo) (Ibérico puro vs. Ibérico x Duroc)	Lomo curado	Ventanas y cols., 2007a

Alimentación y genética (Montanera vs. diferentes piensos) (Ibérico puro vs. Ibérico x Duroc y recíproco)	Lomo curado	Ventanas y cols., 2007b
Alimentación (Montanera vs. diferentes piensos)	Jamón curado	Ventanas y cols., 2007c
Alimentación (Bellota, pasto vs. Pienso alto oleico)	Jamón curado	Pérez-Palacios y cols., 2010
Condiciones de procesado (Duración 9 vs. 18 vs. 20 meses)	Paleta curada	Reina y cols., 2011b

Fuente: Elaboración propia.

Son numerosos los factores determinantes de la calidad de los productos cárnicos derivados del cerdo Ibérico, siendo de especial importancia los relacionados con la grasa, y particularmente, con las características de la GIM, tanto desde el punto de vista de su contenido como de su composición (Ventanas y cols., 2005). En el caso concreto del jamón curado, si bien el consumidor prioriza el componente hedónico, también busca que la alta calidad sensorial sea compatible con los objetivos nutricionales y los nuevos hábitos de consumo que han propiciado el desarrollo de nuevas presentaciones que permiten un consumo fácil y rápido del producto. En este sentido, en los últimos años el loncheado del jamón ha tenido una gran implantación en la industria. Pero ello supone un mayor riesgo microbiológico, por lo que, para garantizar la seguridad se han aplicado diversas técnicas emergentes, alternativas o complementarias a los tradicionales métodos de conservación. Sin embargo, estas nuevas técnicas de conservación, (Principalmente las altas presiones hidrostáticas), pueden tener repercusiones en la calidad sensorial del producto, que deben ser valoradas. Por ello, a continuación se describen los efectos relacionados con las características de la GIM y los tratamientos post-procesado, sobre la calidad de los productos derivados del cerdo Ibérico.

### 2.1.1.1 Grasa intramuscular (GIM).

La grasa subcutánea, intermuscular e intramuscular son importantes componentes del jamón Ibérico, variando en cantidad y calidad de acuerdo con la genética (Ventanas y cols., 2006b) y el sistema de alimentación (Ruiz y cols., 1998a). El mayor contenido en GIM de la raza Ibérica en relación a otras razas comerciales, es una de sus características diferenciales atribuida al metabolismo adipogénico de la misma, que hace que el contenido en GIM de sus carnes sea superior al de las demás (López-Bote, 1998). En el caso concreto de los productos derivados del cerdo Ibérico, como ya se ha comentado anteriormente, el elevado grado de veteado o marmorización, denominación que hace referencia a la grasa acumulada entre las fibras musculares, es uno de los atributos sensoriales más destacados, por lo que se considera indicador de calidad en estos productos.

Asimismo, tanto la cantidad como la composición de la GIM influyen de manera importante sobre atributos sensoriales, como el brillo, la jugosidad, el aroma y el sabor de los productos cárnicos curados, y en particular, del jamón Ibérico (Ruiz y cols., 2000; Carrapiso y cols., 2003; Ventanas y cols., 2007a; Pérez-Palacios y cols., 2010). El veteado tan apreciado por los consumidores es el principal parámetro determinante de la jugosidad. Ello es debido a que facilita la masticación, y cuando la grasa es muy aromática (contiene numerosos compuestos volátiles lipo-solubles) estimula la secreción de saliva provocando una sensación de jugosidad “sostenida”, de importancia capital en un producto deshidratado como el jamón curado (Ventanas, 2012). Asimismo, los lípidos intramusculares son los depósitos grasos que participan más directamente como precursores de los compuestos volátiles responsables de las percepciones olfativas antes (olor) y durante la masticación (aroma), así como, de los aromas característicos del jamón. La formación de dichos compuestos volátiles requiere la participación de productos de la degradación lipolítico-oxidativa de los lípidos intramusculares, y su posterior combinación con los compuestos nitrogenados de bajo peso molecular (principalmente aminoácidos) procedentes de la escisión enzimática de las proteínas (proteolisis), que tiene lugar durante el secado-maduración del jamón. Estos

compuestos volátiles se originan por tanto en los lugares de contacto entre la grasa y el magro, por lo que, la GIM es clave para su formación al estar íntimamente insertada en las fibras musculares (Ventanas, 2012).

Las condiciones de procesado tan particulares de secado-maduración (25-30 °C y 80-60 % HR etapa de secado; 12-18 °C y alrededor del 80 % HR etapa de maduración) de los jamones producidos en nuestro país, han sido señaladas como la causa de la mayor formación de compuestos volátiles implicados en el olor y el aroma. Alcanzando los compuestos derivados de la degradación lipolítico-oxidativa de la grasa (como los aldehídos lineales saturados e insaturados, metil-cetonas o alcoholes), y de los aldehídos ramificados procedentes de los aminoácidos (2 y 3-metilbutanal), tasas mucho más elevadas en los jamones Ibéricos y Serranos, que en los procedentes de otros países (Estévez y cols., 2005c; Jurado y cols., 2009). Por lo tanto, el desarrollo del flavor está relacionado con la intensa proteólisis que experimentan las proteínas, las degradaciones de Strecker de los aminoácidos, la oxidación de lípidos, y las subsiguientes reacciones secundarias de condensación de tipo Maillard entre los aminoácidos y los carbonilos procedentes de la oxidación de lípidos (García y cols., 1991; Ventanas y cols., 1992; Córdoba y cols., 1994a; Toldrá, 1998; Ruiz cols., 1998b y 2002). Por consiguiente, resulta evidente la existencia de una interconexión entre la intensidad de los procesos proteólisis y oxidación de proteínas (con un incremento de los aminoácidos libres y de los aldehídos derivados de los mismos), y de la oxidación de lípidos (productos de oxidación), como principales contribuyentes al flavor característico del jamón que se identifica por un sabor intenso, y aroma a curado, tostado, mantecoso, envejecido (añojo), y con un cierto toque a rancidez (Gandemer, 2009).

#### *2.1.1.1.1 Influencia de la GIM sobre la jugosidad y el desarrollo del aroma y el flavor de los productos curados.*

De las características que anteriormente hemos señalado, la jugosidad y el aroma son dos de los atributos sensoriales con mayor relevancia en la calidad, y por lo tanto, en la aceptabilidad del jamón Ibérico, y en ellos

desempeña un papel clave el engrasamiento, y más específicamente, la tasa de GIM (Ruiz y cols., 2000; Ventanas y cols., 2007a,b).

De acuerdo con la norma UNE 87001:1994 la jugosidad se define como *“la propiedad superficial de la textura relativa a la percepción de la cantidad de agua absorbida o liberada por el producto”*. Ruiz y cols., (1998c) la definen como la sensación de un alimento lubricado durante la masticación.

La jugosidad de los productos cárnicos es el resultado de la humedad liberada del producto cárnico durante la masticación y de la humedad derivada de la saliva (Winger y Hagyard, 1995). El contenido en GIM estimula la generación de saliva, recubre la lengua y diferentes partes de la boca, contribuyendo de este modo directamente a la jugosidad percibida (Dikeman, 1987). En los productos cárnico curados, como el jamón, en los que el proceso de curación implica una fuerte deshidratación, la humedad procedente de la saliva y la contribución directa del contenido en GIM juegan un papel muy importante sobre la jugosidad del producto (Ruiz y cols., 2000).

En relación al aroma y el flavor, según la Norma UNE 87001:1994 el aroma se define como *“la sensación percibida por el órgano olfativo, por vía nasal indirecta posterior, cuando se realiza la degustación de un alimento o bebida”* y el flavor como *“el conjunto de propiedades olfativas y gustativas que se perciben durante la deglución”*. De acuerdo con Montel y cols., (1998) el flavor es un sutil equilibrio entre compuestos no volátiles con propiedades sápidas, y compuestos volátiles que interaccionan tanto entre ellos como con proteínas y lípidos. En el caso de los productos cárnicos, éste estaría asociado con variaciones en el tipo de estos componentes, y un desequilibrio entre ellos podría generar también sabores indeseables. El aroma de los productos cárnicos curados está relacionado tanto con las características de la materia prima, como con las complejas reacciones que tiene lugar durante el procesado de estos productos (Toldrá y Flores, 1998).

Como ya se ha indicado, de entre los componentes de la materia prima, los lípidos juegan un papel muy importante en la calidad sensorial de los productos cárnicos curados, en parte, por su influencia en el flavor de los mismos. En este sentido, la grasa de partida actúa como reservorio de compuestos volátiles, que en el caso de los productos cárnicos derivados del cerdo Ibérico, provienen en su mayoría de la alimentación recibida por los

animales, tales como terpenos e hidrocarburos (Tejeda y cols., 1999). Además durante la maduración, los ácidos grasos tienen un papel determinante en la generación del aroma y el flavor al actuar como precursores de un gran número de compuestos volátiles de bajo peso molecular (Ruiz y cols., 2002b). La mayor parte de los compuestos volátiles identificados en el jamón Ibérico; aldehídos, cetonas y ésteres entre otros, son productos secundarios de la oxidación de los ácidos grasos como son el ácido oleico (C18:1, *n*-9) y el ácido linoleico (C18:2 *n*-6). Además de estos compuestos, otros compuestos de gran impacto en el aroma son los derivados de sus reacciones con los aminoácidos, como el 2 y 3-metilbutanal, el fenilcetaldehído, entre otros.

Asimismo, la grasa puede modular el flavor percibido por su papel en la transferencia de compuestos volátiles de la matriz del producto al ambiente, y durante la masticación, y en consecuencia, en la dinámica de liberación y percepción de los mismos (De Roos, 1997). No obstante, este efecto sobre la dinámica de liberación/retención está también condicionado por las características físico-químicas de cada compuesto (Linforth y cols., 2000).

Entre estos parámetros termodinámicos que afectan a la liberación, está el  $\log P$  (indicador del grado de hidrofobicidad, y por consiguiente, de la polaridad del compuesto) y  $PV$  (indicador de la presión de vapor, y por lo tanto, la volatilidad del compuesto). De Roos, (2000) establece que la volatilidad del compuesto en el producto (factor termodinámico), y la resistencia a trasladarse desde la matriz del producto al ambiente (factor cinético), son dos de los principales factores que controlan la velocidad de liberación del aroma. No obstante, la percepción del flavor durante el consumo de un alimento según Overbosch y cols., (1991) es determinado por numerosos factores, como son el mecanismo de percepción, las técnicas de evaluación, la naturaleza y la concentración de los compuestos volátiles y no-volátiles, y la disponibilidad de esos compuestos liberados al sistema receptor. Disponibilidad que depende del tiempo y de la fragmentación de la matriz del alimento durante la masticación, y su consiguiente transporte.

Si bien, se han llevado a cabo diversos estudios en los que se ha evaluado la percepción del flavor a partir de la incorporación de compuestos volátiles con diferentes propiedades termodinámicas (Brauss y cols., 1999; Weel y cols., 2002; Pionnier y cols., 2004; Frøst y cols., 2005), los estudios

llevados a cabo en productos cárnicos son más limitados (Carrapiso, 2007; Ventanas y cols., 2010a,b). En el caso de los productos cárnicos derivados del cerdo Ibérico, se han empleado tanto técnicas instrumentales para la identificación de los compuestos olor-activos (Carrapiso y cols., 2002a,b), como sensoriales para evaluar el flavor y el aroma en estos productos (Muriel y cols., 2004; Ventanas y cols., 2007b,c; Pérez-Palacios y cols., 2010).

En la bibliografía científica están ampliamente descritas las rutas de formación de los compuestos volátiles responsables del aroma y el flavor de los productos cárnicos curados del cerdo Ibérico a partir de las reacciones acontecidas en la fracción lipídica (Ruiz y cols., 2002b; Jurado y cols., 2009). Sin embargo, el papel que podría desarrollar la grasa sobre la dinámica de liberación/retención de los compuestos aromáticos de interés en productos del cerdo Ibérico, es poco conocido, limitándose a un estudio llevado a cabo en lomo curado con diferente contenido en GIM, en el que se concluye que las diferencias en la GIM van a afectar tanto a la generación de los compuestos volátiles durante la curación del producto, cómo a la mayor o menor liberación de los mismos en las fases posteriores al procesado (Ventanas y cols., 2008). Por el contrario, son numerosos los estudios desarrollados en otros productos crudos curados, como salchichones, o emulsiones cárnicas, donde se ha evaluado la repercusión que tiene tanto el contenido en grasa, (Chevance y Farmer, 1999; Chevance y cols., 2000; Muguerza y cols., 2003; Estévez y cols., 2005a; Carrapiso, 2007; Ventanas y cols., 2010b; Olivares y cols., 2011), como su composición, (Muguerza y cols., 2003) sobre la generación o dinámica de liberación/retención de compuestos volátiles. Así como sus repercusiones sobre el olor, el aroma o el flavor percibidos (Muguerza y cols., 2001 y 2002; Olivares y cols., 2010).

#### *2.1.1.2 Reacciones de oxidación en la calidad de los productos cárnicos curados.*

La oxidación de los lípidos es uno de los principales factores que limitan la calidad y aceptabilidad de la carne y los productos cárnicos. Desencadena pérdidas en el color, pérdidas por goteo, el desarrollo de olores y sabores anómalos, y la producción de compuestos potencialmente tóxicos (Morrissey y cols., 1994; Gray y cols., 1996). Al igual que los lípidos, las proteínas de la

carne juegan un papel muy importante sobre aspectos tecnológicos, nutricionales y sensoriales de la misma, y por lo tanto, cualquier modificación o alteración en su estructura (desnaturalización, proteolisis u oxidación) tiene repercusiones importantes sobre las características que establecen la calidad de un producto (Lawrie, 1998; Estévez y cols., 2008 a,b). De igual modo que sucede en la oxidación de los lípidos, las proteínas son también susceptibles de ser atacadas por los radicales libres (Estévez, 2011). En general, los mecanismos y las reacciones que modulan la oxidación de lípidos y proteínas son diferentes, sin embargo, ambos procesos pueden estar directamente vinculados al estar afectados por similares factores antioxidantes y pro-oxidantes (Stadtman y Levine, 2000; Estévez y cols., 2008a). No obstante, existe un cierto desconocimiento sobre el impacto que tiene la oxidación de las proteínas sobre los alimentos, así como, los mecanismos y factores que la modulan o las posibles consecuencias para los consumidores (Xiong, 2000; Estévez, 2011; Lund y cols., 2011). Las primeras investigaciones en productos cárnicos se enfocaron en evaluar los efectos de la oxidación de proteínas en relación a la pérdida de las propiedades funcionales de las proteínas y la capacidad de retención de agua (Decker y cols., 1993; Wan y cols., 1993; Liu y Xiong, 1996; Srinivasan y cols., 1996). Posteriormente, algunos estudios han puesto de manifiesto la relación existente entre la oxidación de proteínas y la textura, en atributos relacionados con la jugosidad, la ternura y la dureza de la carne (Rowe y cols., 2004; Estévez y cols., 2005b; Lund y cols., 2007; Zakrys y cols., 2009; Ganhão y cols., 2010; Utrera y cols., 2012). Asimismo, se ha relacionado con el deterioro de otros parámetros de calidad de la carne y productos cárnicos, como el valor nutritivo (Park y Xiong, 2007; Santé-Lhoutellier, 2008; Lund y cols., 2011), y determinadas características sensoriales relacionadas con el color (Estévez y cols., 2005b; Ganhão y cols., 2010; Utrera y cols., 2012), el aroma y el flavor (Ventanas y cols., 2007c). Con respecto al aroma, su influencia sobre éste podría deberse a la implicación que tienen ciertos carbonilos específicos generados en la oxidación de proteínas, en concreto el semialdehído  $\alpha$ -aminoadípico (AAS) y el semialdehído  $\gamma$ -glutámico (GGS), en la formación de aldehídos de Strecker a partir de la degradación de la leucina e isoleucina (Estévez y cols., 2011). Originados como consecuencia de la desaminación y descarboxilación oxidativa que



sufren los aminoácidos libres en presencia de compuestos  $\alpha$ -dicarboxilos en las reacciones de Maillard (Mottram, 1998). Los aldehídos de Strecker son los principales promotores de los compuestos responsables del aroma final en las reacciones de Maillard. (Ruiz y cols., 2002b). De esta manera, los productos de la degradación de los aminoácidos libres y oxidados, podrían ser fuente de aldehídos, y en consecuencia, mostrar una influencia significativa sobre el flavor, principalmente, de los productos curados (Estévez, 2011). Más concretamente, en jamón Ibérico Ventanas y cols., (2007c), observaron una posible relación entre la oxidación de proteínas y notas particulares del flavor. Sin embargo, sus repercusiones sobre la calidad en jamón Ibérico loncheado son por el momento inexistentes. Además, considerando la conexión entre la oxidación de lípidos y proteínas, y la influencia que pueden tener el proceso de curación, el contenido y composición en GIM, y los diferentes tratamientos post-procesado a los que puede ser sometido el jamón curado sobre la oxidación de lípidos. Sería de gran interés estudiar la susceptibilidad de las proteínas a la oxidación, así como, su impacto sobre la calidad final del jamón Ibérico loncheado envasado a vacío.

#### *2.1.1.3 Factores post-procesado.*

Como consecuencia de las nuevas tendencias del mercado interior y la potencial exportación, la elaboración de productos cárnicos se encuentra en un momento de continua innovación. Por lo tanto, la industria debe considerar la evolución de los hábitos de consumo, y en definitiva, las preferencias en la demanda de los consumidores hacia productos fraccionados y envasados listos para su consumo (loncheados) se incrementa. Sin embargo, estos tratamientos post-procesado, como el loncheado-ensvasado a vacío y los tratamientos con APH, que imponen las nuevas tendencias de mercado, pueden influir de forma definitiva en la calidad que llega al consumidor. En este sentido, los loncheados envasados a vacío de productos cárnicos han sido el sector del mercado cárnico con el mayor ritmo de crecimiento de los últimos años. Sin embargo, en estos productos se incrementan los riesgos de contaminación cruzada en el momento previo a su envasado, por lo tanto, además de las barreras intrínsecas del propio jamón ( $a_w \leq 0.90$ ), requiere que se extremen las

precauciones necesarias para evitar su contaminación, tales como, el loncheado en salas “blancas” bajo condiciones de refrigeración, y por un tiempo limitado. No obstante, en ocasiones se requiere del empleo de barreras adicionales basadas en la implantación de nuevos métodos de conservación, entre los que destaca la aplicación de APH (Hugas y cols., 2002; Garriga y Americh, 2009). Éstos permiten alcanzar las FSO exigidas por la UE y la exigente legislación al respecto de las importaciones cárnicas de algunos países, como EEUU y Japón. Estos nuevos métodos de conservación se han ido implantando como barreras adicionales o reemplazando los tradicionales métodos de conservación (Devlieghere y cols., 2004). Sin embargo, a pesar de las múltiples ventajas que presentan estas nuevas alternativas, también pueden ocasionar una serie de cambios en detrimento de la calidad, lo cual, podría limitar su aplicación (Hugas y cols., 2002; Devlieghere y cols., 2004; Bover-Cid y cols., 2011).

#### *2.1.1.3.1 Tecnología del deshuesado y loncheado del jamón.*

Una vez finalizado el procesado del jamón curado, el loncheado del mismo requiere seguir los pasos que indica la figura 1. Previamente al loncheado, es necesario el deshuesado y prensado de las piezas para darle una forma más compacta y regular. En general, la preparación de jamón deshuesado conlleva una manipulación importante del producto, por lo que, ha sido objeto de mecanización para facilitar las etapas de extracción de los huesos y el prensado. Y su “acondicionamiento”, para lo cual se mantiene en una cámara de congelación la noche anterior a una temperatura de -5 °C y -6 °C, con el fin de facilitar su corte en frío, lo que permite obtener lonchas finas.

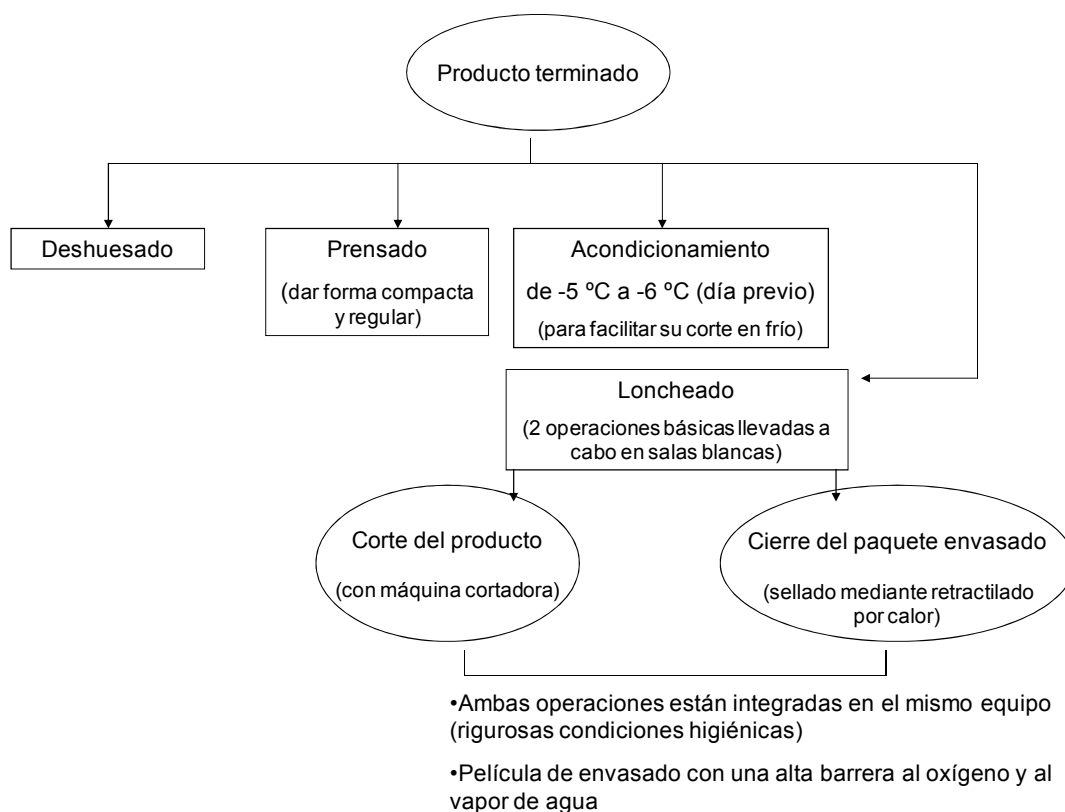
El loncheado se realiza en una sala “blanca” a la que el jamón llega desde la antesala de acondicionamiento. La preparación de los loncheados de jamón consta de dos operaciones básicas:

Corte del producto, una vez que el jamón deshuesado accede a la sala a través de una cinta transportadora o en carros, se carga en la plataforma de la máquina cortadora. El centro o bloque de jamón es seccionado transversalmente mediante cuchillas circulares o mediante una guillotina. Las porciones son colocadas sobre la película inferior, denominada “film de base” de forma escalonada, que es el formato estándar para el envasado a vacío. El grosor suele ser de 1.2-1.5 mm, y se intercala entre ellas un interleaver (separador) de polietileno (PE) o papel para evitar que las lonchas envasadas a vacío se adhieran y rompan al extraerlas del envase.

Cierre del paquete envasado, generalmente va integrado en línea con la cortadora por razones higiénicas (impedir manipulaciones y contaminaciones), y para evitar que las lonchas se resequen si no se envasan inmediatamente. El sellado se realiza mediante retractilado por calor, utilizando unos rodillos calientes o una barra térmica que sueldan los bordes del paquete a 85 °C durante 1-2 segundos. El plástico al tener “memoria térmica” encoge enseguida y recubre el contorno de la barqueta que contiene el jamón. Seguidamente, un sistema de corte consistente en unas mordazas separa las bolsas que caen a la mesa, donde se comprueba si hay algún defecto.

En el caso de los loncheados, la operación de corte y de envasado suelen ir integradas en el mismo equipo, lo cual permiten mantener unas condiciones de higiene rigurosa, y ofrecer un producto con un aspecto y calidad cada vez más atractivos. En ambos casos, el tipo de película de envasado es importante priorizando un envase retráctil y resistente en el jamón deshuesado, y una alta barrera al oxígeno y al vapor de agua en los formatos loncheados.

**Figura 1.** Esquema de los diferentes pasos para el loncheado y envasado a vacío del jamón curado.



Fuente: Elaboración propia adaptado de Ventanas, (2012).

El envasado del jamón curado loncheado preparado para ser expuesto directamente en los lineales de los supermercados, se hace según 2 tipos: el envasado a vacío y el envasado en atmósferas modificadas (MAP). En la tabla 2 se resumen los principales sistemas de envasado que existen en la actualidad.

**Tabla 2.** Principales sistemas de envasado en jamón curado.

---

### Envasado a vacío

- Bolsa retráctil
- Pouch o bolsa rígida
- Termoformado
- Sistema Skin
- Sistema Darfresh

## **Envasado en atmósfera modificada**

- Slicepack
  - Termoformado rígido
- 

Fuente: a partir de Frigola y Ayuso, (2004) y Cilla, (2005).

En el envasado a vacío a su vez hay dos opciones: el termoformado (flexible o rígido), y el sistema denominado envasado a “skin” o doble piel. La tendencia ha sido ir pasando del termoformado flexible al rígido, y actualmente, hacia el envasado a vacío en “skin” y en MAP. El envasado en MAP es un formato que va ganando terreno progresivamente, en comparación con el envasado a vacío, ya que, permiten una presentación más próxima a la del jamón cortado por el método tradicional, y resuelven los problemas de la adherencia de las lonchas. Sin embargo, el principal inconveniente es que su vida útil es más corta que en el envasado a vacío (García-Esteban y cols., 2004; Cilla y cols., 2006; Parra y cols., 2010). El envasado a vacío aumenta el control higiénico, conserva la apariencia visual, y reduce las pérdidas por evaporación (Hugas y Garriga., 1987). El material que normalmente se utiliza en el envasado a vacío es un material multilaminar de calidad alimentaria; que suele contener polietileno (PE) en la parte externa, que es soldable por el calor, etilén vinil alcohol (EVOH) en las intermedias por su alta barrera al oxígeno y al vapor de agua, y poliamida (PA) en el interior que ofrece muy buena resistencia. Pero las opciones son numerosas, como una película compuesta por una capa de LDPE (polietileno de baja densidad) en contacto con el alimento, seguida de varias capas de etil vinil acetato (EVA), y una de cloruro de vinilideno (VDC) en el exterior (Rivas-Cañedo y cols., 2009a).

### *2.1.1.3.2 Influencia de las altas presiones hidrostáticas (APH).*

Además de la influencia de los factores previamente comentados, la calidad de los jamones curados puede verse también comprometida por diversos factores extrínsecos a la materia prima o al proceso de elaboración. Si tenemos en cuenta las nuevas tendencias de mercado en el jamón Ibérico, y la influencia que pueden tener estos factores sobre la calidad final, resulta

necesario llevar a cabo su control y estudio. Entre ellos se encuentra la aplicación de tratamientos de conservación, como son las APH. Las APH es una tecnología muy prometedora para la conservación de productos cárnicos loncheados, tanto crudos curados como cocidos, con una gran aceptación entre los consumidores (Hugas y cols., 2002). Se ha convertido en una de las tecnologías emergentes para procesar alimentos que más ha crecido en los últimos años, y en la actualidad, es reconocida en todo el mundo y se ha convertido en una herramienta muy útil para las empresas exportadoras de productos cárnicos envasados.

El procesado de alimentos por altas presiones está clasificado como una pasteurización no térmica y procesado mínimo. Generalmente, se realiza a temperaturas entre 5 y 12 °C y tiene como principal objetivo la inactivación de microorganismos y enzimas, aunque puede ser usada también en la creación de nuevas texturas, conceptos y productos. El procesado mediante las APH es llevado a cabo, mayoritariamente, en los alimentos dentro de su envase final flexible. El fundamento de la técnica es someter a los alimentos envasados e introducidos dentro de una vasija de acero a una presión hidrostática que industrialmente puede llegar a los 6.000 bares (600 MPa), y usando el agua como medio transmisor (Nunes y Grébol, 2011). La presión aplicada a los alimentos actúa de forma instantánea y uniforme en todos los puntos del alimento, independientemente de sus dimensiones, su composición y de su forma (Smelt, 1998). En los últimos años, los productos cárnicos y sus derivados listos para el consumo han sido los principales beneficiados de esta tecnología. Así, jamón curado loncheado, cortes de pollo o pavo, platos listos para su consumo inmediato, o incluso piezas completas de jamón, son tan sólo algunos de los ejemplos de productos procesados por APH que pueden encontrarse actualmente en el mercado. La tecnología de las APH presenta numerosas ventajas frente a otras técnicas de conservación, lo que ha derivado en un gran éxito de implantación en la industria alimentaria. Entre las ventajas que presenta podríamos destacar las siguientes (Grèbol, 2010):

1. Presenta una gran eficacia para minimizar los riesgos asociados a patógenos y a parásitos, y para inactivar microorganismos alterantes. El procesado por altas presiones es una intervención de letalidad validada

- y probada sobre *Listeria*, *E. Coli*, *Salmonella*... ideal para productos de alto riesgo de contaminación como loncheados, en tiras o dados.
2. Es potencialmente aplicable a muy diversas matrices alimentarias: productos cárnicos cocidos o curados, productos lácteos, platos preparados, frutas, vegetales, moluscos bivalvos ...
  3. Tiene un impacto sensorial y nutricional mínimo sobre los alimentos que han sido utilizados para comercializarlos, destacando sobre todo el "sabor fresco".
  4. Es un proceso no térmico lo que permite su aplicación en alimentos que se alteran tras la aplicación de un tratamiento térmico.
  5. Permite cumplir las exigencias establecidas por las autoridades sanitarias de países como EEUU o Japón, al minimizar el riesgo frente a *Listeria monocytogenes* en productos "ready to eat" (RTE). En este sentido, presiones entre 500 y 600 MPa durante 1-5 min, reducen en varias unidades logarítmicas la contaminación microbiológica (bacterias ácido lácticas, mohos, levaduras, bacterias psicotróficas), y de patógenos (*Listeria*, *E.coli*, *Salmonella*...) en productos cárnicos.
  6. El proceso puede utilizarse en productos envasados a vacío y/o en atmósfera modificadas.
  7. Elimina la necesidad de añadir conservantes al asegurar la eliminación de la flora vegetativa patógena y alterante, junto a la imposibilidad de una contaminación cruzada posterior al tratarse de un proceso post-ensado.

Si bien se ha demostrado la efectividad de las APH sobre la calidad microbiológica en productos cárnicos loncheados y envasados, como el jamón cocido (Jofré y cols., 2008 y 2009; Han y cols., 2011; Hereu y cols., 2012) o el jamón curado (Hereu y cols., 2009; Bover-Cid y cols., 2011 y 2012), también se ha puesto de manifiesto la repercusión que la aplicación de este tratamiento tiene sobre la calidad sensorial y tecnológica de la carne y los productos cárnicos (Campus, 2010). Se han observado alteraciones en el color que podrían deberse a alteraciones en la molécula de mioglobina o al importante impacto sobre la estructura de las proteínas miofibrilares (Carlez y cols., 1995; Goutefongea y cols., 1995). En este sentido son numerosos los estudios que

recientemente se han llevado a cabo en relación a los efectos que tienen las APH sobre diferentes parámetros relacionados con la calidad, en los cuales se han descrito el efecto que tienen diferentes tratamientos sobre el color de la carne y los productos cárnicos (McArdle y cols., 2010; Bak y cols., 2012a,b). Otras investigaciones se han centrado en productos crudos curados para evaluar su influencia sobre la calidad mediante el análisis del perfil de compuestos volátiles en productos como el salchichón y el jamón curado (Rivas-Cañedo y cols., 2009a,b) o mediante su aplicación en diferentes etapas del procesado del jamón curado, y estudiar así, su impacto sobre la actividad antioxidante de determinadas enzimas (Serra y cols., 2007a), o sobre las características relacionadas con la calidad sensorial del mismo (Serra y cols., 2007b)

También es importante destacar que la utilización de las APH para el tratamiento de productos cárnicos curados una vez ya loncheado y envasado a vacío está cada vez más extendida, al ser un formato de consumo que se ha generalizado de manera importante en los últimos años. En este sentido, en un estudio llevado a cabo por Campus y cols., (2008) en lomo curado loncheado, observaron que tratamientos de 300 MPa implicaban una reducción de los fenómenos de proteólisis, como consecuencia de una disminución en la actividad de determinadas enzimas, en concreto de aminopeptidasas y dipeptidilpeptidasas. Asimismo, Clariana y cols., (2011) describen cómo en jamón curado loncheado, un tratamiento de APH de 600 MPa mantiene la estabilidad oxidativa de los lípidos, consigue una efectiva reducción microbiológica, y provoca modificaciones en el color, en la textura y en el flavor. Por el contrario, de Alba y cols., (2012) observaron que las modificaciones en el color y la textura de las lonchas de jamón se debían principalmente al efecto del tiempo de almacenamiento, más que al efecto del tratamiento con APH a 400 y 600 MPa. Más recientemente, Clariana y cols., (2012) describieron en función de la dosis aplicada (400 o 900 MPa) un efecto diferente sobre la actividad antioxidante de determinadas enzimas, y al igual que anteriores estudios, describen un aumento en la luminosidad, en la dureza y en el sabor salado percibido en las muestras tratados con APH.

En el caso concreto de los productos curados derivados del cerdo Ibérico, el efecto del tratamiento con APH sobre loncheados se ha estudiado de



forma más limitada. En relación a la alteración de las características organolépticas como el color, se ha relacionado la aplicación de las APH con incrementos de la luminosidad de la lonchas de jamón (Andrés y cols., 2004a y 2006), así como, con descensos en la intensidad del color rojo de la lonchas tanto de jamón como de lomo curados de cerdo Ibérico (Andrés y cols., 2004a y 2006; Cava y cols., 2009, respectivamente) siempre medido con métodos instrumentales. Asimismo, se han llevado a cabo investigaciones para evaluar su impacto sobre la estabilidad oxidativa, en los que se constatan, que las APH tienen un escaso efecto sobre la oxidación de lípidos a dosis inferiores a los 300 MPa, pero este efecto, se incrementa proporcionalmente a dosis superiores en loncheados de jamón Ibérico (Andrés y cols., 2004a y 2006). Igualmente, Cava y cols., (2009) observaron que a medida que la presión se incrementaba las APH comprometían la estabilidad lipídica, tras la evaluación de la estabilidad oxidativa de lípidos y proteínas en loncheados de jamón y lomo Ibéricos.

Las APH aceleran la formación y la ruptura de hidroperóxidos, y por tanto, las reacciones en cadena involucradas en la oxidación de lípidos (Cheftel y Culioli, 1997). Además, estos autores manifiestan que las APH son causantes de la alteración del tejido muscular, el cual, favorece el efecto catalítico de promotores de la oxidación como metales de transición.

#### *2.1.1.3.3 Influencia de la temperatura de consumo.*

La temperatura de consumo de un alimento es un factor determinante que afecta de manera importante al grado de aceptación o preferencia por parte del consumidor. Incluso, un consumidor podría rechazar un alimento si la temperatura de consumo no es la apropiada o la esperada (Ryynänen y cols., 2001). En función del alimento, la temperatura habitual de consumo es muy diferente, así, el consumo de helado se considera más agradable frío, mientras las patatas fritas resultan más agradables templadas. No obstante, otros productos pueden consumirse a temperaturas diferentes, dependiendo del contexto y cultura. Por ejemplo la mayonesa, se puede consumir fría en ensaladas, pero también puede acompañar a alimentos calientes, como las patatas fritas. Además del mayor o menor grado de aceptabilidad, la

temperatura de consumo puede repercutir de forma importante en la dinámica de liberación compuestos volátiles, y por tanto, en la calidad del aroma y del flavor percibidos (Ryynänen y cols., 2001). En este sentido, autores como Engelen y cols., (2003) observaron en alimentos semi-sólidos cambios dramáticos en la liberación de compuestos volátiles, lo que se ha relacionado en parte, con que la temperatura esté ligeramente por encima o por debajo de los puntos de fusión de la grasa. Fenómenos relacionados con la fusión de la grasa a temperaturas elevadas podría estar relacionado con modificaciones en la firmeza de determinados productos cárnicos (Ryynänen y cols., 2001). Del mismo modo, Ventanas y cols., (2010a) observaron en sistemas modelo cárnicos, cómo un incremento en la temperatura de consumo puede afectar tanto a las propiedades reológicas de la matriz, como a las propiedades termodinámicas de los compuestos volátiles, determinando un incremento en la volatilidad de dichos compuestos.

En el caso concreto de los productos curados del cerdo Ibérico, y del jamón curado en particular, al ser un producto con un alto contenido graso y con unas características de la grasa muy particulares en cuanto a composición (alto contenido en AGMI), la temperatura de consumo podría condicionar las características físicas de esta grasa, y en consecuencia, su efecto sobre la dinámica de liberación/retención de los compuestos volátiles, al afectar tanto a su volatilidad como a su transferencia desde la matriz al ambiente. Teniendo en cuenta que la grasa es un componente esencial y con enorme trascendencia en la calidad del jamón curado Ibérico, resultaría de gran interés evaluar cómo las modificaciones de la temperatura de consumo afectan a sus características, y en definitiva, a las propiedades sensoriales relacionadas con ésta.

## **2.2 EVALUACIÓN SENSORIAL EN PRODUCTOS CÁRNICOS CURADOS DERIVADOS DEL CERDO IBÉRICO.**

La calidad alimentaria de acuerdo con la oficina de Alimentación de la BEUC se define como: “*Satisfacción de las necesidades de los consumidores en su conjunto, confirmado por una compra repetida por parte de los mismos*” (Hernández-Gimeno, 2002). Matizando esta definición, la calidad de un

alimento se refiere al grado de excelencia del mismo, e incluye todas las características destacables y que lo hacen aceptable (Vaclavik, 2002). No obstante, definir qué es calidad de un alimento es una tarea difícil, puesto que se trata de un término subjetivo. Para los consumidores es una manera de asegurar que el alimento reúne una serie de características específicas que se van a mantener en el tiempo. En general, los consumidores demandan productos de calidad frescos, nutritivos, con buena apariencia, saludables, sabrosos, pero en primer lugar, y por encima de todo, demandan alimentos seguros (Anklam y Bataglia, 2001).

Entre los factores más destacables englobados en el concepto de calidad de los alimentos se encuadran las características sensoriales. La valoración sensorial es una función primaria del hombre que ya desde la infancia le lleva a aceptar o rechazar, consciente o inconscientemente, los alimentos de acuerdo con las sensaciones apreciadas al observarlos y/o ingerirlos (Costell y Durán, 1981). Sin embargo, las sensaciones que motivan este rechazo o aceptación varían con el tiempo y el momento en que se perciben, dependen tanto de la persona como del entorno. De ahí, la dificultad de que con determinaciones de valor tan subjetivo, se puede llegar a tener datos objetivos y fiables para evaluar la aceptación o rechazo de un producto alimentario. Por eso es lógico, que en las técnicas de control de calidad de los productos alimentarios, sea de gran importancia conseguir definir mediante parámetros objetivos estas sensaciones subjetivas que experimentarán los consumidores de los alimentos (Sancho y cols., 1999). El análisis sensorial se define en sentido amplio, como un conjunto de técnicas de medida y evaluación de determinadas propiedades de los alimentos, a través de uno o más de los sentidos humanos (Tilgner, 1971).

El objetivo del análisis sensorial es medir todas aquellas propiedades de los alimentos que son captadas por los sentidos antes y durante su ingestión, es decir, definir lo que se conoce como “calidad sensorial” (Costell y Durán, 1981). En la sociedad actual donde las necesidades nutritivas básicas están cubiertas, el principal problema que se plantea es elegir entre una oferta muy amplia de productos, adquiriendo de este modo la calidad sensorial cada vez más importancia. Así pues, el concepto actual de calidad contempla no solo la seguridad, sino además, la satisfacción sensorial del consumidor.

El análisis sensorial es una herramienta más de Control de Calidad Total de la empresa, y por consiguiente, irá en el mismo sentido en que éste se desarrolle. Así, se puede considerar que se dirigirá a la Evaluación, Análisis y Control, tanto del proceso de fabricación, como del producto o del mercado en el que se incide (Costell y Durán, 1981). Ésta se considera una herramienta imprescindible, que permite obtener información sobre algunos aspectos de la calidad de los alimentos a los que no se puede tener acceso con otras técnicas analíticas. Aportando de este modo una valiosa información, ya que, permite un conocimiento más completo de las características de los alimentos, y posibilita su adecuada elaboración con objeto de satisfacer el gusto de los consumidores a los que van destinados.

### *2.2.1 Tipos de pruebas en el análisis sensorial.*

Hay un gran número de pruebas sensoriales de distintas características y diferente campo de aplicación. Existen diversos criterios que se pueden usar para agruparlas, uno de los más útiles es considerar el tipo de información que proporcionan. De acuerdo con este criterio, las pruebas sensoriales se pueden clasificar en: discriminatorias, descriptivas y de preferencia-aceptación (Tabla 3). Una vez establecido correctamente la naturaleza del problema, la elección de la prueba debe estar ligada al grado de confianza exigido, a la naturaleza de las muestras, y a la disponibilidad de las personas (Norma UNE 87008:1992).

Dentro de las *pruebas discriminatorias* se encuentran entre otras, la prueba triangular, la prueba dúo-trío y la prueba de comparación pareada (Lawless y Heymann, 1998). El objetivo es detectar entre las muestras evaluadas la presencia o ausencia de diferencias sensoriales (en uno o más atributos). Por lo tanto, este tipo de pruebas son idóneas para examinar la homogeneidad de una producción, para el control de una nueva tecnología de fabricación, así como, las consecuencias de algún cambio en la materia prima o en la formulación (Tuoraille, 1990).

Por el contrario, las *pruebas descriptivas* intentan identificar (describir) y medir las diferencias que puedan existir entre los productos (Meilgaard y cols., 1991; Lawless y Heymann, 1998). En este tipo de pruebas descriptivas para

cuantificar las diferencias entre los productos, los catadores establecen y utilizan descriptores (atributos) para identificar las características sensoriales.

El perfil sensorial de un producto lo constituye el conjunto de puntuaciones o intensidades otorgadas a las características sensoriales relacionadas con el aspecto, el olor, la textura y el flavor. Este tipo de pruebas implica un entrenamiento previo de los catadores, pues requiere catadores con buenas aptitudes sensoriales y capacidad para reconocer, memorizar y puntuar las características del producto de forma coherente. Existen varias técnicas descriptivas que en general reflejan diferentes filosofías y formas de abordar la descripción sensorial (perfiles de flavor, perfiles de textura, análisis descriptivo cuantitativo, perfil de libre elección) (Murray y cols., 2001).

Normalmente, estas técnicas de análisis descriptivo permiten obtener descripciones objetivas de los productos en términos de los atributos sensoriales percibidos. En función de la técnica utilizada, la descripción puede resultar más o menos rigurosa, así como más o menos cualitativa o cuantitativa (Lawless y Heymann, 1998). Además de obtener descripciones sensoriales completas de los productos, estas técnicas ayudan a identificar variables de proceso o formulación, y a establecer qué atributos sensoriales son importantes desde el punto de vista de la aceptación del producto. También son empleadas en diferentes estudios para establecer correlaciones entre éstas y las medidas instrumentales.

Por último, las *pruebas hedónicas o afectivas* son llevadas a cabo por paneles de consumidores, y por tanto, por sujetos no entrenados. Estas técnicas son útiles para conocer el grado de satisfacción o aceptación de los consumidores en relación con los productos, así como, los productos que resultan preferidos (Lawless y Heymann, 1998). Estos estudios de consumidores, se pueden llevar a cabo en las diferentes etapas del ciclo de vida de un producto: para la selección de prototipos con mayor aceptación (etapa de desarrollo), para su comparación frente a productos competidores (etapas de mantenimiento), y finalmente, en la etapa de mejora/optimización del producto. En estas pruebas hedónicas el panel de consumidores debe estar constituido por una muestra representativa del segmento de población al que está dirigido el producto (consumidores representativos), en términos de datos demográficos y consumo del producto (Lawless y Heymann, 1998).

**Tabla 3.** Tipo de pruebas para el análisis sensorial.

<b>Planteamiento</b>	<b>Prueba</b>	<b>Tipo de prueba</b>
Es una cuestión sobre si difieren los productos	Discriminantes	"A" O "no A" Triangular Duo-Trío Comparación pareada Otras
Es una cuestión sobre qué difieren los productos	Descriptivas	Perfil de flavor Perfil de libre elección Análisis cuantitativo descriptivo (ACD) Perfil tiempo-intensidad (TI) Otras
Es una cuestión sobre la aceptación del consumidor	Afectivas	Preferencia Grado de aceptación Ordenación Otras

Fuente: Elaboración propia a partir de datos de la Norma UNE 87008:1992 y Lawless y Heymann, (1998).

Las pruebas descriptivas, y particularmente el análisis cuantitativo descriptivo (ACD) (Stone y cols., 1974), son las pruebas sensoriales que se han aplicado de forma más extensa al estudio de la calidad sensorial de la carne y los productos cárnicos, en general, y en los derivados del cerdo Ibérico, en particular (Tabla 4).

**Tabla 4.** Resumen de los diferentes trabajos que emplean la técnica de ACD para la evaluación de la calidad sensorial en productos cárnicos curados derivados del cerdo Ibérico (n= número de catadores que conforman el panel), ordenados cronológicamente.

<b>Factor</b>	<b>Panel, Atributos</b>	<b>Referencia</b>
Tiempo de procesado	n=14, 20	Ruiz y cols., 1998c
Sistema de explotación y tipo de músculo	n=14, 20	Cava y cols., 2000
Contenido y composición en ácidos grasos de la grasa	n=14, 7	Ruiz y cols., 2000
Sistema de explotación y cruce	n=18, 24	Carrapiso y cols., 2003
Alimentación	n=18, 18	Muriel, 2003
Contenido en sal y condiciones de procesado	n=12, 20	Andrés y cols., 2004b
Línea genética	n=18, 11	Muriel y cols., 2004
Alimentación	n=12, 13	Ventanas y cols., 2007c
Genotipos	n=14, 20	Ramírez y Cava, 2007
Alimentación, sistema de explotación y cruce	n=12, 19	Ventanas y cols., 2007b
Línea genética	n=18, 24	Carrapiso y García, 2008
Alimentación	n=14, 18	Pérez-Palacios y cols., 2010

Fuente: Elaboración propia.

Del mismo modo se ha aplicado para evaluar la influencia de diferentes factores post-procesado, tales como, las condiciones de almacenamiento (Cilla y cols., 2006), el empleo técnicas de conservación; como el tratamiento con APH (Clariana y cols., 2011 y 2012) y sistemas de irradiación (Jin y cols., 2012)

en la calidad sensorial de productos loncheados derivados de cerdos comerciales, tanto de jamón como de paletas. Sin embargo, los trabajos desarrollados en loncheados de jamón Ibérico son más limitados (Parra y cols., 2010).

En el desarrollo de una prueba sensorial descriptiva distinguimos tres etapas diferenciadas (Lawless y Heymann, 1998): (i) una primera etapa de familiarización con los productos a evaluar, (ii) una segunda etapa cualitativa, basada en la identificación de descriptores que permiten definir el conjunto de características sensoriales que permiten discriminar un producto de otros del mismo tipo, (iii) y una tercera etapa cuantitativa, que se basa en la asignación de puntuaciones, evaluando la intensidad de cada descriptor, es decir, la impresión más o menos pronunciada registrada por el sujeto sobre un elemento de la percepción global. En el caso concreto del ACD, el objetivo es caracterizar y cuantificar los atributos perceptibles en un alimento o ingrediente sin limitaciones, referidas al tipo de producto o a la propiedad sensorial que se evalúa. Por lo tanto, se debería considerar que la técnica de ACD precisa que los catadores deberían ser consumidores habituales de esa clase de productos.

Un panel típico está compuesto por 10-12 personas, las cuales, han demostrado su habilidad para trabajar en grupo. El entrenamiento del panel comienza con el proceso de desarrollo del lenguaje, y su objetivo principal es la preparación de la hoja de cata del producto. El panel trabaja en conjunto para el desarrollo del lenguaje que describe los atributos perceptibles del producto. Esta etapa consta de la generación, selección y normalización de los descriptores. Se requiere un acuerdo entre todos los integrantes del panel. Una vez finalizada esta etapa cualitativa, se pasa a la etapa cuantitativa, en la que cada panelista de forma individualizada mide la intensidad de los atributos seleccionados empleando sistemas escalares. Lo más frecuente es emplear escalas horizontales de 10 cm no estructuradas, y cuyos extremos están definidos con términos seleccionados adecuadamente en función del atributo a evaluar.



### *2.2.2 Técnicas dinámicas de análisis sensorial: Tiempo-intensidad.*

La percepción del flavor y de la textura de un producto son fenómenos dinámicos que se modifican durante el consumo del mismo, por lo que, para su máxima comprensión necesitamos disponer de métodos dinámicos de evaluación sensorial (Piggot, 2000). En este sentido, se han desarrollado distintas técnicas descriptivas de evaluación sensorial, entre ellas la técnica tiempo-intensidad (TI), que permite una monitorización de la intensidad percibida a lo largo del tiempo de consumo del producto. El método TI, es un tipo de evaluación sensorial que consiste en registrar la evolución con el tiempo de la intensidad percibida. El objetivo es conocer la intensidad de un atributo, además de su variación a lo largo del tiempo, así como, las tendencias que puedan esperarse. En definitiva, la respuesta de los catadores va a ser registrada en todo momento, observando la evolución del atributo evaluado a lo largo del tiempo (Cliff y Heymann, 1993).

De acuerdo con Dijksterhuis y Piggott, (2001), este tipo de técnicas dinámicas (TI) en comparación con las técnicas estáticas, donde los catadores deben integrar la intensidad percibida y proporcionar un único valor sobre una escala (Lee y Pangborn, 1986), ofrecen una información más real. Los primeros estudios fueron desarrollados por Sjöström (1954) y Jellinek (1964) para evaluar el flavor y el sabor amargo percibido en la cerveza. A partir de ese momento, el empleo de la técnica TI ha estado muy extendido en una gran variedad de productos como se muestra en la tabla 5. Del mismo modo y de acuerdo con la bibliografía, esta técnica se ha utilizado ampliamente en productos lácteos (Tabla 6).

**Tabla 5.** Resumen de las diferentes aplicaciones de la técnica TI para la evaluación de parámetros relacionados con el sabor y la textura de una gran variedad de productos, ordenados cronológicamente.

<b>Referencia</b>	<b>Producto</b>	<b>Evaluación</b>
Pangborn y Koyasako, 1981	Pudding	Viscosidad
Ott y Palmer, 1990	Azúcar	Sabor dulce
Matysiak y Noble, 1991	Solución de naranja	Flavor
Issanchou y Porcherot, 1992	Agua y cerveza	Amargor
Guirnard y Marty, 1995	Geles	Flavor
Elmore y Langley., 1996	Alimentos líquidos	Flavor
Linforth y cols., 1999	Geles de gelatina	Flavor
Piggot y cols., 2000	Whisky	Sabor dulce
Pålsgård y Dijksterhuis, 2000	Geles	Flavor
Valentová y cols., 2002	Vino/Bermú/Bebidas	Astringencia
Guirnard y cols., 2002	Postres salados	Flavor
Weel y cols., 2002	Geles proteicos	Flavor
Harker y cols., 2003	Zumo de frutas	Jugosidad
Sinesio y cols., 2005	Aceite de oliva	Amargor y acritud
François y cols., 2006	Cerveza	Astringencia
Kostyra y Barylko-Pikielna, 2007	Mahonesa tipo emulsión	Flavor
Potineni y Peterson, 2008	Goma de mascar	Sabor dulce y canela
Mosca y cols., 2010	Geles	Sabor dulce
Sokolowky y Fischer., 2012	Vino blanco	Amargor

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 6.** Resumen de los diferentes trabajos que aplican la técnica TI para la evaluación sensorial de lácteos y derivados lácteos, ordenados cronológicamente.

<b>Referencia</b>	<b>Producto</b>	<b>Evaluación</b>
Birch y Ogunmoyela, 1980	Chocolate caliente	Flavor
Delahunty y cols., 1994	Queso	Flavor
Tuorila y cols., 1995	Yogurt	Flavor
Li y cols., 1997	Helado	Flavor
Brauss y cols., 1999	Yogurt	Flavor
Crouregelongue y cols., 1999	Leche de soja	Astringencia
King y cols., 2000	Yogurt	Sabor dulce y metálico
Wendin y cols., 2000	Crema de queso	Textura y flavor
Chung y cols., 2003	Helado	Flavor
Hyvönen y cols., 2003	Helado	Flavor
Miettinen y cols., 2003	Leche	Flavor
Lethuaut y cols., 2004	Postres lácteos	Flavor

Pionnier y cols., 2004	Queso	Flavor
Miettinen y cols., 2004	Sistemas lácteos	Flavor
Frøst y cols., 2005	Helado	Flavor
González-Tomás y cols., 2007	Cremas lácteas	Flavor
Melo y cols., 2007	Chocolate con leche	Sabor dulce
Cadena y Bolini., 2011	Helado	Flavor
de Loubens y cols., 2011	Geles lácteos	Sabor salado

---

Fuente: Elaboración propia.

En relación al empleo de este tipo de técnicas dinámicas en productos cárnicos, los estudios realizados son más restringidos, como se refleja en la tabla 7. Los primeros trabajos aplicaron la técnica TI para evaluar la terneza de la carne durante la masticación (Duizer y cols., 1993). En los últimos años, su empleo ha sido implementado a diferentes productos cárnicos para evaluar la influencia de diversos factores entre los que se encuentra, el contenido en grasa, la influencia de la temperatura oral, la temperatura de consumo, y el contenido en sal (Tabla 7). Por el contrario, su aplicación en productos cárnicos curados hasta la fecha es inexistente.

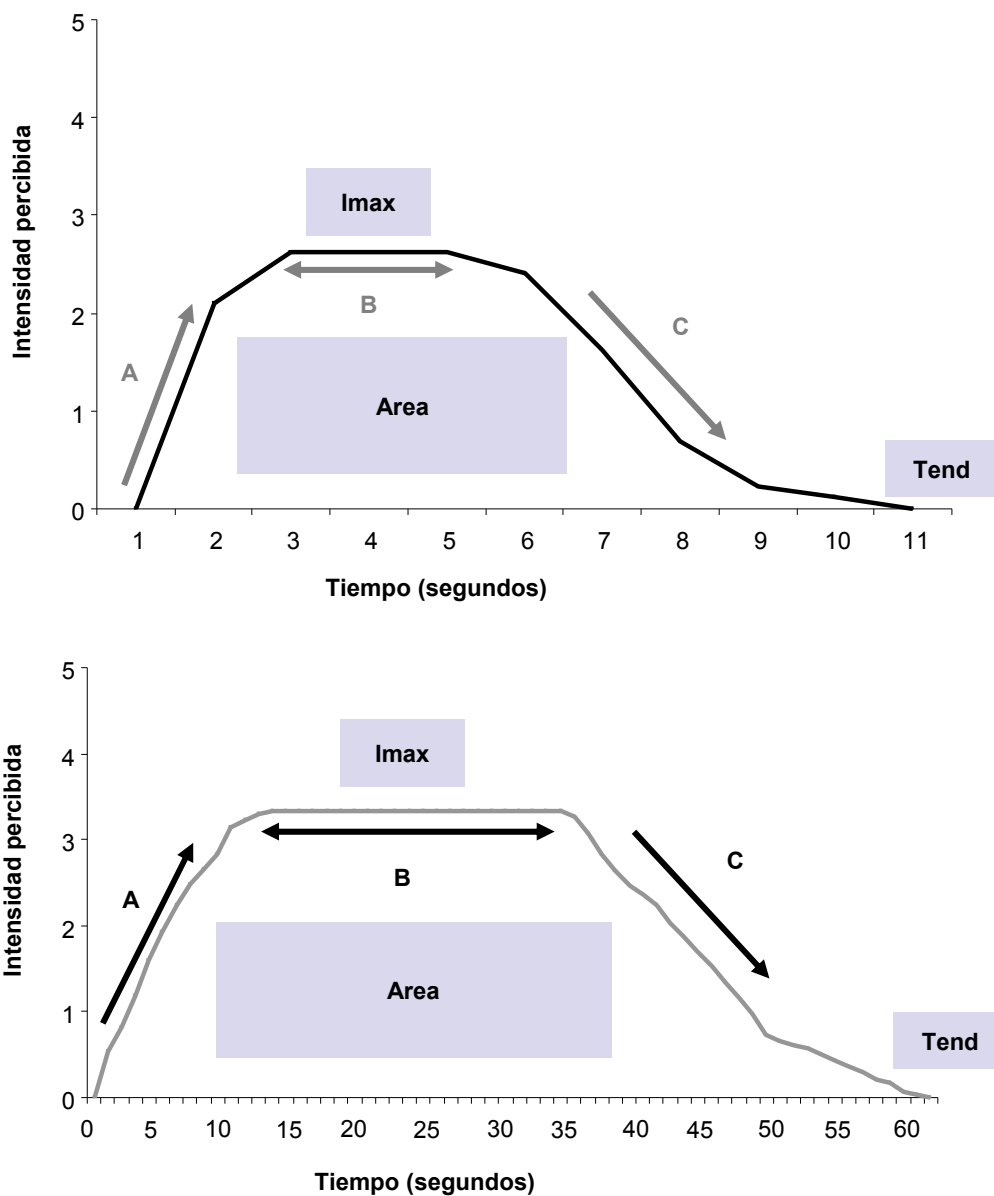
**Tabla 7.** Bibliografía referente al empleo de la técnica TI para el análisis sensorial de carne y productos cárnicos, ordenados cronológicamente.

<b>Referencia</b>	<b>Producto</b>	<b>Evaluación</b>
Duizer y cols., 1993	Ternera	Terneza
Zimoch y Gullett, 1997	Ternera	Terneza y jugosidad
Emrick y cols., 2005	Hamburguesas de pollo	Flavor
Bertram y cols., 2006	Jamón cocido	Sabor salado
Reinbach y cols., 2007	Hamburguesas de cerdo	Flavor
Reinbach y cols., 2009	Hamburguesas de pollo	Temperatura
Ventanas y cols., 2010b	Salchichas tipo bolonia	Flavor y textura

Fuente: Elaboración propia.

El empleo de la técnica TI permite obtener gráficos denominados curvas tiempo-intensidad (Curvas TI) (Figura 2) donde el tiempo de evaluación queda representado sobre el eje de abscisas-x, y la intensidad percibida sobre el eje de ordenadas-y. El resultado es una curva donde se puede observar las variaciones en la percepción con el tiempo, reflejado en subidas y descensos de la intensidad percibida (Piggot, 2000).

**Figura 2.** Curvas TI obtenidas tras la recopilación de los datos generados por los catadores en el TI. Sobre el eje de abscisas-x el tiempo de evaluación, y sobre el eje de ordenadas-y la intensidad percibida. (A: fase de ascenso, B: fase de Plateau, C: fase de descenso;  $I_{max}$ : intensidad máxima observada en la curva, Area: área total calculada entre el comienzo y el final del período de evaluación,  $T_{end}$ : tiempo final calculado).



Fuente: Elaboración propia.

A partir de estas curvas TI se pueden extrapolar una serie de parámetros (Tabla 8) que permiten evaluar cuantitativamente esas variaciones o modificaciones temporales, y por tanto, comparar las curvas TI obtenidas para diferentes productos, catadores, sesiones, etc (Cliff y Heymann, 1993). A través de los parámetros extraídos de la curva se puede conocer la velocidad de ascenso y de descenso de la intensidad máxima percibida, la duración de la intensidad percibida, entre otros.

Para la generación de estas curvas el software registra y almacena en tiempo real los datos generados por los catadores, generando una información muy completa y precisa. Sin embargo, hay grandes diferencias individuales entre las curvas generadas por los catadores, requiriéndose un exhaustivo entrenamiento para disminuir las diferencias entre catadores (van Buuren, 1992). En consecuencia, la mayor dificultad radica en disponer de un adecuado panel de catadores entrenados. Por tanto, se recomienda llevar a cabo sesiones previas de entrenamiento específicas para este tipo de análisis, así como, sesiones de confirmación de la utilidad y fiabilidad del panel.

En este tipo de análisis las escalas empleadas tanto para el entrenamiento como para las sesiones de evaluación, son escalas lineales horizontales o verticales, en cuyos extremos pueden aparecer, entre otras, las palabras nada para el extremo izquierdo, y mucho para el extremo derecho.

Una vez introducida la muestra en la boca, la respuesta ante la intensidad percibida es indicada a través del cursor, los catadores lo deslizan a lo largo de la escala hasta que la intensidad percibida desaparece. Tanto el tiempo mínimo de masticación, a partir del cual el panelista debe continuar con su percepción moviendo el cursor a lo largo de la escala, como el tiempo máximo de evaluación, están previamente establecidos. A lo largo de la evaluación, los catadores deben seguir las indicaciones de una serie de mensajes que aparecen en el monitor a unos tiempos fijados. Finalmente, la evaluación concluye una vez que el panelista ha dejado de percibir, y por lo tanto, ha deslizado el cursor hacia el extremo izquierdo o inferior de la escala (nada), o bien, se haya agotado el tiempo máximo establecido para cada sesión. Del mismo modo, se establece un protocolo de limpieza del paladar entre atributo y atributo evaluado, ayudándose de un auxiliar como tostadas sin sal y agua.

**Tabla 8.** Parámetros extraídos de las curvas TI generadas.

<b>General parameters</b>	<b>Parámetros generales</b>
IStart	Intensidad del primer punto obtenido de la curva
IEnd	Intensidad del último punto obtenido de la curva
TStart	Tiempo calculado de comienzo
Tend	Tiempo final calculado
DurT	Duración total
DurSE	Duración entre el tiempo de inicio y el tiempo final
IMax	Intensidad máxima observada en la curva
Area	Área total calculada entre el comienzo y el final del período de evaluación
Area TSE	Área entre el tiempo de inicio y final de la curva
<b>Increasing phase</b>	<b>Fase creciente (si ha sido detectada)</b>
TDInc	Tiempo de inicio de la fase creciente
TEInc	Tiempo final de la fase creciente
DurInc	Duración de la fase de crecimiento
SIMInc	Pendiente máxima medida en la fase de crecimiento si ésta ha sido detectada
TSIMInc	Tiempo de la máxima pendiente en la fase creciente
Arealnc	Área bajo la fase creciente
Taxx	Tiempo correspondiente al xx% de la intensidad máxima (fase creciente)
<b>Plateau</b>	<b>Fase de plateau</b>
TSPI	Tiempo de comienzo de la fase de plateau
TEPI	Tiempo final de la fase de plateau
DurPI	Duración de la fase de plateau



AreaPI	Área bajo la fase de plateau, entre el comienzo y el final de la fase de plateau.
<b>Decreasing phase</b>	<b>Fase de descenso (si ha sido detectada)</b>
TDDec	Tiempo de inicio de la fase de descenso
TEDec	Tiempo final de la fase de descenso
DurDec	Duración de la fase de descenso
SIMDec	Pendiente máxima medida en la fase de descenso si ésta ha sido detectada
TSIMDec	Tiempo de la máxima pendiente en la fase de descenso
AreaDec	Área bajo la fase de descenso
TDxx	Tiempo correspondiente al xx% de la intensidad máxima (fase de descenso)

---

Fuente: Elaboración propia a partir de datos del FIZZ data (manual de referencia, versión 2.47, 2011).

### *2.2.2.1 Entrenamiento del panel para la técnica TI.*

Peyvieux y Dijksterhuis, (2001) describen tres fases en el proceso de entrenamiento de un panel para el empleo del TI:

1. Introducción del método a los catadores. Esta primera fase consiste en una breve introducción o charla acerca de la técnica y del sistema informático.
2. Familiarización con el sistema informático y con el método de evaluación mediante el empleo de disoluciones de los sabores básicos (dulce, salado, amargo, ácido y umami), a concentraciones superiores al umbral de percepción.
3. Entrenamiento del panel con el producto real, que incluye el desarrollo de un perfil sensorial del producto utilizando para ello una técnica sensorial estática tipo ACD, y un entrenamiento específico del producto con la técnica de TI.

El entrenamiento con el producto real en atributos relacionados con la textura y el flavor es más complejo que el entrenamiento llevado a cabo con las disoluciones básicas. Esta tercera fase tiene lugar tras la discusión de la lista de los atributos seleccionados para el producto mediante el ACD. Esto permite observar que atributos son coherentemente usados por panel, para a continuación, evaluar mediante TI atributos relacionados con la textura y el flavor del producto bajo las mismas condiciones en las que se llevarán a cabo las sesiones de cata.

En estas sesiones de entrenamiento con el producto real se establece el protocolo relacionado con el tiempo de evaluación y el tiempo de permanencia del producto en boca, así como, el protocolo de limpieza a llevar a cabo entre atributo y atributo evaluado. El entrenamiento finaliza una vez que los catadores muestren de dos a tres réplicas razonables en las curvas TI. Se consideran buenas réplicas las curvas cuya intensidad no muestra diferencias durante más del 40 % del tiempo.

## BIBLIOGRAFÍA



- Andrés, A. I., Adamsen, C. E., Møller, J. K. S., & Skibsted, L. H. (2004a). High pressure treatment of dry-cured Iberian ham. Effect on radical formation, lipid oxidation and colour. *European Food Research Technology*, 219, 205–210.
- Andrés, A. I., Cava, R., Ventanas, J., Muriel, E., & Ruiz, J. (2004b). Lipid oxidative changes throughout the ripening of dry-cured Iberian hams with different salt contents and processing conditions. *Food Chemistry*, 84, 375–381.
- Andrés, A. I., Adamsen, C. E., Møller, J. K. S., Ruiz, J., & Skibsted, L. H. (2006). High pressure treatment of dry-cured Iberian ham. Effect on colour and oxidative stability during chill storage packed in modified atmosphere. *European Food Research Technology*, 222, 486–491.
- Anklam, E., & Battaglia, R. (2001). Food analysis and consumer protection. *Trends in Food Science & Technology*, 12, 197–202.
- Antequera, T., López-Bote, C. J., Córdoba, J. J., García, C., Asensio, M. A., & Ventanas, J. (1992). Lipid oxidative changes in the processing of Iberian pig hams. *Food Chemistry*, 45, 105–110.
- Antequera, T., García, C., López, C., Ventanas, J., Asensio, M. A., & Córdoba, J. J. (1994). Evolución de distintos parámetros físico-químicos durante la elaboración de jamones ibéricos a partir de credos Ibéricos (100%) e Ibéricos x Duroc (50%). *Revista Española de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 34, 178–190.
- Bak, K. H., Lindahl, G., Karlsson, A. H., Lloret, E., Ferrini, G., Arnau, J., & Orlien, V. (2012a). High pressure effect on the color of minced cured restructured ham at different levels of drying, pH, and NaCl. *Meat Science*, 90(3), 690–696.
- Bak, K. H., Lindahl, G., Karlsson, A. H., & Orlien, V. (2012b). Effect of high pressure, temperature, and storage on the color of porcine *longissimus dorsi*. *Meat Science*, 92, 374–381.
- Bertram, H. C., Wu, Z., Straddt, I. K., Aagaard, M., & Anslyng, M. D. (2006). Effects of pressurization on structure, water distribution, and sensory attributes of cured ham: Can pressurization reduce the crucial sodium content? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9912–9917.
- Birch, G. G., & Ogunmoyela, G. (1980). Effects of surfactants on the taste and flavour of drinking chocolate. *Journal and Food Science*, 45, 981–984.
- Boved-Cid, S., Belletti, N., Garriga, M., & Aymerich, T. (2011). Model for *Listeria monocytogenes* inactivation on dry-cured ham by high hydrostatic pressure processing. *Food Microbiology*, 28, 804–809.
- Boved-Cid, S., Belletti, N., Garriga, M., & Aymerich, T. (2012). Response surface methodology to investigate the effect of high pressure processing on *Salmonella* inactivation on dry-cured ham. *Food Research International*, 45, 1111–1117.
- Brauss, M. S., Linforth, R. S., Cayeux, I., Harvey, B., & Taylor, A. J. (1999). Altering the fat content affects flavour release in a model yogurt system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2055–2059.
- Cadena, R. S., & Bolini, H. M. A. (2011). Time–intensity analysis and acceptance test for traditional and light vanilla ice cream. *Food Research International*, 44, 677–683.
- Campus, M., Flores, M., Martínez, A., & Toldrá, F. (2008). Effect of high pressure treatment on colour, microbial and chemical characteristics of dry cured loin. *Meat Science*, 80, 1174–1181.

- Campus, M. (2010). High pressure processing of meat, meat products and seafood. *Food Engineering Reviews*, 2, 256–273.
- Carlez, A., Veciana-Nogues, T., & Cheftel, J. C. (1995). Changes in colour and myoglobin of minced beef meat due to high pressure processing. *LWT-Food Science and Technology*, 28(5), 528–538.
- Carrapiso, A. I., Jurado, A., Timón, M. L., & García, C. (2002a). Odor-active compounds of Iberian hams with different aroma characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6453–6458.
- Carrapiso A. I., Ventanas J., & García C. (2002b). Characterization of the Most Odor-Active Compounds of Iberian Ham Headspace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1996-2000.
- Carrapiso, A.I., Bonilla, F., & García, C. (2003). Effect of crossbreeding and rearing system on sensory characteristics of Iberian ham. *Meat Science*, 65, 623-629.
- Carrapiso, A. I., & García, C. (2005). Instrumental colour of Iberian ham subcutaneous fat and lean (*biceps femoris*): influence of crossbreeding and rearing system. *Meat Science*, 71, 284–290.
- Carrapiso, A. I. (2007). Effect of fat content on flavour release from sausages. *Food Chemistry*, 103, 396-403.
- Carrapiso, A. I., & García, C. (2008). Effect of the Iberian pig line on dry-cured ham characteristics. *Meat Science*, 80, 529-534.
- Cava, R., Ventanas, J., Ruiz, J., Andrés, A.I. & Antequera, T. (2000). Sensory characteristics of Iberian ham: Influence of rearing system and muscle location. *Food Science and Technology International*, 6(3), 235-242.
- Cava, R., Ladero, L., González, S., Carrasco, A., & Ramírez, M. R. (2009). Effect of pressure and holding time on colour, protein and lipid oxidation of sliced dry-cured Iberian ham and loin during refrigerated storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 76–81.
- Chung, S.J., Heymann, H., & Grün, I. U. (2003). Temporal release of flavour compounds from low-fat and high-fat ice cream during eating. *Journal of Food Science*, 68, 2150–2156
- Cheftel, J. C., & Culioli, J. (1997). Effects of high pressure on meat: A review. *Meat Science*, 46, 211–236.
- Chevance, F. F. V., & Farmer, L. J. (1999). Release of Volatile Odor Compounds from Full-Fat and Reduced-Fat Frankfurters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 5161-5168.
- Chevance, F. F. V., Farmer, L. J., Desmond, E. M., Novelli, E., Troy, D. J., & Chizzolini, R. (2000). Effect of some fat replacers on the release of volatile aroma compounds from low-fat meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3476–3484.
- Cilla, I. (2005). Calidad y vida útil del jamón curado Denominación de Origen Teruel: contenido en grasa, maduración y conservación; actitudes de los consumidores. *Ph Tesis*. Universidad de Zaragoza, España.
- Cilla, I., Martínez, L., Beltrán, J. A., & Roncalés, P. (2006). Dry-cured quality and acceptability as affected by the preservation system used for retail sale. *Meat Science*, 73(4), 581–589.

- Clariana, M., Guerrero, L., Sárraga, C., Díaz, I., Valero, A., & García-Regueiro, J. A. (2011). Influence of high pressure application on the nutritional, sensory and microbiological characteristics of sliced skin vacuum packed dry-cured ham. Effects along the storage period. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12, 456-465.
- Clariana, M., Guerrero, L., Sárraga, C., & García-Regueiro, J. A. (2012). Effects of high pressure application (400 and 900 MPa) and refrigerated storage time on the oxidative stability of sliced skin vacuum packed dry-cured ham. *Meat Science*, 90, 323-329.
- Cliff, M., & Heymann, H. (1993). Development and use of time-intensity methodology for sensory evaluation: A review. *Food Research International*, 26, 375-385.
- Córdoba, J.J., Antequera, T., García, C., Ventanas, J., López-Bote, C., Asensio, M.A. (1994a). Evolution of free amino acids and amines during ripening of Iberian cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2296-2301.
- Córdoba, J. J., Antequera, T., Ventanas, J., López-Bote, C., García, C., & Asensio, M. A. (1994b). Hydrolysis and loss of extractability of proteins during ripening of Iberian ham. *Meat Science*, 37, 217-227.
- Costell, E., & Durán, L. (1981). El análisis sensorial en el control de la calidad de los alimentos II. Planteamiento y planificación: selección de pruebas. *Revista Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 21, 149-165.
- Crouregelongue, S., Schlich, P., & Noble, A. C. (1999). Using repeated ingestion to determine the effect of sweetness, viscosity and oiliness on temporal perception of soymilk astringency. *Food Quality and Preference*, 10, 273-279.
- Cruz J. (2006). Presentado un estudio sobre la actitud del consumidor ante el jamón ibérico con denominación de origen. *Eurocarne*, 148, 19-24.
- De Alba, M., Montiel, R., Bravo, D., Gaya, P., & Medina, M. (2012). High pressure treatments on the inactivation of Salmonella Enteritidis and the physicochemical, rheological and color characteristics of sliced vacuum-packaged dry-cured ham. *Meat Science*, 91, 173-178.
- Decker, E. A., Xiong, Y. L., Calvert, J. T., Crum, A. D., & Blanchard, S. P. (1993). Chemical, physical, and functional-properties of oxidized turkey white muscle myofibrillar proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 186-189.
- Delahunty, C. M., Piggott, J. R., Conner, J. M., & Patterson, A. (1994). Low-fat Cheddar cheese flavour quality; flavor release in the mouth. En Maarse, H., van der Heij, D. G., (eds.). *Trends in Flavour Research* (pp. 47-52). Elsevier, Amsterdam.
- De Loubens, C., Saint-Eve, A., Déléris, I., Panoillé, M., Doyennette, M., Tréléa, I. C., & Souchon, I. (2011). Mechanistic Model To Understand in Vivo Salt Release and Perception during the Consumption of Dairy Gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2534-2542.
- De Roos, K. B. (1997). How lipids influence food flavour. The chemistry of flavour interactions. *Food Technology*, 51(1), 60-62
- De Roos, K. B. (2000). Physicochemical models of flavour release from foods. En D. D. Roberts, & A. J. Taylor (eds.), *Flavour release* (pp. 126-141). ACS: American Chemical Society, Washington DC.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L., & Debevere, J. (2004). New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, 14, 273-285.
- Dijksterhuis, G. B., & Piggott, J. R. (2001). Dynamic methods of sensory analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 284-290.

- Dikeman, M. E. (1987). Fat reduction in animals and the effects on palatability and consumer acceptance of meat products. En *Proceedings of the Reciprocal Meat Conference*, 40, 93-105.
- Duizer, L. M., Gullett, E. A., & Findlay, C. J. (1993) Time-Intensity methodology for beef tenderness perception. *Food Science*, 58, 943-947.
- Elmore, J. S., & Langley, K. R. (1996). Novel vessel for the measurement of dynamic flavor release in real time from liquid foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3560-3563.
- Engelen, L., Wijk, R. A., Prinz, J. F., Janseen, A.M., Weenen, H., & Bosman, F. (2003). The effect of oral and product temperature on the perception of flavor and texture attributes of semi-solids. *Appetite*, 41, 273-281.
- Emrick, M., Penfield, M. P., Bacon, C. D., Van Laack, R. L., & Breeke, C. J. (2005). Heat intensity and warmed-over flavour in precooked chicken patties formulated at 3 fat levels and 3 pepper levels. *Journal of Food Science*, 70, S600-S604.
- Estévez, M., Morcuende, D., Ventanas, J., & Ventanas, S. (2005c). Mediterranean products. En F. Toldrá (eds.). *Handbook of Fermented meat and poultry* (pp. 393-405). Blackwell publishing, Iowa, EEUU.
- Estévez, M., Ventanas, S., & Cava, R. (2005a). Physicochemical properties and oxidative stability of liver pâté as affected by fat content. *Food Chemistry*, 92, 449-457.
- Estévez, M., Ventanas, S., & Cava, R. (2005b). Protein oxidation in frankfurters with increasing levels of added rosemary essential oil: Effect on colour and texture deterioration. *Journal of Food Science*, 70, 427-432.
- Estévez, M., Kylli, P., Puolanne, E., Kivikari, R., & Heinonen, M. (2008a). Fluorescence spectroscopy as a novel approach for the assessment of myofibrillar protein oxidation in oil-in-water emulsions. *Meat Science*, 80, 4, 1290-1296.
- Estévez, M., Kylli, P., Puolanne, E., Kivikari, R. & Heinonen, M. (2008b). Oxidation of skeletal muscle myofibrillar proteins in oil-in-water emulsions: interaction with lipids and effect of selected phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10933-10940.
- Estévez, M. (2011). Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat Science*, 89, 259-279.
- Estévez, M., Ventanas, S. & Heinonen, M. (2011). Formation of Strecker aldehydes between protein carbonyls - $\alpha$ -aminoacidic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes- and leucine and isoleucine. *Food Chemistry*, 128, 1051-1057
- François, N., Guyot-Declerck, C., Hug, B., Callemien, D., Govaerts, B., & Collin, S. (2006). Beer astringency assessed by time-intensity and quantitative descriptive analysis: Influence of pH and accelerated aging. *Food Quality and Preference*, 17, 445-452.
- Frigola, M., & Ayuso, F. (2004). El envasado del jamón curado. En J. Ventanas (eds.). *Avances en la ciencia y tecnología y comercialización del jamón* (pp. 101-111). II Congreso Mundial del jamón, Cáceres, España.
- Frøst, M. B., Heymann, H., Bredie, W. L. P., Dijksterhuis, G. B., & Martens, M. (2005). Sensory measurement of dynamic flavour intensity in ice cream with different fat levels and flavourings. *Food Quality and Preference*, 16, 305-314.



- Ganhão, R., Morcuende, D., & Estévez, M. (2010). Protein oxidation in emulsified cooked burger patties with added fruit extracts: Influence on colour and texture deterioration during chill storage. *Meat Science*, 85, 402–409.
- Gandemer, G. (2009). Dry cured ham quality as related to lipid quality of raw material and lipid changes during processing (review). *Grasas y Aceites*, 60, 297-307.
- García, C., Berdagué, J.J., Antequera, T., López-Bote, C., Córdoba, J.J. Ventanas, J. (1991). Volatile components of dry cured Iberian ham. *Food Chemistry*, 41, 23-32.
- García-Esteban, M., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2004). Comparison of modified atmosphere packaging and vacuum packaging for long period storage of dry-cured ham: Effects on colour, texture and microbiological quality. *Meat Science*, 67, 57–63.
- Garriga, M., & Americh, M. T. (2009). Advanced decontamination technologies: high hydrostatic pressure on meat products. En F. Toldrá (eds.). *Safety of meat and processed meat* (pp.183-208). Springer Science+Business Media, New York.
- González-Tomás, L., Bayarri, S., Taylor, A. J., & Costell, E. (2007). Flavour release and perception from model dairy custards. *Food Research International*, 40, 520–528.
- Goutefongea, R., Rampon, V., Nicolas, J., & Dumont, J. P. (1995). Meat color changes under high pressure treatment. En *Proceedings 41<sup>st</sup> International Congress of Meat Science and Technology* (pp. 384–385), 20–25 August 1995, San Antonio, Texas.
- Gray, J. I., Gomma, E. A., & Buckley, D. J. (1996). Oxidative Quality and Shelf Life of Meats. *Meat Science*, 43, S111-S113.
- Grèbol, N. (2010). Altas presiones hidrostáticas: Seguridad alimentaria y competitividad empresarial. *IV Congreso Internacional: Autocontrol y alimentos inocuos para proteger la salud*. Kausal, Bilbao, España.
- Guinard, J. X., & Marty, C. (1995). Time-intensity Measurement of Flavor Release from a Model Gel System: Effect of Gelling Agent Type and Concentration. *Journal of Food Science*, 60, 727-730.
- Guinard, J. X., Wee, C., McSunas, A., & Fritter, D. (2002). Flavor release from salad dressing varying in fat and garlic flavour. *Food Quality and Preference*, 13, 129-137
- Han, Y., Jiang, Y., Xu, X., Sun, X., Xu, B., & Zhou, G. (2011). Effect of high pressure treatment on microbial populations of sliced vacuum-packed cooked ham. *Meat Science*, 88(4), 682–688.
- Harker, F. R., Lau, K., & Anne Gunson, F. (2003). Juiciness of fresh fruit: a time-intensity study. *Postharvest Biology and Technology*, 29, 55-60.
- Hereu, A., Bover-Cid, S., Rubio, R., Garriga, M. & Aymerich, T., (2009). Nisin-active packaging and high hydrostatic pressure to improve the safety of sliced dry cured ham. En EFFoST Conference. *New Challenges in Food Preservation: Processing Safety and Sustainability*, Budapest, Hungary.
- Hereu, Dalgaard, P., Garriga, M., Aymerich, M., & Bover-Cid, S. (2012). Modeling the high pressure inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* on RTE cooked meat products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 305-315.
- Hernández-Gimeno J. M. (2002). Calidad de los alimentos de origen animal: ¿qué significado tiene para el consumidor español del siglo XXI?. *Eurocarne*, 106 Mayo 2002.

- Hugas, M. & Garriga, M. (1987). Evolución de los parámetros microbiológicos en jamón curado deshuesado y envasado al vacío. En J. Arnau, M. Hugas & J.M. Monfort. (eds.). *Jamón curado: aspectos técnicos* (pp. 77-90). IRTA, Gerona.
- Hugas, M., Garriga, M., & Monfort, J. M. (2002). New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. *Meat Science*, 62, 359-371.
- Hyvönen, L., Linna, M., Tourila, H., & Dijksterhuis, G. B. (2003). Perception of melting and flavor release of Ice cream containing different types and levels of fat. *Journal of Dairy Science*, 86(4), 1130–1138.
- Issanchou, S. & Porcherot, C. (1992). Problems in time-intensity measurements. A case study: bitterness evaluation in water solutions and beer. *Advances in Sensory Food Science. Rose-Marie Pangborn Memorial Symposium*, Abstract B.IV.66.
- Jellinek, G. (1964). Introduction to and critical review of modern methods of sensory analysis (odor, taste and flavour evaluation) with special emphasis on descriptive analysis (flavour profile method). *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 1, 219-60.
- Jin, S. K., Kim, C. W., Chung, K. H., Jo, K. K., Jeong, J. Y., Hur I. C., y cols. (2012). Physicochemical and sensory properties of irradiated dry-cured ham. *Radiation Physics and Chemistry*, 81, 208-215.
- Jofré, A., Aymerich, T., Monfort, J. M., & Garriga, M. (2008). Application of enterocins A and B, sakacin K and nisin to extend the safe shelf-life of pressurized ready-to-eat meat products. *European Food Research and Technology*, 228, 159–162.
- Jofré, A., Aymerich, T., Grèbol, N., y Garriga, M. (2009). Efficiency of high hydrostatic pressure at 600 MPa against food-borne microorganisms by challenge test on convenience meat products. *Lwt-Food Science and Technology*, 42, 924-928.
- Jurado, A., Carrapiso, A. I., Ventanas, J., & García, C. (2009). Changes in SPME-extracted volatile compounds from Iberian ham during ripening. *Grasas y Aceites*, 60 (3) 262-270.
- King, S. C., Lawler, P. J., & Adams, J. K. (2000). Effect of Aspartame and Fat on Sweetness Perception in Yogurt. *Sensory and Nutritive Qualities of Food*, 65, 1056-1059.
- Kostyra, E., & Barylko-Pikielna, N. (2007). The effect of fat levels and guar gum addition in mayonnaise-type emulsions on the sensory perception of smoke-curing flavour and salty taste. *Food Quality and Preference*, 18, 872-879.
- Lawless, H. T., & Heymann, H. (1998). Sensory evaluation of food: principals and practices. Chapman and Hall, New York.
- Lawrie, R. A. (1998). The eating quality of meat, En: R. A. Lawrie`s Meat Science (6<sup>th</sup> eds.). Lawrie R. A. Woodhead Publishing, Cambridge.
- Lee, W. E. III & Pangborn, R. M. (1986). Time-intensity: the temporal aspects of sensory perception. *Food Technologies*, 40, 71-8, 82.
- Lethuaut, L., Weel, K. G. C., Boelrijk, A. E. M., Brossard, C. D. (2004). Flavor Perception and Aroma Release from Model Dairy Desserts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3478-3485.
- Li, Z., Marshall, R. T., Heymann, H., & Fernando, L. (1997). Effect of milk fat content on flavour perception of vanilla ice cream. *Journal of Dairy Science*, 80, 3133–3141.
- Linforth, R. S. T., Baek, I., & Taylor, A. J. (1999). Simultaneous instrumental and sensory analysis of volatile release from gelatine and pectin/gelatine gels. *Food Chemistry*, 65, 77-83.

- Linforth, R. S. T., Friel, E., & Taylor, A. J. (2000). Modeling aroma release from foods using physicochemical parameters. En D. D. Roberts, & A. J. Taylor (eds.). *Flavor release: Linking experiments, theory and reality* (pp. 166-178). ASC: American Chemical Society, Washington DC.
- Liu, G., & Xiong, Y. L. (1996). Contribution of lipid and protein oxidation to rheological differences between chicken white and red muscle myofibrillar proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 779–784.
- López-Bote, C. J. (1998). Sustained utilization of the Iberian pig Breed. *Meat Science*, 49 (1), 17-27.
- Lund, M. N., Lametsch, R., Hvii, M. S., Jensen, O. N., & Skibsted, L. H. (2007). High-oxygen packaging atmosphere influences protein oxidation and tenderness of porcine longissimus dorsi during chill storage. *Meat Science*, 77, 295–303.
- Lund, M. N., Heinonen, M., Baron, C. P., & Estévez, M. (2011). Protein oxidation in muscle foods: A review. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55, 83–95.
- McArdle, R., Marcos, B., Kerry, J. P., & Mullen, A. (2010). Monitoring the effects of high pressure processing and temperature on selected beef quality attributes. *Meat Science*, 86(3), 629–634.
- Matysiak, N. L., & Noble, A. C. (1991). Comparison of temporal perception of fruitiness in model systems sweetened with aspartame, and aspartame + acesulfame K blend, or sucrose. *Journal of Food Science*, 56, 823-826.
- Meilgaard, M. C., Civille, G. V., & Carr, B. T. (1991). *Sensory evaluation techniques* (2<sup>nd</sup> ed.). CRC Press in Boca Raton, FL, USA.
- Melo, L. L. M. M., Bolini, H. M. A., & Efraim, P. (2007). Equisweet milk chocolates with Intense sweeteners using time–intensity method. *Journal of Food Quality*, 30, 1056–1067.
- Miettinen, S. M., Hyvönen, L. & Tuorila, H. (2003). The timing of the intensity perception of a polar vs. non-polar aroma compound in the presence of added vegetable fat in milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5437-5443.
- Miettinen, S. M., Hyvonen, L., Linforth, R. S. T., Taylor, A., & Tuorila, H. (2004). Temporal aroma delivery from milk systems containing 0–5% added fat, observed by free choice profiling, time–intensity, and atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8111–8118.
- Montel, M.C., Masson, F., & Talon, R. (1998). Bacterial role in flavour development. *Meat Science*, 49, S111-S123.
- Morrissey, P. A., Sheehy, P. J. A., Galvin, K., Kerry, J. P., & Buckley, D. J. (1998). Lipid stability in meat and meat products. *Meat Science*, 49, S73–S86.
- Mosca, A. C., van de Velde, F., Bult, J. H. F., van Boekel, & Stieger, M. (2010). Enhancement of sweetness intensity in gels by inhomogeneous distribution of sucrose. *Food Quality and Preference*, 21, 837-842.
- Mottram, D. S. (1998). Flavour formation in meat and meat products: A review. *Food Chemistry*, 62, 415–424
- Muguerza, E., Gimeno, O., Ansorena, D., Bloukas, J. G., & Astiasarán, I. (2001). Effect of replacing pork backfat with pre-emulsified olive oil on lipid fraction and sensory quality of Chorizo de Pamplona — a traditional Spanish fermented sausage. *Meat Science*, 59, 251-258.

- Muguerza, E., Fista, G., Ansorena, D., Astiasarán, I., & Bloukas, J. G. (2002). Effect of fat level and partial replacement of pork backfat with olive oil on processing and quality characteristics of fermented sausages. *Meat Science*, 61, 397–404.
- Muguerza, E., Ansorena, D., Bloukas, J. G., & Astiasarán, I. (2003). Effect of fat level and partial replacement of pork backfat with olive oil on the lipid oxidation and volatile compounds of Greek dry fermented sausages. *Journal of Food Science*, 68(4), 1531–1536.
- Muriel, E., Ruiz, J., Petrón, M. J., Andrés, A., & Antequera, T. (2003). Influencia del sistema de alimentación sobre parámetros físico-químicos y sensoriales del lomo curado de cerdo ibérico. *Eurocarne*, 121, 75–89.
- Muriel, E., Ruiz, J., Ventanas, J., Petrón, M. J., & Antequera, T. (2004). Meat quality characteristics in different lines of Iberian pigs. *Meat Science*, 67, 299–307.
- Murray, J. M., Delahunty, C. M., & Baxter, I. A., (2001). Descriptive sensory analysis: past, present and future. *Food Research International*, 34, 461-471.
- Nunes, H., & Grèbol, N.. (2011). Las altas presiones, una realidad industrial al alcance de todas las empresas cárnicas. Seguridad alimentaria, sabor fresco, exportación y satisfacción del consumidor. Tecnología de la carne, *Eurocarne*, 202, 54-59.
- Olivares, A., Navarro, J. L., Salvador, A., & Flores, M. (2010). Sensory acceptability of slow fermented sausages based on fat content and ripening time. *Meat Science*, 86(2), 251–257.
- Olivares, A., Navarro, J. L., & Flores, M. (2011). Effect of fat content on aroma generation during processing of dry fermented sausages. *Meat Science*, 87, 264-273.
- Overbosch, P., Afterof, W. G. M., & Haring, P. G. M. (1991). Flavor release in the mouth. *Food Reviews International*, 7, 137–184.
- Ott, D., & Palmer, S. (1990). Ingestion and expectoration sampling methods of four tastes in a model system using time-intensity evaluations. *Journal of Sensory Studies*, 13, 54-70.
- Pålsgård, E., & Dijksterhuis, G. B. (2000). The sensory perception of flavor release as a function of texture and time: a time intensity study using flavored gels. *Journal of Sensory Studies*, 15, 347-359.
- Pangborn, R. M., & Koyasako, A. (1981). Time-course of viscosity sweetness and flavor in chocolate desserts. *Journal of Texture Studies*, 12, 141-50.
- Park, D., & Xiong, Y. L. (2007). Oxidative modification of amino acids in porcine myofibrillar protein isolates exposed to three oxidizing systems. *Food Chemistry*, 103, 607–616
- Parra, V., Viguera, J., Sánchez, J., Peinado, J., Espárrago, F., Gutierrez, J. I., & Andrés, A. I. (2010). Modified atmosphere packaging and vacuum packaging for long period chilled storage of dry-cured Iberian ham. *Meat Science*, 84, 760-768.
- Pérez-Palacios, T., Antequera, T., Durán, M. L., Caro, A., Rodríguez, P. G., & Ruiz, J. (2010). MRI-based analysis, lipid composition and sensory traits for studying Iberian dry-cured hams from pigs fed with different diets. *Food Research International*, 43, 248-254.
- Peyvieux, C., & Dijksterhuis, G. (2001). Training a sensory panel for TI: a case study. *Food Quality and Preference*, 12, 19-28.
- Piggott, J. R. (2000). Dynamism in flavour science and sensory methodology. *Food research International*, 33, 191-197.

- Piggott, J. R., Hunter, E. A., & Margomenou, L. (2000). Comparison of methods of analysis of time-intensity data: application to Scotch malt whisky. *Food Chemistry*, 71, 319-326.
- Pionnier, E., Nicklaus, S., Chabanet, C., Mioche, L., Taylor, A. J., Le Quéré, J. L., & Salles, C. (2004). Flavor perception of a model cheese: relationships with oral and physico-chemical parameters. *Food Quality and Preference*, 15, 843-852.
- Potineni, R. V., & Peterson, D. (2008). Influence of Flavor Solvent on Flavor Release and Perception in Sugar-Free Chewing Gum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3254-3259.
- Ramírez, M. R., & Cava, R. (2007). Effect of Iberian x Duroc genotype on dry-cured loin quality. *Meat Science*, 76, 333-341.
- Reina, R., García, C., García-Casco, J. M., López, P., & Ventanas, J. (2011a). Parámetros de calidad de paleta Ibérica y de Teruel. En *Proceedings del VI Congreso Mundial del Jamón* (Ponencia), Septiembre 2011, Lugo.
- Reina, R., Sánchez del Pulgar, J., García-Casco, J. M., Silva, A., & Fuentes, V. (2011). Efecto del tiempo de curación de las paletas de cerdo ibérico de montanera sobre la textura y los compuestos volátiles. En *Proceedings del VI Congreso Mundial del Jamón* (Comunicación), Septiembre 2011, Lugo.
- Reinbach, H. C., Meinert, L., Ballabio, D., Aaslyng, M. D., Bredie, W. L. P., Olsen, K., y cols. (2007). Interactions between oral burn, meat flavor and texture in chilli spiced pork patties evaluated by time-intensity. *Food Quality and Preference*, 18, 909-919.
- Reinbach, H.C., Tøft, M., & Møller, P. (2009). Relationship between oral burn and temperature in chilli spiced pork patties evaluated by time-intensity. *Food Quality and Preference*, 20, 42-49.
- Rivas-Cañedo, A., Fernández-García, E., & Nuñez, M. (2009a). Volatile compounds in dry-cured Serrano ham subjected to high pressure processing. Effect of the packaging material. *Meat Science*, 82, 162-169.
- Rivas-Cañedo, A., Nuñez, M., & Fernández-García, E. (2009b). Volatile compounds in Spanish dry-fermented sausage 'salchichón' subjected to high pressure processing. Effect of the packaging material. *Meat Science*, 83, 620-626.
- Rowe, L. J., Maddock, K. R., Lonergan, S. M., & Huff-Lonergan, E. (2004). Oxidative environments decrease tenderization of beef steaks through inactivation of milli-calpain. *Journal of Animal Science*, 82, 3254-3266.
- Ruiz, J., Cava, R., Antequera, T., Martín, L., Ventanas, J., López-Bote, C.J. (1998a). Prediction of the feeding background of Iberian pigs using the fatty acid composition of subcutaneous, muscle and hepatic fat. *Meat Science*, 49, 155-163.
- Ruiz, J., Cava, R., Ventanas, J. Jensen, M.T. (1998b). Headspace solid phase microextraction for the analysis of volatiles in a meat product: dry-cured Iberian ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4688-4694.
- Ruiz, J., Ventanas, J., Cava, R., Timón, M .L., & García, C. (1998c). Sensory characteristics of Iberian ham: influence of processing time and slice location. *Food Research International*, 31, 53-58.
- Ruiz, J., Ventanas, J., Cava, R., & Andrés, A.I. & Garcia, C. (1999a). Volatile compounds of dry-cured Iberian ham as affected by the length of the curing process. *Meat Science*, 52, 19-27.

- Ruiz, J., García, C., Díaz, M. C., Cava, R., Tejeda, J. F., & Ventanas, J. (1999b). Dry cured Iberian ham non-volatile components as affected by the length of the curing process. *Food Research International*, 32, 643-651.
- Ruiz, J., Ventanas, J., Cava, R., Andrés, A., & García, C. (2000). Texture and appearance of dry-cured ham as affected by fat content and fatty acid composition. *Food Research International*, 33, 91-95.
- Ruiz, J., García, C., Muriel, E., Andrés, A. I., & Ventanas, J. (2002a). Influence of the sensory characteristics on the acceptability of dry-cured ham. *Meat Science*, 61, 347-354.
- Ruiz, J., Muriel, E., & Ventanas, T. (2002b). The flavour of Iberian ham. En Toldrá, F., (eds.). *Research Advances in the Quality of Meat and Meat products* (pp. 290-309). Trivandrum, Kerala, India: Research Singpost.
- Ryynänen, S., Tuorila, H., & Hyvönen, L. (2001). Perceived temperature effects on microwave heated meals and meal components. *Food Service Technology*, 1, 141-148.
- Sancho, J., Bota, E., & Castro, J. J. (1999). Introducción al análisis sensorial de los alimentos. Ediciones de la Universitat de Barcelona, Zaragoza:
- Santé-Lhoutellier, V., Astruc, T., Marinova, P., Grève, E., & Gatellier, P. (2008). Effect of meat cooking on physicochemical state and in vitro digestibility of myofibrillar proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1488-1494.
- Serra, X., Sárraga, C., Grèbol, N., Guardia, M. D., Guerrero, L., Gou, P., y cols. (2007a). High pressure applied to frozen ham at different process stages. 1. Effect on the final physicochemical parameters and on the antioxidant and proteolytic enzyme activities of dry-cured ham. *Meat Science*, 75(1), 2-20.
- Serra, X., Sárraga, C., Grèbol, N., Guardia, M. D., Guerrero, L., Gou, P., y cols. (2007b). High pressure applied to frozen ham at different process stages. 2. Effect on the sensory attributes and on the colour characteristics of dry-cured ham. *Meat Science*, 75, 21-28.
- Sjöström, L. B. (1954). The descriptive analysis of flavor. En D. Peryan, F. Pilgrim & M. Peterson (eds.). *Food Acceptance Testing Methodology* (pp. 25-61). Quartermaster Food & Container Institute, Chicago.
- Sinesio, F., Moneta, E., & Esti, M. (2005). The dynamic sensory evaluation of bitterness and pungency in virgin olive oil. *Food Quality and Preference*, 16, 557-564.
- Smelt, J.P.P.M. (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Food Science & Technology*, 9, 152-158.
- Sokolowsky, M., & Fischer, U. (2012). Evaluation of bitterness in white wine applying descriptive analysis, time-intensity analysis, and temporal dominance of sensations analysis. *Analytica Chimica Acta*, 732, 46-52.
- Srinivasan, S., Xiong, Y. L., & Decker, E. A. (1996). Inhibition of protein and lipid oxidation in beef heart surimi-like material by antioxidants and combinations of pH, NaCl and buffer type in the washing media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 119-125.
- Stadman, E. R., & Levine, R. L. (2000). Protein oxidation. *Annals New York Academy of Sciences*, 899(1), 191-208.
- Stone, H., Sidel, J. L., Oliver, S., Woolsey, A., & Singleton, R. C. (1974). Sensory evaluation by Quantitative Descriptive Analysis. *Food Technology*, 28(11), 24-33.

- Tejeda, J. F., Antequera, T., Ruiz, J., Cava, R., Ventanas, J., & García, C. (1999). Unsaponifiable fraction content and n-alkane profiles of subcutaneous fat from Iberian hams. *Food Science and Technology International*, 5, 229-233.
- Tilgner, D. J. (1971). A retrospective view of sensory analysis and some considerations for the future. *Advances in Food Research*, 19, 215-277.
- Toldrá, F. (1998). Proteolysis and lipolysis in flavour development of dry-cured meat products. *Meat Science*, 49, 101-110.
- Toldrá, F., & Flores, M. (1998). The role of muscle proteases and lipases in flavour development during the processing of dry-cured ham. *Critical Reviews in Food Science*, 38, 331-352.
- Touraille, C. (1990). Les épreuves. Epreuves discriminatives. En SSHA e ISHA, (coords.). *Evaluation sensorielle. Manuel méthodologique* (pp. 352). Technique & Documentation Lavoisier, Paris.
- Tuorila, H., Sommarahl, C., & Heyvönen, L. (1995). Research note does fat affect the timing of flavour perception? A case study with yoghurt. *Food Quality and Preference*, 6, 55-58.
- UNE 87001:1994. Análisis sensorial: Vocabulario. *Tomo I-Alimentación. Recopilación de Normas UNE*. En AENOR (eds.). Madrid, España.
- UNE 87008:1992. Análisis sensorial de Alimentos. Metodología. Guía general. *Tomo I-Alimentación. Recopilación de Normas UNE*. En AENOR (eds.). Madrid, España.
- Utrera, M., Armenteros, M., Ventanas, S., Solano, F., & Estévez, M. (2012). Pre-freezing raw hams affects quality traits in cooked hams: Potential influence of protein oxidation. *Meat Science*, 92, 596-603.
- Vaclavik Vickie A. (2002). Evaluación de la calidad de los alimentos. En: ACRIBIA S.A. (eds.). *Fundamentos de Ciencia de los Alimentos*, (pp 3-16). Zaragoza, España.
- Valentová, H., Skrovánková, S., Panovská, Z., & Pokorný, J. (2002). Time-intensity studies of astringent taste. *Food Chemistry*, 78, 29-37.
- van Buuren, S. (1992) Analyzing time-intensity responses in sensory evaluation. *Food Technology* 46(2), 101-104.
- Ventanas, J., Córdoba, J. J., Antequera, T., García, C., López-Bote, C., Asensio, M. A. (1992). Hydrolysis and Maillard reactions during ripening of Iberian cured ham. *Journal of Food Science*, 57, 813-815.
- Ventanas, S., Ventanas, J., Ruiz, J., & Estévez, M. (2005). Iberian pigs for development of high-quality cured products. En *Recent Research in Development in Agricultural and Food Chemistry* (pp. 27-53). Research Singpost, Trivandrum, Kerala, India.
- Ventanas, S., Estévez, M., Tejeda, J. F., & Ruiz, J. (2006a). Protein and lipid oxidation in *Longissimus dorsi* and dry cured loin from Iberian pigs as affected by crossbreeding and diet. *Meat Science*, 647-655.
- Ventanas, S., Ventanas, J., Jurado, A., & Estévez, M. (2006b). Quality traits in muscle *biceps femoris* and back-fat from purebred Iberian and reciprocal Iberian x Duroc crossbred pigs. *Meat Science*, 73, 651-659.
- Ventanas, S., Ruiz, J., García, C., & Ventanas, J. (2007a). Preference and juiciness of Iberian dry-cured loin as affected by intramuscular fat content, crossbreeding and rearing system. *Meat Science*, 324-330.

- Ventanas, S., Ventanas, J., & Ruiz, J. (2007b). Characteristics of Iberian dry cured loin: influence of crossbreeding and rearing system. *Meat Science*, 75, 211–219.
- Ventanas, S., Ventanas, J., Tovar, J., García, C., & Estévez, M. (2007c). Extensive feeding versus oleic acid and tocopherol enriched mixed diets for the production of Iberian dry-cured hams: Effect on chemical composition, oxidative status and sensory traits. *Meat Science*, 77, 246-256.
- Ventanas, S., Estévez, M., Andrés, A. I., & Ruiz, J. (2008). Analysis of volatile compounds of Iberian dry-cured loins with different intramuscular fat contents using SPME–DED. *Meat Science*, 79, 172-180.
- Ventanas, S., Mustonen, S., Puolanne, E., & Tuorila, H. (2010a). Odour and flavour perception in flavoured model systems: Influence of sodium chloride, umami compounds and serving temperature. *Food Quality and Preference*, 21, 453-462.
- Ventanas, S., Puolanne, E., & Tuorila, H. (2010b). Temporal changes of flavour and texture in cooked bologna type sausages as affected by fat and salt content. *Meat Science*, 85, 410-419.
- Ventanas, J. (2012). Jamón Serrano Ibérico y Serrano. Fundamentos de la elaboración y de la calidad. Mundi-Prensa (eds.). Madrid:
- Wan, L., Xiong, Y. L., & Decker, E. A. (1993). Inhibition of oxidation during washing improves the functionality of bovine cardiac myofibrillar protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 2267–2271.
- Weel, K. G. C., Boelrijk, A. E. M., Alting, A. C., vanMil, P. J. J. M., Burger, J. J., Gruppen, H., Voragen, A. G. J., & Smit, G. (2002). Flavor release and perception of flavored whey protein gels: perception is determined by texture rather than by release. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5149–5155.
- Wendin, K., Langton, M., Caous, L., & Hall, G. (2000). Dynamic analyses of sensory and microstructural properties of cream cheese. *Food Chemistry*, 71, 363-378.
- Winger, R. J., & Hagyard, C. J. (1995). Juiciness - its importance and some contributing factors. En A. M. Pearson, & T. R. Dutson (eds.). *Quality attributes and their measurement in meat, poultry and fish products* (pp. 94-124). Blackie Academic & Professional, London.
- Xiong, Y. L. (2000). Protein oxidation and implications for muscle foods quality. In E. A. Decker, C. Faustman, & C. J. Lopez-Bote (eds.). *Antioxidants in muscle foods* (pp. 85–111). Wiley, New York.
- Zakrys, P. I., O'Sullivan, M. G., Allen, P., & Kerry, J. P. (2009). Consumer acceptability and physiochemical characteristics of modified atmosphere packed beef steaks. *Meat Science*, 81, 720–725.
- Zimoch, J., & Gullett, E. A. (1997). Temporal aspects of perception of juiciness and tenderness of beef. *Food Quality and Preference*, 8, 203–211.



## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



### 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La influencia de los factores relacionados con la materia prima, principalmente la genética y la alimentación, o con el proceso de curación del jamón Ibérico, sobre la generación de compuestos aromáticos, así como, en la percepción del olor y el aroma, ha sido ampliamente estudiado y descrito. Sin embargo, los conocimientos del efecto de tratamientos tecnológicos posteriores al procesado del producto, como el tratamiento con APH, el almacenamiento o la temperatura de consumo sobre el aroma del jamón Ibérico loncheado, son hasta el momento limitados. Factores que adquieren una importancia creciente si consideramos la gran diversificación que ha experimentado el jamón en cuanto a su presentación. Así, se ha pasado de una situación donde mayoritariamente se comercializaba la tradicional pieza entera, a otra en la que las nuevas formas, representadas por centros deshuesados, tacos y lonchas, suponen ya prácticamente el 50 % del total del jamon de cerdo blanco (37.300 Tm en pieza frente a 35.400 Tm en lonchas) y el 32 % del cerdo Ibérico (16.500 Tm en pieza frente a 5.300 Tm en lonchas), destinados para el consumo en los hogares (Fuente: MAGRAMA).

Los lípidos son la principal fuente directa de los compuestos volátiles responsables del aroma que se generan como consecuencia de la degradación oxidativa de los ácidos grasos durante el procesado del jamón Ibérico, asimismo son precursores de otros volátiles muy olor-activos por las reacciones secundarias de éstos con los aminoácidos. Además, el contenido de grasa afecta a la liberación de compuestos aromáticos desde la matriz del alimento hasta el espacio de cabeza mediante mecanismos físico-químicos. En definitiva, la grasa actúa como reservorio de compuestos volátiles modulando su liberación al ambiente y durante la masticación, por lo que la tasa y la composición de ésta afecta a la percepción del olor y el flavor. El desarrollo de un elevado número de trabajos de investigación dedicados al estudio del efecto del contenido en grasa sobre la liberación del aroma en una gran variedad de productos alimenticios, principalmente en productos lácteos (Piraprez y cols., 1998; Brauss y cols., 1999; Miettinen y cols., 2002) y productos cárnicos (Chevance y Farmer, 1999; Chevance y cols., 2000, Carrapiso, 2007) han

contribuido satisfactoriamente a arrojar luz sobre los mecanismos físico-químicos implicados en la liberación y percepción del aroma en productos con diferente contenido en grasa. En el caso del jamón Ibérico, las características de la GIM juegan un papel determinante en la calidad de estos productos como se ha demostrado en los numerosos trabajos científicos desarrollados (Cava y cols., 2000; Carrapiso y cols., 2003; Ventanas y cols., 2007). No obstante, se desconoce cómo variaciones de las características de la GIM (contenido y composición) podrían afectar a la dinámica de liberación de compuestos aromáticos y a la percepción del aroma y el flavor por parte del consumidor. La utilización de técnicas dinámicas de evaluación sensorial en productos curados como el jamón Ibérico, permitiría además obtener una información más real de las variaciones experimentadas por el consumidor en la percepción de los diferentes atributos sensoriales durante el consumo del producto.

Por último, si bien la oxidación de lípidos y su repercusión en productos curados del cerdo Ibérico es ampliamente conocida y discutida (García y cols., 1991; Cava y cols., 1999; Ruiz y cols., 2002; Carrapiso y cols., 2002; Petrón y cols., 2003), el conocimiento de las repercusiones que en la calidad de estos productos curados pueda tener la oxidación de proteínas es aún muy limitada (Ventanas y cols., 2007).

Considerando lo anteriormente expuesto, el objetivo global del presente trabajo de Tesis Doctoral es, conocer la influencia que el contenido y la composición de la GIM tienen sobre la liberación de compuestos volátiles olor-activos del jamón Ibérico loncheado, así como, sobre las características sensoriales de este producto. Para la consecución de este objetivo, se llevará a cabo en primer lugar, una modelización de la liberación de compuestos volátiles olor-activos en emulsiones cárnicas tipo salchicha fermentadas y curadas, con el objetivo de conseguir una matriz que se asemeje de una forma lo más simplificada posible a la de un producto cárnico crudo curado real. De este modo, se variará de una forma controlada el contenido y composición de la grasa de estos sistemas modelo, a los que se les incorporará compuestos volátiles de interés, para evaluar tanto la dinámica de liberación como la percepción temporal del aroma y el flavor. Posteriormente, se estudiará en jamones Ibéricos loncheados el efecto tanto del contenido en GIM como de otros factores post-procesado, sobre la dinámica de liberación de compuestos

volátiles y las características sensoriales de este producto mediante técnicas dinámicas de evaluación sensorial.

## **OBJETIVOS**

Los objetivos específicos planteados en la presente Tesis Doctoral son los siguientes:

1. Aplicación y optimización del empleo de técnicas sensoriales dinámicas (Tiempo-intensidad) en la evaluación del flavor y la textura en sistemas modelo cárnicos curados y en jamón curado loncheado.
2. Estudiar el efecto del contenido y composición de la grasa añadida en la dinámica de liberación/retención de compuestos volátiles en sistemas modelo cárnicos curados mediante técnicas instrumentales de análisis.
3. Estudiar el efecto del contenido y composición de la grasa añadida sobre la estabilidad oxidativa de lípidos y proteínas, así como sobre las características sensoriales en sistemas modelo cárnicos curados evaluadas por técnicas sensoriales estáticas y dinámicas.
4. Estudiar el efecto del contenido en grasa y de diferentes factores post-procesado (presentación comercial, altas presiones hidrostáticas, tiempo de almacenamiento a refrigeración y temperatura previa al consumo) sobre las características sensoriales del jamón Ibérico loncheado evaluadas por técnicas sensoriales estáticas y dinámicas.
5. Evaluar el efecto del contenido en grasa y factores post-procesado (presentación comercial, altas presiones hidrostáticas, y tiempo de almacenamiento) sobre las reacciones de oxidación de lípidos y proteínas, y sobre el color medido por técnicas instrumentales.



BIBLIOGRAFÍA

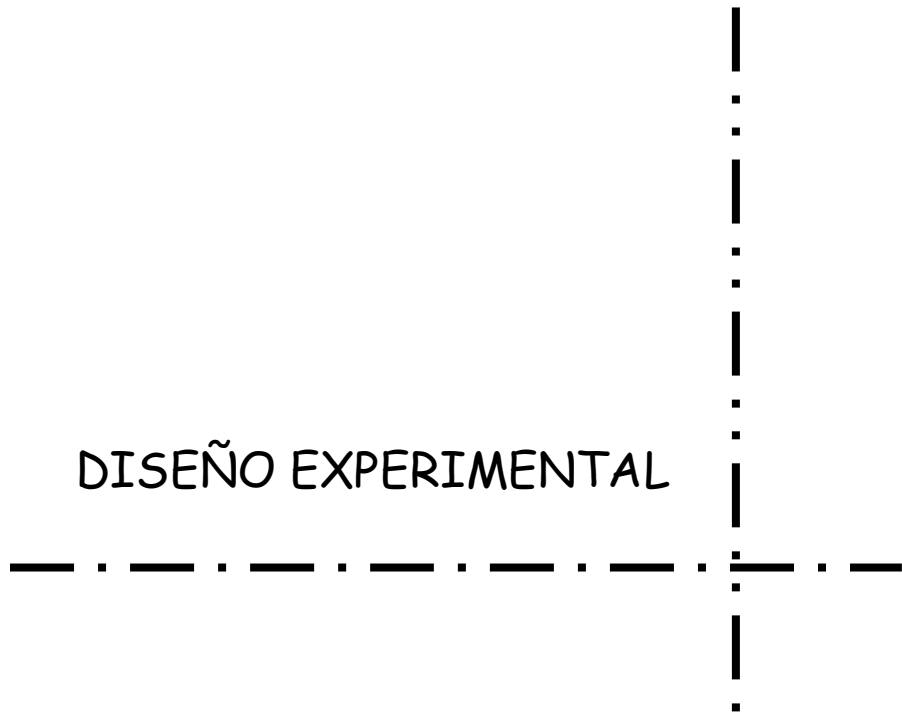




- Brauss, M. S., Linforth, R. S., Cayeux, I., Harvey, B., & Taylor, A. J. (1999). Altering the fat content affects flavour release in a model yogurt system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2055–2059.
- Carrapiso, A., Jurado, A., Timón, M., & García, C. (2002). Odor-active compounds of Iberian hams with different aroma characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6453–6458.
- Carrapiso, A.I., Bonilla, F., & García, C. (2003). Effect of crossbreeding and rearing system on sensory characteristics of Iberian ham. *Meat Science*, 65, 623-629.
- Carrapiso, A. I. (2007). Effect of fat content on flavour release from sausages. *Food Chemistry*, 103, 396-403.
- Cava, R., Ruiz, J., Ventanas, J., & Antequera, T. (1999). Oxidative and lipolytic changes during ripening of Iberian hams as affected by feeding regime: extensive feeding and alpha-tocopheryl acetate supplementation. *Meat Science*, 52, 165-172.
- Cava, R., Ventanas, J., Ruiz, J., Andrés, A.I. & Antequera, T. (2000). Sensory characteristics of Iberian ham: Influence of rearing system and muscle location. *Food Science and Technology International*, 6(3), 235-242.
- Chevance, F. F. V., & Farmer, L. J. (1999). Release of volatile odor compounds from full-fat and reduced- fat frankfurters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 5161–5168.
- Chevance, F. F., Farmer, L. J., Desmond, E. M., Novelli, E., Troy, D. J., & Chizzolini, R. (2000). Effect of some fat replacers on the release of volatile aroma compounds from low-fat meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3476–3484.
- García, C., Berdagué, J.J., Antequera, T., López-Bote, C., Córdoba, J.J. Ventanas, J. (1991). Volatile components of dry cured Iberian ham. *Food Chemistry*, 41, 23-32.
- MAGRAMA Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (<http://www.magrama.gob.es>).
- Miettinen, S. M., Tuorila, H., Piironen, V., Vehkalahti, K., & Hyvönen, L. (2002). Effect of emulsion characteristics on the release of aromas as detected by sensory evaluation, static headspace chromatography and electronic nose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4232-4239.
- Petrón, M. J., García-Regueiro, J. A., Martín, L., Muriel, E., & Antequera, T. (2003). Identification and quantification of cholesterol and cholesterol oxidation products in different types of Iberian hams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5786–5791.
- Piraprez, G., Hérent, M. F., & Collin, S. (1998). Flavour retention by lipids measured in a fresh cheese matrix. *Food Chemistry*, 61, 119-125.
- Ventanas, S., Ventanas, J., Tovar, J., García, C., & Estévez, M. (2007). Extensive feeding versus oleic acid and tocopherol enriched mixed diets for the production of Iberian dry-cured hams: Effect on chemical composition, oxidative status and sensory traits. *Meat Science*, 77, 246-256.
- Ruiz, J., Muriel, E., & Ventanas, T. (2002). The flavour of Iberian ham. En Toldrá, F., (eds.). *Research Advances in the Quality of Meat and Meat products* (pp. 290-309). Research Singpost, Trivandrum, Kerala, India.



DISEÑO EXPERIMENTAL





## 4. DISEÑO EXPERIMENTAL

La presente Tesis doctoral se divide en dos fases experimentales en función del tipo de matriz cárnica a estudiar:

- **Fase experimental I:** para llevar a cabo los ensayos que constituyen esta primera fase experimental, se partió de sistemas modelo cárnicos consistentes en emulsiones cárnicas tipo salchicha de curación rápida (15 días) (“experimental dry-cured sausages”), (Figura 3) diseñados y elaborados en la planta piloto del departamento del área de Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de Cáceres.
- **Fase experimental II:** para llevar a cabo los ensayos que constituyen esta segunda fase experimental, se partió de un lote de 30 jamones Ibéricos curados de cerdos criados en semi-extensividad (campo, DOP Dehesa de Extremadura). Tras la elaboración del producto, se deshuesaron (“maza”, “cadera” y “babilla”), lonchearon y envasaron a vacío. En función del estudio llevado a cabo, los paquetes de jamón loncheado derivados de las diferentes secciones del jamón, recibieron distintos tratamientos post-procesado como se muestra en la figura 4.

**Figura 3.** Sistemas modelo tipo salchicha (experimental dry-cured sausages) diseñados y elaborados en la planta piloto para llevar a cabo la *fase experimental I*.



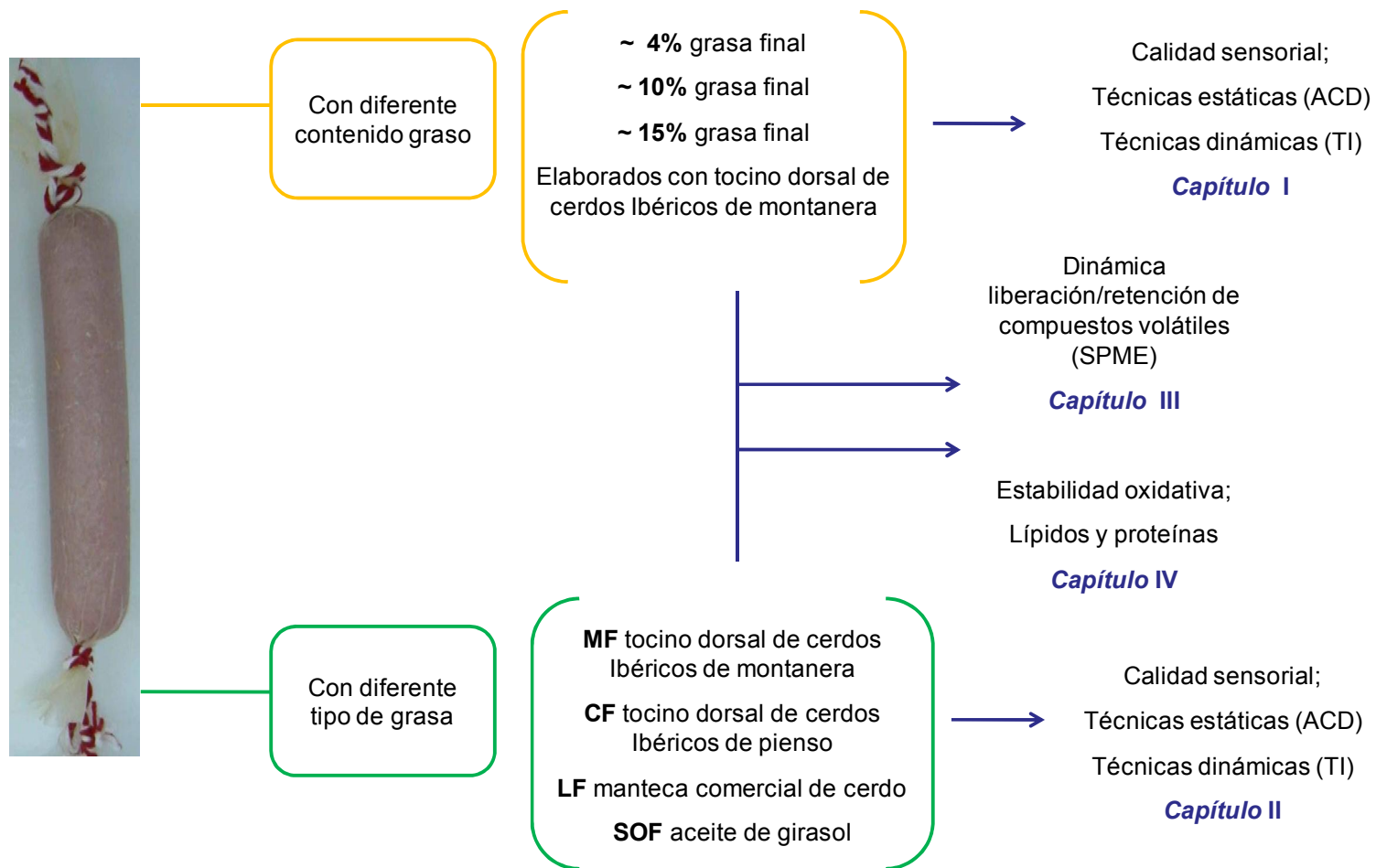
**Figura 4.** Resumen de los diferentes factores estudiados que constituyen los distintos los capítulos en los loncheados envasados a vacío de jamón Ibérico.



## ***FASE EXPERIMENTAL I.***

En esta fase se diseñaron unos sistemas modelo cárnicos cuya composición lipídica pudo variar en contenido y en composición para simular la de los productos cárnicos. Consistentes en una emulsión cárnica tipo salchicha de curación rápida fácilmente reproducible para estudiar posteriormente mediante técnicas instrumentales y sensoriales, la dinámica de la liberación y percepción de compuestos aromáticos característicos de los productos crudos curados derivados del cerdo Ibérico. De acuerdo con el diseño experimental mostrado en la figura 5, esta primera fase se divide a su vez en dos etapas: en la primera se elaboraron unos sistemas modelo con diferentes niveles de grasa incluyendo el contenido en grasa que habitualmente nos encontramos en jamón Ibérico (Ventanas y cols., 2005). En una segunda etapa, se elaboraron sistemas modelo empleando diferentes fuentes de grasa, con el objetivo de variar la composición en ácidos grasos de la misma, grasa animal (tocino dorsal de cerdos Ibéricos en régimen de montanera, tocino dorsal de cerdos Ibéricos alimentados a base de piensos comerciales, y manteca comercial de cerdo) y vegetal (aceite de girasol). Esta fase experimental está representada en la presente Tesis Doctoral por 4 capítulos como ilustra el diseño experimental mostrado en la figura 5.

Figura 5. Diseño experimental de la *fase experimental I* correspondiente a los sistemas modelo cárnicos.

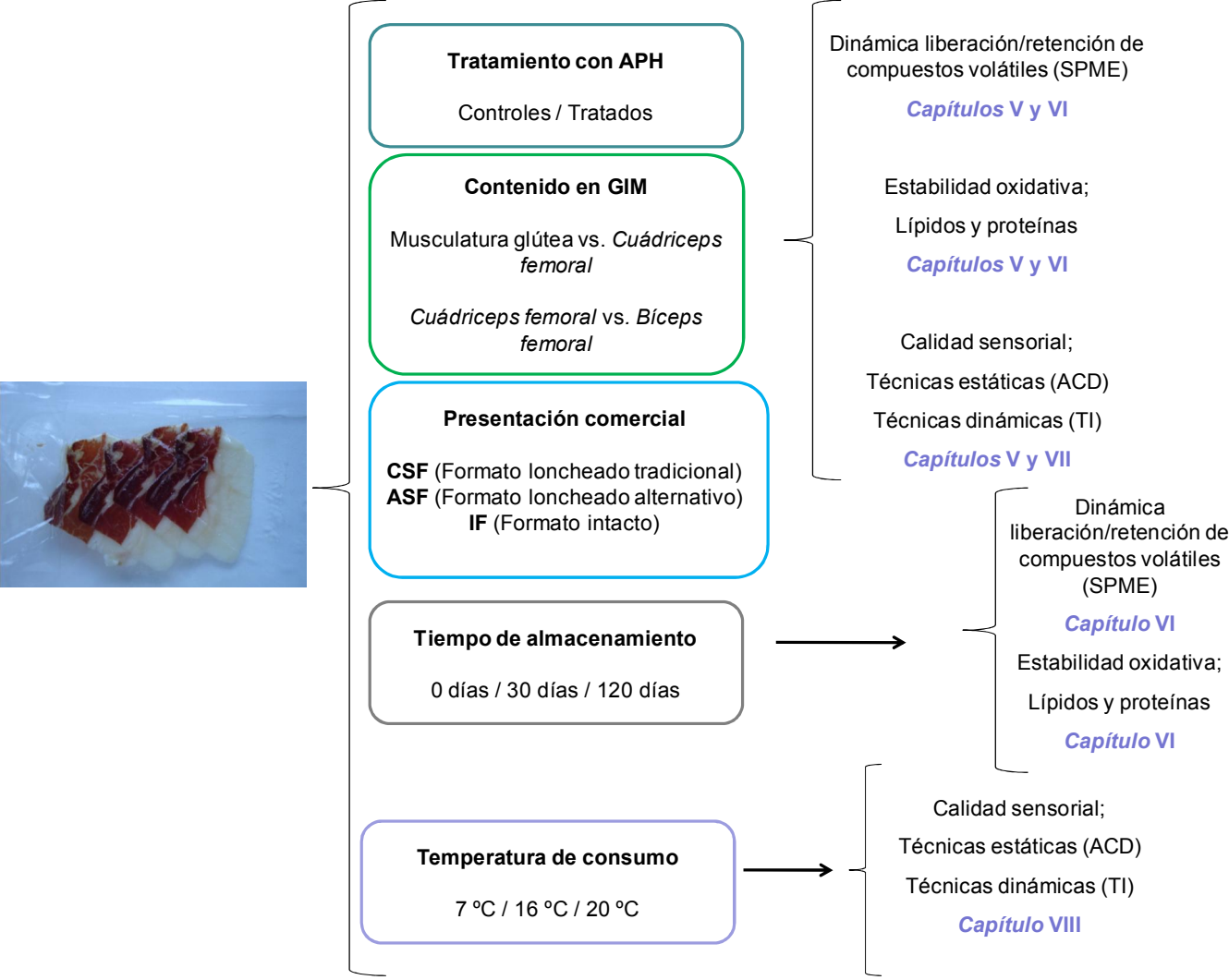




## ***FASE EXPERIMENTAL II.***

En esta fase experimental las muestras analizadas y evaluadas consistieron en jamón Ibérico loncheado y envasado a vacío sometidas a diferentes factores post-procesado: presentación comercial, aplicación de APH, tiempo de almacenamiento a refrigeración (hasta 120 días), y temperatura de consumo del producto. Se evaluó el efecto sobre la calidad sensorial (técnicas dinámicas), la estabilidad oxidativa (lípidos y proteínas), y la dinámica de liberación/retención de compuestos volátiles. Además, en relación con el almacenamiento y atemperado previo al consumo, se consideró otro factor como el contenido en GIM (Figura 4). Esta fase experimental está representada en la presente Tesis Doctoral por 4 capítulos como ilustra el diseño experimental mostrado en la figura 6.

**Figura 6.** Diseño experimental de la *fase experimental II* correspondiente a los estudios llevados a cabo en los loncheados de jamón Ibérico envasados a vacío.



BIBLIOGRAFÍA



Ventanas, S., Ventanas, J., Ruiz, J., & Estévez, M. (2005). Iberian pigs for development of high-quality cured products. En *Recent Research in Development in Agricultural and Food Chemistry* (pp. 27-53). Research Singpost, Trivandrum, Kerala, India.



## MATERIAL Y MÉTODOS





## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 MATERIALES.

#### 5.1.1 Reactivos.

Los productos químicos empleados para los análisis de laboratorio del presente trabajo fueron de calidad A.C.S. (calificación química de alta pureza que cumple o excede los estándares de pureza establecidos por la American Chemical Society). Para las determinaciones que incluyen fases cromatográficas se emplearon solventes de calidad HPLC. Todos los productos fueron suministrados por las firmas Panreac (Panreac Química, S. A.; Barcelona, España), Merck (Merk, S. L., Darmstadt, Alemania) Sigma- Aldrich (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) y Scharlau (Scharlab, S. L.; Barcelona, España). Los gases para cromatografía fueron suministrados por la empresa 'Air Liquide'.

#### 5.1.2 Equipos.

Para la elaboración, conservación y análisis de las muestras del presente trabajo se emplearon los siguientes equipos:

- Congeladores '-86 Freezer' modelo 923 (Forma Scientific Inc.).
- Refrigerador doméstico 'Super-Ser G.L.' modelo 355-88.
- Refrigerador doméstico 'A<sup>+</sup> CLASS Zanussi', RF. 3855.
- Refrigerador termostático VELP Scientific, modelo FTC 90E.
- Refrigerador termostático Aqua Lytic, modelo FKS 3600.
- Homogeneizador 'Polytron' modelo PT10-35.
- Homogeneizador 'Omni' modelo 5100.
- Agitador magnético 'VWR' modelo 52BF.
- Campana de flujo 'CRUMA'.
- Estufa de secado 'Selecta' modelo 210.
- Digestor y destilador 'Büchi' (B-324 y K-435).

- Centrifuga refrigerada 'Eppendorf' modelo 5810R.
- Espectrofotómetro 'Hitachi' modelo U-2000.
- Rotavapor 'Heidolph' modelo VV 2000.
- Purificador de agua milliQ 'Elga' modelo Elgastat UHQ II.
- Colorímetro 'Minolta' CR 300 series (Minolta Camera Corp., Meter division, Ramsey, NJ, USA).
- Picadora-mezcladora 'Stephan' UMC 5 15 Electronic cutter.
- Embutidora 'Mainca' modelo BB12.
- Envasadora a vacío 'Lavezzini' modelo CS 40.
- Cromatógrafo de gases Hewlett Packard, modelo HP-5890-II, equipado con detector FID (flame ionisation detector).
- Cromatógrafo de gases CG-EM Hewlett Packard HP-6890-II equipado con detector selectivo de masas 'Agilent' 5973.
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Agilent 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) acoplado a un Esquire-LC equipado con un cuadrupolo con trampa de iones, una interfase de ESI (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) y LC-MSD Trap software, versión 5.2 (Bruker Daltonics).
- Cromatógrafo de líquidos UFLC 'Shimadzu Prominence' (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipado con detectores de fluorescencia modelo RF-10 XL y diodo-array modelo SPD-M20A.
- Texturómetro universal 'TA-XT2i' (Stable Micro Systems, Godalming, UK).
- Baño de agua termostaticado 'Selecta' Precistern modelo 146 (J.P. Selecta, S.A., Barcelona, España).
- Balanza analítica 'Kren' modelo 770.
- Concentrador centrífugo a vacío tipo SpeedVac 'Savant' modelo SVC200 con trampa de condensación refrigerada 'Savant' modelo RT4104.
- Equipo de altas presiones hidrostáticas, NC Hyperbaric Wave 6500/120; (6500 bars y 120 l).
- Loncheadora Weber modelo MLC 404 CCI y termoformadora compacta 'Mobepack', modelo M 301.

- Fibra SPME (Supelco Co. Canada) (50/30  $\mu\text{m}$  divinilbenzeno-carboxen-polidimetilsiloxano).
- Sala de cata diseñada de acuerdo con la Norma UNE 87004:1979.
- Loncheadora comercial 'OMS' modelo TGI 300.
- Equipos frigoríficos compactos VIZUETE.
- Cámara refrigeradora VIZUETE.
- Termómetro de sonda Testo 735-2.
- Termómetro de sonda Mastrad.

### 5.1.3 Compuestos volátiles.

Para desarrollar la parte del trabajo correspondiente a la *fase experimental I*, influencia del contenido y tipo de grasa en la liberación/retención de compuestos volátiles a partir de sistemas modelo tipo salchicha fermentadas, se seleccionaron una serie de compuestos volátiles, de entre los que presentan un mayor impacto en el aroma del jamón Ibérico en base a la bibliografía científica consultada (Carrapiso y cols., 2002a,b). Estos compuestos se seleccionaron de tal manera que presentasen distintas propiedades termodinámicas particularmente en relación a la volatilidad, representado por la presión de vapor (PV), y la hidrofobicidad o polaridad, representada por el  $\log P_{o-w}$  (coeficiente de partición octanol-agua). Un total de 11 compuestos volátiles (SAFC®) fueron incorporados durante la elaboración de la matriz cárnica de los sistemas modelo tipo salchicha, en forma de disoluciones acuosas (calidad Mili-Q) en las concentraciones pertinentes. Estos sistemas modelo que incluían los 11 compuestos volátiles, se emplearon para evaluar la liberación del aroma utilizando técnicas instrumentales de análisis.

Los compuestos volátiles seleccionados, las concentraciones empleadas, y sus características físico-químicas se muestran en la tabla 9.

**Tabla 9.** Características y concentraciones de los compuestos volátiles incorporados durante el proceso de elaboración a la matriz cárnica de los sistemas modelo, ordenados en función de su polaridad (de apolar a polar).

<b>Compuesto</b>	<b>ppm*</b>	<b>LogP<sup>a</sup></b>	<b>Presión de vapor<sup>a</sup></b>	<b>Solubilidad<sup>a</sup></b>
	(mg/L)	(octanol-agua)	(mm Hg)	(mg/L)
Decanal	100	3.76	0.10	6.08E+01
Octanal	101	2.78	1.18	5.60E+02
1-Octen-3-ol	51	2.6	0.24	1.84E+03
Octalactona	100	2.29	3.52	1.25E+03
Heptanal	200	1.98	3.86	4.30E+03
2-Heptanona	25	1.78	0.39	3.03E+03
Fenilacetaldehído	290	1.59	0.03	3.63E+03
2,6-Dimetilpirazina	101	1.23	50.00	1.40E+04
1-Penten-3-ol	249	1.12	9.68	9.01E+04
2-Pentanona	101	0.91	35.40	4.30E+04
3-Metilbutanal	201	0.54	1.50	3.82E+04

<sup>a</sup>Fuente: Información obtenida de Environmental Science-Interactive SCR PhysPropsDatabase (2004) (<http://www.syrres.com/esc/physdemo.htm>).

\*Concentraciones incorporadas a la matriz cárnica de un 1.5 kg.

Además se elaboraron sistemas modelo en los que únicamente se incorporó un compuesto volátil, el 1-octen-3-ol, en una concentración de 75 ppm, seleccionado por sus particulares notas aromáticas y por ser de fácil reconocimiento por parte de los catadores (Ventanas y cols., 2010a,b). Estos sistemas modelo fueron diseñados para ser evaluados empleando técnicas sensoriales.

#### 5.1.4 Carne de cerdo y tocino dorsal.

La carne (músculo *longissimus dorsi*) para la fabricación de los sistemas modelo procedía de cerdos comerciales de genotipo industrial (Large - White x

Landrace) y fue adquirida 24 h después del sacrificio de los animales en el matadero Herlusa (Arroyo de la Luz, Cáceres).

La procedencia del tocino dorsal empleado fue de cerdos Ibéricos con diferente alimentación; (i) cebados en montanera (bellota, hierba y otros recursos naturales) y (ii) cebados con piensos comerciales (cebo).

La carne se despojó de toda la grasa visible, mientras que la grasa dorsal fue separada de la piel. Tanto la carne como la grasa se cortaron en porciones de aproximadamente 2 cm<sup>3</sup>, se envasaron al vacío y se conservaron en congelación a -18 °C, hasta la elaboración de los sistemas modelos tipo salchicha.

#### *5.1.5 Manteca y aceite de girasol.*

La manteca y el aceite de girasol fueron adquiridos en un distribuidor local de la ciudad de Cáceres. El aceite de girasol se compró el día anterior a su utilización y se conservó a temperatura ambiente, mientras que, la manteca se adquirió días previos a su uso, y por lo tanto, se conservó a refrigeración (+4 °C) hasta su empleo siguiendo las indicaciones del fabricante.

#### *5.1.6 Jamones Ibéricos curados.*

Para el presente estudio se utilizó una partida de 30 jamones Ibéricos de campo certificados por la DOP Dehesa de Extremadura; y por tanto alimentados con hierba y pienso durante la fase de engorde (60 días previos al sacrificio). Los jamones frescos se procesaron de manera tradicional (Ventanas, 2001) en un secadero ubicado en Montánchez (Cáceres), y una vez completado su proceso madurativo de 26 meses, en el que alcanzaron un 32 % de mermas, fueron deshuesados manualmente y descargados de la grasa visible externamente por operarios de la empresa. A continuación, se congelaron a -24 °C y se mantuvieron pre-congelados a una temperatura que nunca superó los -10 °C durante los tres días previos a las pruebas de loncheado.

Un vez en la planta de loncheado se procedió a eliminar las zonas menos homogéneas y a dividir los jamones en las 3 zonas más importantes

que lo componen (“maza”, “babilla” y “cadera”). Finalmente, se procedió a partir de las mismas a realizar el loncheado y envasado a vacío en una loncheadora Weber modelo MLC 404 CCI y termoformadora Mobepack modelo M 301, en el siguiente formato y presentación:

Grosor de las lonchas: 1 mm.

Porciones de aproximadamente 90-100 gramos por envase, una vez seleccionados las lonchas con características similares de cada zona.

Tipo de envase: a vacío, con film de alta barrera flexible en la parte superior e inferior tipo “skin” (doble piel) de PA y PE, con una baja permeabilidad al oxígeno, según ficha administrada por el fabricante.

Dimensiones exteriores del envase: 25 x 13.50 cm.

## 5.2 MÉTODOS.

### 5.2.1 Elaboración de los sistemas modelo tipo salchicha.

Los sistemas modelo cárnicos tipo salchicha se elaboraron en la planta piloto de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura, siguiendo la formulación general que se presenta en la tabla 10.

**Tabla 10.** Formulación e ingredientes de los diferentes lotes de sistemas modelo elaborados con diferente contenido y composición grasa.

	DIFERENTE CONTENIDO			DIFERENTE COMPOSICIÓN			
	~ 4%	~ 10%	~ 15%	MF	CF	LF	SOF
Lomo de cerdo (%)	96.84	92.93	88.11	88.11	88.11	89.00	89.00
Grasa animal/vegetal (%)*	0.00	3.90	8.73	8.73	8.73	7.83	7.83
Sal (%)	2.10	2.10	2.10	2.10	2.10	2.10	2.10
<i>Aditivos</i>							
Glucono-delta-lactona (%)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Nitrito sódico (%)	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015
Ácido ascórbico (%)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

\*En los cálculos efectuados se hicieron las siguientes consideraciones: un 90 % de la composición del tocino dorsal (MF y CF) son lípidos, mientras que, en la manteca y el aceite de girasol (LF y SOF) el 100% de su composición son lípidos.

Se elaboraron un total de 13 ejemplares de sistemas modelo tipo salchicha diferentes, en función de los compuestos volátiles incorporados, de la cantidad y del tipo de grasa empleada para su elaboración. Se elaboraron un total de 6 tipos de sistemas modelo con diferente contenido en grasa a partir de tocino dorsal de cerdos Ibéricos alimentados en régimen de montanera (~ 4%, ~ 10% y ~ 15% de grasa final), tres de ellos incluían los 11 compuestos volátiles (Tabla 9), y los otros 3, únicamente el compuesto 1-octen-3-ol (75 ppm). En relación a los sistemas modelo con diferente tipo de grasa, se emplearon 4 tipos diferentes de grasa con un total de 8 tipos de sistemas modelo. Dos de los cuales, lo constituyen los sistemas modelo elaborados anteriormente, con un ~ 15% final de tocino de cerdos Ibéricos alimentados en régimen de montanera, en esta fase estos sistemas modelo tipo salchicha constituyen el lote MF. Para la elaboración del resto de sistemas modelo se emplearon: tocino dorsal de cerdos Ibéricos alimentados con piensos comerciales (CF), manteca comercial de cedo (LF), y aceite de girasol (SOF). Al igual que en el caso de los sistemas modelo con diferente contenido en grasa, a 4 tipo de sistemas modelo se les incorporó los 11 compuestos volátiles (Tabla 9), y a las otras 4 restantes, únicamente el compuesto 1-octen-3-ol (75 ppm). Los sistemas modelo elaborados con diferente tipo de grasa presentaron un contenido fijo de grasa final del 15 %. Finalmente, se elaboró un tipo de sistema modelo control a partir de tocino dorsal procedente de cerdos Ibéricos alimentados con piensos comerciales, al que no se le incorporó ningún compuesto volátil, y con un contenido en grasa final del 15 %.

Cada tipo de sistema modelo se elaboró de manera independiente y constó de las siguientes etapas (figura 7):

1. *Preparación de los ingredientes y aditivos*: limpieza y división en porciones de la materia prima (carne y tocino dorsal), y conservación a congelación (-18 °C) hasta su utilización. Horas previas a la elaboración de los sistemas modelo, tanto el lomo como la grasa, se retiraron de la cámara de congelación para conseguir un picado/amasado en un punto óptimo de

temperatura. Se pesaron las cantidades necesaria para obtener masas de 1.5 kg.

2. *Picado y amasado del magro*: las porciones de carne se picaron y mezclaron durante 2 min a una velocidad de 15 en una cutter (Stefan UMC 5) hasta obtener una masa homogénea.

3. *Incorporación de la grasa o el aceite y los aditivos*: a la masa magra resultante se le incorporó la grasa o el aceite en la cantidad correspondiente para cada tipo de sistema modelo, así como, los diferentes aditivos y la sal. En el caso concreto de los sistemas modelo que presentaron un contenido en grasa final del ~ 4%, no se incorporó ningún tipo de grasa. Todos los ingredientes fueron mezclados durante 2 min y 30 segundos.

4. *Incorporación de la glucono-delta-lactona (GDL) y el/los compuesto/s volátil/es*: finalmente y dando por concluido la fase de picado/amasado de la matriz cárnica, se incorporó la GDL y el/los compuesto/s volátil/es, siendo mezclados con el resto de la masa durante 30 segundos más.

5. *Envasado a vacío de la masa cárnica*: el objetivo fue eliminar las posibles burbujas de aire presentes en la matriz, mediante su envasado en una envasadora a vacío (Lavezzini modelo CS 40).

6. *Embutido y maduración*: la masa se embutió en tripas artificiales de colágeno de 6 cm de diámetro. Finalmente, se sometieron a un breve proceso de maduración (15 días), en el propio departamento en cámaras destinadas a este fin (equipos frigoríficos compactos, VIZUETE), cuyas condiciones son mostrados en la figura 8. Se siguió el protocolo previamente establecido por Feiner, (2006) en productos cárnicos con GDL.

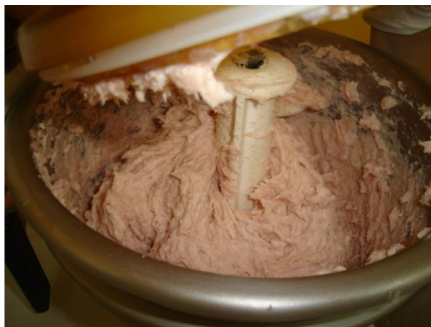
Se obtuvieron un total de 4 muestras (100 g) para cada tipo de sistema modelo.



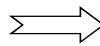
**Figura 7.** Diagrama de flujo de las diferentes fases que constituyen el proceso de elaboración de los sistemas modelo tipo salchicha. \* Incorporación de la grasa o el aceite en todos los lotes excepto en los lotes con un ~ 4% de grasa final. \*\* Incorporación de la mezcla de compuestos o del compuesto 1-octen-3-ol mediante pipeta.



Preparación de los ingredientes y los aditivos



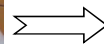
Picado y mezclado del magro (2 min)



Incorporación de la grasa o aceite, la sal y los aditivos (2 min y 30 seg)\*



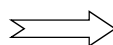
Incorporación de la GDL y el/los compuesto/s volátil/es (30 seg)\*\*



Envasado a vacío de la masa

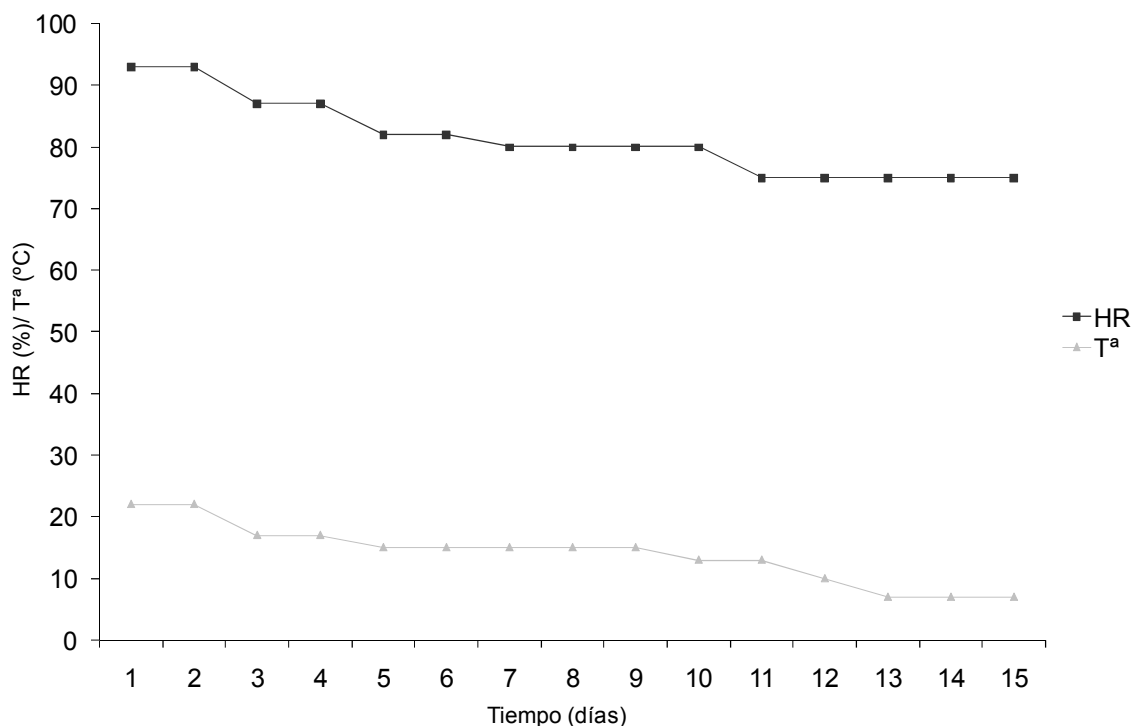


Embutido en tripas de colágeno



Proceso de maduración (15 días)

**Figura 8.** Evolución de la temperatura expresada en °C ( $T^a$ ) y la humedad relativa expresada en % (HR) durante el proceso de maduración de los sistemas modelos.



### 5.2.2 Deshuesado, loncheado y envasado a vacío de los jamones Ibéricos.

Una vez finalizado el proceso de curación, los jamones se deshuesaron y se separaron en 3 secciones como se muestra en la figura 9; *Bíceps femoral* (“maza”), *Cuádriceps femoral* (“babilla”) y musculatura glútea (“cadera”). A continuación, el/los músculo/os correspondiente/es se lonchearon (1mm de grosor) y se envasaron a vacío obteniendo paquetes de unos 90-100 gramos.

El proceso de loncheado y envasado a vacío se realizó días previos a comenzar los ensayos en la compañía Mobepack en Salamanca. La composición y las características del material plástico empleado se muestran en la siguiente tabla (Tabla 11). Se obtuvieron un total de 104 paquetes a partir del loncheado de la “maza” (*Bíceps femoral*) para el primer estudio que constituye el capítulo V. Un total de 110 paquetes para el estudio que constituyen los capítulos VI y VII, con 55 paquetes procedentes del loncheado de la “babilla” (*Cuádriceps femoral*) y 55 paquetes procedentes de la “cadera”

(Musculatura glútea). Y un total de 244 paquetes para el ensayo que constituye el capítulo VIII, 89 paquetes derivados del loncheado de la “babilla” (*Cuádriceps femoral*) y 155 paquetes derivados de la “maza” (*Bíceps femoral*).

**Figura 9.** Deshuesado (izquierda) y su posterior loncheado y envasado a vacío de los diferentes músculos que constituyen la fase experimental II.



**Tabla 11.** Composición y características del material plástico empleado para el envasado a vacío de los loncheados.

Propiedades (film superior)	Valores	Unidad
Composición	Poliamida (PA) Polietileno (PE)	micras micras
Proceso productivo	Coextrusión	
Espesor	100	micras
Peso/m <sup>2</sup>	98.3	grs/m <sup>2</sup>
Temperatura sellado	120-170	°C
Resistencia al desgarro Largo/Ancho	50/40	N/1.5 mm
Permeabilidad al Vapor Agua (23 °C, 85 % HR)	2.4	gr/m <sup>2</sup> día
Permeabilidad al O <sub>2</sub> (23 °C, 85 % HR)	34.0	gr/m <sup>2</sup> dbar
Permeabilidad al CO <sub>2</sub> (23 °C)	120	cm <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> dbar
Permeabilidad al N (23 °C)	8.5	cm <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> dbar

<b>Propiedades (film inferior)</b>	<b>Valores</b>	<b>Unidad</b>
Composición	Poliamida (PA)	micras
	Polietileno (PE)	micras
Espesor	200	micras
Peso/m <sup>2</sup>	192.4	grs/m <sup>2</sup>
Temperatura sellado	120-170	°C
Resistencia al desgarro Largo/Ancho	65/60	N/1.5 mm
Permeabilidad al Vapor Agua (23 °C, 85 % HR)	1.3	gr/m <sup>2</sup> día
Permeabilidad al O <sub>2</sub> (23 °C, 85 % HR)	18.0	cm <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> dbar
Permeabilidad al CO <sub>2</sub> (23 °C)	60.0	cm <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> dbar
Permeabilidad al N (23 °C)	4.5	cm <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> dbar

### 5.2.3 Tratamiento con altas presiones hidrostáticas (APH).

Una vez obtenido los paquetes de jamón loncheado, se remitieron al Instituto del CENTA (Monells, Gerona, España) donde se aplicó un tratamiento con altas presiones hidrostáticas (APH) al 50 % de los paquetes, quedando el otro 50 % de los paquetes sin tratar, y por tanto, como grupo control. La dosis aplicada fue de 600 MPa durante 6 min en un baño a 12 °C. El equipo empleado fue un NC Hyperbaric Wave 6500/120 I (6500 bares y 120 litros). Tras el tratamiento con APH, todos los paquetes (tratados y controles) se remitieron a la Facultad de Veterinaria de Cáceres, donde permanecieron almacenados a refrigeración el tiempo considerado en función del estudio llevado a cabo hasta su análisis sensorial y físico-químico.

### 5.2.4 Contenido en humedad.

La humedad se determinó mediante *desección* empleando el método de la AOAC (2000), utilizando cápsulas de porcelana conteniendo una cantidad de arena de mar igual a 3 veces el peso de la muestra. Aproximadamente 5 g de cada muestra (sistema modelo o jamón curado) fueron mezclados con etanol y sometidos a desecación en estufa durante 24 h a 102 °C. Tras el tiempo de desecación se enfriaron en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y peso constante. El porcentaje de humedad se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = [(P_1 + P_2) - P_3] * (100/P_2)$$

Donde: 'P<sub>1</sub>' es el peso inicial de la cápsula con arena de mar; 'P<sub>2</sub>' es el peso de la muestra; y 'P<sub>3</sub>' es el peso final de la cápsula con arena de mar y muestra desecada.

#### 5.2.5 Contenido en proteínas.

Para cuantificar la proteína total en los sistemas modelo o jamón loncheado, se determinó el nitrógeno total, empleando el método *Kjeldahl* descrito por la AOAC (2000), y se multiplicó por el factor 6.25 (Jones y Gersdorff, 1929). El método constó de tres etapas: digestión, destilación y titulación.

Se pesó 1 g de cada muestra que finamente picada se dispuso en un tubo de digestión Büchi (B-435) al que se le añadieron 15 g de catalizador Kjeldahl (Cu-Se) para ser sometida a un proceso de digestión con 20 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Tras la digestión se procedió a la destilación de la muestra en destilador Büchi (K-324) tras la adición de 100 ml de NaOH al 30 %, y 100 ml de agua destilada, recogiendo el destilado en 100 ml de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> al 2 %. El amoníaco recogido de la destilación se valoró con HCl 0.1N, y se utilizó el indicador mixto (rojo de metilo/azul de metileno) para detectar el punto de equivalencia (cambio de color). Se calculó el porcentaje de proteína bruta con las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ Nitrógeno} = [0.14 (V_1 - V_2)] / P$$

Donde: 'V<sub>1</sub>' son los ml gastados en la valoración de la muestra; 'V<sub>2</sub>' los ml gastados en la valoración del blanco (patrón); y 'P' es el peso de la muestra.

$$\% \text{ Proteína bruta} = 6.25 * \% \text{ Nitrógeno}$$

### 5.2.6 Contenido en grasa total.

La determinación del contenido en grasa se realizó tanto en los sistemas modelo (contenido en grasa total) como en el jamón loncheado (contenido en GIM), de acuerdo con el método descrito por *Folch y cols.*, (1957) con algunas modificaciones. Se partió de 10 g de muestra finamente picada en frascos de centrifuga de plástico que se homogeneizaron con 200 ml de cloroformo/metanol (2:1). Tras una centrifugación a 3000 rpm durante 10 min, se recogió la fracción líquida en embudos de decantación. Al término de la filtración se agregaron 25 ml de agua destilada, se agitaron y dejaron reposar durante 24 h. En matraces esmerilados pesados previamente, se recuperó la fase inferior decantada (liposoluble), filtrando a través de sulfato anhidro. Se evaporó el disolvente en un rotavapor a una temperatura de 40 °C a vacío. Los posibles restos de disolvente se eliminaron bajo corriente de nitrógeno.

El porcentaje de grasa se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Grasa} = [100 * (M_1 - M_2)] / P$$

Donde: 'M<sub>1</sub>' es el peso del matraz con la grasa obtenida, 'M<sub>2</sub>' es el peso del matraz vacío, y 'P' es el peso de la muestra.

### 5.2.7 Contenido en cloruros.

Se realizó la extracción de cloruros con alcohol diluido caliente y posterior determinación por el método *Carpenter-Vohlard* descrito por la AOAC (2000).

Se pesaron 10 g de jamón curado finamente picado en matraces esmerilados. Se añadió 150 ml de alcohol al 40 % y se calentó en agitación suavemente durante 1 hora. Consecutivamente se añadieron 5 ml de cada uno de los reactivos de Carrez y se llevó a enrase con alcohol al 40 % hasta 250 ml. Tras 10 min en reposo se centrifugó 5 min a 3000 rpm. El sobrenadante resultante se filtró hasta 200 ml de enrase con agua destilada. La muestra se calentó hasta un volumen final de 100 ml con la finalidad de eliminar el alcohol.

Una vez preparado el extracto, las determinaciones de cloruros se realizaron mediante titulaciones hasta viraje en volúmenes que contenían: 10 ml del extracto muestra, 1 ml de HNO<sub>3</sub> al 65 %, 50 ml de agua destilada, 1 ml de (NH<sub>4</sub>)Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> y 10 ml de AgNO<sub>3</sub>. El exceso de AgNO<sub>3</sub> se determinó con KSCN 0.1N. Los resultados se expresaron como g NaCl por cada 100 g de jamón curado.

El porcentaje de cloruro sódico se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ NaCl} = 14.625 * (10 - C) / P$$

Donde: 'C' son los ml gastados en la valoración de la muestra; 'P' es el peso de la muestra, y '10' son los ml gastados en la valoración del blanco.

#### 5.2.8 Contenido en pigmentos totales.

Se llevó a cabo la determinación del contenido en mioglobina por el método desarrollado por *Hornsey* (1956). A partir de 10 g de jamón curado en matraces esmerilados, se les incorporó 40 ml de C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O, 10 ml de agua destilada, 1 ml de HCl 12 M. Junto con un blanco que consistió en agua destilada, C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O y HCl, en las mismas cantidades que para el resto de muestras. Se homogeneizaron durante 2 min, se taparon y se guardaron en oscuridad durante 12 h a refrigeración, tras este período se filtraron y se pasó a su medida en el espectrofotómetro a una absorbancia de 640 nm.

Su concentración se calculó a partir de las siguientes fórmulas;

$$\text{Ppm hematina} = [\text{Abs } 640 * \text{Volumen} * 652] / [E * L * P]$$

Donde: 'E' es el coeficiente de extinción milimolar a 640 nm = 4.8 cm<sup>2</sup>/mM, 'L' es el espesor de la cubeta = 1 cm, 'P' es el peso de la muestra.

mg mioglobina / g de muestra = ppm hematina \* 0.026.

ppm Fe hemínico = 8.82 \* (ppm hematina / 100).

### 5.2.9 Análisis instrumental del color.

La determinación del color se llevó a cabo tanto en el magro como en la grasa de cobertura de los loncheados de jamón curado, utilizando un colorímetro Minolta portátil Chroma Meter CR-300, con un área de medición de 8 mm de diámetro, una lámpara de xenón para la iluminación difusa de la muestra, y un iluminante CIE tipo D 65. Las medidas de reflectancia se recogieron en un ángulo de visión de 0 °. El equipo se calibró con un patrón de calibración proporcionado por el fabricante. Se eligió el sistema de medida del color CIE  $L^*a^*b^*$  que define el color con la utilización de tres componentes;  $L^*$  que determina la intensidad de la luminosidad ( $L^*= 0$  oscuro,  $L^*= 100$  luminoso);  $a^*$  que indica el tono de color de la muestra dentro del espacio de color rojo-verde (+ 60 rojo, - 60 verde); y  $b^*$  que revela el tono de color dentro del espacio de color amarillo-azul (+ 60 amarillo, - 60 azul).

Las mediciones del color se realizaron por triplicado en tres zonas distintas elegidas aleatoriamente y a temperatura ambiente ( $\approx 18$  °C). En los casos que se consideró oportuno se calculó la diferencia total de color ( $\Delta E$ ):

$$\Delta E^{a-b} = [(L^*_b - L^*_a)^2 + (a^*_b - a^*_a)^2 + (b^*_b - b^*_a)^2]^{1/2}$$

Donde: ' $L^*_b$ ' es la luminosidad de la muestra después del tratamiento, ' $L^*_a$ ' es la luminosidad de la muestra antes del tratamiento, ' $a^*_b$ ' es el tono de color rojo de la muestra después del tratamiento, ' $a^*_a$ ' es el tono de color rojo de la muestra antes del tratamiento, ' $b^*_b$ ' es el tono de color amarillo de la muestra después del tratamiento y ' $b^*_a$ ' es el tono de color amarillo de la muestra antes del tratamiento.

### 5.2.10 Análisis del perfil de textura (TPA).

La evaluación instrumental de la textura de los sistemas modelo se realizó mediante el método descrito por *Bourne* (1978). El ensayo consistió en comprimir nueve porciones cilíndricas de cada lote de sistemas modelo (3 cm de diámetro y 12 mm de espesor, (Figura 10) acondicionados a temperatura ambiente durante al menos 60 min. Se comprimieron al 35 % de su grosor original mediante una sonda cilíndrica de 5 cm de diámetro y a una velocidad



de 5 mm/seg por dos ciclos, imitando la masticación de manera que los parámetros de textura se extraen de una curva de fuerza-tiempo. En un primer ciclo de movimiento la sonda presiona y comprime la muestra para luego volver a su posición inicial y repetir el proceso en un segundo movimiento.

Los parámetros determinados son (Bourne, 1978):

Dureza ( $\text{N}/\text{cm}^2$ ), Cohesividad (adimensional), Adhesividad ( $\text{N} \times \text{seg}$ ), Elasticidad (cm), Masticabilidad ( $\text{N} \times \text{seg}$ ), Gomosidad ( $\text{N}/\text{cm}^2$ ) y Resiliencia (adimensional).

**Figura 10.** Muestreo y análisis del perfil de textura instrumental (TPA) de los sistemas modelo elaborados.



#### 5.2.11 Análisis de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

El análisis de TBARS se realizó tanto en los sistemas modelo como en los loncheados de jamón, siguiendo la metodología descrita por *Salih y cols.*, (1987). Se homogenizaron en tubo falcón 2.5 g de muestra (sistema modelo o jamón curado) con 7.5 ml de  $\text{HClO}_4$  al 3.86 % y 0.25 ml de BHT al 4.2 % en etanol. Durante el desarrollo de este paso los tubos falcón permanecieron inmersos en hielo para minimizar la generación de nuevas reacciones oxidativas. El homogeneizado se filtró y centrifugó a 3000 rpm durante 2 min. Se tomó una alícuota de 2 ml que se mezcló con 2 ml de TBA 0.02 M en tubo

de vidrio con tapa de rosca. Los tubos con la muestra, junto con un blanco (3 ml HClO<sub>4</sub> y 3 ml TBA) y la curva patrón, se incubaron en un baño de agua termostaticado a 90 - 100 °C durante 30 min. Tras enfriarse, se midió la absorbancia de la mezcla resultante a 532 nm. Se preparó una curva patrón para cuantificar usando 1,1,3,3- tetraetoxipropano (TEP) en HClO<sub>4</sub> al 3.86 %, a concentraciones de entre 0.028 a 1.1134 mg TEP/L.

Los resultados son expresados en mg MDA/Kg muestra.

#### *5.2.12 Determinación del contenido en carbonilos totales por la técnica del 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH).*

La oxidación de proteínas se evaluó mediante la cuantificación del total de carbonilos presentes en los sistemas modelo por derivatización con 2,4-dinitrofenilhidrazina, de acuerdo al método descrito por *Ganhão y cols.*, (2010). Se homogeneizó 1 g de muestra con 10 ml de buffer 20 mM de Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y NaCl 0.6 M a pH 6.5. En dos tubos eppendorf de 2 ml se dispusieron sendas alícuotas de 200 µl para determinar de forma paralela el contenido de carbonilos (C) y la concentración de proteínas (P) de una determinada muestra. Se precipitaron las proteínas con 1 ml de TCA al 10 % por centrifugación a 5000 rpm durante 5 min. El pelet resultante del tubo C se trató con 1 ml de una solución de HCl 2 N y DNPH 0.2 %, mientras que, el pelet del tubo P se trató con 1 ml de HCl 2 N. Ambas muestras se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente agitando con vortex regularmente. Tras la incubación las muestras se precipitaron con 1 ml de TCA al 10 % por centrifugación a 5.000 rpm durante 5 min. A continuación, se eliminó el sobrenadante y se realizaron tres lavados con 1 ml de etanol/acetato de etilo (1:1, v/v) centrifugando a 10.000 rpm durante 5 min, para eliminar el exceso de DNPH hasta que el pelet quedase completamente limpio. Finalmente, los pelets resultantes se disolvieron en 1.5 ml de buffer 20 mM de Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 6.5 con clorhidrato de guanidina 6 M. La concentración de proteína se calculó a partir de la absorbancia a 280 nm de la muestra y la de un patrón de BSA (concentraciones de entre 0.015 a 1 mg/ml de BSA). La cantidad de carbonilos se expresó como nmol de carbonilos por mg de proteína usando un coeficiente

de extinción molar de hidrazonas ( $21.0 \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) a 370 nm. En ambas medidas se empleó un blanco (guanidina 6 M).

### 5.2.13 Síntesis y derivatización de los semialdehídos $\alpha$ -aminoadípico (AAS) y $\gamma$ -glutámico (GGS) como indicadores de oxidación de proteínas.

Los estándares de AAS y GGS se sintetizaron *in vitro* a partir de la N-acetyl-L-lisina y N-acetyl-L-ornitina. La reacción fue catalizada por la lisil oxidasa obtenida de la membrana de la cáscara de huevo siguiendo el procedimiento descrito por *Akagawa y cols.*, (2006). Los semialdehídos AAS y GGS fueron analizados mediante un proceso de derivatización y mediante la técnica de LC-ESI-MS (Cromatografía de líquidos- ionización electrospray- espectrometría de masas) descrita por *Akagawa y cols.*, (2006) y *Estévez y cols.*, (2009), respectivamente. O bien mediante la técnica de HPLC-FLD (Cromatografía de líquidos acoplada a un detector de fluorescencia) descrita por *Utrera y cols.*, (2011).

Las muestras fueron cortadas, mezcladas y posteriormente homogeneizadas (1:10) (w/v) en un tampón fosfato 10 mM que contiene NaCl 0.6 M, usando un homogeneizador ultra-turrax durante 30 seg. Alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  fueron pipeteadas a tubos eppendorf y precipitadas con 2 ml de TCA al 10 % y centrifugadas a 2000 rpm durante 30 min. Los sobrenadantes fueron eliminados y los pellets resultantes fueron tratados con 2 ml de TCA al 5 %, y posteriormente, centrifugados a 5000 rpm durante 5 min. A continuación, los grupos carbonilo de las proteínas fueron derivatizados de la siguiente manera; incorporamos a las muestras 500  $\mu\text{l}$  de 250 mM 2-(N-morfolino) ácido etanosulfónico (MES), tampón que contiene un 1 % de SDS y 1 mM de DTPA. A continuación, 500  $\mu\text{l}$  del tampón MES 250 mM que contiene 50 mM de ABA, y 500  $\mu\text{l}$  de tampón MES 250 mM que contiene 100 mM de  $\text{NaCNBH}_3$ , fueron añadidos a las muestras que posteriormente fueron incubadas a 37 °C en oscuridad durante 60-90 min y agitadas de manera regular. Posteriormente, la proteína fue de nuevo precipitada con 500  $\mu\text{l}$  de TCA al 50 % y centrifugada durante 10 min a 10000 rpm o 5 min a 5000 rpm. Los sobrenadantes fueron eliminados y los pellets se lavaron por duplicado con 1ml de TCA al 10 % y 1ml de etanol:diétiléter (1:1 v/v), agitados y centrifugados durante 5 min a 5000 rpm.

A continuación, los pellets son hidrolizados con 1.5 ml de HCl 6 N a 110 °C durante 18 h. Finalmente, las proteínas hidrolizadas fueron llevadas a sequedad mediante el uso de un rotavapor a 40 °C o por medio de un concentrador centrífugo tipo Speed-Vac. Los extractos secos se redisolieron en 200 µl de agua Mili-Q y filtrados por medio de filtros de jeringa de polipropileno (GHP) (0.45 µm de tamaño de poro, Pall Corporation, USA), para el análisis por HPLC.

#### *5.2.13.1 Cuantificación de los semialdehídos AAS y GGS por LC-ESI-MS.*

Tras el proceso de derivatización anteriormente descrito, la cuantificación final de los carbonilos AAS y GGS de las muestras, en este caso de jamón Ibérico loncheado que constituyen el primer capítulo (*Capítulo V*), se realizó por LC-ESI-MS. Tras su redisolución en agua Mili-Q y filtrado por medio de filtros de jeringa de polipropileno, las muestras (4 µl) fueron inyectadas en un HPLC Agilent 1100 series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipado con una columna de fase reversa Luna (5 µm C18 II column, 150 x 1.00 mm i.d. Phenomenex Torrance, CA, USA) eluida con un flujo isocrático a 50 µl/min de agua – 2.5 % ácido acético (disolvente A; 95 %) y metanol – 2.5 % ácido acético (disolvente B; 5 %). La columna operaba a temperatura constante de 30 °C. El análisis por espectrometría de masas fue llevado a cabo en un Esquire-LC equipado con un cuadrupolo con trampa de iones, una interfase de ESI (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) y LC-MSD Trap software, version 5.2 (Bruker Daltonics). Las condiciones del espectrómetro de masas fueron las siguientes: voltaje capilar de 3500 V, voltaje en la salida del capilar 25 V, potencial “skimmer” de 15 V, y el valor del conductor de la trampa fue de 36. La información suministrada por el ESI-MS fue archivada usando una lectura en el rango de 100-700 m/z. La presión del nebulizador (nitrógeno) fue de 50 psi, gas seco, con flujo de 8 l/min, y una temperatura seca de 300 °C. La identificación de ambos semialdehídos en las muestras fue confirmada mediante comparación de los tiempos de retención, el espectro de masas, y el patrón de fragmentación de éstos con los compuestos estándar. Los picos correspondientes a los iones moleculares de AAS-ABA y GGS-ABA fueron integrados manualmente del ión fragmentado del cromatograma (EIC), y las

áreas resultantes fueron usadas como indicadores arbitrarios de la abundancia de ambos semialdehídos.

#### 5.2.13.2 Cuantificación de los semialdehídos AAS y GGS por HPLC-FLD.

La cuantificación final de AAS y GGS en el resto de muestras de jamón loncheado que constituyen el *capítulo* VI, y de los sistemas modelo tipo salchicha que constituyen el *capítulo* IV, se realizó por HPLC-FLD en un equipo Shimadzu 'Prominence', equipado con detector de fluorescencia. Una alícuota del reconstituido (1µl) fue analizada en el equipo de HPLC anteriormente comentado. La separación de los compuestos fue en fase reversa con una columna COSMOSIL 5C18-AR-II RP-HPLC (150 mm de longitud x 4.6 mm de diámetro interno x 5 µm de diámetro de partícula) equipada con una columna de seguridad (10 mm de longitud x 4.6 mm de diámetro interno) rellena del mismo material. Las fases móviles fueron un buffer de acetato de sodio 50 mM a pH 5.4 (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B) y mediante un gradiente de presión baja variando la concentración de acetonitrilo de 0 % (minuto 0) a 8 % (minuto 20). El flujo fue mantenido a 1 ml/min a una temperatura constante de 30 °C. Los picos fueron registrados a unas longitudes de onda de 283 y 350 nm para excitación y emisión, respectivamente. Los compuestos estándar (0.1 µl) fueron sometidos y analizados bajo las mismas condiciones. Los picos correspondientes a AAS-ABA y GGS-ABA fueron integrados manualmente de los cromatogramas resultantes. La estimación de las cantidades (AAS-ABA y GGS-ABA) fueron calculadas asumiendo que la fluorescencia emitida por 1 mol de ABA es equivalente a la emitida por 1 mol de carbonilo derivatizado. Los resultados se expresan como nmol de carbonilo por mg de proteína.

#### 5.2.14 Análisis del perfil de ácidos grasos.

Se prepararon ésteres metílicos de los ácidos grasos de la materia prima (grasa y lomo) y de los sistemas modelo, por medio de una trans-esterificación mixta en presencia de CH<sub>3</sub>ONa y de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5 % en metanol (*Cava y cols., 1997*), añadiendo previamente ácido tridecanoico como patrón interno. La separación y determinación de los ácidos grasos se realizó mediante un

cromatógrafo de gases HP 5890A equipado con inyector en-columna y detector FID (Detector de ionización de llama), además de una columna capilar de polietilenglicol (Supelcowax-10, Supelco, Bellefonte PA) (60 m de longitud x 0.32 mm de diámetro interno x 0.25  $\mu\text{m}$  de grosor). El gas portador fue helio a un flujo de 0.8  $\text{ml}/\text{min}^{-1}$  y el programa de temperatura se inició a 190  $^{\circ}\text{C}$ , incrementando 2  $^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$  hasta alcanzar los 235  $^{\circ}\text{C}$ , se mantuvo 15 min a esta temperatura y posteriormente se incrementó 6  $^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$  hasta alcanzar los 250  $^{\circ}\text{C}$ , temperatura a la que finalmente se mantuvo durante 20 min. La temperatura del inyector y detector fue de 250  $^{\circ}\text{C}$ . La identificación de cada ácido graso se realizó por comparación de los tiempos de retención en las muestras con patrones (Sigma, St. Louis, MO), que se analizaron empleando las mismas condiciones cromatográficas.

#### *5.2.15 Análisis de compuestos volátiles por técnicas instrumentales.*

Se analizaron los compuestos volátiles liberados de 1 g de sistema modelo o jamón curado en el espacio de cabeza de un vial por microextracción en fase sólida (SPME) y cromatografía de gases y detector de masas (CG-EM), siguiendo la metodología descrita por *Andrés y cols.* (2004). Para el ensayo se utilizó una fibra SPME de divencilbenzo-carboxen-polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) 50/30  $\mu\text{m}$ , activada durante 45 min a 270  $^{\circ}\text{C}$ . Tras la activación, la fibra se insertó a través del septum del tapón que cierra el vial con la muestra, exponiéndola al espacio de cabeza de la muestra. El vial con la muestra fue pre-acondicionado durante 15 min a 37  $^{\circ}\text{C}$  inmerso en un baño de agua termostatzado. La extracción se llevó a cabo en el mismo baño a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante 5 min en el caso de los sistemas modelo, y durante 30 min en el caso del jamón curado. Transcurrido este tiempo, la fibra de SPME fue transferida inmediatamente al inyector del CG-EM cuya temperatura en modo splitless se fijó a 270  $^{\circ}\text{C}$ . El análisis de compuestos volátiles se realizó en un cromatógrafo de gases HP-6890 serie II acoplado a una espectrómetro de masas Agilent 5973. La separación de los compuestos volátiles se realizó por medio de una columna capilar de tipo HP-5 (Restek, USA) (5% fenil-95 % dimetilpolisiloxano, 50 m de longitud x 0.25 mm de diámetro interno x 1,05  $\mu\text{m}$  de espesor). La fibra de SPME fue desorbida y mantenida en el puerto de inyección a 270  $^{\circ}\text{C}$

durante toda la carrera cromatográfica. El programa de temperatura en el caso de los loncheados de jamón curado fue isotérmico comenzando a 40 °C durante 10 min y aumentando hasta los 200 °C a razón de 5 °C min<sup>-1</sup>, hasta 250 °C a razón de 15 °C min<sup>-1</sup>, y mantenida esta temperatura durante 10 min. No obstante, para los sistemas modelo tipo salchicha, el programa de temperatura fue isotérmico comenzando a 45 °C durante 10 min y aumentando hasta los 200 °C a razón de 10 °C min<sup>-1</sup>, hasta 250°C a razón de 15 °C min<sup>-1</sup>, y mantenida esta temperatura durante 10 min.

En ambos casos la línea de transferencia del espectrómetro de masas se mantuvo a 270 °C. Los espectros de masas se generaron por impacto electrónico a 70 eV, con un voltaje del multiplicador de 1756 V. Los datos se recolectaron a razón de 1 scan s<sup>-1</sup> en el rango m/z 30 a 500. Los compuestos volátiles se identificaron por comparación de su espectro con los espectros de masas incluidos en las bibliotecas Willey y el tiempo de retención de los patrones de cada compuesto. El contenido en volátiles se expresó en unidades arbitrarias de área (AAU).

#### *5.2.16 Evaluación sensorial.*

El análisis cuantitativo descriptivo (ACD) y el tiempo-intensidad (TI) se aplicaron tanto en los sistemas modelo que incluían el compuesto volátil 1-octen-3-ol como en los loncheados de jamón Ibérico.

##### *5.2.16.1 Catadores.*

Este análisis fue llevado a cabo con la ayuda de un panel sensorial entrenado de acuerdo a las Normas Internacionales (ISO), compuesto por 6 hombres y 6 mujeres, todos colaboradores del laboratorio (estudiantes graduados, doctorandos y profesores del área de Tecnología e Higiene de los Alimentos), con edades comprendidas entre los 25 y 55 años, con experiencia en el análisis sensorial.

### 5.2.16.2 Entrenamiento del panel para el ACD.

#### *Entrenamiento con los sistemas modelo.*

En relación a los sistemas modelo tipo salchicha, en el entrenamiento se pretendió que los catadores se familiarizaran con el producto objeto de estudio además de desarrollar el vocabulario específico para este producto cárnico, constituyendo la hoja de cata específica.

Inicialmente, el objetivo fue evaluar sensorialmente los sistemas modelo que incluían todos los compuestos volátiles, pero se detectaron dificultades para fijar descriptores adecuados y discernir entre los atributos derivados de la presencia conjunta de los 11 compuestos volátiles. En base a estos antecedentes, se decidió llevar a cabo el estudio sensorial únicamente en aquellos sistemas modelo aromatizados con el 1-octen-3-ol.

En el entrenamiento con este tipo de muestras se siguieron las siguientes pautas:

1°. Familiarización e identificación del olor vinculado a dicho compuesto, evaluándose tres disoluciones acuosas de 1-octen-3-ol elaboradas según se describen en la Norma UNE 87013:1996 para la detección y reconocimiento de olores.

2°. Evaluación del olor en cinco masas cárnicas que no han sufrido el proceso de maduración de diferentes tipos de sistemas modelo elaborados con diferente tipo de grasa (manteca de cerdo-LF, tocino de cerdo Ibérico de pienso-CF y aceite de girasol-SOF) y con diferentes concentraciones de 1-octen-3-ol (0, 25, 50 y 75 ppm). Evaluando una muestra de cada masa cárnica elaboradas con: LF y 25 ppm de 1-octen-ol, SOF y 50 ppm de 1-octen-3-ol, CF y sin 1-octen-3-ol incorporado. Y finalmente, una muestra de cada masa cárnica con 75 ppm del compuesto y elaborada a partir de CF y SOF.

3°. Evaluación de la intensidad de olor y el flavor y generación de los descriptores asociados a los sistemas modelo tipo salchicha ya madurados con las diferentes concentraciones de 1-octen-3-ol (0, 25, 50 y 75 ppm). Como apoyo, durante la generación de los atributos que caracterizaran el olor y el flavor del producto, se les proporcionó una lista de posibles descriptores.



4°. Generación y discusión de los descriptores asociados a la apariencia y textura del producto para completar la ficha de cata.

5°. Exposición y evaluación de la intensidad de todos los atributos generados por los catadores en escalas lineales horizontales no estructuradas de 10 cm de longitud, con extremos correspondientes al máximo y al mínimo de percepción de la intensidad.

6°. Finalmente, tras la evaluación con las escalas se llevó a cabo un consenso de los descriptores que caracterizaban al producto, y que debían por lo tanto, formar parte de la ficha de cata, y de la concentración de 1-octen-3-ol. Se seleccionó una concentración de 1-octen-3-ol de 75 ppm, al considerarse la más adecuada al permitir una mejor percepción y diferenciación de los atributos relacionados con el olor y el flavor de las muestras.

La ficha completa de cata para los sistemas modelo cárnicos tipo salchicha se muestra en la tabla 12.

**Tabla 12.** Atributos que constituyen la ficha de cata para la evaluación de los sistemas modelo mediante la técnica de ACD.

<b><u>Apariencia</u></b>	
Intensidad del color	Intensidad del color presente en el centro de la loncha.
Homogeneidad del color	Cuantificación de la variación de color.
<b><u>Grado de cohesión</u></b>	
Propiedad mecánica de la textura relativa al grado de deformación de un producto antes de romperse.	
<b><u>Textura</u></b>	
Gomosidad	Propiedad mecánica de la textura relativa a la cohesión de un producto blando. La sensación bucal está relacionada con el esfuerzo requerido para poder reducir el producto al estado necesario para su degustación.
Dureza	Propiedad mecánica de la textura relativa a la fuerza requerida para deformar el alimento o para hacer penetrar un objeto en él. En la boca se percibe al comprimir los productos sólidos entre los dientes o los semisólidos entre la lengua y el paladar.
<b><u>Olor</u></b>	
Intensidad general	Percepción por medio de la nariz de sustancias volátiles liberadas en los alimentos.
Seta- champiñón	Propiedad organoléptica de sustancias puras o de mezclas cuyo olor produce el olor característico de los champiñones.
Tierra húmeda	Propiedad organoléptica de sustancias puras o de mezclas cuyo olor produce un olor asociado a la recogida de setas.
Curado	Conjunto complejo de características organolépticas olfativas que se desarrollan como consecuencia de la adición de sales curantes y del posterior secado/maduración del producto.
Tostado*	Propiedad organoléptica de sustancias puras o de mezclas cuyo olor produce el olor característico de frutos secos tostados.
Herbáceo*	Propiedad organoléptica de sustancias puras o de mezclas cuyo olor se caracteriza por presentar notas herbales.
Grasa	Describe el olor elemental producido por la presencia de grasa en un producto.

**Tabla 12.** (Continuación)

---

<b><i>Flavor</i></b>	
Intensidad general	Conjunto complejo de las propiedades olfativas y gustativas que se perciben durante la degustación y que puede estar influido por las propiedades táctiles, térmicas, dolorosas e incluso por efectos cinestésicos.
Ácido	Describe el sabor elemental producido por soluciones acuosas diluidas de la mayoría de los ácidos (por ejemplo: cítrico, tartárico).
Salado	Propiedad organoléptica de sustancias puras o de mezclas cuya degustación produce un sabor salado.
Herbáceo*	Propiedad organoléptica de sustancias puras o de mezclas cuyo sabor se caracteriza por presentar notas herbales.
Champiñón	Propiedad organoléptica de sustancias puras o de mezclas cuyo sabor produce el sabor característico de los champiñones.
Rancio	Sensación olfato-gustativa purgente a grasa vieja.
Curado	Conjunto complejo de características organolépticas olfato-gustativas que se desarrollan como consecuencia de la adición de sales curantes y del posterior secado/maduración del producto.
Persistencia	Sensación olfato-gustativa raramente similar o muy próxima a la sensación percibida cuando el producto estaba en la boca que permanece localizada un cierto tiempo y cuya duración se puede medir.

---

\*El olor "a tostado" y el olor y flavor "herbáceo" fueron eliminados posteriormente de la ficha de cata al considerarse irrelevantes tras los resultados obtenidos en las primeras sesiones y la discusión con el panel.

El protocolo de evaluación de las muestras fue el siguiente: para la evaluación del olor y el flavor media loncha de sistema modelo (grosor 1mm) presentada en frascos de cristal con tapadera junto con unas pinzas para la extracción de la muestra en la evaluación del flavor. Mientras que, para la evaluación y generación de atributos relacionados con la textura y la apariencia, se presentaron lonchas completas en platos de cristal (Figura 11).

**Figura 11.** Forma de presentación para la evaluación de los atributos seleccionados en el entrenamiento de los sistemas modelo para la ficha de cata del ACD.



### *Entrenamiento con los loncheados de jamón Ibérico envasados a vacío.*

El entrenamiento con los loncheados de jamón curado de cerdo Ibérico se hizo posteriormente al de los sistemas modelo, por lo que fue mucho más específico, considerando que este tipo de productos son evaluados de forma habitual por los miembros del panel de cata, y que están familiarizados con las bases de la evaluación sensorial y el uso de escalas no estructuradas. En este caso, el entrenamiento se orientó a fijar y consolidar los aspectos del ACD

específicos para la evaluación de jamón curado. El entrenamiento mostrado en la figura 12, siguió los protocolos establecidos para el entrenamiento específico en el ACD (Lawless y Heymann, 1998). Constó de las siguientes etapas:

- 1°. Generación del vocabulario, es decir, los atributos descriptores o atributos propios de las muestras a evaluar. Se le presentaron a los catadores lonchas de jamón curado Ibérico de los diferentes grupos que constituyen cada experimento en platos de cristal codificadas con un número de tres dígitos. Para facilitar la generación de descriptores se les proporcionó una lista de posibles descriptores del jamón curado Ibérico, en base a la experiencia del director de cata y a la bibliografía consultada (Ruiz y cols., 1998).
- 2°. Selección mediante consenso de los atributos previamente generados de forma individual.
- 3°. Entrenamiento con escalas no estructuras de 10 cm de longitud fijando los extremos verbales de los atributos seleccionados por consenso correspondientes al máximo y mínimo de percepción de la intensidad, empleando referencias para atributos concretos (Tabla 13).

En el caso concreto de los loncheados que constituyen el *capítulo* VIII, en el cual, uno de los factores objeto de estudio fue la temperatura de consumo, las muestras empleadas durante el entrenamiento se presentaron al panel atemperadas a las diferentes temperaturas de estudio (7 °C, 16 °C y 20 °C). La ficha completa de cata generada para los loncheados de jamón Ibérico se presenta en la tabla 14, y consta de un total de 25 atributos referidos a la grasa de cobertura (apariencia y textura táctil), y al magro (apariencia, olor, textura y flavor). Esta ficha de cata se empleó como base utilizándose de forma diferente en función del estudio llevado a cabo. En el caso del primer capítulo (*Capítulo* V) se evaluaron 21 de los 25 atributos presentes en la ficha de cata original. En el resto de estudios correspondientes a los *capítulos* VII y VIII, los atributos relacionados con la textura y el flavor del magro se evaluaron mediante la técnica dinámica de TI, y por lo tanto, la ficha de cata empleada para el ACD estaba constituida

por 12 atributos correspondientes a la apariencia, a la textura táctil y al olor de las muestras.

**Figura 12.** Entrenamiento del panel para el análisis sensorial mediante la técnica ACD. Generación, selección y evaluación de los descriptores que constituirán la ficha de cata de los loncheados de jamón curado.



**Tabla 13.** Referencias empleadas en el entrenamiento del panel para la técnica de ACD de los loncheados de jamón.

	<i>Extremo izquierdo</i>	<i>Extremo derecho</i>
<b>Grasa de cobertura</b>		
<i>Apariencia</i>		
Intensidad del color	Manteca	Tocino oxidado
Brillo	Manteca a 7 °C	Tocino atemperado a 30 °C durante 20-30 min
<i>Textura táctil</i>		
Fluidez	Tocino a -18 °C	Tocino atemperado a 30 °C durante 20-30 min
Dureza	Tocino atemperado a 30 °C durante 20-30 min	Tocino a -18 °C
<b>Magro</b>		
<i>Apariencia</i>		
Intensidad del color rojo	Jamón Serrano de corta maduración	Cecina
Veteado	Jamón Serrano de corta maduración	Jamón Ibérico
Brillo	Cecina	Jamón Ibérico atemperado a 50 °C cubierto de aceite
<i>Olor</i>		
Intensidad general	Grasa de bacon	Tocino oxidado atemperado a 50 °C durante 24 h

**Tabla 14.** Atributos que constituyen la ficha de cata para la evaluación de los loncheados de jamón curado envasados a vacío mediante la técnica de ACD.

<b><i>Grasa de cobertura</i></b>	
<b><i>Apariencia</i></b>	
Color rosa	Intensidad del color rosa presente en la grasa de cobertura.
Color amarillo	Intensidad del color blanco presente en la grasa de cobertura. Variación desde blanco a amarillo.
Homogeneidad del color	Cuantificación de la variación de color.
Brillo	Aspecto de un producto que lo asemeja a una superficie pulida que muestra reflejos luminosos.
<b><i>Textura</i></b>	
Dureza	Resistencia mecánica a la presión ejercida por el dedo índice sobre la grasa de cobertura.
Fluidez	Sensación aceitosa al deslizar el dedo a lo largo de la grasa de cobertura.
Arenoso	Presencia de gránulos al deslizar el dedo índice sobre la superficie de la grasa de cobertura.
<b><i>Magro</i></b>	
<b><i>Apariencia</i></b>	
Intensidad del color	Intensidad del color presente en el magro de la loncha de jamón dependiente de la concentración de la molécula mioglobina.
Tono del color rojo	Tono del color rojo presente en el magro dependiente del estado químico de la molécula mioglobina. Variación desde rojo a marrón.
Brillo	Aspecto de un producto que lo asemeja a una superficie pulida que muestra reflejos luminosos.
Veteado	Medida de la cantidad de grasa infiltrada (intramuscular) en el tejido muscular.



**Tabla 14.** (Continuación).

---

<i>Olor</i>	
General	Percepción por medio de la nariz de sustancias volátiles liberadas en los alimentos.
Rancio	Olor purgente a grasa vieja
Curado	Conjunto complejo de características organolépticas olfativas que se desarrollan como consecuencia de la adición de sales curantes y del posterior secado/maduración del producto.
<i>Textura</i>	
Dureza	Propiedad mecánica de la textura relativa a la fuerza requerida para deformar el alimento o para hacer penetrar un objeto en él. En la boca se percibe al comprimir los productos sólidos entre los dientes o los semisólidos entre la lengua y el paladar.
Jugosidad	Sensación asociada a la liberación de agua y grasa por la masticación, así como, por la secreción de jugos bucales provocados por la carne durante la masticación.
Pastosidad	Sensación percibida en la masticación asociada a la combinación de bajos valores de dureza y valores relativamente altos de adhesividad y gomosidad.
Masticabilidad	Propiedad mecánica de la textura relacionada con la cohesión y con el tiempo necesario o el número de masticaciones requeridas para dejar un producto sólido en las condiciones necesarias para su deglución.
Fibrosidad	Percepción de partículas alargadas y de orientación paralela en un producto.

---

**Tabla 14.** (Continuación).

---

<i>Flavor</i>	
General	Conjunto complejo de las propiedades olfativas y gustativas que se perciben durante la degustación y que puede estar influido por las propiedades táctiles, térmicas, dolorosas e incluso por efectos cinestésicos.
Salado	Propiedad organoléptica de sustancias puras o de mezclas cuya degustación produce un sabor salado.
Amargor	Propiedad organoléptica de sustancias puras o de mezclas cuya degustación produce un sabor amargo
Curado	Conjunto complejo de características organolépticas olfato-gustativas que se desarrollan como consecuencia de la adición de sales curantes y del posterior secado/maduración del producto.
Rancio	Sensación olfato-gustativa purgente a grasa vieja.
Persistencia	Sensación olfato-gustativa raramente similar o muy próxima a la sensación percibida cuando el producto estaba en la boca que permanece localizada un cierto tiempo y cuya duración se puede medir.

---

### *5.2.16.3 Entrenamiento del panel para la técnica TI.*

La evaluación sensorial de las muestras mediante el ACD, se consideró una parte del entrenamiento del panel para el tiempo-intensidad (TI) (Peyvieux y Dijksterhuis, 2001), lo que permitió al panel de cata la familiarización tanto con las muestras como con los atributos que posteriormente se evaluarían mediante la técnica TI, particularmente, para las muestras de los sistemas modelo tipo salchicha.

#### *Entrenamiento con los sistemas modelo tipo salchicha para la técnica TI.*

Se aplicaron las directrices descritas por Peyvieux y Dijksterhuis, (2001) con algunas modificaciones para entrenar al panel en la técnica TI. El entrenamiento tuvo una duración total de 7 sesiones de entrenamiento (dos sesiones introductorias y de familiarización con la técnica, de 2 h cada sesión, y 5 sesiones de entrenamiento con el producto real), divididas en tres partes (Figura 13):

Primera. Al ser un método de evaluación completamente diferente al anterior (ACD), se comenzó con una breve introducción para explicar la metodología seguida en esta técnica (base teórica del TI e instrucciones para manejar el ordenador que se emplearía para la recogida de datos). Durante esta parte se presentaron igualmente las muestras a evaluar a los catadores, explicando su composición en términos generales sin comentar aspectos relacionados con el diseño experimental, y evitar que pudieran tener excesiva información al respecto. En el caso de los sistemas modelo tipo salchicha, la presentación del producto se hizo de una forma más detallada al ser un nuevo producto nunca antes evaluado por el panel.

Segunda. A continuación, para familiarizar al panel con la técnica TI y con el protocolo de evaluación de las muestras que requiere, el panel evaluó con el TI de manera individual en las diferentes cabinas de la sala de cata disoluciones de dos sabores básicos que podemos encontrar en los productos a evaluar, como el ácido ( $1.20 \text{ g l}^{-1}$  ácido cítrico) y salado ( $8.0 \text{ g l}^{-1}$  cloruro sódico).

Tercera. Finalmente, se trabajó con el producto real y se establecieron las condiciones de evaluación en las cabinas, con luz roja (220-230 V 25 W) para evitar la influencia de la apariencia en su evaluación. Además, se emplearon pinzas nasales para evitar la influencia del olor en la percepción del flavor. Los atributos evaluados mediante TI se seleccionaron por consenso con el panel. Al considerarse los más interesantes desde el punto de vista de su modificación temporal durante el consumo de los sistemas modelo, de flavor se evaluó; la intensidad general del flavor, el flavor a champiñones, el flavor a rancio y el flavor a curado. De textura se seleccionó la gomosidad, por considerarse el atributo de textura más característico de las muestras evaluadas, teniendo en cuenta los resultados previamente obtenidos con el ACD.

Se desarrollaron cinco sesiones de entrenamiento en las que el panel evaluó las muestras y los atributos seleccionados. Se emplearon escalas lineales horizontales no estructuradas, cuyos extremos fueron “menos” y “más”. El protocolo de evaluación de las muestras fue discutido y establecido con el panel, fijándose según se describe en la tabla 15.

**Figura 13.** Las diferentes fases del entrenamiento del panel para la técnica TI de los sistemas modelos; primera y segunda fase (extremo superior) y tercera fase (extremo inferior).



**Tabla 15.** Protocolo estandarizado y seguido por el panel en todas las evaluaciones de TI (SM: sistemas modelo, LJ: loncheados de jamón).

	SM	LJ
Empleo de pinzas o clips nasales para evitar la influencia del olor*.	si	no
Tiempo mínimo de masticación (segundos).	15	10
La evaluación continúa hasta que los catadores dejen de percibir el atributo evaluado.	si	si
Movimiento del cursor hacia el extremo izquierdo ("menos") cuando dejen de percibir.	si	si
Las diferencias de intensidad se registran moviendo el cursor a lo largo de la escala en función de la intensidad percibida.	si	si
Tiempo máximo de evaluación (segundos).	120	120
Para la textura, una vez que los catadores tragan la muestra éstos deben mover el cursor hacia el extremo izquierdo ("menos")**.	si	si
<u>Entre atributo y atributo evaluado se establece el protocolo de lavar su paladar con tostada no salada y agua.</u>	si	si

\*Los catadores antes de extraer la muestra del frasco de cristal se colocarán las pinzas o clips nasales, las cuales, se quitarán en el momento que comiencen la evaluación de la muestra en boca.

\*\* En el caso de los sistemas modelo el panel estableció escupir la muestra, como consecuencia de su parcial agrado con el producto.

### *Entrenamiento con los loncheados de jamón Ibérico envasados a vacío para la técnica TI.*

El panel de cata empleado en la evaluación de la percepción temporal de las muestras de jamón curado fue el mismo que el panel empleado para los sistemas modelo. Por tanto, en este caso los catadores estaban ya entrenados y familiarizados con los protocolos de evaluación mediante la técnica de TI.

Siguiendo las mismas pautas que en los sistemas modelo (Peyvieux y Dijksterhuis, 2001), se efectuaron un total de tres sesiones de entrenamiento (2 h por sesión):

1°. En una primera sesión se llevó a cabo una breve introducción sobre la metodología seguida con esta técnica (Instrucciones para manejar el ordenador), y una presentación de las muestras a evaluar objeto de estudio.

2°. A continuación, el panel trabajó con la técnica TI evaluando en las cabinas individuales bajo luz blanca, la dureza y la intensidad general del flavor de diferentes tipos de muestras cárnicas. Los productos cárnicos elegidos fueron jamón cocido, cecina y jamón serrano, los cuales, fueron seleccionados por las diferencias tan marcadas que tienen en estos atributos seleccionados.

3°. Finalmente, para la generación y selección de los atributos de textura y flavor que definiesen al producto, se les proporcionó una lista de posibles descriptores en jamón curado en base a la experiencia del director del panel y a la bibliografía científica consultada (Ruiz y cols., 1998). Por consenso se seleccionaron un total de 7 atributos, 3 atributos de textura; dureza, jugosidad y fibrosidad, y 4 de flavor; sabor salado, intensidad general, rancidez y curado.

Posteriormente, se llevaron a cabo 2 sesiones de entrenamiento con el producto y los atributos seleccionados antes de comenzar con las sesiones definitivas.

En todo momento, los catadores separaban la grasa de cobertura del magro de la loncha. Los loncheados del *capítulo* VIII fueron previamente acondicionados a las diferentes temperaturas de consumo, protocolo desarrollado más adelante en el apartado 5.2.16.5. Todas las muestras se

presentaron en platos de cristal en tantas porciones de muestra como atributos a evaluar (un total de 7 atributos) (Figura 14).

**Figura 14.** Acondicionamiento previo al entrenamiento de los loncheados cuyo factor de estudio fue la temperatura de consumo (extremo superior), y forma de presentación de las muestras para el entrenamiento con los atributos seleccionados para la ficha de cata del TI (extremo inferior) de los diferentes loncheados que constituyen la *fase experimental II*.



Al igual que en el caso de los sistemas modelo, se emplearon escalas lineales horizontales no estructuradas, cuyos extremos verbales fueron “menos” y “más”. El protocolo de evaluación de las muestras, al igual que en los sistemas modelo, se estableció por consenso con el panel (Tabla 15).

Durante todas las sesiones efectuadas de TI, tanto para los sistemas modelo como para los loncheados de jamón, se le indicaba a los catadores que debían hacer en cada momento mediante la inclusión de mensajes del tipo: “indique la intensidad percibida mientras mastica la muestra mediante el movimiento del cursor a lo largo de la escala”, “trague o escupa la muestra y mueva el cursor hacia menos cuando deje de percibir”. Este protocolo estandarizado fue seguido en todas las evaluaciones de TI.

#### *5.2.16.4 Diseño experimental de las sesiones de evaluación sensorial.*

El análisis sensorial efectuado por el panel se desarrolló en un total de 52 sesiones, de las cuales, 16 sesiones fueron para el estudio de los sistemas modelo tipo salchicha, y un total de 36 sesiones para el estudio de los loncheados de jamón Ibérico. En cada sesión se evaluaron un total de 2, 3 o 4 muestras codificadas con un número de tres dígitos.

De las 16 sesiones de evaluación sensorial de los sistemas modelo;

- 8 sesiones fueron para la técnica de ACD, de las cuales, 3 sesiones se emplearon para evaluar los sistemas modelo elaborados con tocino dorsal de cerdos Ibéricos cebados en montanera con diferente contenido en grasa, (~ 4%, ~ 10% y ~ 15%). Las otras 5 sesiones restantes se emplearon para evaluar los sistemas modelo elaborados con diferente tipo de grasa (MF, CF, LF y SOF) más el lote control (sin 1-octen-3-ol).

Con un total de 3 repeticiones por panelista y lote elaborado.

- En las 8 sesiones restantes los sistemas modelo se evaluaron mediante la técnica TI, de las cuales igualmente, fueron necesarias 3 sesiones para evaluar los sistemas modelo elaborados con diferente contenido en grasa (~ 4%, ~ 10% y ~ 15%). Y un total de 5 sesiones para evaluar los sistemas modelo elaborados con diferente tipo de grasa (MF, CF, LF y SOF) más el lote control (sin 1-octen-3-ol).

Con un total de 3 repeticiones por panelista y lote elaborado.

De las 36 sesiones destinadas a la evaluación sensorial de los loncheados de jamón curado;



- 20 sesiones se emplearon para llevar a cabo las evaluaciones mediante la técnica sensorial de ACD. En 8 sesiones se evaluaron las muestras procedentes de cada lote del primer capítulo, el *capítulo V*, en los que se evaluó la influencia del tratamiento con APH; tratados (HHP) y no tratados (C) con altas presiones, y la forma de presentación; envasados en tres diferentes formatos comerciales (CSF; formato loncheado tradicional, las lonchas de jamón extendidas a lo largo del envase, ASF; formato loncheado apilado, las lonchas de jamón son apiladas de manera horizontal, y IF; formato intacto, jamón sin lonchar en un bloque de 2 cm de grosor). Con un total de 6 lotes; HHP CSF, HHP ASF, HHP IF, C CSF, C ASF y C IF. En 4 sesiones se evaluaron las muestras que constituyen el tercer capítulo (*Capítulo VII*), teniendo como factores objeto de estudio la influencia del tratamiento con APH; tratados (HHP) y no tratados (C) con altas presiones, y el contenido en GIM; alto (Hip) y bajo (Flank), en loncheados almacenados durante 4 meses a refrigeración. Con un total de 4 lotes; HHP Hip, HHP Flank, C Hip y C Flank. Finalmente, las 8 sesiones restantes se emplearon para estudiar el efecto de la temperatura previa al consumo (*Capítulo VIII*); 7 °C, 16 °C y 20 °C, y el contenido en GIM; alto (BF) y bajo (QF). Con un total de 6 lotes; BF 7 °C, BF 16 °C, BF 20 °C, QF 7 °C, QF 16 °C y QF 20 °C.

Con un total de 4 repeticiones por panelista y lote de muestras.

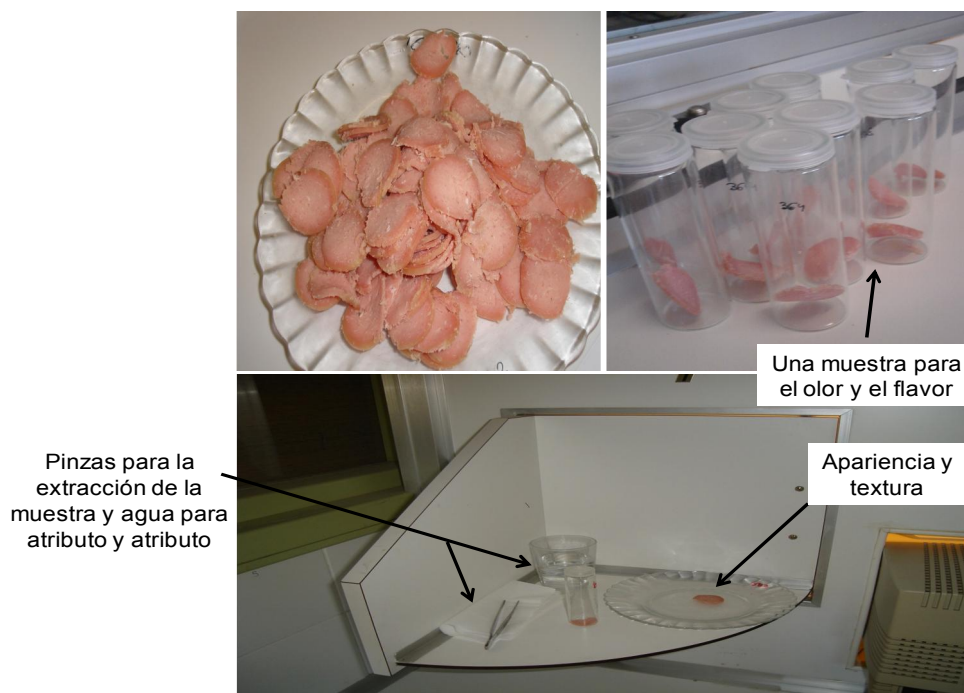
- En las 16 sesiones restantes los loncheados se valoraron mediante la técnica TI. 8 sesiones para evaluar las muestras que constituyen el *capítulo VII*, anteriormente comentadas, y 8 sesiones para evaluar las muestras que constituyen el cuarto capítulo (*Capítulo VIII*), descritas igualmente en el párrafo anterior.

Con un total de 4 repeticiones por panelista y lote de muestras.

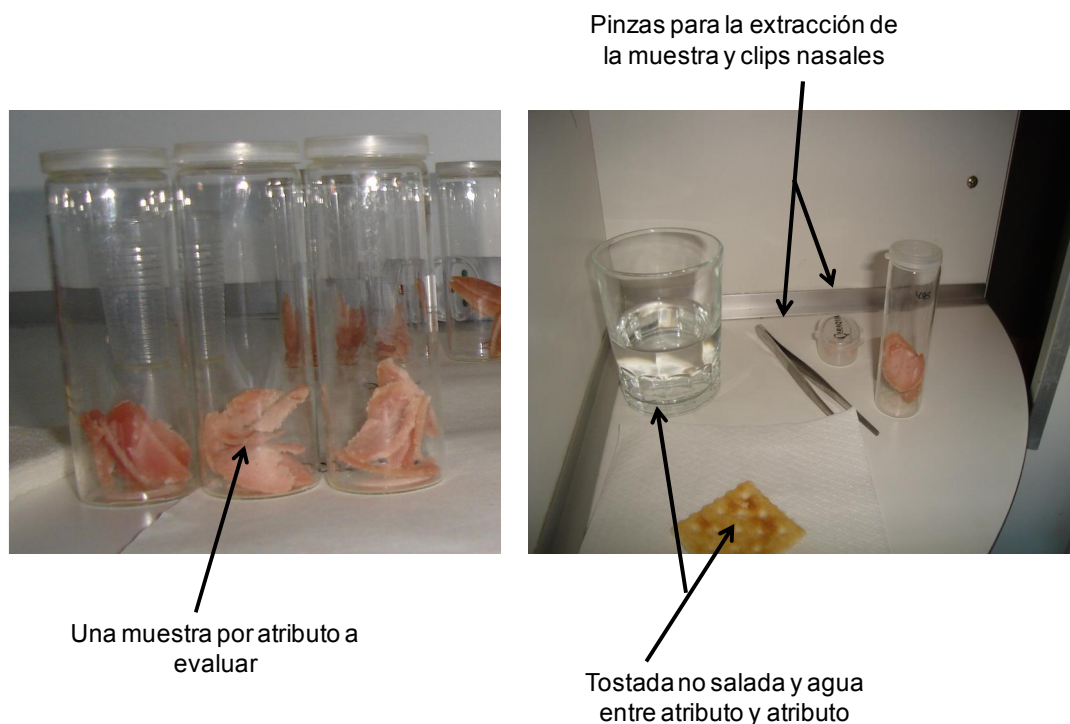
### 5.2.16.5 Preparación de las muestras para las evaluaciones sensoriales.

En lo que respecta a los sistemas modelo, cada grupo de muestras pertenecientes a una sesión de evaluación sensorial fueron loncheadas en el mismo día de análisis mediante una loncheadora comercial (OMS modelo TGI 300), para obtener lonchas de 1 mm de grosor (Figura 15a). Las muestras se dispusieron sobre platos de cristal cubierto con papel de aluminio para evitar la pérdida de aroma y permanecieron durante 20-30 min a temperatura ambiente. Para las sesiones de ACD, bajo un código de tres dígitos se presentaron lonchas completas en platos de cristal para los atributos relacionados con la apariencia y la textura, mientras que, para los atributos relacionados con el olor y el flavor, se presentaron medias lonchas colocadas en frascos de cristal cerrados (Figura 15a). En las sesiones de TI, los catadores recibieron en frascos de cristal cerrados bajo un código de tres dígitos, media loncha de sistema modelo por atributo evaluado (un total de 5 atributos) (Figura 15b).

**Figura 15 (a).** Loncheado y forma de presentación de las muestras de los sistemas modelo para las evaluaciones sensoriales mediante la técnica de ACD.



**Figura 15 (b).** Forma de presentación de los sistemas modelo para las evaluaciones sensoriales de textura y flavor mediante TI.



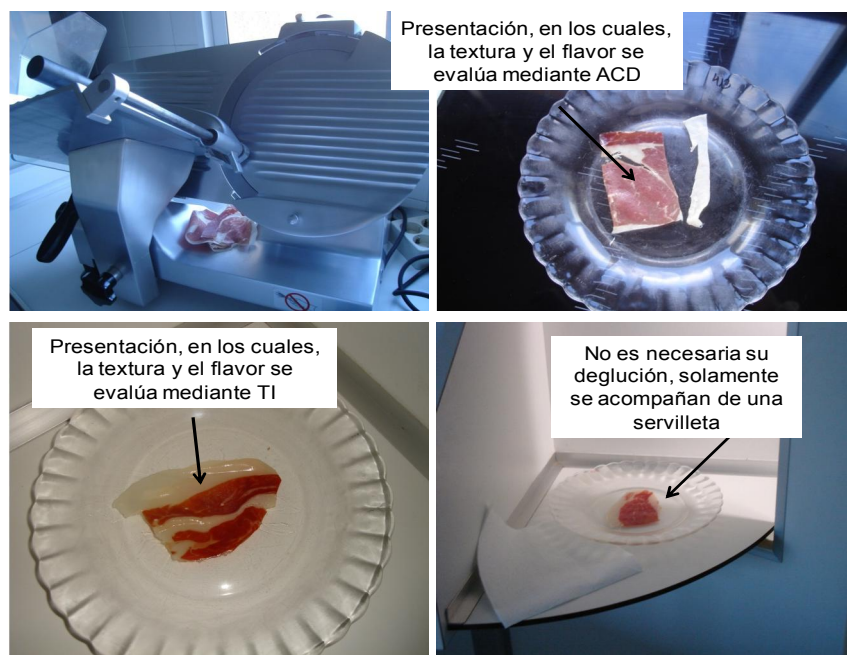
En la preparación de las muestras para el análisis sensorial de los loncheados de jamone Ibérico, únicamente se lonchearon las muestras del formato intacto (bloque de 2 cm de grosor) perteneciente al *capítulo V* (Figura 16a) utilizando una loncheadora comercial (OMS modelo TGI 300) para obtener lonchas de 1 mm de grosor. Para el resto de lotes estudiados, las muestras se presentaban ya loncheadas en el envase. Previamente a la evaluación sensorial, todas las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante al menos 20-30 min en su envase cerrado, para evitar así la pérdida de aroma. Todas las muestras se dispusieron directamente en platos de cristal para su evaluación mediante el ACD. En estas evaluaciones, en las cuales la ficha de cata contempla atributos relacionados con la grasa de cobertura y el magro, ambos se evaluaron de manera independiente (Figura 16b). Del mismo modo, para las sesiones de TI las muestras se presentaron en platos de cristal, salvo que en este caso, fueron cortadas en tantas porciones como atributos a evaluar, y se pidió retirar la grasa de cobertura (Figura 16c).

En el caso particular del cuarto estudio (*Capítulo VIII*), donde uno de los factores estudiados fue la influencia de la temperatura de consumo sobre las características sensoriales. Se estableció un protocolo de atemperado tras una serie de pruebas de medición de la temperatura a diferentes tiempos (10 min, 15 min, 20 min, 30 min, 40 min y 50 min de atemperado) en estufas destinadas a este fin (VELP Scientific modelo FTC 90E y Aqua Lytic modelo FKS 3600), con un termómetro de sonda sobre las muestras objeto de estudio. Tanto las muestras como los platos de cristal, se acondicionaron a la temperatura correspondiente (7 °C, 16 °C o 20 °C) en estas estufas de temperatura controlada durante al menos 30 min previos a la cata (Figura 16c). Las muestras eran extraídas de las estufas en el momento que el catador daba comienzo a la evaluación y solicitaba las diferentes muestras que constituían la sesión de cata.

**Figura 16 (a).** Diferentes formas de presentación planteadas para el *capítulo V*. Formato loncheado tradicional (superior), formato loncheado alternativo (centro) y formato intacto (inferior).



**Figura 16 (b).** Loncheado del formato intacto del capítulo V, y las distintas formas de presentación de los diferentes loncheados para la evaluación sensorial mediante la técnica ACD. La forma de presentación varía en función de la/s técnica/s desarrollada/s en cada capítulo de los loncheados de jamón curado.



**Figura 16 (c).** Forma de presentación de todos los loncheados (extremo superior) y atemperado previo de las muestras y los platos para los loncheados del capítulo VIII (extremo inferior) para la evaluación sensorial mediante la técnica TI.



### *Condiciones de las evaluaciones sensoriales.*

Las evaluaciones sensoriales se efectuaron en la sala de cata de la planta piloto del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos (Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura), provista de cabinas individuales diseñadas atendiendo a la Norma UNE 87001:1979.

Todas las evaluaciones se realizaron bajo condiciones ambientales similares de temperatura e iluminación (~ 21 °C, Corona 15 W 108 mA, 220-240 V/ 50 Hz – 4200 K). Sin embargo, para las sesiones de evaluación de los sistemas modelos en atributos relacionados con la textura y el flavor evaluados mediante TI, se emplearon bombillas de luz roja (~ 21 °C, Mazda 220-230 V 25 W) para evitar la influencia de la apariencia del producto en la evaluación de estos atributos.

La distribución de la muestra a cada catador, bien para la evaluación de los sistemas modelo tipo salchicha, o bien para la evaluación de los loncheados de jamón Ibérico, fue igual para todos, de manera homogénea y en platos o frascos de cristal idénticos, y codificados con números de tres dígitos elegidos al azar por el FIZZ software. La codificación de cada muestra no debe proporcionar al catador ninguna información sobre su identidad.

En cada cabina en función del objetivo de cada estudio, de la técnica sensorial empleada, y de la muestra evaluada, se preparaba con un vaso de agua, servilleta de papel, tostada no salada, pinzas o clips para la nariz, luz artificial blanca o roja.

Las escalas empleadas en todos los entrenamientos y sesiones de cata fueron escalas lineales horizontales no estructuradas de 10 cm de longitud. En cuyos extremos aparecen las palabras “rojo” y “marrón”, para evaluar la intensidad del tono rojo del magro de los loncheados, “blanco” y “amarillo” para evaluar la intensidad del color de la grasa de cobertura de los mismos, y para el resto de atributos en ambos productos las palabras “menos” y “más”.

El programa informático empleado para la recopilación de datos de las distintas sesiones fue el FIZZ Network (v.1.01: Byosistememes, Francia).

### 5.2.17 Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los resultados se efectuó con el programa SPSS versión 15.0 para Windows. Se realizó una estadística descriptiva simple (medias y desviaciones estándar), para caracterizar sensorial e instrumentalmente los loncheados y sistemas modelo analizados.

Con el fin de analizar cada uno de los efectos (contenido y tipo de la grasa en los sistemas modelo, así como, el efecto de los diferentes tratamientos post-procesado y el contenido en GIM en los jamones Ibéricos loncheados), se aplicó el procedimiento ANOVA (Análisis de la varianza), empleando el test de Tukey para la comparación múltiple de las medias obtenidas del análisis instrumental, y un ANOVA medidas repetidas (MLG; modelo lineal general) empleando el test de Bonferroni para la comparación múltiple de las medias obtenidas del análisis sensorial. Incluyendo en cada modelo como factores intra-sujetos los parámetros concretos de cada estudio.

En lo que respecta a las curvas TI medias, fueron calculadas para cada atributo teniendo en cuenta el número de catadores y el número de repeticiones usando el FIZZ software. Un ANOVA medidas repetidas (MLG) fue igualmente llevado a cabo para los parámetros extraídos de las curvas medias como son la Intensidad máxima (Imax), la duración de esa intensidad máxima (DurPI), el tiempo final (Tend) y el área bajo la curva (AreaTse o Area). Del mismo modo que en los casos anteriores, se incluyeron como factores intra-sujetos los parámetros concretos de cada ensayo.

En ocasiones se completó el estudio mediante correlaciones de Pearson ( $r$ ), y Análisis de Componentes Principales (ACP), con la finalidad de facilitar la interpretación de los resultados.





## BIBLIOGRAFÍA



- Andres, A. I., Cava, R., Ventanas, J., Muriel, E., & Ruiz, J. (2004). Lipid oxidative changes throughout the ripening of dry-cured Iberian hams with different salts contents and processing conditions. *Food Chemistry*, 84, 375–381.
- Akagawa, M., Sasaki, D., Ishii, Y., Kurota, Y., Yotsu-Yamashita, M., Uchida, K., y cols. (2006). New methods for the quantitative determination of mayor protein carbonyls,  $\alpha$ -aminoadipic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes: Investigation of the formation mechanism and chemical nature in vitro and in vivo. *Chemical Research in Toxicology*, 19, 1059–1065.
- A.O.A.C. (2000). Official Methods of Analysis, 17th ed. Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburgh, Maryland.
- Bourne, M. C. (1978). Texture profile analysis. *Food Technology*, 32, 62–66.
- Carrapiso, A. I., Jurado, A., Timón, M. L., & García, C. (2002a). Odor-active compounds of Iberian hams with different aroma characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6453–6458.
- Carrapiso A. I., Ventanas J., & García C. (2002b). Characterization of the Most Odor-Active Compounds of Iberian Ham Headspace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1996-2000.
- Cava, R., Ruiz, J., López-Bote, C., Martín, L., García, C., Ventanas, J., & Antequera, T. (1997). Influence of finishing diet on fatty acid profiles of intramuscular lipids, triglycerides and phospholipids in muscles of the Iberian pig. *Meat Science*, 46, 263-270.
- Estévez, M., Ollilainen, V., & Heinonen, M. (2009). Analysis of protein oxidation markers  $\alpha$ -aminoadipic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes – In food proteins by using LC–ESI–Multi-Stage Tandem MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3901-3910.
- Feiner G. (2006). Meat products handbook. Woodhead Publishing, Cambridge
- Folch, L., Lees, M., & Sloane-Stanley, C. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497–509.
- Ganhão, R., Morcuende, D., & Estévez, M. (2010). Protein oxidation in emulsified cooked burger patties with added fruit extracts: Influence on colour and texture deterioration during chill storage. *Meat Science*, 85, 402–409.
- Hornsey, H. C. (1956). The colour of cooked cured pork. I. Estimation of the nitric oxide-haem pigments. *Journal Science Food Agricultural*, 8, 534–540.
- Jones, D. B. & Gersdorff, C. E. F. (1929). Proteins of the avocado (*Persea americana* Mill). *Journal of Biological Chemistry*. 81 (3), 533-539.
- Lawless, H. T., & Heymann, H. (1998). Sensory evaluation of food: principals and practices. Chapman and Hall, New York.
- Peyvieux, C., & Dijksterhuis, G. (2001). Training a sensory panel for TI: a case study. *Food Quality and Preference*, 12, 19-28.
- Ruiz, J., Ventanas, J., Cava, R., Timón, M .L., & García, C. (1998). Sensory characteristics of Iberian ham: influence of processing time and slice location. *Food Research International*, 31, 53-58.

- Salih, A. M., Smith, D. M., Price, J. F., & Dawson, L. E. (1987). Modified extraction 2-thiobarbituric acid method for measuring lipid oxidation in poultry. *Poultry Science*, 66, 1483–1488.
- UNE 87001:1979. Análisis sensorial. Guía para la instalación de una sala de cata. *Tomo I-Alimentación. Recopilación de Normas UNE*. En AENOR (eds.). Madrid, España.
- UNE 87013:1996. Análisis sensorial. Metodología. Iniciación y entrenamiento de jueces en la detección y reconocimiento de olores. *Tomo I-Alimentación. Recopilación de Normas UNE*. En AENOR (eds.). Madrid, España.
- Utrera, M., Morcuende, D., Rodríguez-Carpena, J. G., & Estévez, M. (2011). Fluorescent HPLC for the detection of specific protein oxidation carbonyls –  $\alpha$ -amino adipic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes – in meat systems. *Meat Science*, 89, 500-506.
- Ventanas, J. (2001). Tecnología del jamón Ibérico: de los sistemas tradicionales a la explotación racional del sabor y el aroma. En Mundi-Prensa (eds.). Madrid.
- Ventanas, S., Mustonen, S., Puolanne, E., & Tuorila, H. (2010a). Odour and flavour perception in flavoured model systems: Influence of sodium chloride, umami compounds and serving temperature. *Food Quality and Preference*, 21, 453-462.
- Ventanas, S., Puolanne, E., & Tuorila, H. (2010b). Temporal changes of flavour and texture in cooked bologna type sausages as affected by fat and salt content. *Meat Science*, 85, 410-419.



CAPÍTULOS



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Atendiendo al formato científico de redacción de Tesis Doctorales, este apartado se presenta en forma de ocho artículos de investigación elaborados a partir de los datos experimentales obtenidos con el Material y Métodos especificados en la sección anterior.

### 6.1 LISTADO DE MANUSCRITOS.

**Artículo 1 (Capítulo I).** Static and dynamic sensory methods to evaluate the flavour and texture in dry-cured meat model products varying the fat content. (p.177)

**Artículo 2 (Capítulo II).** Impact of lipid composition on dynamic sensory perception of flavour and texture in experimental fermented sausages. (p.203)

**Artículo 3 (Capítulo III).** Effect of lipid content and composition on volatile compounds release from experimental fermented sausages. (p.231)

**Artículo 4 (Capítulo IV).** Impact of lipid content and composition on lipid oxidation and protein carbonylation in experimental fermented sausages. (p.253)

**Artículo 5 (Capítulo V).** Lipid and protein oxidation and sensory properties of vacuum-packaged dry-cured ham subjected to high hydrostatic pressure. (p.281)

**Artículo 6 (Capítulo VI).** Impact of high pressure treatment and intramuscular fat content on colour changes and protein and lipid oxidation in sliced and vacuum-packed Iberian dry-cured ham. (p.317)

**Artículo 7 (Capítulo VII).** Application of time-intensity method to assess the sensory properties of Iberian dry-cured ham: effect of fat content and high pressure treatment. (p.343)

**Artículo 8 (Capítulo VIII).** Effect of intramuscular fat content and serving temperature on temporal sensory perception of sliced and vacuum packaged dry-cured ham. (p.373)





## CAPÍTULO I.

**Estatus:** en proceso de revisión en *Food Science and Technology International*, 9 de Abril de 2013.

### **Static and dynamic sensory methods to evaluate the flavour and texture in experimental fermented sausages varying the fat content**

Verónica Fuentes<sup>a\*</sup>, Jesús Ventanas<sup>a</sup>, Ana I. Carrapiso<sup>b</sup> y Sonia Ventanas<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Department of Animal Production and Food Science, University of Extremadura,  
10003 Cáceres, Spain.

<sup>b</sup> Food Technology, University of Extremadura, Ctra. de Cáceres s/n, 06071 Badajoz,  
Spain.

\*Corresponding author: Verónica Fuentes, email:[vefuentesd@unex.es](mailto:vefuentesd@unex.es)

## **Abstract**

Two different descriptive sensory techniques, a static (Quantitative Descriptive Analysis-QDA) and a dynamic sensory method (Time-Intensity-TI) were applying for evaluating the effect of fat content on the sensory characteristics of experimental fermented sausages. Experimental fermented sausages with different fat levels (~ 4%, ~ 10% and ~ 15%) and flavoured with 1-octen-3-ol were manufactured. Release of 1-octen-3-ol was analysed using SPME and GC/MS. Chromatographic areas of 1-octen-3-ol negatively correlated with temporal perception of mushroom flavour. Modifications of sausages matrices in terms of fat content did not affect dynamic perception of overall flavour, whereas increasing the fat content led to a higher intensity and shorter duration of mushroom flavour and a less persistence of rancid and cured flavour. Experimental fermented sausages with the lowest fat content showed a higher intense and a longer gumminess perception. Moreover, differences in protocols of sample consumption between both techniques could have contributed to the differences found in flavour perception between both sensory methods.

## **Keywords**

Fat content, Experimental fermented sausages, TI, Flavour, Texture, QDA.

## INTRODUCTION

Meat products are complex food matrices with a great variety of components which can interact with flavour compounds affecting their release and perception (Jiménez-Colmenero, 1996). Among them, lipids play different roles in meat flavour perception as they contribute to flavour compounds generation mainly through oxidation reactions and act as solvent for the volatile compounds (Mottram, 1998). Moreover, texture is an important sensory attribute that depends on the characteristics of the matrix and thus is affected by the fat level and the type of fat (Jiménez-Colmenero, 1996).

Dry-cured meat products, particularly hams and loins, derived from Iberian pigs are highly appreciated by consumers because of their particular and distinctive sensory attributes including flavour and texture (Ventanas et al., 2005). The high intramuscular fat (IMF) content of these products (12 % average for dry-cured hams) is directly linked to certain sensory characteristics as marbling, juiciness and flavour (Ventanas et al., 2005). Scientific articles devoted to the influence of fat content on the release and perception of aromatic volatile compounds in dry-cured meat products are very limited. Ventanas et al., (2008) reported the effect of IMF content on volatile compounds release in Iberian dry cured loins but measured by instrumental techniques.

Static sensory techniques have been extensively applied to study the sensory characteristics of Iberian dry-cured products (Ruiz et al., 1998; Ventanas et al., 2007) as well as the effect of fat content on sensory characteristics of other meat products as frankfurters (Crehan et al., 2000) or fermented sausages (Muguerza et al., 2002; Olivares et al., 2010). However, the perception of flavour and texture in foods are dynamic not static phenomena (Cliff and Heymann, 1993). Dynamic sensory methods as the Time-intensity (TI) technique provide temporal information about perceived sensation being suitable for quantifying changes in flavour and texture attributes during foods consumption (Cliff and Heymann, 1993). This technique has been successfully applied to study the flavour perception in different foods and beverages (Barylko-Pikielna et al., 1990; van Buuren, 1992) as well as the dynamic texture perception (Wendin et al., 2000; Roger Haker et al., 2003) although the

application in meat products is mainly limited to pork patties and cooked sausages (Reinbach et al., 2009; Ventanas et al., 2010).

The present study aimed to provide an insight into the temporal sensory perception of flavour and texture in dry cured meat products and particularly in those derived from Iberian pigs using the TI technique. Moreover, the results obtained using the classical static sensory profile (QDA) was compared with those obtained using the TI technique. As an initial approach, a experimental fermented sausage was designed and consisted in a simple matrix containing fat, lean and additives and with a shorter ripening process (15 days) compared to that of Iberian dry-cured hams (3 years). Moreover, in order to better understand the flavour release and perception, a selected volatile compound, 1-octen-3-ol was added to the experimental fermented sausages. This compound was selected since (i) it has been reported as odour active compound in Iberian dry-cured hams (Carrapiso et al., 2002) (ii) it is a hydrophobic compound therefore with a high affinity by the lipid phase and (iii) its particular aromatic notes allowing an easier recognition and identification by the panellist. The effect of fat content was studied by varying the fat content (~ 4%, ~ 10% and ~ 15%) in the experimental fermented sausages taking into consideration that Iberian dry-cured hams has an average level of 12 % of IMF content. Release of 1-octen-3-ol was also instrumentally analysed.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Experimental fermented sausages manufacture**

Experimental fermented sausages were manufactured in a pilot plant. Three different treatments were designed based on the final fat content namely: ~ 4%, ~ 10% and ~ 15%. Back-fat from Iberian pigs reared extensively and fed on acorns and grass during the final fattening period (“montanera” rearing system) was used in different proportion to get the required fat content in each group. Formulations of all sausages included: 96.84 % (for ~ 4%), 92.93 % (for ~ 10%) and 88.11 % (for ~ 15%) of lean pork (contains 3.01 % of fat content), 0.00 % (for ~ 4%), 3.90 % (for ~ 10%) and 8.73 % (for ~ 15%) of back-fat, 2 % of

sodium chloride, 1 % of glucono-delta-lactone, 0.015 % of sodium nitrite and 0.05 % of ascorbic acid. All sausages were flavoured with one volatile compound, 1-octen-3-ol (75 mg Kg<sup>-1</sup>) ( $\log P_{(o/w)} = 2.6$ , vapour pressure (mmHg) = 0.24 and water solubility (mg/l) = 1.84E + 03) (PhysProp Database, <http://www.syrres.com/what-we-do/databaseforms.aspx?id=386>). This compound was partly selected due to its distinctive and easy to recognize flavour notes (mushroom-like and earthy flavours, (<http://www.flavornet.org/flavornet.html>) (Sahidi et al., 1986).

Manufacture of sausages was run as follows: first, lean pork was cleaned removing the external fat. Subsequently the lean and fat were chopped separately and then the lean was minced and mixed in a vacuum cutter for 2 min. Afterwards, the fat, the sodium chloride and the additives (sodium nitrite and ascorbic acid) were mixed for 2 min and 30 seconds, and finally the glucono-delta-lactone (GDL) and the volatile compound 1-octen-3-ol were added and mixed for 30 seconds. Then, the batter was vacuum-packaged to remove air bubbles and stuffed in collagen casings (6 cm of diameter). Finally, ripening of sausages was carried out in dryer chambers during 15 days, with relative humidity ranging from 95 % to 75 % and temperature ranging from 22 °C to 12 °C. At the end of the ripening process the loss weight of the three groups of sausages was 35 % average. The ripening process was fixed following the protocols developed for meat products containing GDL (Feiner, 2006).

### **Experimental fermented sausages characterization**

Fat content was determined using the Folch method (Folch et al., 1957), protein content was determined by the Kjeldahl method (ISO 937:1978) and moisture was analysed by an AOAC method (AOAC, 2000). Twelve repetitions per type of sausages were performed.

#### **1-octen-3-ol analysis**

1-octen-3-ol release was determined in the flavoured sausages (~ 4%, ~ 10% and ~ 15%) and also in a control group (non-flavoured) to confirm that the proportion of generated against added compound was negligible. The volatile

compound was extracted from headspace samples using the SPME (solid phase microextraction) procedure and analysed by GC/MS (mass spectrometry) (gas chromatograph Hewlett–Packard 5890 series II coupled to a mass selective detector Hewlett–Packard HHP-5791A). One gram of minced sample was weighed into a 4 ml vial. All vials were closed with a teflon/silicone septum. A SPME fibre (50/30  $\mu\text{m}$  divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane coating) (Supelco) was inserted through the septum and exposed to the headspace of the vial. Vials were pre-conditioned for 15 min at 37 °C. Extraction was carried out at 37 °C for 5 min in a water bath. After extraction, the SPME fibre was immediately transferred to the injector of the chromatograph which was in the splitless mode at 270 °C. The separation of the volatile compounds was performed on a 5 % phenyl–methyl silicone (HP-5) bonded phase fused silica capillary column (Hewlett– Packard, 50 m x 0.32 mm i.d, film thickness 1.05  $\mu\text{m}$ ), operating at 6 psi of column head pressure. Oven programme was: 45 °C for 10 min, 10 °C  $\text{min}^{-1}$  to 200 °C, 15 °C  $\text{min}^{-1}$  to 250 °C, and held 250 °C for 10 min. The transfer line to the mass spectrometer was maintained at 270 °C. The mass spectra were obtained using a mass selective detector by electronic impact at 70 eV, a multiplier voltage of 1756 V and collecting data at a rate of 1 scan  $\text{s}^{-1}$  over the  $m/z$  range 30–500. The volatile compounds were identified by comparing their mass spectrum and linear retention index with those of the standards and also by comparing the mass spectrum with those reported in the Wiley library. Results are given in area units (AU). Six repetitions per sausages were performed.

### **Sensory evaluation**

Sensory evaluations of both QDA and TI were carried out in the sausages flavoured with 1-octen-3-ol (75 mg  $\text{Kg}^{-1}$ ). Nine panellists (3 males and 6 females, age range 25-49) all of them were members of the Food Technology Department (University of Extremadura). All fermented sausages were stored under chilled conditions and sliced (1 mm) during the sessions using a commercial slicing machine, and finally conditioned at room temperature ( $\sim$  21 °C). Samples were coded with three digit numbers and samples order was randomised following the “Williams Latin Square” design. In each session, three slices (1mm) per type of sausages ( $\sim$  4%,  $\sim$  10% and  $\sim$  15%) flavoured with 1-

octen-3-ol (75 mg Kg<sup>-1</sup>) were given to the assessors and the three groups were evaluated within the same session with a total of three repetition per type of sausages.

### **Quantitative descriptive analysis**

Prior to time-intensity (TI) study, a quantitative descriptive analysis (QDA) was carried out using a trained panel (n= 9) who had already participated in the sensory evaluation of other meat products and had experience in the development of sensory profiles. The development of a conventional sensory profile can be considered as a part of the TI training (Peyvieux and Dijksterhuis, 2001) to test if the selected attributes are applicable to the product under investigation and to allow panellists to get familiar with the attributes and samples later used in the TI study.

To generate and set up the list of attributes characterizing the sausages, samples (medium fat content, ~ 10%) flavoured with different concentration of 1-octen-3-ol (25, 50 and 75 mg kg<sup>-1</sup>), and one non-flavoured (control group) were evaluated during training sessions (4 hours). In addition, three dissolutions with different concentration of 1-octen-3-ol (UNE 87013:1996) were employed as references to evaluate odour attributes linked to 1-octen-3-ol and thus panelists got familiar with the aromatic notes linked to this volatile compound. Slices (1 mm) of sausages flavoured with different concentration of 1-octen-3-ol, were presented on glass plate to evaluate appearance and texture attributes and in glass bottle covered with plastic lids to evaluate odour and flavour attributes. The odour and flavour intensities of four different sausages samples were evaluated using a 10 cm unstructured horizontal scale anchored “less” and “more”. Panellists were required to generate a set of terms that describe differences among sausages samples. After discussion, the panel reached an agreement and a total of 13 attributes grouped in appearance (colour intensity, colour homogeneity and cohesiveness), odour (overall, mushroom, cured, fatty, humid soil-like), texture (gumminess) and flavour (overall, rancid, cured and mushroom) were selected. Mushroom and humid soil-like attributes are odour and flavour descriptors of the volatile compound 1-octen-3-ol (<http://www.flavornet.org/flavornet.html>). Once the attributes were chosen,

panelists discussed the verbal anchors and selected “less” to “more”. Taking into consideration that during ripening of sausages a proportion of the added 1-octen-3-ol could be released from the matrix to the air, the selected concentration should be high enough to be sure that panelists perceived it in the final product. According to panel discussion, sausages containing 75 mg Kg<sup>-1</sup> of 1-octen-3-ol provided an easy recognition and identification of the flavour notes linked to this compound compared to those containing 20 and 50 mg Kg<sup>-1</sup>.

Three QDA sessions were carried out over three consecutive days. The sessions were run in a four-booth sensory panel room equipped with white fluorescent light at room temperature (~ 21 °C). A whole slice was served on a glass plate at room temperature (~ 21 °C) to evaluate appearance and texture attributes. And half a slice was served in a capped glass bottle to evaluate odour and flavour attributes. In addition, a glass of mineral water (150 ml) was provided for rinsing between samples. Assessors used a 10 cm non-structured and horizontal lineal scale with verbal extremes, “less” to “more” for all attributes. The FIZZ Network (v. 1.01: Biosystemes, France) program was used for collecting the data.

### **Time-Intensity training**

Dynamic perception of flavour and texture of sausages were studied using TI methodology. The training procedure described by Ventanas et al., (2010) was applied with some modifications. Besides the QDA previously described, two training sessions (2 hours per session) were performed, divided in different steps. First, an introductory short talk was given to the assessors explaining the TI methodology (computer screen instructions) and presenting the sausages (ingredients and composition) in general terms. Panelists got familiar with the computer system (FIZZ software) by rating the intensity of two taste solutions in individual booths: sour (1.20 g l<sup>-1</sup> citric acid) and salt (8.0 g l<sup>-1</sup> NaCl) solutions. Finally, panelist participated in five further training TI sessions evaluating the different attributes with the real product using a 10 cm non-structured horizontal lineal scale with two verbal anchors, “none” and “strong”. The protocol of sample evaluation was fixed after panel discussion and was established as follows: panelists should keep the sample in their mouths and chew for 15



seconds before spitting it out. Then, the panellists should continue the evaluation until they did not perceive anything. Panellists were required to move the cursor along the line according to the intensity of their perception. The total time of the evaluation was fixed in 120 seconds. Panellists were instructed to move the cursor completely towards “none” when they did not perceive any flavour attribute. For texture attributes, panellists were expected to move the cursor back to zero after they spat the sample out. The final rinsing protocol between samples was mineral water and a piece of unsalted crackers. This standardised protocol was used in the TI evaluations.

### **Time-intensity evaluations**

Based on the results obtained in the QDA, a total of five attributes were evaluated using the TI technique: gumminess, overall flavour, mushroom-like flavour, rancid flavour and cured flavour. All attributes were evaluated in triplicate by the trained panel (n= 9) for the three treatments (~ 4%, ~ 10% and ~ 15%) flavoured with 75 mg Kg<sup>-1</sup> of 1-octen-3-ol, thus a total of 27 TI curves of each attribute were obtained for each sample.

Samples (half a slice per attribute, 1mm thickness) were served in capped glass bottles at room temperature (~ 21 °C). For flavour attributes evaluation, before opening the glass bottle and taking the sample, panellists used nose-clips to avoid odour influence. Once the sample was placed in the mouth, panellists removed the nose-clip and started to evaluate the flavour attribute intensity. Sessions took place in individual booths at room temperature (~ 21 °C) and under red light to avoid visual cues. The same protocol of sample evaluation fixed during training sessions was followed. Data were collected using the FIZZ software (Sensory Analysis and Computer Test Management) (Biosystemes, France, 2002).

### **Data analysis**

Results of chemical composition and 1-octen-3-ol headspace concentration were analysed by a one-way ANOVA (GLM procedure) with fat content as main effect and testing mean differences by Tukey post-hoc test.

Two-way ANOVA (repeated measures) (GLM procedure) was applied for each attribute evaluated using the QDA to study the main effect of fat content. In this model, fat content (~ 4%, ~ 10% and ~ 15%) and replications (session 1, 2 and 3) were included as within-subject factors. Bonferroni correction was applied for multiple means comparison of main factor.

Data from individual TI curves of mushroom, cured, overall, rancid flavour and gumminess were analysed and average TI curves were computed for each attribute over 9 assessors and three replications using the FIZZ software. Three TI parameters were extracted from TI curves: maximum intensity ( $I_{max}$ ), duration of the plateau phase (DurPI) and total area under the curve (Area). A two-way ANOVA (repeated measures) (GLM procedure) was carried out for each TI parameter. In this model, fat content (~ 4%, ~ 10% and ~ 15%) and replications (session 1, 2 and 3) were included as within-subject factors. Bonferroni correction was applied for multiple means comparison of main factor.

All statistical analyses were conducted using the software SPSS (v.15.0) for windows.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Experimental fermented sausages characterization**

Measurements related to chemical composition are shown in **Table 1**. Significant differences were found in all chemical parameters. As expected, fat content was markedly different among the three treatments (3.91 % for the ~ 4% group; 9.85 % for the ~ 10% one and 14.56 % for the ~ 15 % one). In addition, significant differences were also found in protein and moisture content between the three groups which are related to the amount of lean pork used in the formulations of each treatment (**section 2.1**).

**Table 1.** Chemical characterization (mean  $\pm$  standard deviation); Fat, protein and moisture contents of sausages. Results are expressed as %.

	~ 4%	~ 10%	~ 15%	<i>p-values</i> <sup>c</sup>
Fat	3.91 $\pm$ 0.94 <sup>c</sup>	9.85 $\pm$ 0.60 <sup>b</sup>	14.56 $\pm$ 1.59 <sup>a</sup>	***
Protein	39.25 $\pm$ 1.39 <sup>a</sup>	35.54 $\pm$ 1.51 <sup>b</sup>	31.52 $\pm$ 0.82 <sup>c</sup>	***
Moisture	51.50 $\pm$ 0.70 <sup>a</sup>	48.21 $\pm$ 0.91 <sup>c</sup>	50.77 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	***

*p-values*<sup>c</sup>: ns, non significant;  $p > 0.05$ ; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

<sup>a-c</sup>Means with different superscript differ significantly.

Statistical significance:  $p < 0.05$ .

### 1-octen-3-ol release

The relative amount of 1-octen-3-ol extracted from the headspace of the samples using the SPME showed the great affinity of this compound by the lipid phase. A significant effect of fat content ( $F(2;30) = 62,83$ ,  $p < 0.001$ ) on the chromatographic area of 1-octen-3-ol was found ( $13.18 \pm 2.35 \cdot 10^7$  AU in ~ 4% samples,  $13.93 \pm 3.96 \cdot 10^7$  AU in ~ 10% samples and  $2.49 \pm 0.58 \cdot 10^7$  AU in ~ 15% sausages;  $p < 0.001$ ). However, its concentration in control sausages was not detected after ripening process. Therefore, the detected chromatographic area of 1-octen-3-ol was only caused by the amount of this compound added into sausages batter. And then the results from the effect of fat content on 1-octen-3-ol release were reliable. In agreement with these results, Ventanas et al., (2010) detected a higher concentration of this volatile compound (1-octen-3-ol) in the headspace of low-fat bologna type sausages than in high fat ones. Similar results for the effect of fat content on the release of other volatile compounds have been reported in sausages (Carrapiso, 2007), emulsions (Doyen et al., 2001) and aqueous solutions (Roberts et al., 2003).

## **Effect of fat content on appearance and odour traits of experimental fermented sausages**

Results derived from QDA profile are shown in **Table 2**. Regarding the appearance of sausages, increasing the fat content decreased the colour intensity ( $p < 0.001$ ), colour homogeneity ( $p < 0.05$ ) and cohesiveness ( $p < 0.01$ ). In agreement with these results a decrease in colour intensity in high fat cooked bologna type sausages had been previously reported by Ventanas et al., (2010). Similarly, Saint-Eve et al., (2009) reported more visual firmness in low-fat than in high-fat model cheeses.

Mushroom and humil-soil odours were perceived with the lowest intensities in ~ 15% sausages compared to the rest. Whereas the rest of odour attributes (Overall, cured and fatty), showed the highest intensities in ~ 4% samples. In agreement with Roberts et al., (2003) that reported a reduction in release of lipophilic as fat content increases by nosespace and sensory analysis.

**Table 2.** Sensory characteristics (QDA) (mean  $\pm$  standard deviation) of sausages with different fat content (~ 4%, ~ 10% and ~ 15%).  $p$ -values<sup>c</sup> for fat content (F) and session (S).

	TYPE OF SAUSAGES			$p$ -values <sup>c</sup>	
	~ 4%	~ 10%	~ 15%	F	S
<b>Appearance</b>					
Colour intensity	5.73 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>	4.3 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	3.17 $\pm$ 0.22 <sup>c</sup>	***	**
Colour homogeneity	5.32 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	4.27 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	5.07 $\pm$ 0.27 <sup>ab</sup>	*	ns
Cohesiveness	5.95 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	5.46 $\pm$ 0.15 <sup>ab</sup>	4.93 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	**	ns
<b>Odour</b>					
Overall	5.63 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	4.67 $\pm$ 0.081 <sup>b</sup>	5.48 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	**	ns
Mushroom	3.33 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	3.97 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	2.45 $\pm$ 0.14 <sup>c</sup>	***	**
Humid-soil	2.05 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	2.00 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	1.10 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	***	ns
Cured	3.43 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	2.34 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	2.44 $\pm$ 0.15 <sup>ab</sup>	**	ns
Fatty	3.96 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	2.59 $\pm$ 0.24 <sup>b</sup>	2.92 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	***	*
<b>Texture</b>					
Gumminess	6.53 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	5.28 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	5.69 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	**	ns
<b>Flavour</b>					
Overall	6.35 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	5.31 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>	5.79 $\pm$ 0.23 <sup>ab</sup>	**	**
Mushroom	4.49 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	3.30 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>	1.67 $\pm$ 0.28 <sup>c</sup>	***	ns
Rancid	3.12 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	2.85 $\pm$ 0.20 <sup>ab</sup>	2.29 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	*	**
Cured	4.47 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	2.91 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	3.04 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	***	ns

$p$ -values<sup>c</sup>: ns, non significant;  $p > 0.05$ ; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . <sup>a-c</sup>Means with different superscript differ significantly. Statistical significance:  $p < 0.05$ .

## Static and dynamic sensory perception of flavour and texture in experimental fermented sausages

Results from QDA are shown in **Table 2** while the extracted TI parameters (means  $\pm$  standard deviation) are shown in **Table 3** and **Figure 1** shows the average TI curves obtained for each evaluated attribute.

**Table 3.** Sensory characteristics (TI) (mean  $\pm$  standard deviation) of sausages with different fat content ( $\sim$  4%,  $\sim$  10% and  $\sim$  15%). (IMax: maximum intensity; DurPI: duration of plateau; and Area: total area under the curve).  $p$ -values<sup>c</sup> for fat content (F) and session (S).

	TYPES OF SAUSAGES			$p$ -values <sup>c</sup>	
	$\sim$ 4%	$\sim$ 10%	$\sim$ 15%	F	S
<b><i>Gumminess</i></b>					
IMax	6.41 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	4.72 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	4.50 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>	***	**
DurPI	9.00 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	4.80 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	9.60 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	***	**
Area	81.21 $\pm$ 4.95 <sup>a</sup>	60.94 $\pm$ 2.73 <sup>b</sup>	54.10 $\pm$ 4.36 <sup>b</sup>	***	***
<b><i>Mushroom flavour</i></b>					
IMax	3.90 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>	2.73 $\pm$ 0.21 <sup>c</sup>	4.42 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	***	*
DurPI	10.20 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	8.40 $\pm$ 0.00 <sup>ab</sup>	7.80 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	**	ns
Area	68.85 $\pm$ 6.69 <sup>a</sup>	42.65 $\pm$ 2.96 <sup>b</sup>	79.47 $\pm$ 8.10 <sup>a</sup>	**	*
<b><i>Rancid flavour</i></b>					
IMax	2.66 $\pm$ 0.20	2.18 $\pm$ 0.22	2.70 $\pm$ 0.30	ns	***
DurPI	9.60 $\pm$ 0.01	8.40 $\pm$ 0.01	7.80 $\pm$ 0.01	ns	ns
Area	30.89 $\pm$ 3.50	32.44 $\pm$ 3.41	35.12 $\pm$ 4.21	ns	***

**Overall flavour**

IMax	5.31±0.14	5.33±0.13	5.67±0.13	ns	***
DurPI	9.60±0.02	9.00±0.01	9.00±0.01	ns	ns
Area	88.24±6.38	77.44±4.86	82.77±6.16	ns	***

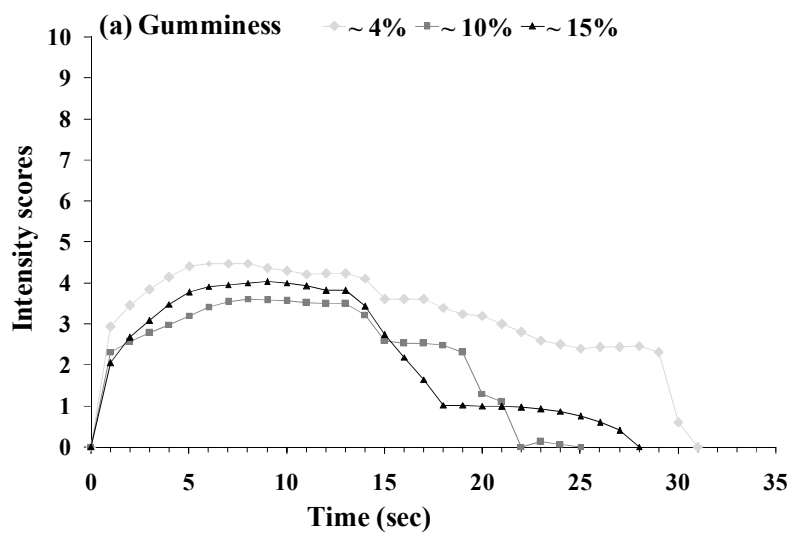
**Cured flavour**

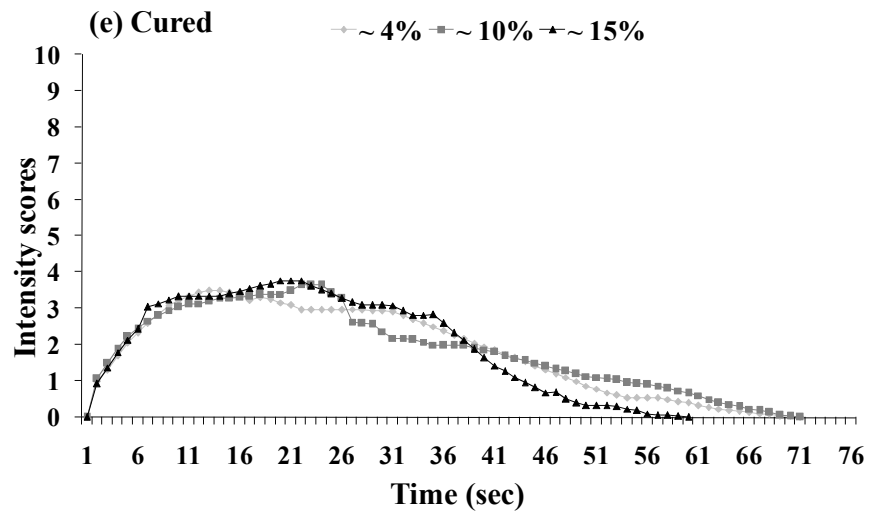
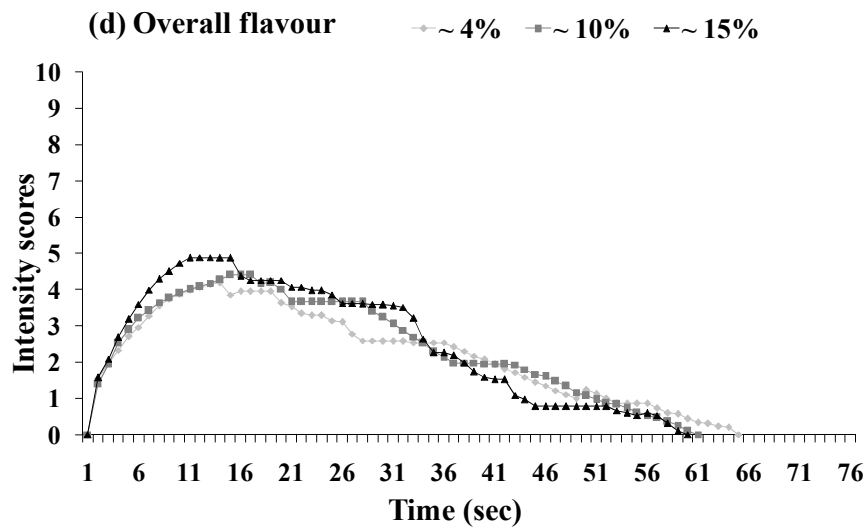
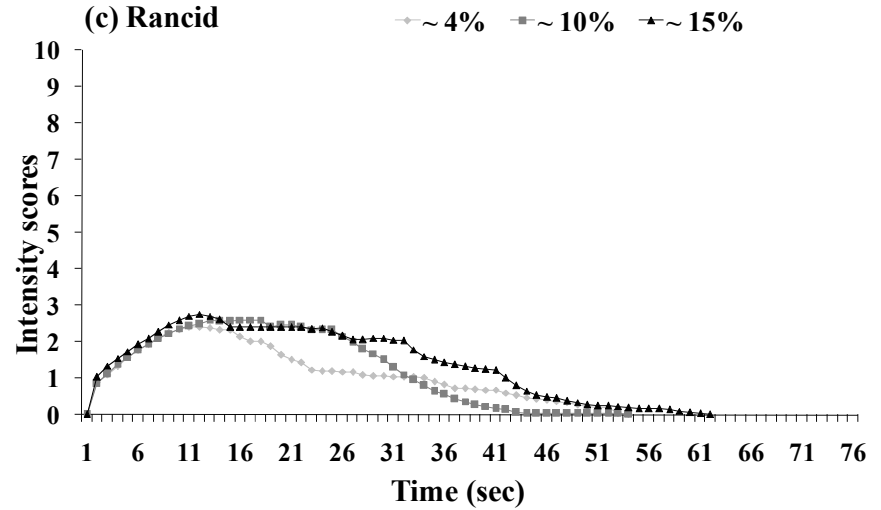
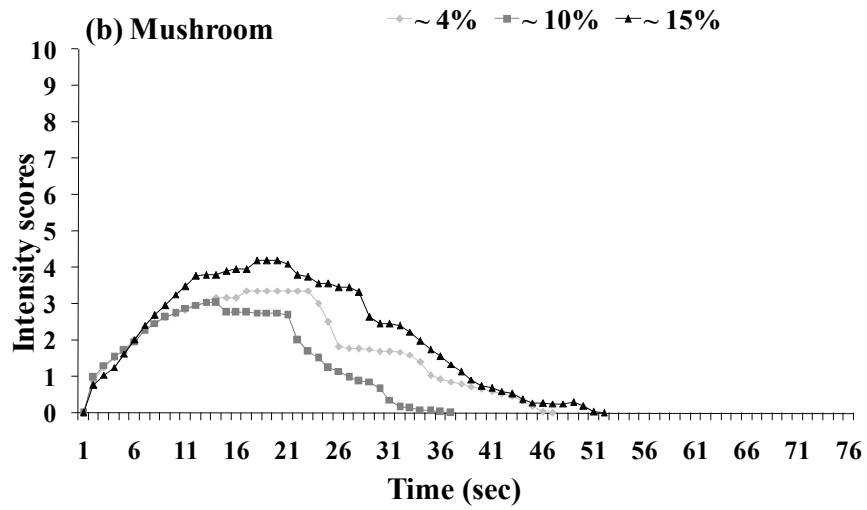
IMax	3.71±0.29	3.92±0.25	3.33±0.28	ns	ns
DurPI	8.40±0.01 <sup>a</sup>	9.00±0.01 <sup>a</sup>	6.00±0.01 <sup>b</sup>	**	***
Area	53.22±6.52	60.06±5.93	54.43±7.28	ns	ns

*p*-values<sup>c</sup>: ns: *p* > 0.05, \* *p* < 0.05, \*\* *p* < 0.01, \*\*\* *p* < 0.001.

Different letters within the same row denote significant differences between means at *p* < 0.05.

**Figure 1.** Average TI curves for the attributes Gumminess (a), Mushroom flavour (b), Rancid flavour (c), Overall flavour (d) and Cured flavour (e) (n = 27; 9 panellists x 3 replications) (~ 4%, ~ 10% and ~ 15%).







Regarding the sensory evaluation of gumminess using the AQD (**Table 2**), results showed that sausages with the lowest fat content (~ 4%) were perceived significantly gummier than those with higher fat content (~ 10% and ~ 15%). Similarly, fat content showed a significant effect on temporal gumminess perception. ~ 4% sausages were significantly gummier (higher  $I_{max}$  and Area values) compared to sausages with higher fat content (**Table 3**). Moreover, TI average curve showed that gumminess perception was longer in ~ 4% compared to ~ 10% and ~ 15% samples (**Figure 1a**). Fat plays a crucial role in foods texture, providing essential mouthfeel characteristics (Drewnowski, 1987) and determining fracture properties in solid foods (Marshall 1990). The application of dynamic sensory techniques to evaluate the temporal perception of texture in meat products is very limited and very few studies have been accomplished. As far as we know, gumminess has never been evaluated using TI method in meat products or meat model systems. Only, Ventanas et al., (2010) used TI to evaluate temporal perception of juiciness of cooked bologna sausages and reported a limited effect of fat content on the temporal perception of juiciness. The highest fat content in ~ 10% and ~ 15% samples could have promoted the formation of a fatty coating in the mouth during consumption and then these samples turned to be juicier and easier to chew than ~ 4% samples. Overall, in meat products, fat stimulates the saliva secretion and contributes directly to juiciness by coating the tongue, teeth and others parts of the mouth (Dikeman, 1987).

Regarding flavour attributes, QDA showed a significant effect of fat content on perception of all flavour attributes evaluated. Moreover, TI method showed that fat content had a marked effect on temporal perception of mushroom flavour (linked to 1-octen-3-ol), but a weak effect on the perception of other more complex flavours which were not directly caused by the addition of flavourings (overall flavour, rancid and cured flavour).

Mushroom flavour ( $p < 0.001$ ) and rancid flavour ( $p < 0.05$ ) intensity increased as fat content decreased evaluated by QDA profile. TI method displayed that fat content had a significant effect on all evaluated TI parameters of mushroom flavour. The longest duration of the maximum intensity ( $DurPI$ ) was recorded in ~ 4% sausages whereas the shortest was found in ~ 15% samples. However,

maximum intensity ( $I_{max}$ ) of mushroom flavour was significantly ( $p < 0.001$ ) higher in ~ 15% sausages HF compared to ~ 4% and ~ 10% ones, although no significant differences were found for total Area between ~ 15% and ~ 4% sausages (**Table 3**). **Figure 1b** shows that mushroom flavour was less persistent in ~ 10% samples compared to the other types of sausages. Contrarily, TI parameters of rancid flavour were not significantly affected by fat content (**Table 3**), although sausages with the highest fat content displayed the longest perception (**Figure 1c**).

QDA revealed that ~ 4% and ~ 15% samples showed the highest scores for overall ( $p < 0.01$ ) and ~ 4% ones for cured flavour ( $p < 0.001$ ). Nevertheless, TI parameters of overall flavour were not significantly affected by variations in fat content (**Table 3**). Moreover, persistence of this attribute was also similar in all treatments despite of the fat content (**Figure 1d**). Finally, fat content had a significant effect ( $p < 0.01$ ) on DurPI of cured flavour. ~ 15% sausages showed the shortest duration of the maximum perception (DurPI) compared to the other groups (**Table 3**). Moreover, **Figure 1e** shows a lower persistence of cured flavour in ~ 15% samples compared to ~ 4% and ~ 10%.

The decrease of scores for odour and flavour perception (mainly caused by 1-octen-3-ol) as fat content increased match the decrease in chromatographic areas of 1-octen-3-ol as fat content increased. Similarly, Ventanas et al., (2010) reported consistent results between chromatographic areas of 1-octen-3-ol and intensity of mushroom odour and flavour in cooked bologna sausages with different fat content. According to results from QDA evaluations, ~ 4% samples showed the highest values for most odour and flavour attributes. In general, the presence of proteins, polysaccharides or lipids reduces the volatility of an aroma compound with respect to its volatility in pure water (Druaux and Voilley, 1997). The addition of fat induces significant retention of hydrophobic flavour compounds resulting in noticeable effects on flavour perception (Guichard, 2002). This phenomenon could explain the highest retention of volatile compounds as 1-octen-3-ol ( $\log P_{\text{octanol/water}} = 2.6$ ) in samples with the highest fat content (~ 15%).

Similarly to results obtained from TI evaluations, Guirnard et al., (2002) reported a shorter duration of garlic, pepper and sourness flavours with fat content in dressing salads. Chung et al., (2003) described in ice-cream containing three aroma compounds (vanillin,  $\delta$ -decalactone and hexanal) a shorter persistence of flavour in samples with high fat content compared to low fat ones. In addition, Brauss et al., (1999) described in a model yogurt system that a high viscous yogurt is more difficult to remove from the oral cavity by mouth and tongue movements and may therefore be present in the oral cavity for a longer time, resulting in a longer flavour persistence. This argument could explain the shorter temporal perception of overall and cured flavour observed in sausages with the highest fat content compared to those with lower fat content. ~ 15% sausages were less hard and thus less difficult to chew than other samples, and thus they would be easier to remove from the oral cavity by mouth and tongue movements and may therefore be present in the oral cavity for a shorter time.

Variations in the fat content of sausages involved different effects on the temporal perception depending on the flavour attribute evaluated. Therefore, varying fat content could influence flavour by different mechanisms. The structure of a product influences the transport of volatiles into the oral and nasal cavities, while the composition of a product influences the interactions between flavour and non-flavor ingredients (Taylor 1999). Indeed, food products are generally multiphase and the affinity of volatile compounds for the different phases affects its availability to the vapour phase (Druaux and Voilley 1997). Considering the results obtained from TI evaluation of flavour attributes, particularly of mushroom flavour, it is plausible the occurrence of physicochemical interactions between aroma compounds and non-volatile food constituents.

Lipids play a key role in many quality traits of meat products, particularly in flavour attributes, because they are both solvent and precursors of aroma compounds (Gandemer, 1999). In the present study, lipids would have contributed to cured and rancid flavour generation whereas mushroom flavour was mainly attributed to the presence of 1-octen-3-ol added during sausages manufacture. 1-octen-3-ol is a hydrophobic volatile compound ( $\log P_{\text{octanol/water}} = 2.6$ ) and therefore it has a high affinity by the lipid phase. As it was mentioned,

the data of release of 1-octen-3-ol (extracted from the headspace samples using the SPME) confirmed its great affinity for the lipid phase, being the release markedly lower in the ~15% sausages than in the other types of sausages. Increasing the fat content causes a general increase in volatile compound concentration of foodstuffs (fat act as a reservoir) but a general decrease in the compound concentrations in the headspace and in the nosespace, for example in sausages (Carrapiso, 2007).

Moreover, a negative correlation was found between the dynamic flavour perception of this compound (mushroom flavour) during eating of samples ( $I_{max}$  and Area) and the amount released in the headspace analyzed by SPME ( $r = -0.59$ ,  $p < 0.01$  and  $r = -0.52$ ,  $p < 0.01$  respectively). The effect of fat content on  $I_{max}$  and Area for the flavour traits did not match that found for 1-octen-3-ol release and for the odour traits and mushroom flavour in the QDA, which increased as fat content decreased. However, results for DurPI show a better agreement with 1-octen-3-ol release data and the static perception.

Inconsistency between headspace, nosespace and mouthspace data were also found by Roberts et al., (2003) and Linforth et al., (2002). Roberts et al., (2003) reported that for highly lipophilic compounds, the headspace concentration markedly decreased with increasing fat content. However, the physiology of swallowing liquid samples from the mouth, the dilution with saliva, the transfer of the compound from the sample to the air, the transport of the volatile compound through the retronasal route to the nasal cavity, and the final exhalation through the nostrils are not adequately simulated in static headspace analysis, showing that the retronasal transport is important. In addition the skin membranes in the mouth have some lipophilic properties and can also act as a reservoir for lipophilic compounds (Roberts et al., 2003). These arguments would explain the differences found between headspace and the TI method.

## **Static vs. Dynamic sensory techniques for experimental fermented sausages evaluations**

Two sensory methods were used to compare the texture and flavour perception of sausages.

Results obtained from texture perception were similar however a lack of consistency between the static and dynamic perception of flavour was found. These results could be due to differences in the procedure of sample consumption. A minimum time of sample chewing before swallowing was fixed for the TI sessions for flavour attributes while panellist in the QDA evaluations maintained the sample in the mouth until they considered that it was ready to swallow. Regarding texture attributes the samples were swallowed when panellists considered they were ready to swallow in both sensory evaluations. Therefore, results from texture perception could be a consequence of a similar samples consumption process in both sensory evaluations. However, the minimum time fixed for evaluating of flavour attributes would cause that panellists kept the sample in the mouth for a longer time during TI evaluations compared to QDA. TI evaluations would allow a complete chewing of solid samples, and hence, a better dilution with saliva, a better contact with membranes in the mouth, a better transfer of the compound from the sample to the air, and a better retronasal transport compared to QDA sessions.

Time-intensity (TI) sensory evaluation providing temporal information about perceived sensations (Cliff and Heymann, 1993) while QDA sensory evaluation quantifies the sensory response using a unipoint measurement. In static techniques, panelists must time-average or integrate their responses to provide single intensity values (Lee and Pangborn, 1986). Therefore, although the same samples were tasted both in TI and QDA evaluations, the time of chewing, the time that samples were kept in the mouth and dilution with saliva in the mouth should be taken into consideration to explain differences found between static and dynamic techniques. Consequently, consumption of samples by TI was more similar to real swallowing and thus TI method was a useful tool for evaluating and provided more real information compared to QDA profile.

## **CONCLUSIONS**

This study can be considered the first approach to study the perception of flavour and texture in dry-cured meat products from a dynamic perspective. The application of the time-intensity technique was a successful technique although certain discrepancies were found with QDA, particularly for flavour attributes. These differences could be attributed to differences in the procedure of samples consumption since in QDA no a minimum time of sample chewing was fixed. Variations in the fat content of sausages involved changes in the temporal perception of flavour and texture, particularly on mushroom flavour and gumminess. Therefore, the IMF content in dry-cured ham should be considered since it would have influence on perception of texture and aroma during consumption.

## **FUNDING**

This study was supported by the “Ministerio de Educación, Cultura y Deporte” for the FPI grant and the “Ministerio de Economía y Competitividad” project entitled: “Estudio sensorial e instrumental de la liberación de compuestos olor-activos en jamón ibérico loncheado: efecto del contenido y características de la grasa. (Project AGL2007-65923-C02-01).

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors gratefully acknowledge the financial supports by the “Ministerio de Educación, Cultura y Deporte” and the “Ministerio de Economía y Competitividad”.

## **REFERENCES**

Association of Official Analytical Chemists (AOAC) 2000. *Official Methods of Analysis*, 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburgh, Maryland.

- Barylko-Pikielna N, Matuszewska I and Hellemann U. (1990). Effect of salt on time-intensity characteristics of bread. *Lebensmittel-Wissenschaft und - Technology* 23: 422-426.
- Brauss MS, Linforth RS, Cayeux I, Harvey B and Taylor AJ. (1999). Altering the fat content affects flavor release in a model yogurt system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 2055–2059.
- Carrapiso AI, Jurado A, Timón ML and García C. (2002). Odor-Active Compounds of Iberian Hams with Different Aroma Characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6453-6458.
- Carrapiso AI. (2007). Effect of fat content on flavour release from sausages. *Food Chemistry* 103: 396-403.
- Chung SJ, Heymann H and Grün IU. (2003). Temporal release of flavour compounds from low-fat and high-fat ice cream during eating. *Journal and Food Science* 68: 2150–2156.
- Cliff M and Heymann H. (1993). Development and use of time-intensity methodology for sensory evaluation: A review. *Food Research International* 26: 375-385.
- Crehan CM, Hughes E, Troy DJ and Buckley DJ. (2000). Effects of fat level and maltodextrin on the functional properties of frankfurters formulated with 5, 12 and 30% fat. *Meat Science* 55: 463-469.
- Dikeman ME. (1987). Fat reduction in animals and effects on palatability and consumer acceptance of meat products. *Recipe Meat Conference* 40: 93-103.
- Doyen K, Carey M, Linforth RST, Marin M and Taylor AJ. (2001). Volatile Release from an Emulsion: Headspace and In-Mouth Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 804-810.
- Drewnowski A. (1987). Fats and food texture: Sensory and hedonic evaluations. Marcel Dekker, New York.
- Druaux C and Voilley A. (1997). Effect of food composition and microstructure on volatile flavour release. A review. *Trends in Food Science & Technology* 8: 364-368.
- Meat products handbook. Woodhead Publishing: Cambridge.
- Folch J, Lees M and Sloane Stanley GH. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* 226: 497–509.
- Gandemer G. (1999). Lipids and meat quality: lipolysis, oxidation, maillard reaction and flavour. *Scis Aliment* 19: 439–458.

- Guirchard E. (2002). Interactions between flavor compounds and food ingredients and their influence on flavor perception. *Food Reviews International* 18(1): 49-70.
- Guinard JX, Wee C, McSunas A and Fritter D. (2002). Flavour release from salad dressing varying in fat and garlic flavour. *Food Quality and Preference* 13: 129–137.
- <http://www.flavornet.org/flavornet.html>
- International Organization for Standardization (ISO) 937:1978. *Meat and meat products. Determination of nitrogen content (Reference method)*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Jiménez-Colmenero F. (1996). Technologies for developing low-fat meat products. *Trends in Food Science & Technology* 7: 41–48.
- Lee WE III and Pangborn RM. (1986). Time-intensity: the temporal aspects of sensory perception. *Food Technology* 40:71- 82.
- Linforth R, Martin F, Carey M, Davidson J and Taylor A J. (2002). Retronasal Transport of Aroma Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 1111-1117.
- Marshall, RJ. (1990). Combined instrumental and sensory measurement of the role of fat in food texture. *Food Quality and Preference* 2: 117-124.
- Mottram DS. (1998). Flavour formation in meat and meat products: A review. *Food Chemistry* 62: 415–424.
- Peyvieux C and Dijksterhuis G. (2001). Training a sensory panel for TI: A case study. *Food Quality and Preference* 12: 19–28.
- Reinbach HC, Toft M and Møller P. (2009). Relationship between oral burn and temperature in chili spiced pork patties evaluated by time–intensity. *Food Quality and Preference* 20: 42–49.
- Roberts DD, Pollien P, Antille N, Lindinger C and Yeretizian C. (2003). Comparison of Nosespace, Headspace, and Sensory Intensity Ratings for the Evaluation of Flavor Absorption by Fat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 3636-3642.
- Roger Haker F, Karen Lau F and Anne Gunson F. (2003). Juiciness of fresh fruit: a time-intensity study. *Postharvet Biology and Technology* 29: 55-60.
- Ruiz J, Ventanas J, Cava R, Timón ML and García C. (1998). Sensory characteristics of Iberian ham: Influence of processing time and slice location. *Food Research International* 31: 53–58.



- Sahidi F, Rubin, LJ and D'Souza LA. (1986). In Food Science and Nutrition 24 Meat flavor volatiles: A review of the composition, technique of analysis and sensory evaluation, *CRC Critical Review in Food Science and Nutrition* 24, pp. 219–227.
- Saint-Eve A, Lauerjat C, Magnan C, Déléris I and Souchon I. (2009). Reducing salt and fat content: Impact of composition, texture and cognitive interactions on the perception of flavoured model cheeses. *Food Chemistry* 116: 167–175.
- Taylor, AJ. (1999). Flavour matrix interactions. In Swift KA D (ed) *Current Topics in Flavours and Fragrances*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers Dordrecht, pp.123-138.
- Una Norma Española (UNE) 87013:1996. *Análisis Sensorial Tomo 1 Alimentación Recopilación de las Normas UNE*, AENOR, Madrid, Spain.
- van Buuren S. (1992). Analyzing time-intensity responses in sensory evaluation. *Food & Technology* 2: 101-104.
- Ventanas S, Ventanas J, Ruiz J and Estévez M. (2005). Iberian pigs for the development of high-quality cured products. In Pandalai SG (ed). *Recent research developments in agricultural and Food Chemistry*. Trivandrum, India: Research Signpost, (6)pp. 27–53.
- Ventanas S, Ventanas J and Ruiz J. (2007). Sensory characteristics of Iberian dry-cured loins: Influence of crossbreeding and rearing system. *Meat Science* 75: 211-219.
- Ventanas S, Estévez M, Andrés AI and Ruiz J. (2008). Analysis of volatile compounds of Iberian dry-cured loins with different intramuscular fat contents using SPME–DED. *Meat Science* 79: 172-180.
- Ventanas S, Puolanne E and Tuorila H. (2010). Temporal changes of flavour and texture in cooked bologna type sausages as affected by fat and salt content. *Meat Science* 85: 410–419.
- Wendin C, Langton M, Caous L and Hall G. (2000). Dynamic analyses of sensory and microstructural properties of cream cheese. *Food Chemistry* 71: 363–378.



## **CAPÍTULO II.**

**Estatus:** preparado.

### **Impact of lipid composition on dynamic sensory perception of flavour and texture in experimental fermented sausages**

Verónica Fuentes<sup>a\*</sup>, Jesús Ventanas<sup>a</sup>, Ana I. Carrapiso<sup>b</sup> y Sonia Ventanas<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Department of Animal Production and Food Science, University of Extremadura,  
10003 Cáceres, Spain.

<sup>b</sup> Food Technology, University of Extremadura, Ctra. de Cáceres s/n, 06071 Badajoz,  
Spain.

\*Corresponding author: Verónica Fuentes, email:[vefuentesd@unex.es](mailto:vefuentesd@unex.es)

## **Abstract**

Four experimental fermented sausages containing different type of lipids (animal fats and sunflower oil) and including the volatile compound 1-octen-3-ol ( $75 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) were manufactured to evaluate the impact of lipid composition on flavour and texture characteristics. Instrumental texture measurements (TPA) revealed differences between textural properties of sausages elaborate with animal and vegetal fat which could be attributed to differences in fat globule size. Dynamic sensory perception of flavour and texture were evaluated using the time–intensity (TI) method. The TI study revealed that most flavour attributes displayed the highest intensities in the sausages elaborated with animal fat whereas those elaborated with sunflower oil displayed the most persistent flavour perception. Moreover, dynamic perception of flavour during sausages consumption revealed a likely influence of oral temperature on flavour compounds volatility and thus in their release and perception.

## **Keywords**

Fatty acid profile, TI, Experimental fermented sausages, Flavour, Texture, Sunflower oil.

## INTRODUCTION

Fats in meat products play important roles in stabilizing meat emulsions, reducing cooking loss, improving water holding capacity and providing juiciness (Pietrasik and Duda, 2000). Moreover, fat acts as a carrier and reservoir of aroma compounds, stimulates the senses during eating and acts as a precursor for certain flavours. The amount and composition of fat and its physical state influence the release of flavour compounds during consumption (Hort and Cook, 2007). Fatty acid composition and their arrangement in lipids modify the melting behaviour of fats and thus affecting the sensory properties of food systems (Sourdet et al., 2002). The physical state of lipids (proportion of solid to liquid ratio) also affects aroma compound partitioning and then its release (Relkin et al., 2004) and perception (Vingerhoeds et al., 2008).

Texture might be also influenced by the modification of the fatty acid composition of the fat used (Scheeder et al., 2001). However several authors have not reported a great influence of fatty acid composition on instrumental texture of frankfurters (Paneras and Bloukas, 1994), fermented sausages (Muguerza and Astiasarán, 2001) and beef patties (Scheeder et al., 2001) elaborated with of vegetable oils.

Flavour and texture perception are dynamic processes since continuous changes in their intensities are perceived during eating as a result of mixing with saliva and the breakdown of the food matrix through chewing (Ventanas et al., 2010). The time-intensity (TI) technique is a dynamic sensory method providing temporal information about perceived sensations over time (Cliff and Heymann, 1993) and thus providing a more real and valid information compared to static techniques (Dijksterhuis and Piggott, 2001).

Regarding meat products, first studies applied the TI technique to evaluate the changes in meat tenderness during chewing (Butler et al., 1996). More recently, Reinbach et al., (2009) and Ventanas et al., (2010) analysed the temporal flavour perception in pork patties and cooked bologna sausages, respectively. However, to our knowledge this is the first study investigating the effect of the fatty acid composition on the temporal sensory properties in meat products. For this purpose, experimental fermented sausages were designed and consisted in

a simple matrix containing fat/oil, lean and additives and ripened during 15 days. Moreover, in order to better understand the flavour release and perception, a selected volatile compound, 1-octen-3-ol was added to the sausages. This compound was selected since (i) it has been reported as odour active compound in particular meat products (Carrapiso et al., 2002) (ii) it is a hydrophobic compound therefore with a high affinity by the lipid phase and (iii) its particular aromatic notes allowing an easier recognition and identification by the panellist. The effect of fatty acid composition was studied by using different lipid sources during sausages manufacture, namely vegetable and animal fats.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Manufacture of the experimental fermented sausages**

Four types of experimental fermented sausages flavoured with the volatile compound 1-octen-3-ol ( $75\text{mg Kg}^{-1}$ ) were manufactured varying in the lipid source: back-fat from Iberian pigs extensively reared and fed on acorn and grass during the final fattening period (MF), back-fat from Iberian pigs fed on concentrate (CF), commercial lard (LF) and sunflower oil (SOF). Formulations of sausages are reported in **Table 1**. The proportion of the different fats/oil including in the sausages formulation was calculated considering that back-fat had a 90 % of fat content while sunflower oil and commercial lard had a 100 % of lipid content. Moreover, the proportion of lean pork and animal/vegetable fat were adjusted to obtain a ~15% of total lipid content after the ripening process.

The manufacture of sausages was run in a pilot plant. First, lean pork was cleaned by removing the external fat. Subsequently the lean and the animal fats were chopped. Afterwards, the lean was mixed in a vacuum cutter for 2 min. Then, the fat and the rest of ingredients and additives (sodium chloride, sodium nitrite and ascorbic acid) were added and mixed with lean for 2.5 min. The sunflower oil was directly added to the vacuum cutter without previous treatment (not chopped). Finally, the glucono-delta-lactone (GDL) and the volatile compound 1-octen-3-ol were added and mixed for 30 seconds. Then, the batter was vacuum-packaged to remove air bubbles and stuffed into 6 cm

diameter artificial collagen casings. Ripening of the experimental fermented sausages was carried out in dryer chambers for 15 days, the relative humidity ranging from 95 % to 75 % and the temperature ranged from 22 °C to 12 °C. At the end of the ripening process weight losses of the four types of sausages was 35 % average. Protocol of the ripening process was fixed following the protocols developed for meat products containing GDL (Feiner, 2006). Finally, sausages were vacuum-packed and stored at 2 °C until sensory analysis.

**Table 1.** Formulation (%) of fermented sausages using different lipid sources: MF (Back-fat from Iberian pigs fed on acorns and grass), CF (Back-fat from Iberian pigs fed on concentrate), LF (Commercial lard) and SOF (Sunflower oil).

	MF	CF	LF	SOF
Lean pork	88.11	88.11	89.00	89.00
Animal fat/vegetable fat	8.73	8.73	7.83	7.83
Sodium chloride	2.10	2.10	2.10	2.10
<i>Additives</i>				
Glucono-delta-lactone	1.00	1.00	1.00	1.00
Sodium nitrite	0.015	0.015	0.015	0.015
Ascorbic acid	0.05	0.05	0.05	0.05

### **Fatty acid analysis of fats**

Fatty acid methyl esters (FAMES) were prepared by acidic-*trans*-esterification in the presence of sulphuric acid (5 % sulphuric acid in methanol) (Sandler and Karo, 1992). For MF and CF fats, lipids were previously extracted by using the Folch et al., (1957) procedure. FAMES were analysed by gas chromatography using a Hewlett-Packard HP-5890A gas chromatograph, equipped with an on-column injector and a flame ionization detector, using a polyethyleneglycol capillary column (Supelcowax-10, Supelco, Bellefonte, PA) (60 m × 0.32 mm i.d. × 0.25 µm film thickness). Gas chromatograph oven program temperature was as follows: initial temperature of 190 °C, 2 °C/min to 235 °C; 15 min at this temperature and thereafter 6 °C/min to 250 °C, and then kept for an additional 20 min. Injector and detector temperatures were 250 °C. Carrier gas was helium at a flow rate of 0.8 ml/min. Individual FAME peaks were identified by comparison of their retention times with those of standards (Sigma, St. Louis, MO). Tridecanoic acid was used as internal standard. Eight repetitions were performed per type of experimental fermented sausage and results are expressed as percentage of the total fatty acids analysed.

### **Sausages characterization**

Chemical composition of sausages was (means ± standard deviation): fat content (14.5 % ± 1.26) (Folch et al., 1957), protein content (31.99 % ± 0.36) (ISO 937:1978) and moisture content (48.39 % ± 1.40) (AOAC, 2000). Twelve repetitions were performed per type of sausages.

Textural properties of sausages were analysed by a Texture Profile Analysis (TPA) using a TA-XT2 texture analyzer (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, England, UK) equipped with a 5 cm-diameter probe. Previously, slices of the samples of sausages (12 mm thick section x 3 cm diameter) were equilibrated at room temperature for 60 min. Samples were compressed to 35 % of their original height at a crosshead speed of 5 mm/s through a 2-cycle sequence. Sausages were characterized in terms of hardness (N/cm<sup>2</sup>), fracturability (N/cm<sup>2</sup>), adhesiveness (N x s), springiness (cm), cohesiveness (dimensionless), gumminess (N/cm<sup>2</sup>) = (hardness x cohesiveness), chewiness (N/cm) =



(springiness x gumminess) and resilience (dimensionless) (Bourne, 1978). Nine repetitions per type of sausages were performed.

Fatty acid composition of sausages was analysed following the same procedure previously reported for the fats/oil (**section 2.2**).

## **Sensory evaluation**

### *Assessors*

Nine panellists (3 males and 6 females, range age 25-49) with previous experience in sensory evaluation participated in the study (training and evaluation sessions). All of them were members of the Food Technology Department (University of Extremadura, Spain).

### *Time-Intensity training*

Dynamic sensory properties of sausages were studied using the TI methodology. The training procedure described by Peyvieux and Dijksterhuis, (2001) with some modifications was applied. A quantitative descriptive analysis (QDA) was developed in order to test if the selected attributes are applicable to the product under investigation and to allow panellists to get familiar with the attributes and samples later used in the TI study. After QDA training, two more training sessions (2 h per session) were performed in different steps for TI evaluations. First, an introductory short talk was given to the assessors explaining the TI methodology (computer screen instructions) and presenting the experimental fermented sausages (ingredients and composition) in general terms. Panellists got familiar with the computer system (FIZZ software) by rating the intensity of two taste solutions in individual booths: sour ( $1.20 \text{ g l}^{-1}$  citric acid) and salt ( $8.0 \text{ g l}^{-1}$  NaCl) solutions. Finally, panellist participated in five further training TI sessions evaluating the different attributes with the real product using a 10 cm non-structured horizontal lineal scale with two verbal anchors, “none” and “strong”.

## Time-intensity evaluations

A total of five attributes were selected for sausages evaluation using the TI technique. As texture attribute, gumminess was selected, and as flavour attributes, overall, mushroom, rancid and cured were chosen. Mushroom attribute is an odour descriptor of the volatile compound of 1-octen-3-ol (<http://www.flavornet.org/flavornet.html>; Shahidi et al., 1986).

All attributes were evaluated in triplicate by a trained panel (n= 9), thus a total of 27 TI curves of each attribute were obtained for each sample. The evaluation of the four types of sausages was performed in the same session, with the serving order of the samples randomised according to the Williams Latin Square design.

Samples were sliced during sessions using a commercial slicing machine (1mm thickness) and were served (half a slice per attribute) in a capped glass bottle coded with three digit numbers at room temperature (~ 21 °C). During flavour attributes evaluations, panellists used nose-clips to avoid odour influence before opening the glass bottle and tasting the sample. Once the sample was placed in the mouth, panellists removed the nose-clip and started to evaluate the flavour attribute intensity. Sessions took place in individual booths under red light to avoid visual cues. Panellist should follow the following established protocol: panellists should keep the sample in their mouths and chew for 15 seconds before spitting it out. Then, the panellists should continue the evaluation until they did not perceive anything. Panellists were required to move the cursor along the 10 cm line according to the intensity of their perception. The total time of the evaluation was fixed in 120 seconds, but panellists could stop before by moving the mouse completely down towards “not at all” extreme. For texture attributes, panellists were expected to move the cursor back to zero after they spat the sample out. During the data collection, specific messages were displayed in the computer screen showing the commands as “indicate the intensity during chewing the sample by moving the cursor along the scale”, “Spit out the sample” and “move the cursor completely down if you do not perceived anything more”. The rinsing protocol between samples was mineral water and a piece of unsalted crackers. Data were collected using the FIZZ

software (Sensory Analysis and Computer Test Management) (Biosystemes, France, 2002).

### **Data analysis**

Results from chemical composition, TPA and fatty acid profile analysis were analysed by one-way ANOVA, using the type of fat as main factor. Means differences were tested by Tukey post-hoc test.

Data from individual TI curves of overall flavour, mushroom flavour, cured flavour, rancid flavour and gumminess were analysed and average TI curves were computed for each attribute over 9 assessors and three replications using FIZZ software. Three TI parameters were extracted from TI curves: maximum intensity ( $I_{max}$ ), duration of the plateau phase (DurPI) and total area under the curve (Area). TI parameters were analysed by two-way ANOVA (repeated measures) (GLM procedure) to study the main effect of lipid composition. In this model, lipid sources (MF, CF, LF and SOF) and replications (session 1, 2 and 3) were included as within-subject factors. Bonferroni correction was applied for multiple means comparison of lipid source (main factor).

Principal component analysis (PCA) was performed with fatty acid analysis data and TI parameters. Analyses were carried out on the mean values across assessors and repetitions for all sensory attributes and all TI parameters, and across repetitions for instrumental texture, and fatty acid composition data in each evaluated sample.

SPSS software (v 15.0) for windows was used for all statistic analyses.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Fatty acid profile of fats/oil and experimental fermented sausages**

Fatty acid profiles of the different type of fats were significantly different (**Table 2**). MF and CF showed the highest proportion of oleic acid (C18:1, *n*-9) and total monounsaturated fatty acids (MUFA), whereas SOF displayed the highest proportion of linoleic acid (C18:2) and total polyunsaturated fatty acids (PUFA)

and LF had the highest proportion of total saturated fatty acids (SFA). Acorns are rich in MUFA (mainly oleic acid, C18:1 *n*-9) whereas grass is a recognised source of *n*-3 fatty acids (mainly linolenic acid, C18:2) (Daza et al., 2005; Rey et al., 2006) explaining the higher proportion of oleic acid and linolenic acid found in MF compared to CF. SOF showed the highest proportion of PUFA which was expected since vegetable oils displays a higher ratio unsaturated to saturated fatty acids than animal fats (Liu et al., 1991).

**Table 2.** Fatty acid profile (mean  $\pm$  standard deviation) of the different fats (Montanera: MF, Concentrate: CF, commercial lard: LF and sunflower oil: SOF). Results are expressed in %.

	MF	CF	LF	SOF	<sup>c</sup> <i>p</i> -values
	1.67 $\pm$ 0.07 <sup>ab</sup>	1.51 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	1.92 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.09 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	***
C16	29.05 $\pm$ 0.91 <sup>b</sup>	30.11 $\pm$ 0.79 <sup>ab</sup>	32.39 $\pm$ 1.80 <sup>a</sup>	8.67 $\pm$ 0.13 <sup>c</sup>	***
C17	0.31 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.35 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.34 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	0.05 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	***
C18	10.46 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup>	12.74 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	13.12 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	3.55 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	***
C20	0.25 $\pm$ 0.09	0.36 $\pm$ 0.17	0.28 $\pm$ 0.16	0.29 $\pm$ 0.01	ns
<b><math>\Sigma</math>SFA</b>	<b>41.73<math>\pm</math>0.93<sup>c</sup></b>	<b>45.07<math>\pm</math>0.66<sup>b</sup></b>	<b>48.05<math>\pm</math>1.43<sup>a</sup></b>	<b>12.65<math>\pm</math>0.11<sup>d</sup></b>	***
C16:1	1.98 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	2.03 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	2.19 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.14 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	***
C17:1	0.26 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.30 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.29 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.03 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	***
C18:1 ( <i>n</i> -9)	45.07 $\pm$ 1.08 <sup>a</sup>	42.25 $\pm$ 0.53 <sup>b</sup>	36.07 $\pm$ 1.05 <sup>c</sup>	24.05 $\pm$ 0.05 <sup>d</sup>	***
C18:1 ( <i>n</i> -7)	2.58 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	3.37 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	3.45 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	1.16 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	***
C20:1	0.74 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	1.20 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.56 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	0.11 $\pm$ 0.06 <sup>d</sup>	***
<b><math>\Sigma</math>MUFA</b>	<b>50.62<math>\pm</math>1.02<sup>a</sup></b>	<b>49.15<math>\pm</math>0.38<sup>a</sup></b>	<b>43.16<math>\pm</math>0.91<sup>b</sup></b>	<b>25.50<math>\pm</math>0.09<sup>c</sup></b>	***
C18:2	6.34 $\pm$ 0.28 <sup>c</sup>	4.18 $\pm$ 0.25 <sup>d</sup>	7.25 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	60.42 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	***
C18:3 ( <i>n</i> -3)	0.41 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>	0.24 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	0.52 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	**
C20:4	0.20 $\pm$ 0.08	0.35 $\pm$ 0.21	0.18 $\pm$ 0.05	0.41 $\pm$ 0.20	ns
<b><math>\Sigma</math>PUFA</b>	<b>6.96<math>\pm</math>0.35<sup>b</sup></b>	<b>4.77<math>\pm</math>0.43<sup>c</sup></b>	<b>7.95<math>\pm</math>0.24<sup>b</sup></b>	<b>61.00<math>\pm</math>0.02<sup>a</sup></b>	***

<sup>c</sup>*p*-values: ns:  $p > 0.05$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Different letters within the same row denote significant differences between means at  $p < 0.05$ .

The fatty acid profile of sausages partly reflected the fatty acid profile of the fats/oil used for their elaboration (**Table 3**). Samples from MF sausages had significantly higher proportion of C18:1 (*n*-9) and thus of total MUFA than the rest of samples. Moreover, CF and LF samples had significantly higher proportion of stearic acid (C18:0) and then of total SFA compared to the rest. Consistently, SOF sausages showed significantly higher total PUFA and lower total SFA proportions compared to the rest of sausages. The higher PUFA/SFA ratio found in SOF sausages compared to those elaborated with animal fats (MF, CF and LF) was also previously reported by Özvural and Vural, (2008) in frankfurters containing oil blends. The incorporation of vegetable oils into meat products emulsions tends to increase the unsaturated fatty acid proportion (Özvural and Vural, 2008).

**Table 3.** Fatty acid profile (mean  $\pm$  standard deviation) of sausages elaborated with different lipid sources (Montanera: MF, concentrate: CF, commercial lard: LF and sunflower oil: SOF). Results are expressed in %.

	MF	CF	LF	SOF	<sup>c</sup> p-values
C14	1.71 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	2.13 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	0.66 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>	2.18 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	***
C16	27.77 $\pm$ 0.54 <sup>b</sup>	31.91 $\pm$ 1.39 <sup>a</sup>	31.52 $\pm$ 1.07 <sup>a</sup>	14.43 $\pm$ 1.60 <sup>c</sup>	***
C17	0.34 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	0.32 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.13 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	0.36 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	***
C18	11.24 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	13.01 $\pm$ 1.76 <sup>a</sup>	12.85 $\pm$ 1.29 <sup>a</sup>	6.45 $\pm$ 1.48 <sup>b</sup>	***
C20	0.37 $\pm$ 0.18	0.30 $\pm$ 0.17	0.73 $\pm$ 0.88	0.32 $\pm$ 0.18	ns
<b><math>\Sigma</math>SFA</b>	<b>41.43<math>\pm</math>0.51<sup>b</sup></b>	<b>47.66<math>\pm</math>1.77<sup>a</sup></b>	<b>47.22<math>\pm</math>1.07<sup>a</sup></b>	<b>22.40<math>\pm</math>1.98<sup>c</sup></b>	***
C16:1	2.00 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	2.83 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	2.92 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.97 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>	***
C17:1	0.27 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.27 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.14 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.31 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	***
C18:1 (n-9)	42.84 $\pm$ 0.63 <sup>a</sup>	37.55 $\pm$ 1.19 <sup>b</sup>	34.84 $\pm$ 1.04 <sup>c</sup>	26.51 $\pm$ 3.02 <sup>d</sup>	***
C18:1 (n-7)	3.14 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	3.54 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	3.39 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	1.63 $\pm$ 0.67 <sup>b</sup>	***
C20:1	0.72 $\pm$ 0.06	0.56 $\pm$ 0.02	0.99 $\pm$ 1.56	0.48 $\pm$ 0.06	ns
<b><math>\Sigma</math>MUFA</b>	<b>49.07<math>\pm</math>0.59<sup>a</sup></b>	<b>45.13<math>\pm</math>1.68<sup>b</sup></b>	<b>42.13<math>\pm</math>1.11<sup>c</sup></b>	<b>29.76<math>\pm</math>2.70<sup>d</sup></b>	***
C18:2	7.68 $\pm$ 0.15 <sup>bc</sup>	5.91 $\pm$ 2.34 <sup>c</sup>	8.83 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>	45.27 $\pm$ 2.37 <sup>a</sup>	***
C18:3 (n-3)	0.49 $\pm$ 0.11	0.42 $\pm$ 0.10	0.78 $\pm$ 1.15	0.56 $\pm$ 0.11	ns
C20:4	0.39 $\pm$ 0.19	0.46 $\pm$ 0.26	0.53 $\pm$ 0.27	0.53 $\pm$ 0.19	ns
<b><math>\Sigma</math>PUFA</b>	<b>8.56<math>\pm</math>0.15<sup>bc</sup></b>	<b>6.78<math>\pm</math>2.32<sup>c</sup></b>	<b>9.92<math>\pm</math>0.31<sup>b</sup></b>	<b>46.58<math>\pm</math>1.31<sup>a</sup></b>	***

<sup>c</sup>p-values: ns:  $p > 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Different letters within the same row denote significant differences between means at  $p < 0.05$ .

### Textural properties of experimental fermented sausages

Regarding textural properties of sausages (**Table 4**), TPA shows that lipid source significantly ( $p < 0.001$ ) influenced all measurements except fracturability ( $p > 0.05$ ). SOF sausages were harder, gummier, less adhesive, and measurements of chewiness springiness, cohesiveness and resilience were higher compared to the rest of sausages. MF and LF sausages showed less hardness, gumminess and chewiness values compared to the other sausages, whereas LF samples showed the lowest values of springiness and cohesiveness. Finally, CF samples showed the highest adhesiveness values compared to the rest of sausages. Accordingly, Choi et al., (2009) reported an increase in hardness, cohesiveness, gumminess, chewiness and springiness in

emulsions containing pre-emulsified vegetable oil compared to those containing pork fat. Contrarily, Muguerra et al., (2003) in dry fermented sausages with a partial substitution of pork back-fat by pre-emulsified soy oil did not report changes in hardness and springiness, although a slight increase in cohesiveness, gumminess and chewiness was detected. On the contrary, Bloukas et al., (1997) found that fermented sausages with direct incorporation of olive oil as liquid are softer than control sausages, whereas those in which the olive oil was incorporated as pre-emulsified fat with soy protein isolate are harder than the control.

According to Bloukas and Paneras, (1993) the hardness values are positively correlated with protein content in low fat frankfurters. In the present study the protein content was not significantly different between sausages ( $p>0.05$ ). Therefore, differences in textural properties and particularly in hardness could mostly be explained by differences in the fatty acid profile. Teye et al., (2006) reported that changing the fatty acid composition of subcutaneous adipose tissue using different dietary oils changes lipid melting point and thus fat firmness. In addition, Youssef and Barbut, (2009) reported that higher hardness values might be related to the fat globules size which is smaller in oils compared to animal fats. A larger area of protein membrane is needed to surround the smaller fat globules which could have contributed to increase the resistance to compression of food systems containing vegetable oils as SOF. This larger surface probably determined more protein-protein interactions and increased the number and strength of the fat globules bonds to the protein matrix making the SOF sausages firmer compared to those elaborated with animal fats.

**Table 4.** Textural properties (mean  $\pm$  standard deviation) of sausages from a TPA (Montanera: MF, concentrate: CF, commercial lard: LF and sunflower oil: SOF).

	MF	CF	LF	SOF	<sup>c</sup> <i>p-values</i>
Hardness (N cm <sup>-2</sup> )	59.27 $\pm$ 1.77 <sup>b</sup>	64.48 $\pm$ 5.11 <sup>b</sup>	63.18 $\pm$ 4.63 <sup>b</sup>	76.86 $\pm$ 5.45 <sup>a</sup>	***
Fracturability (N cm <sup>-2</sup> )	0.10 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.03	0.08 $\pm$ 0.01	ns
Adhesiveness (N x s)	-0.09 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	-0.20 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	-0.05 $\pm$ 0.03 <sup>bc</sup>	-0.01 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	***
Springiness (cm)	0.76 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	0.79 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.69 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	0.82 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	**
Cohesiveness	0.64 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.64 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.60 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	0.67 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	***
Gumminess (N cm <sup>-2</sup> )	37.99 $\pm$ 1.05 <sup>c</sup>	45.88 $\pm$ 3.38 <sup>b</sup>	37.62 $\pm$ 3.77 <sup>c</sup>	51.28 $\pm$ 3.16 <sup>a</sup>	***
Chewiness (N cm <sup>-1</sup> )	28.94 $\pm$ 1.29 <sup>c</sup>	36.35 $\pm$ 2.57 <sup>b</sup>	27.55 $\pm$ 2.90 <sup>c</sup>	42.00 $\pm$ 2.28 <sup>a</sup>	***
Resilience	0.19 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.20 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.20 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.26 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	***

<sup>c</sup>*p-values*: ns:  $p > 0.05$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Different letters within the same row denote significant differences between means at  $p < 0.05$ .



## Time intensity analysis

**Table 5** shows the extracted TI parameters (means  $\pm$  SD) and the **Figure 1** the average TI curves for each evaluated attribute. The lipid source had a significant effect on all the gumminess TI parameters. The highest maximum intensity of gumminess ( $I_{max}$ ) and duration of maximum intensity (DurPI) were significantly recorded for MF sausages compared to the rest of samples ( $p < 0.01$ ). Moreover, MF sausages also displayed the highest Area ( $p < 0.01$ ), although these differences were not significant compared to SOF and CF samples. However, total duration of gumminess perception was longer in CF samples compared to the rest of sausages samples (**Figure 1a**). Instrumental texture measurements (TPA) and results of dynamic perception of gumminess are partly in disagreement. Both methodologies revealed a trend of SOF sausages to display a higher gumminess compared to the other types of sausages, but opposite results were obtained for MF samples. These results would highlight that perception of gumminess recorder by the panel using TI method did not completely match with instrumental measurements. Panellists were trained to evaluate gumminess as “a texture mechanical property related to soft product cohesiveness and evaluate as the amount of deformation undergone by the experimental sausages before rupture”. Texture properties of a solid food are a result of a complex mixture of physical phenomena that occur during eating (Drake, 1987) and therefore, according to the obtained results these properties would be better assessed by dynamic sensory techniques than by instrumental ones. As far as we know, no information is available in the scientific literature regarding the dynamic sensory evaluation of gumminess in solid foods and particularly in meat products. Several parameters should be considered in order to evaluate the effect of added fat on texture properties of solid foods such as the method of oil incorporation to the formulated product (liquid or pre-emulsion) (Bloukas et al., 1997), the fat globules size (Youssef and Barbut, 2009) or if the used fats melts or not at oral temperature (Vingerhoeds et al., 2008).

Regarding flavour attributes, the lipid composition had a significant effect on  $I_{max}$  and Area of overall flavour ( $p < 0.01$ ) (**Table 5**). Overall flavour was perceived as more intense in MF and LF samples compared to the others

sausages, although the longest persistence was displayed by the SOF samples (**Figure 1b**). Similarly, the lipid composition significantly affected all evaluated TI parameters of mushroom flavour, with  $I_{max}$  and Area higher in MF sausages (**Figure 1c**). Total duration of mushroom perception was also the longest in SOF samples compared to the other sausages. All TI parameters extracted from rancid flavour curves were significantly affected by lipid composition. The LF samples displayed the highest  $I_{max}$  and Area, whereas the highest DurPI was exhibited by SOF experimental sausages. **Figure 1d** showed that rancid perception was more persistent in MF samples compared to the rest. Finally, the duration of maximum intensity (DurPI) of cured flavour was significantly affected by lipid composition ( $p < 0.05$ ), with SOF and LF samples showing the highest values (**Figure 1e**). Therefore, TI study revealed that most flavour attributes were perceived as more intense in sausages elaborated with animal fat (particularly in MF and LF) than with sunflower oil (SOF), whereas persistence of flavour attributes was longer in sausages containing SOF. The higher solid to liquid ratio of animal fats compared to SOF could partly explain these differences since volatile compounds have a better solubility in the liquid state than in the solid state of fat (Maier, 1975). A less sorption of volatile compounds on the solid state due to a worse solubility leads to a better release and thus a more intense perception in sausages elaborated with animal fat.

The low solid to liquid ratio of SOF might cause a great retention of aroma compounds and thus a slow release of these compounds during consumption from the sausages matrix. This event could have contributed to the higher persistence of flavour attributes found in sausages elaborated with SOF compared to those elaborated with more saturated fats. Volatility and then release of flavour compounds depends on the physical state of the fat (which mainly depends on chain length and degree of unsaturation), the chemical properties of the volatile compound (hydrophobic properties,  $\log P_{o/w}$ ) and also the temperature (Harvey et al., 1995). In fact, the effect of temperature on volatility is predominant to the effect of the physical state of the fat on the retention of volatile compounds (Meynier et al., 2003). Maier, (1975) reported that retention of volatile compounds by triacylglycerides increases with temperature in a solid state but decreases in the liquid state. These arguments

could explain the higher release of the volatile compound in samples with solid fat (MF, LF and CF) than with more unsaturated lipid (SOF) until a balance between product temperature (room temperature, ~ 21 °C) and oral temperature (37°C in the oral cavity) was reached. Once the samples reached the oral temperature, the lower retention and consequently the higher release of volatile compounds in SOF samples would lead to a longer persistence of the evaluated flavour attributes compared to the rest of sausages. The higher intensity perception found in sausages containing animal fat would have been promoted by a less sorption of volatile compounds and would have occurred before reaching the balance between samples and oral temperatures. Once the oral temperature was reached, the effect of temperature on volatile compounds release was predominant.

**Table 5.** Sensory characteristics (TI) (mean  $\pm$  standard deviation) of sausages (Montanera: MF, concentrate: CF, commercial lard: LF and sunflower oil: SOF). (Imax: maximum intensity; DurPI: duration of plateau; and Area: total area under the curve). <sup>c</sup>*p*-values of both factors (lipid composition: LC and session: S).

	TYPE OF SAUSAGES				<sup>c</sup> <i>p</i> -values	
	MF	CF	LF	SOF	LC	S
<b>TEXTURE</b>						
<i>Gumminess</i>						
Imax	4.50 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	3.29 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	3.40 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	3.51 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup>	**	ns
DurPI	9.60 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	7.20 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	6.60 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	7.20 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	***	***
Area	54.10 $\pm$ 4.36 <sup>a</sup>	44.59 $\pm$ 1.53 <sup>ab</sup>	33.98 $\pm$ 4.28 <sup>b</sup>	46.97 $\pm$ 3.99 <sup>ab</sup>	**	**

## FLAVOUR

### *Overall*

lmax	5.67±0.13 <sup>a</sup>	4.31±0.20 <sup>b</sup>	5.02±0.28 <sup>ab</sup>	4.79±0.17 <sup>b</sup>	**	**
DurPI	9.00±0.01	9.00±0.01	9.00±0.01	7.80±0.01	ns	ns
Area	82.77±6.16 <sup>a</sup>	61.70±4.46 <sup>b</sup>	86.18±6.44 <sup>a</sup>	59.52±4.30 <sup>b</sup>	**	ns

### *Mushroom*

lmax	4.42±0.24 <sup>a</sup>	3.54±0.19 <sup>ab</sup>	2.74±0.36 <sup>b</sup>	3.58±0.22 <sup>ab</sup>	***	ns
DurPI	7.80±0.01 <sup>ab</sup>	6.00±0.01 <sup>b</sup>	8.4±0.01 <sup>a</sup>	8.4±0.01 <sup>a</sup>	**	***
Area	79.47±8.10 <sup>a</sup>	35.20±3.15 <sup>b</sup>	50.89±6.74 <sup>b</sup>	50.44±5.52 <sup>b</sup>	***	ns

### *Rancid*

lmax	2.70±0.30	2.32±0.20	3.54±0.50	2.75±0.28	*	***
DurPI	7.80±0.01 <sup>a</sup>	4.80±0.01 <sup>b</sup>	6.00±0.01 <sup>ab</sup>	6.60±0.01 <sup>a</sup>	***	***
Area	35.12±4.21	23.97±0.87	37.58±5.22	33.74±2.93	*	**

### *Cured*

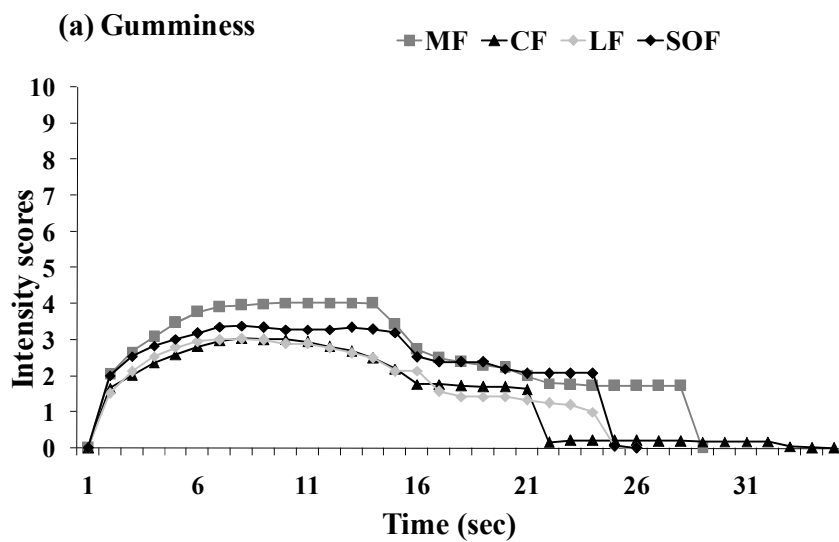
lmax	3.33±0.28	3.89±0.11	4.30±0.43	3.42±0.27	ns	**
DurPI	6.00±0.01	6.60±0.01	7.80±0.02	7.80±0.01	*	**
Area	54.43±7.28	42.55±3.25	56.79±7.68	41.48±4.19	ns	*

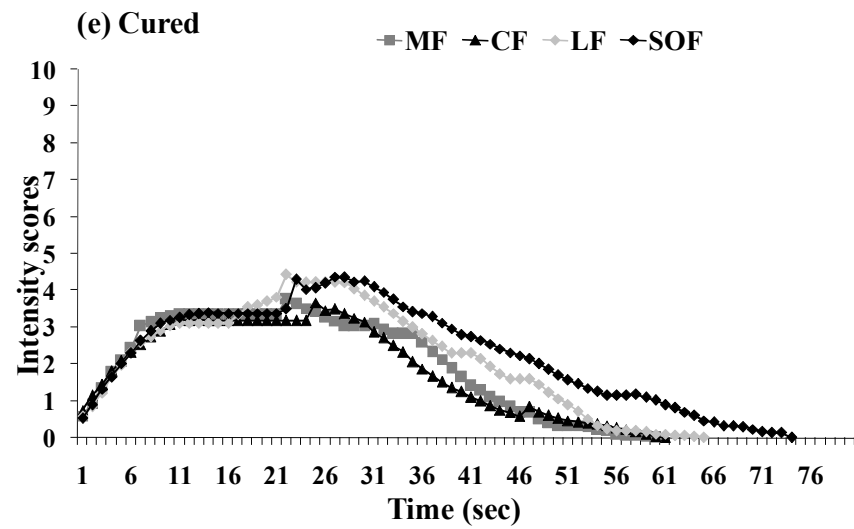
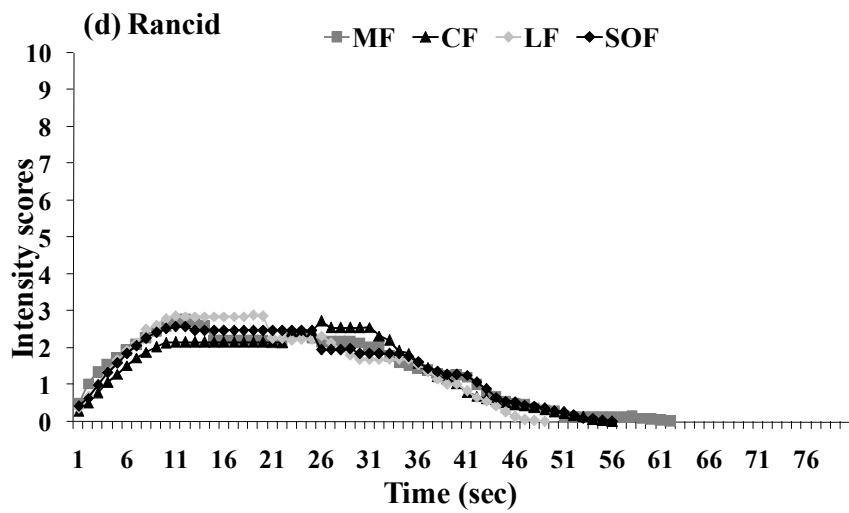
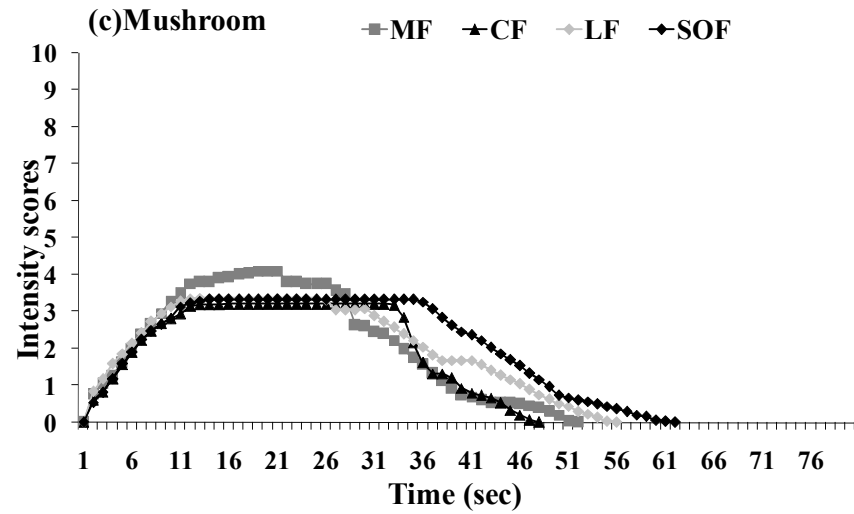
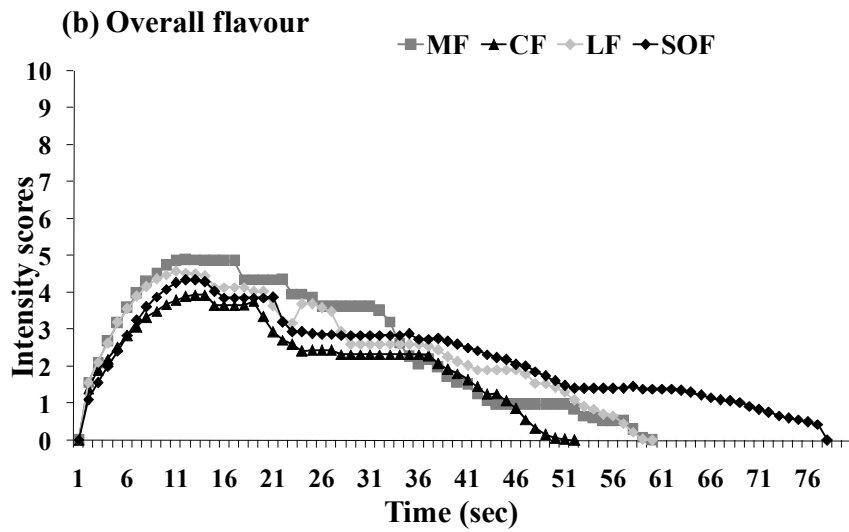
---

<sup>c</sup>p-values: ns:  $p > 0.05$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Different letters within the same row denote significant differences between means at  $p < 0.05$ .

**Figure 1.** Average TI curves for the attributes Mushroom flavour (b), Rancid flavour (c), Overall flavour (d) and Cured flavour (e) (n = 27; 9 panellists x 3 replications).





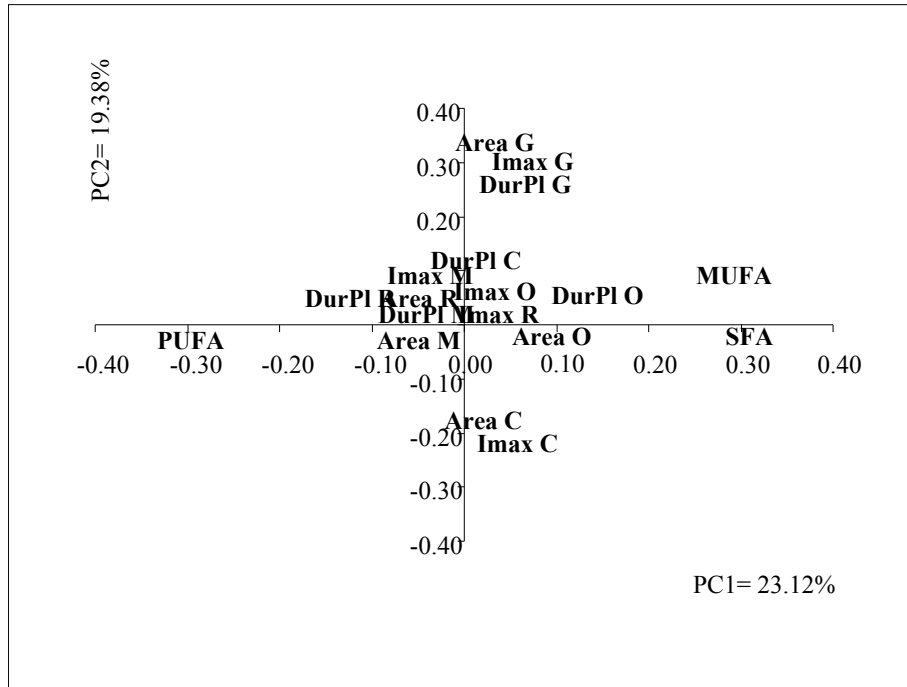
## Principal component analysis

A principal component analysis was performed in order to evaluate the relationship among fatty acid profile of sausages and TI parameters of gumminess (G), overall flavour (O), mushroom flavour (M), cured flavour (C) and rancid flavour (R) (**Figure 2**). The first two principal components accounted for 42.49 % of the total variance. The first PC (23.12 % of the total variance) was positively loaded by DurPI-O, Area-O, MUFA and SFA. Moreover, this component was negatively defined by PUFA, Area-M, DurPI-R, Area-R and DurPI-M. The second PC (19.38 % of the total variance) was positively defined by I<sub>max</sub>-M, DurPI-C, Area-G, I<sub>max</sub>-G, Area-G, I<sub>max</sub>-R, I<sub>max</sub>-O while Area C and I<sub>max</sub> C showed negative loading in this PC. Loadings plots (**Figure 2a**) showed that total MUFA and SFA proportion were positively correlated with all TI parameters of overall flavour (I<sub>max</sub> O, Area O and DurPI O) and the maximum intensity of rancid flavour (I<sub>max</sub> R), but inversely with those related to mushroom and rancid flavour (I<sub>max</sub> M, Area M, DurPI M, Area R and DurPI R). Texture parameters were positively correlated with MUFA content. In addition, the percentage of PUFA was negatively correlated with percentage of MUFA and SFA.

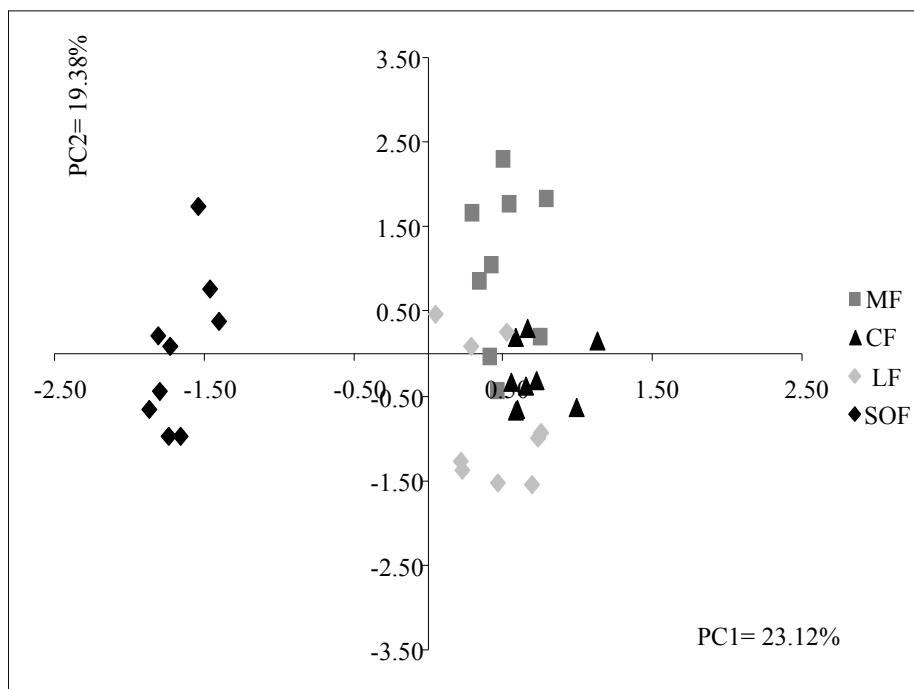
A factor scores plot (**Figure 2b**) showed great differences between sausages containing animal fat (MF, CF and LF) and ones containing vegetable oil (SOF). Overall, SOF samples were located in the negative axis of the first PC and were associated with high levels of PUFA and with a longer persistence of maximum intensity of rancid and mushroom flavours (DurPI-R and DurPI-M). Furthermore, the inclusion of vegetable fat in the sausages was associated with a more persistence (T<sub>end</sub>) of mushroom flavour which would be linked to a higher release of 1-octen-3-ol. MF samples were located in the upper right quadrant of PCA associated with a higher intensity perception (I<sub>max</sub>-G and Area-G) and longer duration of maximum intensity of gumminess (DurPI-G). Finally, CF and LF samples were located in the positive axis of the first PC associated with a higher perception of rancid, cured and overall flavour.

**Figure 2.** Principal Component Analysis (PCA) of time-intensity parameters and fatty acid profile. Parameter loadings (a) and factor scores (b) plots for the two first principal components. (G= gumminess, O= overall, R= rancid, C= cured, M= mushroom).

(a)



(b)





## CONCLUSIONS

This study demonstrates the feasibility of dynamic sensory methods, particularly the TI method, for evaluating the sensory properties of experimental fermented sausages manufactured with different lipid sources. The TI study revealed that lipid composition had a marked influence on the perceived texture and flavour during mastication. Most flavour attributes were perceived as more intense in sausages elaborated with animal fat, particularly in LF and MF ones, whereas persistence of flavour attributes was longer in sausages containing vegetable oils. Moreover, oral temperature would influence the dynamic perception of flavour and texture as it affects the physical state of fats.

## FUNDING

This study was supported by the “Ministerio de Educación, Cultura y Deporte” for the FPI grant and the “Ministerio de Economía y Competitividad” project entitled: “Estudio sensorial e instrumental de la liberación de compuestos olor-activos en jamón ibérico loncheado: efecto del contenido y características de la grasa. (Project AGL2007-65923-C02-01).

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the financial supports by the “Ministerio de Educación, Cultura y Deporte” and the “Ministerio de Economía y Competitividad”.

## REFERENCES

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) 2000. *Official Methods of Analysis*, 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburgh, Maryland.
- Bourne MC. (1978). Texture profile analysis. *Food Technology* 32: 62–66.
- Bloukas JG and Paneras, ED. (1993). Substituting olive oil for pork for pork backfat affects quality of low-fat frankfurters. *Journal of Food Science* 58: 705–709.

- Bloukas JG, Paneras ED and Fournitzis GC. (1997).Effect of replacing pork backfat with olive oil on processing and quality characteristics of fermented sausages.*Meat Science* 45(2): 133–144.
- Butler G, Posh LM, Mackie, DA and Jones A. (1996).Time–intensity as a toll for measurement meat tenderness.*Food Quality and Preference*, 7: 193–204.
- Carrapiso AI, Jurado A, Timón ML and García C. (2002).Odor-active compounds of Iberian hams with different aroma characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6453–6458.
- Cava R, Estévez M, Ruiz J, Morcuende D and Antequera T. (2003).Evolution of fatty acids from intramuscular lipid fractions during ripening of Iberian hams as affected by  $\alpha$ -tocopheryl acetate supplementation in diet. *Food Chemistry* 81: 199–207.
- Cava R, Ruiz J, Ventanas J and Antequera T. (1999).Oxidative and lipolytic changes during ripening of Iberian hams as affected by feeding regime: extensive feeding and alpha-tocopheryl acetate supplementation. *Meat Science* 52: 165-172.
- Choi YS, Choi JH, Han DJ, Kim HY, Lee, MA, Kim HW et al. (2009). Characteristics of low-fat meat emulsion systems with pork fat replaced by vegetable oils and rice bran fiber. *Meat Science* 82: 266-271.
- Cliff M and Heymann H. (1993).Development and use of time-intensity methodology for sensory evaluation: A review. *Food Research International* 26: 375-385.
- Daza A, Rey AI, Ruiz J and López-Bote CJ.(2005). Effects of feeding in free-range conditions or in confinement with different dietary MUFA/PUFA ratio and  $\alpha$ -tocopheryl acetate, on antioxidants accumulation and oxidative stability in Iberian pigs.*Meat Science* 69: 151–163.
- Dijksterhuis GB and Piggott J. (2001).Dynamic methods of sensory analysis.*Trends in Food Science and Technology* 11: 284–290.
- Drake B. (1987). Food psychorheology.A speculation on difficulties. In Moskowitz H R (ed), *Food Texture, Instrumentation and SenroryMeasurement*, New York: Marcel Dekker,pp. 167-74.
- Feiner G. (2006). Meat products handbook. Woodhead Publishing: Cambridge.
- Folch J, Lees M and Sloane Stanley GH.(1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.*The Journal of Biological Chemistry* 226: 497–509.

Fuentes V, Ventanas J, Carrapiso AI, Benedito J and Ventanas J. (submitted to Food Science and Technology International). Temporal sensory perception and instrumental measurements of texture and flavour in dry-cured model products varying the fat content.

Guichard E. (2002). Interactions between flavor compounds and food ingredients and their influence on flavor perception. *Food Reviews International* 18(1): 49–70.

Harvey B, Druaux C and Voilley A. (1995). Effect of protein on the retention and transfer of aroma compounds at the lipid-water interface. In Dickinson E and Lorient D (eds) *Food Macromolecules and Colloids*. Cambridge, U.K: The Royal Society of Chemistry, pp. 154-163.

Hort J and Cook D. (2007). Formulating low-fat food: The challenge of retaining flavour quality. In Taylor A and Hort J (eds) *Modifying flavour in food*. Cambridge, England: Woodhead Publishing in Food Science, Technology and Nutrition, pp. 131–143.

<http://www.flavornet.org/flavornet.html>

International Organization for Standardization (ISO) 937:1978. *Meat and meat products. Determination of nitrogen content (Reference method)*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

Lee WEIII. (1989). Single-point versus time-intensity measurements: an informational entropy analysis. *Journal Sensory Studies* 4: 19-30.

Liu MN, Huffman DL and Egbert WR. (1991). Replacement of beef fat with partially hydrogenated plant oil in lean ground beef patties. *Journal of Food Science* 56: 861–862.

Maier HG. (1975). Binding of volatile aroma substances to nutrients and foodstuffs. In Maarse H and Groenen PJ (eds) *International symposium on aroma research*. The Netherlands: Pudoc: Wageningen, pp 143-157.

Meynier A, Garillon A, Lethuaut L and Genot C. (2003). Partition of five aroma compounds between air and skim milk, anhydrous milk fat or full fat cream. *Lait* 83: 223-235.

Muguerza E, Ansorena D and Astiasarán I. (2003). Improvement of nutritional properties of Chorizo de Pamplona by replacement of pork backfat with soy oil. *Meat Science* 65: 1361-1367.

Muguerza E, Fista G, Ansorena D, Astiasaran I and Bloukas JG. (2002). Effect of fat level and partial replacement of pork backfat with olive oil on processing and quality characteristics of fermented sausages. *Meat Science* 61: 397-404.

- Özvural EB and Vural H. (2008). Utilization of interesterified oil blends in the production of frankfurters. *Meat Science* 78: 211-216.
- Paneras ED and Bloukas JG. (1994). Vegetable oils replace pork backfat for low-fat frankfurter. *Journal of Food Science* 59: 725–728. 733.
- Peyvieux C and Dijksterhuis G. (2001). Training a sensory panel for TI: A case study. *Food Quality and Preference* 12: 19–28.
- Pietrasik Z and Duda Z. (2000). Effect of fat content and soy protein/carrageenan mix on the quality characteristics of comminuted, scalded sausages. *Meat Science* 56: 181-188.
- Reinbach HC, Toft M and Møller P. (2009). Relationship between oral burn and temperature in chili spiced pork patties evaluated by time–intensity. *Food Quality and Preference* 20: 42–49.
- Relkin P, Fabre M and Guichard E. (2004). Effect of Fat Nature and Aroma Compound Hydrophobicity on Flavor Release from Complex Food Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 6257-6263.
- Rey AI, Daza A, López-Carrasco C and López-Bote CJ. (2006). Feeding Iberian pigs with acorns and grass in either free-range or confinement affects the carcass characteristics and fatty acids and tocopherols accumulation in Longissimus dorsi muscle and backfat. *Meat Science* 73: 66–74.
- Ruiz J, García C, Muriel E, Andrés AI and Ventanas J. (2002). Influence of sensory characteristics on the acceptability of dry-cured ham. *Meat Science* 61: 347–354.
- Sandler SR and Karo W. (1992). *Source book of advances organic laboratory preparations*. San Diego: Academic Press.
- Shahidi FLJ, Rubin LJ and D'Souza LA. (1986). Meat flavor volatiles: A review of the composition, technique of analysis and sensory evaluation, *CRC Critical Review in Food Science and Nutrition* 24, pp. 219–227.
- Sourdet S, Relki, P, Fosseux PY and Aubry V. (2002). Composition of fat protein layer in complex food emulsions at various weight ratios of casein-to-whey proteins. *Lait* 82: 567-578.
- Teye GA, Wood JD, Whittington FM, Stewart A and Sheard PR. (2006). Influence of dietary oils and protein level on pork quality 2. Effects on properties of fat and processing characteristics of bacon and frankfurter-style sausages. *Meat Science* 73: 166–177.

- Ventanas S, Ventanas J, Ruiz J and Estévez M. (2005). Iberian pigs for the development of high-quality cured products. In Pandalai SG (ed) *Recent research developments in agricultural and food chemistry*. Trivandrum, India: Research Signpost, (6)pp. 27–53.
- Ventanas S, Puolanne E and Tuorila H. (2010). Temporal changes of flavour and texture in cooked bologna type sausages as affected by fat and salt content. *Meat Science* 85: 410-419.
- Ventanas S, Ventanas J, Tovar J, García C and Estévez M. (2007). Extensive feeding versus oleic acid and tocopherol enriched mixed diets for the production of Iberian dry-cured hams: Effect on chemical composition, oxidative status and sensory traits. *Meat Science* 77: 246–325.
- Vingerhoeds MH, de Wijk RA, Zoet FD, Nixdorf RR and van Aken GA. (2008). How emulsion composition and structure affect sensory perception of low-viscosity model emulsions. *Food Hydrocolloids* 22: 631-146.
- Youssef MK and Barbut S. (2009). Effects of protein level and fat/oil on emulsion stability, texture, microstructure and color of meat batters. *Meat Science* 82: 229-233.



## **CAPÍTULO III.**

**Estatus:** preparado.

### **Effect of lipid content and composition on volatile compounds release from experimental fermented sausages**

Verónica Fuentes, Jesús Ventanas, David Morcuende, Ana I. Carrapiso and Sonia Ventanas.

Department of Animal Production and Food Science, University of Extremadura, 10003  
Cáceres, Spain

\*Corresponding author: Sonia Ventanas, email:[sanveca@unex.es](mailto:sanveca@unex.es)

## **Abstract**

The influence of lipid content (~ 4% and ~ 15%) and lipid composition (two animal fats from Iberian pigs fed different finishing diets and sunflower oil) on the release of 11 volatile compounds with different physicochemical properties was studied under headspace conditions in experimental fermented sausages. Regarding sausages manufactured with different lipid content the release of most volatile compounds showed a similar behaviour regardless their physicochemical properties and percentage of fat. Changes in the matrix structure of sausages and flavour loss during processing and influence of lipid content on fatty acid composition could have contributed to these results. The lipid composition had a great influence on volatile compound release since most headspace concentrations increased as the unsaturated fatty acid fraction increased.

## **Keywords**

Fatty acid composition, fat content, experimental fermented sausages, SPME, volatile release.



## INTRODUCTION

Flavour is considered as one of the most important attributes determining the acceptance of food by consumers (Guichard, 2002). Volatile compounds which contribute to food flavour are not uniformly released from the foods as they can interact with macro ingredients such as fat, carbohydrate and proteins of the food in many different patterns (Chevance, & Farmer, 1999). According to Roberts, and Pollien, (2000), the lipid phase is the main component influencing flavour compounds volatility and thus their release and perception. Moreover, the amount and composition of fat and its physical state influence the dynamic release of flavour compounds during consumption (Hort, & Cook, 2007). Volatile release depends on both the proportion of liquid-to-solid fat ratio and on the aroma compound characteristics (Relkin, Fabre, & Guichard, 2004; Fabre, Relkin, & Guirchard, 2005) such as the hydrophobicity expressed by the  $\log P_{o-w}$  value (logarithm of the oil–water partition coefficient) (Taylor, 1998).

The high intramuscular fat (IMF) content of meat and meat products derived from Iberian pigs (12 % average in Iberian dry-cured ham) together with its particular fatty acid composition linked to the genetic and feeding systems of pigs contribute to the high sensory quality of these products (Ventanas, Ventanas, Ruiz, & Estévez, 2005). This feeding strategy (outdoors with acorns and grass) is reflected in the high content of monounsaturated fatty acids, mainly oleic acid, and the low content of saturated fatty acids in pig muscles and thus in the derived dry-cured meat products (Rey, López-Bote, & Sanz Arias, 1997). This particular fatty acid profile determines not only the formation of particular flavour compounds along the dry-cured product ripening (Cava, Ruiz, Ventanas, & Antequera, 1999; Ventanas, Ventanas, Tovar, García, & Estévez, 2007) but it also would influence their release and thus perception during product consumption.

In order to study how the fat content and fatty acid composition influence the volatile release in Iberian dry-cured products, as an initial approach different experimental fermented sausages were designed varying the fat content and the lipid sources used. Moreover, eleven volatile compounds were selected and included in the sausages based on: (1) their role in meat aroma as odour-active

compounds (Mottram, 1998; Carrapiso, Jurado, Timón, & García, 2002) (2) their different physicochemical characteristics (log  $P_{o-w}$  and vapour pressure) (3) their distinctive and different aroma notes and (4) their formation during the dry-cured meat products processing (Toldrá, 1998; Ruiz et al., 2002).

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Experimental fermented sausages manufacture**

Formulation of experimental fermented sausages is reported in **Table 1**. Manufacture of sausages was run as follows: first, commercial lean pork was cleaned from external fat, chopped, minced and mixed in a vacuum cutter for 2 min. Subsequently the fat, sodium chloride and the additives were mixed for 2.5 min and finally the glucono-delta-lactone (GDL) and the corresponding volatile compound solution in milli-Q water whose concentration is shown in **Table 2** were added. 20 ml of water were used to add the volatile compounds: the volatile compound solution, which included 5 ml of water, was vigorously shaken and the emulsion was immediately added to the batter. Then 5 ml of water were added to the flask, shaken and added to the batter. The same procedure was repeated twice more to obtain the flavoured sausages. Some of the selected volatile compounds used can not be solved in water because of their low water solubility and large concentration, so they were added as an emulsion. Water has important advantages against other solvents since is safe and is a main component of the batter and also some volatile compounds used are highly water-soluble. Ethanol, methanol or other solvents were not used because of safety concerns and the potential interferences with the added volatile compounds or the batter components. Otherwise, propylene glycol was initially essayed to get a more stable emulsion, but finally discarded because improvement in the emulsion was not enough to justify the inclusion of odd components in the batter. Two types of sausages with increasing lipid content were manufactured using back-fat from Iberian pigs fed extensively on acorns and reared in “montantera” traditional system (~4% and ~15%).

Moreover, three types of sausages varying in the lipid composition were manufactured using animal fat [back-fat from Iberian pigs fed extensively on acorn and grass -MF; back-fat from Iberian pigs fed on a concentrate -CF] and vegetable fat [sunflower oil -SOF]. These sausages were manufactured in order to obtain about 15 % lipid content after the ripening process.

Finally, the batter was vacuum-packaged to remove air bubbles and stuffed into 6 cm diameter artificial collagen casings and the ripening of the experimental sausages was carried out in drying chambers for 15 days, the relative humidity ranging from 95 % to 75 % and the temperature from 22 °C to 12 °C. At the end of the ripening process the weight losses of the fermented sausages was 35 % in average. The ripening process was fixed following the protocols developed for meat products containing GDL (Feiner, 2006).

During the ripening of sausages, a little proportion of the selected volatile compounds could be generated and a proportion of the added volatile compounds could be released from the matrix to the air. Therefore, the concentration of the selected volatile compounds added to batter sausages was enough and the volatile compounds detected in the fermented sausages mainly derived from the originally volatile compounds added. The concentrations and physicochemical characteristics of the eleven volatile compounds are shown in **Table 2**.

**Table 1.** Sausages formulation (%) for the ~ 4% and ~ 15% lipid content after ripening and for the different lipid sources (MF: Montanera, CF: Concentrate and SOF: Sunflower oil).

	LIPID CONTENT		LIPID COMPOSITION		
	~ 4%	~ 15%	MF	CF	SOF
Lean pork	96.84	88.11	88.11	88.11	89.00
Animal fat/vegetable fat	0.00	8.73	8.73	8.73	7.83
Sodium chloride	2.10	2.10	2.10	2.10	2.10
<i>Additives</i>					
Glucono-delta-lactone	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Sodium nitrite	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015
Ascorbic acid	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

**Table 2.** Concentrations and physicochemical characteristics of the studied volatile compounds.

	Concentrations (mg Kg <sup>-1</sup> )	Log $P_{o-w}$	Vapour pressure (mm Hg)	Water solubility (mg/L)	Descriptors**
Decanal	100	3.76	0.10	6.08E+01	soap, orange peel, tallow
Octanal	100	2.78	1.18	5.60E+02	fat, soap, lemon, green, purgent
1-Octen-3-ol	50	2.60	0.24	1.84E+03	mushroom, fatty, fruity, grass
Heptanal	200	2.29	3.52	1.25E+03	fat, citrus, rancid, oily
2-Heptanone	25	1.98	3.86	4.30E+03	soap, musty, blue cheese, fruity
Phenylcetaldehyde	300	1.78	0.39	3.03E+03	honey, sweet, floral
Octalactone	100	1.59	0.03	3.63E+03	coconut
3-Methylbutanal	200	1.23	50.00	1.40E+04	almond, malt, cheese, chocolate
1-Penten-3-ol	250	1.12	9.68	9.01E+04	butter, purgent, burnt, green, grass
2-Pentanone	100	0.91	35.40	4.30E+04	ether, fruit, sweet, acetone
2,6-Dimethylpyrazine	100	0.54	1.50	3.82E+04	cocoa, fried potato, nutty, roast beef, roasted nut

Data from Environmental Science-Interactive SCR PhysPropsDatabase (2004) (<http://www.syrres.com/esc/physdemo.htm>).

\*\* Data from <http://www.flavornet.org/flavornet.html>

## **Sausages characterization**

Fat content was determined by using the Folch method (Folch, Lees, & Sloane Stanley, 1957), protein content by the Kjeldahl method (ISO, 937:1978) and moisture was determined by an AOAC method (AOAC, 2000). Twelve repetitions were performed per type of sausages.

Fatty acid methyl esters (FAMES) were prepared by acidic transesterification in the presence of sulphuric acid (5 % sulphuric acid in methanol) (Sandler, & Karo, 1992). FAMES were analysed by gas chromatography using a Hewlett-Packard HP-5890A gas chromatograph, equipped with an on-column injector and a flame ionization detector, using a polyethyleneglycol capillary column (Supelcowax-10, Supelco, Bellefonte, PA) (60 m × 0.32 mm i.d. × 0.25 µm film thickness). Gas chromatograph oven program temperature was as follows: initial temperature of 190 °C, 2 °C/min to 235 °C; 15 min at this temperature and thereafter 6 °C/min to 250 °C, and then kept for an additional 20 min. Injector and detector temperatures were 250 °C. Carrier gas was helium at a flow rate of 0.8 ml/min. Individual FAME peaks were identified by comparison of their retention times with those of standards (Sigma, St. Louis, MO). Tridecanoic acid was used as internal standard. Eight repetitions were performed per type of sausages and results are expressed as percentage of the total fatty acids analysed.

## **Analysis of volatile compounds release**

The release of the eleven volatile compounds added to the sausages containing different lipid content or different lipid composition were analysed by solid phase microextraction (SPME) coupled to gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS) (gas chromatograph Hewlett–Packard 5890 series II coupled to a mass selective detector Hewlett–Packard HHP-5791A). One gram of minced sample was weighed into a 4 ml vial. All vials were closed with a teflon/silicone septum. An SPME fibre (50/30 µm divinylbenzene-carboxen-polydimethylsiloxane coating) was inserted through the septum and exposed to the headspace of the vial. Vials were pre-conditioned for 15 min at 37 °C. Extraction was carried out at 37 °C for 5 min in a water bath. After extraction, the SPME fibre was immediately transferred to the injector of the

chromatograph, which was in the splitless mode at 270°C. The separation of the volatile compounds was performed on a 5% phenyl–methyl silicone (HP-5) bonded phase fused silica capillary column (Hewlett– Packard, 50 m x 0.32 mm i.d, film thickness 1.05 µm), operating at 6 psi of column head pressure. Oven programme was: 45 °C for 10 min, 10 °C min<sup>-1</sup> to , 15 °C min<sup>-1</sup> to 250 °C, and held 250 °C for 10 min. The transfer line to the mass spectrometer was maintained at 270 °C. The mass spectra were obtained using a mass selective detector by electronic impact at 70 eV, a multiplier voltage of 1756 V and collecting data at a rate of 1 scan s<sup>-1</sup> over the m/z range 30–500. The volatile compounds were identified by comparing their mass spectrum and linear retention index with those of the standards. Results are given in area units (AU). Six repetitions per sausages were performed.

### **Statistical analyses**

Data from proximate composition, fatty acid profile and headspace measurements were analysed by a one-way ANOVA (GLM procedure) using lipid content (~ 4% and ~ 15%) or lipid composition (MF, CF and SOF) as main effects, with the detected differences being tested by mean differences being tested by the Tukey post-hoc test. Two principal components analyses (PCA) were carried out with data obtained from the volatile compound analysis and lipid content or lipid composition of sausages. SPSS software (v 15.0) for windows was used for all statistic analyses.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Characterization of fermented sausages**

The proximate composition of fermented sausages elaborated with different lipid content was (means±sd): fat content (3.9 % ± 0.91 and 14.56 % ± 1.59; *p*<0.001), protein content (39.25 % ± 1.39 and 31.52 % ± 0.82; *p*<0.001) and moisture content (51.50 % ± 0.70 and 50.77 % ± 0.25; *p*<0.001). All chemical parameters were significantly affected by lipid content, decreasing the moisture and protein content when lipid content increased. In concordance with

sausages formulations, as lipid content increased the lean pork incorporated decreased, and thus, the protein content decreased (**Table 1**).

No significant differences were found in the proximate composition of fermented sausages elaborated with different lipid sources (means±sd): lipid content (14.36 % ± 1.40), protein content (32.19 % ± 1.04) and moisture content (48.74 % ± 1.46).

The results obtained from the fatty acid profile analysis revealed a significant effect of lipid content on fatty acid composition ( $p < 0.01$ ) (**Table 3**). The proportion of saturated fatty acids (SFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA) significantly decreased as lipid content increased while proportion of monounsaturated fatty acids (MUFA) significantly increased with lipid content. The differences in the sausages fatty acid profile could be due to the addition of pork back-fat, which had a fatty acid profile different than those of the pork lean. As expected fatty acid composition of fermented sausages was significantly affected by the lipid source ( $p < 0.001$ ) (**Table 3**). MF samples showed the highest proportion of MUFA, CF samples had the highest proportion of total SFA, and finally, SOF samples had the highest proportion of PUFA compared to the rest of sausages.

**Table 3.** Fatty acid profile (means±standard deviation) of sausages elaborated with different lipid content and lipid composition<sup>a</sup>.  $p$ -values<sup>c</sup> of both factors (LC: lipid content and FAC: fatty acid composition).

	LIPID CONTENT		LIPID COMPOSITION			$p$ -values <sup>c</sup>	
	~ 4%	~ 15%	MF	CF	SOF	LC	FAC
ΣSFA	42.91±0.85	41.43±0.51	41.43±0.51 <sup>b</sup>	47.66±1.77 <sup>a</sup>	22.40±1.98 <sup>c</sup>	**	***
ΣMUFA	43.03±0.68	49.07±0.59	49.07±0.59 <sup>a</sup>	45.13±1.68 <sup>b</sup>	29.76±2.70 <sup>c</sup>	***	***
ΣPUFA	12.70±0.33	8.56±0.16	8.56±0.15 <sup>b</sup>	6.78±2.32 <sup>b</sup>	46.58±1.31 <sup>a</sup>	***	***

SFA: saturated fatty acids, MUFA: monounsaturated fatty acids and PUFA: polyunsaturated fatty acids.



<sup>a</sup>Results are expressed as means in percent.

*p*-values<sup>c</sup>: \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001.

Different letters within the same row denote significant differences between means at *p*<0.05.

### **Effect of lipid content on the release of volatile compounds**

**Table 4** showed that lipid content had not a significant influence on the headspace concentration of most studied volatile compounds. Most volatile compounds displayed similar headspace concentrations in both sausages (~4% and ~15%) except for 2-pentanone, 2-heptanone and 1-octen-3-ol. A suppression effect of lipid content was observed on the release of the latter volatile compounds agreeing with previous studies that described that release of volatile compounds generally decreases as fat content increases (Doyen, Carey, Linforth, Marin, and Taylor, 2001; Carrapiso, 2007). The present results are partly in agreement with Buttery, Guadagni, and Ling, (1973) also found that the rate of air-to-solution partition coefficient of volatile compounds in water, vegetable oil, and water-oil mixtures decreased as oil content increased. Fat acts as a solvent for volatile flavour compounds, and thus delays the release of flavour in high-content fat products (Chevance, & Farmer, 1999). With regard to meat products, some studies in sausages (Carrapiso, 2007) and frankfurters (Chevance, Farmer, Desmond, Novelli, Troy, & Chizzolini, 2000) also found that for most volatile compounds increasing the fat content lead to a decrease in volatile compounds release. However, these studies were performed in meat products not subjected to ripening process. In these sense, results from headspace concentrations analysis in sausages batter which were not subjected to ripening process, showed that lipid content affected the release of compounds hydrophobic compounds such as Decanal, 1-Octen-3-ol, 1-Heptanal among others, showed a higher headspace concentrations in batter with a ~ 4% fat content while release of compounds of intermediate hydrophobicity and hydrophilic (3-Methylbutanal and 2,6-Dimethylpirazine for example) were not affected by lipid content. The physicochemical properties of each compound are closely related to its release from foodstuffs (Linforth, Friel, & Taylor, 1999). According to Roberts et al., (2003), the amount of lipid needed

to reduce the headspace concentration is lower for hydrophobic compound than for hydrophilic ones. Carrapiso, (2007) reported that the release of hydrophilic compounds was not decreased but increased when fat content increased

However, **Table 4** shows that regardless the physicochemical properties and hydrophobicity, headspace concentration of most volatile compounds was not affected by the lipid content of sausages. In fact, during ripening process of dry sausage several phenomena take place, such as proteolysis and protein insolubilisation resulting in a selective loss of protein solubility (Astiasaran, Villanueva, & Bello, 1990). In addition this loss of solubility depends on factors such as the technological preparation and the composition of the ingredients (Astiasaran et al., 1990). And any factor which alters protein solubility will necessarily affect the textural qualities of cured sausages (Klement, Cassens, & Fennema, 1973). According to Kinsella, (1989) the modification of release can be attributed to interactions and to changes of diffusivity of the aroma compound in the matrix. Therefore, these phenomena took place along the ripening process might have caused a modification of matrix structure which could have masked the potential differences in volatile compounds release. Moreover, the present results could be consequence of a volatile loss during ripening process. According to De Roos, (1997) a reduction in fat content can contribute to a higher flavour loss during processing and storage due to the increase in flavour volatility. This phenomenon would explain the significant impact of ripening process moreover likely a higher loss of volatile compounds might take place in ~ 4% sausages compared to ~ 15% ones, and thus, a similar behaviour between both groups was found.

Finally, the fatty acid profile (**Table 3**) might have affected the volatile compounds release. Several authors have reported the influence of solid/liquid proportion on volatile compounds release, increasing the release with increasing the percentage of solid-to-liquid fat (Guichard, Tromelin, Juteau, Rega, & Roudnitzky, 2002; Roberts, Pollien, & Watzke, 2003). Therefore, a higher SFA content and thus solid/liquid proportion in sausages with ~ 15% compared to those elaborated with ~ 4% might have promoted the release of volatile compounds in these sausages due to the less solubility of volatile compounds.

**Table 4.** Headspace concentrations (AUx10<sup>7</sup>) (means ± standard deviation) of selected volatile compound extracted by SPME from fermented sausages with different lipid content (~ 4% and ~ 15%). *p*-values<sup>c</sup> of factor: lipid content.

	LIPID CONTENT		<i>p</i> -values <sup>c</sup>
	~ 4%	~ 15%	
3-Methylbutanal	5.58±0.43	4.29±1.69	ns
1-Penten-3-ol	7.34±1.94	8.96±2.78	ns
2-Pentanone	4.71±1.09	3.26±0.92	*
2-Heptanone	26.5±5.74	17.28±6.46	*
Heptanal	31.37±2.87	28.45±10.91	ns
2,6-Dimethylpyrazine	11.43±1.92	10.77±3.89	ns
1-Octen-3-ol	26.18±5.74	16.3±6.79	*
Octanal	23.95±2.98	20.78±8.22	ns
Phenylacetaldehyde	1.35±0.26	1.34±0.58	ns
Decanal	14.44±2.57	12.09±4.93	ns
Octalactone	5.80±1.06	4.66±2.37	ns

Significant differences between means at  $p < 0.05$ . *p*: ns:  $p > 0.05$ ; \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### Effect of lipid composition on volatile compounds release

**Table 5** shows the headspace concentration of volatile compounds analysed in the fermented sausages elaborated with different lipid sources (MF, CF and SOF). Fatty acid composition had a significant effect on the release of most studied volatile compounds, with SOF showing the largest release of these compounds, although for most volatile compounds no significant differences were found compared to MF sausages. CF sausages displayed the highest retention of most volatile compounds and thus the lowest levels of headspace concentration, although no significant differences were found compared to MF sausages for most volatile compounds. Release of volatile compounds could be affected by the physical state of the fat, which mostly depends on their fatty acid melting points (Maier, 1975). Relkin et al., (2004) observed that the proportion of liquid-to-solid content of fat influences on the release of flavour compounds. Results revealed that sausages elaborated with animal and more saturated fat, particularly CF ones, showed a higher retention effect on the analysed volatile

compounds. An increase in the proportion of unsaturated fatty acids as in MF and SOF sausages led to a higher release of the studied volatile compounds. In disagreement with previous studies which reported that the sorption of volatile compounds on fatty foods in the liquid state is more important than in the solid state due to better solubility (Maier, 1975; Guichard, Tromelin, Juteau, Rega, & Roudnitzky, 2002). However, Relkin et al., (2004) observed a greater release of hydrophobic compounds in emulsion with vegetable fat than in emulsion containing animal fat. Changes in the nature of the fat affect certain structural parameters as fat droplets and thus the flavour compounds release (Relkin et al., 2004). Dubois, Sergent, and Voilley, (1996) observed that food emulsions containing animal fat have a greater droplet size than those with vegetable fat. Moreover Charles, Rosselin, Beck, Sauvageot, and Guichard, (2000) reported that the release of hydrophobic compounds is higher when the fat droplet size is smaller whereas the release of hydrophilic compounds is higher in emulsion with larger droplet size. However, in the present study the effect of lipid composition was regardless physicochemical parameters of volatile compounds. According to van Ruth, Vries, Geary, and, Giannouli, (2002) emulsions with larger particles showed higher aroma retention, which was independent of the lipid fraction and the polarity of aroma compounds. These results are in agreement with those reported in the present study, since SOF sausages showed the highest chromatographic areas for most volatile compounds. Taking into account of the fact that flavour release depends on the proportion of liquid-to-solid content of fat, differences in fatty acid profile could have affected the proportion liquid-to-solid fat of MF and CF sausages and hence volatile compounds release. In addition the structure of emulsions has an important effect on the retention of aroma compound (van Ruth et al., 2002). The texture can affect the resistance to mass transfer of volatile compounds from product to air (De Roos, 2003). According to Druaux, and Voilley, (1997) the rates of mass transfer of an aroma compound across the different interfaces of a multiphasic system also have to be considered to describe the phenomena that are involved in aroma compound release from a food product. Therefore, the present results showed that the changes in the structure caused by lipid source might have had took precedence against physical state of fat. However, according to Roudnitzky, Roudaut, and Guichard, (2003) and Harvey, Druaux,

and Voilley, (1995) volatility of flavour compounds in oil depends on the chain length and the degree of unsaturation of the fatty acids contained in the triglycerides. And then, the profile fatty acid composition of sunflower oil might promote the volatile compounds release in comparison with the fatty acid composition of other vegetable oils.

**Table 5.** Headspace concentrations (AUx10<sup>7</sup>) (means ± standard deviation) of selected volatile compound extracted by SPME from fermented sausages with different lipid composition (MF, CF and SOF). *p*-values<sup>c</sup> of factor: lipid composition.

	LIPID COMPOSITION			<i>p</i> -values <sup>c</sup>
	MF	CF	SOF	
3-Methylbutanal	4.29±1.69 <sup>ab</sup>	2.10±0.34 <sup>c</sup>	5.69±1.86 <sup>a</sup>	**
1-Penten-3-ol	8.96±2.78 <sup>a</sup>	3.70±0.33 <sup>c</sup>	6.98±2.57 <sup>b</sup>	**
2-Pentanone	3.26±0.92 <sup>b</sup>	2.80±0.24 <sup>b</sup>	5.17±1.82 <sup>a</sup>	**
2-Heptanone	17.28±0.65 <sup>ab</sup>	9.52±0.77 <sup>b</sup>	20.58±7.81 <sup>a</sup>	*
Heptanal	28.45±10.91 <sup>ab</sup>	14.65±1.12 <sup>b</sup>	35.38±13.49 <sup>a</sup>	**
2,6-Dimethylpyrazine	10.77±3.89 <sup>a</sup>	4.68±0.45 <sup>b</sup>	9.99±4.24 <sup>a</sup>	*
1-Octen-3-ol	16.3±6.79 <sup>ab</sup>	7.82±0.99 <sup>b</sup>	17.5±7.39 <sup>a</sup>	*
Octanal	20.78±8.22 <sup>ab</sup>	10.60±0.91 <sup>b</sup>	25.53±10.23 <sup>a</sup>	*
Phenylacetaldehyde	1.34±0.58 <sup>ab</sup>	0.62±0.13 <sup>b</sup>	1.62±0.63 <sup>a</sup>	*
Decanal	12.09±4.93 <sup>ab</sup>	6.46±0.65 <sup>b</sup>	14.53±6.33 <sup>a</sup>	*
Octalactone	4.66±2.37 <sup>a</sup>	1.93±0.23 <sup>b</sup>	4.13±2.11 <sup>ab</sup>	*

Different letters within the same row denote significant differences between means at  $p < 0.05$ .

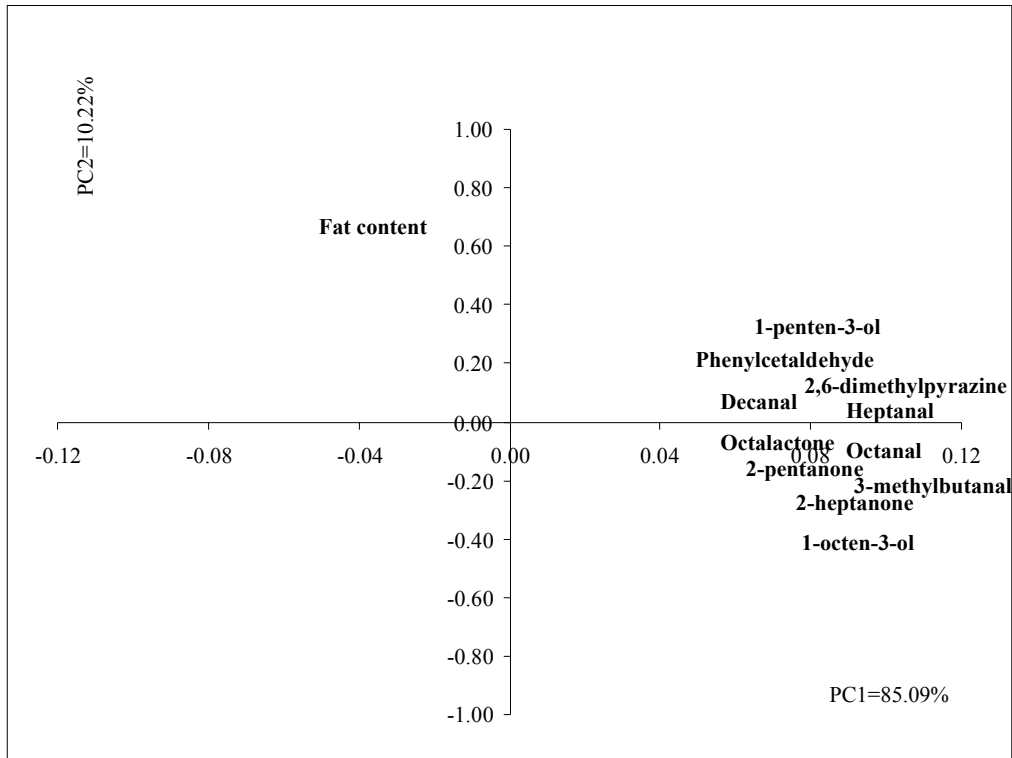
Significant differences between means at  $p < 0.05$ . *p*: ns:  $p > 0.05$ ; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### **Principal component analysis (PCA)**

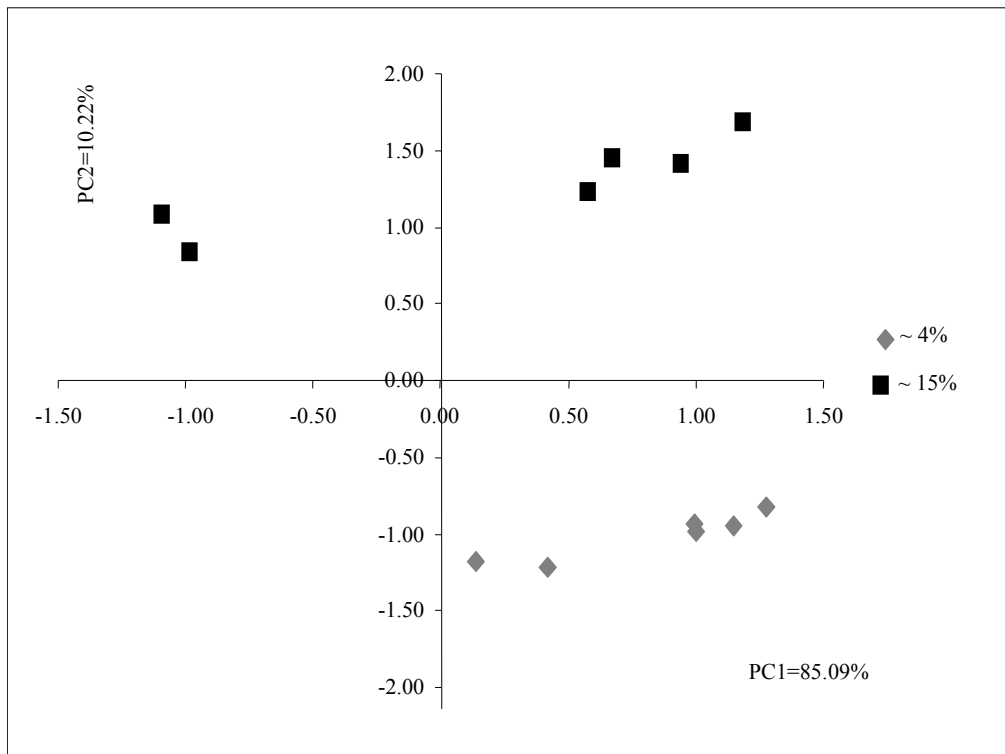
Two PCA were performed to evaluate the relationship between lipid content or lipid composition and headspace concentrations of volatile compounds. **Figure 1a** shows the relationship among headspace concentration of volatile compounds and the level of lipid content of the fermented sausages (~ 4% and ~ 15% fat content). The first two principal components accounted for 95.31 % of the total variance. The first PC (85.09 % of the total variance) was positively loaded by all selected volatile compounds and negatively defined by fat content. Factor score plot (**Figure 1b**) shows slight differences among the two types of fermented sausages. Overall, both samples sausages (~ 4% and ~ 15% lipid content) were located in the positive axis of the first PC and were associated with high headspace concentrations of selected volatile compound. These results are consistent with those previously described and discussed in the effect of lipid content on volatile compounds release from the experimental fermented sausages.

**Figure 1.** Principal component analysis (PCA) of headspace concentrations of volatile compounds affected by lipid content. Parameter loadings (a) and factor scores (b) plots for the two first principal components.

(a)

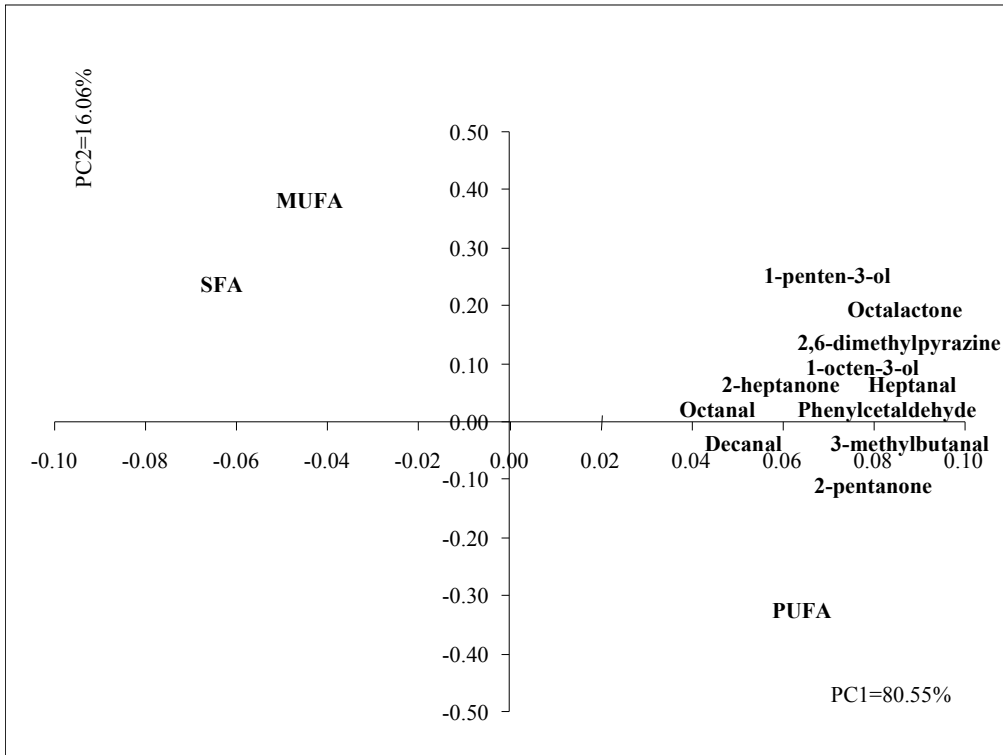


(b)

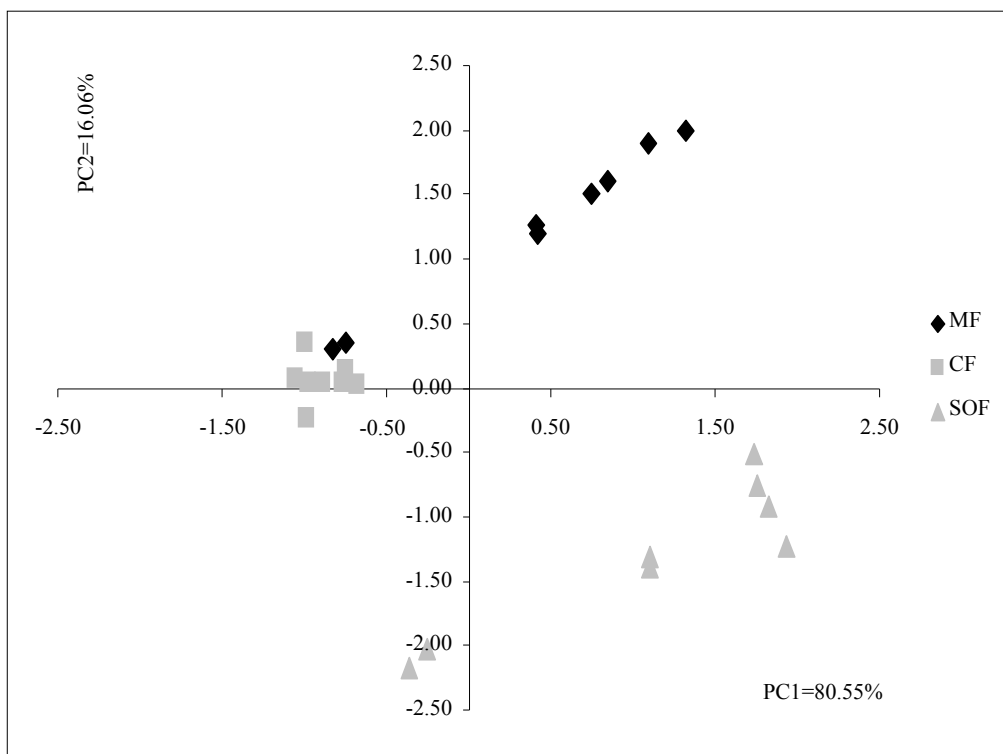


**Figure 2.** Principal component analysis (PCA) of headspace concentrations of volatile compounds affected by lipid composition. Parameter loadings (a) and factor scores (b) plots for the two first principal components.

(a)



(b)





Regarding to fermented sausages elaborated with different lipid sources (**Figure 2a**), 96.61 % of the variance was explained by the first two principal components, 80.55 % by the first principal (PC1) component and 16.06 % by the second (PC2). The loading plot for PC1 showed that headspace concentrations of all studied volatile compounds and the PUFA level showed positive loadings while SFA and MUFA levels had negative loadings. The results from the PCA score plot showed the same pattern as the analysis of variance (**Figure 2b**). CF sausages, which had the lowest headspace volatile concentrations, were located in the negative area of the PC1, whereas SOF and MF sausages, with a higher level of fat unsaturation (PUFA or MUFA), were located in the positive area of the PC1, in which the volatile compounds had the highest loadings. These results are in good agreement would support that volatility increases with insaturation level of fat and contributing to the release of the studied volatile compounds.

## **CONCLUSIONS**

Variations in the lipid content, from ~ 4% to ~ 15%, of the experimental fermented sausages did not significantly influence the dynamic of retention-release of most volatile compounds suggesting that other factors likely related to the drying-curing of sausages process would have masked the retention effect of lipid content on volatile compounds release. However, a clear effect of lipid composition on volatile compounds release was observed, increasing this phenomenon with the unsaturation level of the lipid source used in the manufactured of the fermented sausages. Further studies in real dry-cured meat products could shed light on the effect of lipid characteristics on flavour release and perception.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Verónica Fuentes is thankful to the “Ministerio de Educación, Cultura y Deporte” for the FPI grant. This study was supported by the “Ministerio de Economía y Competitividad” project entitled: “Estudio sensorial e instrumental de la liberación de compuestos olor-activos en jamón Ibérico loncheado: efecto del contenido y características de la grasa”. (Project AGL2007-65923-C02-01).

## REFERENCES

- AOAC Official Methods of Analysis (17th ed.) Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburgh, Maryland (2000).
- Astiasaran, I., Villanueva, R., & Bello, J. (1990). Analysis of Proteolysis and Protein Insolubility during the Manufacture of Some Varieties of Dry Sausages. *Meat Science*, 28, 111-117.
- Buttery, R. G., Guadagni, D. G., & Ling, L. C. (1973). Flavor Compounds: Volatilities in Vegetable Oil and Oil-Water Mixtures. Estimation of Odor Thresholds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 21(2), 198-201.
- Calkins, C. R., & Hodgen, J. M. (2007). A fresh look at meat flavour. *Meat Science*, 77, 63–80.
- Carrapiso, A. I., Jurado, A., Timón, M. L., & García, C. (2002). Odor-active compounds of Iberian hams with different aroma characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6453–6458.
- Carrapiso, A. I. (2007). Effect of fat content on flavour release from sausages. *Food Chemistry*, 103, 396-403.
- Cava, R., Ruiz, J., Ventanas, J., & Antequera, T. (1999). Oxidative and lipolytic changes during ripening of Iberian hams as affected by feeding regime: extensive feeding and alpha-tocopheryl acetate supplementation. *Meat Science*, 52, 165-172.
- Charles, M., Rosselin, V., Beck, L., Sauvageot, F., & Guichard, E. (2000). Flavor release from salad dressings: Sensory and physicochemical approaches in relation with the structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1810-1816.
- Chevance, F. F. V., & Farmer, L. J. (1999). Release of volatile odor compounds from full-fat and reduced-fat frankfurters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 5161–5168.

- Chevance, F. F., Farmer, L. J., Desmond, E. M., Novelli, E., Troy, D. J., & Chizzolini, R. (2000). Effect of some fat replacers on the release of volatile aroma compounds from low-fat meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3476–3484.
- De Roos, K. B. (1997). How lipids influence food flavour. The chemistry of flavour interactions. *Food Technology*, 51(1), 60–62.
- Doyen, K., Carey, M., Linforth, R. S. T., Marin, M., & Taylor, A. J. (2001). Volatile Release from an Emulsion: Headspace and In-Mouth Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 804-810.
- Dubois, C., Sergent, M., & Voilley, A. (1996). Flavoring of complex media: a model cheese example. In R. McGorin, & J. Leland, (Eds.), *Flavor-food Interactions* (pp. 217-226). American Chemical Society: Washington, DC.
- Fabre, M., Relkin, P., & Guichard, E. (2005). Flavour Release from Food Emulsions Containing Different Fats. In F. Shahidi, & H. Weenen (Eds.), *Food Lipids* (pp. 61-72). ACS: American Chemical Society.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226, 497–509.
- Feiner, G. (2006). Meat products handbook. Woodhead Publishing: Cambridge.
- Guichard, E. (2002). Interactions between flavor compounds and food ingredients and their influence on flavor perception. *Food Reviews International*, 18(1), 49–70.
- Guichard, E., Tromelin, A., Juteau, A., Rega, B., & Roudnitzky, N. (2002). Physical and chemical interactions in several flavour compounds/food matrix systems. En *Flavour Research at the dawn of the Twenty-first Century* (pp. 15-20). 10th Weurman flavour research symposium; Le Quéré, J. L., Etiévant, P. X., Eds.; Lavoisier: Paris, Beaune, France.
- Harvey, B., Druaux, C., & Voilley, A. (1995). Effect of protein on the retention and transfer of aroma compounds at the lipid-water interface. In E. Dickinson, & D. Lorient (Eds.), *Food Macromolecules and Colloids* (pp 154-163). The Royal Society of Chemistry: Cambridge, U.K.
- Hort, J., & Cook, D. (2007). Formulating low-fat food: The challenge of retaining flavour quality. In A. Taylor, & J. Hort (Eds.), *Modifying flavour in food* (pp. 131–143). Cambridge, England: Woodhead Publishing in Food Science, Technology and Nutrition.
- International Organization for Standardization (ISO) 937:1978. *Meat and meat products. Determination of nitrogen content (Reference method)*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

- Jiménez-Colmenero, F. (1996). Technologies for developing low-fat meat products. *Trends in Food Science & Technology*, 7, 41-48.
- Mottram, D. S. (1998). Flavour formation in meat and meat products: A review. *Food Chemistry*, 62, 415–424.
- Relkin, P., Fabre, M., & Guichard, E. (2004). Effect of Fat Nature and Aroma Compound Hydrophobicity on Flavor Release from Complex Food Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6257-6263.
- Rey, A., López-Bote, C., & Sanz Arias, R. (1997). Effect of extensive feeding on  $\alpha$ -tocopherol concentration and oxidative stability of muscle microsomes from Iberian pigs. *Animal Science*, 65, 515-520.
- Roberts, D. D., & Pollien, P. (2000). Relative influence of milk components on flavor compound volatility. In D. D. Roberts, & A. Taylor (Eds.), *Flavor Release* (pp 321-332). American Chemical Society: Washington DC.
- Roberts, D. D., Pollien, P., & Watzke, B. (2003). Experimental and Modeling Studies Showing the Effect of Lipid Type and Level on Flavor Release from Milk-Based Liquid Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 189-195.
- Roudnitzky, N. Roudaut, G., & Guichard, E. (2003). Effect of composition of triglycerides on flavour release: application to commercial fats. In *Chemistry flavor and texture of lipid containing foods*; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC.
- Sandler, S. R., & Karo, W. (1992). *Source book of advances organic laboratory preparations*. San Diego: Academic Press.
- Taylor, A. (1998). Physical chemistry of flavour. *International Journal of Food Science and Technology*, 33, 53–62.
- van Ruth, S. M., de Vries, G., Geary M., & Giannouli, P. (2002). Influence of composition and structure of oil-in-water emulsions on retention of aroma compounds. *Journal of the Science of food and Agriculture*, 82, 1028-1035.
- Ventanas, S., Ventanas, J., Ruiz, J., & Estévez, M. (2005). Iberian pigs for the development of high-quality cured products. In S. G. Pandalai (Ed.), *Recent Research Developments in Agricultural and Food Chemistry* (pp. 27–53). Trivandrum, India: Research Signpost
- Ventanas, S., Ventanas, J., Tovar, J., García, C., & Estévez, M. (2007). Extensive feeding versus oleic acid and tocopherol enriched mixed diets for the production of Iberian dry-cured hams: Effect on chemical composition, oxidative status and sensory traits. *Meat Science*, 77, 246-256.

## **CAPÍTULO IV.**

**Estatus:** enviado a *Food Chemistry*, 26 de Marzo de 2013.

### **Impact of lipid content and composition on lipid oxidation and protein carbonylation in experimental fermented sausages**

Verónica Fuentes, Mario Estévez, Jesús Ventanas and Sonia Ventanas\*.

Department of Animal Production and Food Science. Faculty of Veterinary Sciences.

University of Extremadura. Cáceres, Spain.

\*Corresponding author: Sonia Ventanas, email: [sanveca@unex.es](mailto:sanveca@unex.es)

## **Abstract**

This study was devoted to investigate the effect of lipid content (~ 4%, ~ 10% and ~ 15%) and composition on the oxidative stability of proteins and lipids in experimental fermented sausages. Experimental sausages with different fatty acid composition were produced by adding different lipid sources (animal fat and sunflower oil). Modifying lipid content had a significant impact on both lipid oxidation and protein carbonylation. Using different lipid sources for the manufacture of fermented sausages led to products with different susceptibility to lipid and protein oxidation. While the fatty acid profile had a major effect on the occurrence and extent of lipid oxidation, the presence of compounds with potential antioxidant activity may be more influential on the extent of protein carbonylation. The usage of sunflower oil for the manufacture of fermented sausages may be a good strategy to control protein oxidation although the hexanal counts are significantly higher than in products elaborated with back-fat.

## **Keywords**

Fermented sausages, AAS, GGS, Lipid oxidation, Lipid content, Sunflower oil.

## INTRODUCTION

Many sensory traits of fermented and dry-cured meat products depend on the content and composition of muscle lipids including those affected by the onset of oxidative reactions (Gandemer, 2002). Lipid oxidation is responsible for rancidity which is considered unpleasant for consumers (Jeremiah, 2001). Several authors have found a connection between lipid oxidation and fat content in pork (Estévez, Morcuende, & Cava, 2003), liver pâtés (Estévez, Ventanas, & Cava, 2005) and dry-cured loins (Ventanas, Estévez, Andrés, & Ruiz, 2008). Moreover, lipid oxidation is primarily initiated in the highly unsaturated fatty acids components of membrane phospholipids (Mercier, Gatellier, Vincent, & Renerre, 2001) and thus increasing the degree of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in meat products leads to a higher susceptibility to undergo lipid oxidation (Gandemer, 2002). Lipid oxidation is regarded as one of the main causes for functional, sensory and nutritional quality deterioration in meat and meat products (Morrissey, Sheehy, Galvin, Kerry, & Buckley, 1998).

Oxidizing lipids are also thought to promote the oxidative damage to proteins through the pro-oxidant activity of primary (hydroperoxides) and secondary (aldehydes, ketones) lipid oxidation products (Kikugawa, Kato, & Hayasaka, 1991). The formation of carbonyl compounds is one of the most marked changes occurring during the oxidation of proteins (Estévez, 2011). The quantification of the total protein carbonyls using the 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) method is routinely used for the assessment of protein oxidation in muscle foods (Ventanas, Estévez, Tejeda, & Ruiz, 2006). The DNPH method has, however, considerable limitations since it measures the total amount of a variety of carbonyl derivatives formed through unspecific pathways during the oxidative process (Estévez, 2011). Estévez, Ollilainen, and Heinonen (2009) developed a method to detect particular protein carbonyls in food proteins namely,  $\alpha$ -amino adipic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes (AAS and GGS, respectively) using liquid-chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry (LC-ESI-MS). Several studies have employed this HPLC technique to assess protein oxidation in dry-cured hams (Fuentes, Ventanas, Morcuende, Estévez, & Ventanas, 2010), porcine patties (Utrera, Morcuende,

Rodríguez-Carpena, & Estévez, 2011), and other different meat products (Armenteros, Heinonen, Ollilainen, Toldrá, & Estévez, 2009). Protein carbonylation involves the irreversible loss of essential amino acids (i.e. lysine) and is implicated in the loss of functionality of myofibrillar proteins and the modification of colour and texture of meat products (Fuentes et al., 2010; Utrera, Armenteros, Ventanas, Solano, & Estévez, 2012). Whereas the study of the interactions between oxidizing lipids and proteins has been covered before, the application of the DNPH method provided limited insight on precise oxidation mechanisms (Estévez, 2011). On the contrary, the analysis of specific protein carbonyls has enabled the understanding of the mechanisms involved in the oxidative damage to proteins during meat processing (Ganhão, Morcuende, & Estévez, 2010; Utrera et al., 2012). To our knowledge, the influence of lipid content and composition on the formation of specific protein carbonyls in processed meat products has not been studied before.

The aim of this research was to study the impact of lipid content and lipid source on the oxidative stability of lipids and proteins in experimental fermented sausages. The effect of lipid content was studied by varying the level of fat (~ 4%, ~ 10% and ~ 15%) while the effect of lipid composition was assessed by adding different lipid sources, namely back-fats from Iberian pigs with different feeding background, commercial lard and sunflower oil.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Manufacture of fermented sausages**

Formulation of experimental fermented sausages is reported in **Table 1**. Manufacture of sausages was run as follows: first, commercial lean pork was cleaned from external fat, chopped, minced and mixed in a vacuum cutter for 2 min. Subsequently the fat, sodium chloride and the additives were mixed for 2.5 min and finally the glucono-delta-lactone (GDL) was added. Three types of sausages with increasing lipid content were manufactured using back-fat from Iberian pigs fed extensively on acorns and pasture [~ 4%, ~ 10% and ~ 15%]. Moreover, four types of sausages varying in the lipid composition were



manufactured using animal fat [back-fat from Iberian pigs fed extensively on acorn and grass -MF; back-fat from Iberian pigs fed on a concentrate -CF; and commercial lard -LF] and vegetable fat [sunflower oil -SOF]. These sausages were manufactured in order to obtain about 15 % lipid content after the ripening process.

Finally, the batter was vacuum-packaged to remove air bubbles and stuffed into 6 cm diameter artificial collagen casings and the ripening of the experimental sausages was carried out in drying chambers for 15 days, the relative humidity ranging from 95 % to 75 % and the temperature from 22 °C to 12 °C. At the end of the ripening process the weight losses of the fermented sausages was 35 % in average. The ripening process was fixed following the protocols developed for meat products containing GDL (Feiner, 2006).

### **Chemical composition of fermented sausages**

Lipid content was determined by the Folch method (Folch, Lees, & Sloane Stanley, 1957), protein content by the Kjeldahl method (ISO, 937:1978) and moisture was determined by an AOAC method (AOAC, 2000). Twelve repetitions were performed per type of fermented sausage.

Fatty acid methyl esters (FAMES) were prepared by acidic transesterification in the presence of sulphuric acid (5 % sulphuric acid in methanol) (Sandler & Karo, 1992). FAMES were analysed by gas chromatography using a Hewlett-Packard HP-5890A gas chromatograph, equipped with an on-column injector and a flame ionization detector, using a polyethyleneglycol capillary column (Supelcowax-10, Supelco, Bellefonte, PA) (60 m × 0.32 mm i.d. × 0.25 µm film thickness). Gas chromatograph oven program temperature was as follows: initial temperature of 190 °C, 2 °C/min to 235 °C; 15 min at this temperature and thereafter 6 °C/min to 250 °C, and then kept for an additional 20 min. Injector and detector temperatures were 250 °C. Carrier gas was helium at a flow rate of 0.8 ml/min. Individual FAME peaks were identified by comparison of their retention times with those of standards (Sigma, St. Louis, MO). Tridecanoic acid was used as internal standard. Eight repetitions were performed per type of fermented sausage and results are expressed as percentage of the total fatty acids analysed.

## Lipid oxidation measurements

Lipid oxidation was evaluated by assessing the formation of hexanal by static headspace analysis (Ventanas et al., 2006) and also by monitoring malondialdehyde (MDA) formation by means of TBARS (Salih, Smith, Price, & Dawson, 1987). Hexanal concentration was quantified by headspace-SPME and GC/MS. A gas chromatograph Hewlett–Packard 5890 serie II coupled to a mass selective detector (Hewlett–Packard HP-5791 A). One gram of minced sample was weighed into a 4 ml vial. All vials were closed with a teflon/silicone septum. An SPME fibre (50/30  $\mu\text{m}$  divinylbenzene-carboxen-polydimethylsiloxane coating) was inserted through the septum and exposed to the headspace of the vial. Vials were pre-conditioned for 15 min at 37 °C. Extraction was carried out at 37 °C for 5 min in a water bath. After extraction, the SPME fibre was immediately transferred to the injector of the chromatograph, which was in the splitless mode at 270 °C. The separation of the volatile compounds was performed on a 5 % phenyl–methyl silicone (HP-5) bonded phase fused silica capillary column (Hewlett– Packard, 50 m x 0.32 mm i.d, film thickness 1.05  $\mu\text{m}$ ), operating at 6 psi of column head pressure. Oven programme was: 45 °C for 10 min, 10 °C  $\text{min}^{-1}$  to 200 °C, 15 °C  $\text{min}^{-1}$  to 250 °C, and held 250 °C for 10 min. The transfer line to the mass spectrometer was maintained at 270 °C. The mass spectra were obtained using a mass selective detector by electronic impact at 70 eV, a multiplier voltage of 1756 V and collecting data at a rate of 1 scan  $\text{s}^{-1}$  over the m/z range 30–500. Hexanal was identified by comparing their mass spectrum and linear retention index with that of the standard. Results are given in area units (AU). Five repetitions per type of sausage were performed.

TBARS were assessed following the method developed by Salih et al., (1987). The product (2.5 g) was dispensed in cone plastic tubes and homogenised with 7.5 ml of perchloric acid (3.86 %) and 0.25 ml of BHT (4.2 % in ethanol). During homogenisation, the plastic tubes were immersed in an ice bath to minimise the development of oxidative reactions during extraction of TBARS. The slurry was filtered and centrifuged (67 g for 5 min) and 2 ml aliquots were mixed with 2 ml thiobarbituric acid (0.02 M) in test tubes. The test tubes were placed in a hot water bath (90 °C) for 30 min together with the tubes from the standard curve.

After cooling, the absorbance was measured at 532 nm. The standard curve was prepared using a 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP) solution (0.2268 g) in 3.86 % perchloric acid.

### **Protein oxidation measurements**

The total carbonyls content was evaluated by derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) according to the method described by Ganhão et al., (2010). Protein concentration was calculated by spectrophotometry, using BSA as standard. The protein oxidation markers,  $\alpha$ -amino adipic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes (AAS and GGS, respectively) were analysed using the method described by Utrera et al. (2011) upon derivatization with *p*-amino benzoic acid (ABA) and analysis by HPLC. Standard AAS and GGS were synthesised in vitro from N-acetyl-L-lysine and N-acetyl-L-ornithine using lysyl oxidase activity from egg shell membrane as described by Estévez et al. (2009). A Shimadzu 'Prominence' HPLC apparatus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), equipped with a quaternary solvent delivery system (LC-20AD), a DGU-20AS on-line degasser, a SIL-20A auto-sampler, a RF-10A XL fluorescence detector, and a CBM-20A system controller, was used. An aliquot (1  $\mu$ l) from the reconstituted protein hydrolysates was injected and analyzed in the above mentioned HPLC equipment. AAS-ABA and GGS-ABA were eluted in a Cosmosil 5C18-AR-II RP-HPLC column (5  $\mu$ m, 150 x 4.6 mm) equipped with a guard column (10 x 4.6 mm) packed with the same material. The flow rate was kept at 1 ml/min and the temperature of the column was maintained constant at 30 °C. The eluate was monitored with excitation and emission wavelengths set at 283 and 350 nm, respectively. Standards (0.1  $\mu$ l) were run and analyzed under the same conditions. Identification of both derivatized semialdehydes in the FLD chromatograms was carried out by comparing their retention times with those from the standard compounds. The peaks corresponding to AAS-ABA and GGS-ABA were manually integrated from FLD chromatograms and the resulting areas plotted against an ABA standard curve with known concentrations that ranged from 0.1 to 0.5 mM. Results are expressed as nmol of carbonyl compound per mg of protein.

## Statistics analysis

Data from proximate composition, fatty acid composition and headspace measurements were analysed by a one-way ANOVA (GLM procedure) using lipid content (~ 4%, ~ 10% and ~ 15%) or lipid composition (MF, CF, LF and SOF) as main effects, with the detected differences being tested by the Tukey post-hoc test. The Tukey test was used when the ANOVA showed a significant effect. SPSS software (v 15.0) for windows was used for all statistic analyses. Moreover, Pearson correlation coefficients were calculated to analyse the relationships among variables.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Characterization of experimental sausages

The chemical composition of fermented sausages elaborated with different lipid content was as follows: (means  $\pm$  sd) lipid content (3.90 %  $\pm$  0.91, 9.85 %  $\pm$  0.60 and 14.56 %  $\pm$  1.59;  $p < 0.001$ ), protein content (39.25 %  $\pm$  1.39 for sausages with ~ 4% lipid content, 35.54 %  $\pm$  1.51 for sausages with ~ 10% lipid content and 31.52 %  $\pm$  0.82 for sausages with ~ 15% lipid content;  $p < 0.001$ ) and moisture content (51.50 %  $\pm$  0.70, 48.21 %  $\pm$  0.91 and 50.77 %  $\pm$  0.25, respectively for ~ 4%, ~ 10% and ~ 15% lipid content sausages;  $p < 0.001$ ). The chemical composition was in good agreement with the formulation applied to each type of sausage (**Table 1**). All chemical parameters were significantly affected by lipid content, with both moisture and protein content decreasing with lipid content. Significant differences were found in the fatty acid composition of sausages with different lipid content ( $p < 0.001$ ). Sausages containing ~ 10% and ~ 15% lipid content had significantly higher percentages of monounsaturated fatty acids (MUFA) and lower of saturated fatty acids (SFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA) than those with ~ 4% lipid content (**Table 1**). Lean pork contains more phospholipids and PUFA than back-fat while the latter is rich in triglycerides and thus in MUFA, particularly in oleic acid (Cava, Ruiz, López-Bote, Martín, García, Ventanas, & Antequera, 1997). Therefore, the incorporation level of back-fat in the experimental sausages explains the higher

proportion of MUFA in ~ 10% and ~1 5% lipid content sausages compared to ~ 4% lipid content ones.

**Table 1.** Formulation (%) and fatty acid profile (means  $\pm$  standard deviation) of fermented sausages with different lipid content and various lipid sources MF (back-fat from Iberian pigs fed on acorns and grass), CF (back-fat from Iberian pigs fed on concentrate), LF (commercial lard) and SOF (sunflower oil). Results are expressed in %.

	LIPID CONTENT			LIPID SOURCE					
	~4%	~10%	~15%	MF	CF	LF	SOF		
Lean pork	96.84	92.93	88.11	88.11	88.11	89.00	89.00		
Animal fat/vegetable fat	0.00	3.90	8.73	8.73	8.73	7.83	7.83		
Sodium chloride	2.10	2.10	2.10	2.10	2.10	2.10	2.10		
<i>Additives</i>									
Glucono-delta-lactone	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00		
Sodium nitrite	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015		
Ascorbic acid	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05		
	<i>p</i>							<i>p</i>	
$\Sigma$ SFA	42.91 $\pm$ 0.85 <sup>a</sup>	38.27 $\pm$ 0.64 <sup>c</sup>	41.43 $\pm$ 0.51 <sup>b</sup>	***	41.43 $\pm$ 0.51 <sup>b</sup>	47.66 $\pm$ 1.77 <sup>a</sup>	47.22 $\pm$ 1.07 <sup>a</sup>	22.40 $\pm$ 1.98 <sup>c</sup>	***
$\Sigma$ MUFA	43.03 $\pm$ 0.68 <sup>b</sup>	48.78 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>	49.07 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>	***	49.07 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>	45.13 $\pm$ 1.68 <sup>b</sup>	42.13 $\pm$ 1.11 <sup>c</sup>	29.76 $\pm$ 2.70 <sup>d</sup>	***
$\Sigma$ PUFA	12.70 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	11.59 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	8.56 $\pm$ 0.16 <sup>c</sup>	***	8.56 $\pm$ 0.15 <sup>bc</sup>	6.78 $\pm$ 2.32 <sup>c</sup>	9.92 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup>	46.58 $\pm$ 1.31 <sup>a</sup>	***

SFA: saturated fatty acids, MUFA: monounsaturated fatty acids, PUFA: polyunsaturated fatty acids.

<sup>a-c</sup> Means with different superscript differ significantly at  $p < 0.05$ .

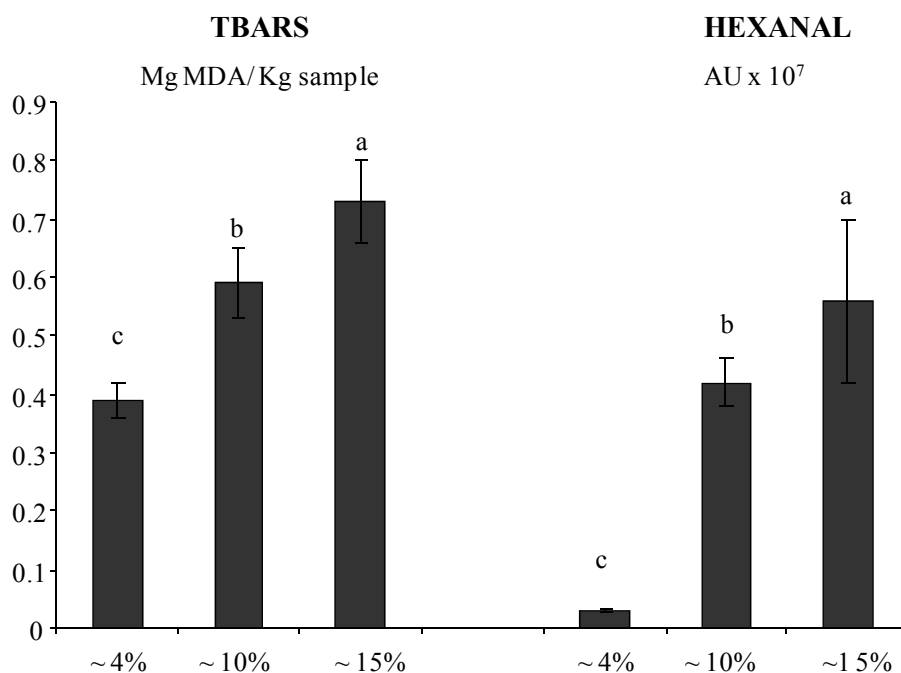
*p*: \*\*\*  $p < 0.001$ .

Sausages elaborated with different lipid sources had a similar ( $p>0.05$ ) lipid (14.50 %  $\pm$  1.26), protein (31.99 %  $\pm$  0.36) and moisture contents (48.39 %  $\pm$  1.40). As expected, these fermented sausages showed significantly different fatty acid profiles ( $p<0.001$ ) (**Table 1**). MF had significantly higher proportion of total MUFA than the other sausages. In contrast, CF and LF samples had significantly higher levels of total SFA compared to MF and SOF. Finally, SOF samples showed a significant higher total PUFA proportion compared to the other sausages. Experimental sausages reflected the fatty acid composition of the lipid sources and animal fats, in turn, reflected the composition of the diets given to the animals. Acorns are rich in MUFA (mainly oleic acid, C18:1) whereas grass is a recognised source of *n*-3 fatty acids (mainly linolenic acid, C18:2) (Rey, Daza, López-Carrasco, & López-Bote, 2006) which explain the higher proportion of MUFA and PUFA found in MF compared to CF. SOF sausages showed the highest proportion of PUFA which was expected since vegetable oils displays a higher ratio unsaturated to saturated fatty acids than animal fats (Liu, Huffman, & Egbert, 1991).

### **Effect of lipid content on lipid oxidation**

TBARS and chromatographic areas of hexanal were measured in fermented sausages with different lipid content as indicators of lipid oxidation (**Figure 1**).

**Figure 1.** TBARS values (mg MDA/Kg sample) and chromatographic areas of hexanal (AU x 10<sup>7</sup>) (means ± standard deviation) assessed in fermented sausages with different lipid content. Different letters on the bars denote significant differences between means at  $p < 0.05$ .



Results showed that lipid oxidation in fermented sausages was significantly affected by lipid content. Increasing the lipid content (from ~ 4% to ~ 15%) enhanced lipid oxidation as both TBARS and hexanal values increased to a significant extent. Particularly, sausages containing ~ 10% and ~ 15% lipids were more prone to suffer lipid oxidation reactions than those with a lower lipid content ( $r = 0.93$ ,  $p < 0.001$  between lipid content and MDA values and  $r = 0.93$ ,  $p < 0.001$  between lipid content and hexanal counts). Accordingly, previous studies have found good correlations between fat content and the level of lipid oxidation in different meat products (Sasaki, Mitsumoto, & Kawabata, 2001; Estévez et al., 2003). Estévez et al. (2005) reported that lipid stability of pâtés was affected by lipid content and Ventanas et al. (2008) observed major volatile compounds derived from lipid oxidation in loins with higher IMF content. It is expected that products with higher lipid content had larger amounts of lipid-

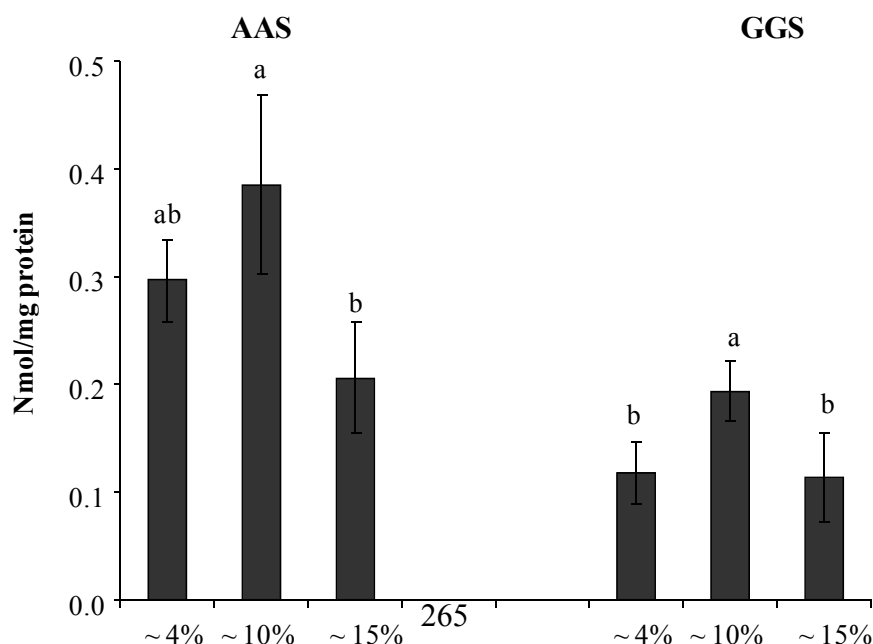


derived oxidation products. In the present study, the variations in fatty acid composition between sausages with different lipid content may also have had an influence. Moreover, Estévez, Kylli, Puolanne, Kivikari, and Heinonen (2008a) observed that myofibrillar proteins had a clear protective role against lipid oxidation as emulsions with the highest amount of myofibrillar proteins showed the lowest lipid oxidation values. Some particular proteins residues (i.e. sulphur-containing) are known to display antioxidant protection against other susceptible protein residues (sacrificial protection) and against lipids (Levine, Berlett, Moskovitz, Mosoni, & Stadtman, 1999; Diaz & Decker, 2004). Therefore, the lower extent of lipid oxidation in sausages containing ~ 4% lipid may be the result of the combination of an increased stability due to a lower lipid content and a potential protective effect of a larger amount of proteins in the product.

### Effect of lipid content on protein carbonylation

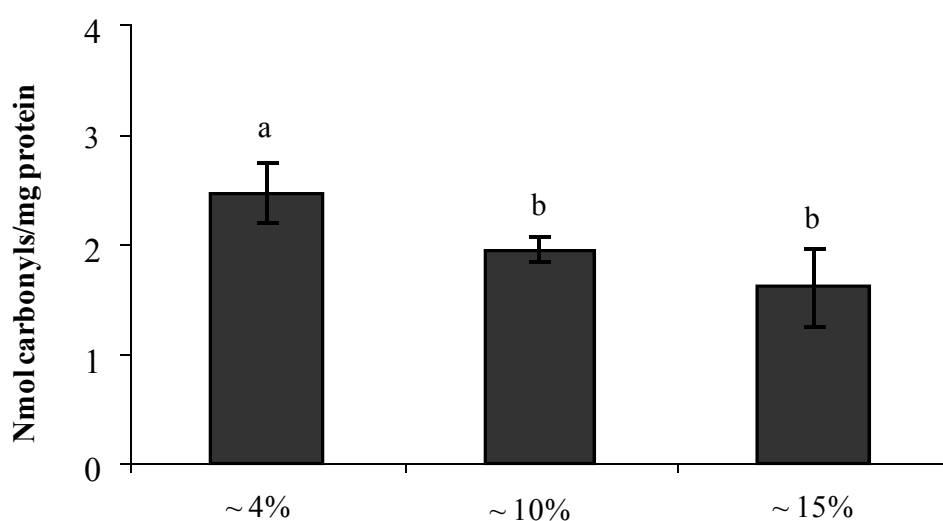
Lipid content had a significant impact on the extent of protein carbonylation as assessed by the amount of AAS and GGS (**Figure 2**). Sausages with an intermediate lipid content (~ 10%) had the highest levels of both AAS and GGS but results derived from AAS carbonyl show no significant differences between sausages containing ~ 10% and ~ 4% lipid (**Figure 2**). Furthermore, higher amounts of AAS were found in all products compared to GGS.

**Figure 2.** Amount of AAS and GGS in fermented sausages with different lipid content. Different letters on the bars denote statistical differences ( $p < 0.05$ ) between means.



However, different results were obtained when protein oxidation was measured using the DNPH method (**Figure 3**).

**Figure 3.** Amount of total protein carbonyls (Nmol carbonyls/mg protein) in fermented sausages with different lipid content (~ 4%, ~ 10% and ~ 15%) using the DNPH method. Different letters on the bars denote statistical differences ( $p < 0.05$ ) between means



These results showed a decrease in total carbonyls content as lipid content increased ( $r = -0.86$ ;  $p < 0.001$ ), and samples with ~ 4% lipid content had the highest level of total carbonyls compared to the rest of samples. Contradictory results were reported by Estévez et al. (2005) in liver pâtés with different fat content since samples with a higher MDA content also showed higher carbonyls measured using the DNPH method. However, in this previous study, liver pâtés showed a similar protein content while in the present study, the protein content of sausages decreased with lipid content ( $r = -0.99$ ;  $p < 0.001$ ) (**section 3.1**). The inconsistent results obtained using both protein oxidation measurements can be caused by the different methodology employed. Protein semialdehydes analysed using HPLC-FLD are specific and reliable indicators of protein oxidation in muscle foods (Armenteros et al., 2009; Estévez et al., 2009). In

contrast, the DNPH method is non-specific since it is limited to provide an estimation of the total protein carbonyls formed by indefinite pathways during the oxidative process and may include, in some cases, lipid-derived carbonyls (Estévez et al., 2008a; Armenteros et al., 2009). Previous studies have also reported lack of consistency between both methods when applied to diverse meat products (Ganhão et al., 2010; Rodríguez-Carpena, Morcuende, & Estévez, 2011; Armenteros et al., 2009).

The mechanisms and reaction pathways for the oxidation of lipids and proteins are different but directly linked as both processes may be affected by similar pro-oxidant and antioxidant factors (Stadtman, & Levine, 2000; Estévez et al., 2008a). The timely interaction between lipid and protein oxidation has been described in food systems (Viljanen, Kylli, Kivikari, & Heinonen, 2004). Correlation between both oxidative phenomena was clearly observed in ~ 10% lipid content. However, in products with ~ 15% lipid content in which the lipid oxidation showed the largest extent, the amount of AAS and GGS was similar to those found in samples with ~ 4% lipid content (**Figure 2**). In general, no significant correlations ( $p>0.05$ ) between lipid (MDA and hexanal) and protein oxidation (AAS and GGS) were found. Once the oxidative reactions commence, the measurable changes indicate that lipid oxidation would progress faster than the oxidative degradation of myofibrillar proteins (Estévez et al., 2008a, Estévez, Morcuende, & Ventanas, 2008b). Furthermore, Estévez et al. (2009) and Estévez and Heinonen (2010) reported that the initial increase of AAS and GGS as a result of the in vitro metal-catalyzed oxidation of myofibrillar proteins was followed by a significant decrease of both compounds. The authors hypothesized whether the apparent net loss of protein carbonyls at prolonged oxidation rates may be caused by the implication of such compounds as reactants in advanced reactions (Estévez, 2011). Therefore, results observed in sausages containing ~ 15% lipid content could be affected by the higher lipid content in these samples. More intense lipid oxidative reactions in this type of samples could have promoted a faster progress in protein oxidative reactions and the involvement of protein carbonyls in further reactions during ripening process of sausages. As reported by Estévez (2011), intense lipid oxidation phenomena would enhance the loss of AAS upon reaction with lipid-derived

products to form Schiff bases and other complex end-products. This phenomenon could explain the lack of a clear and significant correlation between lipid and protein oxidation measurements.

Finally, a larger extent of protein oxidation could have been expected in samples with ~ 4% lipids compared to those containing ~ 10% lipids as the former had a significantly higher protein content. These results are in good agreement with Levine et al., (1999) who reported that peptides and amino acids could act as inhibitors of protein oxidation and therefore, proteins would be able to protect themselves from oxidative damage. The antioxidant properties of proteins are attributed to the cooperative effect of a variety of properties including the ability of aromatic and sulphur-containing amino acids to scavenge free radicals, and the capacity to act as metal-ion chelators (Diaz, & Decker, 2004; Kaul, Sharma, & Mehta, 2008). Furthermore, Saigas, Tanabe, and Nishimura (2003) demonstrated that some peptides from porcine myofibrillar proteins display an antioxidant potential equivalent to that of  $\alpha$ -tocopherol.

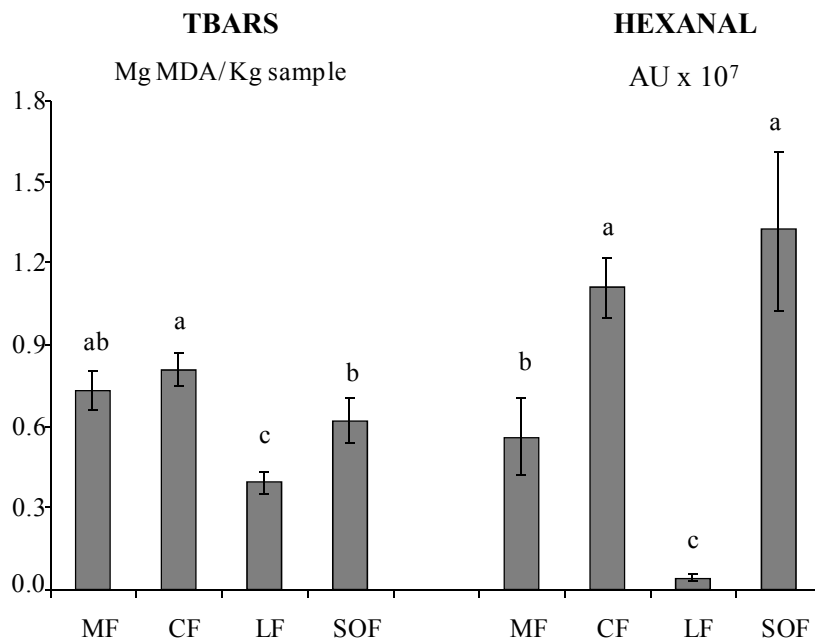
#### **Effect of lipid composition on lipid oxidation**

**Figure 4** shows the results of lipid oxidation measurements (hexanal and TBA) in fermented sausages elaborated with different lipid sources (MF, CF, LF and SOF) and thus varying in fatty acid composition. Lipid source had a significant effect on lipid oxidation ( $p < 0.001$ ) since CF sausages showed significantly higher TBARS values compared to the rest of products, although no significant differences were detected compared to MF counterparts. Sausages elaborated with LF displayed the significantly lowest TBARS values while SOF had intermediate values. Similarly, hexanal results confirmed the great susceptibility of CF sausages to undergo lipid oxidation although no significant differences were found compared to SOF samples which showed the highest hexanal concentration. In agreement with TBARS numbers, sausages elaborated with LF had the significantly lowest hexanal counts. According to Shahidi and Pegg, (1994) hexanal derives from the oxidation of particular PUFA, mainly linoleic acid. The higher PUFA content, the higher the susceptibility of muscle to lipid oxidation (Shahidi & Pegg, 1994) due to the presence of labile double bonds

and this is reflected in the results obtained in the present study. To this regard, a positive and significant correlation between PUFA level and hexanal values was found ( $r= 0.58$ ;  $p<0.001$ ). Results from hexanal and TBARS are partly in disagreement, as the analysis of the latter enabled the detection of significant differences between CF sausages (more prone to lipid oxidation) and the MF counterparts. Moreover, the SOF and CF sausages were the most prone to lipid oxidation according to hexanal results while CF and MF sausages showed the highest values according to TBARS results. The disadvantages of using TBARS as an index of lipid oxidation in dry-cured products have been previously reported by Ventanas et al., (2006). TBARS increase during the first stages of processing of Iberian dry-cured ham (salting/post-salting) and decrease at the final stages (drying) (Andrés, Cava, Ventanas, Muriel, & Ruiz, 2004). Moreover, as a consequence of the presence of residual nitrite in cured-products, MDA could undergo nitrosation reactions making all or part of the MDA unreactive for TBARS determination, leading to TBA numbers lower than expected (Kolodziejaska, Skonieczny, & Rubin, 1990). In addition, MDA is known to interact with proteins through the formation of covalent linkages via Schiff base formation (Estévez, 2011). However, agreeing with TBARS results from the present study, some authors have reported significantly lower amounts of lipid oxidation products in dry-cured sausages (Muguerza, Gimeno, Ansorena, Bloukas, & Astiasarán, 2001; Ansorena & Astiasarán, 2004) and burger patties (Rodríguez-Carpena et al., 2012) produced with olive or high-oleic sunflower oil than in their control counterparts. In contrast, results from other studies support that using olive and other vegetable oils for the manufacture of processed muscle foods enhances the oxidative instability of the final product (Kayaardi & Gök, 2003; Choi et al., 2010). Furthermore, a recent study carried out by Rodríguez-Carpena, et al. (2012) reported a large concentration of  $\alpha$ -tocopherol (51.90 mg tocopherol/100 g oil) in the same sunflower oil used for the manufacture of the present SOF sausages. This antioxidant may have contributed to inhibit TBARS numbers but was unable to control the formation of hexanal. In relation to the effect of the added animal-source fats, Ventanas, Ventanas, Tovar, García & Estévez, (2007) reported that muscles from pigs fed extensively had large levels of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherols derived from acorns and grass which enhanced the oxidative stability of such samples. In addition,

Estévez, Ventanas, & Cava, (2007) isolated phenolic compounds from tissues of free-range reared Iberian pigs which can have been accumulated as a result of the intake of natural resources. Therefore, the higher level of antioxidants placed in back-fat from pigs fed on acorns and grass may be the main responsible for lower hexanal levels in MF samples compared to CF counterparts. The lowest lipid oxidation in LF samples could be caused by the presence of BHA (butylated hydroxyanisole; E-320) and citric acid (E-330) in accordance to the formulation of the commercial lard. Synthetic phenolic antioxidants are commonly added to lipid foods to control oxidative reactions (Moure, Cruz, Franco, Domínguez, Sineiro, & Domínguez, 2001).

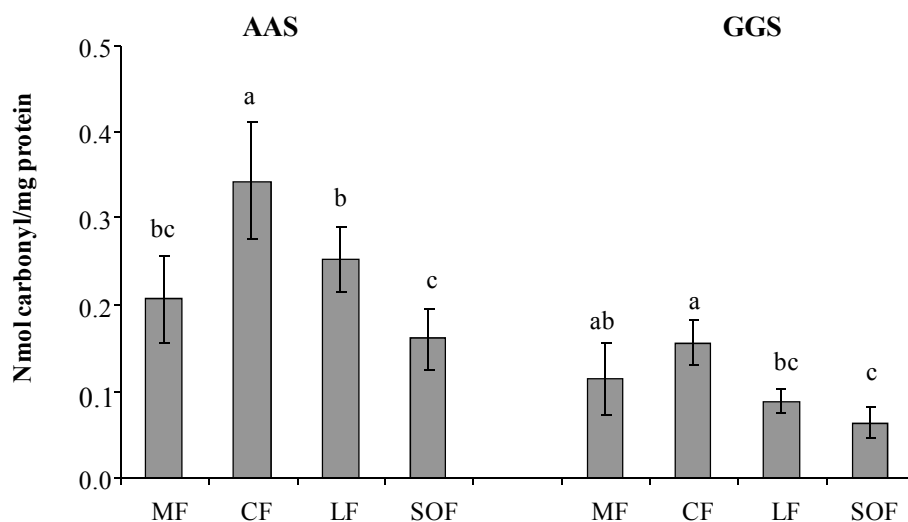
**Figure 4.** TBARS values (mg MDA/Kg sample) and chromatographic areas of hexanal (AU x 10<sup>7</sup>) (means ± standard deviation) assessed in fermented sausages manufactured with different lipid sources: MF (back-fat from Iberian pigs fed on acorns and grass), CF (back-fat from Iberian pigs fed on concentrate), LF (commercial lard) and SOF (sunflower oil). Different letters on the bars denote statistical differences ( $p < 0.05$ ) between means.



## Effect of lipid composition on protein carbonylation

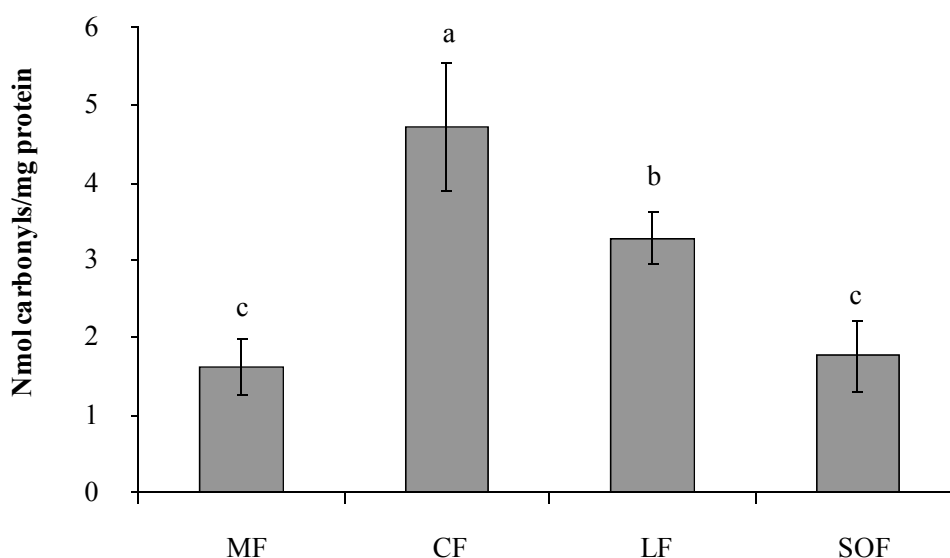
Results (**Figure 5**) revealed that the nature of the lipid used for the manufacture of fermented sausages significantly affected the formation of AAS and GGS with the CF samples showing the highest ( $p < 0.001$ ) amount of these protein carbonyls. Moreover, SOF samples showed the lowest values for these carbonyls compounds. Finally, all experimental sausages showed higher amount of AAS than that of GGS.

**Figure 5.** Amount of AAS and GGS in fermented sausages manufactured with different lipid sources: MF (back-fat from Iberian pigs fed on acorns and grass), CF (back-fat from Iberian pigs fed on concentrate), LF (commercial lard) and SOF (sunflower oil). Different letters on the bars denote statistical differences ( $p < 0.05$ ) between means



The results obtained using the DNPH method also showed a higher amount of total carbonyls in CF samples and the lowest amount of total carbonyls in the MF and SOF counterparts (**Figure 6**).

**Figure 6.** Amount of total protein carbonyls (Nmol carbonyls/mg protein) in fermented sausages manufactured with different lipid sources: MF (back-fat from Iberian pigs fed on acorns and grass), CF (back-fat from Iberian pigs fed on concentrate), LF (commercial lard) and SOF (sunflower oil) by the DNPH method. Different letters on the bars denote statistical differences ( $p < 0.05$ ) between means



Similarly to the results regarding the effect of lipid content and previously reported, the sum of AAS and GGS detected in the fermented sausages was lower than the total amount of protein carbonyls analysed using the DNPH method. The DNPH can also be attached to lipid-derived carbonyls, such as MDA, leading to an overestimation of the total amount of protein carbonyls (Estévez, 2011). According to previous scientific evidences, both carbonyls may account for up to the 70 % of the total amount of protein carbonyls as analyzed by the DNPH method (Utrera et al., 2011). The formation of AAS and GGS from myofibrillar proteins involves the oxidative deamination of the original amino acids, namely lysine, proline and arginine, in the presence of ROS and transition metals such as iron (Estévez et al., 2009).

Whereas oxidizing lipids and proteins are known to interact in complex food systems, the influence of lipid content and composition on the stability of meat proteins in a fermented product was, up to now, unknown. As for lipid oxidation, the clear influence of the lipid composition on protein carbonylation



may theoretically respond to a combined effect of the fatty acid composition and the presence in such fats and oils of compounds with antioxidant activity. A more intense lipid oxidation phenomenon may lead to a more intense protein oxidation as lipid radicals and other early lipid oxidation products could initiate the oxidative degradation of particular amino acid residues (Estévez, 2011). In the present study, however, such connection was not observed. The intense hexanal formation occurred in SOF samples and ascribed to the large proportion of PUFA is not in line with the low protein oxidation markers found in these sausages. The present results suggest that other factors linked to the lipid composition, such as the presence of antioxidant compounds, played a more influential role on protein carbonylation. Previous studies have reported the effectiveness of  $\alpha$ -tocopherol and carotenoids as inhibitors of protein oxidation in muscle foods (Estévez, 2011). On the contrary, the modification of the fatty acid composition of the meat through dietary means has a negligible impact on meat protein oxidation (Estévez, 2011). Santé-Lhoutellier, Engel, Aubry, and Gatellier, (2008) found a negative correlation between protein carbonylation in lamb meat and vitamin E level showing a protective effect of vitamin E against protein oxidation. Estévez, Ventanas, and Cava, (2006) also found a protective effect of synthetic antioxidants such as BHT on proteins from processed meat products. Agreeing with these results, in the present study, the likely presence of antioxidants in SOF, MF and LF sausages as previously reported would explain the higher stability against protein oxidation in these products compared to the CF counterparts. A similar effect was observed by Estévez and Cava, (2004) in meat emulsions (liver pâté) manufactured with tissues from Iberian pigs fed on pasture and acorns compared to those elaborated with tissues from pigs fed on concentrates. In line with the present results, tocopherols and a wide range of phenolic compounds have been found to inhibit the formation of AAS and GGS in myofibrillar proteins oxidized in vitro (Estévez & Heinonen, 2010). Consequently, the high concentration of tocopherols in the vegetable oil would explain the lower extent of protein carbonylation in SOF samples. The benefits of this potential antioxidant effect on proteins may include nutritional aspects (protection against loss of essential amino acids). However, compared to lipid oxidation results, the higher content of PUFA in SOF samples (**Table 1**) would have limited the protective effect of  $\alpha$ -tocopherol against lipid oxidation

phenomenon measured as hexanal content (**Figure 4**). As a result, it is worth-noting that the impact of the composition of the lipid fraction of a meat product in terms of fatty acid composition and antioxidant compounds is different on lipids and proteins, highlighting the different mechanism involved in both lipid and protein oxidation phenomena.

## **CONCLUSIONS**

Lipid content and lipid source had a marked influence on lipid and protein oxidation although both phenomena seemed not to be governed by similar mechanisms. Fatty acid composition and presence of antioxidant compounds had a marked influence on the oxidative stability of lipids while proteins seemed not to be particularly affected by the fatty acid composition of the samples. Taking into consideration the relevant consequences of both, lipid and protein oxidation, the amount and characteristics of the fat added to a meat product should be carefully considered to enhance its nutritional and sensory quality. Since lipids and proteins respond different to modification in the lipid fraction, further studies should focus on novel formulation strategies aimed to minimize both lipid and protein oxidation in processed meat products.

## **ACKNOWLEDGEMENT**

Verónica Fuentes is thankful to the “Ministerio de Educación, Cultura y Deporte” for the FPI grant. This study was supported by the “Ministerio de Economía y Competitividad” project entitled: “Estudio sensorial e instrumental de la liberación de compuestos olor-activos en jamón ibérico loncheado: efecto del contenido y características de la grasa. (Project AGL2007-65923-C02-01). Mario Estévez thanks the Spanish Ministry of Science and Innovation for the contract through the “Ramón y Cajal (RYC-2009-03901)” program and the European Community (Research Executive Agency) for the Marie Curie Reintegration Fellowship (PERG05-GA-2009-248959; Pox-MEAT).

## REFERENCES

- Andrés, A. I., Cava, R., Ventanas, J., Muriel, E., & Ruiz, J. (2004). Lipid oxidative changes throughout the ripening of dry-cured Iberian hams with different salt contents and processing conditions. *Food Chemistry*, *84*, 375–381.
- Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2004). The use of linseed oil improves nutritional quality of the lipid fraction of dry-fermented sausages. *Food Chemistry*, *87*, 69-74.
- AOAC (2000). In *Official methods of analysis* (17th ed.). Gaithersburgh, Maryland: Association of Official Analytical Chemists.
- Armenteros, M., Heinonen, M., Ollilainen, V., Toldrá, F., & Estévez, M. (2009). Analysis of protein carbonyls in meat products by using the DNPH-method, fluorescence spectroscopy and liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry (LC–ESI-MS). *Meat Science*, *83*, 104–112.
- Cava, R., Ruiz, J., López-Bote, C., Martín, L., García, C., Ventanas, J., & Antequera, T. (1997). Influence of Finishing Diet on Fatty Acid Profiles of Intramuscular Lipids, Triglycerides and Phospholipids in Muscles of the Iberian Pig. *Meat Science*, *45*, 263-270.
- Choi, Y. S., Choi, J. H., Han, D. J., Kim, H. Y., Lee, M. A., Jeong, J. Y., et al. (2010). Effects of replacing pork back-fat with vegetable oils and rice bran fiber on the quality of reduced-fat frankfurters. *Meat Science*, *84*, 557–563.
- Diaz, M., & Decker, E. A. (2004). Antioxidant mechanisms of caseinophosphopeptides and casein hydrolysates and their application in ground beef. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 8208–8213.
- Estévez, M., Morcuende, D., & Cava, R. (2003). Oxidative and colour changes in meat from free-range reared Iberian pigs slaughtered at 90 kg live-weight and commercial pig under refrigerated storage. *Meat Science*, *65*, 1139–1146.
- Estévez, M., & Cava, R. (2004). Lipid and protein oxidation, release of iron from heme molecule and colour deterioration during refrigerated storage of liver pâté. *Meat Science*, *68*, 551-558.
- Estévez, M., Ventanas, V., & Cava, R. (2005). Physicochemical properties and oxidative stability of liver pâté as affected by fat content. *Food Chemistry*, *92*, 449-457.
- Estévez, M., Ventanas, V., & Cava, R. (2006). Effect of natural and synthetic antioxidants on protein oxidation and colour and texture changes in refrigerated stored porcine liver pâté. *Meat Science*, *74*, 396-403.

- Estévez, M., Ventanas, S., & Cava, R. (2007). Oxidation of lipids and proteins in frankfurters with different fatty acid compositions and tocopherol and phenolic contents. *Food Chemistry*, *100*, 55-63.
- Estévez, M., Killy, P., Puolanne, E., Kivikari, R., & Heinonen, M. (2008a). Fluorescence spectroscopy as a novel approach for the assessment of myofibrillar protein oxidation in oil-in-water emulsions. *Meat Science*, *80*, 1290–1296.
- Estévez, M., Morcuende, D., & Ventanas, S. (2008b). Determination of oxidation. In L.M. L. Mollet, & F. Toldrá (Eds.), *Handbook of processed meat and poultry analysis* (pp. 141–162). Boca Raton FL, USA: CRC Press.
- Estévez, M., Ollilainen, V., & Heinonen, M. (2009). Analysis of protein oxidation markers  $\alpha$ -amino adipic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes – In food proteins by using LC–ESI–Multi-Stage Tandem MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(9), 3901-3910.
- Estévez, M., & Heinonen, M. (2010). Effect of phenolic compounds on the formation of  $\alpha$ -amino adipic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes from myofibrillar proteins oxidized by copper, iron and myoglobin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 4448–4455.
- Estévez, M. (2011). Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat Science*, *89*, 259-279.
- Feiner, G. (2006). *Meat products handbook*. Woodhead Publishing: Cambridge.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, *226*, 497–509.
- Fuentes, V., Ventanas, J., Morcuende, D., Estévez, M., & Ventanas, S. (2010). Lipid and protein oxidation and sensory properties of vacuum-packaged dry-cured ham subjected to high hydrostatic pressure. *Meat Science*, *85*, 506–514.
- Gandemer, G (2002). Lipids in muscles and adipose tissues, changes during processing and sensory properties of meat products. *Meat Science*, *62*, 309-321.
- Ganhão, R., Morcuende, D., & Estévez, M. (2010). Protein oxidation in emulsified cooked burger patties with added fruit extracts: Influence on colour and texture deterioration during chill storage. *Meat Science*, *85*, 402-409.
- ISO 937:1978. Meat and meat products. Determination of nitrogen content (Reference method). *International Organization for Standardization*, Geneva.
- Jeremiah, L. E. (2001). Packaging alternatives to deliver fresh meat using short- or long-term distribution. *Food Research International*, *34*, 749–772.

- Kaul, S., Sharma, S. S., & Mehta, I. K. (2008). Free radical scavenging potential of L-proline: Evidence from in vitro assays. *Amino Acids*, *34*, 315–320.
- Kayaardi, S., & Gök, V. (2003). Effect of replacing beef fat with olive oil on quality characteristics of Turkish soudjouk (sucuk). *Meat Science*, *66*, 249–257.
- Kikugawa, K., Kato, T., & Hayasaka, A. (1991). Formation of dityrosine and other fluorescent amino acids by reaction of amino acids with lipid hydroperoxides. *Lipids*, *26*, 922–929.
- Kolodziejaska, Y., Skonieczny, S., & Rubin, L. J. (1990). Malonaldehyde–nitrite interactions in meat and model systems. *Journal of Food Science*, *55*, 925–928.
- Levine, R. L., Berlett, B. S., Moskovitz, J., Mosoni, L., & Stadtman, E. R. (1999). Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mechanisms of ageing and development*, *107*, 323–332.
- Liu, M. N., Huffman, D. L., & Egbert, W. R. (1991). Replacement of beef fat with partially hydrogenated plant oil in lean ground beef patties. *Journal of Food Science*, *56*, 861–862.
- Mercier, Y., Gatellier, P., Vincent, A., & Renerre, M. (2001). Lipid and protein oxidation in microsomal fraction from turkeys: influence of dietary fat and vitamin E supplementation. *Meat Science*, *58*, 125–134.
- Morrissey, P. A., Sheehy, P. J. A., Galvin, K., Kerry, J. P., & Buckley, D. J. (1998). Lipid stability in meat and meat products. *Meat Science*, *49*, S73–S86.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Dominguez, J. M., Sineiro, J., Dominguez, H., et al. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, *72*, 145–171.
- Muguerza, E., Gimeno, O., Ansorena, D., Bloukas, J. G., & Astiasarán, I. (2001). Effect of replacing pork backfat with pre-emulsified olive oil on lipid fraction and sensory quality of Chorizo de Pamplona — a traditional Spanish fermented sausage. *Meat Science*, *59*, 251–258.
- Rey, A. I., Daza, A., López-Carrasco, C., & López-Bote, C. J. (2006). Feeding Iberian pigs with acorns and grass in either free-range or confinement affects the carcass characteristics and fatty acids and tocopherols accumulation in Longissimus dorsi muscle and backfat. *Meat Science*, *73*, 66–74.
- Rodríguez-Carpena, J. G., Morcuende, D., & Estévez, M. (2012). Avocado, sunflower and olive oils as replacers of pork back-fat in burger patties: Effect on lipid composition, oxidative stability and quality traits. *Meat Science*, *90*, 106–115.

- Saigas, A., Tanabe, S., & Nishimura, T. (2003). Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 3661–3667.
- Salih, A. M., Smith, D. M., Price, J. F., & Dawson, L. E. (1987). Modified extraction 2-thiobarbituric acid method for measuring lipid oxidation in poultry. *Poultry Science*, *66*, 1483–1488.
- Sandler, S. R., & Karo, W. (1992). *Source book of advances organic laboratory preparations*. San Diego: Academic Press.
- Santé-Lhoutellier, V., Engel, E., Aubry, L., Gatellier, P. (2008). Effect of animal (lamb) diet and meat storage on myofibrillar protein oxidation and in vitro digestibility. *Meat Science*, *79*, 777-783.
- Sasaki, K., Mitsumoto, M., & Kawabata, K. (2001). Relationship between lipid peroxidation and fat content in Japanese Black beef Longissimus muscle during storage. *Meat Science*, *59*, 407–410.
- Stadtman, E. R., & Levine, R. L. (2000). Protein oxidation. *Annals New York Academy of Sciences*, *899(1)*, 191–208.
- Shahidi, F., & Pegg, R. B. (1994). Hexanal as an indicator of meat flavor deterioration. *Journal of Food Lipids*, *1*, 177–186.
- Utrera, M., Morcuende, D., Rodríguez-Carpena, J. G., & Estévez, M. (2011). Fluorescent HPLC for the detection of specific protein oxidation carbonyls –  $\alpha$ -aminoacidic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes – in meat systems. *Meat Science*, *89*, 500-506.
- Utrera, M., Armenteros, M., Ventanas, S., Solano, F., & Estévez, M. (2012). Pre-freezing raw hams affects quality traits in cooked hams: Potential influence of protein oxidation. *Meat Science*, *92*, 596-603.
- Utrera, M., & Estévez, M. (2012). Analysis of tryptophan oxidation by fluorescence spectroscopy: Effect of metal-catalyzed oxidation and selected phenolic compounds. *Meat Science*, *135*, 88-93.
- Ventanas, S., Estévez, M., Tejeda, J. F., & Ruiz, J. (2006). Protein and lipid oxidation in Longissimus dorsi and dry cured loin from Iberian pigs as affected by crossbreeding and diet. *Meat Science*, *72*, 647-655.
- Ventanas, S., Ventanas, J., Tovar, J., García, C., & Estévez, M. (2007). Extensive feeding versus oleic acid and tocopherol enriched mixed diets for the production of Iberian dry-cured hams: Effect on chemical composition, oxidative status and sensory traits. *Meat Science*, *77*, 246–325.

- Ventanas, S., Estévez, M., Andrés, A. I. & Ruiz, J. (2008). Analysis of volatile compounds of Iberian dry-cured loins with different intramuscular fat contents using SPME–DED. *Meat Science*, 79, 172- 180.
- Viljanen, K., Kylli, P., Kivikari, R., & Heinonen, M. (2004). Inhibition of protein and lipid oxidation in liposomes by berry phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7419–742.





## **CAPÍTULO V.**

**Estatus:** publicado.

*Meat Science*

DOI:10.1016/j.meatsci.2010.02.024

### **Lipid and protein oxidation and sensory properties of vacuum-packaged dry-cured ham subjected to high hydrostatic pressure**

Verónica Fuentes, Jesús Ventanas, David Morcuende, Mario Estévez, Sonia Ventanas\*.

Department of Animal Production and Food Science. Faculty of Veterinary Sciences.

University of Extremadura. 1071, Cáceres, Spain.

\*Corresponding author: Sonia Ventanas, email: [sanveca@unex.es](mailto:sanveca@unex.es)

## **Abstract**

The effect of HHP treatment (600 MPa) on the oxidative stability of lipids and proteins of vacuum-packaged Iberian dry-cured ham and the impact on the sensory characteristics of the product was investigated. In order to assess how different commercial presentations are affected by HHP treatment, three different formats of presentation of vacuum-packaged Iberian dry-cured ham were considered, namely, i) intact format (IF) corresponding to non-sliced vacuum-packaged dry-cured ham, ii) conventional sliced format (CSF) corresponding to dry-cured ham slices placed stretched out in the package and iii) alternative sliced format (ASF) corresponding to dry-cured ham slices piled up horizontally. The oxidation of dry-cured ham lipids and proteins was enhanced by HHP-treatment with the type of format being highly influential on these oxidative reactions. Pre-slicing dry-cured ham results in a more susceptible product to undergo oxidative reactions during pressurisation and the subsequent refrigerated storage. Plausible mechanisms, by which HHP-induced oxidative reactions would affect particular sensory traits in vacuum packaged Iberian dry-cured ham such as colour, texture and flavour attributes, are discussed in the present paper.

## **Keywords**

Dry-cured ham, High pressure treatment, Lipid oxidation, Protein oxidation, Sensory traits, Vacuum- packaged format.

## INTRODUCTION

The Iberian dry-cured ham is a traditional processed Spanish meat product highly appreciated by Spanish consumers and of increasing interest amongst emerging markets abroad such as those in Northern Europe, Japan and USA. Dry-cured meats from Iberian pigs are high quality products mostly due to their particular sensory features achieved after two-year average period of ripening (Ventanas, Ventanas, Ruiz, & Estévez, 2005). Post-processed operations including deboning, slicing and packaging are critical steps since they can contribute to cross-contamination phenomena which affects the shelf life and safety of the product. In addition, Iberian dry-cured ham is commonly exhibited in refrigerated display cabinets with this storage having a great impact on its quality since the physico-chemical and thus, the sensory characteristics of the product are considerably modified (Andrés, Adamsen, Møller, Ruiz, & Skibsted, 2006). In recent years, slicing followed by vacuum or modified atmosphere packaging are the most widespread methods to avoid the unpleasant sensory changes and the safety threats (Adamsen, Hansen, Møller, & Skibsted, 2003; García-Esteban, Ansorena, & Astiasarán, 2004). Thus, the diversification of the appearance of the product is a major concern of dry-cured ham producers and retailers, with the sliced packaging resulting in a more convenient and easy-to-handle product.

High-pressure (HHP) processing at 600 MPa has been confirmed as an efficient non-thermal technology for the preservation of sliced dry-cured ham. This emerging technology enables the reduction of microorganisms linked to spoilage while keeping the surviving microbiota at low levels during the subsequent storage (Garriga, Grébol, Aymerich, Monfort, & Hugas, 2004). The application of HHP to sliced dry-cured ham is required for products to be sold in countries with demanding safety regulations such as USA and Japan. However, previous studies has also confirmed that HHP promotes lipid oxidation and volatile formation and induces colour changes in sliced dry-cured ham (Andres, Møller, Adamsen, & Skibsted, 2004; Andrés, et al., 2006; Rivas-Cañedo, Fernandez-García, & Nuñez, 2009). Moreover, HHP is known to affect the sensory characteristics of meat products (Mor-Mor, & Yuste, 2003) while the influence of HHP on sensory properties of dry-cured ham is currently unknown.

Lipid oxidation is one of the main factors limiting the quality and acceptability of meats and meat products (Morrissey, Sheehy, Galvin, Kerry, & Buckley, 1998). Muscle proteins are also susceptible to oxidative reactions initiated by oxidizing lipids, metal ions and other pro-oxidants generated during meat processing (Xiong, & Decker, 1995; Estévez, Kylli, Puolanne, Kivikari, & Heinonen, 2008a). The oxidation of muscle proteins involves the loss of essential amino acids and decreases protein digestibility affecting the nutritional value of meat (revised by Xiong, 2000). Moreover, colour and texture deterioration of meat has been related to protein oxidation phenomenon (Estévez, Ventanas, & Cava, 2005). The formation of carbonyl compounds is one of the most remarkable changes occurring during the oxidation of proteins, with the quantification of the total protein carbonyls using the 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) method being routine technique for the assessment of protein oxidation in muscle foods (Oliver, Ahn, Moerman, Goldstein, & Stadtman, 1987; Lund, Lametsch, Hviid, Jensen, & Skibsted, 2007; Estévez et al., 2008a). The DNPH method is, however, a non-specific method since it is limited to measure the total amount of a variety of carbonyl derivatives formed through unspecific pathways during the oxidative process. More recently, Estevez, Ollilainen, & Heinonen, (2009) developed a specific method to detect particular protein carbonyls namely,  $\alpha$ -aminoadipic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes (AAS and GGS, respectively) using liquid-chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry (LC-ESI-MS) in myofibrillar proteins. This method has been successfully applied in various meat products which confirm the potential use of both semialdehydes as indicators of protein oxidation (Armenteros, Heinonen, Ollilainen, Toldrá, & Estévez, 2009). The impact of HHP on the oxidative degradation of myofibrillar proteins is poorly understood and the specific oxidation products AAS and GGS have never been detected in meats subjected to HHP. The aim of the present study was to investigate the effect of HHP treatment (600 MPa) on the oxidative stability of lipids and proteins of vacuum-packaged Iberian dry-cured ham and the impact on the sensory characteristics of the product. In order to study the influence of different commercial presentations on the effectiveness and consequences of HHP treatment, three different formats of presentation of sliced and vacuum-packaged dry-cured ham were considered.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Sampling, packaging and pressure treatment**

Dry-cured hams (7.5 kg average) from free-range reared Iberian pigs fed on grass and commercial concentrates during the finish fattening period (60 days prior to slaughter) and slaughtered at 160 kg live weight and 12 months of age (Campo, DOP Dehesa de Extremadura). The hams were processed in a traditional way that includes two defined steps: salting/post-salting and ripening (Estévez, Morcuende, Ventanas, & Ventanas, 2008b). During the first period (4–6 months), low temperatures (0–3 °C) were combined with a high relative humidity (80–90 %) to reduce the risk of bacterial spoilage. Then, the hams were ripened for 15 months in a cellar at temperatures ranging from 10 to 27 °C and relative humidity of 58–80 %. Once the ripening process was finished ( $a_w \sim 0.90$ ), dry-cured hams were deboned and subsequently the muscle *Biceps femoris* was extracted. Afterwards, muscles were sliced (1 mm thickness) and vacuum-packaged (polyamide and polyethylene in the upper film with 34.0 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup> permeability to O<sub>2</sub> at 23 °C and 85 % HR; polyamide and polyethylene in the lower film with 18.0 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup> permeability to O<sub>2</sub> at 23 °C and 85 % HR) in Mobepack company (Salamanca, Spain) using three different formats of presentation: i) intact format (IF) corresponding to non-sliced vacuum-packaged dry-cured ham, ii) conventional sliced format (CSF) corresponding to dry-cured ham slices placed stretched out in the package and iii) alternative sliced format (ASF) corresponding to dry-cured ham slices piled up horizontally. A total of 104 packages (90 g) were obtained and half of the packages were subjected to HHP treatment in CENTA Institute (Monells, Girona, Spain). Packages of dry-cured ham were pressurized at 600 Mpa for 6 minutes in a thermostatic bath set at 12 °C (NC Hyperbaric Wave 6500/120; 120 litres and 6500 bars). Subsequently, all batches (pressurized and control) were refrigerated (4 °C) under white fluorescent light (620 lux) following a light/darkness cycle of 12 hours during one month reproducing the preservation conditions during retail display.

### **Physico- chemical analysis**

Proximate chemical composition of Iberian dry-cured hams for IF and non pressurize samples was (means ± standard deviation): pH 5.7 ± 0.03, moisture

48.04% ± 0.42 (AOAC, 1984), aw 0.9 ± 0.002, intramuscular fat (IMF) 12.8 % ± 1.64 (Folch et al 1957), chloride content 3.5 % ± 1.04 (AOAC, 1984), protein 37.4% ± 0.56 (Kjeldahl, ISO, 1978) and myoglobin 1.8 % ± 0.41 (Hornsey, 1956).

### **Colour analysis**

Instrumental colour (CIE L\* a\* b\*; CIE, 1976) was measured on the surface of all Iberian dry-cured hams using a Minolta chromameter CR- 300 (Minolta Camera Corp., Meter Division, Ramsey, NJ). All measurements were made in triplicate. Three colour indices were obtained: L\* (lightness), a\* (redness) and b\* (yellowness) values. Before each measurement the equipment was standardised against a white tile. D 65 illuminant and 0 ° standard observer angle were used. Measurements were performed on the first, second and the last slice for the CSF and ASF batches. Analyses were carried out at 18°C before the sensory analysis of the same samples. A numerical total colour difference ( $\Delta E$ ) between treated (t) and control (c) was calculated using the following formula:

$$\Delta E_{t-c} = [(L^*_t - L^*_c)^2 + (a^*_t - a^*_c)^2 + (b^*_t - b^*_c)^2]^{1/2}$$

### **Analysis of AAS and GGS using LC-ESI-MS**

Standard AAS and GGS were synthesised in vitro from N-acetyl-L-lysine and N-acetyl-L-ornithine using lysyl oxidase activity from egg shell membrane following the procedure described by Akagawa et al. (2006). AAS and GGS were analysed in Iberian dry-cured ham samples following a derivatisation procedure and a LC-ESI-MS technique described by Akagawa et al. (2006) and Estévez et al. (2009), respectively. Dry-cured ham samples were cut, minced and subsequently homogenized 1:10 (w/v) in 10 mM phosphate buffer containing 0.6 M NaCl using an ultraturrax homogenizer for 30 s. Aliquots of 200 µl were dispensed in eppendorf tubes and precipitated with 2 ml of 10 % TCA and centrifuged at 670 x g for 30 min. The supernatants were removed and the resulting pellets treated with 2 ml of 5 % TCA and subsequently centrifuged at 4200 x g for 5 min. Then, protein carbonyl groups were derivatized as follows:

first, 500  $\mu$ l of 250 mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) buffer containing 1 % sodium dodecyl sulfate (SDS) and 1 mM diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) were added to each sample. In addition, 500  $\mu$ l of 250 mM MES buffer containing 50 mM of para-amino benzoic acid (ABA) and 500  $\mu$ l 250 mM MES buffer containing 100 mM NaCNBH<sub>3</sub> were also added. The mixture was incubated in a bath at 37 °C for 1 h and stirred regularly. Afterwards, the protein was again precipitated by the addition of 500  $\mu$ l of 50 % TCA, and centrifuged for 10 min at 16770 x g. The supernatants were removed and the pellets were washed with 1 ml of 10 % TCA and then washed twice with 1 ml of ethanol/diethyl ether 1:1 (v/v), shaken, and centrifuged for 5 min at 16770 x g. Then, the precipitates were hydrolysed with 6 N HCl at 110 °C for 18 h. The protein hydrolysates were dried using a rotatory evaporator at 40 °C and finally the dried extracts were redissolved in 200  $\mu$ l milliQ water. Samples (2  $\mu$ l) were injected into an Agilent 1100 series HHPLC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipped with a Luna reversed-phase (RP) column (5  $\mu$ m C18 II column, 150 x 1.00 mm i.d. Phenomenex Torrance, CA, USA) eluted at a flow rate of 50  $\mu$ l/min with isocratic water–2.5 % acetic acid (solvent A; 95 %) and methanol–2.5% acetic acid (solvent B; 5 %). The column was operated at a constant temperature of 30 °C. MS analysis was carried out on an Esquire-LC quadrupole ion trap mass spectrometer equipped with an ESI interface (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) and LC–MSD Trap software, version 5.2 (Bruker Daltonics). Capillary voltage was 3500 V, capillary exit offset 25 V, skimmer potential 15 V, and the trap drive value was 36. Conventional ESI–MS data were recorded using a scan range of 100– 700 m/z. Nebulizer (nitrogen) pressure was 50 psi, dry gas (nitrogen) flow 8 l/min, and dry temperature 300 °C. Identification of both semialdehydes was confirmed by positive matches for retention time, mass spectra and fragmentation pattern with the standard compounds. The peaks corresponding to the molecular ions of AAS-ABA and GGS-ABA were manually integrated from extracted ion chromatograms (EIC) and the resulting areas used as arbitrary indicators of the abundance of both semialdehydes.

## **Volatile aldehydes analysis**

Volatile aldehydes were analysed by headspace-SPME and GC/MS (gas chromatograph Hewlett–Packard 5890 serie II coupled to a mass selective detector Hewlett–Packard HHP-5791A) following the method developed by Andres et al. (2004). One gram of minced sample was weighed into a 4 ml vial. All vials were closed with a teflon/silicone septum. An SPME fibre (50/30  $\mu\text{m}$  divinilbenzene-carboxen-polidimethylsiloxane coating) was inserted through the septum and exposed to the headspace of the vial. Vials were preconditioned for 15 min at 37 °C. Extraction was carried out at 37 °C for 30 min in a water bath. After extraction, the SPME fibre was immediately transferred to the injector of the chromatograph which was in splitless mode at 270 °C. The separation of volatile compounds was performed on a 5 % phenyl–methyl silicone (HHP-5) bonded phase fused silica capillary column (Hewlett–Packard, 50 m x 0.32 mm i.d, film thickness 1.05  $\mu\text{m}$ ), operating at 6 psi of column head pressure. Oven programme was: 40 °C for 10 min, 5 °C  $\text{min}^{-1}$  to 200 °C, 15 °C  $\text{min}^{-1}$  to 250 °C, and held 250 °C for 10 min. Transfer line to the mass spectrometer was maintained at 270 °C. The mass spectra were obtained using a mass selective detector by electronic impact at 70 eV, a multiplier voltage of 1756 V and collecting data at a rate of 1 scan  $\text{s}^{-1}$  over the  $m/z$  range 30–500. Volatile compounds were tentatively identified by comparing their mass spectrum with those reported in the Willey Library and by comparing their mass spectrum and/or LRI with those reported in the NIST data-base ([www.webbook.nist.gov](http://www.webbook.nist.gov)) Results are given in area units (AU).

## **Sensory analysis**

All Iberian dry-cured ham batches were evaluated using the quantitative descriptive analysis (QDA) method (Ruiz, Ventanas, Cava, Timón, & García, 1998) by a trained panel (n=12). Twenty-one attributes grouped in appearance, odour, texture and flavour of lean and in appearance and texture of fat were evaluated. The external fat and the lean of each slice were separately evaluated. The intact batches were sliced (1mm) during the sessions using a commercial slicing machine. A total of 8 sessions were done in a four-booth sensory panel room equipped with white fluorescent light. Sample order was



randomised following the William Latin Square Design. In each session, three slices (1mm) per batch were given to the assessors and three batches were evaluated within the same session. Firstly, slices were pre-conditioned at 16 °C and subsequently served on glass plates at room temperature (~ 21 °C) with a glass of water (150 ml). Assessors used a 10 cm linear non-structured quantitative scale with verbal extremes, “less” to “more” for all attributes but for red shade “red” to “brown”. FIZZ Network (v. 1.01: Biosystemes, France) program was used for collecting the data.

### **Statistic analysis**

Data from instrumental colour, lipid and protein oxidation measurements were analysed by two-way ANOVA (GLM procedure) with treatment (treated and control) and type of format as main factors. Data from sensory analysis (QDA) were analyzed by three way (repeated measures) (GLM procedure) ANOVA to evaluate the main effects of treatment and type of format and their interaction. In this model, type of treatment (control or HHP), type of format (IF, CSF or ASF) and replications (session 1, 2, 3 or 4) were included as within-subject factors. A principal component analysis (PCA) was carried out with data obtained from sensory analysis, volatile aldehydes analysis, protein oxidation analysis and instrumental colour measurements. All statistical analyses were conducted using the software SPSS (v 15.0) for windows.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Lipid and protein oxidation**

Amongst all volatiles found in the headspace of dry-cured hams, four aldehydes (pentanal, hexanal, heptanal and nonanal) were detected in all batches and used as indicators of lipid oxidation (**Table 1**). Lipid oxidation is a major factor reducing quality and acceptability of meat products (Morrissey et al., 1998). Aldehydes are main secondary products of lipid oxidation and are considered main contributors to Iberian ham flavour (Ruiz, Muriel, & Ventanas, 2002a). Lipid-derived volatiles such as the aldehydes detected in the present study, are formed from the breakdown of hydroperoxides and other reactive-oxygen

species formed at early stages of the oxidative reaction (Estévez, Morcuende, & Ventanas, 2008c). Amongst them, the most abundant in the headspace of the present samples were hexanal and pentanal. Specific Strecker aldehydes, such as 3-methylbutanal, were also found in large quantities. The Strecker degradation of amino acids is a minor pathway of the Maillard reactions (Cremer, & Eichner, 2000) and involves the oxidative deamination and decarboxylation of  $\alpha$ -amino acids in the presence of lipid carbonyls such as volatile aldehydes (Hidalgo, & Zamora, 2004). HHP treatment significantly enhanced the formation of lipid-derived aldehydes in dry-cured hams (**Table 1**). According to Andrés et al. (2004), HHP has little effect on lipid oxidation below 300 MPa but this effect increases proportionally at higher pressures. In fact, treatments between 300 and 400 MPa appears to be critical for inducing marked changes in meat. Taking into account the relatively intense HHP treatment applied to dry-cured ham in the present study (600 MPa) the impact of HHP on lipid oxidation was expected. HHP accelerates the formation and breakdown of hydroperoxides and hence, the chain reactions involved in lipid oxidation (Cheftel, & Culioli, 1997). In addition, HHP is known to cause the disruption of muscle tissue which enhances the catalyst effect of oxidation promoters like transition metals (Cheftel et al., 1997). In fact, heme and non-heme iron are thought to be also involved in the promotion of lipid oxidation in meats treated with HHP and subjected to a subsequent refrigerated storage in the presence of oxygen (Cheah, & Ledward, 1996). The above mechanisms would explain the significant increase of lipid oxidation products recorded in dry-cured hams in the present study.

**Table 1.** Chromatographic areas (AU x 10<sup>6</sup>) (mean ± standard deviation) of volatile aldehydes detected in non-treated or treated dry-cured ham with high pressure (control vs. HHP) and vacuum-packaged in three different formats (Intact vs. Conventional-sliced format vs. Alternative-sliced format). *p*-values<sup>a</sup> of both factors (treatment: T and type of format: F) and interaction (T\*F).

	Control			HHP			<i>p</i> -values <sup>a</sup>		
	Intact	Conventional-sliced	Alternative-sliced	Intact	Conventional-sliced	Alternative-sliced	T	F	T*F.
Hexanal	57.04± 0.34 <sup>b</sup>	63.11± 16.63 <sup>b</sup>	65.57± 15.91 <sup>b</sup>	71.88± 20.90 <sup>b</sup>	111.41± 13.46 <sup>a</sup>	113.5± 20.37 <sup>a</sup>	***	*	ns
3-methylbutanal	28.18±2.76 <sup>c</sup>	39.36±2.89 <sup>a</sup>	30.67±4.94 <sup>bc</sup>	36.86±1.82 <sup>ab</sup>	28.65±1.91 <sup>c</sup>	34.06±5.35 <sup>abc</sup>	ns	ns	***
2-methylbutanal	14.28±4.70 <sup>ab</sup>	16.49±2.44 <sup>a</sup>	12.49±0.98 <sup>ab</sup>	11.61±1.70 <sup>ab</sup>	10.90±1.20 <sup>b</sup>	12.05±1.56 <sup>ab</sup>	**	ns	ns
Pentanal	12.67±2.11 <sup>bc</sup>	16.74±2.13 <sup>ab</sup>	10.30±2.36 <sup>cd</sup>	4.72±1.49 <sup>d</sup>	21.74±4.39 <sup>a</sup>	20.21±2.33 <sup>a</sup>	*	***	***
Heptanal	4.75±0.88 <sup>c</sup>	5.61±0.22 <sup>bc</sup>	3.43±0.34 <sup>d</sup>	5.71±0.31 <sup>bc</sup>	7.78±0.33 <sup>a</sup>	5.95±0.12 <sup>b</sup>	***	***	**
Octanal	1.69±0.33 <sup>b</sup>	2.16±0.68 <sup>ab</sup>	1.87±0.25 <sup>ab</sup>	2.52±0.46 <sup>ab</sup>	2.44±1.42 <sup>ab</sup>	3.41±0.35 <sup>a</sup>	**	ns	ns

Nonanal	1.35±0.13	0.73±0.05	1.17±0.66	1.37±0.48	1.65±0.71	1.63±0.48	*	ns	ns
---------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	---	----	----

---

<sup>a</sup>*p*-values: ns: *p*>0.05; \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001.

Different letters within the same row denote significant differences between means at *p*<0.05.

The HHP had also a significant effect on muscle proteins. The relative amounts of the protein oxidation products, AAS-ABA and GGS-ABA, as obtained from EIC chromatograms, are shown in **Figure 1a** and **1b**, respectively. Both compounds were positively identified by the retention times (GGS: 14.5 min; AAS: 28.4 min), mass spectra (GGS: m/z 253; AAS: m/z 267) and fragmentation pattern, that were identical to those shown by the standard compounds (Armenteros et al., 2009). In general, higher amounts of AAS were detected in all batches compared to GGS. HHP treatment caused a significant ( $p < 0.001$ ) increase of AAS and GGS counts in all batches.

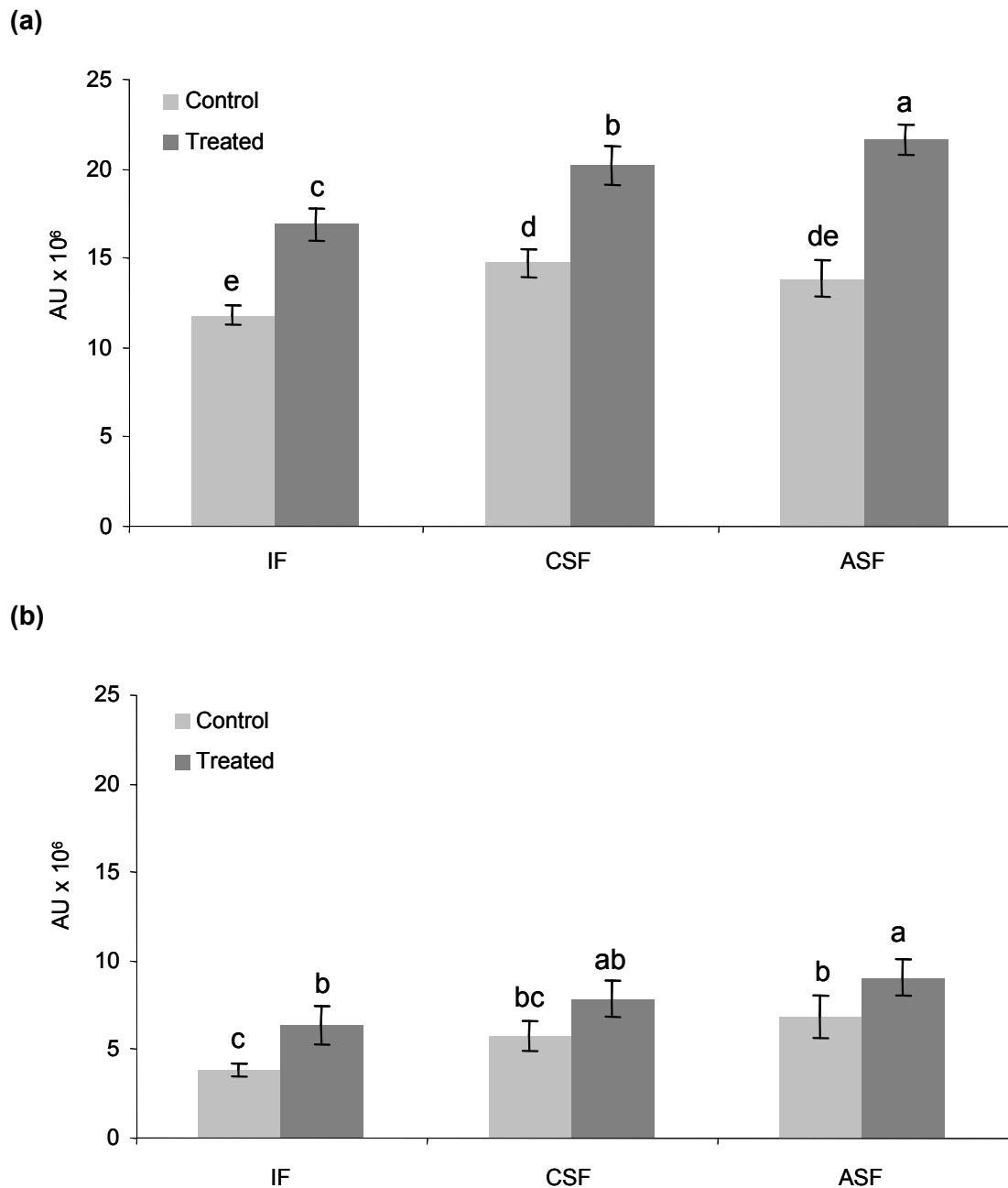
Whereas the role played by muscle proteins on the occurrence and intensity of oxidative reactions in HHP-treated meats has been profusely discussed, a further updated reconsideration is required. Early studies dealing with the effect of HHP on muscle proteins mainly focused on the effect temperature and pressure on protein denaturation (Wada, 1992; Cheah et al., 1996). In fact, Wada (1992) suggested that lipid oxidation after HHP treatment is influenced by the co-operative effect of denatured proteins although the precise interaction mechanisms between oxidizing lipids and denatured proteins were not fully clarified. Other authors focused on the enhanced catalytic effect of non-heme iron which is released from heme pigments as a result of the HHP treatment (Cheah et al., 1996). The same authors consistently reported in subsequent studies that the acceleration of lipid oxidation in meat treated by HHP might be attributed to the release of iron from heme or non-heme compounds rather than to other protein changes (Cheah, & Ledward, 1997; Ma, Ledward, Zamri, Frazier, & Zhou, 2007). Thus far, the fact that myofibrillar proteins are also targets for ROS and therefore, susceptible to oxidation has not been considered in this discussion. The present study proves that muscle proteins are oxidized as a result of HHP treatment and the following refrigerated storage. The formation of carbonyl compounds is one of the most remarkable changes occurring during the oxidation of proteins (Stadtman, & Levine, 2000; Requena, Levine, & Stadtman, 2003). Previous studies approached the occurrence of protein oxidation in HHP-treated meats although their results were partially inconsistent. Cava, Ladero, González, Carrasco, and Ramírez, (2009) found no increase of protein carbonyls in meats subjected to mild HHP treatments (200-

300 MPa). However, the methodology employed by the aforementioned authors is much less sensitive and less specific than that used in the present study. The protein semialdehydes analyzed in the present study were recently detected for the first time in oxidized myofibrillar proteins using LC-ESI-MS and highlighted as reliable indicators of protein oxidation in muscle foods (Estévez et al., 2009; Armenteros et al., 2009). In general terms, the mechanisms and reaction pathways for the oxidation of lipids and proteins are highly different but directly linked as both processes may be affected by similar pro-oxidant and antioxidant factors (Stadtman et al., 2000; Estévez et al., 2008a). Specifically, the formation of AAS and GGS from myofibrillar proteins involves the oxidative deamination of the original amino acids, namely lysine, proline and arginine, in the presence of ROS and transition metals such as iron (Estévez et al., 2009). Therefore, the enhanced ability of non-heme iron at promoting lipid oxidation in HHP-treated meats (Cheah et al., 1997; Ma et al., 2007) might be also applied to protein oxidation. The timely interaction between lipid and protein oxidation has been profusely described in food systems (Viljanen, Killy, Kivikari, & Heinonen, 2004; Estévez, Cava, & Ventanas, 2005) and it is plausibly taking place during refrigerated storage of HHP-treated meats. In fact, the positive and significant correlations between hexanal and the protein semialdehydes, AAS ( $r= 0.843$ ) and GGS ( $r= 0.651$ ) reasserted the interaction between lipid and protein oxidation phenomena.

The format used for vacuum-packaging dry-cured ham samples had a significant influence on the extent of lipid and protein oxidation. Significantly higher accounts of hexanal and pentanal were detected in the headspace of HHP-treated CSF and ASF samples compared to the intact counterparts (IF) (**Table 1**). Similarly, HHP-treated dry-cured ham slices from the ASF showed significantly higher amounts of AAS than samples from the other formats and larger amount of GGS than those from the IF (**Figure 1**). Vacuum-packaged diminishes the extent of oxidative reactions in meat products through the exclusion of oxygen and the protection against UV light. However, the remaining oxygen within the package as well as the partial permeability of the plastic material to oxygen and UV light as pro-oxidant factors explains the development of oxidation in the samples from the present study. The

differences between the different formats (IF, CSF and ASF) for the extent of lipid and protein oxidation were more noticeable in pressurized samples which confirms the great impact of this technology on oxidative reactions. The higher counts of lipid-derived volatiles and protein semialdehydes in the HHP-treated pre-sliced dry-cured ham samples than in the intact counterparts reflects that pre-slicing increases the susceptibility of dry-cured ham to lipid and protein oxidation. The disruption of muscle tissues during slicing could have promoted the formation of lipid-derived volatiles and protein semialdehydes during HHP treatment and the subsequent refrigerated storage. In addition, the total surface exposed to the oxygen and other pro-oxidant factors is considerably higher in pre-sliced dry-cured hams (CSF and ASF) than in the IF samples, which supports the results obtained. LC-MS analysis of protein carbonyls detected significant differences between the HHP-treated CSF and the ASF dry-cured ham samples for the formation of AAS. The formation of this semialdehyde in the ASF was more intense than in the pre-sliced dry-cured ham packaged following the traditional procedure (CSF). These results refuted the original hypothesis that ASF would have been less oxidized than CSF due to a lower exposure of light. The present results may be explained by the impact of the format on the plastic material used for packaging dry-cured ham samples. During vacuum-packaging of sliced dry-cured ham samples, the plastic film was forced to stretch considerably while wrapping piled up slices in the ASF, whereas this plastic material gently covered outspread slices from the CSF. Eventually, the ASF dry-cured ham might be covered by a thinner layer of plastic material which involves a higher exposure to oxygen and other pro-oxidants. This stretching effect could also have occurred during packaging of intact pieces of dry-cured ham although the impact of the wrapping material was obviously not as critical in these samples as in the pre-sliced ones.

**Figure 1.** Levels of AAS (a) and GGS (b) in dry-cured ham as analysed by LC–MS. Mean values correspond to area units from the peak integration of EIC for [M+H]<sup>+</sup>267 (AAS-ABA) and for [M+H]<sup>+</sup>253 (GGS-ABA) and were then corrected considering the total protein content from each batch. Different letters on the bars denote statistical differences ( $p < 0.05$ ) amongst means. IF (Intact format), CSF (Conventional sliced format) and ASF (Alternative sliced format).





## Instrumental colour and sensory analysis

**Table 2** shows  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  values of all Iberian dry-cured ham batches. HHP treatment significantly decreased redness ( $a^*$ ) in all samples. Type of format also influenced the instrumental colour measurements leading to higher  $L^*$  (lightness) and lower  $a^*$  values (redness) in samples from the ASF compared to the counterparts. According to the total colour difference ( $\Delta E_{t-c}$ ) between non-pressurized and pressurized Iberian dry-cured ham samples, the highest colour change was suffered by the ASF ( $\Delta E_{t-c} = 5.18 \pm 1.51$ ) followed by the CSF ( $\Delta E_{t-c} = 4.27 \pm 0.73$ ). Samples from the IF showed the lowest values for the total colour change ( $\Delta E_{t-c} = 3.74 \pm 0.65$ ) whereas these differences were not significant. HHP treatment also affected most appearance attributes of fat and lean of dry-cured ham samples (**Table 3**). Regarding the attributes related to appearance and texture of external fat, HHP treatment significantly reduced the yellowness, the brightness and the fluidity of fat. Moreover, fat of CSF showed a more intense pink colour than samples of IF and ASF batches. Regarding appearance attributes of lean, pressurized samples were more brownish and displayed a significantly less intense brightness than non-pressurized samples. Dry-cured samples from the IF were less brownish compared to formats containing sliced samples (ASF and CSF), although these differences were only significant in pressurized samples. Pressurized samples of formats containing sliced samples (ASF and CSF), showed significant lower scores for brightness and red colour than samples of IF. This effect was less marked in non-pressurized samples.

The concentration and chemical state of the nitrosylmyoglobin pigment and the light scattering properties of the meat are main responsible for the colour displayed by the lean of dry-cured hams. HHP is known to modify the colour properties of muscle foods due to modifications of meat pigments and muscle structure as a result of the high temperatures and pressure. According to Andrés et al. (2004), pressurized dry-cured hams show lower  $L^*$  and  $a^*$ -values than non-pressurized ones. The effect of HHP on colour is influenced by treatment intensity as redness of dry-cured hams decreases with increasing pressure, especially above 400 MPa. Therefore, this effect was expected in the dry-cured hams from the present study which were treated with 600 MPa.

Instrumental redness was significantly affected by HHP which suggests certain modifications in the nitrosylmyoglobin molecule and/or the muscle structure. The redness of lean, visually assessed by panellist as red shade, was also significantly affected by HHP treatment. The clear consistency between instrumental and sensory colour measurements was observed as a positive relationship between instrumental redness and visual red colour ( $r= 0.835$ ) and a negative relationship between those and red shade ( $r=-0.744$ ) were found. Three phenomena could have induced the colour changes observed as a result of pressure processing: (i) denaturation of the globin moiety of the molecule with possible displacement or separation of the heme from the globin; (ii) modification of the porphyrin ring with a release of the iron atom; (iii) oxidation of ferrous oxymyoglobin into ferric metmyoglobin (Carlez, Veciana-Nogues, & Cheftel, 1995). Besides the effect of HHP on meat pigments, this treatment has also an impact on the structure of myofibrillar proteins which can lead to a decrease in the solubility of actin and myosin (Goutefongea, Rampon, Nicolas, & Dumont, 1995). The decrease in instrumental lightness and visual brightness of lean after HHP treatment could result from alteration of protein structure caused by HHP, affecting the light scattering properties of the product. The oxidation of muscle proteins (including myoglobin) during HHP treatment and the subsequent storage could also have played a major role in colour changes. In fact, the ASF hams suffered more intense discolouration and displayed significantly lower  $a^*$ -values after pressurisation than the hams from the other formats. According to the calculated total colour difference ( $\Delta E$ ), pre-sliced hams (ASF and CSF) suffered colour changes to a higher extent than intact (IF) samples ( $p>0.05$ ). In accordance with the instrumental analysis, the colour displayed by pre-sliced hams after HHP treatment and chill storage was more grey-brownish (significantly higher red shade values) than IF hams. These results are also in agreement with those previously reported for lipid and protein oxidation. A higher exposure to oxygen and other pro-oxidants in pre-sliced hams, and particularly in the ASF samples, could have caused an increase in the oxidation of meat pigments and myofibrillar proteins, as aforementioned. The relationship between protein oxidation and colour changes has been previously suggested in cooked sausages (Estévez et al., 2005), liver pâtés

(Estévez, & Cava, 2004), cooked patties (Ganhão et al., in press) and dry-cured hams (Ventanas, Ventanas, Tovar, García, & Estévez, 2007).

**Table 2.** Instrumental colour measurements (mean  $\pm$  standard deviation) of non-treated or treated dry-cured ham with high pressure (control vs. HHP) and vacuum-packaged in three different formats (Intact vs. Conventional-sliced format vs. Alternative-sliced format).  $p$ -values<sup>a</sup> of both factors (treatment: T and type of format: F) and interaction (T\*F).

	Control			HHP			$p$ -values <sup>a</sup>		
	Intact	Conventional-sliced	Alternative-sliced	Intact	Conventional-sliced	Alternative-sliced	T	F	T*F
<i>Instrumental color</i>									
L*	41.26 $\pm$ 2.11 <sup>c</sup>	40.79 $\pm$ 1.91 <sup>c</sup>	49.69 $\pm$ 3.19 <sup>a</sup>	43.96 $\pm$ 1.99 <sup>bc</sup>	39.86 $\pm$ 2.12 <sup>c</sup>	47.22 $\pm$ 0.17 <sup>ab</sup>	ns	***	ns
a*	15.77 $\pm$ 2.15 <sup>ab</sup>	17.40 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	13.37 $\pm$ 2.53 <sup>bc</sup>	15.34 $\pm$ 2.09 <sup>ab</sup>	15.04 $\pm$ 0.21 <sup>ab</sup>	11.02 $\pm$ 1.47 <sup>c</sup>	*	***	ns
b*	7.33 $\pm$ 0.62 <sup>ab</sup>	7.07 $\pm$ 1.42 <sup>ab</sup>	8.19 $\pm$ 0.62 <sup>a</sup>	5.73 $\pm$ 0.58 <sup>b</sup>	7.95 $\pm$ 0.89 <sup>a</sup>	6.79 $\pm$ 0.65 <sup>ab</sup>	ns	ns	ns

<sup>a</sup> $p$ -values: ns:  $p > 0.05$ ; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Different letters within the same row denote significant differences between means at  $p < 0.05$ .

Both, the HHP treatment and the packaging format had significant effects on most texture parameters (**Table 3**). Higher values for hardness were obtained in fat from ASF batches compared to the rest of batches. Pressurized samples were harder, less juicy, less doughy and more difficult to chew than non-pressurized samples. Samples of ASF were significantly harder and more difficult to chew compared to the other formats. Pressurized samples of IF showed significantly higher scores for doughiness compared to pressurized formats containing sliced samples (ASF and CSF). The texture deterioration observed for dry-cured hams subjected to HHP can be considered a main drawback as juiciness has a great impact on consumer's acceptability of this product (Ruiz, García, Muriel, Andrés, & Ventanas, 2002b). The partial denaturation of muscle proteins and their modification as a result of oxidative reactions could have influenced texture changes. Carbonyl compounds generated from protein oxidation (AAS and GGS) and assessed in the present study are involved in cross-linking of damaged proteins via Schiff base formation (Estévez et al., 2008a). Schiff bases are generated as a result of the reactions between lipid oxidation products (aldehydes) and amino groups from the side chain of proteins. It is plausible that the protein oxidation caused an increase of hardness and loss of juiciness in dry-cured hams through the loss of protein solubility and the formation of cross-links and aggregates between proteins. In good agreement with results from protein oxidation and other changes in sensory parameters, ASF hams turned out to be the hardest amongst the three formats. Consistently, positive correlation coefficients were found between AAS and hardness ( $r= 0.873$ ) and doughiness ( $r= 0.907$ ) as well as between GGS and hardness ( $r= 0.732$ ) and doughiness ( $r= 0.818$ ). On the other hand, chewiness and juiciness were negatively connected with hardness ( $r= -0.749$  and  $r= -0.594$ , respectively), doughiness ( $r= -0.855$  and  $r= -0.721$ , respectively) and with protein carbonyls AAS ( $r= -0.882$  and  $r= -0.765$ , respectively) and (GGS) ( $r= -0.728$  and  $r= -0.667$ , respectively). Other authors have studied the effect of proteolytic enzymes on texture attributes of dry-cured ham subjected to HHP treatments. Certain enzymes, namely, cathepsins and calpains are involved in postmortem tenderization of meat and remain active during ripening process and chill storage of dry-cured hams. Campus, Flores, Martínez, & Toldrá, (2008) reported that HHP-treatments (400 MPa) of vacuum

packaged dry-cured ham significantly diminished the activities of cathepsins B and B+ L during the subsequent chill storage. Other authors (Homma, Ikeuchi, & Suzuki, 1996) observed that the activity of cathepsin B, D and L decreases in meat subjected to HHP (500 MPa). Doughtiness attribute is directly connected to these enzymatic activities, and according to results from sensory analysis, the treated samples became less doughtiness than non-treated samples as a result of the HHP treatment of 600 MPa. However, proteins modified by oxidizing lipids are more difficultly degraded by proteases than the native protein (Hidalgo, & Zamora, 2001). According to these authors, the formation of some oxidized lipid/amino acid reaction products contributes to inhibit proteolytic activity. Although enzymes could remain active in dry-cured hams, the impact of their activity on texture attributes of fully processed dry-cured hams might not be relevant.

Finally, most odour and flavour attributes were also significantly affected by HHP treatment and vacuum-packaged format. HHP treatment significantly decreased overall odour, particularly for IF and CSF, and increased rancid odour particularly for IF. The type of format only influenced the overall odour; with the ASF samples showing significant lower scores compared to others formats. The acceleration of lipid oxidation and the formation of lipid-derived volatiles as a result of the pressurisation are likely linked to the increase of most odour and flavour attributes upon HHP-treatment. The lipid-derived aldehydes have a very-low olfaction threshold, and therefore constitute an important group of odorants (Ohloff, 1973; Tressl, Bahri, & Engel, 1981). Aminopeptidases and dipeptidylpeptidases activity decrease after pressure treatment (Homma et al., 1996; Campus et al., 2008). Whereas the activity of the enzymes responsible of the generation of free amino acids is greatly reduced by pressure, a large amount of free amino acids are already generated during ripening and may be available for Maillard reactions. However, no significant increase of Strecker aldehydes was observed in HHP-treated hams.

Regarding flavour attributes, HHP treatment significantly influenced all attributes except rancid flavour increasing the intensity of saltiness, bitterness, overall flavour, cured flavour and after-taste flavour perceived in the dry-cured ham samples. Dry-cured ham samples of CSF were saltier and had a more intense

overall and after-taste flavour compared to IF and ASF. Upon pressurisation, pre-sliced hams displayed more intense cured, rancid, overall and after taste attributes. As previously reported, these types of formats (ASF and CSF) suffered the oxidative reactions to a higher extent than IF. Positive correlation coefficients were found between hexanal and flavour attributes ( $r= 0.875$  for saltiness,  $r= 0.334$  for bitterness,  $r= 0.955$  for cured,  $r= 0.043$  for rancid flavour,  $r= 0.842$  for overall flavour and  $r= 0.732$  for after taste), and between AAS and flavour attributes ( $r= 0.760$  for saltiness,  $r= 0.728$  for bitterness,  $r= 0.903$  for cured,  $r= 0.711$  for overall flavour and  $r= 0.689$  for after taste) products which suggest that some of these compounds might contribute particular flavours. It is generally known that the oxidation of unsaturated fatty are highly responsible for the odour and flavour formed during the processing of muscle foods (Ohloff, 1973; Tressl et al., 1981). On the other hand, the impact of protein oxidation on meat odour and flavour is poorly understood. A likely relationship between protein oxidation and particular flavour notes in dry-cured hams was reported in a previous paper (Ventanas et al., 2007). In fact, the large variety of compounds derived from protein oxidation comprise amino-containing molecules with taste potential (Davies, Shanlin, Wang, & Dean, 1999).

**Table 3.** Sensory characteristics (mean  $\pm$  standard deviation) of non-treated or treated dry-cured ham with high pressure (control vs.HHP) and vacuum-packaged in three different formats (Intact vs. Conventional-sliced format vs. Alternative-sliced format). *p*-values of main factors (session: Se; treatment: T and type of format: F) and interaction (T\*F).

	Control <sup>a</sup>			HHP <sup>b</sup>			<i>p</i> -values <sup>c</sup>			
	Intact	Conventional-sliced	Alternative-sliced	Intact	Conventional-sliced	Alternative-sliced	Se	T	F	T*F
<b>External Fat</b>										
<i>Appearance</i>										
Pink color	1.20 <sup>b</sup> $\pm$ 0.52	2.25 <sup>a</sup> $\pm$ 0.79	0.79 <sup>c</sup> $\pm$ 0.42	1.14 <sup>b</sup> $\pm$ 0.55	2.09 <sup>a</sup> $\pm$ 0.94	1.11 <sup>b</sup> $\pm$ 0.58	***	ns	***	ns
Yellow color	4.13 <sup>a</sup> $\pm$ 0.99	4.89 <sup>a</sup> $\pm$ 0.42	3.75 <sup>b</sup> $\pm$ 1.18	3.60 <sup>b</sup> $\pm$ 1.20	3.49 <sup>b</sup> $\pm$ 1.10	3.58 <sup>b</sup> $\pm$ 1.32	ns	***	ns	*
Brightness	5.40 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.28	5.81 <sup>a</sup> $\pm$ 1.07	4.97 <sup>bc</sup> $\pm$ 0.95	4.97 <sup>c</sup> $\pm$ 1.10	3.88 <sup>d</sup> $\pm$ 1.03	3.87 <sup>d</sup> $\pm$ 0.89	**	***	ns	***



*Texture*

Hardness	1.95 <sup>c</sup> ± 0.95	2.13 <sup>c</sup> ± 0.77	2.76 <sup>a</sup> ± 1.03	1.89 <sup>c</sup> ± 0.94	2.03 <sup>c</sup> ± 0.74	2.54 <sup>b</sup> ± 0.71	*** ns	*** ns
Fluidity	5.35 <sup>c</sup> ± 0.91	6.02 <sup>ab</sup> ± 0.91	5.44 <sup>bc</sup> ± 1.17	5.06 <sup>cd</sup> ± 1.02	4.64 <sup>d</sup> ± 1.12	4.38 <sup>e</sup> ± 1.10	*** ***	ns *

**Lean**

*Appearance*

Red color	5.23 <sup>bc</sup> ± 1.06	5.71 <sup>ab</sup> ± 1.10	4.84 <sup>cd</sup> ± 0.97	5.75 <sup>a</sup> ± 1.10	4.93 <sup>cd</sup> ± 1.19	4.46 <sup>d</sup> ± 1.24	ns ns	** *
Red shade	4.51 <sup>b</sup> ± 1.09	4.69 <sup>b</sup> ± 1.15	4.95 <sup>ab</sup> ± 1.47	4.55 <sup>b</sup> ± 1.05	5.48 <sup>a</sup> ± 1.05	5.79 <sup>a</sup> ± 1.28	* ***	*** ns
Brightness	5.57 <sup>a</sup> ± 1.03	5.76 <sup>a</sup> ± 1.05	4.39 <sup>b</sup> ± 1.03	4.73 <sup>b</sup> ± 1.08	3.94 <sup>c</sup> ± 1.05	3.35 <sup>d</sup> ± 0.72	ns ***	*** ***
Marbling	5.47 <sup>a</sup> ± 1.41	4.37 <sup>bcd</sup> ± 1.11	4.13 <sup>d</sup> ± 0.93	4.41 <sup>bcd</sup> ± 1.01	4.70 <sup>bc</sup> ± 1.09	4.80 <sup>b</sup> ± 1.07	** ns	ns ns

*Odour*

Overall	5.72 <sup>a</sup> ± 1.09	5.72 <sup>a</sup> ± 1.06	5.11 <sup>bc</sup> ± 1.08	5.25 <sup>b</sup> ± 1.02	5.33 <sup>b</sup> ± 1.85	4.82 <sup>c</sup> ± 0.80	ns **	** ns
---------	--------------------------	--------------------------	---------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	-------	-------

Rancid	0.77 <sup>c</sup> ± 0.36	1.22 <sup>b</sup> ± 0.30	1.11 <sup>b</sup> ± 0.41	1.67 <sup>a</sup> ± 0.65	1.03 <sup>bc</sup> ± 0.46	1.26 <sup>b</sup> ± 0.65	**	**	ns	***
<i>Texture</i>										
Hardness	2.44 <sup>d</sup> ± 0.74	1.99 <sup>e</sup> ± 0.80	2.97 <sup>c</sup> ± 0.97	3.77 <sup>b</sup> ± 1.03	3.39 <sup>b</sup> ± 0.90	5.03 <sup>a</sup> ± 1.25	***	***	***	*
Juiciness	4.30 <sup>a</sup> ± 1.08	3.92 <sup>ab</sup> ± 1.26	3.83 <sup>ab</sup> ± 0.91	3.40 <sup>bc</sup> ± 0.98	3.07 <sup>c</sup> ± 0.98	3.41 <sup>c</sup> ± 0.96	ns	**	ns	ns
Chewiness	2.33 <sup>d</sup> ± 0.79	2.36 <sup>d</sup> ± 1.00	2.99 <sup>c</sup> ± 1.08	3.14 <sup>bc</sup> ± 1.24	3.56 <sup>b</sup> ± 1.14	4.30 <sup>a</sup> ± 1.13	ns	***	***	ns
Doughtiness	2.25 <sup>a</sup> ± 0.93	1.83 <sup>ab</sup> ± 1.02	2.08 <sup>a</sup> ± 0.72	2.06 <sup>a</sup> ± 0.94	1.58 <sup>b</sup> ± 0.57	0.93 <sup>c</sup> ± 0.53	**	***	**	***
<i>Flavour</i>										
Overall	4.98 <sup>d</sup> ± 0.73	5.72 <sup>bc</sup> ± 0.99	5.33 <sup>c</sup> ± 0.87	5.42 <sup>c</sup> ± 0.77	6.2 <sup>a</sup> ± 0.85	5.90 <sup>b</sup> ± 1.02	*	***	***	ns
Saltiness	4.27 <sup>d</sup> ± 1.01	4.95 <sup>bc</sup> ± 0.88	4.37 <sup>d</sup> ± 0.77	4.70 <sup>cd</sup> ± 1.03	5.54 <sup>a</sup> ± 1.00	5.26 <sup>a</sup> ± 0.99	ns	***	***	ns
Bitterness	1.00 <sup>b</sup> ± 0.50	1.48 <sup>a</sup> ± 0.71	1.13 <sup>b</sup> ± 0.59	1.72 <sup>a</sup> ± 0.77	1.34 <sup>ab</sup> ± 0.66	1.49 <sup>a</sup> ± 0.59	*	**	ns	**
Cured	4.75 <sup>c</sup> ± 1.06	5.14 <sup>bc</sup> ± 1.33	5.01 <sup>c</sup> ± 1.13	5.05 <sup>bc</sup> ± 1.22	5.62 <sup>ab</sup> ± 1.28	5.93 <sup>a</sup> ± 1.09	*	**	ns	ns

Rancid	1.59 ± 0.60	1.34 ± 0.48	1.49 ± 0.67	1.42 ± 0.48	1.40 ± 0.51	1.62 ± 0.70	**	ns	ns	ns
After-taste	4.79 <sup>b</sup> ± 0.70	5.74 <sup>a</sup> ± 0.81	5.16 <sup>b</sup> ± 0.96	5.07 <sup>b</sup> ± 1.08	5.80 <sup>a</sup> ± 0.90	5.83 <sup>a</sup> ± 0.84	ns	*	**	ns

---

*p*-values<sup>c</sup>: ns: *p*>0.05; \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001.

Different letters within the same row denote significant differences between means at *p*<0.05.

## Principal component analysis (PCA)

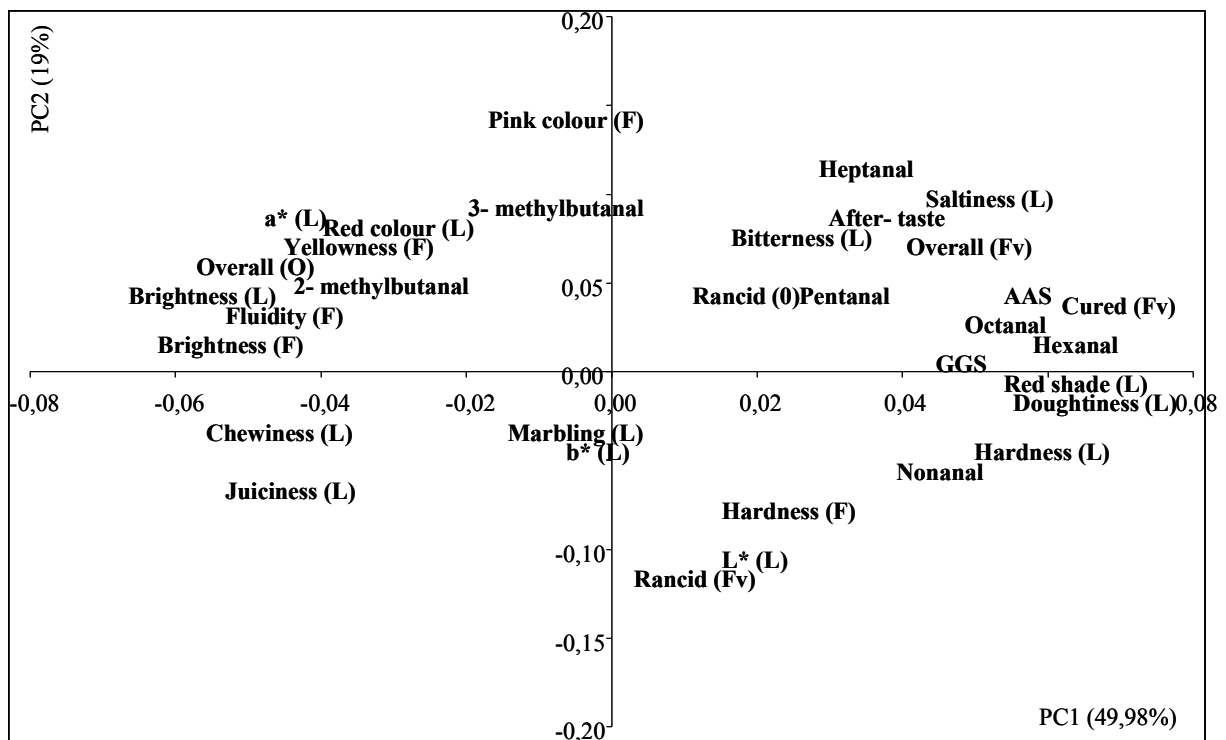
PCA was performed to evaluate the relationship among variables considered in this study (**Figure 2**). The first two principal components accounted 68.98% of the total variance. The first PC (49.98 % of the total variance) was positively loaded by protein oxidation indices (GGS and AAS), the chromatographic areas of octanal, hexanal and nonanal (lipid oxidation indices) and by red shade of lean, doughiness, hardness and cured flavour. Moreover, this component was negatively defined by  $a^*$  index, the yellowness, fluidity and brightness of fat and by overall odour, juiciness, chewiness and brightness of lean and the chromatographic area of 2-methylbutanal. The second PC (19 % of the total variance) was positively defined by pink colour of fat and the chromatographic area of 3-methylbutanal while  $L^*$  index, hardness and rancid flavour showed negative loadings in this PC. Loadings plots (**Figure 2a**) show that volatile compounds derived from lipid oxidation (hexanal, octanal and nonanal), were strongly correlated with semialdehydes derived from protein oxidation (AAS and GGS) which supports the aforementioned interaction between lipid and protein oxidation phenomena. Hardness and doughiness of lean was positively correlated with AAS and GGS while juiciness and chewiness were negatively correlated with hardness and both semialdehydes. These results are in good agreement with the arguments supporting the impact of protein oxidation on texture parameters. Additionally, PCA found positive relationships between flavour attributes such as saltiness, bitterness, cured, rancid, overall and after taste and lipid and protein oxidation measurements. Fluidity of fat was strongly correlated with brightness of both fat and lean. Red colour of lean and yellowness of fat were positively correlated with  $a^*$  index (redness). Finally, taste attributes (saltiness and bitterness) were positively correlated with overall and after-taste flavour and negatively with rancid flavour.

Factor scores plot (**Figure 2b**) shows great differences between the six evaluated samples. Overall, pressurized formats containing pre-sliced samples (ASF and CSF) were located in the positive axis of first PC and were associated with high levels of protein oxidation index (AAS and GGS) and lipid oxidation-derived volatiles (pentanal, hexanal, heptanal, octanal and nonanal). Moreover, pressurized samples of ASF were also harder and doughier and more brownish

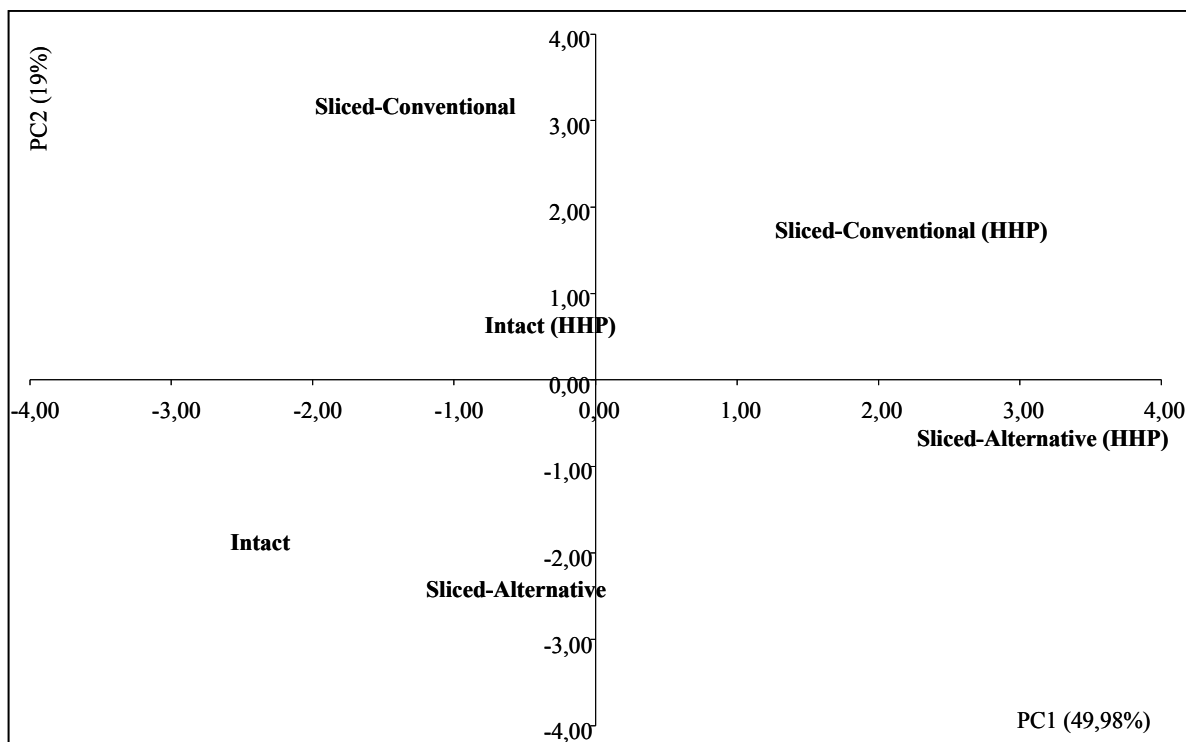
compared to the rest of batches. Pressurized samples of CSF were located in the upper right quadrant of PCA associated with a high salty and bitter taste, with a more intense after-taste and overall flavours. Non-pressurized batches were located in the negative axis of first PC regardless the type of format. In agreement with the previously mentioned results, non-pressurized samples of IF were juicier and easier to chew whereas samples of ASF displayed a more intense rancid flavour and higher L\* values. Finally, non-pressurized samples of CSF were associated with an intense pink colour of fat and with high levels of 3-methylbutanal.

**Figure 2.** Principal component analysis (PCA) analysis of sensory profiling (O= odour attributes, Fv= flavour attributes, F= fat attributes, L= lean attributes), chromatographic areas of volatile compounds (lipid oxidation and protein oxidation) and instrumental colour measurements. Parameter loadings (a) and factor scores (b) plots for the two first principal components.

(a)



(b)



## CONCLUSIONS

Physical-chemical and sensory characteristics of vacuum-packaged Iberian dry-cured ham are influenced by HHP treatment (600 MPa) followed by one month of refrigeration storage. The oxidation of muscle lipids and proteins induced by HHP treatment compromises oxidative stability and sensory traits of dry-cured hams. Commercial presentation has also a marked influence on physical-chemical and sensory characteristics of dry-cured hams, with the alternative format showing the most remarkable changes.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Verónica Fuentes is thankful to the “Ministerio de Educación” for the FPI grant. This study was supported by the “Ministerio de Ciencia e Innovación” project entitled: “Estudio sensorial e instrumental de la liberación de compuestos oloractivos en jamón ibérico loncheado: efecto del contenido y características

de la grasa. (Project AGL2007-65923-C02-01). Authors are grateful to Dr. Narcís Grèbol and Jeroni Durango from CENTA-IRTA (Monells, Girona) for performing the high pressure treatment. The authors are thankful to Ana Antúnez for her technical assistance.

## REFERENCES

- Adamsen, C.E., Hansen, M.L., Møller, J.K.S., & Skibsted, L. H. (2003). Studies on the antioxidative activity of red pigments in Italian-type dry-cured ham. *European Food Research Technology*, 217, 201–206
- Akagawa, M., Sasaki, D., Ishii, Y., Kurota, Y., Yotsu-Yamashita, M., Uchida, K., et al. (2006). New methods for the quantitative determination of mayor protein carbonyls,  $\alpha$ -aminoadipic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes: Investigation of the formation mechanism and chemical nature in vitro and in vivo. *Chemical Research in Toxicology*, 19, 1059–106.
- Andrés, A.I., Adamsen, C.E., Møller, J.K.S., & Skibsted, L.H. (2004). High pressure treatment of dry-cured iberiam ham. Effect on radical formation, lipid oxidation and colour. *European Food Research Technology*, 219, 205-210.
- Andrés, A.I., Cava, R., Ventanas, J., Thovar, V., & Ruiz, J. (2005). Sensory characteristics of Iberian ham: Influence of salt content and processing conditions. *Meat Science*, 68, 45-51
- Andrés, A. I., Adamsen, C.E., Møller, J.K.S., Ruiz, J., & Skibsted, L. H. (2006). High-pressure treatment of dry-cured Iberian ham. Effect on colour and oxidative stability during chill storage packed in modified atmosphere. *European Food Research Technology*, 222, 486-491.
- AOAC. (1984). Official Methods of Analysis (14th Ed.). Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Armenteros, M., Heinonen ,M., Ollilainen ,V., Toldrá, F., & Estévez, M. (2009). Analysis of protein carbonyls in meat products by using the DNPH-method, fluorescence spectroscopy and liquid chromatography–electrospray ionisation–mass spectrometry (LC–ESI–MS). *Meat Science*, 83, 104-112.
- Campus, M., Flores, M., Martínez, A., & Toldrá, F. (2008). Effect of high pressure treatment on colour, microbial and chemical characteristics of dry cured loin. *Meat Science*, 80, 1174-1181.

- Carlez, A., Veciana-Nogues, T., & Cheftel, J.C. (1995). Changes in colour and myoglobin of minced beef meat due to high pressure processing. *LWT - Food Science and Technology*, *28*, 528–538
- Cava, R., Ladero, L., González, S., Carrasco, A., & Ramírez, M.R. (2009). Effect of pressure and holding time on colour, protein and lipid oxidation of sliced dry-cured Iberian ham and loin during refrigerated storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *10*, 76-81.
- Cheftel, J.C., & Culioli, J. (1997). Effects of high pressure on meat: A Review. *Meat Science*, *46*, 211-236.
- Cheah, P.B., & Ledward, D.A. (1996). High pressure effects on lipid oxidation in minced pork. *Meat Science*, *43*, 123-134.
- Cheah, P.B., & Ledward, D.A. (1997). Catalytic mechanism of lipid oxidation following high pressure treatment in pork fat and meat. *Journal of Food Science*, *62*, 1135-1139.
- Cremer, D.R., & Eichner, K. (2000). The reaction kinetics for the formation of Strecker aldehydes in low moisture model systems and in plant powders. *Food Chemistry*, *71*, 37–43
- Davies, M.J., Shanlin, F.U., Wang, H., & Dean, R.T. (1999). Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radical Biology & Medicine*, *27*, 1151-1163.
- Estévez, M., & Cava, R. (2004). Lipid and protein oxidation, release of iron from heme molecule and colour deterioration during refrigerated storage of live pâté. *Meat Science*, *68*, 551–558.
- Estévez, M., Ventanas, S., & Cava, R. (2005). Protein oxidation in frankfurters with increasing levels of added rosemary essential oil: Effect on colour and texture deterioration. *Journal of Food Science*, *70*, 427–432.
- Estévez, M., Killy, P., Puolanne, E., Kivikari, R., & Heinonen, M. (2008a). Fluorescence spectroscopy as a novel approach for the assessment of myofibrillar protein oxidation in oil-in-water emulsions. *Meat Science*, *80*, 1290-1296.
- Estévez, M., Morcuende, D., Ventanas, J. & Ventanas, S. (2008b). Mediterranean products. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of fermented meat and poultry*, (pp. 393–405), Iowa, Blackwell Publishing.
- Estévez, M., Morcuende, D., & Ventanas, S. (2008c). Determination of oxidation. In L.M. L. Mollet & F. Toldrá (Eds.), *Handbook of processed meat and poultry analysis*, (pp. 141–162). Boca Raton, FL, USA: CRC Press.



- Estévez, M., Ollilainen, V., & Heinonen, M. (2009). Analysis of protein oxidation markers  $\alpha$ -aminoadipic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes in food proteins using liquid chromatography (LC)-electrospray ionization (ESI)-multistage tandem mass spectrometry (MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 3901-3910.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, *226*, 497-509.
- Ganhão, R., Estévez, M. & Morcuende, D. Protein oxidation in emulsified cooked burger patties with added fruit extracts: influence on colour and texture deterioration during chill storage. *Meat Science*, in press.
- García-Esteban, M., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2004). Comparison of modified atmosphere packaging and vacuum packaged for long period storage of dry-cured ham: effects on colour, texture and microbiological quality. *Meat Science*, *67*, 57-63.
- Garriga, M., Grébol, N., Aymerich, M.T., Monfort, J.M., & Hugas, M. (2004). Microbial inactivation after high-pressure processing at 600 MPa in commercial meat products over its shelf life. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *5*, 451-457.
- Goutefongea, R., Rampon, V., Nicolas, N., & Dumont, J.P.(1995). In: *Proceedings volume II from 41th International Congress of Meat Science and Technology*, (p. 384).
- Hidalgo, F.J., & Zamora, R. (2001). Inhibition of proteolysis in oxidized lipid damaged proteins. *Journal Agricultural Food Chemistry*, *49*, 6006-6011.
- Hidalgo, F.J., & Zamora, R. (2004). Strecker- type degradation by the lipid oxidation products 4,5-epoxy-2-alkenals. *Journal Agricultural Food Chemistry*, *52*, 7126-7131.
- Homma, N., Ikeuchi, Y., & Suzuki, A. (1996). Effect of high pressure treatment on proteolytic system in meat. In high pressure and biotechnology, eds C. Balny, R. Hayashi, *Elsevier Science*, 327-330
- Hornsey, H. C. (1956). The colour of cooked cured pork. I. Estimation of the nitric oxide-haem pigments. *Journal Science Food Agricultural*, *8*, 534-540
- Lund, M.N., Lametsch, R., Hviid, M.S., Jense, O.N., & Skibsted, L.H. (2007). High-oxygen packaging atmosphere influences protein oxidation and tenderness of porcine longissimus dorsi during chill storage. *Meat Science*, *77*, 295-303.
- Ma, H.J., Ledward, D.A., Zamri, A.I., Frazier, R.A., & Zhou, G. H. (2007). Effects of high pressure/thermal treatment on lipid oxidation in beef and chicken muscle. *Food Chemistry*, *104*, 1575-1579.

- Mor-Mur, M., & Yuste, J. (2003). High pressure processing applied to cooked sausage manufacture: physical properties and sensory analysis. *Meat Science*, *65*, 1187-1191.
- Morrissey, P.A., Sheehy, P.J.A., Galvin, K., Kerry, J.P., & Buckley, D.J. (1998). Lipid stability in meat and meat products. *Meat Science*, *49*, S73-S86.
- Ohloff, G., (1973) Fats as flavour precursors. In: J. Solms, Editor, *Fette als funktionelle Bestandteile von Lebensmitteln*, Forster, Zürich (1973), (pp. 119–132).
- Oliver, C.N., Alin, B.W., Moerman, E.J., Goldstein, S., & Stadtman, E.R. (1987). Age- related changes in oxidized proteins. *Journal of Biological Chemistry*, *262*, 5488-5491.
- Requena, J.R., Levine, R.L., & Stadtman, E.R. (2003). Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino Acids*, *25*, 221-226.
- Rivas-Cañedo, A., Fernández-García, E., & Nuñez, M. (2009). Volatile compounds in dry-cured Serrano ham subjected to high pressure processing. Effect of the packaging material. *Meat Science*, *82*, 162-169.
- Ruiz, J., Muriel, E., & Ventanas, J. (2002a). The flavour of Iberian ham. In F. Toldrá (Ed.), *Research advances in the quality of meat and meat products*, (pp. 289–309). Trivandrum, India: Research Signpost.
- Ruiz, J., García, C., Muriel, E., Andrés, A.I., & Ventanas, J. (2002b). Influence of sensory characteristics on the acceptability of dry-cured ham. *Meat Science*, *61*, 347-354.
- Ruiz, J., Ventanas, J., Cava, R., Timón, M.L., & García, C. (1998). Sensory characteristics of Iberian ham: influence of processing time and slice location. *Food Research International*, *31*, 53-58.
- Stadtman, E.R., & Levine, R.L. (2000). Protein oxidation. *Annals New York Academy of Sciences*, *899(1)*, 191–208.
- Tressl, R., Bahri, D., & Engel, K.H. (1981). Lipid oxidation in fruits and vegetables. In R. Teranishi and H. Barrera-Benitez, (Eds.). *Quality of selected fruits and vegetables of north America*. ACS Symposium Series 31, (pp. 213–231). ACS: Washington, DC, USA.
- Ventanas, S., Ventanas, J., Ruiz, J. & Estévez, M. (2005). Iberian pigs for the development of high-quality cured products. In *Recent Research in Development in Agricultural and Food Chemistry*. (pp. 27-53), Trivandrum, Kerala, India: Research Singpost.
- Ventanas, S., Ventanas, J., Tovar, J., García, C., & Estévez, M. (2007). Extensive feeding versus oleic acid and tocopherol enriched mixed diets for the production of Iberian dry-cured hams: Effect on chemical composition, oxidative status and sensory traits. *Meat Science*, *77*, 246–325

- Viljanen, K., Kylli, P., Kivikari, R., & Heinonen, M. (2004). Inhibition of protein and lipid oxidation in liposomes by berry phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7419–7424
- Wada, S. (1992). High Pressure and Biotechnology. In C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans & P. Masson. (Eds.), (p. 235). France: Editions John Libbey Eurotext.
- Xiong, Y.L., & Decker, E.A. (1995). Alteration of muscle protein functionality by oxidative and antioxidative process. *Journal of Muscle Food*, 6, 139-160.
- Xiong, Y. L. (2000). Protein oxidation and implications for muscle foods quality. In E. A. Decker, C. Faustman, & C. J. Lopez-Bote (Eds.), *Antioxidants in muscle foods* (pp. 85–111). New York: Wiley.



## CAPÍTULO VI.

**Estatus:** enviado a *Food Chemistry*, 9 de Mayo de 2013.

**Impact of high pressure treatment and intramuscular fat content on colour changes and protein and lipid oxidation in sliced and vacuum-packed Iberian dry-cured ham**

Verónica Fuentes, Mariana Utrera, Mario Estévez, Jesús Ventanas and Sonia Ventanas\*.

Department of Animal Production and Food Science. University of Extremadura,  
10003 Cáceres, Spain.

\*Corresponding author: Sonia Ventanas, email: [sanveca@unex.es](mailto:sanveca@unex.es)

## **Abstract**

The effect of high hydrostatic pressure (600 MPa) and intramuscular fat content on colour parameters and oxidative stability of lipids and proteins in sliced vacuum-packed Iberian dry-cured ham throughout refrigerated storage (120 days at 2 °C) were investigated. Several studies have investigated the influence of HHP on lipid oxidation of meat products. However, its effects on protein carbonylation, as the influence of IMF content on this carbonylation are still poorly understood. Furthermore this study supplied information on likely effects that IMF can have on changes caused by HHP. HHP treatment had a significant effect on lean lightness after 0 and 120 days of storage while IMF content increased lightness and yellowness over time. Regarding oxidative stability HHP treatment had not a great impact on lipid and protein oxidation. However, its effect depended on IMF content showing samples with a high IMF a larger lipid instability while samples with a low IMF a larger protein carbonylation.

## **Keywords**

Sliced dry-cured ham, AAS, GGS, Lipid oxidation, IMF, High pressure.

## INTRODUCTION

Intramuscular fat content (IMF) plays a major role in consumer's acceptability of dry-cured products owing to its influence on the appearance, juiciness and flavour of these muscle foods (Ventanas, Ventanas, & Ruiz, 2007). While colour, flavour and texture traits are the main quality factors in Iberian dry-cured meat products the modification of these parameters during the application of innovative technologies (i.e. high-hydrostatic pressure, HHP) and the subsequent storage requires further investigation. Recent studies have related protein oxidation and colour changes in meat products (Fuentes, Ventanas, Morcuende, Estévez, & Ventanas, 2010; Utrera, Armenteros, Ventanas, Solano, & Estévez, 2012). The formation of carbonyl compounds is one of the most marked changes occurring during the oxidation of proteins (Estévez, 2011). Estévez, Ollilainen, and Heinonen (2009) applied a method to detect particular protein carbonyls namely,  $\alpha$ -amino adipic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes (AAS and GGS, respectively) using liquid-chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry (LC-ESI-MS) in myofibrillar proteins. This method has been successfully applied to various meat products confirming the potential of both semialdehydes as indicators of protein oxidation (Armenteros, Heinonen, Ollilainen, Toldrá, & Estévez, 2009). In addition to the potential impact of protein carbonylation of particular meat quality traits, the formation of protein carbonyls is also responsible for the loss of nutritional value and impaired digestibility (Estévez, 2011).

In recent years, as a result of new consumer concerns, industry demands the use of preservation methods which increases the shelf life of manufactured foods ensuring food safety. Among these innovative technologies, vacuum packaging in combination with HHP, has been found to reduce efficiently microbial counts and to prevent products from contamination (Hugas, Garriga, & Monfort, 2002). Nevertheless, intense HHP treatments (> 400 MPa) induce undesirable changes on meat and meat products, modifying their texture and colour and increasing lipid oxidative reactions (Cheftel, & Culioli, 1997). However, its impact on the oxidative degradation of myofibrillar proteins and the potential impact on particular traits is still poorly understood. On the contrary, lipid oxidation impact on features traits of meat products as the factors involved

in its extent have been largely studied (Gandemer, 2002). Overall, the IMF content and storage conditions in meat and meat products are closely related to lipid oxidation (Ruiz, Ventanas, Cava, Andrés, & García, 1999; Ventanas, Estévez, Andrés, & Ruiz, 2008). However, as far as the effect of IMF content on protein carbonylation has been poorly studied. Furthermore, it is currently unknown, whether the IMF content has an effect or not on the oxidative changes induced by HHP.

The aim of this study was to evaluate the combined effect of HHP treatment and IMF content on colour changes (external fat and lean) and oxidative stability (lipid oxidation and protein carbonylation) as well as their evolution throughout chilled storage and the implications of each factor on these traits in sliced and vacuum-packed Iberian dry-cured ham.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Sampling, packaging and pressure treatment**

A total of 18 dry-cured hams (7.5 kg average) were obtained from free-range reared Iberian pigs fed on grass and commercial concentrates during the fattening period (60 days prior to slaughter) and slaughtered at 160 kg live weight and 12 months of age (Campo, DOP Dehesa de Extremadura). Green hams were processed according to the method described by Fuentes et al., (2010). Once the ripening process was finished (~ 30% weight loss), the hams were deboned and two different sections (*Quadriceps femoris*: flank and gluteal muscles: hip) varying in the IMF content, were extracted. Afterwards, muscles were sliced (1 mm thickness) and vacuum-packed (polyamide and polyethylene in the upper film with 34.0 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup> permeability to O<sub>2</sub> at 23 °C and 85 % HR, polyamide and polyethylene in the lower film with 18.0 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup> permeability to O<sub>2</sub> at 23 °C and 85 % HR) (Mobepack Company, Salamanca, Spain). Approximately 108 packages (54 packages of flank samples and 54 packages of hip samples) containing 100 g of sliced Iberian dry-cured ham were obtained. Half of the packages of each group were subjected to HHP treatment at the CENTA Institute (Monells, Girona, Spain). Packages of sliced dry-cured ham



were pressurized at 600 MPa for 6 min in a bath set at 12 °C (NC Hyperbaric Wave 6500/120; 120 l and 6500 bars). Subsequently, all vacuum packages of Iberian dry-cured ham slices, namely, (i) HHPHip (samples subjected to HHP with high IMF content), (ii) HHPFlank (samples subjected to HHP with low IMF content) (iii) CHip (non-pressurized samples with high IMF content) (iiii) CFlank (non-pressurized samples with low IMF content) were stored in darkness at  $2 \pm 1$  °C. The samples were opened for subsequent analysis after 0, 30 and 120 days of storage.

### **Physico-chemical analyses**

The proximate composition of sliced Iberian dry-cured hams was determined as follows: moisture content, protein content and chloride content were determined using official methods (AOAC, 2000). The Folch method (Folch, Lees, & Sloane Stanley, 1957) was employed for determining IMF. I

### **Instrumental colour measurements**

Instrumental colour (CIE  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ; CIE, 1976) was measured on the surface and external fat of sliced dry-cured hams using a Minolta chromameter CR-300 (Minolta Camera Corp., Meter Division, Ramsey, NJ). The following colour coordinates were determined: lightness ( $L^*$ ), redness ( $a^*$ , red  $\pm$  green) and yellowness ( $b^*$ , yellow  $\pm$  blue). Before each measurement the equipment was standardised against a white tile. D 65 illuminant and 0 ° standard observer angle were used. Analyses were carried out at 18 °C on randomly selected slices at 0, 30 and 120 days of storage. All measurements were made in triplicate on the surface of the external fat and the lean of vacuum-packed slices.

### **TBARS analysis**

Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) were assessed following the method described by Salih, Smith, Price, and Dawson, (1987). The standard curve was prepared using a 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP) solution (0.2268 g) in 3.86 % perchloric acid. TBARS are expressed as mg of malondialdehyde (MDA) per  $\text{kg}^{-1}$  of sample.

### **Volatile aldehydes analysis**

Volatile aldehydes were analysed by headspace-SPME and GC/MS (gas chromatograph Hewlett–Packard 5890 series II coupled to a mass selective detector Hewlett–Packard HHP-5791A). One gram of minced sample was weighed into a 4 mL vial. All vials were closed with a teflon/silicone septum. An SPME fibre (50/30  $\mu\text{m}$  divinylbenzene- carboxen-polydimethylsiloxane coating) was inserted through the septum and exposed to the headspace of the vial. Vials were pre-conditioned for 15 min at 37 °C. Extraction was carried out at 37 °C for 30 min in a water bath. After extraction, the SPME fibre was immediately transferred to the injector of the chromatograph which was in splitless mode at 270 °C. The separation of volatile compounds was performed on a 5 % phenyl–methyl silicone (HHP-5) bonded phase fused silica capillary column (Hewlett–Packard, 50 m x 0.32 mm i.d, film thickness 1.05  $\mu\text{m}$ ), operating at 6 psi of column head pressure. Oven programme was: 40 °C for 10 min, 5 °C  $\text{min}^{-1}$  to 200 °C, 15 °C  $\text{min}^{-1}$  to 250 °C, and held 250 °C for 10 min. The transfer line to the mass spectrometer was maintained at 270 °C. The mass spectra were obtained using a mass selective detector by electronic impact at 70 eV, a multiplier voltage of 1756 V and collecting data at a rate of 1 scan  $\text{s}^{-1}$  over the  $m/z$  range 30–500. Volatile compounds as pentanal, hexanal, heptanal, nonanal, octanal and 1-octen-3-ol as indicators of lipid oxidation and 2-methylbutanal and 3-methylbutanal compounds as the main branched aldehydes derived from Strecker degradation reactions of amino acids were measurement. All volatile compounds were tentatively identified by comparing their mass spectrum and linear retention index with that of the standards. Results are given in area units (AU). Ten repetitions per type of sliced ham were performed.

### **Protein oxidation measurements**

The protein oxidation markers,  $\alpha$ -amino adipic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes (AAS and GGS, respectively) were analysed using the method described by Utrera, Morcuende, Rodríguez-Carpena, and Estévez, (2011) upon derivatization with *p*-amino benzoic acid (ABA) and analysis by HPLC. Standard AAS and GGS were synthesised in vitro from *N*-acetyl- L-lysine and *N*-acetyl-L-

ornithine using lysyl oxidase activity from egg shell membrane as described by Estévez et al. (2009). A Shimadzu 'Prominence' HPLC apparatus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), equipped with a quaternary solvent delivery system (LC-20AD), a DGU-20AS on-line degasser, a SIL-20A auto-sampler, a RF-10A XL fluorescence detector, and a CBM-20A system controller, was used. An aliquot (1  $\mu$ L) from the reconstituted protein hydrosylates was injected and analyzed in the above mentioned HPLC equipment. AAS-ABA and GGS-ABA were eluted in a Cosmosil 5C18-AR-II RP-HPLC column (5  $\mu$ m, 150 x 4.6 mm) equipped with a guard column (10 x 4.6 mm) packed with the same material. The flow rate was kept at 1 mL/min and the temperature of the column was maintained constant at 30 °C. The eluate was monitored with excitation and emission wavelengths set at 283 and 350 nm, respectively. Standards (0.1  $\mu$ L) were run and analyzed under the same conditions. Identification of both derivatized semialdehydes in the FLD chromatograms was carried out by comparing their retention times with those from the standard compounds. The peaks corresponding to AAS-ABA and GGS-ABA were manually integrated from FLD chromatograms and the resulting areas plotted against an ABA standard curve with known concentrations that ranged from 0.1 to 0.5 mM. Results are expressed as nmol of carbonyl compound per mg of protein.

### **Data analysis**

The effects of HHP treatment and IMF content on colour, lipid and protein oxidation occurred during chilled storage of sliced and vacuum-packed dry-cured ham, were analysed by two-way ANOVA with HHP treatment (control and treated) and IMF content (Flank and Hip) as main factors. To analyse the effect of storage time a one-way ANOVA was performed. The Tukey test was used at the 5 % level to make comparisons between sample means when pertinent. All statistical analyses were conducted using the software SPSS (v 15.0) for windows.

## **RESULTS**

### **Chemical composition**

Significant differences were found in the chemical composition between samples obtained from the two different locations evaluated (Flank and Hip). Proximate composition of Iberian dry cured hams were (means  $\pm$  standard deviation): moisture content (Flank: 42.84 %  $\pm$  1.57 and Hip: 39.66 %  $\pm$  3.46;  $p < 0.01$ ), chloride content (Flank: 3.76 %  $\pm$  0.56 and Hip: 3.13 %  $\pm$  0.65;  $p < 0.05$ ), intramuscular fat (IMF) content (Flank: 9.91 %  $\pm$  0.78 and Hip: 15.81 %  $\pm$  1.07;  $p < 0.001$ ) and protein content (Flank: 41.78 %  $\pm$  2.10 and Hip: 39.37 %  $\pm$  2.66;  $p < 0.05$ ). These results are consistent with previous studies carried out in sliced Iberian dry-cured ham (Fuentes et al., 2010).

### **Colour analysis**

**Table 1** shows  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  values measured on the surface of the external fat and the lean of sliced Iberian dry-cured hams at 0, 30 and 120 days of chilled storage.

**Table 1.** Effect of HHP treatment (control (C) vs. HHP (HHP)) and IMF content (Flank: low and Hip: high) on instrumental colour measurements (mean  $\pm$  standard deviation) of sliced dry-cured ham during chilled storage at 2 °C.  $p$ -values of both factors (Treatment: T and IMF content: F) and interaction (T\*F).

<b>FAT</b>		CFlank	CHip	HHPFlank	HHPHip	T	F	T*F
L*	0d	67.17±2.02 <sup>ab,y</sup>	70.58±3.6 <sup>a,z</sup>	65.96±2.99 <sup>b,y</sup>	69.83±2.93 <sup>a,y</sup>	ns		
	30d	70.61±1.84 <sup>b,x</sup>	73.96±3.01 <sup>a,xy</sup>	71.15±2.76 <sup>ab,x</sup>	73.44±2.27 <sup>ab,x</sup>	ns		
	120d	71.25±3.04 <sup>x</sup>	74.40±2.97 <sup>x</sup>	71.89±4.32 <sup>x</sup>	75.00±2.36 <sup>x</sup>	ns		
a*	0d	2.64±0.33 <sup>ab</sup>	2.09±0.60 <sup>b,xy</sup>	3.00±0.45 <sup>a</sup>	2.63±0.58 <sup>ab,x</sup>	*		
	30d	3.12±0.48 <sup>a</sup>	2.55±0.58 <sup>ab,x</sup>	3.07±0.57 <sup>a</sup>	2.34±0.40 <sup>b,xy</sup>	ns		
	120d	2.68±0.87 <sup>a</sup>	1.45±0.65 <sup>by</sup>	2.59±0.89 <sup>a</sup>	1.91±0.66 <sup>ab,y</sup>	ns		
b*	0d	8.55±1.02 <sup>z</sup>	8.96±0.25 <sup>z</sup>	8.35±1.19 <sup>y</sup>	8.56±0.30 <sup>z</sup>	ns		
	30d	11.22±1.19 <sup>y</sup>	11.06±0.47 <sup>y</sup>	11.09±1.13 <sup>x</sup>	11.10±0.34 <sup>y</sup>	ns		
	120d	12.88±1.12 <sup>x</sup>	12.40±0.74 <sup>x</sup>	12.50±1.69 <sup>x</sup>	12.93±0.69 <sup>x</sup>	ns		
<b>LEAN</b>								
L*	0d	32.41±1.81 <sup>c,xy</sup>	34.69±0.89 <sup>b,xy</sup>	34.70±1.92 <sup>b</sup>	38.17±1.83 <sup>a,x</sup>	***	***	ns
	30d	33.92±2.04 <sup>b,x</sup>	35.35±1.55 <sup>ab,x</sup>	34.86±2.47 <sup>ab</sup>	36.89±1.49 <sup>a,xy</sup>	ns	*	ns
	120d	31.49±1.77 <sup>c,z</sup>	33.25±1.52 <sup>bc,z</sup>	34.50±2.39 <sup>ab</sup>	35.67±1.03 <sup>a,z</sup>	***	*	ns

a*	0d	15.80±1.36 <sup>y</sup>	16.79±1.61 <sup>z</sup>	15.48±1.70 <sup>z</sup>	16.47±2.16 <sup>y</sup>	ns	ns	ns
	30d	19.67±1.50 <sup>x</sup>	19.95±1.46 <sup>x</sup>	18.18±2.21 <sup>x</sup>	19.86±2.32 <sup>x</sup>	ns	ns	ns
	120d	18.43±1.51 <sup>x</sup>	18.40±2.02 <sup>xy</sup>	17.51±1.64 <sup>xy</sup>	19.32±2.49 <sup>x</sup>	ns	ns	ns
b*	0d	5.03±0.37 <sup>c,y</sup>	6.50±0.73 <sup>ab,y</sup>	5.56±0.87 <sup>bc,y</sup>	6.88±1.01 <sup>a,y</sup>	ns	***	ns
	30d	7.22±0.87 <sup>bc,x</sup>	8.36±0.94 <sup>ab,x</sup>	7.06±0.80 <sup>c,x</sup>	8.59±1.26 <sup>a,x</sup>	ns	***	ns
	120d	6.89±0.82 <sup>b,x</sup>	8.24±1.59 <sup>ab,x</sup>	7.45±1.15 <sup>b,x</sup>	9.11±1.22 <sup>a,x</sup>	ns	**	ns

*p*-values: ns:  $p > 0.05$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

<sup>a-c</sup> Different letters within the same row denote significant differences between means at  $p < 0.05$ : IMF and HHP treatment.

<sup>x-z</sup> Different letters within the same column denote significant differences between means at  $p < 0.05$ : storage time.

Colour parameters in external fat were not affected by HHP treatment except for  $a^*$  values which showed significant differences ( $p < 0.05$ ) at the beginning of storage period (0 days). Redness ( $a^*$  values) of external fat in pressurized samples was more intense than in control ones at this time of storage, but this difference disappeared after 30 and 120 days of storage ( $p > 0.05$ ). Moreover, time of storage significantly affected  $L^*$  ( $p < 0.001$ ),  $a^*$  ( $p < 0.01$ ) and  $b^*$  ( $p < 0.001$ ) values of the external fat (**Table 1**). In general, lightness showed an upward trend during storage, reaching statistical differences in all groups at the end of the chilled storage ( $p < 0.05$ ). Storage time significantly affected  $a^*$  values of external fat in Hip samples decreasing with the storage time particularly in HHP samples (HHPHip). Finally,  $b^*$  parameter constantly increased throughout storage time in all studied groups.

Regarding colour parameters of the lean in dry-cured ham slices,  $L^*$  was significantly influenced by HHP treatment after 0 and 120 days of storage ( $p < 0.001$ ). Pressurized samples showed higher  $L^*$  values compared to control ones at the beginning and at the end of storage. The IMF content also affected the instrumental colour measurements leading to higher  $L^*$  and  $b^*$  values in samples with the highest IMF content (Hip group) along storage.

$L^*$  ( $p < 0.05$ ),  $a^*$  ( $p < 0.001$ ) and  $b^*$  ( $p < 0.001$ ) of the lean were significantly affected by storage time since these parameters varied over time.  $L^*$  values showed a significant decrease throughout storage time except for HHPFlank samples. However,  $a^*$  and  $b^*$  parameters showed an upward trend during storage in all groups although this effect was particularly marked during the first 30 days of storage.

## **TBARS and volatile aldehydes**

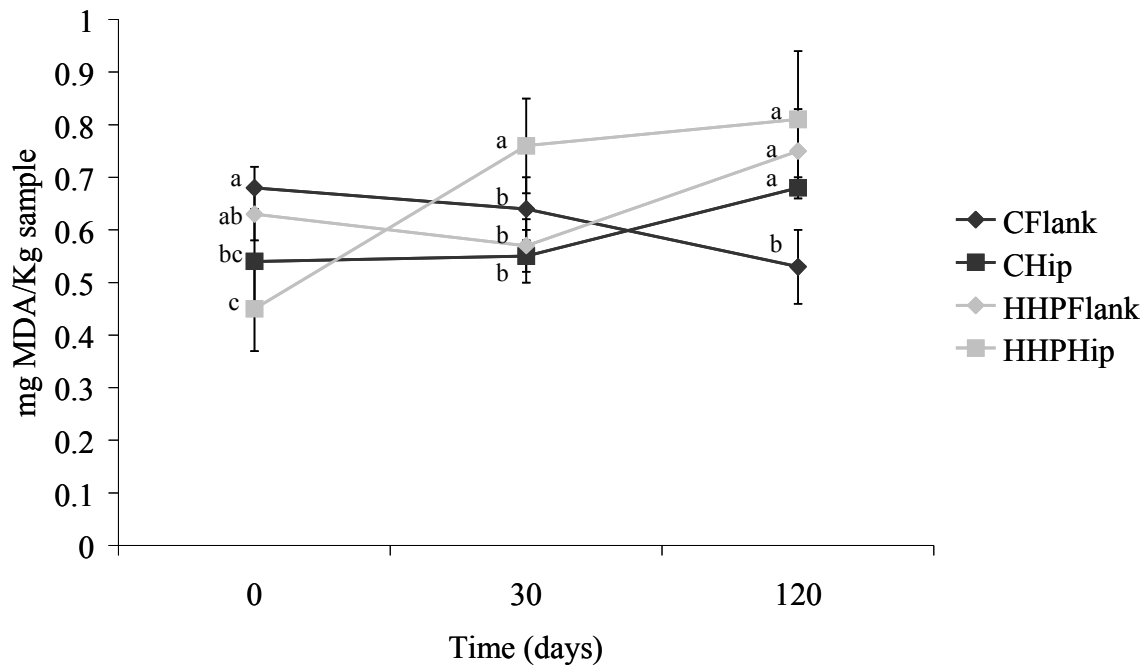
### **TBARS**

**Figure 1** shows the effect of HHP treatment, IMF content and storage time on the TBARS values of sliced and vacuum-packed Iberian dry-cured hams stored at 2 °C. HHP treatment had a significant effect on all batches over time. Control samples showed a larger extent of lipid oxidation compared to its pressurized counterparts ( $p < 0.05$ ) at the beginning of the storage. However, pressurized samples showed the highest TBARS values at the end of the storage ( $p < 0.001$ ). Moreover, the TBARS values were significantly affected by IMF content after 0 and 120 days of chilled storage. Flank samples (with a lower IMF content) showed a higher extent of lipid oxidation compared to Hip samples at 0 days of storage ( $p < 0.001$ ). On the contrary, Hip samples (with a higher IMF content) displayed a larger extent of lipid oxidation after 120 days of storage ( $p < 0.01$ ). TBARS values displayed an upward trend during the storage of pressurized samples particularly for those with the highest IMF content at 30 days of storage (HHPHip). At the end of the storage (120 days), CFlank samples displayed the lowest TBARS values compared to the rest of samples ( $p < 0.01$ ) including the pressurized ones (HHPFlank). Nevertheless, no

significant differences in TBARS values were found between CHip and HHPHip samples.

Evolution of TBARS values along the storage (0, 30 and 120 days) was significantly different between the four studied groups of sliced and vacuum-packed dry-cured hams. CFlank samples showed a significant ( $p < 0.01$ ) decrease in TBARS after 120 days of storage while HHPHip ones showed a significant increase in TBARS values after 30 days of chilled storage ( $p < 0.001$ ). The latter samples exhibited the most intense increase in TBARS values over time. Finally, slight variations in TBARS values were found for HHPFlank and CHip during the storage although the highest values were exhibited at 120 days of chilled storage ( $p < 0.01$ ) for both groups.

**Figure 1.** Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) in treated or non-treated dry-cured ham slices with high pressure (control (C) vs. HHP (HHP)) and with different IMF content (Flank vs. Hip) stored in vacuum at 2 °C during 120 days. Different letters within the same line denote significant differences between means at  $p < 0.05$ .





## **Volatile aldehydes**

Amongst all volatiles found in the headspace of sliced and vacuum-packed dry-cured hams (**Table 2**), two of them were Strecker aldehydes, particularly 3-methylbutanal and 2-methylbutanal, and six of them were aldehydes derived from lipid oxidation, particularly pentanal, heptanal, 1-octen-3-ol, octanal, nonanal, and hexanal which was the most abundant volatile in all samples.

Concentrations of 3-methylbutanal at 0 and 30 days of storage and of 2-methylbutanal at 30 days of storage were significantly lower in pressurized samples than in control ones ( $p < 0.001$ ). However, no significant effect of HHP treatment on the concentration of both compounds was found at the end of the chilled storage ( $p > 0.05$ ). Regarding to the rest of volatile aldehydes, most volatile compounds showed higher headspace concentrations in control samples compared to pressurized samples at 0 and 30 days of the chilled storage although for nonanal and 1-octen-3-ol these differences were not significant at 0 and 30 days of storage, respectively. After 120 days of storage, differences in headspace concentration of all volatile compound were not significant between control and pressurized samples except for hexanal. Pressurized samples exhibited a significant higher hexanal content than control ones after 120 days of storage (main effect of HHP;  $p < 0.05$ ).

Regarding the effect of IMF content on aldehydes concentrations, a significant effect was found for all volatile compounds at all sampling times except for 1-octen-3-ol at 120 days ( $p > 0.05$ ). Both Strecker aldehydes, 3-methylbutanal and 2-methylbutanal exhibited higher concentrations in Hip samples (higher IMF content) at the beginning of the chilled storage ( $p < 0.05$  for 3-methylbutanal and  $p < 0.001$  for 2-methylbutanal). However, at 30 and 120 days, samples with the lowest IMF content (Flank) exhibited the highest concentrations for both compounds. A marked effect of IMF content on lipid-derived volatiles compounds concentration was found and particularly on hexanal content, increasing with the IMF content at all sampling times.

Regarding the effect of the storage time on studied volatile aldehydes, both 3-methylbutanal and 2-methylbutanal concentrations significantly decreased with the storage time except in CFlank samples where an increase after 30 days of storage was detected for both compounds. Overall, the lipid-derived volatile compounds showed a significant increase throughout storage except for pentanal compound which showed a significant decrease over time. Regarding hexanal, a significant decrease with the storage time was found in control samples while pressurized samples showed an increase along chilled storage although this effect was not significant in HHPHip samples ( $p > 0.05$ ).

**Table 2.** Effect of HHP treatment (control (C) vs. HHP (HHP)) and IMF content (Flank: low and Hip: high) on chromatographic areas (AU x 10<sup>7</sup>) (mean ± standard deviation) of volatile aldehydes detected in sliced dry-cured ham during chilled storage at 2 °C. *p*-values of both factors (Treatment: T and IMF content: F) and interaction (T\*F).

	CFlank	CHip	HHPFlank	HHPHip	T	F	T*F
<b>3-Methylbutanal</b>							
0d	3.05±0.42 <sup>a,y</sup>	3.18±0.68 <sup>a,x</sup>	1.99±0.20 <sup>b</sup>	2.67±0.54 <sup>a,x</sup>	***	*	ns
30d	4.79±0.79 <sup>a,x</sup>	3.20±0.85 <sup>b,x</sup>	2.11±0.53 <sup>c</sup>	2.02±0.45 <sup>c,y</sup>	***	***	**
120d	2.23±0.54 <sup>a,z</sup>	1.53±0.33 <sup>b,y</sup>	2.29±0.56 <sup>a</sup>	1.49±0.33 <sup>b,z</sup>	ns	***	ns
<b>2-Methylbutanal</b>							
0d	0.88±0.10 <sup>bc,y</sup>	1.22±0.25 <sup>a,x</sup>	0.80±0.09 <sup>c,xy</sup>	1.09±0.24 <sup>ab,x</sup>	ns	***	ns
30d	1.43±0.39 <sup>a,x</sup>	0.91±0.09 <sup>b,y</sup>	0.71±0.07 <sup>b,y</sup>	0.77±0.09 <sup>b,y</sup>	***	**	***
120d	0.85±0.09 <sup>ab,y</sup>	0.79±0.09 <sup>b,y</sup>	1.03±0.36 <sup>b,x</sup>	0.75±0.10 <sup>b,y</sup>	ns	**	ns
<b>Pentanal</b>							

0d	1.86±0.33 <sup>b,x</sup>	3.07±0.59 <sup>a,x</sup>	0.64±0.14 <sup>c</sup>	2.53±1.05 <sup>ab,x</sup>	***	***	ns
30d	0.80±0.25 <sup>c,y</sup>	2.55±0.80 <sup>a,x</sup>	0.65±0.16 <sup>c</sup>	1.63±0.28 <sup>b,y</sup>	**	***	*
120d	0.80±0.10 <sup>c,y</sup>	1.36±0.50 <sup>b,y</sup>	0.72±0.10 <sup>c</sup>	1.84±0.54 <sup>a,xy</sup>	ns	***	*
Hexanal							
0d	16.3±1.31 <sup>b,x</sup>	22.9±3.81 <sup>a,x</sup>	6.53±1.48 <sup>c,y</sup>	14.7±6.70 <sup>b</sup>	***	***	ns
30d	8.93±1.68 <sup>c,y</sup>	21.4±4.85 <sup>a,x</sup>	8.35±1.85 <sup>c,x</sup>	17.00±1.75 <sup>b</sup>	*	***	*
120d	8.82±0.10 <sup>b,y</sup>	13.8±2.82 <sup>a,y</sup>	9.45±1.12 <sup>b,x</sup>	16.7±4.48 <sup>a</sup>	*	***	ns
Heptanal							
0d	1.21±0.16 <sup>bc,x</sup>	2.42±0.77 <sup>a</sup>	0.61±0.09 <sup>c,y</sup>	1.32±0.71 <sup>b,y</sup>	***	***	ns
30d	0.75±0.11 <sup>c,z</sup>	2.22±0.64 <sup>a</sup>	0.76±0.11 <sup>c,y</sup>	1.28±0.27 <sup>b,y</sup>	***	***	***
120d	1.01±0.15 <sup>c,y</sup>	2.00±0.56 <sup>b</sup>	1.04±0.33 <sup>c,x</sup>	2.05±0.72 <sup>a,x</sup>	ns	***	ns
1-Octen-3ol							
0d	0.42±0.09 <sup>a,y</sup>	0.52±0.09 <sup>a,xy</sup>	0.30±0.08 <sup>b,y</sup>	0.45±0.10 <sup>a,y</sup>	**	***	ns
30d	0.23±0.08 <sup>c,z</sup>	0.43±0.09 <sup>a,y</sup>	0.26±0.09 <sup>bc,y</sup>	0.34±0.07 <sup>ab,z</sup>	ns	***	*
120d	0.53±0.08 <sup>x</sup>	0.59±0.09 <sup>x</sup>	0.62±0.08 <sup>x</sup>	0.55±0.09 <sup>x</sup>	ns	ns	*
Octanal							
0d	0.47±0.10 <sup>b,y</sup>	1.05±0.32 <sup>a,xy</sup>	0.46±0.10 <sup>b,y</sup>	0.61±0.14 <sup>b,y</sup>	**	***	**
30d	0.36±0.08 <sup>c,z</sup>	0.83±0.10 <sup>a,y</sup>	0.39±0.09 <sup>c,y</sup>	0.56±0.10 <sup>b,y</sup>	***	***	***
120d	0.67±0.09 <sup>b,x</sup>	1.09±0.23 <sup>a,x</sup>	0.69±0.10 <sup>b,x</sup>	1.33±0.49 <sup>a,x</sup>	ns	***	ns

Nonanal

0d	0.48±0.10 <sup>b,y</sup>	0.90±0.10 <sup>a,x</sup>	0.79±0.16 <sup>a,x</sup>	0.55±0.08 <sup>b,y</sup>	ns	*	***
30d	0.26±0.06 <sup>ab,z</sup>	0.32±0.05 <sup>a,y</sup>	0.21±0.06 <sup>b,y</sup>	0.27±0.09 <sup>ab,z</sup>	*	*	ns
120d	0.95±0.10 <sup>ab,x</sup>	1.03±0.22 <sup>ab,x</sup>	0.87±0.15 <sup>b,x</sup>	1.13±0.16 <sup>a,x</sup>	ns	**	ns

*p*-values: ns:  $p > 0.05$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

<sup>a-c</sup> Different letters within the same row denote significant differences between means at  $p < 0.05$ : IMF and HHP treatment.

<sup>x-z</sup> Different letters within the same column denote significant differences between means at  $p < 0.05$ : storage time.

### AAS and GGS

**Table 3** shows the concentration of protein oxidation markers measured in sliced and vacuum-packed dry-cured hams throughout the storage. Results revealed that the effect of HHP treatment was more marked on AAS levels at the beginning of the storage time (0 and 30 days) ( $p < 0.05$ ) while GGS levels were more affected at the end of the chilled storage (120 days) ( $p < 0.01$ ). Pressurized samples showed lower levels of AAS at 0 and 30 days of storage. These samples had higher concentrations of GGS after 120 days of chilled storage. Moreover, T\*F interaction revealed that the effect of HHP on GGS levels was only significant in Flank samples. IMF content showed a significant effect on AAS content after 30 days of storage and on GGS content after 30 and 120 days of storage. Flank samples containing lower IMF displayed higher values of both carbonyls compared to Hip samples. Finally, storage time had a significant effect on AAS concentration in samples obtaining from Hip section ( $p < 0.05$ ), decreasing after 30 days of storage and then remaining constant until the end of the storage.

**Table 3.** Effect of HHP treatment (control (C) vs. HHP (HHP)) and IMF content (Flank: low and Hip: high) on levels of AAS and GGS as analysed by HPLC-FLD (Nmol/mg protein) ( $10^5$ ) in sliced dry-cured ham during chilled storage at 2 °C.

<b>AAS</b>	CFlank	CHip	HHPFlank	HHPHip	T	F	T*F
0 d	1.76±0.24	1.88±0.14 <sup>x</sup>	1.48±0.16	1.71±0.26 <sup>x</sup>	*	ns	ns
30 d	1.71±0.62 <sup>a</sup>	1.44±0.34 <sup>ab,y</sup>	1.44±0.32 <sup>ab</sup>	1.13±0.41 <sup>b,y</sup>	*	*	ns
120 d	1.24±0.11 <sup>b</sup>	1.58±0.11 <sup>ab,xy</sup>	1.76±0.17 <sup>a</sup>	1.17±0.41 <sup>b,xy</sup>	ns	ns	**
<b>GGS</b>							
0 d	0.32±0.03	0.27±0.04	0.38±0.07	0.32±0.07	ns	ns	ns
30 d	0.27±0.01 <sup>b</sup>	0.33±0.04 <sup>ab</sup>	0.45±0.09 <sup>a</sup>	0.22±0.06 <sup>b</sup>	ns	*	***
120 d	0.32±0.05 <sup>b</sup>	0.27±0.01 <sup>b</sup>	0.43±0.05 <sup>a</sup>	0.29±0.02 <sup>b</sup>	**	**	*

*p*-values: ns:  $p > 0.05$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

<sup>a-c</sup> Different letters within the same row denote significant differences between means at  $p < 0.05$ : IMF and HHP treatment.

<sup>x-z</sup> Different letters within the same column denote significant differences between means at  $p < 0.05$ : storage time.

## DISCUSSION

### Effect of HHP treatment

Pressurized samples exhibited at 0 and 120 days of chilled storage, higher L\* values than control ones. Similarly, Clariana, Guerrero, Sárraga, and García-Regueiro, (2012) observed an increase in L\* values in pressurized and sliced dry-cured ham after 50 days of refrigerated storage. Previous studies related the increase in L\* values of pressurized meat products (500 MPa) to a new arrangement of surface proteins promoted by HHP, resulting in the coagulation or denaturalization of proteins, which would increase the reflected/absorbed light ratio (Mor-Mur, & Yuste, 2003). HHP treatment has an impact on the structure of myofibrillar proteins (Goutefongea, Rampon, Nicolas, & Dumont, 1995) and accordingly the HHP would have affected the lightness of the lean surface of the sliced ham of the present study. As consequence of these changes of structure and surface properties, most likely protein denaturation, lean lightness varied over time, explaining the decrease in L\* values mainly after 120 days of storage. Other modification that might affect light diffusion is a fat crystallization (McClements, & Decker, 2010). According to these authors, decreasing of temperature contributes to fat crystallization. Therefore a fat crystallization along storage time would support the constant increase in fat lightness. Regarding a\* parameter, no effect of HHP treatment was found on these values which might be attributed to the high stability provided by the vacuum-packing system. However, a previous study carried out by Fuentes et al., (2010) reported a decrease of a\* values in pressurized and vacuum-packed samples after 30 days of refrigerated storage. In this previous study, vacuum-packed sliced hams were refrigerated under white fluorescent light following a light/dark cycle of 12 h. In contrast, in the present study vacuum-packed sliced hams were stored in the darkness during the whole experiment. In this sense, Clariana et al., (2012) observed the influence of different light conditions on a\* parameter in sliced skin vacuum-packed dry-cured ham and reported that a\* values decrease in the light as a potential photodegradation of the nitrosylmyoglobin. Therefore, the presence or the lack of light during storage would explain the difference found between these results and those derived from the previous study.

Although HHP treatment had a significant effect on lipid oxidation, slight differences in lipid oxidation phenomenon measured as TBARS values was observed between pressurized and control samples. Previous studies carried out in dry-cured hams, reported different results in TBARS values depending on the pressure level, the storage time and the storage conditions (light or dark) (Clariana et al., 2012). Regarding storage time several results have been found. A previous study performed by Cilla, Martínez, Beltrán, & Roncalés, (2006) reported no differences in TBARS values throughout refrigerated storage in vacuum-packaged boneless dry-cured hams, whereas others authors as Parra et al., (2010) observed an upward trend during the storage of vacuum-packed dry-cured ham. Diverse factors such as HHP and IMF content, present in this study, have an influence on the extent of lipid oxidation, and thus, samples subjected to HHP treatment and with a high IMF content (HHPHip) showed the farthest and highest MDA formation over time. The decrease observed in CF flank at the end of storage reflected that this compound (MDA) could be involved in other reactions. According to Shahidi (1992) MDA values decline due to further reaction with amino groups. Regarding levels of hexanal, an index of lipid oxidation, were significantly higher in pressurized samples compared to control ones particularly at the end of the storage time, supporting that the effect of HHP treatment on lipid oxidation was particularly marked during the last stages of the refrigerated storage. In good agreement with the present results, several authors have reported a significant effect of HHP on the release of volatile aldehydes from lipid oxidation in Iberian dry-cured ham (Fuentes et al., 2010). The hexanal results over time reflected that this aldehyde could be involved in further reactions and therefore, the amount of hexanal in meat products varies considerably during processing and storage (Andrés, Cava, Ventanas, Muriel, & Ruiz, 2004). Similarly to MDA evolution over time, CF flank samples showed the lowest hexanal values and the strongest decrease after 30 days of storage. Overall, HHP accelerates the formation and breakdown of hydroperoxides and hence, the chain reactions involved in lipid oxidation (Cheftel & Culioli, 1997). Lipid-derived volatiles such as the aldehydes detected in the present study, are formed from the breakdown of hydroperoxides and other reactive-oxygen species formed in the early stages of oxidation (Estévez,

Morcuende, & Ventanas, 2008a). These facts would explain the different results observed between pressurized and control samples along storage time.

Control samples showed a higher headspace concentrations of 3-methylbutanal at 0 and 30 days of storage and of 2-methylbutanal at 30 days of storage. Fuentes et al., (2010) observed no effect of HHP treatment on 3-methylbutanal headspace concentration and a higher 2-methylbutanal concentration in control samples than in the pressurized counterparts. The Strecker degradation of amino acids is a minor pathway of Maillard reactions (Cremer, & Eichner, 2000) and involves the oxidative deamination and decarboxylation of  $\alpha$ -amino acids. According to Hidalgo, and Zamora, (2004), this reaction occurs in the presence of lipid carbonyls such as volatile aldehydes. This fact would explain the similar behaviour found between Strecker and lipid aldehydes. In the present study, at the beginning of the storage both, Strecker aldehydes and lipid derived aldehydes, showed a greater release in control samples than in the treated ones. At the end of the storage this difference diminished between treated and non-treated hams, except for hexanal values which showed a significant difference during the whole experiment ( $p < 0.05$ ).

Regarding protein oxidation, HHP treatment decreased the AAS concentration at 0 and 30 days of storage but pressurized samples showed a higher GGS concentration compared to non-pressurized samples at the end of the storage. A previous study carried out by Estévez et al., (2009) observed that AAS, unlike GGS, decreased in a late event during an in vitro oxidation assay, denoting that this semialdehyde might act as a reactant for further reactions. In fact, AAS formed as a result of lysine oxidation could be eventually involved in further reactions during meat processing and storage (Estévez, 2011). And its involvement in other reactions would explain the effect of storage time on AAS levels (above mentioned). In the present study HHP treatment could have promoted the formation of both carbonyls, AAS and GGS, while a lower stability of the former might have caused the obtained results. The HHP treatment could have promoted its involvement in further reactions explaining that control samples had higher AAS values than pressurized ones. Regarding results from GGS, previous studies have reported a significant effect of HHP treatment on GGS generation (Fuentes et al., 2010). Moreover, several authors have



observed that this compound is a more stable and more reliable protein oxidation marker than AAS in meat products (Armenteros et al., 2009). Similarly to lipid oxidation, protein oxidation measured by AAS and GGS did not show great differences and thus no marked effect of HHP treatment was reported along chilled storage. According to Stadtman, and Levine, (2000) and Estévez, Killy, Puolanne, Kivikari, and Heinonen, (2008b), the mechanisms and reaction pathways for the oxidation of lipids and proteins are different but directly linked as both processes may be affected by similar pro-oxidant and antioxidant factors. Accordingly, in the present study, lipid and protein oxidation showed a similar behaviour. However, the significantly larger amount of GGS in HHPFlank samples highlight the potential effect of HHP on protein oxidation in sliced dry-cured ham which may lead to a deleterious impact on its nutritional and sensory quality. Previous studies have reported modifications of redness as consequence of the impact of protein oxidation on the integrity and properties of myoglobin and myofibrillar proteins (Ganhao et al., 2010; Utrera et al., 2012). Therefore the increase in  $a^*$  values over storage time might be a likely result of protein oxidation. However, it remains indefinite whether protein carbonylation had a direct influence on these changes.

### **Effect of IMF content**

A significant effect of the IMF content was found on  $L^*$  and  $b^*$  values of the studied dry-cured ham samples. The highest  $L^*$  values were recorded in samples containing higher IMF content. Similarly, Fuentes et al., (data not published) reported higher scores for brightness (sensory analysis) in Iberian dry-cured ham slices with high levels of IMF content. A positive correlation between IMF content and brightness was also reported by Ruiz, Ventanas, Cava, Andrés, and García, (2000). The effect on  $b^*$  parameter might have been promoted by a higher extent of lipid oxidation in samples with a higher IMF content. Some authors have reported the influence of IMF content on lipid oxidation in dry-cured loins (Ventanas et al., 2008). According to García-Esteban, Ansorena, and Astiasarán, (2004) an increase in  $b^*$  parameter could be related to the intensity of the oxidation process. Furthermore, in accordance to results obtained in the present study, these authors found an increase in  $b^*$  parameter by the third week of storage in vacuum-packed hams. Consequently,

the effect of IMF content with the effect of HHP on lipid oxidation (previously reported), would lead to the extent of oxidation process over time and then the increase of  $b^*$  values in external fat and lean surface during the chilled storage.

Regarding the effect of IMF content on TBARS values (**Figure 1**) Flank samples showed a higher extent of lipid oxidation compared to Hip samples at the beginning of storage ( $p < 0.001$ ). But finally Hip samples (with a higher IMF content) showed the highest TBARS numbers compared to its counterparts after 120 days of storage ( $p < 0.01$ ). These results are in agreement with previous studies carried out by Estévez, Ventanas, and Cava, (2005) and Ventanas et al., (2008) who reported a positive effect of fat content on lipid oxidation in different meat products.

Regarding the effect of IMF content on the formation and release of volatile aldehydes, the concentration of volatile aldehydes derived from lipid oxidation increased with the IMF content. The higher IMF content and then the higher extent of lipid oxidation (Ventanas et al., 2008) would cause a higher formation of volatile aldehydes derived from this reaction, particularly hexanal. However, 3-methylbutanal and 2-methylbutanal headspace concentrations were higher in Flank samples compared to Hip ones. Furthermore, both aldehydes are compounds of intermediate hydrophobicity ( $\log P = 1.23$  for both compounds) and thus the IMF had a limited effect on the release of both compounds. Consequently, the results for 3- and 2-methylbutanal could have been mainly due to a higher formation of Strecker aldehydes as consequence of a larger extent of protein oxidation in the Flank samples. In fact, authors such as Estévez, Ventanas, and Heinonen, (2011) reported that AAS and GGS carbonyls can promote the formation of Strecker aldehydes. According to Toldrá, (2004) the simultaneous occurrence of protein proteolytic and oxidative reactions and the formation of Strecker aldehydes during ripening of meat products suggests that protein semialdehydes may be implicated in the formation of Strecker aldehydes by reacting with neighbouring free amino acids.

IMF content showed a significant effect on AAS content after 30 days of storage and on GGS content after 30 and 120 days of storage. Unlike the results for lipid oxidation, Flank samples displayed a higher amount of both carbonyls

compared to Hip samples. A lack of correlation between protein and lipid oxidation has been previously reported by Estévez et al., (2008b). In the present study, the higher protein content in Flank involves a higher source of protein oxidation products. An increase in protein content would decrease the lipid/protein ratio which could result in a higher extent of protein oxidation. On the contrary, a decrease in protein content as consequence of a higher IMF content would increase the lipid/protein ratio which could results in a higher extent of lipid oxidation. Therefore, the IMF content could have determined the effect of HHP treatment on lipid and protein oxidation. In fact, this decrease in lipid/protein ratio as consequence of the highest protein content in Flank section might explain the increase in GGS after HHP treatment at 120 days of storage in these samples. Consequently, both phenomena (lipid and protein oxidation) were not directly linked due to the likely influence of the physico-chemical composition of samples on their susceptibility to undergo changes induced by the HHP treatment.

## **CONCLUSIONS**

As far as we know, this study reports, for the first time, information concerning impact of IMF content on changes caused by HHP treatment in sliced dry-cured ham along storage. IMF content and storage time led to clear modifications in colour unlikely HHP treatment. Similarly, oxidative stability was not specially affected by HHP however a more marked impact was observed during the last stages of storage. Nevertheless, IMF content and then the physico-chemical composition of dry-cured ham determined oxidative changes promoted by HHP. Taking into consideration the remarkable impact of IMF content on oxidative effects caused by HHP, previous to each HHP treatment it should probably be considered whenever top-quality products are to be produced. Therefore depending on sliced section ham different strategies may be required to inhibit the unpleasant consequences of colour changes, lipid and protein oxidation.

In summary, it could be concluded that despite a long period of chilled storage after HHP treatment the quality of sliced and vacuum-packed dry-cured ham was preserved.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Verónica Fuentes is thankful to the “Ministerio de Educación, Cultura y Deporte” for the FPI grant. This study was supported by the “Ministerio de Economía y Competitividad” project entitled: “Estudio sensorial e instrumental de la liberación de compuestos olor-activos en jamón ibérico loncheado: efecto del contenido y características de la grasa. (Project AGL2007-65923-C02-01). Mario Estévez thanks the Spanish Ministry of Science and Innovation for the contract through the “Ramón y Cajal (RYC-2009-03901)” program and the European Community (Research Executive Agency) for the Marie Curie Reintegration Fellowship (PERG05-GA-2009-248959; Pox-MEAT).

## REFERENCES

- Andrés, A. I., Cava, R., Ventanas, J., Muriel, E., & Ruiz, J. (2004). Lipid oxidative changes throughout the ripening of dry-cured Iberian hams with different salt contents and processing conditions. *Food Chemistry*, *84*, 375-381.
- AOAC Official Methods of Analysis (17th ed.) *Association of Official Analytical Chemists*, Gaithersburgh, Maryland (2000).
- Armenteros, M., Heinonen, M., Ollilainen, V., Toldrá, F., & Estévez, M. (2009). Analysis of protein carbonyls in meat products by using the DNPH-method, fluorescence spectroscopy and liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry (LC–ESI-MS). *Meat Science*, *83*, 104–112.
- Cheftel, J. C., & Culioli, J. (1997). Effects of high pressure on meat: A review. *Meat Science*, *46*, 211–236.
- Cilla, I., Martínez, L., Beltrán, J. A., & Roncalés, P. (2006). Dry-curd quality and acceptability as affected by the preservation system used for retail sale. *Meat Science*, *73*(4), 581–589.
- Clariana, M., Guerrero, L., Sárraga, C., García-Regueiro, J. A. (2012). Effects of high pressure application (400 and 900 MPa) and refrigerated storage time on the oxidative stability of sliced skin vacuum packed dry-cured ham. *Meat Science*, *90*, 323-329.

- Cremer, D. R., & Eichner, K. (2000). The reaction kinetics for the formation of Strecker aldehydes in low moisture model systems and in plant powders. *Food Chemistry*, *71*, 37–43.
- Estévez, M., Killy, P., Puolanne, E., Kivikari, R., & Heinonen, M. (2008b). Fluorescence spectroscopy as a novel approach for the assessment of myofibrillar protein oxidation in oil-in-water emulsions. *Meat Science*, *80*, 1290–1296.
- Estévez, M., Morcuende, D., & Ventanas, S. (2008a). Determination of oxidation. In L. M. L. Mollet & F. Toldrá (Eds.), *Handbook of processed meat and poultry analysis* (pp. 141–162). Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Estévez, M., Ollilainen, V., & Heinonen, M. (2009). Analysis of protein oxidation markers  $\alpha$ -aminoadipic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes in food proteins using liquid chromatography (LC)-electrospray ionization (ESI)-multistage tandem mass spectrometry (MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 3901–3910.
- Estévez, M., Ventanas, V., & Cava, R. (2005). Physicochemical properties and oxidative stability of liver pâté as affected by fat content. *Food Chemistry*, *92*, 449–457.
- Estévez, M. (2011). Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat Science*, *89*, 259–279.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, *226*, 497–509.
- Fuentes, V., Ventanas, J., Morcuende, D., Estévez, M., & Ventanas, S. (2010). Lipid and protein oxidation and sensory properties of vacuum-packaged dry-cured ham subjected to high hydrostatic pressure. *Meat Science*, *85*, 506–514.
- Gandemer, G. (2002). Lipids in muscles and adipose tissues, changes during processing and sensory properties of meat products. *Meat Science*, *62*, 309–4321.
- García-Esteban, M., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2004). Comparison of modified atmosphere packaging and vacuum packaging for long period storage of dry-cured ham: effects on colour, texture and microbiological quality. *Meat Science*, *67*, 57–63.
- Goutefongea, R., Rampon, V., Nicolas, N., & Dumont, J. P. (1995). In: *Proceedings volume II from 41th International Congress of Meat Science and Technology* (p. 384).
- Hidalgo, F. J., & Zamora, R. (2004). Strecker-type degradation by the lipid oxidation products 4,5-epoxy-2-alkenals. *Journal Agricultural Food Chemistry*, *52*, 7126–7131.
- Hugas, M., Garriga, M., & Monfort, J. M. (2002). New mild technologies in meat processing: High pressure as a novel technology. *Meat Science*, *62*, 359–371.

- Mc Clements, J., & Decker, E. A. (2010). Química de los alimentos. In S. Damodaran, K. Parkin, & O. R. Fennema (Eds.), *Lípidos* (pp. 155–214). (3th ed.). Zaragoza: Acribia S.A.
- Mor-Mur, M., & Yuste, J. (2003). High pressure processing applied to cooked sausage manufacture: Physical properties and sensory analysis. *Meat Science*, *65*, 1187–1191.
- Parra, V., Viguera, J., Sánchez, J., Peinado, J., Espárrago, F., Gutierrez, J. I., & Andrés, A. I. (2010). Modified atmosphere packaging and vacuum packaging for long period chilled storage of dry-cured Iberian ham. *Meat Science*, *84*, 760-768.
- Ruiz, J., Ventanas, J., Cava, R., Andres, A., & Garcia, C. (1999). Volatile compounds of dry-cured Iberian ham as affected by the length of the curing process. *Meat Science*, *52*, 19–27.
- Ruiz, J., Ventanas, J., Cava, R., Andrés, A. I., & García, C. (2000). Texture and appearance of dry cured ham as affected by fat content and fatty acid composition. *Food Research International*, *33*, 91-95.
- Shahidi, F. (1992). Prevention of lipid oxidation in muscle foods by nitrite and nitrite-free compositions. In A.G. St. Angelo (Ed.), *Lipid Oxidation in Food*. (pp. 161–182). Washington, D.C: ACS (American Chemical Society).
- Salih, A. M., Smith, D. M., Price, J. F., & Dawson, L. E. (1987). Modified extraction 2-thiobarbituric acid method for measuring lipid oxidation in poultry. *Poultry Science*, *66*, 1483–1488.
- Toldrá, F. (2004). The role of muscle enzymes in dry-cured meat products with different drying conditions. *Trends in Food Science & Technology*, *17*, 164–168.
- Utrera, M., Morcuende, D., Rodríguez-Carpena, J. G., & Estévez, M. (2011). Fluorescent HPLC for the detection of specific protein oxidation carbonyls –  $\alpha$ -amino adipic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes – in meat systems. *Meat Science*, *89*, 500-506.
- Utrera, M., Armenteros, M., Ventanas, S., Solano, F., & Estévez, M. (2012). Pre-freezing raw hams affects quality traits in cooked hams: Potential influence of protein oxidation. *Meat Science*, *92*, 596-603.
- Ventana, S., Ventanas, J., & Ruiz, J. (2007). Sensory characteristics of Iberian dry-cured loins: Influence of crossbreeding and rearing system. *Meat Science*, *75*, 211-219.
- Ventanas, S., Estévez, M., Andrés, A. I., & Ruiz, J. (2008). Analysis of volatile compounds of Iberian dry-cured loins with different intramuscular fat contents using SPME–DED. *Meat Science*, *79*, 172-180.

## **CAPÍTULO VII.**

**Estatus:** preparado.

### **Application of time-intensity method to assess the sensory properties of Iberian dry-cured ham: effect of intramuscular fat content and high pressure treatment**

Verónica Fuentes<sup>a</sup>, Mario Estévez<sup>a</sup>, Narcis Grébol<sup>b</sup>, Jesús Ventanas<sup>a</sup> and Sonia Ventanas<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup>Department of Animal Production and Food Science. University of Extremadura,  
10003 Cáceres, Spain.

<sup>b</sup>Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Centre de Tecnologia de la Carn, Granja Camps i Armet s/n, 17121 Monells, Girona, Spain.

\*Corresponding author: Sonia Ventanas, email: [sanveca@unex.es](mailto:sanveca@unex.es)

## **Abstract**

This paper describes the effect of high pressure treatment (HHP) (600 MPa) during refrigerated storage (120 days, +2 °C) on the oxidative stability (hexanal) and the sensory properties of sliced and vacuum-packaged Iberian dry-cured ham varying in intramuscular fat (IMF) content (low fat –flank and high fat - hip). Both static and dynamic (time-intensity, TI) sensory techniques were applied. Samples subjected to HHP treatment and Hip samples showed the highest hexanal content. Hip samples displayed higher scores for colour intensity, marbling and brightness of lean. IMF content contributed to a more intense temporal perception of hardness and fibrousness and to a more intense and longer rancid flavour perception. External fat from pressurized samples showed a higher colour intensity and hardness probably due to the extent of lipid oxidation and the development of fat crystallization. Results of temporal analysis indicated that pressurized samples turned out harder, juicier, more fibrousness, saltier and displayed a more intense overall and rancid flavour.

## **Keywords**

High pressure, IMF, Sliced dry-cured ham, TI.



## INTRODUCTION

Dry-cured Iberian ham is the most valuable meat product of Spain, with a first-rate consumer acceptance (Ruiz, García, Muriel, Andrés, & Ventanas, 2002a). The high amount of intramuscular fat (IMF), the great concentrations of heme pigments and the high levels of monounsaturated fatty acids (MUFA) have been highlighted as some of the most relevant quality aspects in muscles from Iberian pigs (Ventanas, Ventanas, Ruiz, & Estévez, 2005). IMF has a clear effect on eating quality of meat as it reduces the shear force during chewing, making easier muscle fibre separation, and hence, improving the juiciness and tenderness sensation (Lawrie, 1998). Juiciness and flavour intensity seem to be the most important features in determining dry-cured Iberian ham acceptability (Ruiz et al., 2002a).

In recent years, the new trends in marketing and selling dry-cured meat products include slicing and packaging in order to meet the consumers' demand. Thus, it is extremely important to guarantee the safety of this product, while maintaining its unique product quality (Andrés, Møller, Adamsen, & Skibsted, 2004). High hydrostatic pressure (HHP) is a very promising preservation technology for sliced meat cured products (Hugas, Garriga, & Monfort, 2002), which can be applied to the product upon vacuum packaging. The use of HHP has been highlighted to ensure the safety of the products and to extend their shelf-life without decreasing organoleptic properties (Rubio, Martínez, García-Cachán, Rovira, & Jaime, 2007). Nevertheless, in a previous study, HHP at 600 MPa was observed to induce severe oxidative deterioration of lipids and proteins and changes in texture or colour in Iberian dry-cured hams after 1 month of storage (Fuentes, Ventanas, Morcuende, Estévez, & Ventanas, 2010).

The influence of different factors on the sensory characteristics of Iberian dry-cured products has been extensively studied, with descriptive profile being the routine technique used for this purpose (Ventanas, Ventanas, Tovar, García, & Estévez, 2007a; Ventanas, Ventanas, & Ruiz, 2007b). The descriptive profile is a static sensory technique and thus can be useful for detecting the intensity perception of different attributes measured as an overall impression during

product consumption. Dijksterhuis, and Piggott, (2001) developed a sensory evaluation method called time–intensity (TI) which allows monitoring the intensity over time and thus provides more real and valid information compared to static techniques. TI analysis has been successfully applied to evaluate the taste, the flavour and the mouthfeel of model (Pålsgård, & Dijksterhuis, 2000) and food systems (Guinard, Wee, McSunas, & Fritter, 2002) including meat products such as bologna-type sausages (Ventanas, Puolanne, & Tuorila, 2010). However, the TI technique has been, so far, poorly applied to meat products although the information provided by this novel methodology may be of great interest in the Meat Science field. In particular, TI may be a useful tool to study the impact of HHP treatment and the IMF content on the dynamic perception of texture and flavour in Iberian dry-cured ham. Flavour and texture perception is, actually, a dynamic process since continuous changes in their intensities are perceived during eating as a result of mixing with saliva and the breakdown of the food matrix through chewing.

Moreover, most studies have evaluated the effect of HHP treatment on dry-cured products characteristics after a variable period of refrigerated storage, mainly ranged from 30 to 90 days (Andrés et al., 2004; Cava, Ladero, González, Carrasco, & Ramírez, 2009; Fuentes et al., 2010). To our knowledge this is the first time that changes on sensory traits of Iberian dry-cured ham subjected to HHP treatment were evaluated after 120 days of refrigerated storage (+2 °C).

The aim of the present study was to determine the effect of IMF content and HHP treatment (600 MPa) on the sensory characteristics of vacuum-packaged Iberian dry-cured ham using dynamic sensory techniques.

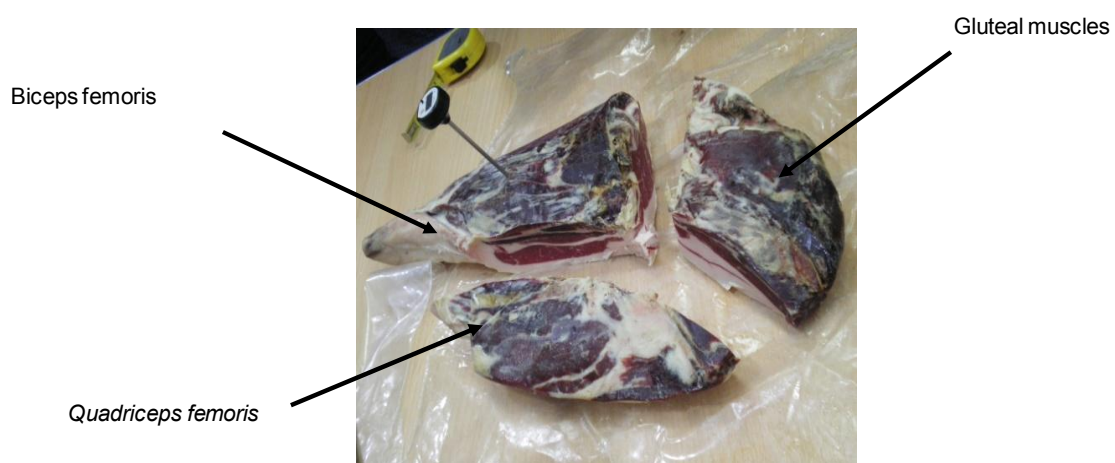
## **MATERIALS AND METHODS**

### **Sampling, packaging and pressure treatment**

Dry-cured hams (7.5 kg average) were obtained from free-range reared Iberian pigs fed on grass and commercial concentrates during the fattening period (60 days prior to slaughter) and slaughtered at 160 kg live weight and 12 months of

age (Campo, DOP Dehesa de Extremadura). Green hams were processed traditionally, according to the method described by Fuentes et al., (2010). Once the ripening process was finished (~ 30 % weight loss), the hams were deboned and two different sections (*Quadriceps femoris*; flank and gluteal muscles; hip) varying in the IMF content were extracted (Flank section containing lower IMF content compared to hip section) (**Figure 1**). Afterwards, muscles were sliced (1 mm thickness) and vacuum-packaged (polyamide and polyethylene in the upper film with 34.0 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup> permeability to O<sub>2</sub> at 23 °C and 85 % HR; polyamide and polyethylene in the lower film with 18.0 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup> permeability to O<sub>2</sub> at 23 °C and 85 % HR) (Mobepack company, Salamanca, Spain). A total of 110 packages were obtained (55 packages of flank batch and 55 packages of hip batch). Half of the packages of each batch were subjected to HHP treatment at the CENTA Institute (Monells, Girona, Spain). Packages of dry-cured ham were pressurized at 600 Mpa for 6 min in a bath set at 12 °C (NC Hyperbaric Wave 6500/120; 120 l and 6500 bars). Subsequently, all batches were storage at chilled condition (2 °C) for 120 days.

**Figure 1.** Different sections of the deboned Iberian dry-cured hams. *Quadriceps femoris* (flank) and Gluteal muscles (hip) were selected to carry out the present study. These sections were selected based on the differences in the IMF content: flank (low IMF content) and hip (high IMF content).



## **Physico-chemical analysis**

The Proximate composition of all Iberian dry-cured hams batches was determined: moisture content and chloride content were determined using an official method (AOAC, 1984). Intramuscular fat (IMF) was determined by the Folch method (Folch, Lees, & Sloane Stanley, 1957). Protein content was determined by Kjeldahl method (Kjeldahl, ISO, 1978).

## **Hexanal analysis**

Hexanal aldehyde was analysed by headspace-SPME and GC/MS (gas chromatograph Hewlett–Packard 5890 series II coupled to a mass selective detector Hewlett–Packard HHP-5791A) following the method developed by Andrés, Cava, Ventanas, Muriel, and Ruiz (2004). One gram of minced sample was weighed into a 4 ml vial. All vials were closed with a teflon/silicone septum. An SPME fibre (50/30  $\mu\text{m}$  divinylbenzene-carboxen-polydimethylsiloxane coating) was inserted through the septum and exposed to the headspace of the vial. Vials were pre-conditioned for 15 min at 37 °C. Extraction was carried out at 37 °C for 30 min in a water bath. After extraction, the SPME fibre was immediately transferred to the injector of the chromatograph which was in splitless mode at 270 °C. The separation of volatile compounds was performed on a 5% phenyl–methyl silicone (HHP-5) bonded phase fused silica capillary column (Hewlett– Packard, 50 m x 0.32 mm i.d, film thickness 1.05  $\mu\text{m}$ ), operating at 6 psi of column head pressure. Oven programme was: 40 °C for 10 min, 5 °C  $\text{min}^{-1}$  to 200 °C, 15 °C  $\text{min}^{-1}$  to 250 °C, and held 250 °C for 10 min. The transfer line to the mass spectrometer was maintained at 270 °C. The mass spectra were obtained using a mass selective detector by electronic impact at 70 eV, a multiplier voltage of 1756 V and collecting data at a rate of 1 scan  $\text{s}^{-1}$  over the  $m/z$  range 30–500. Hexanal was tentatively identified by comparing their mass spectrum with those reported in the Willey Library. Results are given in area units (AU).

## **Sensory evaluations**

In the present study, sensory profile was used to evaluate the attributes related to appearance and texture of external fat and the attributes related to

appearance and odour of lean, while attributes related to texture and flavour of lean were evaluated using the time intensity method.

### **Panellists**

Ten panellists (five males and five females, range age 26–50 years) with previous experience in sensory evaluation participated in the study (training and evaluation sessions). All of them were staff of the University of Extremadura.

### **Sensory profiling**

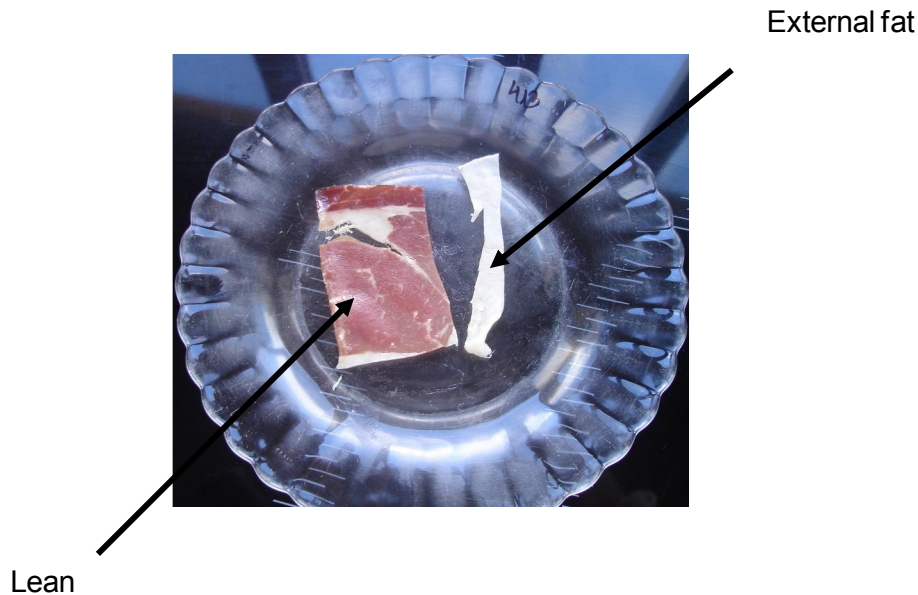
In order to select the evaluated attributes, samples (one slice) of each batch were presented on a glass plate at room temperature (~ 21 °C) with a list of potential attributes. After discussion the panel reached an agreement and selected 12 attributes and their verbal anchors on the scale. The selected attributes were in agreement with the attributes selected in a previous study (Fuentes et al., 2010) but including some modifications. For most difficult attributes, some references were presented in order to fix the anchors of the scale (**Table 1**).

**Table 1.** Products employed as references for fixing the anchors of certain attributes. The products employed to fix the “less” (left anchor) and “more” (right anchor) are shown for the attributes related to both external fat and lean.

	Left anchors	Right anchors
<b>External fat</b>		
<i>Appearance</i>		
Colour intensity	Bacon fat	Oxidized fat of dry-cured ham
Brightness	Back fat at 7 °C	Back fat 30 °C for 20-30 min
<i>Tactile texture</i>		
Fluidity	Back-fat at -18 °C	Back-fat at 30 °C for 20-30 min
Hardness	Back-fat at 30 °C for 20-30 min	Back-fat at -18 °C
<b>Lean</b>		
<i>Appearance</i>		
Red colour intensity	Serrano dry-cured ham	Dry-cured beef
Marbling	Serrano dry-cured ham	Iberian dry-cured ham
Brightness	Dry-cured beef	Iberian dry-cured ham at 50 °C greased with olive oil
<i>Odour</i>		
Rancid	Bacon fat	Oxidized back-fat at 50 °C for 24h

Sensory profiling sessions were carried out over four consecutive days with one session per day. Twelve attributes grouped in appearance and tactile texture of external fat and appearance and odour of lean were evaluated. Four samples were evaluated per session, thus a total of 4 sessions were performed. Each sample consisted of a slice of dry-cured ham served on a glass plate marked with random three digit codes. The external fat and the lean of each slice were separately evaluated (**Figure 2**). For each panellist, the presentation order of the four batches over the sessions was randomized following the Williams Latin Square design. Evaluations were conducted in individual booths at room temperature (~ 21 °C). Panellists rated the intensity of the selected attributes using an unstructured scale (10 cm). The selected attributes were for appearance of external fat; colour intensity, colour homogeneity and brightness; for tactile texture of external fat: fluidity, hardness and sandy; for appearance of lean: red colour intensity, marbling, brightness and for odour of lean: overall, rancid and cured. The verbal anchors for most attributes were from less to more whereas for colour intensity ranged from white to yellow. FIZZ Network (v. 1.01: Biosystemes, France) program was used for collecting the data.

**Figure 2.** Presentation of the slices of Iberian dry-cured ham to the panel during sensory evaluation sessions (descriptive profile). The external and lean of each slice were separately served on the same glass plate.



### **TI training**

Dynamic sensory properties of dry-cured ham affected by amount of IMF and high pressure treatment were studied using TI methodology. The training procedure described by Peyvieux, and Dijksterhuis (2001) was applied with some modifications. Three training sessions (2 h per session) were performed, divided in different steps. During the first session, the TI method (computer screen instructions) and the product under investigation were introduced to the panellist in general terms. Panellists got familiar with the TI data collection (FIZZ software). Panellist participated in two further training TI sessions evaluating the overall flavour intensity and the texture of three different traditional meat products (dry-cured beef “cecina”, cooked ham and dry-cured Serrano ham) using a 10 cm unstructured horizontal scale anchored “less” and “more”. Sample size was standardised and the protocol was established as follows: panellists should keep the sample in their mouths, chew for 10 s and then swallow. After swallowing panellists should continue the evaluation until they did not perceive anything. Panellists were instructed to move the cursor along the scale according to the intensity of their perception. The time of the evaluation

was fixed in 120 s, but panellists could stop before by moving the mouse completely towards “less” extreme. During the data collection, specific messages were displayed in the computer screen showing commands as “indicate the intensity during chewing the sample by moving the cursor along the scale”, “swallow the sample” and “move the cursor completely toward less if you do not perceived anything more”. The final rinsing protocol between samples was tap water and a piece of unsalted crackers. This standardised protocol was used in the TI evaluations.

### **Time–intensity evaluations**

A total of seven attributes grouped in texture (hardness, juiciness and fibrousness) and flavour (saltiness, overall, rancid and cured) were chosen after discussion with panellist to be evaluated by TI methodology. Evaluations were carried out on eight consecutive days, with one session per day. Panellists rated one attribute at a time and all attributes were evaluated four times, thus a total of 40 TI curves of each attribute were obtained for each sample. Two samples were evaluated in the same session, thus a total of eight sessions were performed. The serving order of the samples randomised according to the Williams Latin Square design. Samples were served on a glass plate and coded with three digit numbers. Once the panellist placed the sample in their mouth they started to evaluate the texture or flavour intensity. Sessions took place in individual booths under white light.

The intensity recordings started when assessors clicked on the scale and stopped after 120 s or when the assessors returned the marker completely “less” in the scale. The message “swallow” was displayed after 10 s of chewing for overall, saltiness, rancid and cured flavour evaluation. In order to evaluate texture attributes, the panellists were instructed to chew and to finish the evaluation when they considered the sample was ready for swallowing. Attributes were scored on a 10 cm unstructured horizontal scale anchored with “less” and “more” for all evaluated attributes. Between samples, panellists were required to follow the rinsing protocol. Data were collected using the FIZZ software (Sensory Analysis and Computer Test Management) (Biosystemes, France, 2002).



## Data analysis

Data from chemical composition and headspace were analysed by two-way ANOVA (GLM procedure) with treatment (Control and HHP) and IMF content (flank and hip) as main effects and testing means differences by Tukey post hoc test. Data from sensory analysis (QDA) were analysed by three-way ANOVA (repeated measures) (GLM procedure) in order to evaluate the main effects of HHP treatment, IMF content and their interaction. In this model, the HHP treatment (Control and HHP), the IMF content (flank and hip) and replications (session 1, 2, 3 or 4) were included as within-subject factors. Bonferroni correction was applied for multiple means comparison of main factors (HHP and IMF). Pearson's correlation coefficients were also calculated.

Data from individual TI curves were analysed and average TI curves were computed for each attribute over ten assessors and four replications using FIZZ software. Four TI parameters were extracted from TI curves: (1) maximum intensity (I<sub>max</sub>), (2) computed end time (T<sub>end</sub>) – total duration of the evaluation in seconds, (3) duration of the plateau phase (DurPI) and (4) the total area under the curve (AreaTse). Data from TI parameters were analysed by three-way ANOVA (repeated measures) (GLM procedure). In this model, treatment (Control and HHP), IMF content (flank and hip) and replications (session 1, 2, 3 or 4) were included as within-subject factors. Bonferroni correction was applied for multiple means comparison of main factors (HHP and IMF).

SPSS software (v 15.0) for windows was used for carrying out all statistic analyses.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Physico-chemical analysis

The proximate composition of the Iberian dry-cured hams (**Table 2**) is in agreement with previous studies carried out in the same product (Fuentes et al., 2010). Hip samples displayed higher IMF content compared to flank ones

regardless the HHP treatment whereas flank samples showed the highest protein, moisture and chloride content.

**Table 2.** Physico–chemical composition (expressed as %) of sliced and vacuum-packed dry-cured ham with different IMF content (flank vs. hip) and treated or non-treated with HHP (control vs.HHP). *p*-values<sup>c</sup> of both main factors (IMF content: F and treatment: T) and interaction (F\*T).

	CONTROL		HHP		<i>p</i> -values <sup>c</sup>		
	Flank	Hip	Flank	Hip	F	T	F*T
IMF	9.53±0.89 <sup>b</sup>	16.21±0.76 <sup>a</sup>	10.29±0.47 <sup>b</sup>	15.40±1.25 <sup>a</sup>	***	ns	*
Protein	42.19±2.19	39.78±2.74	41.38±2.12	38.95±2.77	*	ns	ns
Moisture	43.42±1.92	39.98±3.47	42.26±0.96	39.34±3.75	*	ns	ns
ClNa	3.71±0.64	3.09±0.47	3.80±0.52	3.18±0.84	*	ns	ns

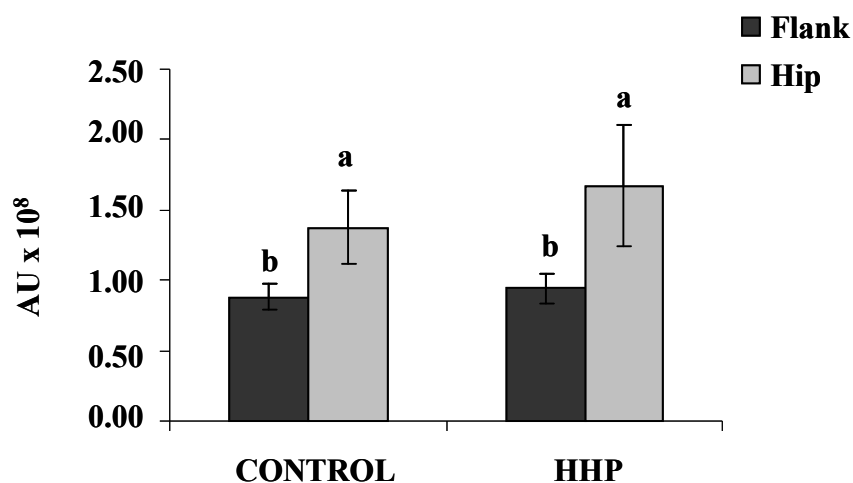
*p*-values<sup>c</sup>: ns *p*<0.05, \* *p*<0.05, \*\* *p*<0.01, \*\*\* *p*<0.001.

Different letters within the same row denote significant differences between means at *p*<0.05.

### Hexanal analysis

The oxidative stability of pressurized and control dry-cured ham samples measured as hexanal content is shown in **Figure 3**. IMF content significantly affected (*p*<0.001) lipid oxidation since hip dry-cured hams showed a higher hexanal content compared to flank ones regardless the HHP treatment (flank: 9.14E+07 ± 6.15E+06 vs. hip: 1.53E ± 6.15E+06). These results were expected since hexanal is derived from lipid oxidation and meat products with higher fat content generally show higher amounts of oxidation products. In fact, several authors have previously found significant correlations between fat content and lipid oxidation (Estévez, Morcuende, & Cava, 2003; Estévez, Ventanas, & Cava, 2005). Regarding the influence of HHP treatment, a significant effect on lipid oxidation (*p*<0.05) was also found. Headspace concentration of hexanal increased in all pressurized batches compared control ones (HHP: 1.31E+08 ± 6.15E+06 vs. control: 1.13E+08 ± 6.15E+06). In a previous study carried out by Fuentes et al., (2010) a similar effect of HHP treatment (600 Mpa) on lipid oxidation was reported. The impact of HHP treatment on hexanal content was higher in hip samples compared to flank ones suggesting that IMF content could enhance the effect of HHP on lipid oxidation.

**Figure 3.** Effect of IMF content and HHP treatment on lipid oxidation of sliced dry-cured ham. Level of hexanal (means  $\pm$  standard deviation from ten replicates) are expressed in AU. Different letters indicate significant differences between means ( $p < 0.05$ ).



### Sensory profiling

Results from the ANOVA in **Table 3** show a significant effect ( $p < 0.01$ ) of HHP treatment on colour intensity and homogeneity of external fat. External fat of HHP-treated samples were more yellow and displayed lower colour homogeneity compared to control samples. Consistently, a negative correlation between intensity and homogeneity of colour was found ( $r = -0.362$ ,  $p < 0.05$ ). Accumulation of products derived from lipid oxidation promoted by HHP treatment may have contributed to increase colour intensity in terms of yellowness perception. An irregular yellow colour could explain the lower scores for colour homogeneity obtained after HHP treatment.

Moreover, after HPP treatment external fat of samples turned out harder but less sandy, with these differences being more marked in hip samples compared to flank ones. Previous studies in meat (Cheftel, & Culoli, 1997) as well as in dairy creams and emulsions (Dumay, Lambert, Funtenberger, & Cheftel, 1996) reported that pressure enhances the formation of denser and most stable fat crystals. In fact, lipids present in a liquid state at room temperature crystallise under pressure. However, Fuentes et al., (2010) reported no effect of HHP

treatment on hardness of external fat of Iberian dry-cured ham refrigerated during 1 month under white fluorescence light. In the present study, the longer time of the storage after pressurization (4 months) would partly explain that variations in hardness caused by HHP treatment were more evident. (Cheftel, & Culoli, 1997). Corona, (2012) reported a crystallization of bak-fat from Iberian pigs during cold storage using ultrasonic measurements and similarly to Niñoles, Mulet, Ventanas, and Benedito (2010) in stored fat for 2 months at 0 °C, a complete crystallization in the present study was expected. This phenomenon together with modifications in the physical state of fat due to HHP treatment could promote the formation of fat crystals and thus explaining the reported results for hardness perception of external fat.

On the other hand, the perception of the “sandy” attribute has never been assessed before in the external fat of dry-cured ham samples by means of tactile perception. In the present study, this attribute was included in the list of the definitive attributes after panel discussion during training sessions. External fat of HHP-treated samples were perceived less sandy compared to control ones, which could be partly linked to the increase of hardness perception. It was expected that modifications of fat and protein due to HHP treatment could promote the formation of fat or protein aggregates which could be perceived as an increase of sandy perception. This attribute was evaluated by rolling the finger across the fat surface and thus the higher hardness of external fat in HPP samples could partly hinder the perception of the sandy attribute. According to a previous study performed by Mor-Mur & Yuste, (2003), pressurized cooked sausages were less grainy although this attributes was evaluated during sausages consumption.

Fat content significantly influenced ( $p < 0.001$ ) the attributes related to the appearance of lean of dry-cured ham samples but not the odour attributes. As expected, hip samples displayed higher scores for marbling and brightness attributes and consequently were less red compared to flank ones. In fact, significant and negative correlations between red colour intensity and brightness ( $r = -0.494$ ,  $p < 0.001$ ) and between red colour intensity and marbling ( $r = -0.619$ ,  $p < 0.001$ ) were found. Ruiz, Ventanas, Cava, Andrés, & García, (2000) reported that a higher amount of IMF linked to a higher oleic acid content

causes a higher fluidity of fat in dry-cured ham. This argument could explain the higher scores for marbling and brightness of lean in hip samples which is supported by the significant and positive correlation found between both attributes ( $r= 0.763, p<0.001$ ).

HHP had a different effect on red colour intensity of dry-cured samples depending on the IMF content (main effect of T\*F interaction,  $p<0.01$ ). HHP treatment decreased red intensity scores in hip samples whereas slight variations were found in the flank counterparts. Similarly, Serra et al., (2007) reported a lower colour intensity in pressurized hams than in control ones. Carlez, Veciana-Nogues, & Cheftel, (1995) attributed the modifications in red colour intensities caused by HHP treatment to an increase in protein denaturation, resulting in a higher lightness ('whitening' effect). More recently, several authors have been linked colour deterioration to protein oxidation in different meat products, particularly in dry-cured hams (Ventanas et al., 2007a) and cooked patties (Ganhão, Morcuende, & Estévez, 2010). Oxidation of nitrosomyoglobine pigment as well as myofibrillar proteins during HHP treatment could play an important role on colour modifications in dry-cured ham samples (Fuentes et al., 2010). Moreover, pressurized samples displayed significant higher marbling ( $p<0.01$ ) and lower brightness ( $p<0.05$ ) scores compared to control ones.

Odour attributes were affected by HHP treatment, particularly cured odour ( $p<0.05$ ). Control samples showed a more intense cured odour compared to HHP ones. Rivas-Cañedo, Fernández-García, and Nuñez (2009) reported a lower level of certain volatile compounds in Serrano hams after HPP treatment. Moreover, Garriga, Grèbol, Aymerich, Monfort, & Hugas (2004) reported the effectiveness of pressurization treatment (600 MPa) on preventing microbial growth in Serrano ham, and thus, in the level of volatile compounds mainly derived from microbial metabolism (Rivas-Cañedo et al., 2009). These arguments could partly explain the lower intensity of cured odour perceived in dry-cured ham samples after HHP treatment.

**Table 3.** Main effect of IMF content (flank; low fat vs. hip; high fat) and HHP treatment (control: non-treated vs. HHP: treated) on attributes related to lean and the effect of HHP treatment on attributes related to external fat (mean  $\pm$  standard deviation). Significance level of main factors (IMF content: F, treatment: T and session: Se) and interaction (T\*F): ns, non significant, \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001.

	CONTROL		HHP		F	T	Se	T*F
	Flank	Hip	Flank	Hip				
<b>External fat</b>								
<i>Appearance</i>								
Colour intensity	3.75 $\pm$ 0.16	2.63 $\pm$ 0.11	4.05 $\pm$ 0.13	3.35 $\pm$ 0.13	-	**	ns	-
Colour homogeneity	5.90 $\pm$ 0.24	5.86 $\pm$ 0.21	5.02 $\pm$ 0.15	5.69 $\pm$ 0.21	-	**	*	-
Brightness	5.19 $\pm$ 0.13	5.66 $\pm$ 0.16	5.83 $\pm$ 0.20	5.47 $\pm$ 0.18	-	ns	***	-
<i>Tactile texture</i>								
Fluidity	5.89 $\pm$ 0.17	6.55 $\pm$ 0.17	6.05 $\pm$ 0.14	6.63 $\pm$ 0.18	-	ns	***	-
Hardness	2.28 $\pm$ 0.15	1.82 $\pm$ 0.14	2.65 $\pm$ 0.13	2.65 $\pm$ 0.15	-	**	ns	-
Sandy	2.92 $\pm$ 0.11	2.01 $\pm$ 0.16	2.69 $\pm$ 0.11	1.07 $\pm$ 0.11	-	**	*	-
<b>Lean</b>								
<i>Appearance</i>								
Red colour intensity	7.26 $\pm$ 0.13	6.59 $\pm$ 0.15	7.29 $\pm$ 0.12	6.03 $\pm$ 0.13	***	**	*	**
Marbling	0.97 $\pm$ 0.07	2.8 $\pm$ 0.13	1.30 $\pm$ 0.07	3.71 $\pm$ 0.24	***	**	***	*
Brightness	3.62 $\pm$ 0.15	5.73 $\pm$ 0.15	3.57 $\pm$ 0.11	5.27 $\pm$ 0.21	***	*	ns	ns
<i>Odour</i>								
Overall intensity	6.14 $\pm$ 0.15	5.57 $\pm$ 0.15	5.53 $\pm$ 0.19	5.99 $\pm$ 0.13	ns	ns	ns	**

Rancid	2.20±0.15	2.22±0.08	2.00±0.15	2.03±0.12	ns	ns	ns	ns
Cured	4.73±0.18	4.43±0.22	4.09±0.12	4.36±0.13	ns	*	ns	**

### Time-intensity analysis

**Table 4** shows the extracted TI parameters (means  $\pm$  sd) and the **Figure 4** displays the average TI curves for each evaluated attribute. Dynamic perception of hardness, juiciness, fibrousness and rancid flavour were significantly affected by the IMF content of samples. Hip samples displayed a significantly ( $p < 0.05$ ) higher intensity perception of hardness (Imax and Area) compared to flank ones. Maximum perception of fibrousness (Imax) significantly decreased ( $p < 0.05$ ) with the IMF content as well as the duration of the maximum intensity (DurPI). Dransfield (1994) in fresh pork and Ruiz et al., (2000) in dry-cured hams reported that IMF content has a remarkable effect on the texture, being negatively related to hardness and fibrousness. The effect of IMF on hardness was unexpected. Taking into consideration that IMF has been recurrently correlated to decreased hardness and increased juiciness, the present results may be ascribed to differences between flank and hip muscles regarding other aspects different o IMF such as muscle structure. The muscles of hip section are located near of the coxofemoral joint and thus may content a higher amount of collagen compared to those of flank section which would contribute to increase the consistence and thus the hardness perception of these samples. Regarding to flavour perception, flank samples displayed a significantly longer duration of the plateau phase of saltiness (DurPI,  $p < 0.05$ ) compared to hip ones which would be related with the higher chloride content quantified in flank compared to hip dry-cured ham samples. Moreover, the intensity (Imax and Area) and duration (Tend) of rancid perception increased as IMF content increased. Similarly, Ventanas et al., (2007a) observed a positive and significant correlations between IMF and the intensity and persistence of flavour suggesting the possibility that the IMF would have influenced the generation and release of aroma volatiles, affecting the aroma perception. The influence of the fat level on the release of volatile compounds during mastication has been reported in different products such as sausages (Carrapiso, 2007), dairy

emulsions (Roberts, Pollien, & Watzke, 2003) and yogurts (Brauss, Linforth, Cayeux, Harvey, & Taylor, 1999). It is known that the oxidation of unsaturated fatty acids is mainly responsible for the odour and flavour formed during the processing of muscle foods (Tressl, Bahri, & Engel, 1981). Ventanas, Estévez, Andrés, & Ruiz, (2008) reported a higher generation of volatile compounds derived from the oxidation of fatty acids in high IMF loins due to the higher triglyceride content in those samples than in low IMF loins. In fact, in the present study higher levels of hexanal were found in hip dry-cured samples compared to flank ones, which would have contributed to increase the intensity and duration of rancid flavour perception.

The dynamic perception of texture attributes was affected by HHP treatment. HHP significantly affected the total duration (Tend) and the persistence of maximum intensity (DurPI) of hardness ( $p < 0.05$ ). Persistence of hardness and duration of the maximum intensity were longer in pressurized compared to control dry-cured ham samples (**Fig. 4a**). The treatment also affected most TI parameters of juiciness and fibrousness, (**Fig. 4b and 4c**). Persistence (Tend) and intensity (Imax and Area) of both attributes significantly increased with HPP treatment. Dry-cured ham samples subjected to HHP treatment were perceived juicier and more fibrous for a longer time than non-pressurized ones. The effect of HHP on the texture properties of meat products has already been observed in previous studies (Mor-Mur, & Yuste, 2003; Bertram, Wu, Straadt, Aagaard, & Aaslyng, 2006). Fuentes et al., (2010) using a descriptive sensory analysis reported that pressurized dry-cured ham was harder, less juicy, less doughy and more difficult to chew than non-pressurized samples. Bertram et al., (2006) using TI observed that pressured cooked ham was perceived as significantly less tender compared to non-pressurized ones. Fuentes et al., (2010) concluded that HHP treatment also has a significant effect on muscle proteins in treated dry-cured ham at 600 MPa. Taking into account that HHP treatment applied to the dry-cured hams in the present study was at 600 MPa, the impact of HHP on protein oxidation can be expected. Fuentes et al., (2010) in dry-cured hams and Estévez, Ventanas and Cava, (2005b) in frankfurters, have related protein oxidation with texture changes. Serra et al., (2007) reported a negative correlation between the hardness, the proteolysis index and the



proteolytic activities in HHP-treated dry-cured hams (400 and 600 MPa). These authors observed a higher fibrousness scores in treated ham (600 MPa) which is consistent with the results obtained for fibrousness in the present study. Campus, Flores, Martínez, & Toldrá, (2008) in vacuum packaged dry-cured ham and Homma, Ikeuchi, & Suzuki, (1996) in meat reported that HHP diminishes the activity of proteolytic enzymes. These arguments would explain the highest intensity of fibrousness and the more persistence of hardness. Moreover, Huff-Lonergan, & Lonergan, (2005) concluded a reduced proteolytic activity of tenderising enzymes and cross-linking of myofibrillar proteins may influence negatively water-holding capacity (WHC) and juiciness of muscle foods. Fuentes et al., (2010) found a loss of juiciness in pressurized dry-cured ham (600 MPa) which is not in agreement with the present results. The different sensory method used in both studies could partly explain the different results, demonstrating that static and dynamic sensory techniques can provide different type of information (Dijksterhuis, & Piggott, 2001). In fact, a positive effect of pressurization on juiciness has been suggested in cooked ham evaluated by TI (Bertram et al., 2006) and in cooked sausages by two triangle tests (Mor-Mur, & Yuste, 2003). The highest juiciness observed in HHP-treated samples are in agreement with a previous investigation and reveals that the pressure-induced alteration in meat structure and water distribution is affecting how juicy the meat is being perceived during consumption (Suzuki, Homma, Kim, Ikeuchi, Sugiyama, & Saito, 2001). Juiciness is related to the degree of lubrication of the food during the chewing and the subsequent swallowing (Ruiz, et al., 2002a). The juiciness of meat products is considered to arise from the moisture released by the product during chewing and the moisture from saliva (Winger, & Hagyard, 1994). The increase of the hardness perception, together with a higher fibrousness may have led to an extension of the mastication process to have the samples ready to be swallowed. Like this, HHP-treated samples may have therefore been present in the oral cavity for a longer time, resulting in a higher persistence and a higher stimulation of salivation compared to non-pressurized ones. Like this, two circumstances apparently contradictory such as hardness and juiciness may be compatible during the temporal perception of meat samples as an initial perception of intense hardness may have led to an eventual greater juiciness. In fact, in HHP-treated samples hardness was

perceived faster compared to juiciness (**Figure 4**) which was reflected in the results obtained for Sminc parameter (maximum slope of the initial phase) ( $1.05 \pm 0.46$  for hardness and  $0.93 \pm 0.37$  for juiciness) whereas juiciness perception at maximum intensity (DurPI) was longer compared to hardness (**Table 4**). This finding would have been unlikely using static techniques.

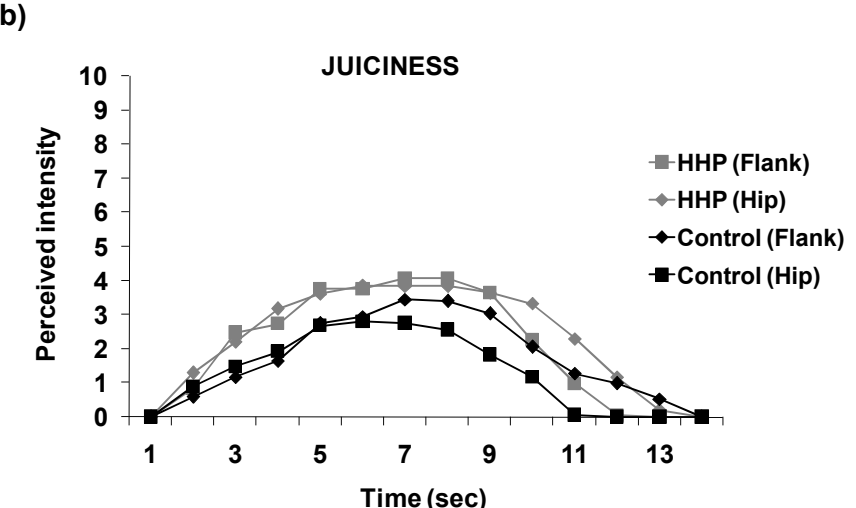
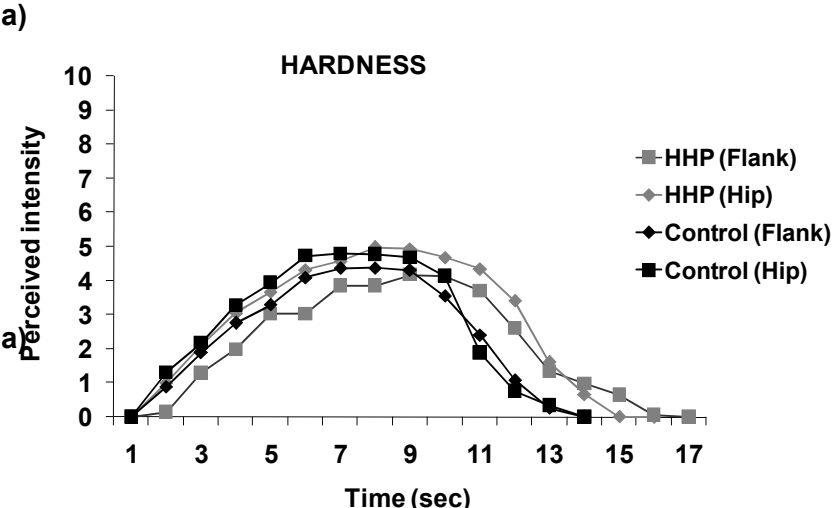
Regarding to temporal changes of flavour, the HHP significantly affected saltiness, overall and rancid flavour perception. After HHP treatment samples were perceived significantly saltier (Imax and Area) ( $p < 0.05$ ) while overall and rancid flavour were significantly more persistent (Tend) and overall flavour was significantly more intense (Imax and Area) ( $p < 0.05$ ) (**Figure 4d**).

Regarding saltiness perception, Bertram et al., (2006) reported that the structure and biophysical characteristics of cooked ham is altered by pressurization and suggested that pressurization may reduce the critical amount of salt required in a ham product. According to Arnau, Hugas, and Monfort, (1987) saltiness perception is increased by the weakening of the interaction between ions  $\text{Na}^+$  and HPP could induce changes in this interaction; leaving ions  $\text{Na}^+$ , responsible for the saltiness perception, more accessible and then increasing saltiness perception. The increase in saltiness perception with HPP was not related to an increase in the salt content, since no differences in salt content with HPP were found (**Table 2**). These results is in good agreement with those from a previous study carried out by Clariana, Guerrero, Sárraga, Díaz, Valero, and García-Regueiro, (2011). Regarding temporal flavour perception, several studies have confirmed that HHP promotes lipid oxidation and volatile formation in sliced dry-cured ham (Andrés et al., 2004). Lipid oxidative of dry-cured Iberian ham lead to the formation of volatile carbonyls which strongly affect the flavour of the final product (Ruiz, Muriel, & Ventanas, 2002b). The results obtained for overall flavour perception can be linked to the acceleration of lipid oxidation and the formation of lipid-derived volatiles such as hexanal as a result of pressurisation, as previously reported.

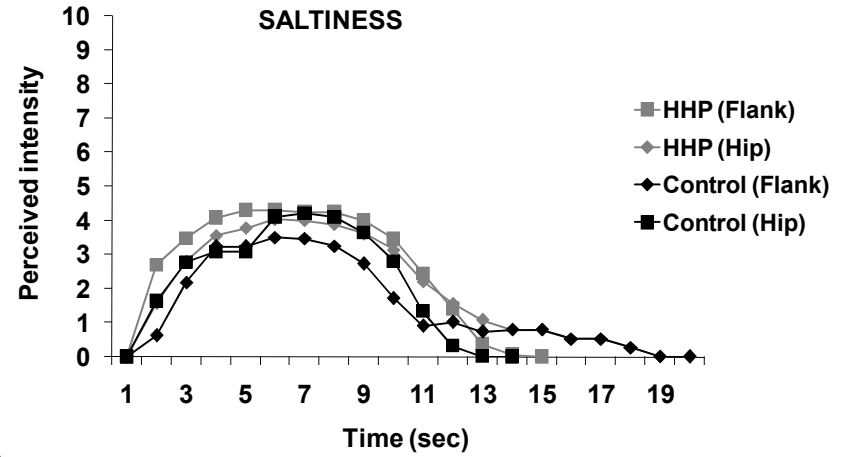
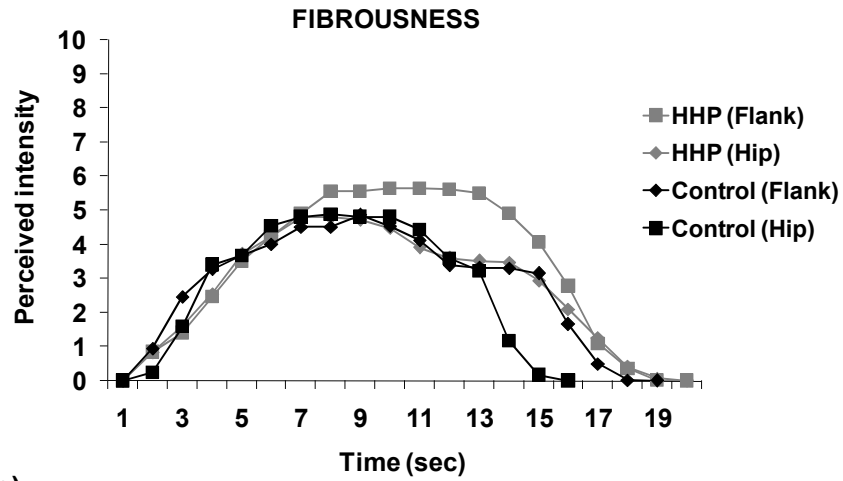
**Table 4.** Main effect of IMF content (F) and HHP treatment (T) on TI parameters (mean  $\pm$  standard deviation): I<sub>max</sub>: maximum intensity observed for the curve, T<sub>end</sub>: finish time, DurPI: duration of plateau and AreaT<sub>se</sub>: Total Area under the curve. Significance level for IMF (F), treatment (T), session (Se) and interaction (F\*T): ns, non significant, \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001.

	CONTROL		HHP		F	T	Se	F*T
	Flank	Hip	Flank	Hip				
<b>Hardness</b>								
I <sub>Max</sub>	4.36 $\pm$ 0.30	4.91 $\pm$ 0.37	4.15 $\pm$ 0.50	4.94 $\pm$ 0.39	*	ns	ns	ns
T <sub>End</sub>	12.86 $\pm$ 0.33	13.28 $\pm$ 0.24	14.88 $\pm$ 0.49	14.34 $\pm$ 0.60	ns	**	ns	ns
DurPI	3.34 $\pm$ 0.37	3.19 $\pm$ 0.32	4.11 $\pm$ 0.53	4.55 $\pm$ 0.44	ns	**	ns	ns
AreaT <sub>se</sub>	34.88 $\pm$ 3.53	37.43 $\pm$ 2.91	35.29 $\pm$ 2.53	48.63 $\pm$ 4.88	*	ns	ns	ns
<b>Juiciness</b>								
I <sub>Max</sub>	3.51 $\pm$ 0.43	2.71 $\pm$ 0.24	4.26 $\pm$ 0.52	3.64 $\pm$ 0.40	ns	*	ns	ns
T <sub>End</sub>	12.54 $\pm$ 0.16	11.90 $\pm$ 0.17	13.07 $\pm$ 0.49	14.75 $\pm$ 0.36	ns	***	ns	*
DurPI	3.75 $\pm$ 0.61	3.21 $\pm$ 0.29	3.93 $\pm$ 0.59	3.90 $\pm$ 0.55	ns	ns	ns	ns
AreaT <sub>se</sub>	24.81 $\pm$ 4.08	19.71 $\pm$ 2.19	35.43 $\pm$ 7.38	32.26 $\pm$ 5.46	ns	*	ns	ns
<b>Fibrousness</b>								
I <sub>Max</sub>	4.62 $\pm$ 0.38	4.51 $\pm$ 0.22	5.63 $\pm$ 0.29	4.72 $\pm$ 0.28	*	*	ns	ns
T <sub>End</sub>	16.18 $\pm$ 1.74	15.37 $\pm$ 0.57	18.39 $\pm$ 1.32	17.02 $\pm$ 1.28	ns	*	ns	ns
DurPI	6.08 $\pm$ 0.97	4.34 $\pm$ 0.86	5.51 $\pm$ 0.80	4.98 $\pm$ 0.64	*	ns	ns	ns
AreaT <sub>se</sub>	46.73 $\pm$ 6.86	42.35 $\pm$ 4.60	60.97 $\pm$ 6.99	54.85 $\pm$ 6.20	ns	**	ns	ns
<b>Saltiness</b>								
I <sub>Max</sub>	3.44 $\pm$ 0.30	4.11 $\pm$ 0.37	4.62 $\pm$ 0.28	4.52 $\pm$ 0.39	ns	*	ns	ns
T <sub>End</sub>	13.56 $\pm$ 0.39	13.10 $\pm$ 0.29	13.92 $\pm$ 0.46	14.12 $\pm$ 0.55	ns	ns	***	ns
DurPI	4.61 $\pm$ 0.41	2.88 $\pm$ 0.50	4.91 $\pm$ 0.50	4.32 $\pm$ 0.64	*	ns	ns	ns
AreaT <sub>se</sub>	28.59 $\pm$ 2.61	32.53 $\pm$ 3.82	43.69 $\pm$ 5.85	40.88 $\pm$ 5.77	ns	**	ns	ns
<b>Overall flavour</b>								
I <sub>Max</sub>	5.33 $\pm$ 0.34	5.54 $\pm$ 0.25	5.56 $\pm$ 0.16	6.14 $\pm$ 0.29	ns	*	ns	ns
T <sub>End</sub>	19.90 $\pm$ 1.81	22.84 $\pm$ 3.79	23.94 $\pm$ 3.38	23.59 $\pm$ 3.34	ns	*	ns	ns
DurPI	6.09 $\pm$ 1.02	7.10 $\pm$ 1.94	10.84 $\pm$ 1.77	6.75 $\pm$ 0.15	ns	**	ns	*
AreaT <sub>se</sub>	72.21 $\pm$ 11.20	80.74 $\pm$ 18.78	82.77 $\pm$ 14.72	92.15 $\pm$ 12.59	ns	ns	ns	ns
<b>Rancid flavour</b>								
I <sub>Max</sub>	2.30 $\pm$ 0.37	3.61 $\pm$ 0.18	2.79 $\pm$ 0.53	3.39 $\pm$ 0.31	*	ns	ns	ns
T <sub>End</sub>	17.43 $\pm$ 1.92	23.255 $\pm$ 3.49	22.52 $\pm$ 2.97	24.00 $\pm$ 3.85	*	*	ns	ns
DurPI	6.14 $\pm$ 1.15	7.42 $\pm$ 1.76	6.80 $\pm$ 1.20	7.04 $\pm$ 1.92	ns	ns	ns	ns
AreaT <sub>se</sub>	21.53 $\pm$ 2.38	55.73 $\pm$ 11.24	40.96 $\pm$ 12.05	49.78 $\pm$ 10.32	**	ns	ns	ns
<b>Cured flavour</b>								
I <sub>Max</sub>	5.31 $\pm$ 0.34	4.50 $\pm$ 0.18	4.77 $\pm$ 0.42	5.15 $\pm$ 0.43	ns	ns	ns	ns
T <sub>End</sub>	19.90 $\pm$ 2.20	22.18 $\pm$ 1.78	21.17 $\pm$ 2.25	21.76 $\pm$ 2.47	ns	ns	ns	ns
DurPI	7.08 $\pm$ 1.66	5.95 $\pm$ 1.16	8.20 $\pm$ 1.27	6.37 $\pm$ 1.14	ns	ns	ns	ns
AreaT <sub>se</sub>	64.70 $\pm$ 11.58	61.37 $\pm$ 7.56	66.48 $\pm$ 10.67	71.85 $\pm$ 9.20	ns	ns	ns	ns

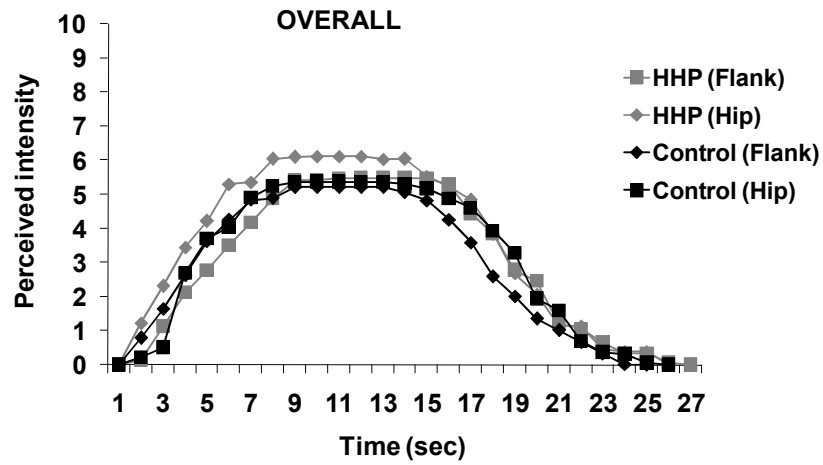
**Figure 4.** Average TI curves for the attributes hardness (a), juiciness (b), fibrousness (c), saltiness (d), overall flavour (e), rancid flavour (f) and cured flavour (g) (n = 40; 10 panellists x 4 replications).



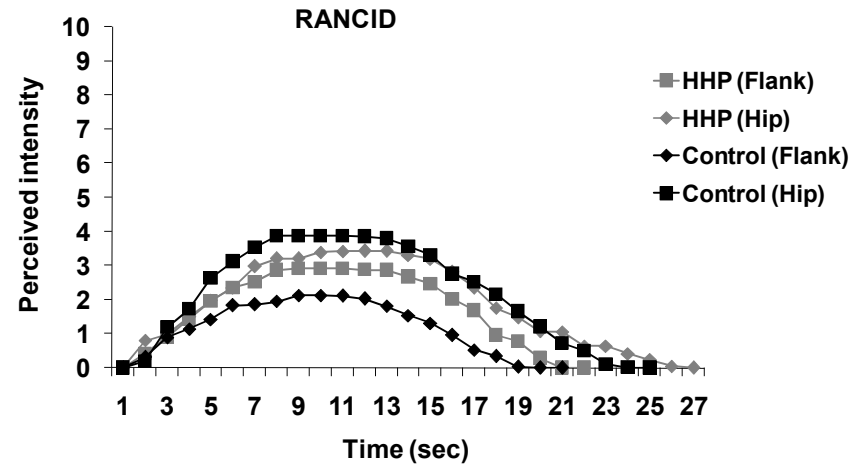
c)d)



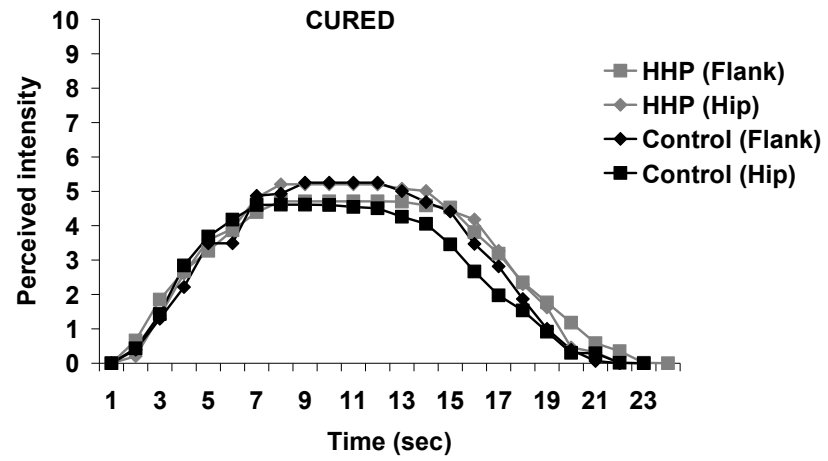
e)



f)



g)



## CONCLUSIONS

Both static (sensory profiling) and dynamic sensory techniques (time–intensity) resulted as successful methods to assess the effect of IMF and HHP treatment on the sensory characteristics of sliced and vacuum packaged dry-cured hams. Differences in the IMF content affected the appearance of lean and had a remarkable effect on the temporal perception of hardness and fibrousness and of rancid flavour. Lipid oxidation measured as hexanal content was enhanced by both IMF content and HPP treatment contributing to increase the temporal perception of rancid flavour. Finally, TI method revealed that HHP treatment of sliced and vacuum packaged dry-cured hams samples affected the temporal perception of both texture and flavour attributes.

## ACKNOWLEDGES

Verónica Fuentes is thankful to the “Ministerio de Educación, Cultura y Deporte” for the FPI grant. This study was supported by the “Ministerio de Economía y Competitividad” project entitled: “Estudio sensorial e instrumental de la liberación de compuestos olor-activos en jamón ibérico loncheado: efecto del contenido y características de la grasa. (Project AGL2007-65923-C02-01). Authors are grateful to Jeroni Durango from CENTA-IRTA (Monells, Girona) for performing the high pressure treatment.

## REFERENCES

- Andrés, A. I., Cava, R., Ventanas, J., Muriel, E., & Ruiz, J. (2004). Lipid oxidative changes throughout the ripening of dry-cured Iberian hams with different salt contents and processing conditions. *Food Chemistry*, 84(3), 375–381.
- Andrés, A. I., Møller, J. K. S., Adamsen, C. E., & Skibsted, L. H. (2004). High pressure treatment of dry-cured Iberian ham. Effect on radical formation, lipid oxidation and colour. *European Food Research Technology*, 219, 205–210.
- AOAC (1984). *Official Methods of Analysis* (14th ed.). Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.

- Arnau, J., Hugas, M., Monfort, J. M., (1987). Jamón curado: Aspectos técnicos, *Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries*. 1st d. Barcelona.
- Bertram, H. C., Kristensen, M., Østdal, H., Baron, C. P., Young, J. F., & Andersen, H. J. (2007). Does oxidation affect the water functionality of myofibrillar proteins? *Journal Agricultural Food Chemistry*, 55, 2342–2348.
- Bertram, H. C., Wu, Z., Straadt, I. K., Aagaard, M., & Aaslyng, M. D. (2006). Effects of Pressurization on Structure, Water Distribution, and Sensory Attributes of Cured Ham: Can Pressurization Reduce the Crucial Sodium Content?. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9912-9917.
- Brauss, M. S., Linforth, R. S., Cayeux, I., Harvey, B., & Taylor, A. J. (1999). Altering the fat content affects flavor release in a model yogurt system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2055–2059.
- Campus, M., Flores, M., Martínez, A., & Toldrá, F. (2008). Effect of high pressure treatment on colour, microbial and chemical characteristics of dry cured loin. *Meat Science*, 80, 1174–1181.
- Carlez, A., Veciana-Nogues, T., & Cheftel, J. C. (1995). Changes in colour and myoglobin of minced beef meat due to high pressure processing. *LWT –Food Science and Technology*, 28, 528–538.
- Carrapiso, A. (2007). Effect of fat content on flavour release from sausages. *Food Chemistry*, 103, 396-403.
- Cava, R., Ladero, L., González, S., Carrasco, A., & Ramírez, M. R. (2009). Effect of pressure and holding time on colour, protein and lipid oxidation of sliced dry-cured Iberian ham and loin during refrigerated storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 76–81.
- Cheftel, J. C., & Culioli, J. (1997). Effects of high pressure on meat: A review. *MeatScience*, 46, 211–236.
- Clariana, M., Guerrero, L., Sárraga, C., Díaz, I., Valero, A., & García-Regueiro, J. A. (2011). Influence of high pressure application on the nutritional, sensory and microbiological characteristics of sliced skin vacuum packed dry-cured ham. Effects along the storage period. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12, 456-465.
- Corona, E. (2012). Caracterización de la calidad de productos cárnicos crudo-curados mediante ultrasonidos de señal. *PhD Tesis*, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.
- Dijksterhuis, G. B., & Piggott, J. R. (2001). Dynamic methods of sensory analysis. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 284–290.



- Dransfield, E. (1994). Tenderness of meat, poultry and fish. In A. M. Pearson, & T. R. Dutson (Eds.). *Quality attributes and their measurement in meat, poultry and fish products* (pp. 289-315). London: Blackie Academic & Professional.
- Dumay, E., Lambert, C., Funtenberger, S., & Cheftel, C. J. (1996). Effects of High Pressure on the Physico-chemical Characteristics of Dairy Creams and Model Oil/Water Emulsions. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 29, 606.
- Estévez, M., Morcuende, D., & Cava, R. (2003). Oxidative and colour changes in meat from free-range reared Iberian pigs slaughtered at 90 kg live-weight and commercial pig under refrigerated storage. *Meat Science*, 65, 1139–1146.
- Estévez, M., Ventanas, S., & Cava, R. (2005). Physicochemical properties and oxidative stability of liver pâté as affected by fat content. *Food Chemistry*, 92, 449-457.
- Estévez, M., Ventanas, S., & Cava, R. (2005b). Protein oxidation in frankfurters with increasing levels of added rosemary essential oil: Effect on colour and texture deterioration. *Journal of Food Science*, 70, 427–432.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226, 497–509.
- Fuentes, V., Ventanas, J., Morcuende, D., Estévez, M., & Ventanas, S. (2010). Lipid and protein oxidation and sensory properties of vacuum-packaged dry-cured ham subjected to high hydrostatic pressure. *Meat Science*, 85, 506-514.
- Ganhão, R., Morcuende, D., & Estévez, M. (2010). Protein oxidation in emulsified cooked burger patties with added fruit extracts: influence on colour and texture deterioration during chill storage. *Meat Science*, 85, 402-409.
- Garriga, M., Grébol, N., Aymerich, M. T., Monfort, J. M., & Hugas, M. (2004). Microbial inactivation after high-pressure processing at 600 MPa in commercial meat products over its shelf life. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 451–457.
- Guinard, J.X., Wee, C., McSunas, A., & Fritter, D. (2002). Flavor release from salad dressing varying in fat and garlic flavour. *Food Quality and Preference*, 13, 129-137.
- Homma, N., Ikeuchi, Y., & Suzuki, A. (1996). Effect of high pressure treatment on proteolytic system in meat. In C. Balny & R. Hayashi (Eds.), *High Pressure and Biotechnology* (pp. 327–330). Elsevier Science.
- Huff-Lonergan, E., & Lonergan, S. M. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Science*, 71, 194-204.

- Hugas, M., Garriga, M., & Monfort, J.M. (2002). New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. *Meat Science*, 62, 359-371.
- ISO 937:1978. Meat and meat products. Determination of nitrogen content (Reference method). International Organization for Standardization, Geneva.
- Lawrie, R. A. (1998). The eating quality of meat. In *Meat Science* (6th ed.). Cambridge: Woodhead Publishing.
- Mor-Mur, M., & Yuste, J. (2003). High pressure processing applied to cooked sausage manufacture: Physical properties and sensory analysis. *Meat Science*, 65, 1187-1191.
- Niñoles, L., Mulet, A., Ventanas, S., & Benedito, J. (2010). Ultrasonic assessment of the melting behaviour in fat from Iberian dry-cured hams. *Meat Science*, 85, 26-32.
- Peyvieux, C., & Dijksterhuis, G. (2001). Training a sensory panel for TI: A case study. *Food Quality and Preference*, 12, 19-28.
- Pålsgård, E., & Dijksterhuis, G.B. (2000) 'The Sensory Perception of Flavour Release as a Function of Texture and Time' in *Journal of Sensory Studies* 15, 347-359
- Rivas-Cañedo, A., Fernández-García, E., & Nuñez, M. (2009). Volatile compounds in dry-cured Serrano ham subjected to high pressure processing. Effect of the packaging material. *Meat Science*, 82, 162-169.
- Roberts, D. D., Pollien, P., & Watzke, B. (2003). Experimental and modeling studies showing the effect of lipid type and level on flavour release from milk-based liquid emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 189-195.
- Rubio, B., Martínez, B., García-Cachán, M.D., Rovira, J., & Jaime, I. (2007). Effect of high pressure preservation on the quality of dry cured beef "Cecina de Leon". *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 102-110.
- Ruiz, J., García, C., Muriel, E., Andrés, A. I., & Ventanas, J. (2002a). Influence of sensory characteristics on the acceptability of dry-cured ham. *Meat Science*, 61, 347-354.
- Ruiz, J., Muriel, E., & Ventanas, J. (2002b). The flavour of Iberian ham. In F. Toldrá (Ed.). *Research advances in the quality of meat and meat products* (pp. 289-309). Trivandrum, India: Research Signpost.
- Ruiz, J., Ventanas, J., Cava, R., Andrés, A. I., & García, C. (2000). Texture and appearance of dry-cured ham as affected by fat content and fatty acid composition. *Food Research International*, 33, 91-95.

- Serra, X., Grébol, N., Guàrdia, M. D., Guerrero, L., Gou, P., Masoliver P., et al., (2007). High pressure applied to frozen ham at different process stages. 2. Effect on the sensory attributes and on the colour characteristics of dry-cured ham. *Meat Science*, 75, 21-28.
- Suzuki, A., Homma, Y., Kim, K., Ikeuchi, Y., Sugiyama, T., & Saito, M. (2001). Pressure-induced changes in the connectin/titin localization in the myofibrils revealed by immunoelectron microscopy. *Meat Science*, 59, 193-197.
- Tressl, R., Bahri, D., & Engel, K.H. (1981). Lipid oxidation in fruits and vegetables. In: R. Teranishi, & H. Barrera-Benitez (Eds.). *Quality of selected fruits and vegetables of North America*. ACS Symposium Series 31 (pp. 213–231). ACS: Washington, DC, USA.
- Ventanas, J., Córdoba, J. J., Antequera, T., García, C., López-Bote, C., & Asensio, M. A. (1992). Hydrolysis and Maillard reactions during ripening of Iberian cured ham. *Journal of Food Science*, 57, 813–815.
- Ventanas, S., Estévez, M., Andrés, A. I., & Ruiz, J. (2008). Analysis of volatile compounds of Iberian dry-cured loins with different intramuscular fat contents using SPME–DED. *Meat Science*, 79, 172-180.
- Ventanas, S., Puolanne, E., & Tuorila, H. (2010). Temporal changes of flavour and texture in cooked bologna type sausages as affected by fat and salt content. *Meat Science*, 85, 410-419.
- Ventanas, S., Ventanas, J., Ruiz, J., & Estévez, M. (2005). Iberian pigs for the development of high-quality cured products. In *Recent Research in Development in Agricultural and Food Chemistry* (pp. 27–53). Trivandrum, Kerala, India: Research Signpost.
- Ventanas, S., Ventanas, J., Tovar, J., García, C., & Estévez, M. (2007a). Extensive feeding versus oleic acid and tocopherol enriched mixed diets for the production of Iberian dry-cured hams: Effect on chemical composition, oxidative status and sensory traits. *Meat Science*, 77, 246–325.
- Ventanas, S., Ventanas, J., & Ruiz, J. (2007b). Sensory characteristics of Iberian dry-cured loins: Influence of crossbreeding and rearing system. *Meat Science*, 75, 211-219.
- Winger, R. J., & Hagyard, C. J. (1994). Juiciness- its importance and some contributing factors. In A. M. Pearson, & T. R. Dutson (Eds.). *Quality attributes and their measurement in meat, poultry and fish products* (pp. 94–124). London: Blackie Academic & Professional.



## **CAPÍTULO VIII.**

**Estatus:** aceptado.

*Meat Science*

DOI:10.1016/j.meatsci.2012.11.017

### **Effect of intramuscular fat content and serving temperature on temporal sensory perception of sliced and vacuum packaged dry-cured ham**

Verónica Fuentes, Jesús Ventanas, David Morcuende, Sonia Ventanas\*.

Department of Animal Production and Food Science, University of Extremadura, 10003  
Cáceres, Spain.

\*Corresponding author: Sonia Ventanas, email:[sanveca@unex.es](mailto:sanveca@unex.es)

## **Abstract**

The present study aimed to evaluate the influence of three serving temperatures (7 °C, 16 °C and 20 °C) and two different hams sections varying in the intramuscular fat (IMF) content on the sensory characteristics of sliced and vacuum-packaged Iberian dry-cured hams using the time-intensity (TI) method. Preceding the TI study, appearance and odour of dry-cured hams were evaluated using a descriptive profile. Fluidity and brightness of the external fat, brightness of lean and all odour attributes increased as serving temperature increased whereas the hardness of external fat decreased with temperature. Oral temperature would have disguised the effect of serving temperature over time as consequence of a possible balance between both temperatures during samples consumption. TI revealed that the effect of serving temperature on flavour and texture perception was more noticeable along the first seconds of chewing. Odour intensities increased with the IMF content and temporal perception of hardness, saltiness and rancid flavour were also significantly influenced by the IMF content.

## **Keywords**

Serving temperature, Iberian dry-cured ham, Time-intensity, Intramuscular fat content.

## INTRODUCTION

Sensory characteristics are of a great importance for consumer preferences and satisfaction with foods (Tuorila, & Monteleone, 2009). In fact, flavour and texture have a clear relationship to meat palatability (Behrends et al., 2005; Calkins, & Hodgen, 2007).

The serving temperature influences the ratings of sensory attributes (Engelen, Wijk, Prinz, Janssen, Weenen, & Bosman, 2003) being an important factor affecting both acceptability and intensity of odour and flavour attributes. The effect of serving temperature on flavour perception depends on the food and the sensory attribute evaluated (Ventanas, Mustonen, Puolanne, & Tuorila, 2010b). Moreover, product temperature could influence the viscosity of the product and the ratio of solid and melted fat and thereby affects the quality and the thickness of the oral coating formed during product consumption (Engelen et al., 2003).

Iberian dry-cured ham is one of the most valuable derived meat products of Spain, with a first-rate consumer acceptance. This high consumer preference is mainly sustained on its unique and much appreciated sensory features, being the juiciness and flavour the most important properties in determining Iberian dry-cured ham acceptability (Ruiz, García, Muriel, Andrés, & Ventanas, 2002a). Traditionally, Iberian dry-cured hams have been sold as the whole leg including the hoof whereas current purchasing trends involve portioning such as in sliced and vacuum-packaged dry-cured hams.

Dry-cured ham is generally recommended to be consumed at room temperature in order to improve the perception of its particular sensory properties. However, sliced and vacuum packaged dry-cured ham is commonly stored under chilled conditions in both domestic refrigerators and in display cabinets in the market and thus, in most occasions, people consume this product just after take it out from the fridge. The “room temperature” is considerably variable throughout the year, particularly in Mediterranean countries where this product is mostly consumed. Taking into consideration the variety of temperatures of dry-cured ham consumption and the likely influence of this parameter on the sensory features and hence, acceptability of dry-cured hams, it is of great interest to investigate the impact of serving temperature on the sensory perception of this

product. Additionally, most studies have investigated the effect of temperature of consumption on sensory properties of solutions (Bartoshuk, Rennert, Rodin, & Stevens, 1982; Calvino, 1986; Green, & Frankmann, 1987), model system (Ventanas et al., 2010b), semi-solids products (Engelen et al., 2003), meals (Ryynänen, Tuorila, & Hyvönen, 2001) or pork patties (Reinbach, Tøft, & Møller, 2009) but no scientific studies have been carried out in dry-cured products.

Several authors have reported the influence of different factors such as the length of the ripening process (Ruiz, Ventanas, Cava, Andrés, & García, 1999), the pig feeding system (Ventanas, Ventanas, Tovar, García, & Estévez, 2007) or the fat content and composition (Ruiz, Ventanas, Cava, Andrés, & García, 2000) on Iberian dry-cured ham sensory properties using the descriptive profile analysis. However, temporal aspects of sensory perception affected by the temperature of consumption have not been studied before in dry-cured meats products and particularly in Iberian dry-cured hams. The time-intensity (TI) method allows monitoring the intensity over time and thus provides more real and valid information compared to static techniques (Dijksterhuis, & Piggott, 2001). The objective of the present study was to investigate the effect of serving temperature (7 °C, 16 °C and 20 °C) on the dynamic perception of flavour and texture in Iberian dry-cured ham using TI methodology. Moreover, to evaluate the effect of the IMF content and the possible interactions with the temperature of consumption, two different sections of the Iberian dry-cured hams were considered.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Dry-cured ham samples**

Eight dry-cured hams (7.5 kg average) were obtained from free-range reared Iberian pigs fed on grass and commercial concentrates during the fattening period (60 days prior to slaughter) and slaughtered at 160 kg live weight and 12 months of age (Campo, DOP Dehesa de Extremadura). Green hams were processed traditionally, including two defined steps: salting/post-salting and ripening (Estévez, Morcuende, Ventanas, & Ventanas, 2008). During the first



period (4–6 months), low temperatures (0–7 °C) were combined with high relative humidity (80–90 %) to reduce the risk of bacterial spoilage. Then, the hams were ripened for 15 months in a cellar at temperatures ranging from 10 to 27 °C and relative humidity 58–80 %. In order to evaluate the effect of the IMF content on sensory characteristics, once the ripening process was finished (~30 % weight loss), the hams were deboned and two different sections varying in the IMF content were extracted (*Quadriceps femoris* (QF) containing lower IMF content compared to *Biceps femoris* (BF)). Afterwards, muscles were sliced (1 mm thickness) and vacuum-packaged (polyamide and polyethylene in the upper film with 34.0 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup> permeability to O<sub>2</sub> at 23 °C and 85 % HR, polyamide and polyethylene in the lower film with 18.0 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup> permeability to O<sub>2</sub> at 23 °C and 85 % HR) (Mobepack Company, Salamanca, Spain). A total of 244 packages of slices (100 g each one) were obtained (89 packages of QF batch and 155 packages of BF batch). Subsequently, both batches (QF and BF) were stored at chilled conditions (5 °C) for one month.

### **Chemical composition.**

Moisture content and chloride content (ISO 1443) were determined using official methods (AOAC, 2000). Folch method (Folch, Lees, & Sloane Stanley, 1957) was employed for determining the intramuscular fat content (IMF). Protein content was determined by Kjeldahl method (ISO 937:1978). Ten repetitions per batch were performed.

### **Sensory evaluations**

Descriptive sensory analysis and TI evaluations were performed in all dry-cured hams batches at different serving temperatures (7 °C, 16 °C and 20 °C). These temperatures were selected based on: (i) 7 °C simulated chilled conditions in domestic refrigerators, (ii) 20 °C simulated samples consumption at room temperature and (iii) 16 °C is an intermediate temperature between the others and similar to the temperature reached in the last stage of dry-cured hams ripening.

All the glass plates using for presenting the samples to the panellist were conditioned at the different serving temperatures for at least 45 minutes.

Afterwards, dry-cured ham slices were placed on different glass plates and conditioned at the different serving temperatures for at least 30 minutes. This preconditioning protocol of glass plates and samples was carried out in heat cabinets (VELP Scientific, mod. FTC 90E and Aqua Lytic, mod. FKS 3600). Samples were taken out from the heat cabinet and served to the panellists immediately before samples testing.

### *Panellist*

Ten panellists (five males and five females) with previous experience in sensory evaluation participated in the study (training and evaluation sessions). All of them were staff of the University of Extremadura.

During training sessions (2 h), assessors (n=10) were getting familiar with the appearance, odour, texture and flavour attributes and the intensity rating procedure with the FIZZ software system used for the evaluations. The attributes were selected after panel discussion and were in agreement with those previously reported by Fuentes et al., (2012 submitted). All panellists have previous experience with the TI technique.

### *Organization of the sessions*

For practical reasons, the samples were presented in blocks representing one group (QF with a lower IMF content and BF with a higher IMF content) per day. In each daily session three samples at two different serving temperatures were presented to the panel. Assessors participated in a total of sixteen sessions consisted of eight sensory profiling sessions and eight TI sessions. Each sample (QF and BF) at each temperature (7 °C, 16 °C and 20 °C) was evaluated four times.

In each session, three samples with random three digit codes were presented to the assessors. Samples were allowed to equilibrate for at least 30 minutes at the selected temperature in heat cabinets (VELP Scientific modelo FTC 90E y Aqua Lytic modelo FKS 3600). Evaluations were conducted in individual booths. The presentation order of samples for each assessor was randomized following a William Latin Square design.

Prior to TI, descriptive sensory analysis was carried out over eight consecutive days. To generate and set up the list of attributes characterizing the dry-cured ham samples, all batches at different serving temperature were evaluated. Samples were presented on glass plates with a list of potential attributes according to Fuentes et al. (2012, submitted). Panellists rated the intensity of the selected attributes using an unstructured scale (10 cm). After discussion the panel reached an agreement. The selected attributes were for appearance of external fat: colour intensity, colour homogeneity and brightness; for tactile texture of external fat: fluidity, hardness and sandy; for appearance of lean: red colour intensity, marbling and brightness; for odour of lean: overall, rancid and cured. Their verbal anchors were from “less” to “more” for all attributes, except for fat colour intensity that anchors were from “white” to “yellow”. Panellist were instructed to evaluate first the attributes of the external fat of the dry-cured ham slice, and then those related to the lean (Fuentes et al., 2012 submitted)

Dynamic sensory properties of flavour and texture in dry-cured ham affected by IMF content and serving temperature were studied using TI methodology. Sample size was standardised and the protocol was established as follows: panellists should keep the sample in their mouths, chew for 10 s and then swallow. After swallowing panellists should continue the evaluation until they did not perceive anything. Panellists were instructed to move the cursor along the scale according to the intensity of their perception. The time of the evaluation was fixed in 120 s, but panellists could stop before by moving the mouse completely towards “less” extreme. During the data collection, specific messages were displayed in the computer screen showing commands as “indicate the intensity during chewing the sample by moving the cursor along the scale”, “swallow the sample” and “move the cursor completely toward less if you do not perceived anything more”.The final rinsing protocol between samples was tap water and a piece of unsalted crackers. This standardised protocol was used in all TI evaluations. Panellists rated one attribute at a time and all attributes were evaluated four times, thus a total of 40 TI curves of each attribute were obtained for each sample at each serving temperature.

All sensory data were collected using the FIZZ software (Sensory Analysis and Computer Test Management) (Biosystemes, France, 2002).

## **Statistical analysis**

Data from chemical composition were analysed by one-way ANOVA (GLM procedure) with IMF content as main factor.

Three-way ANOVA (repeated measures) (GLM procedure) was applied for each attribute measured by using descriptive profile to evaluate the main effects of IMF content, serving temperature and their interaction. IMF content (QF or BF), replications (1, 2, 3 and 4 sessions) and serving temperature (7 °C or 16 °C or 20 °C) were included as within-subject factors. Pearson's correlation coefficients were also calculated.

Regarding data from individual TI curves of texture and flavour attributes were analysed and average TI curves were computed for each attribute over ten assessors and four replications using FIZZ software. Four TI parameters were extracted from TI curves: (1) maximum intensity (Imax), (2) computed end time (Tend): total duration of the evaluation in seconds, (3) total area under the curve (Area) and (4) duration of the plateau phase (DurPI). Three-way ANOVA (repeated measures) (GLM procedure) was carried out for each TI parameter. In this model, IMF content, serving temperature and replications were included as within subject factors. Tukey's tests were used when ANOVA showed a significant effect within each studied batch.

All statistical analyses were conducted using the software SPSS (v 15.0) for windows.

## **RESULTS**

### **Chemical composition**

Significant differences were found in the chemical composition between the samples obtained from the two different locations evaluated (QF and BF). Proximate composition of Iberian dry-cured hams were (means  $\pm$  standard deviation): moisture content (QF: 43.86 %  $\pm$  1.38 and BF: 42.51 %  $\pm$  0.62;  $p < 0.05$ ), chloride content (QF: 3.46 %  $\pm$  0.29 and BF: 2.82 %  $\pm$  0.29;  $p < 0.001$ ), intramuscular fat (IMF) content (QF: 10.51 %  $\pm$  0.64 and BF: 14.58 %  $\pm$  0.62;

$p < 0.001$ ) and protein content (QF: 42.63 %  $\pm$  1.99 and BF: 38.91 %  $\pm$  3.63;  $p < 0.05$ ). These results are consistent with previous studies carried out in Iberian dry-cured ham (Fuentes, Ventanas, Morcuende, Estévez, & Ventanas, 2010).

### **Sensory profiling**

Main effect of IMF content and serving temperature on sensory attributes is shown in **Table 1**

All attributes related to appearance and odour of lean were significantly affected by IMF content (**Table 1**) showing BF samples (higher IMF content) the highest scores for brightness, marbling, overall odour, cured odour and rancid odour compared to QF ones (lower IMF content). Moreover, increasing the IMF content of dry-cured ham samples contributed to significantly decrease the intensity of redness in the dry-cured ham samples.

Serving temperature had also a great influence on the sensory profile of the evaluated samples (**Table 1**). Increasing the serving temperature significantly increased the colour intensity, the brightness and the fluidity of the external fat of samples regardless the IMF content. Nevertheless the main effect of temperature on colour homogeneity was not significant ( $p > 0.05$ ) (**Table 1**), increasing the serving temperature significantly decreased the colour homogeneity in QF samples with samples served at 7° C showing the highest scores for this attribute. The hardness of external fat was also significantly affected by serving temperature. Fat of samples served at 20°C were less hard compared to those served at 16 °C and 7 °C (**Table 1**). Moreover, most sensory attributes related to the lean of samples was significantly affected by the serving temperature (**Table 1**). Increasing the serving temperature resulted in a less intense marbling perception in QF (lower IMF content) samples but not in BF ones (higher IMF content). The brightness of lean increased with temperature regardless the IMF content of samples. And finally, all odour attributes were affected by serving temperature to similar extent, increasing with temperature regardless the IMF content.

**Table 1.** Main effect of intramuscular fat content (IMF) and serving temperature (T) on sensory attributes (mean  $\pm$  standard deviation) of sliced and vacuum packed dry-cured ham (QF: *Quadriceps femoris* and BF: *Biceps femoris*) evaluated using descriptive sensory analysis. Significance level for fat content (IMF), temperature (T), session (S) and interaction (IMF\*T): ns, non significant,  $p > 0.05$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

	QF				BF				IMF	T	S	IMF*T
	7 °C	16 °C	20 °C	mean $\pm$ sd	7 °C	16 °C	20 °C	mean $\pm$ sd				
<b>EXTERNAL FAT</b>												
<i>Appearance</i>												
Colour intensity	2.46 <sup>b</sup>	3.23 <sup>b</sup>	3.03 <sup>ab</sup>	2.91 $\pm$ 0.08	2.31 <sup>b</sup>	3.08 <sup>a</sup>	2.72 <sup>ab</sup>	2.71 $\pm$ 0.08	-	***	*	ns
Colour homogeneity	6.80 <sup>a</sup>	6.12 <sup>b</sup>	6.14 <sup>b</sup>	6.36 $\pm$ 0.11	6.34	6.71	6.54	6.53 $\pm$ 0.10	-	ns	ns	**
Brightness	2.21 <sup>b</sup>	3.76 <sup>a</sup>	4.75 <sup>a</sup>	3.58 $\pm$ 0.07	2.25 <sup>b</sup>	4.98 <sup>a</sup>	5.71 <sup>a</sup>	4.31 $\pm$ 0.10	-	***	***	*
<i>Tactile texture</i>												
Fluidity	3.88 <sup>c</sup>	4.76 <sup>b</sup>	6.01 <sup>a</sup>	4.88 $\pm$ 0.08	3.37 <sup>c</sup>	5.19 <sup>b</sup>	6.31 <sup>a</sup>	4.96 $\pm$ 0.13	-	***	**	*
Hardness	4.14 <sup>a</sup>	3.32 <sup>b</sup>	2.59 <sup>c</sup>	3.35 $\pm$ 0.15	4.30 <sup>a</sup>	3.88 <sup>a</sup>	2.46 <sup>b</sup>	3.55 $\pm$ 0.11	-	***	**	ns
Sandy	1.21	1.81	1.63	1.55 $\pm$ 0.08	1.11	1.12	0.93	1.05 $\pm$ 0.05	-	ns	ns	*

**LEAN**

*Appearance*

Red colour intensity	6.93	6.94	7.37	7.08±0.95	6.45	6.55	6.74	6.58±0.89	**	ns	ns	ns
Marbling	1.19 <sup>a</sup>	0.88 <sup>ab</sup>	0.71 <sup>b</sup>	0.93±0.43	3.67 <sup>a</sup>	3.07 <sup>b</sup>	3.89 <sup>a</sup>	3.54±0.90	***	**	***	***
Brightness	2.74 <sup>b</sup>	3.22 <sup>b</sup>	3.89 <sup>a</sup>	3.28±0.28	3.29 <sup>b</sup>	4.40 <sup>a</sup>	4.63 <sup>a</sup>	4.11±0.86	***	***	***	ns

*Odour*

Overall intensity	3.95 <sup>b</sup>	5.31 <sup>a</sup>	5.90 <sup>a</sup>	5.05±0.89	5.28 <sup>b</sup>	5.25 <sup>b</sup>	6.53 <sup>a</sup>	5.69±0.92	**	***	ns	**
Rancid	0.75 <sup>b</sup>	1.12 <sup>a</sup>	1.42 <sup>a</sup>	1.10±0.58	1.04 <sup>b</sup>	1.28 <sup>ab</sup>	1.68 <sup>a</sup>	1.33±0.61	*	***	ns	ns
Cured	2.93 <sup>c</sup>	3.47 <sup>b</sup>	4.29 <sup>a</sup>	3.56±0.88	4.30 <sup>c</sup>	4.92 <sup>b</sup>	5.80 <sup>a</sup>	5.01±0.89	***	***	**	ns

---

Different letters within the same row denote significant differences between means within the same batch (QF or BF).

## Time intensity evaluations

TI parameters extracted from TI curves are shown in **Table 2** and average TI curves in **Figure 1**. Temporal perception of hardness (I<sub>max</sub> and Area;  $p < 0.01$ ) was significantly affected by the IMF content of samples, with BF samples showing a more intense hardness perception compared to QF ones regardless the serving temperature. No effect of IMF on dynamic perception of juiciness and fibrousness was observed. Regarding flavour attributes, IMF content showed a significant effect on the duration of the Plateau phase (DurPI;  $p < 0.05$ ) of saltiness and on the persistence of rancid flavour (T<sub>end</sub>;  $p < 0.05$ ), displaying the BF samples the highest scores for DurPI of saltiness and the shortest duration of rancid flavour.

On the other hand, persistence of hardness (T<sub>end</sub>) was significantly affected by the serving temperature ( $p < 0.01$ ) (**Table 2**), with hardness being more persistent ( $p < 0.001$ ) in BF samples served at 16 °C compared to those served at 7 °C or 20 °C (**Figure 1a**). Although main effect of serving temperature did not significantly affect temporal juiciness perception, IMF\*T interaction was significant ( $p < 0.01$ ), increasing the persistence of juiciness (T<sub>end</sub>) with temperature in QF samples but decreasing in BF ones. Similarly, a significant IMF\*T interaction was obtained for the persistence of the maximum intensity (DurPI) of fibrousness. Although main effect of temperature did not affect fibrousness perception in a significant extent, in BF samples fibrousness intensity significantly (Area;  $p < 0.001$ ) increased with temperature (**Figure 1c**) showing the BF samples served at 7 °C the lowest intensity perception.

Persistence of saltiness (T<sub>end</sub>) and intensity of overall flavour (Area under the curve) were significantly influenced by the serving temperature ( $p < 0.05$ ) (**Table 2**). Persistence of saltiness was the longest at 16 °C in BF samples and at 7 °C in QF ones. Overall flavour was more intense (Area under the curve) at 20 °C compared to 16 °C and 7 °C (**Table 2**), although these differences (persistence of saltiness and overall intensity) were only significant in BF samples but not in QF ones (**Fig. 1d and 1e**). Persistence of overall flavour (T<sub>end</sub>) was shorter at 7 °C compared to 16 °C and 20 °C in BF samples. Regarding rancid and cured



flavour, a tendency of increasing the intensity perception over time (mainly Area under the curve) with serving temperature was observed (**Fig. 1f and 1g**).

**Table 2.** Main effect of intramuscular fat content (IMF) and serving temperature (T) on TI parameters (means  $\pm$  SEM); maximum intensity observed for the curve (Imax), computed end time (Tend), duration of plateau phase (DurPI), total area under the curve (Area). Significance level for fat content (IMF), temperature (T), session (S) and interaction (IMF\*T): ns, non significant, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . QF: *Quadriceps femoris* and BF: *Biceps femoris*.

	QF			BF			IMF	T	S	IMF*T
	7 °C	16 °C	20 °C	7 °C	16 °C	20 °C				
<b>Hardness</b>										
IMax	3.72±0.28	4.07±0.30	4.29±0.25	4.76±0.12	4.88±0.27	5.20±0.40	**	ns	ns	ns
TEnd	11.90±0.20	11.93±0.20	11.92±0.34	11.25±0.20 <sup>b</sup>	13.58±0.48 <sup>a</sup>	12.36±0.35 <sup>ab</sup>	ns	**	ns	**
DurPI	3.59±0.43	3.45±0.32	3.83±0.37	3.67±0.24	4.63±0.44	4.41±0.41	ns	ns	ns	ns
AreaTse	28.52±2.08	29.41±3.05	32.16±3.25	36.94±1.72	40.41±3.85	40.92±3.35	**	ns	ns	ns
<b>Juiciness</b>										
IMax	2.52±0.27	2.41±0.26	2.80±0.33	2.24±0.27	2.52±0.31	2.30±0.24	ns	ns	ns	ns
TEnd	11.17±0.15	11.61±0.12	11.74±0.26	11.79±0.15	11.69±0.22	11.06±0.14	ns	ns	**	**
DurPI	3.72±0.34	3.16±0.31	3.01±0.27	3.75±0.44	3.99±0.24	4.00±0.36	ns	ns	ns	ns
AreaTse	18.67±2.11	17.02±1.96	21.35±3.79	17.21±2.50	18.23±2.65	17.64±2.21	ns	ns	ns	ns
<b>Fibrousness</b>										
IMax	4.17±0.22	4.34±0.16	4.23±0.18	3.70±0.13	4.08±0.18	4.20±0.16	ns	ns	ns	ns
TEnd	19.84±2.29	17.94±1.33	18.57±1.13	16.79±1.60	17.07±0.67	16.49±1.48	ns	ns	ns	ns
DurPI	6.67±0.64	5.26±0.66	7.39±0.58	7.16±0.48	8.31±0.73	6.28±0.54	ns	ns	ns	**
AreaTse	49.16±4.96	45.97±5.48	51.21±4.32	37.54±3.46	47.99±2.80	48.59±5.59	ns	ns	ns	ns
<b>Saltiness</b>										
IMax	2.95±0.27	3.10±0.36	2.65±0.26	2.78±0.18	2.59±0.41	2.37±0.23	ns	ns	ns	ns
TEnd	13.05±0.52	11.94±0.16	12.43±0.23	12.02±0.31 <sup>b</sup>	14.08±0.45 <sup>a</sup>	11.65±0.16 <sup>b</sup>	ns	*	**	***
DurPI	4.89±0.72	3.26±0.40	3.79±0.62	5.05±0.49	5.53±0.73	4.56±0.47	*	ns	ns	ns

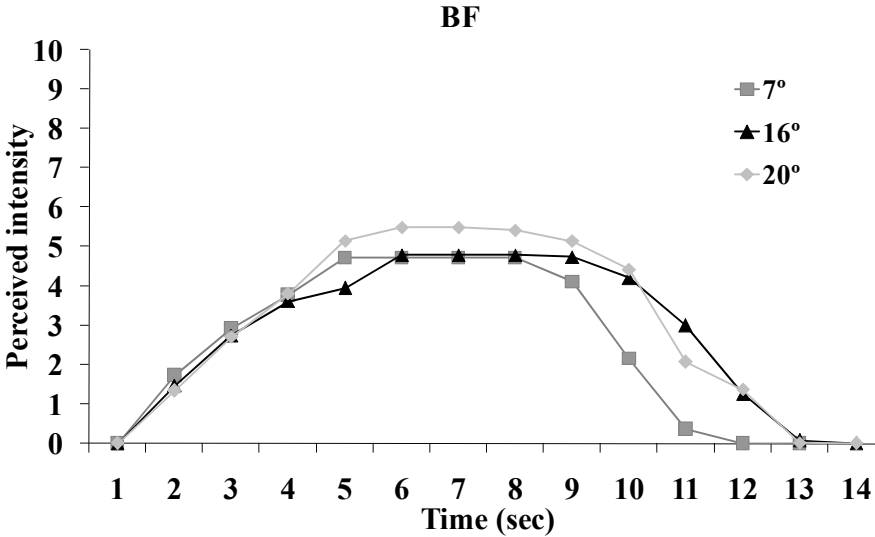
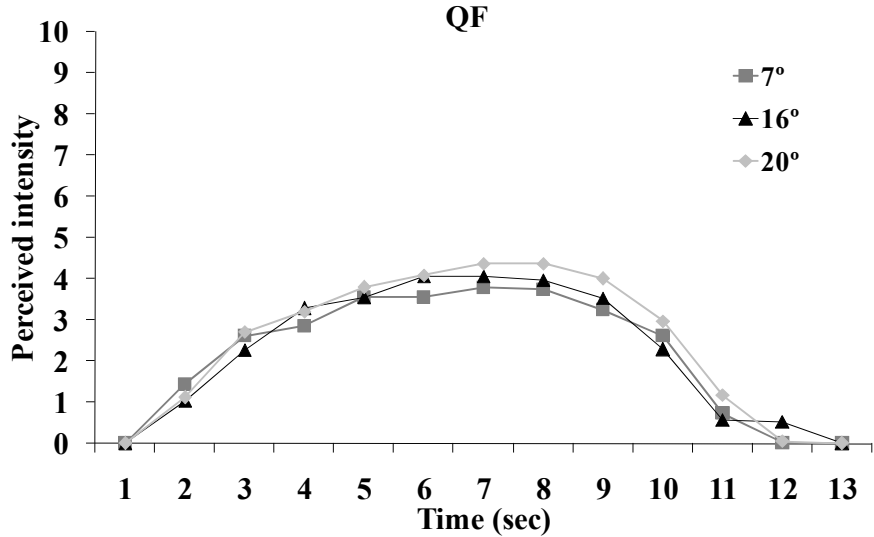
AreaTse	24.39±3.01	20.56±3.26	16.80±2.61	21.38±2.04	16.59±3.01	16.74±1.86	ns	ns	ns	ns
<b>Overall flavour</b>										
IMax	4.43±0.22	4.38±0.25	4.62±0.24	4.35±0.20	4.98±0.29	5.24±0.26	ns	ns	ns	*
TEnd	19.61±3.29	19.40±2.28	19.95±1.77	15.89±1.15	19.46±1.81	19.92±2.62	ns	ns	ns	ns
DurPI	5.97±1.47	5.43±0.64	6.27±0.73	5.27±0.49	5.99±0.59	7.74±0.77	ns	ns	ns	ns
AreaTse	51.68±6.99	54.75±6.90	61.87±8.95	43.92±3.50	63.00±8.00	71.87±11.61	ns	*	ns	ns
<b>Rancid flavour</b>										
IMax	2.16±0.20	2.50±0.18	2.46±0.25	2.33±0.16	2.29±0.23	2.13±0.26	ns	ns	ns	ns
TEnd	18.24±1.59	19.87±2.04	19.30±1.95	15.34±1.24	16.41±1.09	15.26±0.96	*	ns	ns	ns
DurPI	5.87±1.16	5.86±0.68	4.95±0.59	6.27±0.46	5.82±0.76	4.98±0.48	ns	ns	ns	ns
AreaTse	27.35±3.73	33.97±4.43	26.32±4.02	24.54±2.77	26.59±3.81	32.71±8.71	ns	ns	ns	ns
<b>Cured flavour</b>										
IMax	4.44±0.29	4.71±0.28	4.56±0.22	4.32±0.23	4.25±0.37	4.34±0.18	ns	ns	ns	ns
TEnd	19.39±2.18	19.20±1.98	18.16±1.37	16.48±1.55	18.25±1.24	17.71±1.86	ns	ns	ns	ns
DurPI	6.37±0.80	5.76±0.79	5.56±0.34	5.94±0.56	5.99±0.67	6.45±0.58	ns	ns	ns	ns
AreaTse	51.46±5.11	52.26±5.44	53.64±5.67	43.30±3.92	47.4±5.30	51.36±7.27	ns	ns	ns	ns

---

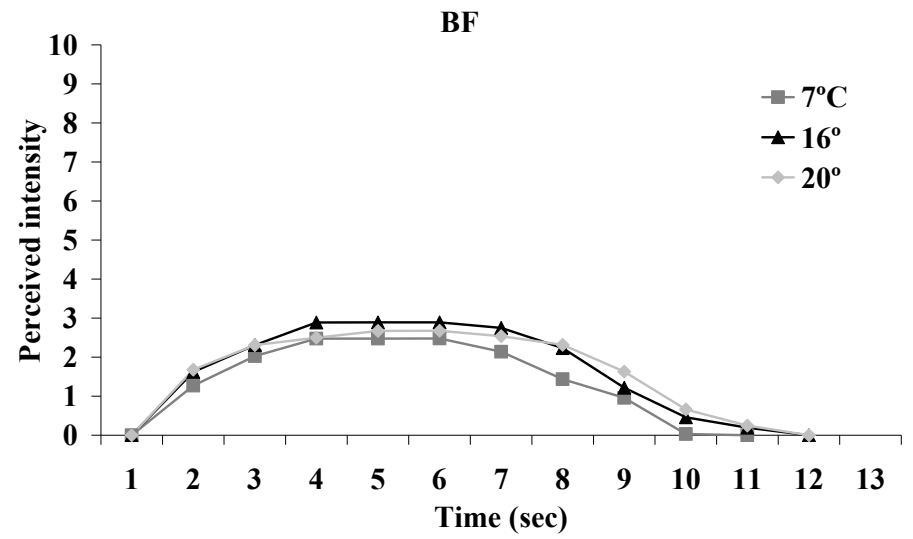
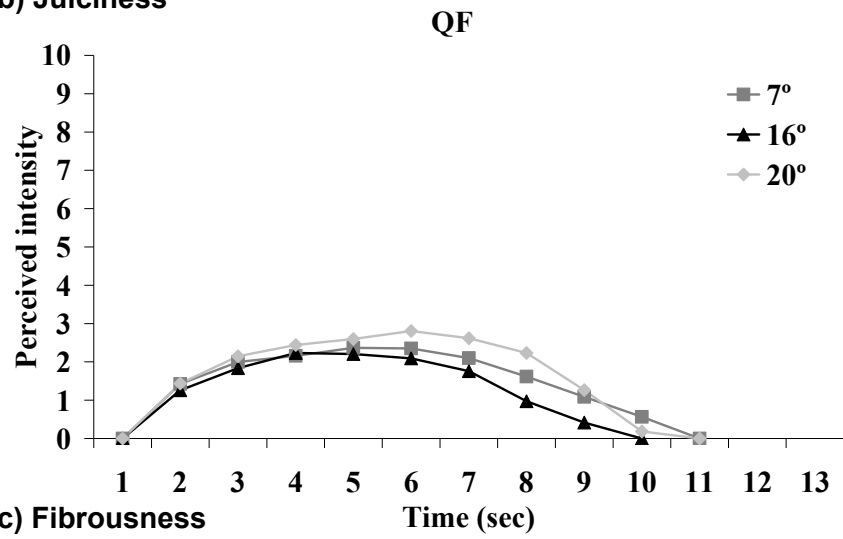
Different letters within the same row denote significant differences between means within the same batch (QF or BF).

**Figure 1.** Average of TI curves for the attributes hardness (a), juiciness (b), fibrousness (c), saltiness (d), overall flavour (e), rancid flavour (f) and cured flavour (g). (n= 40, 10 panellist x 4 replications). Curves are sorted by dry-cured ham sections (QF: *Quadriceps femoris*-10.5 % of IMF content and BF: *Biceps femoris*-14.6 % of IMF content).

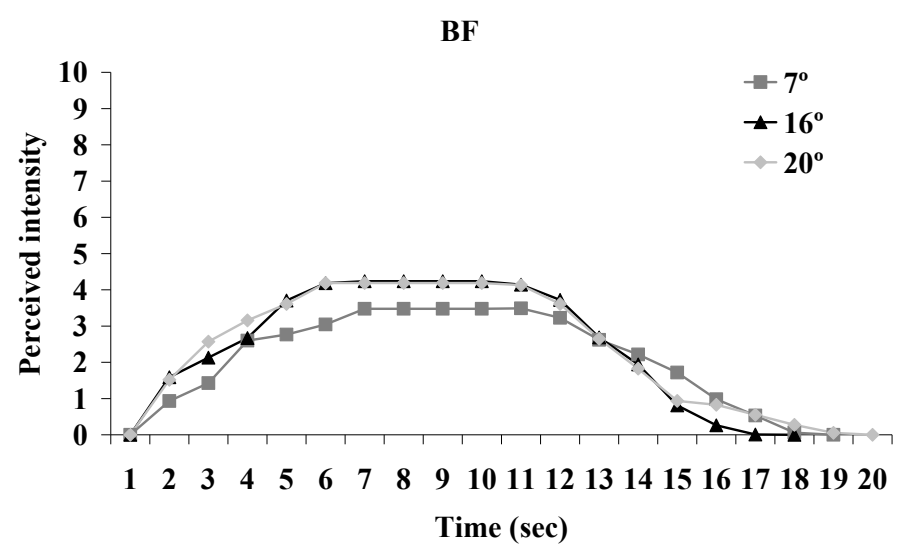
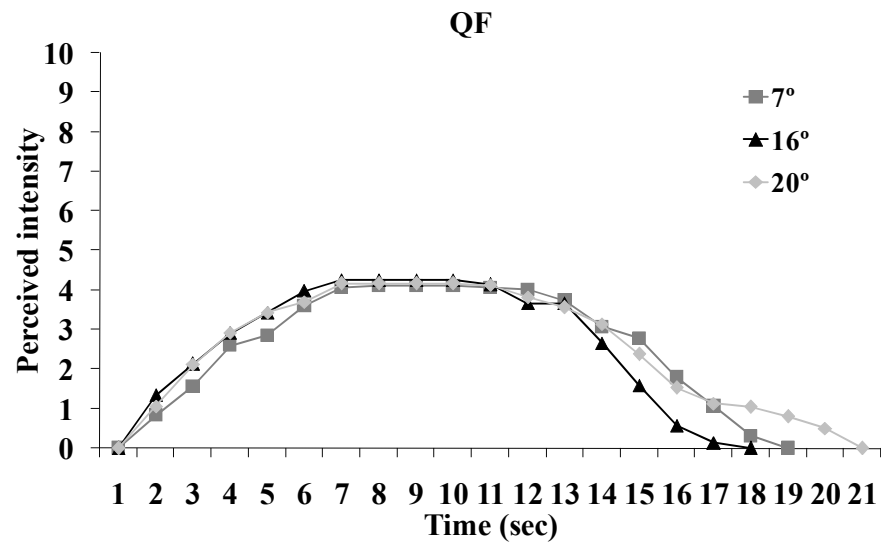
**a). Hardness**



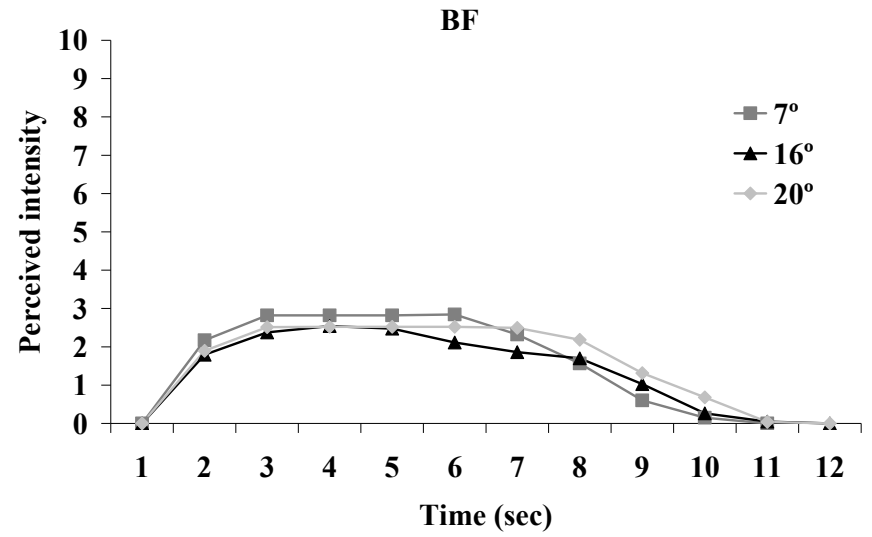
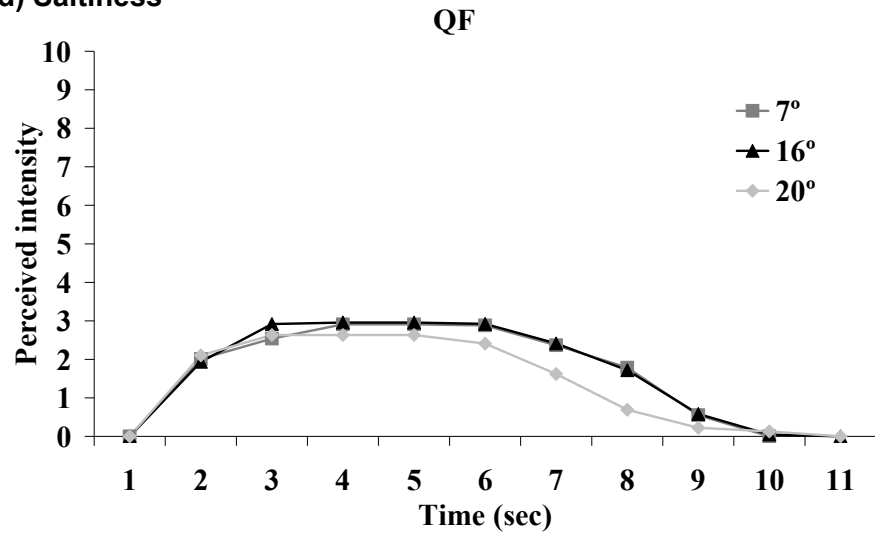
**b) Juiciness**



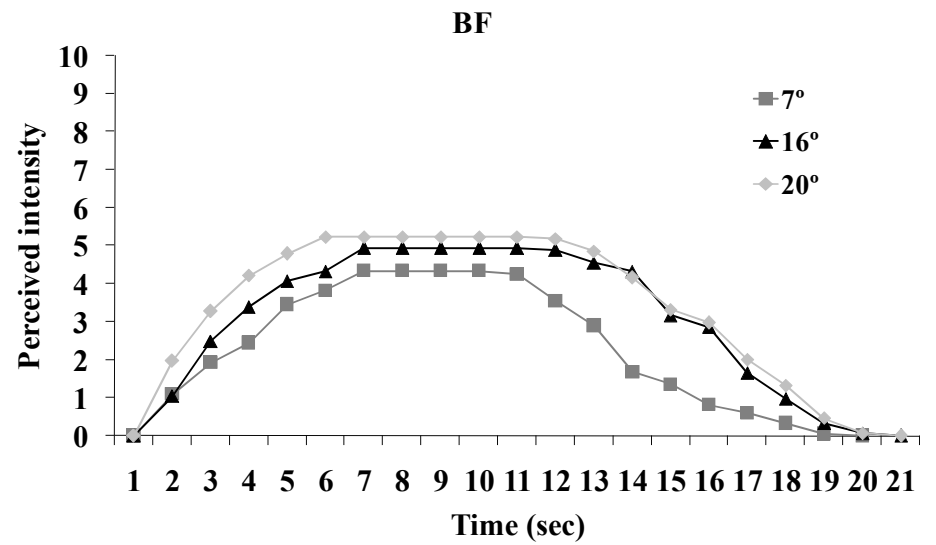
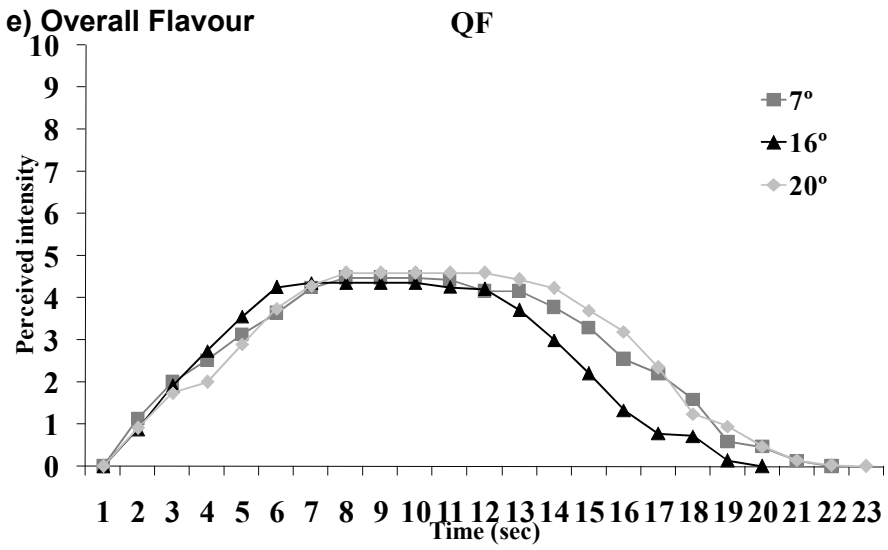
**c) Fibrousness**



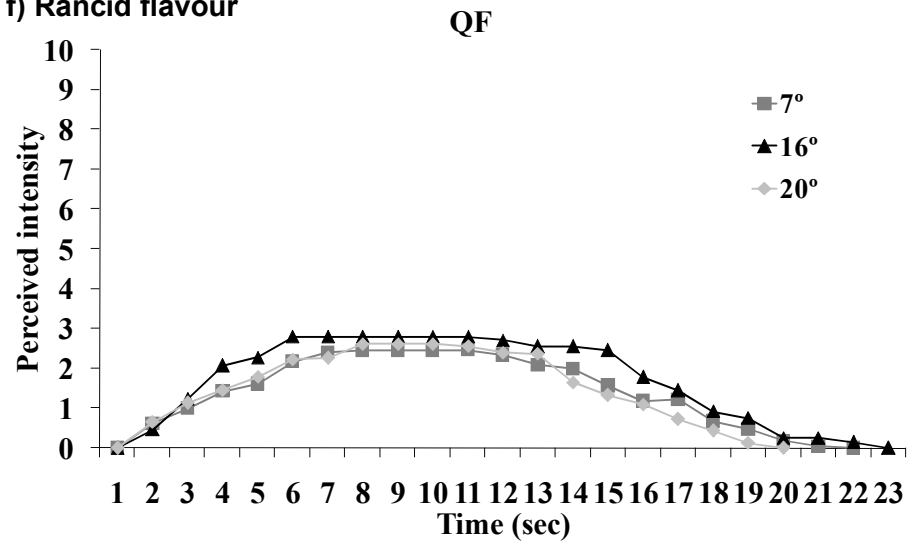
d) Saltiness



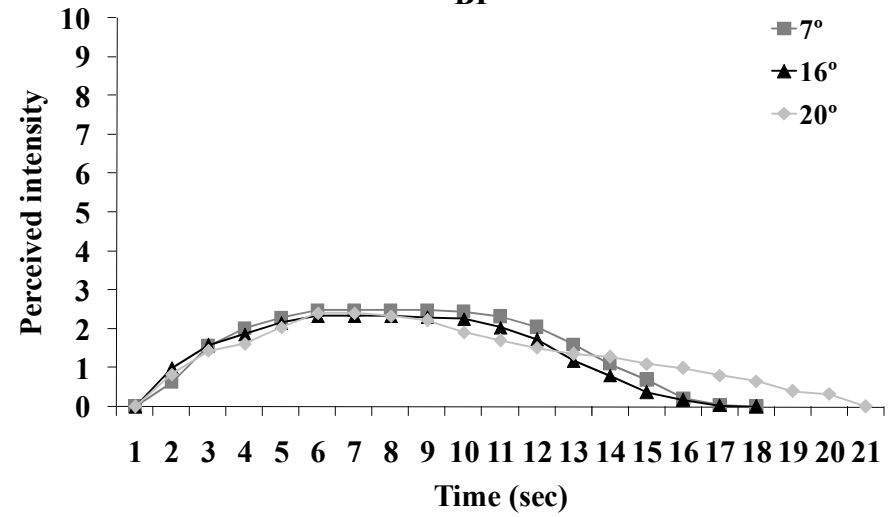
e) Overall Flavour



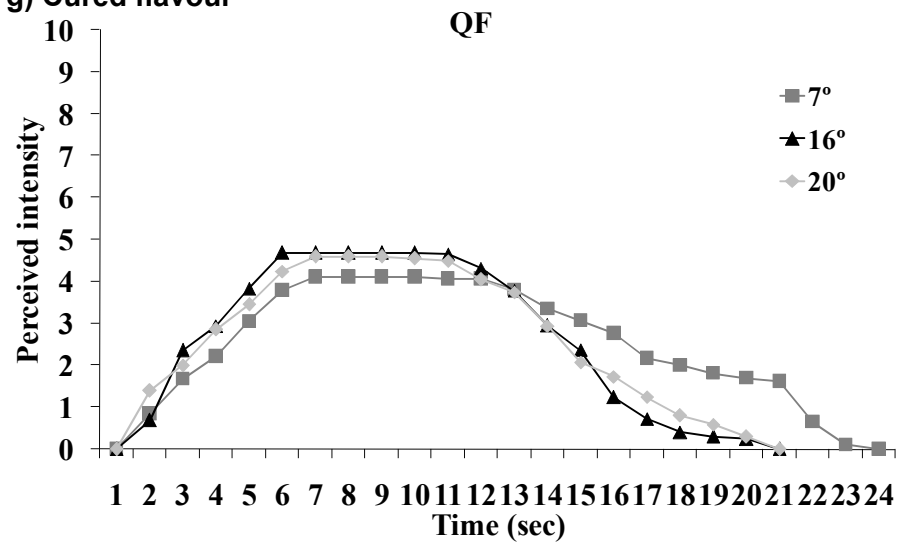
f) Rancid flavour



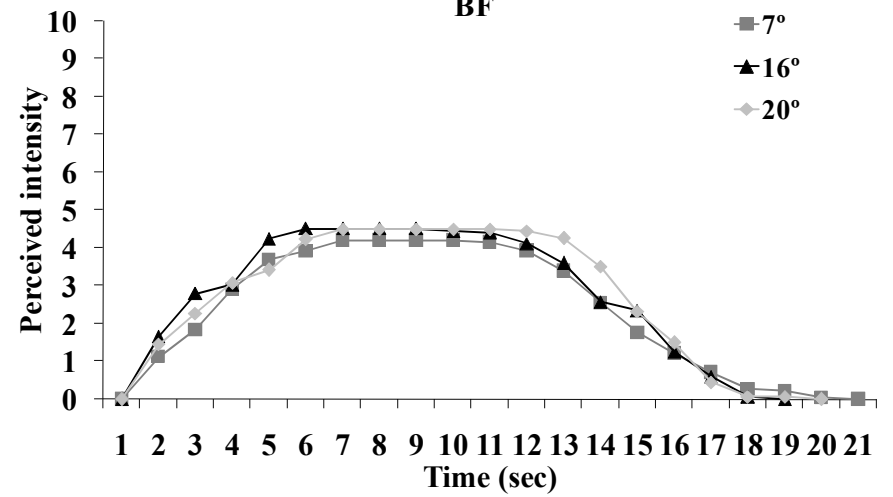
**BF**



g) Cured flavour



**BF**



## **DISCUSSION**

### **Effect of IMF content**

The high IMF content of dry-cured meat products from Iberian pigs is related to both the rearing system and the genetic features of the pig breed (Mayoral, et al., 1999). In addition, differences in the IMF content between muscles have been previously reported in Iberian dry-cured ham (Antequera, García, López, Ventanas, Asensio, & Córdoba, 1994). A positive effect of IMF content on the proportion of oleic acid and a positive influence of oleic acid on oiliness and brightness of dry-cured hams have been found by Ruiz et al., (2000), which could explain the highest brightness scores obtained in BF samples compared to QF ones. Moreover, regarding tactile texture of fat, Fuentes et al. (2012 submitted) also reported a significant decrease of sandy perception with fat content.

Colour is an important characteristic of meat and meat products (Risvik, 1994; Resurreccion, 2003) and particularly in dry-cured ham colour is one of the most important property related to appearance (Gandemer, 2002). Moreover, the influence of colour perception of sliced and vacuum packaged dry-cured ham in consumers' choice is well established (Gandemer, 2002). The concentration and chemical state of the nitrosylmyoglobin pigment and the light scattering properties of the meat are mainly responsible for the colour displayed by the lean of dry-cured products (Fuentes et al., 2010). Consistently, Ruiz et al. (2000) and Fuentes et al., (2012 submitted) reported a positive relationship between IMF content of dry-cured ham and appearance traits such as brightness and marbling, agreeing with the highest scores for these attributes found in the present study in BF samples.

The ripening process of Iberian dry-cured meat products involves complex chemical and biochemical changes in the main components of raw meat (proteins and lipids), leading to the generation of volatile compounds with distinct aromatic notes and/or low olfaction thresholds (Ruiz, Muriel, & Ventanas, 2002b). In whole meat products such as hams and loins, IMF could act as a reservoir of precursors which subsequently undergo transformations leading to volatile compound formation (Ventanas, Córdoba, Antequera, García, López-



Bote, & Asensio, 1992; Ruiz et al., 2002b). Ventanas, Estévez, Andrés, and Ruiz, (2008) concluded that in dry-cured meat products subjected to long ripening processes, particularly Iberian dry-cured loins, lipid oxidative phenomena can also affect triglycerides fraction. Therefore, in loins with high IMF content and thus with higher triglyceride content, the generation of volatile compounds derived from lipid oxidation phenomenon is higher than in low IMF ones. Accordingly, the highest generation of volatile in high IMF content samples (BF) could have contributed to increase the related odour attributes. In the present study, the more intense odour perception, particularly rancid odour, displayed by BF samples compared to QF ones could be related to the enhancement of lipid oxidation reactions due to the higher IMF content of these samples (BF).

Dynamic perception of hardness (intensity and persistence) was positively affected by the IMF content of dry-cured ham samples which are inconsistent with previous results reported by Ruiz et al., (2000) in Iberian dry-cured hams. These authors found positive relationship of IMF with juiciness but negatively with dryness, hardness and fibrousness. However, Buscailhon, Berdagué, Bousset, Cornet, Gandemer, and Touraille, (1994) found no relationship between textural traits and the lipid fraction in French dry-cured hams. These inconsistent results can be due to different sensory techniques employed and the different storage conditions. In the present study, dry-cured hams were sliced and vacuum packed and then stored, while in the previous studies dry-cured hams were sliced after storage and just before the sensory analysis. Moreover, these studies employed static sensory techniques for carrying out the sensory evaluation of samples while in the present study TI method was used, which allows monitoring the intensity over time, and thus, provides more real and valid information compared to static techniques (Dijksterhuis, & Piggott, 2001). In a similar study carried out by Fuentes et al. (2012 submitted), the results obtained for texture traits of sliced and vacuum packaged dry-cured hams using TI method were consistent with the present results. Furthermore, these differences in results obtained may be ascribed to differences between *Quadriceps femoris* and *Biceps femoris* muscles regarding other aspects different to IMF such as muscle structure.

Dynamic perception of saltiness was significantly affected by the IMF content (**Table 2**), showing the BF samples the more persistent of  $I_{max}$  (DurPI) compared to QF ones. A slower release of compounds related with saltiness, mainly NaCl, from BF dry-cured hams would explain the more persistent saltiness perception in these samples. Similarly, Ventanas, Puolanne, and Tuorila, (2010a) in cooked bologna type sausages and using TI method, reported that loss of saltiness perception was slower in high fat samples. Furthermore, De Loubens et al, (2011) modelling the salty release and dynamic perception (TI method) in dairy gels reported that fat addition increased the  $I_{max}$  and the maximum perceived intensity of saltiness occurred later, contrary to low-fat products. During food consumption, salt must be released from the product and diluted in the saliva to reach the taste receptors located on the tongue, and then, induce salty perception (De Loubens et al., 2011). Fat presents in the matrix product could have stimulated the saliva production and hence the salt dilution increased, contributing to extent the saltiness perception in BF dry-cured hams compared to QF ones.

Fat could influence the release of volatile compounds from the food matrix to the environment and the mouth, mainly by retaining non-polar compounds (Ventanas et al., 2008). Carrapiso, (2007) and Seuvre, Espinosa Díaz, and Voilley (2000), reported that increasing the fat content leads to a decrease in the release of hydrophobic volatile compounds. The lower retention effect by a lower IMF content would cause a higher release of non-polar compounds derived from lipid oxidation contributing to rancid flavour perception and explaining the longer persistence of this attribute found in QF compared to BF samples.

### **Effect of serving temperature**

Serving temperature is one of the most important conditions affecting consumer's responses to foods (Cardello, & Maller, 1982). If the serving temperature is not appropriate, consumers may reject the food (Zellner, Stewart, Rozin, & Brown, 1988). The colour intensity of external fat of samples increased with temperature, being more yellow at 16 °C and 20 °C compared to samples served at 7 °C. Furthermore, significant differences were found in

colour homogeneity of fat in QF samples, which could be partly explain by the higher colour intensity (yellowness) displayed by this samples compared to BF ones. Accordingly, QF samples evaluated at 7 °C displayed the lowest values for colour intensity and consequently, the highest scores for colour homogeneity.

Certain sensory traits of Iberian dry-cured ham, particularly oiliness and brightness, are highly dependent on the fat solid/liquid ratio at a given temperature (Ruiz et al., 2000). Niños, Mulet, Ventanas, and Benedito, (2010) reported that increase in the percentage of melted fat with temperature involves a decrease in the solid/liquid ratio and thus, increasing the fluidity and decreasing the hardness. These arguments would explain the increase of brightness and fluidity and the decrease of hardness with serving temperature found in the external fat of the studied dry-cured ham samples. Moreover, decreasing of temperature contribute to fat crystallization (McClements, and Decker, 2010) which is accompanied by changes in its internal structure, morphological properties and molecular packaging (Awad, 2004). Solid fats are duller since the presence of crystals lead to a higher light diffusion compared to liquid fats (McClements, and Decker, 2008). At 16 °C and 20 °C of serving temperature fat was more liquid which would explain that fat was perceived as more yellowness at higher temperatures compared to 7 °C.

Regarding odour attributes previous studies in model systems (Ventanas et al., 2010b) and custard dessert (Engelen et al., 2003) reported that increasing the serving temperature contributed to increase odour intensities agreeing with the results obtained in the present study. Increasing the temperature can affect partition coefficient of volatile compounds between matrix and air (Ventanas et al., 2010b) with the odorous compounds became more volatile, resulting in a high concentration of these compounds reaching the receptors in the nose (Engelen et al., 2003). At 20 °C, sample matrix was more fluid leading to a weaker retention of volatile compounds and thus providing a higher intensity of odour compared to the rest of serving temperature (7 °C and 16 °C). Ventanas et al., (2010b) reported similar effects of serving temperature in model systems.

Temperature effects on texture perception can be mediated by physico-chemical changes in the product. Any change in the physical properties of food would influence the texture sensation (Engelen et al., 2003). Therefore, it was expected that variations in serving temperature determined physical changes of product components, particularly in fat, and therefore modifications in perceived texture. It seems that the probable changes in fat caused by the different temperatures were not reflected in modifications in the dynamic perception of texture since slight modifications in temporal perception of texture attributes (hardness, juiciness and fibrousness) were found caused by the different serving temperatures. Although no main effect of serving temperature was obtained for most TI parameters of texture attributes, some IMF\*T interactions were obtained. In this sense, results showed that temperature has a higher effect on persistence (Tend) of hardness in BF dry-cured hams samples compared to QF ones. We expected that as increase the temperature, persistence of hardness decreases in a more extent in samples with higher fat content (BF) but results showed the opposite phenomenon. Differences due to muscle structure related to the type of fibre or the different extent of dehydration (moisture content) could have contributed more to the dynamic perception of hardness than fat content.

The effect of serving temperature on flavour perception depends on the food and the sensory attribute evaluated (Ryynänen et al., 2001). An increase in product temperature is known to change the viscosity, causes melting of fats and enhance flavour and odour release (Engelen et al., 2003). Persistence of saltiness was the longest in BF dry-cured samples served at 16 °C while for QF ones it was at 7 °C. Saltiness perception could be related to fat characteristics of dry-cured hams and with the modification of fat properties with serving temperature. In this sense, descriptive profile showed that brightness of lean surface increased with serving temperature which could be related with an increase in fat fluidity affecting the dynamic perception of saltiness, mainly in terms of persistence. Engelen et al. (2003) reported that melted fat might be more prone than solid fat to spread and to leave a fatty residue behind on the mucosa after swallowing. Moreover, these authors proposed that higher serving temperature weakened the food matrix and made the fat more available to form

a fatty coating in the mouth. The formation of this coating in the oral cavity would affect the saltiness perception as a result of a lower mixing of salt with saliva.

Previous studies in model systems (Ventanas et al., 2010b) and semi-solids products (Engelen et al., 2003) reported that increasing the temperature of samples consumption contribute to increase flavour intensity. In the present study, intensity perception over time (Area under the curve) of overall flavour increased with serving temperature. Regarding rancid and cured flavour the same effect was observed but without a significant effect. Moreover, for most flavour attributes the persistence (Tend) tended to be longer at higher temperatures. Higher temperatures promoted that volatile compound became more volatile, and in addition, sample matrix was more fluid leading to more readily release of compounds from the matrix as serving temperature increased. Effect of serving temperature on temporal overall flavour perception in BF samples was more evident compared to QF samples which could be caused by the highest IMF content in BF samples, and therefore a higher percentage of melted fat in these samples as temperature increased was expected.

If results obtained from odour and flavour perception are compared, differences between both evaluations are found. The temperature influenced the volatility of compounds and thus a high concentration of these compounds reaching the receptors in the nose, however, this effect on dynamic flavour perception was not so marked. During swallowing, other factors such as mixing with saliva and the breakdown of the food matrix through chewing interceded in flavour perception (Ventanas et al., 2010a), whereas an optimum sniffing and odour perception may depend on the type of odour and its concentration (Cain, 1976). Consequently, the role played by texture on release of aroma compound could have been the main responsible for the differences found between odour and flavour perception. In fact some studies have reported the effect of texture on flavour release during product eating (Brauss, Balders, Linforth, Avison, & Taylor, 1999; Voilley, Druaux, Goldschmidt, Isaanchou, & Molin, 2002 and De Roos, 2003).

Moreover, the oral temperature should be considered since it could affect the flavour perception. When the panellist placed the samples in their mouths the serving temperature would be balanced with the oral temperature after some seconds of chewing. Once the samples reached the oral temperature, differences between samples served at different temperatures disappeared. Therefore, TI technique would be useful to evaluate the effect of serving temperature mainly during the first seconds of sample consumption before the balance between oral and sample temperatures was reached. Nevertheless, this information only can be obtained using dynamic sensory techniques as TI but no with static techniques as QDA.

## **CONCLUSIONS**

The sensory evaluation revealed a marked effect of both IMF content and serving temperature on the perception of appearance and odour of sliced and vacuum packaged dry-cured ham. TI resulted in the most useful tool for evaluating the effect of serving temperature on temporal perception of flavour and texture, particularly during the first period of sample consumption. Taking into consideration the pronounced effect of serving temperature on the sensory characteristics of sliced and vacuum packaged dry-cured ham, sensory scientist as well as consumers should carefully consider this factor prior consumption and/or sensory evaluation of these products.

## **ACKNOWLEDGES**

Verónica Fuentes is thankful to the “Ministerio de Educación, Cultura y Deporte” for the FPI grant. This study was supported by the “Ministerio de Economía y Competitividad” project entitled: “Estudio sensorial e instrumental de la liberación de compuestos olor-activos en jamón ibérico loncheado: efecto del contenido y características de la grasa (Project AGL2007-65923-C02-01).

## REFERENCES

- Antequera, T., García, C., López-Bote, C. J., Ventanas, J., Asensio, M. A., & Córdoba, J. J. (1994). Evolución de distintos parámetros físico-químicos durante la elaboración de jamones Ibéricos a partir de cerdos Ibéricos (100%) e Ibéricos x Duroc (50%). *Revista Española de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 34, 178–190.
- AOAC Official Methods of Analysis (17th ed.) Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburgh, Maryland (2000).
- Awad, T.S. (2004). Ultrasonic studies of the crystallization behavior of two palm fats O/W emulsions and its modification. *Food Research International*, 37, 579-586.
- Bartoshuk, L. M., Rennert, K., Rodin, J., & Stevens, J. C. (1982). Effects of temperature on the perceived sweetness of sucrose. *Physiology and Behavior*, 28, 905–910.
- Behrends, J. M., Goodson, K. J., Koohmaraie, M., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., Morgan, W. W., et al. (2005). Beef customer satisfaction: USDA quality grade and marination effects on consumer evaluations of top round steaks. *Journal of Animal Science*, 83, 662–670.
- Brauss, M. S., Balders, B., Linforth, R. S. T., Avison, S., & Taylor, A. J. (1999). Fat content, baking time, hydration and temperature affect flavour release from biscuits in model-mouth and real systems. *Flavour and Fragrance Journal*, 14, 351–357.
- Buscailhon, S., Berdagüe, J. L., Bousset, J., Cornet, M., Gandemer, G., & Touraille, C. (1994). Relations between compositional traits and sensory qualities of French dry-cured ham. *Meat Science*, 37, 229-243.
- Cain, (1976). Olfaction and the common chemical sense: Some psychophysical contrasts. *Sensory processes*, 1, 57-67.
- Calkins, C. R., & Hodgen, J. M. (2007). A fresh look at meat flavour. *Meat Science*, 77,63–80.
- Calvino, A. M. (1986). Perception of sweetness: the effects of concentration and temperature. *Physiology and Behavior*, 36, 1021–1028.
- Cardello, A. V., & Maller, O. (1982). Acceptability of water, selected beverages and foods as a function of serving temperature. *Journal of Food Science*, 47, 1549–1552.
- Carrapiso, A. (2007). Effect of fat content on flavour release from sausages. *Food Chemistry*, 103, 396-403.
- De Loubens, C., Saint-Eve, A., Délérís, I., Panouillé, M., Doyennette, M., Tréléa, I.C., et al. (2011). Mechanistic Model To Understand in Vivo Salt Release and Perception during

- the Consumption of Dairy Gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2534-2542.
- De Roos, K. B. (2003). Effect of texture and microstructure on flavour retention and release. *International Dairy Journal*, 13, 593-605.
- Dijksterhuis, G. B., & Piggott, J. R. (2001). Dynamic methods of sensory analysis. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 284-290.
- Engelen, L., Wijk, R. A., Prinz, J. F., Janseen, A.M., Weenen, H., & Bosman, F. (2003). The effect of oral and product temperature on the perception of flavor and texture attributes of semi-solids. *Appetite*, 41, 273-281.
- Estévez, M., Morcuende, D., Ventanas, J., & Ventanas, S. (2008). Mediterranean products. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of fermented meat and poultry* (pp. 393-405). Iowa: Blackwell Publishing.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.
- Fuentes, V., Estévez, M., Grébol, N., Ventanas, J., & Ventanas, S. (submitted to *Meat Science*). Application of time-intensity method to assess the sensory properties of Iberian dry-cured ham: effect of fat content and high pressure treatment.
- Fuentes, V., Ventanas, J., Morcuende, D., Estévez, M., & Ventanas, S. (2010). Lipid and protein oxidation and sensory properties of vacuum-packaged dry-cured ham subjected to high hydrostatic pressure. *Meat Science*, 85, 506-514.
- Gandemer, G. (2002). Lipids in muscles and adipose tissues, changes during processing and sensory properties of meat products. *Meat Science*, 62, 309-321.
- Green, B. G., & Frankmann, S. P. (1987). The effect of cooling the tongue on the perceived intensity of taste. *Chemical Senses*, 12, 609-619.
- ISO 937:1978. Meat and meat products. Determination of nitrogen content (Reference method). International Organization for Standardization, Geneva.
- Niñoles, L., Mulet, A., Ventanas, S., & Benedito, J. (2010). Ultrasonic assessment of the melting behaviour in fat from Iberian dry-cured hams. *Meat Science*, 85, 26-32.
- Mayoral, A.I., Dorado, M., Guillén, M.T., Robina, A., Vivo, J.M., Vázquez, C., & Ruiz, J. (1999). Development of meat and carcass quality characteristics in Iberian pigs reared outdoors. *Meat Science*, 52, 315-324.



- Mc Clements, J., & Decker, E. A. (2010). Química de los alimentos. In S. Damodaran, K. Parkin & O.R. Fennema (Eds.) (3th ed). *Lípidos* (pp155-214). Zaragoza: Acribia S.A.
- Reinbach, H.C., Tøft, M., & Møller, P. (2009). Relationship between oral burn and temperature in chilli spiced pork patties evaluated by time-intensity. *Food Quality and Preference*, 20, 42-49.
- Resurreccion, A. V. A. (2003). Sensory aspects of consumer choices for meat and meat products. *Meat Science*, 66, 11–20.
- Risvik, E. (1994). Sensory properties and preferences. *Meat Science*, 36, 67–77.
- Ruiz, J., García, C., Muriel, E., Andrés, A. I., & Ventanas, J. (2002a). Influence of sensory characteristics on the acceptability of dry-cured ham. *Meat Science*, 61, 347–354.
- Ruiz, J., Muriel, E., & Ventanas, J. (2002b). The flavour of Iberian ham. In F. Toldrá (Ed.), *Research advances in the quality of meat and meat products* (pp. 289–309). Trivandrum, India: Research Signpost.
- Ruiz, J., Ventanas, J., Cava, R., Andrés, A. I., & García, C. (2000). Textural traits in dry-cured ham as affected by fat content and composition. *Food Research International*, 33, 91–95.
- Ruiz, J., Ventanas, J., Cava, R., Andrés, A. I., & García, C. (1999). Volatile compounds of dry-cured Iberian ham as affected by the length of the curing process. *Meat Science*, 52, 19–27.
- Ryynänen, S., Tuorila, H., & Hyvönen, L. (2001). Perceived temperature effects on microwave heated meals and meal components. *Food Service Technology*, 1, 141–148.
- Seuvre, A. M., Espinosa-Díaz, M. A., & Voilley, A. (2000). Influence of the food matrix structure on the retention of aroma compounds. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4296-4300.
- Tuorila, H., & Monteleone, E. (2009). Sensory food science in the changing society: Opportunities, needs, and challenges. *Trends in Food Science and Technology*, 20, 54–62.
- Ventanas, J., Córdoba, J. J., Antequera, T., García, C., López-Bote, C., & Asensio, M. A. (1992). Hydrolysis and Maillard reactions during ripening of Iberian cured ham. *Journal of Food Science*, 57, 813–815.
- Ventanas, S., Estévez, M., Andrés, A.I., & Ruiz, J. (2008). Analysis of volatile compounds of Iberian dry-cured loins with different intramuscular fat contents using SPME–DED. *Meat Science*, 79, 172-180.

- Ventanas, S., Mustonen, S., Puolanne, E., & Tuorila, H. (2010b). Odour and flavour perception in flavoured model systems: influence of sodium chloride, umami compounds and serving temperature. *Food Quality and Preference*, 21, 453-462.
- Ventanas, S., Puolanne, E., Tuorila, H. (2010a). Temporal changes of flavour and texture in cooked bologna type sausages as affected by fat and salt content. *Meat Science*, 85, 410-419.
- Ventanas, S., Ventanas, J., Tovar, J., García, C., & Estévez, M. (2007). Extensive feeding versus oleic acid and tocopherol enriched mixed diets for the production of Iberian dry-cured hams: Effect on chemical composition, oxidative status and sensory traits. *Meat Science*, 77, 246–325.
- Voilley, A., Druaux, C., Goldschmidt, B., Issanchou, S., & Molin, P. (2002). Flavour release from model cheese. *ACS National Meeting*, August 18.
- Zellner, D. A., Stewart, W. F., Rozin, P., & Brown, J. M. (1988). Effect of temperature and expectations on liking for beverages. *Physiology & Behavior*, 44, 61–68.

DISCUSIÓN CONJUNTA



## 7. DISCUSIÓN CONJUNTA

En esta sección de la Tesis Doctoral, se discuten los resultados más relevantes en relación con los diversos experimentos realizados. Aunque estos resultados ya han sido parcialmente discutidos en la sección de capítulos, el objetivo de este apartado es aportar una visión más global e integradora de los mismos.

La discusión se ha dividido en tres apartados: El primer apartado engloba todos los aspectos relacionados con el efecto del contenido en grasa. El segundo discute los resultados obtenidos en referencia al efecto de las características de la grasa. Finalmente, el tercer apartado recopila los aspectos más interesantes obtenidos del estudio de los diferentes tratamientos post-procesados sobre la calidad del jamón Ibérico loncheado y envasado a vacío.

### 7.1 Influencia del contenido en grasa.

El primero de los objetivos de la presente Tesis Doctoral planteaba el estudio de la influencia del contenido en grasa intramuscular (GIM) sobre aquellas características determinantes de la calidad del jamón Ibérico loncheado. Para la consecución de este objetivo, en primer lugar se llevó a cabo una modelización en emulsiones cárnicas de curación rápida con diferente contenido en grasa (sistemas modelos tipo salchicha, *capítulos* I, III y IV), y en segundo lugar, se estudió la influencia del contenido en GIM en jamones Ibéricos loncheados envasados a vacío, empleando para ello diferentes partes o secciones del jamón con diferente porcentaje de GIM (*Capítulos* VI, VII y VIII). En ambos productos se evaluó su impacto sobre la estabilidad oxidativa de lípidos y proteínas, sobre la dinámica de liberación de compuestos volátiles, así como, su influencia sobre las características sensoriales. Partiendo de una visión global de los resultados obtenidos en los diferentes capítulos se puede hacer la siguiente consideración: la influencia del contenido en grasa sobre la estabilidad oxidativa y la calidad sensorial no depende solamente de dicho contenido, sino del resto de cambios o consecuencias que implican una variación en el contenido en grasa, como son variaciones en relación al contenido lípido/proteína, o concretamente en los

sistemas modelo variaciones en el perfil de ácidos grasos, además de la influencia de factores extrínsecos, como son las características termodinámicas de los compuestos volátiles, y en el caso concreto del jamón curado, las variaciones en la composición físico-química que lleva consigo la distinta localización anatómica del músculo.

#### *7.1.1 Influencia del contenido en grasa sobre la estabilidad oxidativa.*

En relación a los resultados obtenidos (*Capítulos IV y VI*), la susceptibilidad a la oxidación lipídica aumentaba con el contenido en grasa presente en los productos evaluados, ya fuera en los sistemas modelo (grasa añadida) o en las muestras de jamón curado (GIM). En el caso de las muestras de jamón Ibérico, aquellos loncheados con mayor contenido en grasa (Hip; “cadera”) mostraron mayores niveles de TBARS y de aldehídos volátiles derivados de la oxidación lipídica, pero niveles más bajos de los aldehídos de Strecker, 2 y 3-metilbutanal. Además de la generación de compuestos volátiles el contenido en grasa interviene en la dinámica de liberación/retención. No obstante, en el caso concreto del 2 y 3-metilbutanal, ambos aldehídos presentan una hidrofobicidad intermedia ( $\log P= 1.23$ ), por lo tanto, el efecto del contenido en GIM sobre la liberación al espacio de cabeza sería limitado. Los resultados derivados de un estudio previo llevado a cabo por Ventanas y cols., (2008) observaron la influencia del contenido en GIM y del tiempo de maduración sobre la generación y liberación de los compuestos volátiles, mostrando ambas clases de compuestos tendencias similares en el lomo Ibérico. No obstante, el tiempo de maduración contribuye a las reacciones de Maillard y degradaciones de Strecker (Ventanas y cols., 1992; Ventanas y cols., 2008). Por lo tanto, el prolongado período de maduración al que es sometido el jamón Ibérico en comparación con otro producto curado como el lomo Ibérico, podría haber contribuido a los resultados observados en este estudio. También, de acuerdo con la composición físico-química los loncheados con un menor contenido en GIM (Flank; “babilla”), mostraban a su vez, un contenido en proteínas más elevado, y por consiguiente, concentraciones más elevadas de 2 y 3-metilbutanal, que en el párrafo siguiente comentaremos en relación con los resultados derivados de la oxidación de proteínas. De forma similar, los

resultados mostraron mayores niveles de TBARS y del aldehído hexanal en los sistemas modelo con un mayor nivel de grasa añadida (~ 15%). Estos resultados coinciden con las observaciones realizadas por otros autores como Estévez y cols., (2005a) en patés.

En relación a la oxidación de proteínas, el contenido en GIM de los loncheados mostró un efecto marcado sobre los niveles de los carbonilos GGS y AAS analizados mediante HPLC-FPD (*Capítulo VI*). A diferencia de la oxidación de lípidos, los niveles de ambos carbonilos fueron más elevados en los loncheados con un contenido en GIM menor (procedentes de la “babilla”; Flank). Por lo tanto, y de acuerdo con los resultados obtenidos, ambos procesos oxidativos no mostraron una conexión directa. En el presente trabajo, se evidenció la influencia que tiene la composición de los loncheados sobre ambos procesos oxidativos. Cualquier cambio en el contenido en GIM lleva consigo una variación en el contenido en proteínas, y en consecuencia, la magnitud de ambos procesos se vio comprometida en función de la proporción lípido/proteína, que fue en el caso de los loncheados procedentes de la “babilla” 0.2, y en los loncheados procedentes de la “cadera” 0.4. Un mayor contenido de proteínas supone una mayor fuente de productos de oxidación de proteínas, y por el contrario, un mayor contenido de lípidos supone una mayor fuente de productos de oxidación de lípidos.

Además, esta mayor generación de carbonilos derivados de la oxidación de proteínas podría haber contribuido a las concentraciones de los aldehídos de Strecker, anteriormente comentadas. Autores como Estévez y cols., (2011) observaron la implicación de ambos carbonilos (AAS y GGS) en la formación de 2 y 3-metilbutanal. Asimismo, el hecho de que tenga lugar simultáneamente la proteólisis y reacciones de oxidación de las proteínas, y la formación de aldehídos de Strecker durante el proceso de maduración de los productos cárnicos, sugiere que los semialdehídos proteicos pueden reaccionar con aminoácidos libres, y por lo tanto, estar implicados igualmente en la generación de estos aldehídos de Strecker (Martín y cols., 1998; Toldrá, 2004).

En los sistemas modelo (*Capítulo IV*), los resultados no mostraron una clara correlación con la oxidación de lípidos. Los valores evidenciaron que las muestras con un contenido intermedio de grasa (~ 10%) fueron las muestras que mostraron las concentraciones más elevadas de ambos carbonilos. Estos

resultados pondrían de manifiesto la posible participación de ambos carbonilos (AAS y GGS) en otras reacciones (Estévez y Heinonen, 2010; Estévez y cols., 2011). En este sentido, la evolución observada en el desarrollo de ambos procesos oxidativos en los sistemas modelo con un mayor contenido en grasa (~ 15%), indicaría un desarrollo más rápido de la oxidación de lípidos en estas muestras como consecuencia del mayor contenido graso, lo cual, podría favorecer que la oxidación de proteínas en estas muestras ocurriese más rápidamente en comparación con el resto de lotes estudiados, y en consecuencia, la intervención de ambos carbonilos derivados de la oxidación de proteínas en otras reacciones durante el proceso de maduración de los sistemas modelo con un ~ 15% de grasa. Finalmente, estos resultados pueden ser debidos al diferente contenido en proteínas encontrado en los lotes planteados en función del porcentaje de grasa final (~ 4%, ~ 10% y ~ 15%) según se describe en el *capítulo IV*. Si consideramos los resultados encontrados en los loncheados, se esperaba que los sistemas modelo con un ~ 4% de grasa como resultado de su mayor contenido en proteínas, mostrase una mayor susceptibilidad a la oxidación de las mismas. Sin embargo, diferentes estudios llevados a cabo en emulsiones han identificado que péptidos y aminoácidos pueden actuar como inhibidores de la oxidación de proteínas, y en consecuencia, las proteínas podrían protegerse a ellas mismas de la oxidación (Levine y cols., 1999; Estévez y cols., 2008a). En cambio, en una matriz más compleja como son los loncheados de jamón curado con diferente contenido en GIM sometido a largos períodos de curación, de almacenamiento, o incluso a diferentes tratamientos de post-procesado, dicho efecto protector no se evidenció en los resultados obtenidos. En este caso concreto, se observó cómo en función de la proporción lípido/proteína predominaba uno u otro fenómeno oxidativo. Sin embargo, en los sistemas modelo, matriz cárnica sencilla y sometida solamente a un breve proceso de maduración, se observó como la oxidación de lípidos depende del contenido en grasa, mientras que, la oxidación de proteínas es el resultado combinado del contenido en proteínas y el efecto protector de las mismas frente a dicha oxidación.



### 7.1.2 Influencia del contenido en grasa sobre la dinámica de liberación/retención de compuestos volátiles.

Teniendo en cuenta que la liberación de los compuestos volátiles no responde a un patrón uniforme como consecuencia de su interacción con los macro-ingredientes de un alimento, entre los que destacan los lípidos (Chevance y Farmer, 1999) y que variaciones en el contenido lipídico influyen sobre la liberación de los mismos, que a su vez, está determinada por las características termodinámicas de cada compuesto (Carrapiso y cols., 2007). Otro de los objetivos planteados fue evaluar el efecto del contenido en grasa sobre la liberación de compuestos volátiles responsables del aroma de los productos cárnicos (*Capítulo III*). Los resultados evidenciaron que el papel desarrollado por el contenido en grasa en la dinámica de liberación/retención de los compuestos volátiles no es el factor predominante. Esta dinámica está más determinada por diversos factores entre los que se encuentran; el perfil en ácidos grasos que origina diferencias en la fluidez de la matriz, el proceso de maduración que determina pérdidas de compuestos volátiles y el desarrollo de reacciones y cambios en la estructura de la matriz de los sistemas modelo. El estudio realizado sobre los sistemas modelo para evaluar el efecto del contenido en grasa sobre la dinámica de liberación/retención de compuestos volátiles, puso de manifiesto un efecto no significativo del contenido en grasa ( $p > 0.05$ ) sobre la mayoría de los compuestos volátiles seleccionados. Estos resultados no coinciden con los descritos por otros autores en emulsiones cárnicas tipo salchichas no sometidas a un proceso de maduración (Chevance y cols., 2000; Carrapiso, 2007). En el presente estudio, otros factores diferentes al contenido en grasa parecen haber influido en mayor medida en la dinámica de liberación/retención de los compuestos volátiles añadidos que las propias variaciones en el contenido en grasa. Durante el proceso de maduración de los sistemas modelo (15 días), se puede producir una pérdida de volátiles, pérdida que podría haber sido más elevada en las muestras con un ~ 4% de grasa, ya que, una reducción del contenido en grasa puede contribuir a una mayor pérdida de compuestos volátiles durante el procesado y almacenamiento de las mismas, por un aumento en la volatilidad de estos compuestos (De Roos,

1997). Además de ocasionar un aumento en la volatilidad de los compuestos volátiles durante el proceso de maduración, un descenso del contenido en grasa incorporado implicaría diferencias en la solubilidad de los compuestos, como consecuencia de un perfil en ácidos grasos diferente entre los sistemas modelo con un ~ 4% de grasa, y los que presentaban un ~ 15% de grasa añadida. En este sentido, los resultados derivados del perfil de ácidos grasos (*Capítulo III*) mostraron que los sistemas modelo con un ~ 4% de grasa presentaban un mayor porcentaje en ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), y consecuentemente, una mayor proporción de grasa líquido/sólido que podría favorecer la solubilización de los compuestos volátiles en la grasa, y por lo tanto, es de esperar una menor liberación de los mismos al espacio de cabeza (Relkin y cols., 2004).

### *7.1.3 Influencia del contenido en grasa sobre la calidad sensorial.*

Finalmente, debemos considerar la influencia del contenido en GIM de los loncheados y del contenido en grasa final de los sistemas modelo sobre las características sensoriales de ambos. Para evaluar la influencia del contenido en GIM sobre la calidad sensorial de los loncheados se elaboraron dos estudios que componen los *capítulos VII y VIII*, constituidos por loncheados obtenidos a partir de tres secciones diferentes del jamón (“cadera”; musculatura glútea, “maza”; *Bíceps femoral* y “babilla”; *Cuádriceps femoral*). Destacar que en ambos estudios la sección correspondiente a la “babilla” constituyó los loncheados con un bajo contenido en GIM, mientras que, los loncheados con un alto contenido en GIM lo constituyeron los loncheados procedentes de dos secciones diferentes, la “cadera” y la “maza”. Además, los loncheados que componen ambos capítulos fueron sometidos a diferentes períodos de almacenamiento (1mes y 4 meses), antes de llevar a cabo la evaluación sensorial. Como se indicó en la sección de Material y Métodos, se empleó la técnica sensorial de análisis cuantitativo descriptivo (ACD) para la evaluación de los atributos relacionados con la apariencia, la textura táctil y el olor de las muestras, y la técnica tiempo-intensidad (TI) para la percepción dinámica de los atributos relacionados con la textura en boca y el flavor.

En líneas generales, los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral confirmaron un efecto marcado del contenido en GIM sobre los atributos relacionados con la apariencia de los loncheados de jamón Ibérico, constatando de una manera evidente su influencia sobre la intensidad de color, mostrando de manera global una menor intensidad de color las muestras con un mayor contenido en GIM (Hip en el *capítulo* VII y BF en el *capítulo* VIII). Asimismo, se obtuvieron mayores puntuaciones para el brillo y el veteado en estos loncheados con un mayor contenido en GIM. De hecho, se encontraron correlaciones negativas entre la intensidad de color rojo y los atributos brillo y veteado ( $r = -0.494$  y  $r = -0.619$ ;  $p < 0.001$ , respectivamente). En estudios anteriores realizados en jamón Ibérico (Ruiz y cols., 2000; Cava y cols., 2000; Ventanas y cols., 2007) se confirmó la influencia marcada del contenido en GIM sobre el brillo y la intensidad de veteado.

En armonía con los resultados derivados de la evaluación de la apariencia de los loncheados, el porcentaje de grasa incorporado a los sistemas modelo mostró un efecto significativo sobre la apariencia de los mismos ( $p < 0.05$ ), mostrando los sistemas modelos con el menor contenido en grasa (~ 4%), una mayor intensidad y homogeneidad de color, y un mayor grado de cohesión.

Con respecto a su influencia sobre la percepción del olor, se encontraron discrepancias entre las diferentes muestras y estudios planteados. Se observó una relación positiva entre el contenido en GIM y la percepción de los diferentes atributos de olor, en concreto, con la intensidad general, el olor a rancio y a curado, en los loncheados de jamón Ibérico evaluados tras 1 mes de almacenamiento a refrigeración. Sin embargo, en las muestras evaluadas tras 4 meses refrigeradas, el contenido en GIM no mostró ningún efecto sobre la percepción del olor ( $p > 0.05$ ). Las diferencias encontradas entre en ambos estudios podrían ser originadas por el diferente período de almacenamiento al que fueron sometidos los loncheados. Este efecto no significativo del contenido en GIM sobre la percepción del olor tras 4 meses de almacenamiento, podría estar relacionado con la evolución observada a lo largo de ese período de almacenamiento en los compuestos derivados de la degradación de Strecker (3-metilbutanal y 2-metilbutanal), y algunos aldehídos derivados de la oxidación de lípidos (hexanal y pentanal), y que más adelante mencionaremos más

detalladamente. Por lo tanto, a pesar del efecto significativo ( $p < 0.05$ ) del contenido en GIM para la mayoría de los aldehídos derivados de la oxidación de lípidos, la evolución de algunos de ellos a lo largo de este período de almacenamiento, podría ocasionar los resultados derivados de la percepción del olor.

En los sistemas modelo (*Capítulo II*), se obtuvieron mayores intensidades para los atributos de intensidad general, a tierra húmeda, a curado y a grasa, en aquellos sistemas modelo con el menor contenido en grasa (~ 4%). Sin embargo, en el olor a champiñón el lote con un contenido intermedio de grasa (~ 10%) presentó una mayor intensidad de percepción de este atributo, a pesar de la mayor liberación que experimenta el 1-octen-3-ol al espacio de cabeza (SPME) en los sistemas modelo elaborados con un ~ 4%. En estos sistemas modelo la percepción del olor depende de la generación y liberación de los compuestos volátiles desde la matriz cárnica al ambiente. Considerando que la generación de compuestos volátiles durante el período de maduración es insignificante, deberíamos tener en cuenta para explicar estos resultados el papel ejercido por la grasa sobre la retención de los mismos. No obstante, dicha liberación, y en consecuencia, su percepción está marcada por las características termodinámicas de cada compuesto (Carrapiso, 2007). En definitiva, la liberación de los compuestos volátiles responsables del olor en estas muestras, con un ~ 4% de grasa final, sería mayor que en las muestras con un mayor contenido en grasa (~ 15%), como resultado de ese efecto supresor que tiene la grasa en la liberación de los compuestos volátiles.

En relación a los resultados derivados de la evaluación sensorial de los atributos de textura mediante TI, revelaron que los loncheados con un mayor contenido en GIM presentaban una mayor intensidad de percepción de la dureza ( $I_{max}$  y  $Area$ ;  $p < 0.05$ ). Estos resultados no coincidirían con los descritos previamente por Ruiz y cols. (2000) para la dureza evaluada también en jamón curado, pero empleando técnicas estáticas de evaluación sensorial. Numerosos estudios han demostrado un papel esencial del contenido en GIM sobre la textura, tanto de la carne fresca como de productos cárnicos (Dransfield, 1994; Ruiz y cols., 2000). No obstante, al comparar los resultados obtenidos en la evaluación de los loncheados en la presente Tesis Doctoral, en relación a anteriores estudios llevados a cabo en jamón curado con diferente contenido

en GIM, se pone de manifiesto la clara influencia de otros parámetros, tales como, la composición del músculo evaluado, el loncheado del producto y el método sensorial empleado. Además, debemos considerar que las muestras evaluadas pertenecen a diferentes zonas anatómicas del jamón con las consecuentes diferencias en relación no sólo al contenido en GIM, sino también a otros factores que pudieran haber influido de forma más importante, como el tipo de músculo que determinará el tipo de fibra y la mayor o menor cantidad de colágeno, y/o el grado de deshidratación (Ruiz y cols., 1998; Cava y cols., 2000).

Además, hay que destacar que en estos estudios previos citados, el método de evaluación sensorial de elección fue el ACD, donde los catadores generan un valor medio de la intensidad del atributo evaluado. Por el contrario, la técnica TI empleada en la presente Tesis Doctoral, los catadores reproducen la intensidad percibida a lo largo de la masticación, en un producto que previamente a su evaluación, a diferencia de los anteriores estudios, ha sido loncheado y envasado a vacío, y posteriormente, almacenado en condiciones de refrigeración.

Las secciones correspondientes a la “babilla” y a la “cadera”, mostraron en la percepción de la fibrosidad diferencias significativas en la intensidad máxima y en la duración de la misma ( $I_{max}$  y  $DurPI$ ;  $p < 0.05$ ), observando en las muestras procedentes de la “babilla” una mayor intensidad de percepción. Por el contrario, al evaluar las muestras procedentes de la “babilla” frente a las muestras derivadas de la “maza”, no se detectaron diferencias significativas, evidenciando de nuevo la influencia de la localización anatómica, y por lo tanto de su composición físico-química sobre la textura percibida.

Con respecto los resultados obtenidos en la evaluación de la textura en los sistemas modelo, ambos métodos de evaluación sensorial ACD y TI, revelaron que las muestras con el menor contenido graso (~ 4%) presentaban una textura más gomosa en comparación con el resto. No se ha encontrado literatura científica relativa al efecto del contenido en grasa sobre la gomosidad. La formación de un residuo graso en la boca durante la masticación, como consecuencia del mayor contenido graso en los lotes con un ~ 10% y ~ 15% de grasa final, pudo ocasionar que estas muestras resultasen más jugosas y más fáciles de masticar que aquellas con un contenido graso menor, y por tanto,

estas últimas mostrasen una textura más gomosa. De este modo, se observó de manera clara y evidente la influencia del contenido en grasa sobre la textura. En los sistemas modelo a diferencia de los loncheados de jamón, todos los lotes planteados (~ 4%, ~ 10% y ~ 15%) presentaban la misma matriz cárnica sencilla, y como único componente diferencial, el contenido en grasa incorporado a los distintos lotes elaborados.

Sorprendentemente, en la percepción dinámica de los atributos del flavor, el contenido en GIM o el contenido de grasa incorporada en los sistemas modelo, no presentó un marcado efecto sobre los atributos evaluados (*Capítulos I, VII y VIII*). En el caso de los loncheados de jamón, únicamente algunos parámetros de TI extraídos (definidos en la tabla 8, ver sección de Revisión Bibliográfica) de los atributos sabor salado y flavor a rancio, se vieron afectados por el contenido en grasa. Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos en ambos estudios (*Capítulos VII y VIII*) observamos tendencias opuestas. Al comparar los valores obtenidos entre la “cadera” y la “babilla”, se observó una mayor duración de la intensidad máxima (DurPI) del sabor salado en las muestras con un menor contenido en GIM, así como, una menor intensidad (I<sub>max</sub>, Area) y duración total (Tend) del flavor a rancio percibido en estos loncheados con un menor contenido en GIM. Por el contrario, al comparar los loncheados procedentes de la “maza” y la “babilla”, las puntuaciones de la DurPI en el sabor salado aumentaron con el contenido en GIM, mientras que, la duración total (Tend) del flavor a rancio percibido disminuyó con éste. Teniendo en cuenta el contenido en GIM de todas las secciones empleadas, la diferencia del contenido en GIM encontrada entre la “cadera” y la “babilla”, fue mayor a la diferencia del contenido en GIM entre la “babilla” y la “maza”. Por lo tanto, los resultados mostraron la importancia de la magnitud de la diferencia en el contenido en GIM en la percepción del sabor salado y el flavor a rancio.

En general, la percepción del sabor salado durante el consumo se debe a la generación de saliva y a la dilución de la sal con ésta para alcanzar las papilas gustativas, y así, generar el sabor salado (De Loubens y cols., 2011). En definitiva, los loncheados procedentes de la “cadera” y la “maza”, en comparación con aquellos derivados de la “babilla”, como consecuencia de su mayor contenido en GIM, dejarían un residuo graso mayor en la boca durante

la masticación. Dicho residuo graso sería más evidente y persistente en los loncheados de la “cadera”, en comparación con el resto de loncheados (“maza” y “babilla”), e impediría la completa solubilización de la sal en la saliva, originando una intensidad del sabor salado más persistente en los loncheados procedentes de la “babilla”. Por el contrario, considerando la menor diferencia en el contenido en GIM entre los loncheados de la “babilla” y la “maza”, el residuo graso dejado por los loncheados procedentes de la maza, podría no serlo suficientemente importante para ver ese efecto “supresor” de la solubilización de la sal, pero si suficiente para incrementar la producción de saliva estimulada por el mayor contenido en GIM en los loncheados de la maza, permitiendo una mejor solubilización de la sal en la saliva, derivando en una intensidad del sabor salado más persistente.

En lo referente a los resultados derivados de la percepción del flavor a rancio, el contenido en GIM tendría un efecto condicionado tanto por su papel como reservorio de compuestos volátiles generados a partir de las reacciones de oxidación, como por su papel en la dinámica de liberación/retención. En definitiva, y según los resultados encontrados, un descenso en el contenido en GIM pudo provocar una mayor liberación de compuestos hidrofóbicos derivados de la oxidación de lípidos, desencadenando un flavor a rancio más persistente en estas muestras procedentes de la “babilla”. No obstante, al compararlo con los loncheados procedentes de la “cadera”, predominó la mayor generación de compuestos derivados de la oxidación de lípidos, a pesar de la mayor liberación de compuestos hidrofóbicos que pueden experimentar las muestras procedentes de la “babilla”.

Del mismo modo que en el caso de la textura, para la evaluación sensorial del flavor de los sistemas modelo se emplearon ambas técnicas sensoriales, ACD y TI. Este estudio que constituye el *capítulo* I de la presente Tesis Doctoral, reveló diferencias en la aplicación de ambas técnicas. El contenido en grasa tuvo un efecto significativo sobre la percepción del flavor evaluado mediante el ACD. Los catadores otorgaron las puntuaciones más elevadas de los atributos evaluados (intensidad general, a champiñones, a rancio y a curado) a las muestras con un ~ 4% o ~ 10% de grasa. Por el contrario, con la técnica de TI únicamente se puso de manifiesto un efecto marcado de la grasa sobre el flavor a champiñón, vinculado a la presencia del

compuesto volátil 1-octen-3-ol, mientras que, sobre el resto de atributos del flavor su efecto no fue tan marcado y característico. De forma similar a los resultados derivados de la evaluación sensorial de los loncheados de jamón Ibérico mediante la técnica TI, en los que se observó que la grasa únicamente presentaba un marcado efecto sobre la percepción del sabor salado y el flavor a rancio, sabores característicos del jamón curado. Al igual que los resultados derivados en la presente Tesis, considerando los diferentes trabajos presentes en la literatura científica no se observa un claro efecto del descenso del contenido graso sobre la percepción del flavor, y autores como Jiménez-Colmenero, (2000) y Crehan y cols., (2000) en emulsiones cárnicas, describen efectos opuestos en relación al efecto del contenido en grasa sobre la percepción del flavor.

Las discrepancias entre ambos métodos sensoriales, podrían ser consecuencia de la diferente metodología y protocolos de evaluación de las muestras para la evaluación de un proceso dinámico como el flavor. Con la técnica de TI, a diferencia del ACD, se establece un tiempo mínimo de masticación, lo cual, puede originar que el tiempo de permanencia en la boca sea mayor en las evaluaciones con el TI, desencadenando una masticación completa de la muestra, y en consecuencia, una mejor dilución con la saliva y transferencia vía retronasal de los compuestos responsables del flavor. En relación a la textura, en ambas técnicas de evaluación sensorial, los catadores escupían o tragaban la muestra en el momento que ellos lo consideraron oportuno, sin establecer un tiempo mínimo de permanencia en la boca, lo cual, podría explicar la mayor similitud encontrada en los resultados obtenidos por ambas técnicas.

Además del contenido en grasa, las características termodinámicas y las características químicas de cada compuesto influyen sobre la liberación del mismo (Rabe y cols., 2004; Relkin y cols., 2004), lo cual, explicaría los diferentes patrones de percepción encontrados en función del atributo del flavor evaluado. Además de estos factores, la textura es otro parámetro que interviene en la dinámica de liberación/retención de los compuestos responsables del flavor, influyendo sobre su persistencia e intensidad (Brauss y cols., 1999). En el caso de los sistemas modelo, la menor gomosidad percibida en las muestras con un ~ 15% de grasa podría provocar una mayor liberación



del compuesto 1-octen-3-ol, en consistencia con estudios preliminares llevados a cabo empleando la técnica TI en alimentos como yogur o geles a las que se les ha incorporado compuestos volátiles (Brauss y cols., 1999; Weel y cols., 2002). No obstante, el efecto de la textura podría depender del tiempo de permanencia de la muestra en la boca. Los catadores en la evaluación mediante el ACD establecen ellos mismos el tiempo de masticación, y consecuentemente, puede ocasionar diferencia en la masticación de las muestras en función de la textura de las muestras y de los catadores, por lo que, estas diferencias podrían verse reflejadas en las puntuaciones otorgadas a la intensidad de percepción de los atributos del flavor.

Del mismo modo que entre el ACD y el TI, se observaron diferencias en los resultados obtenidos entre la evaluación sensorial dinámica del flavor y la dinámica de liberación/retención de compuestos volátiles, en particular del compuesto 1-octen-3-ol, evaluada por técnicas instrumentales como la SPME acoplada a CG-EM. De acuerdo con Carrapiso, (2007), los lípidos actúan como reservorio de compuestos, por lo tanto, un aumento en el contenido en grasa genera en el alimento un aumento en la concentración de volátiles, sin embargo, se observa un descenso general en las concentraciones detectadas en el espacio de cabeza y en el espacio de cabeza de la cavidad nasal. En definitiva, las diferencias detectadas entre ambas técnicas reflejaron que a medida que el contenido en grasa final aumenta se produce una mayor retención, y por lo tanto, una menor liberación de compuestos al espacio de cabeza cuando se evalúa mediante técnicas instrumentales. Sin embargo, cuando el producto es consumido al haber una mayor cantidad de compuestos retenidos en la fase grasa del producto, habrá una mayor cantidad de compuestos volátiles que entran en contacto con los receptores correspondientes, incrementando de ese forma la percepción de los atributos del flavor asociados a la presencia de esos compuestos, en este caso el 1-octen-3-ol (flavor a champiñón). En este sentido, son numerosos los trabajos que han detectado resultados contradictorios al comparar los resultados obtenidos mediante técnicas diferentes (Linforth y cols., 2002; Roberts y cols., 2003). Roberts y cols., (2003) observaron un descenso en la liberación de compuestos hidrofóbicos con el contenido en grasa, sin embargo, su determinación mediante el análisis estático del espacio de cabeza, no simula el

proceso de deglución que implica una dilución con la saliva y transporte de los compuestos desde el alimento al aire, y de éste, a la cavidad nasal vía retronasal.

En definitiva los resultados evidenciaron la importancia en la elección de la técnica sensorial más apropiada para la evaluación sensorial, principalmente, para la percepción del flavor.

## **7.2 Influencia de las características de la grasa.**

Al igual que el contenido en grasa, las características de la misma, particularmente, su composición en ácidos grasos tienen un papel primordial sobre la calidad final de un producto (Gandemer, 2002). En la presente Tesis Doctoral, el estudio de la influencia de la composición de la grasa se planteó desde diferentes puntos de vista. En primer lugar, se estudiaron las diferencias en la estabilidad oxidativa tanto de lípidos como de proteínas de un sistema modelo cárnico elaborado con grasas de diferente naturaleza. En segundo lugar, se evaluó la influencia del perfil de ácidos grasos sobre la liberación de compuestos volátiles olor-activos en estos mismos sistemas modelo cárnicos. Y en tercer lugar, se evaluaron las diferencias existentes en las características sensoriales debidas a las diferencias en el tipo de grasa empleada. Para la consecución de estos objetivos, se partieron de diferentes grasas, tres de origen animal (tocino procedente de cerdos Ibéricos sometidos a dos regímenes de alimentación diferente, y manteca comercial de cerdo), y un aceite vegetal (aceite de girasol comercial) para elaborar los diferentes lotes planteados.

### *7.2.1 Influencia de las características de la grasa en el perfil de ácidos grasos de los sistemas modelo elaborados.*

Los resultados obtenidos en el perfil de ácidos grasos de los sistemas modelo reflejaron el perfil de ácidos grasos de las diferentes grasas empleadas, el cual, está determinado por la alimentación recibida por los animales (Daza y cols., 2005; Rey y cols., 2006), así como de los aceites vegetales (Liu y cols.,

1991). El lote elaborado con grasa de cerdos Ibéricos en montanera (MF), así como, el lote elaborado con grasa de cerdos Ibéricos de pienso (CF), se caracterizaron por mostrar niveles elevados de ácido oleico (C18:1, *n*-9) y de  $\Sigma$ AGMI (ácidos grasos monoinsaturados). En las muestras elaboradas con manteca (LF) se detectó un alto nivel de  $\Sigma$ AGS (ácidos grasos saturados), mientras que, los sistemas modelo elaborados con aceite de girasol (SOF), presentaron niveles elevados de ácido linoleico (C18:2) y de  $\Sigma$ AGPI (ácidos grasos poliinsaturados).

### *7.2.2 Influencia de las características de la grasa sobre la estabilidad oxidativa.*

La oxidación lipídica es una de las principales causas de deterioro de la carne y productos cárnicos (Morrissey y cols., 1998), siendo los fosfolípidos los principales precursores de los productos derivados de la oxidación lipídica, debido al elevado número de insaturaciones de los ácidos grasos que los constituyen, junto con el hecho, de que al ser componentes estructurales de las membranas celulares presentan una mayor exposición a agentes pro-oxidantes (Love y Pearson, 1971; Boylston y cols., 1996). De esta forma, modificaciones en el perfil de ácidos grasos de los fosfolípidos modificarán la susceptibilidad de los mismos a los fenómenos de oxidación. En la presente Tesis Doctoral, de acuerdo con los resultados observados (*Capítulo IV*), tanto el perfil de ácidos grasos como la presencia de sustancias con actividad antioxidante, podrían haber jugado un papel determinante en la estabilidad oxidativa de los sistemas modelo cárnicos tipo salchicha elaborados. De acuerdo con los niveles de hexanal detectados, los sistemas modelo elaborados con tocino procedente de cerdos Ibéricos alimentados a base de piensos (CF) y aquellos elaborados con aceite de girasol (SOF), mostraron una mayor susceptibilidad a la oxidación lipídica, en comparación con aquellos elaborados con tocino procedente de cerdos Ibéricos alimentados en montanera (MF), y manteca comercial (LF) en cuya formulación se encuentran antioxidantes como el E-320 (BHA: butilhidroxi-anisol) y el E-330 (ácido cítrico), que por el contrario, mostraron los niveles más bajos de hexanal. En este sentido, Cava y cols., (1999) observaron que el balance entre la composición en ácidos grasos y el nivel de antioxidantes naturales como tocoferoles presentes en el músculo del cerdo,

tienen un papel decisivo en las reacciones de oxidación. De hecho, se han cuantificado mayores niveles de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferol en los tejidos procedentes de cerdos criados en extensividad, en comparación con cerdos criados en régimen intensivo (Ventanas y cols., 2007; Estévez y cols., 2007). Detectando estos autores, Ventanas y cols., (2007) niveles de 6.36  $\mu\text{g}$  de  $\alpha$ -tocoferol y 1.50  $\mu\text{g}$  de  $\gamma$ -tocoferol por gramo de músculo en cerdos Ibéricos en régimen de montanera, frente a 2.09  $\mu\text{g}$  de  $\alpha$ -tocoferol y 0.14  $\mu\text{g}$  de  $\gamma$ -tocoferol por gramo de músculo en cerdo Ibéricos alimentados a base de concentrados. Por lo tanto, un posible mayor nivel de antioxidantes naturales, probablemente tocoferoles, presente en los sistemas modelo elaborados con tocino de montanera, explicarían las diferencias observadas entre estos sistemas modelo (MF) y los elaborados con tocino procedente de cerdos Ibéricos cebados con piensos comerciales (CF).

En lo referente al lote elaborado con manteca comercial de cerdo (LF), la presencia de antioxidantes sintéticos (E-320 y E-330) en la formulación de la misma, explicaría la mayor estabilidad oxidativa mostrada por los sistemas modelo elaborados con este tipo de grasa en comparación con el resto. Con respecto a los elaborados con aceite de girasol, se encontró una correlación positiva y significativa entre los niveles de hexanal y de AGPI ( $r= 0.58$ ;  $p<0.001$ ). De acuerdo con Shahidi y Pegg, (1994) el hexanal deriva de la oxidación de los AGPI, principalmente del ácido linoleico (C18:2). Por lo tanto, a pesar de la presencia de  $\alpha$ -tocoferol en el aceite de girasol a unos niveles elevados (51.90 mg tocoferol/100 g aceite) (Rodríguez-Carpena y cols., 2012) este antioxidante no logró frenar de forma significativa la formación de hexanal.

A diferencia de la oxidación de lípidos, las repercusiones que puede tener la composición en ácidos grasos en un producto cárnico madurado sobre la formación de los carbonilos AAS y GGS derivados de la oxidación de proteínas, son hasta el momento desconocidas. De hecho, el *capítulo IV* de la presente Tesis Doctoral, constituye el primer estudio encaminado a evaluar la influencia de las características de la grasa sobre la generación de dos carbonilos específicos de la oxidación de proteínas en un sistema modelo cárnico curado cuya única diferencia es la naturaleza de la grasa empleada. Los resultados obtenidos revelaron un efecto combinado del perfil de ácidos grasos y de la presencia de compuestos con actividad antioxidante en las grasas y en el aceite empleados sobre la mayor o menor susceptibilidad a la

oxidación de proteínas. De acuerdo con los valores obtenidos, los niveles más elevados de AAS y GGS, así como de los carbonilos totales, se correspondían a las muestras del lote CF, mientras que, las muestras correspondientes al lote SOF mostraron los niveles más bajos detectados.

En relación a los resultados derivados de ambos fenómenos oxidativos no se detectó una clara conexión entre la oxidación de lípidos y proteínas. Los elevados niveles de hexanal detectados en las muestras elaboradas con aceite de girasol (SOF), no estuvieron en línea con los niveles de carbonilos derivados de la oxidación de proteínas, lo que pondría de manifiesto el papel primordial que puede tener un elevado contenido en AGPI sobre la oxidación de lípidos, y la presencia de sustancias antioxidantes como compuestos fenólicos, sobre la carbonilación de las proteínas. En este sentido, son diversos los estudios que han observado el efecto de compuestos naturales con actividad antioxidante como el  $\alpha$ -tocoferol y de una gran variedad de compuestos fenólicos (Estévez y Heinonen, 2010; Ganhão y cols., 2010a), o de compuestos antioxidantes sintéticos como el BHT (Estévez y cols., 2006), sobre la formación de carbonilos derivados de la oxidación de proteínas. En consecuencia, este efecto protector ejercido por estos compuestos antioxidantes (naturales o sintéticos) frente a la oxidación de proteínas, explicaría los niveles más bajos de carbonilos en los lotes MF, LF y SOF, frente al lote CF. Efecto protector previamente observado en relación a los resultados derivados de la oxidación de lípidos. No obstante, en el caso concreto del lote SOF, con un elevado nivel de  $\alpha$ -tocoferol, a diferencia del efecto protector ejercido frente a la oxidación de proteínas, dicho compuesto no mostró la misma capacidad protectora frente a la oxidación de lípidos, evaluado mediante la determinación de hexanal. En este caso, los elevados niveles de AGPI tuvieron una mayor repercusión sobre el desarrollo de las reacciones de oxidación lipídica que el efecto protector del  $\alpha$ -tocoferol. Por tanto, el impacto de la composición de la fracción lipídica sobre la oxidación de lípidos o proteínas, en términos de perfil de ácidos grasos y compuestos antioxidantes, es diferente. Ambos parámetros mostraron una marcada influencia sobre la oxidación de lípidos, mientras que, la oxidación de proteínas no se vio influenciada de forma significativa por la composición en ácidos grasos. En definitiva, considerando las repercusiones que puede tener la oxidación de lípidos y proteínas sobre la calidad del producto, las

características de la grasa añadida para la elaboración de productos cárnicos, en términos de perfil de ácidos grasos y presencia de antioxidantes endógenos o añadidos a los alimentos para la obtención de productos cárnicos de una elevada calidad, deberían ser previamente consideradas para favorecer tanto su valor nutricional, como para mejorar su calidad sensorial.

### *7.2.3 Influencia de las características de la grasa sobre la dinámica liberación/retención de volátiles.*

Las características de la grasa determinan la calidad sensorial de un producto por su influencia sobre la dinámica liberación/retención de los compuestos volátiles liberados durante la masticación (Hort y Cook, 2007), y por consiguiente, sobre la percepción del flavor (Vingerhoeds y cols., 2008). Numerosos estudios han manifestado la influencia del estado físico de la grasa sobre la liberación de compuestos volátiles (Maier, 1975; Guichard y cols., 2002) observando una disminución en la liberación en la grasa en estado líquido. En base a estos antecedentes, los resultados esperados en la presente Tesis Doctoral eran que los sistemas modelo elaborados con aceite de girasol mostrasen una mayor retención de los compuestos volátiles incorporados. No obstante, independientemente a las características termodinámicas de cada compuesto y a la fracción lipídica, cualquier cambio en la estructura de las emulsiones tienen una gran relevancia en la liberación de los compuestos volátiles (van Ruth y cols., 2002). De acuerdo con Relkin y cols., (2004) cualquier cambio en la naturaleza de la grasa afecta a la estructura de las gotas de grasa. Además, el tamaño de las gotas de grasa de las emulsiones tienen una gran influencia sobre la liberación de los compuestos volátiles (Charles y cols., 2000), observando una mayor liberación de compuestos hidrofóbicos en emulsiones con grasa vegetal, como consecuencia del menor tamaño de las gotas grasas en comparación con los glóbulos grasos de la grasa animal. Además, del estado físico de la grasa, la longitud de la cadena y el grado de insaturaciones de un ácido graso (Harvey y cols., 1995; Roudnitzky y cols., 2003) influyen en la volatilidad de los compuestos. En base a estos estudios previos, los resultados reflejaron la influencia del tamaño del glóbulo graso o gota de grasa y del número de insaturaciones en la liberación de los

compuestos volátiles incorporados a la matriz de los sistemas modelo cárnicos. Las técnicas instrumentales de análisis de compuestos volátiles (SPME) detectaron mayores áreas cromatográficas en los sistemas modelo elaborados con grasa vegetal (SOF) de manera independiente a las características de cada compuesto. En armonía con los resultados previamente observados por van Ruth y cols., (2002) en emulsiones aceite-agua elaboradas con aceite de girasol. Por lo tanto, estos resultados podrían deberse por un lado a parámetros que determinan su estructura, como el tamaño de los glóbulos/gotas de la grasa/aceite, el cual, es mayor en los los glóbulos grasos de la grasa animal que las gotas grasas del aceite vegetal (Dubois y cols., 1996), y al perfil de ácidos grasos del aceite de girasol. Asimismo, la liberación de los compuestos volátiles fue mayor en las muestras de los sistemas modelo elaborados con tocino de montanera (MF), en comparación con los sistemas modelo elaborados con tocino de pienso (CF).

En conclusión, se observó una mayor liberación de compuestos volátiles en los sistemas modelo elaborados con grasa más insaturada. Estos resultados junto con los obtenidos en el Análisis de Componentes Principales (ACP) mostraron una clara distinción entre los lotes elaborados con una grasa más saturada (CF), y aquellos elaborados con grasa con un mayor número de insaturaciones (SOF y MF), apoyando el impacto ejercido por el perfil de ácidos grasos sobre la dinámica de liberación/retención de los compuestos volátiles.

#### *7.2.4 Influencia de las características de la grasa sobre la textura instrumental.*

Además de por su repercusión sobre el aroma y el flavor, la calidad sensorial puede ser comprometida por la influencia que las características de la grasa pueden tener sobre la textura (Scheeder y cols., 2001). En este apartado, consideraremos la influencia de las características de la grasa sobre la textura de los sistemas modelo medida por técnicas instrumentales (Perfil de textura; TPA, Bourne, 1978). Los resultados revelaron que las características de la grasa afectaron de forma significativa a la mayoría de las determinaciones (*Capítulo II*). Modificaciones en el perfil de ácidos grasos del tejido adiposo determinan modificaciones en el punto de fusión de la grasa, y en definitiva, en las características de textura de la misma, particularmente, en la firmeza (Teye

y cols., 2006). Además, Youssef y Barbut, (2009) observaron en emulsiones cárnicas que el tamaño de los glóbulos grasos podría determinar modificaciones en la dureza. En el caso de las grasas vegetales tipo aceite, al presentar un tamaño de gotas grasas menor, en comparación con el tamaño de los glóbulos grasos presentes en las grasas de origen animal, es necesario una mayor área de proteínas de membrana para rodearlas, lo cual, podría incrementar la resistencia a la compresión de los sistemas que contienen aceite de girasol, y en consecuencia, incrementar la dureza de los mismos. Estos argumentos podrían explicar en parte los valores más elevados de dureza, gomosidad, masticabilidad, cohesividad y elasticidad, y los más bajos para la adhesividad de los sistemas modelo elaborados con aceite de girasol (SOF). Por el contrario, los lotes MF, y LF resultaron ser las muestras menos duras, gomosas y masticables.

#### *7.2.5 Influencia de las características de la grasa sobre la calidad sensorial.*

Finalmente, el último objetivo que se planteó en la presente Tesis Doctoral en relación a las características de la grasa, fue evaluar su influencia sobre la calidad sensorial de los sistemas modelos, utilizando técnicas dinámicas de evaluación sensorial, en concreto la técnica TI. Mediante esta técnica se evaluó tanto la textura como el flavor de los sistemas modelo, utilizando un panel de catadores previamente entrenados.

En relación a los atributos de textura evaluados, las muestras del lote MF presentaron la mayor intensidad máxima, así como, la mayor duración de la misma ( $I_{max}$ , y  $DurPI$ ;  $p < 0.01$ ) en la percepción de la gomosidad, mientras que, las muestras del lote CF exhibieron la mayor persistencia ( $Tend$ ).

En relación a los atributos del flavor, la técnica TI puso de manifiesto que la mayoría de los atributos se percibieron de forma más intensa en los sistemas modelo elaborados con grasa animal (MF y LF) mostrando, en general, valores más elevados en los parámetros relacionados con la intensidad, como la  $I_{max}$  y el  $Area$  ( $p < 0.05$ ), mientras que, la duración de esa intensidad percibida fue mayor en aquellos sistemas modelo elaborados con aceite vegetal (SOF), mostrando comúnmente los valores más elevados en los parámetros relacionados con la duración, como la  $DurPI$  y el  $Tend$  ( $p < 0.05$ ). La influencia



de la temperatura durante la masticación sobre la proporción sólido/líquido de las diferentes grasas empleadas para la elaboración de los distintos lotes de sistemas modelo elaborados planteados explicaría los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral. Previamente, Corona, (2012) mediante la técnica de ultrasonidos caracterizaron las diferentes grasas empleadas en la elaboración de los distintos sistemas modelo, observando la influencia de la temperatura sobre la fusión de la grasa. Además de la influencia que tiene el estado físico de la grasa y las propiedades termodinámicas de cada compuesto, la volatilidad depende también de la temperatura (Harvey y cols., 1995). De hecho, el efecto de la temperatura predomina frente al estado físico de la grasa (Meynier y cols., 2003). En este sentido, los resultados encontrados reflejaron la influencia de la temperatura durante la masticación de las muestras. Dichos resultados indican un equilibrio entre la temperatura de consumo del producto (temperatura ambiente, ~ 21 °C) y la temperatura oral (cavidad oral, 37 °C). De acuerdo con un estudio anterior llevado a cabo Maier, (1975), un incremento en la temperatura en las grasas en estado sólido supone un descenso en la liberación de los compuestos volátiles, mientras que, en las grasas en estado líquido supone todo lo contrario. Luego, la variación de la temperatura a lo largo de la masticación hasta alcanzar un equilibrio, ocasionaría modificaciones en la proporción sólido/líquido durante la masticación, lo cual, sería más evidente en las grasas de origen animal, como consecuencia del mayor % de grasa a fusionar, en consistencia con los resultados previamente detectados mediante ultrasonidos por Corona, (2012). En consecuencia esas mayores variaciones en el estado físico de las grasas origen animal podrían repercutir en mayor medida en la dinámica de liberación/retención de los compuestos volátiles. Ocasionando una mayor retención o menor liberación de los compuestos volátiles en comparación con las muestras elaboradas con aceite de girasol a lo largo de la masticación. Por lo tanto, la mayor intensidad percibida en los sistemas modelo elaborados con las grasas de origen animal se correspondería con una mayor liberación de compuestos volátiles al comienzo de la masticación, previo al equilibrio entre ambas temperaturas durante la masticación. Lo cual explicaría, que tras ese equilibrio térmico las muestras elaboradas con aceite vegetal experimentasen una menor retención de compuestos volátiles, a diferencia de las muestras elaboradas con grasa

animal, que sufrieron una mayor retención debido al efecto predominante de la temperatura. Mostrando finalmente, las muestras elaboradas con grasa animal (MF y LF) una mayor intensidad de percepción, y las muestras elaboradas con aceite vegetal (SOF) una percepción más duradera.

Del mismo modo que en el análisis instrumental de la dinámica de liberación/retención de compuestos volátiles (desarrollado en el apartado 7.2.3), a pesar de la menor solubilidad que pueden tener los compuestos volátiles en los sistemas modelo elaborados con grasa animal, un acondicionamiento previo a 37 °C, de manera similar que en la evaluación sensorial, podría haber favorecido una menor retención de los compuestos en las grasas en estado líquido (SOF) seguido por la grasa con un mayor número de insaturaciones (MF), y por lo tanto, con una menor proporción sólido/líquido. Considerando la relevancia que tiene el flavor sobre la calidad sensorial y el objetivo que se pretenda alcanzar, los productos cárnicos elaborados a partir de grasa animal podrían presentar una mayor calidad final si se pretende potenciar la intensidad del flavor, mientras que, si lo que se quiere es prolongar la duración del flavor durante la masticación, la elección sería productos cárnicos elaborados con aceite vegetal.

De acuerdo con todos los resultados obtenidos en los diferentes capítulos que constituyen el estudio de la influencia de las características de la grasa (*Capítulos II, III y IV*), se puede considerar que el efecto de las características de la grasa sobre la calidad de un producto no se atribuye solamente a las diferencias en el perfil en ácidos grasos, sino, al efecto combinado de éste junto con la presencia de sustancias con actividad antioxidante, parámetros que pueden determinar su estructura, y con factores extrínsecos, como la temperatura. No obstante, la grasa procedente de cerdos Ibéricos en régimen de montanera, a diferencia del resto de grasas empleadas, fue la grasa que mostró unas características óptimas para la obtención de sistemas modelo cárnicos tipo salchicha fermentadas, distinguidos por su estabilidad oxidativa, la intensidad del flavor percibida y las características de textura.

### 7.3 Factores post-procesado.

Otro de los principales objetivos descritos en la presente Tesis Doctoral planteaba el estudio de la influencia de factores post-procesado sobre la calidad del jamón loncheado envasado a vacío, entre los que destaca la forma de presentación (Intacto y loncheado previo), el tratamiento con APH (600 MPa durante 6 min), el tiempo de almacenamiento a refrigeración (0, 30 y 120 días), y finalmente, la temperatura de consumo (7 °C, 16 °C y 20 °C).

#### 7.3.1 Influencia de la forma de presentación del jamón Ibérico.

En la comercialización del jamón curado, particularmente en Serrano y recientemente en Ibérico, se constata que se ha producido un descenso paulatino en las ventas por piezas enteras a favor a otros formatos fraccionados, tales como loncheados. En este sentido, las industrias han desarrollado diferentes tecnologías de corte y envasado entre las que destacan el envasado a vacío y en atmósferas modificadas. Sin embargo, ningún estudio previo ha evaluado en concreto, la influencia de la forma de presentación en jamón Ibérico loncheado envasado a vacío.

En este sentido, se establecieron tres formas de presentación: formato loncheado tradicional (CSF; lonchas de jamón extendidas a lo largo del envase), formato loncheado alternativo (ASF; lonchas de jamón apiladas horizontalmente), y un formato intacto (IF; bloque de jamón, sin un loncheado previo) para evaluar su impacto sobre la estabilidad oxidativa de lípidos y proteínas, y relacionarlo con las posibles repercusiones que puede tener sobre la calidad sensorial y el color de los loncheados de jamón envasados a vacío. Para ello, son sometidos a un mes de almacenamiento bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 h diarias, simulando de esta manera, las condiciones en la que los jamones se presentan en los expositores en los puntos de venta.

En relación a los resultados derivados de la estabilidad oxidativa que constituyen el *capítulo V*, evidenciaron que un loncheado previo al envasado a vacío incrementa la susceptibilidad del jamón a las reacciones de oxidación frente al formato en bloque (IF), y dentro de estos formatos loncheados (extendido -CSF vs. apilado-ASF), fue el formato ASF, el que mostró una

mayor susceptibilidad a las reacciones de oxidación. En este tipo de presentación (ASF) se detectaron mayores niveles de aldehídos derivados de la oxidación de lípidos, así como, de los carbonilos característicos de la oxidación de proteínas (AAS y GGS). Un mayor estiramiento de la película de plástico, y por lo tanto, una mayor deformación ejercida por las lonchas en el formato ASF sobre el material plástico empleado para el envasado, podría haber causado una mayor exposición al oxígeno y a otros factores pro-oxidantes lo que explicaría los resultados obtenidos.

En relación a su influencia sobre la calidad sensorial de los loncheados, observamos que el panel de cata mediante la técnica de ACD, revelan un efecto significativo del formato sobre el tono del color rojo (de rojo a marrón;  $p < 0.001$ ) y la dureza del magro ( $p < 0.001$ ), destacando el formato ASF por sus mayores puntuaciones para ambos atributos, así como, las menores para el brillo ( $p < 0.001$ ) y la intensidad del color rojo (menos a más;  $p < 0.01$ ). Del mismo modo, se observó que los formatos loncheados (ASF y CSF) frente al bloque de jamón no loncheado (IF), presentaban unas puntuaciones de los atributos del flavor significativamente más elevadas ( $p < 0.01$ ) en cuanto a intensidad general y persistencia. Igualmente es de destacar, que el formato ASF atenuó el sabor salado percibido por los catadores en comparación con el formato CSF. Estos resultados derivados de la evaluación sensorial junto con los obtenidos en el Análisis de Componentes Principales (ACP), y en los coeficientes de correlación de Pearson ( $r$ ), ponen de manifiesto la clara relación e influencia de la oxidación de proteínas sobre los atributos de color y textura, coincidiendo con estudios previos realizados en diferentes productos cárnicos mediante medidas instrumentales (Estévez y cols., 2005b; Ganhão y cols., 2010b; Utrera y cols., 2012), así como, la influencia de los aldehídos derivados de la oxidación de lípidos y de los carbonilos generados en la oxidación de proteínas en el flavor percibido (Ventanas y cols., 2007).

El color instrumental medido sobre la superficie del magro, reveló que las lonchas del formato ASF mostraban los valores más bajos del parámetro  $a^*$ , y los más elevados para el parámetro  $L^*$ , en comparación con los otros formatos planteados (CSF y IF), coincidiendo con los resultados derivados de la evaluación sensorial del color rojo del magro. La presencia de una coloración más marronácea junto con una mayor luminosidad en estas muestras (ASF),

las cuales, presentaron un mayor nivel de compuestos carbonilos derivados de la oxidación de proteínas, constató la influencia de la oxidación de proteínas sobre el color, ya que, cualquier cambio en la estructura de las proteínas induce cambios en la luminosidad de la loncha de jamón (Andrés y cols., 2004 y 2006).

Otro parámetro determinado y relacionado con el color fue la diferencia total de color ( $\Delta E$ ). Estos loncheados fueron sometidos a APH (600 MPa), resultando un total de seis lotes en función del tratamiento (controles y tratados), y de la forma de presentación (CSF, ASF y IF). Determinando dentro de cada formato la diferencia total de color ( $\Delta E_{t-c}$ ), el formato ASF mostró la mayor diferencia de color ( $\Delta E_{t-c} = 5.18 \pm 1.51$ ), seguido por el formato CSF ( $\Delta E_{t-c} = 4.27 \pm 0.73$ ), y finalmente, el formato IF ( $\Delta E_{t-c} = 3.74 \pm 0.65$ ). Aunque estas diferencias no fueron significativas, constatamos que están en armonía con los resultados derivados del color y con aquellos derivados de la oxidación de lípidos y proteínas. Una mayor exposición al oxígeno y otros factores pro-oxidantes, en los formatos loncheados (CSF y ASF), y particularmente en el formato ASF, promovieron la oxidación de los pigmentos cárnicos y proteínas miofibrilares, y en consecuencia, modificaciones tanto en la intensidad del color rojo como en la luminosidad mostrada.

Finalmente, considerando los resultados en conjunto, se puede afirmar que la estabilidad oxidativa es determinante en la calidad sensorial. Teniendo en cuenta que un loncheado previo y un tratamiento con APH incrementan la susceptibilidad a las reacciones de oxidación, el formato en bloque (IF) sería la mejor elección. No obstante, si se requiere de un loncheado previo del jamón el formato ASF es el formato menos idóneo para la obtención de productos de alta calidad. Esta consideración sería de enorme interés para los industriales del sector, puesto que, cada vez son más las industrias con una línea de loncheado-envasado a vacío de jamón curado para su exportación tras el tratamiento con APH.

### 7.3.2 Tratamiento con altas presiones hidrostáticas (APH).

En la presente Tesis doctoral, en relación al tratamiento con APH, uno de los principales objetivos fue determinar su impacto sobre la calidad sensorial del jamón Ibérico y relacionar los cambios con la estabilidad oxidativa, tanto de lípidos como de proteínas. Por tanto, habría que destacar que este estudio además de suponer el primero en evaluar las reacciones de oxidación de proteínas en un producto curado sometido a APH mediante la detección de dos carbonilos específicos (GGs y AAS) derivados de la oxidación de aminoácidos concretos, ha demostrado que estas reacciones son la causa de los cambios experimentados en la textura y en el color.

A diferencia de los trabajos referenciados en la literatura científica, en la presente Tesis Doctoral, se evaluó su efecto sobre la calidad sensorial mediante el empleo de técnicas sensoriales dinámicas, en concreto el TI, lo que supone un avance importante en la percepción real de los atributos del flavor y la textura por parte del consumidor. Finalmente, se estudió cómo el contenido en GIM modifica o no el efecto ejercido por las APH sobre la calidad de los loncheados de jamón Ibérico.

El estudio de las repercusiones que las APH puedan tener sobre la estabilidad oxidativa y la calidad sensorial de los loncheados envasados a vacío, constituyen los *capítulos* V, VI y VII de la presente Tesis Doctoral.

#### 7.3.2.1 Influencia de las APH sobre la estabilidad oxidativa.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los *capítulos* V y VI, en líneas generales, el tratamiento con APH favoreció la oxidación de lípidos y de proteínas, sin embargo, dicha inestabilidad oxidativa fue más evidente en el primer estudio que constituye el *capítulo* V, donde los loncheados tras el tratamiento con APH (600 MPa, 6 min) fueron sometidos a 1 mes de almacenamiento bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 h diarias, que corresponde con el período de rotación en los lineales. Por el contrario, en el segundo estudio que constituye el *capítulo* VI, tras un período de almacenamiento más prolongado, 0, 1 y 4 meses en oscuridad, el tratamiento con APH solamente mostró un efecto más marcado en las últimas etapas (4 meses). Ello concuerda

con estudios anteriores en los que se evaluó el efecto de las APH sobre la oxidación lipídica (Andrés y cols., 2004 y 2006; Cava y cols., 2009). Sin embargo, éstos últimos (Cava y cols., 2009), no detectaron un efecto significativo sobre los niveles de carbonilos totales derivados de la oxidación de proteínas, medidos por la técnica del DNPH en jamón y lomo loncheados tras 90 días de almacenamiento en ausencia de luz. En comparación con la técnica utilizada en la presente Tesis Doctoral (detallada en los *capítulos V y VI*), la técnica de DNPH es un método más inespecífico (Estévez y cols., 2008b). En base a esto, se puede destacar la idoneidad de la cuantificación de la oxidación de proteínas mediante la determinación de los carbonilos AAS y GGS para la determinación de la oxidación de proteínas.

Ambos procesos de oxidación (lípidos y proteínas) se ven influenciados por factores similares, lo cual, puede desencadenar una conexión directa entre ambos procesos (Stadtman y Levine, 2000; Estévez y Cava, 2004). Por lo tanto, es posible que dicha interacción entre la oxidación de lípidos y proteínas tenga lugar durante el periodo de almacenamiento de los loncheados. No obstante, en el *capítulo V*, en el cual, las APH mostraron un marcado impacto sobre la oxidación de lípidos y de proteínas, se obtuvieron correlaciones positivas y significativas entre los niveles de hexanal y el de los carbonilos AAS y GGS ( $r= 0.843$  entre hexanal y AAS, y  $r= 0.651$  entre hexanal y GGS;  $p<0.05$ ). Sin embargo, en los loncheados sometidos a un prolongado almacenamiento en ausencia de luz, la relación entre ambos procesos oxidativos no fue tan evidente, observándose únicamente un aumento significativo del compuesto GGS al final del período de almacenamiento. Estos resultados se deben probablemente a diferencias tanto en la estabilidad como en la reactividad de ambos compuestos, con lo que paradójicamente los niveles de AAS disminuyeron a lo largo del almacenamiento (Estévez y cols., 2009; Armenteros y cols., 2009). Las APH pudieron promover la intervención del carbonilo AAS en otras reacciones durante el prolongado almacenamiento. Por lo tanto, los resultados obtenidos ponen de manifiesto la influencia de las condiciones de almacenamiento sobre la estabilidad oxidativa tras el tratamiento con APH, así como, la elección de una técnica de análisis adecuada, principalmente, para la oxidación de proteínas.

En relación a la influencia del contenido en GIM sobre los efectos que las APH mostraron sobre la estabilidad oxidativa, los resultados revelaron que dicho contenido en GIM determina el impacto de las APH sobre la oxidación tanto de lípidos como de proteínas. En cuanto a la oxidación de lípidos, fueron las muestras con un mayor contenido en GIM y sometidas a las APH, las que mostraron una mayor susceptibilidad a la oxidación. Por el contrario, en el caso de la oxidación de proteínas, los loncheados con un menor contenido en GIM y sometidos a las APH fueron los que presentaron mayores valores de AAS y GGS al final del almacenamiento. Estos resultados confirmarían la influencia de la composición físico-química de los loncheados sobre los cambios inducidos por las APH.

#### *7.3.2.2 Influencia de las APH sobre parámetros relacionados con el color instrumental.*

Se estudió igualmente el efecto de las APH sobre parámetros de calidad del producto final, como es el color medido instrumentalmente (CIE L\*, a\*, b\*) (*Capítulos V y VI*). Como ya se ha detallado anteriormente, en el estudio desarrollado en el *capítulo V* los loncheados fueron almacenados durante 1 mes bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 h diarias, mientras que, en el estudio desarrollado en el *capítulo VI* los loncheados fueron almacenados durante 4 meses en ausencia de luz, tomando mediciones a los 0, 30 y 120 días. Al mes de almacenamiento bajo ciclos de luz/oscuridad, las APH tuvieron un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre el parámetro a\* (color rojo), mientras que, en los loncheados almacenados en oscuridad las APH no mostraron influencia significativa sobre ninguno de los parámetros de color medidos tanto en la grasa de cobertura como en el magro. En este sentido, Clariana y cols., (2012) estudiaron en jamón loncheado envasado a vacío, el efecto de las condiciones de luz sobre el parámetro a\*, determinando que la luz podría causar una fotodegradación de la molécula de nitrosilmioglobina. Por tanto, ese descenso observado en el valor del parámetro a\* medido en la superficie de los loncheados, puede ser promovido por la exposición a ciclos de 12 h diarias de luz durante el almacenamiento.



Concluyendo que, un almacenamiento en oscuridad o el envasado en películas que limiten o minimicen la exposición/filtración a las radiaciones UV, permitirían minimizar el impacto de las APH sobre el color, preservando así la calidad del producto durante más tiempo.

### *7.3.2.3 Influencia de las APH sobre parámetros relacionados con la calidad sensorial.*

En este último apartado debemos considerar la influencia del tratamiento con APH sobre las características sensoriales de la grasa externa y del magro de los loncheados evaluados mediante la técnica de ACD. En relación a la grasa externa, el tratamiento causó cambios importantes tanto en la textura como en la apariencia, que en función de las condiciones de almacenamiento fueron diferentes. Tras un mes de almacenamiento bajo ciclos de luz/ oscuridad de 12 h diarias, se observa una disminución en la intensidad de color, el brillo y la fluidez de las muestras tratadas con APH. Sin embargo, tras 4 meses de almacenamiento la grasa de los loncheados mostró una coloración más amarillenta, y menos homogénea, así como, una mayor dureza al tacto y una menor arenosidad. La acumulación de productos derivados de la oxidación lipídica a lo largo del almacenamiento podría ser el causante de esa percepción más amarillenta de la grasa. En relación al aumento de la dureza o disminución de la fluidez táctil, estudios previos llevados a cabo por Cheftel y Culoli, (1997) en carne, y Dumay y cols., (1996) en emulsiones y en lácteos, mostraron que los lípidos bajo presión tienden a cristalizar (aumento del punto de fusión más de 10 °C/100 MPa). En relación al almacenamiento a refrigeración, Corona, (2012) observaron mediante ultrasonidos la cristalización de la grasa tras el almacenamiento a refrigeración. Por lo tanto, del mismo modo que Niñosles y cols., (2010) en tocino de cerdo tras 2 meses de almacenamiento a 0 °C, podríamos asegurar tras 4 meses de almacenamiento una completa cristalización de los lípidos que cristalizan a esa temperatura (triglicéridos saturados y monoinsaturados). Consecuentemente, los diferentes períodos de almacenamiento a los que fueron sometidos los loncheados (1 mes vs. 4 meses) podrían explicar las diferencias observadas en la coloración y dureza

de la grasa, siendo los cambios más marcados tras un período de almacenamiento prolongado.

En relación a los cambios en los atributos sensoriales evaluados en el magro de la loncha, se observaron importantes modificaciones en atributos relacionados con el color y la textura tras el tratamiento con APH. Investigaciones previas han atribuido estos cambios en el color al impacto ejercido por las APH sobre las proteínas (Carlez y cols., 1995), y a su vez, al papel que juegan éstas sobre el color y la textura de diferentes productos cárnicos (Estévez y cols., 2005b; Ganhão y cols., 2010b; Utrera y cols., 2012). Estos argumentos apoyarían las variaciones observadas en la evaluación sensorial del color y la textura de los loncheados. Tras el tratamiento con APH los loncheados mostraron una coloración significativamente más marronácea, una disminución en el color rojo del magro, un menor brillo, y una mejor apreciación del veteado, un aumento de la dureza y la masticabilidad, así como, un descenso de la jugosidad y la pastosidad. Además, la evaluación sensorial dinámica (TI), reveló un aumento en la duración de la dureza (Tend y DurPI) y la fibrosidad (Tend) percibidas, y una mayor persistencia de la jugosidad (Tend) en las muestras tratadas con APH, probablemente debido a una mayor generación de saliva a lo largo del tiempo producida por ese aumento en la dureza. Habría que destacar que estas modificaciones temporales en la percepción de la textura, solamente se pueden percibir gracias al empleo de técnicas dinámicas de evaluación sensorial tipo TI.

Respecto a los resultados derivados de la percepción sensorial del olor, las APH no mostraron un efecto claro. En los loncheados tras un mesrefrigerados, las puntuaciones otorgadas a la intensidad general de olor disminuyeron, mientras que, en el caso del olor a rancio aumentaron. Por el contrario, en los loncheados evaluados tras 4 meses refrigerados, el tratamiento solamente afectó a la percepción del olor a curado, disminuyendo sus puntuaciones. No obstante, las APH no mostraron un efecto significativo sobre las concentraciones de la mayoría de los aldehídos estudiados en esa etapa del almacenamiento, Según Tressl y cols., (1985) los aldehídos derivados de la oxidación de lípidos debido a su bajo umbral de olfacción constituyen un grupo importante de compuestos aromáticos. Por lo tanto, la magnitud de ambos procesos oxidativos podría haber influido en el olor

percibido, así como, a la evolución de algunos de estos aldehídos derivados de la oxidación de lípidos a lo largo del período de almacenamiento (4 meses). En armonía con los resultados anteriormente descritos en relación a influencia del contenido en GIM sobre la percepción del olor tras 4 meses de almacenamiento (Apartado 7.1.3).

Sin embargo, en relación a la percepción del flavor, aunque la metodología aplicada en ambos estudios fue diferente, un ACD para los loncheados procedentes del primer estudio (*Capítulo V*), y la técnica TI en los loncheados que constituyen el segundo estudio (*Capítulo VII*), los resultados revelaron de manera general un aumento en la intensidad y persistencia de los atributos del flavor, tales como, la intensidad general, el sabor salado, el sabor amargo y el flavor a curado. Ambos estudios evidenciaron una clara influencia de las APH sobre la percepción del flavor, mostrando un incremento generalizado en la percepción de los diferentes atributos evaluados mediante una u otra técnica sensorial. De acuerdo con Arnau y cols., (1987) las altas presiones en jamones curados pueden favorecer la movilización del ion  $\text{Na}^+$ , lo cual, explicaría los resultados obtenidos de la percepción del sabor salado. En relación al resto de atributos, la aceleración de la oxidación de lípidos y la formación de volátiles derivados de éstos, como resultado del tratamiento con APH, estaría probablemente relacionado con un incremento en las intensidades de los atributos relacionados con el flavor. En este sentido, se detectaron correlaciones positivas entre los atributos del flavor y las concentraciones de hexanal y de AAS y GGS (*Capítulo V*). Aunque el impacto de la oxidación de proteínas sobre el flavor es escasamente conocido, al igual que en la oxidación de lípidos, una gran variedad de compuestos derivados de la oxidación de proteínas pueden intervenir en el flavor de los productos cárnicos, como se ha descrito en lomo curado (Ventanas y cols., 2007). Un estudio previo llevado a cabo por Armenteros y cols., (2009) detectó que en los productos cárnicos curados los niveles de los semialdehídos AAS y GGS son más elevados. Más recientemente, Estévez y cols., (2011) observaron la implicación de ambos carbonilos en la formación de aldehídos de Strecker. De acuerdo con estos autores, es posible que ambos semialdehídos constituyan una importante fuente de estos compuestos que contribuyen al flavor, particularmente, en los productos sometidos a un proceso de curación.

En base a los resultados observados en los diferentes estudios llevados a cabo, observamos que las APH limitan la estabilidad oxidativa y modifican la calidad sensorial de los loncheados envasados a vacío.

En relación a las repercusiones que las APH tienen sobre la estabilidad oxidativa, son a su vez, condicionadas por el contenido en GIM y en proteínas. Asimismo, un almacenamiento en oscuridad o envasado en películas filtro a la luz UV, permitirían limitar las repercusiones que las APH tienen sobre la estabilidad oxidativa de lípidos y proteínas, preservando la calidad del jamón tras el tratamiento durante un tiempo más prolongado. Por lo tanto, éstas serían las condiciones idóneas para una mejor conservación de la calidad de loncheados envasados a vacío tras el tratamiento con APH.

### *7.3.3 Influencia del tiempo de almacenamiento.*

La aplicación de temperaturas bajas, tanto de refrigeración como de congelación, permite una prolongación de la vida útil de muchos alimentos durante largos períodos de tiempo. En la presente Tesis Doctoral para evaluar los cambios que puede ocasionar el tiempo de almacenamiento sobre la calidad del jamón Ibérico loncheado envasado a vacío, se establecieron tres períodos de almacenamiento a una temperatura de 2 °C: 0, 30 y 120 días.

El tiempo de almacenamiento comprometió la estabilidad oxidativa y además, en función de las características o tratamientos aplicados a los loncheados, el efecto ejercido por el tiempo de almacenamiento sufrió variaciones. En este sentido, aunque el efecto principal del tiempo de almacenamiento sobre los valores de TBARS fue significativo ( $p < 0.05$ ), dicho efecto fue especialmente marcado en las muestras tratadas con APH o en aquéllas que presentaban un mayor contenido en GIM. Aunque al inicio del período de almacenamiento (0 días), observamos que los loncheados no tratados con APH presentaban niveles más elevados de TBARS, y de forma similar, los lotes con menor contenido en GIM presentaron mayores niveles de TBARS al comienzo (0 días). Sin embargo, tras 120 días de almacenamiento los loncheados con un alto contenido en GIM y sometidos a las APH (HHPHip), presentaron los valores más elevados de TBARS. Por el contrario, los loncheados con un bajo contenido en GIM y no tratados con APH (CFIank), en

cambio, experimentaron un descenso en los valores de TBARS a lo largo del periodo de almacenamiento, probablemente como consecuencia de la participación del MDA en otras reacciones (Shahidi, 1992). Del mismo modo que en el TBARS, los valores medidos de hexanal a lo largo del periodo de almacenamiento también disminuyeron, lo que sugiere igualmente la posible participación de este aldehído en otras reacciones. Por otra parte, el tiempo de almacenamiento mostró un efecto significativo sobre las áreas cromatográficas de la mayoría de los compuestos volátiles estudiados. En el caso de los aldehídos de Strecker, principalmente en el 3-metilbutanal, se observó un incremento en las áreas cromatográficas a los 30 días, disminuyendo posteriormente a los 120 días de almacenamiento. En relación a los aldehídos derivados de la oxidación lipídica, se observa una tendencia general a aumentar tras los 120 días de almacenamiento. No obstante, algunos de ellos como, el nonanal, el octanal y el alcohol 1-octen-3-ol, tras un descenso durante los primeros 30 días de almacenamiento, sus áreas cromatográficas experimentaron un incremento, detectando al final del almacenamiento concentraciones superiores con respecto al inicio. La posible participación de determinados compuestos derivados de la oxidación lipídica en el desarrollo de otro tipo de reacciones como las degradaciones de Strecker, puede explicar el descenso en los las áreas cromatográficas detectados en volátiles derivados de la oxidación lipídica, y el incremento en las áreas detectadas para el 3-metilbutanal a los 30 días de refrigeración de los loncheados.

En relación a la determinación de los carbonilos AAS y GGS derivados de la oxidación de proteínas, el tiempo de almacenamiento tuvo un efecto significativo sobre el carbonilo AAS en todos los lotes loncheados con mayor contenido en GIM (Hip). De manera general, desde el comienzo hasta el final del almacenamiento se detectó un descenso en el carbonilo AAS, principalmente durante los primeros 30 días. Por el contrario, el tiempo de almacenamiento no mostró un efecto significativo sobre los niveles del carbonilo GGS. En estos resultados al igual que anteriores estudios (Estévez y cols., 2009; Armenteros y cols., 2009), detectamos una mayor inestabilidad del compuesto AAS. Lo que indica que durante el proceso de almacenamiento de los loncheados de jamón el carbonilo AAS podría haber intervenido en otras reacciones.

De los resultados derivados tanto de la oxidación de lípidos como de la oxidación de proteínas, se puede concluir que el jamón Ibérico loncheado envasado a vacío es un producto muy estable, por lo que, se puede someter a un período prolongado de almacenamiento en oscuridad sin una gran repercusión sobre su estabilidad oxidativa. No obstante, las características del jamón como es su contenido en GIM, así como, el tratamiento con APH, juegan un papel primordial en las repercusiones que el almacenamiento pueda tener sobre su calidad.

El color instrumental (CIE L\*, a\*, b\*) medido sobre la superficie del magro y de la grasa de cobertura de los loncheados de jamón, se vio influenciado de forma significativa por el tiempo de almacenamiento. Durante los primeros 30 días de almacenamiento se observó un aumento en todos los parámetros de color evaluados (luminosidad: L\*, color rojo: a\* y color amarillo: b\*). Sin embargo, de manera general, al comparar los resultados obtenidos a 0 días y 120 días de almacenamiento, la luminosidad del magro disminuyó de forma significativa (L\*;  $p < 0.05$ ). Por el contrario en el resto de parámetros medidos, aunque a partir del primer mes de almacenamiento se observase un descenso, el color rojo (a\*) y el color amarillo (b\*) incrementaron durante el almacenamiento de 0 a 120 días ( $p < 0.001$ ). En lo que se refiere a la grasa de cobertura, tanto el parámetro L\* como el parámetro b\*, aumentaron de forma progresiva a lo largo del período de refrigeración en todos los lotes planteados ( $p < 0.001$ ). Sin embargo, el parámetro a\* aumentó sus valores durante el primer mes de almacenamiento, disminuyendo posteriormente en todos los lotes con un mayor contenido en GIM, observando finalmente en este parámetro, un descenso general desde el comienzo hasta el final del almacenamiento en estos lotes ( $p < 0.001$ ). El efecto significativo del tiempo de almacenamiento sobre la oxidación lipídica podría explicar el aumento del parámetro b\*, el cual, además fue más elevado en las muestras con un mayor contenido en GIM. Asimismo, este incremento en la intensidad del color amarillo en la grasa de cobertura tras 120 días de almacenamiento, coincide con los resultados de la evaluación sensorial del color de la grasa realizada en estas mismas muestras, y descrito en el *capítulo VII*. Autores como García-Esteban y cols., (2004) también detectaron un incremento del parámetro b\* tras tres semanas de almacenamiento en jamón envasado a vacío, lo que relacionaron con un

incremento en la intensidad de los procesos oxidativos que tienen lugar durante el almacenamiento, y que por tanto, podrían incrementar la intensidad del color amarillo. Por otro lado, cualquier cambio experimentado por las proteínas, como coagulación o desnaturalización, podría tener repercusiones sobre la reflectancia/absorbancia de la luz (Mor-Mur y Yuste, 2003), afectando de este modo a la luminosidad del magro, y explicando el descenso observado tras 120 días de almacenamiento en el parámetro L\*. Igualmente como se ha comentado anteriormente (Apartado 7.3.1), la oxidación de proteínas ha sido relacionada con descensos en el parámetro a\*. En la presente Tesis Doctoral, la estabilidad encontrada en los resultados obtenidos de la oxidación de proteínas, podría haber contribuido a limitar el descenso en los valores del parámetro a\* a lo largo de esos 120 días de almacenamiento.

#### *7.3.4 Influencia de la temperatura de consumo.*

Entre los factores estudiados que determinan la calidad sensorial de un producto se encuentra la temperatura de consumo. Dicha temperatura modifica la aceptabilidad de un producto afectando la percepción del olor y el flavor (Ryynänen y cols., 2001; Ventanas y cols., 2010), siendo este último, uno de los atributos sensoriales que más influencia tienen sobre la aceptabilidad del jamón Ibérico (Ruiz y cols., 2002). En este sentido, hay que destacar que este es el primer estudio encaminado a evaluar cómo la temperatura de consumo (7 °C, 16 °C y 20 °C) del jamón Ibérico repercute en la calidad sensorial del mismo. Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral utilizando la técnica de ACD muestran que un atemperado previo de las lonchas de jamón Ibérico, a 16 °C, y aún más a 20 °C, potencian de forma significativa la intensidad de percepción de los atributos sensoriales relacionados con el aspecto y la textura de la grasa de cobertura (brillo, intensidad de color, fluidez y dureza), y el aspecto del magro (veteado y brillo), así como, las percepciones olfativas antes de introducir el producto en la boca (intensidad de olor, olor a rancio y a curado). Fenómenos relacionados con modificaciones de los lípidos por la temperatura, como la proporción sólido/líquido, la cual disminuye con la temperatura (Relkin y cols., 2004; Niños y cols., 2010), explicaría los cambios observados en la grasa de cobertura en relación al aspecto, con un aumento en

el brillo, y a la textura táctil, con un aumento en la fluidez y un descenso en la dureza. Además, estas modificaciones de las características físicas de la grasa con la temperatura, podrían explicar igualmente los cambios encontrados en el magro del jamón en relación a su aspecto y al olor, con un aumento en el brillo, en el veteado, y en el olor percibido. Este aumento detectado en la fluidez de la grasa implicaría una mayor liberación de compuestos volátiles, que sumado a un incremento en el coeficiente de partición de los mismos (Ventanas y cols., 2010), explicarían los resultados derivados de la percepción del olor.

El efecto de la temperatura de consumo sobre la percepción dinámica del flavor y textura evaluada mediante la técnica TI, no fue tan marcado como los cambios observados en la apariencia, el olor y la textura táctil evaluados con la técnica de ACD. Según Engelen y cols., (2003) cualquier cambio en las propiedades físicas de un producto semi-sólido influirían en la textura percibida. Sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos tras la evaluación sensorial mediante TI, los cambios sufridos por la grasa en un producto como el jamón curado no habrían sido suficientes como para generar cambios en la percepción de la textura, al observarse únicamente un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre la persistencia de la dureza (Tend), con una interacción GIM\*Tª significativa ( $p < 0.01$ ). No obstante, estos resultados derivados de la percepción del atributo dureza (aumento del tiempo de percepción con la temperatura en las muestras de alto contenido en grasa -BF) reflejaron que diferencias en la estructura del músculo (tipo de fibra y proceso de deshidratación) podrían condicionar la dureza percibida, como anteriormente se ha discutido (Apartado 7.1.3).

En lo referente a los resultados derivados de la evaluación dinámica de los atributos del flavor, únicamente parámetros como la persistencia del sabor salado (Tend) y el área (Area) del flavor general, presentaron cambios significativos ( $p < 0.05$ ) en función de la temperatura de consumo. Engelen y cols., (2003) describieron que la grasa fundida podría ser más propensa que la grasa sólida a dejar un residuo graso en la boca tras la deglución. Por lo tanto, la percepción del sabor salado podría haberse visto influenciada por una menor solubilidad de la sal con la saliva, como consecuencia de una mayor presencia de residuo graso en las muestras que presentaran una grasa más fluida por la mayor temperatura de consumo. Por lo tanto, las diferencias en las



características de la grasa, previamente comentadas y observadas en los resultados obtenidos con la técnica ACD en los loncheados servidos a 20 °C, podrían haber originado una mayor formación de dicho residuo graso en la boca, y en consecuencia, principalmente en las muestras con una mayor contenido en GIM (BF), una menor persistencia del sabor salado en comparación con las muestras servidas a 7 °C y 16 °C. En relación al resto de atributos, igualmente que en la percepción del olor, un aumento en la fluidez de la matriz junto con un aumento en la volatilidad de los compuestos volátiles, explicarían el aumento en la intensidad general del flavor (Area;  $p < 0.05$ ), así como, la tendencia observada de un aumento en la duración de la intensidad percibida (DurPI;  $p > 0.05$ ) y de la persistencia del resto de atributos evaluados a medida que la temperatura de consumo se incrementaba (Tend;  $p > 0.05$ ). Este efecto detectado sobre la intensidad general del flavor, fue más evidente en las muestras con un mayor contenido en GIM (BF), como resultado del mayor % de grasa fundida esperado en estas muestras y de una menor retención de los compuestos volátiles responsables del flavor, como consecuencia del aumento de la fluidez de la grasa con la temperatura.

A diferencia de los resultados derivados de la percepción del olor ( $p < 0.05$ ), la intervención de otros factores durante el consumo de la muestra, como la temperatura oral, podría haber mitigado los efectos esperados en la percepción del flavor, como consecuencia de un posible equilibrio entre la temperatura de los loncheados y la temperatura oral. Estos resultados coinciden con los obtenidos en la evaluación sensorial dinámica mediante la técnica de TI de los sistemas modelo elaborados con diferente composición grasa (Apartado 7.2.5). Dichos resultados reflejaron un equilibrio entre la temperatura de consumo de la muestra (~ 21 °C) y la temperatura oral (37 °C).

Por lo tanto, podemos concluir que el efecto de la temperatura fue un factor predominante y determinante en la liberación de los compuestos volátiles responsables del olor y el flavor de los loncheados de jamón durante el consumo de este producto. Además del efecto de la temperatura para explicar las diferencias observadas en la evaluación del olor y el flavor, se debe considerar el efecto de la textura y microestructura de la matriz sobre la liberación de compuestos volátiles, previamente evaluada por diversos trabajos (Voilley y cols., 2002; De Roos, 2003).

El empleo de una técnica dinámica sensorial, como el TI, permitió observar que la temperatura de consumo de las muestras de jamón repercuten en la percepción temporal del flavor durante los momentos iniciales de consumo del producto, hasta que la temperatura del producto se iguala a la temperatura oral, y en consecuencia, las diferencias en la temperatura de los loncheados desaparecen. Esta información únicamente puede obtenerse utilizando técnicas dinámicas de evaluación sensorial, y en consecuencia, aportan información complementaria a la obtenida mediante las técnicas estáticas como el ACD, empleada igualmente en este estudio.

En general, los resultados derivados de este estudio pusieron de manifiesto la importancia de un atemperado previo al consumo del jamón Ibérico loncheado para la optimización de parámetros relevantes en la calidad sensorial del mismo, y por lo tanto, que presente sus atributos característicos en el momento del consumo. Siendo, de entre las temperaturas empleadas en el presente estudio la temperatura de consumo de 20 °C, la temperatura que consigue una mayor optimización de dichas características consideradas relevantes, entre las que destacan un mayor brillo, una grasa más fluida, una mayor intensidad de olor, un sabor salado menos persistente, y una potenciación del flavor.

BIBLIOGRAFÍA



- Andrés, A. I., Adamsen, C. E., Møller, J. K. S., & Skibsted, L. H. (2004). High pressure treatment of dry-cured Iberian ham. Effect on radical formation, lipid oxidation and colour. *European Food Research Technology*, 219, 205–210.
- Andrés, A. I., Adamsen, C. E., Møller, J. K. S., Ruiz, J., & Skibsted, L. H. (2006). High pressure treatment of dry-cured Iberian ham. Effect on colour and oxidative stability during chill storage packed in modified atmosphere. *European Food Research Technology*, 222, 486–491.
- Armenteros, M., Heinonen, M., Ollilainen, V., Toldrá, F., & Estévez, M. (2009). Analysis of protein carbonyls in meat products by using the DNPH method, fluorescence spectroscopy and liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS). *Meat Science*, 83, 104–112.
- Arnau, J., Hugas, M., Monfort, J. M., (1987). Jamón curado: Aspectos técnicos, *Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries*. 1st d. Barcelona.
- Bourne, M. C. (1978). Texture profile analysis. *Food Technology*, 32, 62–66.
- Boylston, T. D., Morgan, S. A., Johnson, K. A., Wright, R. W., Busboom, J. R., & Reeves, J. J. (1996). Volatile lipid oxidation products of Wagyu and domestic breeds of beef. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1091-1095.
- Brauss, M. S., Linforth, R. S., Cayeux, I., Harvey, B., & Taylor, A. J. (1999). Altering the fat content affects flavour release in a model yogurt system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2055–2059.
- Carlez, A., Veciana-Nogues, T., & Cheftel, J. C. (1995). Changes in colour and myoglobin of minced beef meat due to high pressure processing. *LWT-Food Science and Technology*, 28(5), 528–538.
- Carrapiso, A. I. (2007). Effect of fat content on flavour release from sausages. *Food Chemistry*, 103, 396-403.
- Cava, R., Ruiz, J., Ventanas, J., & Antequera, T. (1999). Oxidative and lipolytic changes during ripening of Iberian hams as affected by feeding regime: extensive feeding and alpha-tocopheryl acetate supplementation. *Meat Science*, 52, 165-172.
- Cava, R., Ventanas, J., Ruiz, J., Andrés, A.I. & Antequera, T. (2000). Sensory characteristics of Iberian ham: Influence of rearing system and muscle location. *Food Science and Technology International*, 6(3), 235-242.
- Cava, R., Ladero, L., González, S., Carrasco, A., & Ramírez, M. R. (2009). Effect of pressure and holding time on colour, protein and lipid oxidation of sliced dry-cured Iberian ham and loin during refrigerated storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 76–81.
- Charles, M., Rosselin, V., Beck, L., Sauvageot, F., & Guichard, E. (2000). Flavor release from salad dressings: Sensory and physicochemical approaches in relation with the structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1810-1816.
- Cheftel, J. C., & Culioli, J. (1997). Effects of high pressure on meat: A review. *Meat Science*, 46, 211–236.
- Chevance, F. F. V., & Farmer, L. J. (1999). Release of volatile odor compounds from full-fat and reduced-fat frankfurters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 5161–5168.
- Chevance, F. F., Farmer, L. J., Desmond, E. M., Novelli, E., Troy, D. J., & Chizzolini, R. (2000). Effect of some fat replacers on the release of volatile aroma compounds from low-fat meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3476–3484.

- Clariana, M., Guerrero, L., Sárraga, C., & García-Regueiro, J. A. (2012). Effects of high pressure application (400 and 900 MPa) and refrigerated storage time on the oxidative stability of sliced skin vacuum packed dry-cured ham. *Meat Science*, 90, 323-329.
- Corona, E. (2012). Caracterización de la calidad de productos cárnicos crudo-curados mediante ultrasonidos de señal. *PhD Tesis*. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Crehan, C. M., Hughes, E., Troy, D. J., & Buckley, D. J. (2000). Effects of fat level and maltodextrin on the functional properties of frankfurters formulated with 5, 12 and 30% fat. *Meat Science*, 55, 463-469.
- Daza, A., Rey, A. I., Ruiz, J., & López-Bote, C. J. (2005). Effects of feeding in free-range conditions or in confinement with different dietary MUFA/PUFA ratio and  $\alpha$ -tocopheryl acetate, on antioxidants accumulation and oxidative stability in Iberian pigs. *Meat Science*, 69, 151-163.
- De Loubens, C., Saint-Eve, A., Délérís, I., Panouillé, M., Doyennette, M., Tréléa, I.C., et al. (2011). Mechanistic Model To Understand in Vivo Salt Release and Perception during the Consumption of Dairy Gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2534-2542.
- De Roos, K. B. (1997). How lipids influence food flavour. The chemistry of flavour interactions. *Food Technology*, 51(1), 60-62.
- De Roos, K. B. (2003). Effect of texture and microstructure on flavour retention and release. *International Dairy Journal*, 13, 593-605.
- Dransfield, E. (1994). Tenderness of meat, poultry and fish. En A. M. Pearson, & T. R. Dutson (eds.). *Quality attributes and their measurement in meat, poultry and fish products* (pp. 289-315). London: Blackie Academic & Professional.
- Dubois, C., Sergent, M., Voilley, A. (1996). Flavoring of complex media: a model cheese example. En R. Mc Gorrin, & J. Leland, (eds.), *Flavor-food Interactions* (pp. 217-226). ACS: American Chemical Society, Washington DC.
- Dumay, E., Lambert, C., Funtenberger, S., & Cheftel, C. J. (1996). Effects of High Pressure on the Physico-chemical Characteristics of Dairy Creams and Model Oil/Water Emulsions. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 29, 606.
- Engelen, L., Wijk, R. A., Prinz, J. F., Janseen, A.M., Weenen, H., & Bosman, F. (2003). The effect of oral and product temperature on the perception of flavor and texture attributes of semi-solids. *Appetite*, 41, 273-281.
- Estévez, M., & Cava, R. (2004). Lipid and protein oxidation, release of iron from heme molecule and colour deterioration during refrigerated storage of liver pâté. *Meat Science*, 68, 551-558.
- Estévez, M., Ventanas, V., & Cava, R. (2005a). Physicochemical properties and oxidative stability of liver pâté as affected by fat content. *Food Chemistry*, 92, 449-457.
- Estévez, M., Ventanas, V., & Cava, R. (2005b). Protein oxidation in frankfurters with increasing levels of added rosemary essential oil: Effect on colour and texture deterioration. *Journal of Food Science*, 70, 427-432.
- Estévez, M., Ventanas, V., & Cava, R. (2006). Effect of natural and synthetic antioxidants on protein oxidation and colour and texture changes in refrigerated stored porcine liver pâté. *Meat Science*, 74, 396-403.

- Estévez, M., Ventanas, S., & Cava, R. (2007). Oxidation of lipids and proteins in frankfurters with different fatty acid compositions and tocopherol and phenolic contents. *Food Chemistry*, 100, 55-63.
- Estévez, M., Killy, P., Puolanne, E., Kivikari, R., & Heinonen, M. (2008a). Fluorescence spectroscopy as a novel approach for the assessment of myofibrillar protein oxidation in oil-in-water emulsions. *Meat Science*, 80, 1290–1296.
- Estévez, M., Morcuende, D., & Ventanas, S. (2008b). Determination of oxidation. En L. M. L. Mollet, & F. Toldrá (eds.). *Handbook of processed meat and poultry analysis* (pp. 141–162). CRC Press in Boca Raton FL, USA.
- Estévez, M., Ollilainen, V., & Heinonen, M. (2009). Analysis of protein oxidation markers  $\alpha$ -amino adipic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes in food proteins using liquid chromatography (LC)-electrospray ionization (ESI)-multistage tandem mass spectrometry (MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 3901–3910.
- Estévez, M., & Heinonen, M. (2010). Effect of phenolic compounds on the formation of  $\alpha$ -amino adipic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes from myofibrillar proteins oxidized by copper, iron and myoglobin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4448–4455.
- Estévez, M., Ventanas, S., & Heinonen, M. (2011). Formation of Strecker aldehydes between protein carbonyls– $\alpha$ -amino adipic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes—and leucine and isoleucine. *Food Chemistry*, 128, 1051–1057.
- Gandemer, G (2002). Lipids in muscles and adipose tissues, changes during processing and sensory properties of meat products. *Meat Science*, 62, 309-321.
- Ganhão, R., Morcuende, D., & Estévez, M. (2010a). Tryptophan depletion and formation of  $\alpha$ -amino adipic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes in porcine burger patties with added phenolic-rich fruit extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3541–3548.
- Ganhão, R., Morcuende, D., & Estévez, M. (2010b). Protein oxidation in emulsified cooked burger patties with added fruit extracts: Influence on colour and texture deterioration during chill storage. *Meat Science*, 85, 402-409.
- García-Esteban, M., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2004). Comparison of modified atmosphere packaging and vacuum packaging for long period storage of dry-cured ham: effects on colour, texture and microbiological quality. *Meat Science*, 67, 57-63.
- Guichard, E., Tromelin, A., Juteau, A., Rega, B., & Roudnitzky, N. (2002). Physical and chemical interactions in several flavour compounds/food matrix systems. En *Flavour Research at the dawn of the Twenty-first Century* (pp. 15-20). 10th Weurman flavour research symposium; Le Quéré, J. L., Etiévant, P. X., Eds.; Lavoisier: Paris, Beaune, France.
- Harvey, B., Druaux, C., & Voilley, A. (1995). Effect of protein on the retention and transfer of aroma compounds at the lipid-water interface. En Dickinson, E., & Lorient, D., (eds.). *Food Macromolecules and Colloids* (pp 154-163). The Royal Society of Chemistry, Cambridge, U.K.
- Hort, J., & Cook, D. (2007). Formulating low-fat food: The challenge of retaining flavour quality. En A. Taylor & J. Hort (eds.). *Modifying flavour in food* (pp. 131–143). Woodhead Publishing in Food Science, Technology and Nutrition: Cambridge, England.
- Jiménez-Colmenero, F. (2000) Relevant factors in strategies for fat reduction in meat products. *Trends in Food Science & Technology* 11, 56–66.

- Levine, R. L., Berlett, B. S., Moskovitz, J., Mosoni, L., & Stadtman, E. R. (1999). Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mechanisms of ageing and development*, 107, 323–332.
- Linforth, R., Martin, F., Carey, M., Davidson, J., & Taylor, A. J. (2002) Retronasal Transport of Aroma Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1111-1117.
- Liu, M. N., Huffman, D. L., & Egbert, W. R. (1991). Replacement of beef fat with partially hydrogenated plant oil in lean ground beef patties. *Journal of Food Science*, 56, 861–862.
- Love, J. D., & Pearson, A. M. (1971). Lipid oxidation in meat and meat products - a review. *Journal of the American Oil Chemists` Society*, 48, 547-549.
- Martín, L., Córdoba, J. J., Antequera, T., Timón, M. L., & Ventanas, J. (1998). Effects of salt and temperature on proteolysis during ripening of Iberian ham. *Meat Science*, 49, 145–153
- Meynier, A., Garillon, A., Lethuaut, L., & Genot, C. (2003). Partition of five aroma compounds between air and skim milk, anhydrous milk fat or full fat cream. *Lait*, 83, 223-235.
- Maier, H.G., (1975). Binding of volatile aroma substances to nutrients and foodstuffs. En H. Maarse & P.J. Groenen, (eds.). *International symposium on aroma research*, (pp. 143-157). Pudoc: Wageningen, The Netherlands.
- Mor-Mur, M., & Yuste, J. (2003). High pressure processing applied to cooked sausage manufacture: Physical properties and sensory analysis. *Meat Science*, 65, 1187–1191.
- Morrissey, P. A., Sheehy, P. J. A., Galvin, K., Kerry, J. P., & Buckley, D. J. (1998). Lipid stability in meat and meat products. *Meat Science*, 49, S73–S86.
- Niñoles, L., Mulet, A., Ventanas, S., & Benedito, J. (2010). Ultrasonic assessment of the melting behaviour in fat from Iberian dry-cured hams. *Meat Science*, 85, 26-32.
- Rabe, S., Krings, U., & Berger, R. G. (2004). Dynamic flavour release from Miglyol/water emulsions: modelling and validation. *Food Chemistry*, 84, 117-125.
- Relkin, P., Fabre, M., & Guichard, E. (2004). Effect of Fat Nature and Aroma Compound Hydrophobicity on Flavor Release from Complex Food Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6257-6263.
- Rey, A. I., Daza, A., López-Carrasco, C., & López-Bote, C. J. (2006). Feeding Iberian pigs with acorns and grass in either free-range or confinement affects the carcass characteristics and fatty acids and tocopherols accumulation in Longissimus dorsi muscle and backfat. *Meat Science*, 73, 66–74.
- Roberts D. D., Pollien, P., Antille, N., Lindinger, C., & Yeretizian, C. (2003) Comparison of Nosespace, Headspace, and Sensory Intensity Ratings for the Evaluation of Flavor Absorption by Fat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3636-3642.
- Rodríguez-Carpena, J. G., Morcuende, D., & Estévez, M. (2012). Avocado, sunflower and olive oils as replacers of pork back-fat in burger patties: Effect on lipid composition, oxidative stability and quality traits. *Meat Science*, 90, 106-115.
- Roudnitzky, N., Roudaut, G., Guichard, E. (2003). Effect of composition of triglycerides on flavour release: application to commercial fats. En *Chemistry, flavor and texture of lipid containing foods*. ACS Symposium Series: American Chemical Society, Washington DC.



- Ruiz, J., Ventanas, J., Cava, R., Timón, M. L., & García, C. (1998). Sensory characteristics of Iberian ham: influence of processing time and slice location. *Food Research International*, 31, 53-58.
- Ruiz, J., Ventanas, J., Cava, R., Andrés, A., & García, C. (2000). Texture and appearance of dry-cured ham as affected by fat content and fatty acid composition. *Food Research International*, 33, 91-95.
- Ruiz, J., García, C., Muriel, E., Andrés, A. I., & Ventanas, J. (2002). Influence of the sensory characteristics on the acceptability of dry-cured ham. *Meat Science*, 61, 347-354.
- Ryynänen, S., Tuorila, H., & Hyvönen, L. (2001). Perceived temperature effects on microwave heated meals and meal components. *Food Service Technology*, 1, 141-148.
- Scheeder, M. R. L., Casutt, M. M., Roulin, M., Escher, F., Dufey, P. A., & Kreuzer, M. (2001). Fatty acid composition, cooking loss and texture of beef patties from meat of bulls fed different fats. *Meat Science*, 58, 321-328.
- Shahidi, F. (1992). Prevention of lipid oxidation in muscle foods by nitrite and nitrite-free compositions. In A.G. St. Angelo (eds.). *Lipid Oxidation in Food* (pp. 161-182). ACS Symposium Series 222: American Chemical Society, Washington DC.
- Shahidi, F., & Pegg, R. B. (1994). Hexanal as an indicator of meat flavor deterioration. *Journal of Food Lipids*, 1, 177-186.
- Stadtman, E. R., & Levine, R. L. (2000). Protein oxidation. *Annals New York Academy of Sciences*, 899(1), 191-208.
- Teye, G. A., Wood, J. D., Whittington, F. M., Stewart, A., & Sheard, P. R. (2006). Influence of dietary oils and protein level on pork quality 2. Effects on properties of fat and processing characteristics of bacon and frankfurter-style sausages. *Meat Science*, 73, 166-177
- Tressl, R., Bahri, D., & Engel, K.H. (1981). Lipid oxidation in fruits and vegetables. In: R. Teranishi, & H. Barrera-Benitez (eds.). *Quality of selected fruits and vegetables of North America* (pp. 213-231). ACS Symposium Series 31. American Chemical Society, Washington DC.
- Toldrá, F. (2004). The role of muscle enzymes in dry-cured meat products with different drying conditions. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 164-168.
- Utrera, M., Armenteros, M., Ventanas, S., Solano, F., & Estévez, M. (2012). Pre-freezing raw hams affects quality traits in cooked hams: Potential influence of protein oxidation. *Meat Science*, 92, 596-603.
- van Ruth, S. M., de Vries, G., Geary M., & Giannouli, P. (2002). Influence of composition and structure of oil-in-water emulsions on retention of aroma compounds. *Journal of the Science of food and Agriculture*, 82, 1028-1035.
- Ventanas, J., Córdoba, J. J., Antequera, T., García, C., López-Bote, C., Asensio, M. A. (1992). Hydrolysis and Maillard reactions during ripening of Iberian cured ham. *Journal of Food Science*, 57, 813-815.
- Ventanas, S., Ventanas, J., Tovar, J., García, C., & Estévez, M. (2007). Extensive feeding versus oleic acid and tocopherol enriched mixed diets for the production of Iberian dry-cured hams: Effect on chemical composition, oxidative status and sensory traits. *Meat Science*, 77, 246-256.

- Ventanas, S., Estévez, M., Andrés, A. I., & Ruiz, J. (2008). Analysis of volatile compounds of Iberian dry-cured loins with different intramuscular fat contents using SPME–DED. *Meat Science*, 79, 172-180.
- Ventanas, S., Mustonen, S., Puolanne, E., & Tuorila, H. (2010). Odour and flavour perception in flavoured model systems: Influence of sodium chloride, umami compounds and serving temperature. *Food Quality and Preference*, 21, 453-462.
- Vingerhoeds, M. H., De Wijk, R. A., Zoet, F. D., Nixdorf, R. R., & Van Aken, G. A. (2008). How emulsion composition and structure affect sensory perception of low-viscosity model emulsions. *Food Hydrocolloid*. 22, 631-146.
- Voilley, A., Druaux, C., Goldschmidt, B., Issanchou, S., & Molin, P. (2002). Flavour release from model cheese. *ACS National Meeting*, August 18.
- Weel, K. G. C., Boelrijk, A. E. M., Alting, A. C., vanMil, P. J. J. M., Burger, J. J., Gruppen, H., Vorigen, A. G. J., & Smit, G. (2002). Flavor release and perception of flavored whey protein gels: perception is determined by texture rather than by release. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5149–5155.
- Youssef, M. K., & Barbut, S. (2009). Effects of protein level and fat/oil on emulsion stability, texture, microstructure and color of meat batters. *Meat Science*, 82, 229-233.

# CONCLUSIONES



## 7. CONCLUSIONES

1. La aplicación por primera vez de técnicas sensoriales dinámicas tipo tiempo-intensidad en sistemas modelo cárnicos y en jamón curado loncheado han aportado información relativa a la percepción de la textura y el flavor a lo largo del tiempo de consumo del producto. Esta información era desconocida en este tipo de productos ya que hasta el momento era obtenida mediante técnicas sensoriales estáticas. De esta forma, se ha podido tener un conocimiento más amplio y realista sobre la percepción de la calidad sensorial de estos productos por los consumidores.

2. En los sistemas modelo cárnicos aromatizados con compuestos volátiles olor-activos, modificaciones en el contenido en grasa añadida, un 4 % y un 15 %, no repercutieron de forma significativa sobre la liberación/retención de los compuestos volátiles evaluadas por técnicas instrumentales. Este efecto de la grasa podría haber quedado enmascarado por el efecto de otros factores relacionados con modificaciones de la estructura de la matriz o pérdidas de los compuestos volátiles durante el proceso de maduración. En este sentido, al variar el tipo de grasa añadida, sin variar su contenido, el perfil de ácidos grasos determinó un efecto marcado sobre la dinámica de liberación/retención de estos compuestos, aumentando esta liberación con el grado de insaturación de la grasa empleada.

3. Tanto el perfil de ácidos grasos como la presencia de sustancias antioxidantes en las grasas añadidas a los sistemas modelo influyeron sobre la intensidad de las reacciones de oxidación lipídica. Sin embargo, las reacciones de oxidación de proteínas estuvieron condicionadas por la presencia de sustancias con actividad antioxidante, y en menor grado por el perfil de ácidos grasos.

4. El contenido en GIM de los jamones Ibéricos loncheados, un 10 % y un 15 %, fue un parámetro determinante de la calidad sensorial en atributos como el brillo, la intensidad del color rojo del magro, y la intensidad de veteado evaluados por ACD, y en la dureza, el sabor salado y la rancidez evaluados por

TI. No obstante, otros parámetros composicionales derivados de la diferente localización anatómica de las muestras pueden ser también decisivos en determinados atributos como la dureza.

5. En los formatos del jamón Ibérico loncheados, en comparación con los bloques intactos, las reacciones de oxidación de lípidos y proteínas se ven favorecidas, y en consecuencia, la calidad sensorial del producto. Resultando particularmente afectados los atributos relacionados con el color y la textura. En relación a los formatos loncheados, la presentación tradicional de lonchas extendidas muestra una mayor estabilidad oxidativa en relación con la presentación con lonchas apiladas durante el almacenamiento del producto a refrigeración.

6. El empleo de altas presiones hidrostáticas (APH) en jamón Ibérico loncheado envasado a vacío se traduce en modificaciones de la calidad sensorial del producto. Con consecuencias positivas como son una mejor apreciación del veteado y un aumento de la intensidad del flavor general, y negativas como son, una coloración más marronácea, un menor brillo, así como, incrementos de la percepción del sabor salado y de la dureza de las muestras.

7. En relación a las dos anteriores conclusiones (6 y 7), se concluye que un loncheado previo potencia los cambios originados por las APH, especialmente en los formatos con las lonchas apiladas. En cambio, la calidad del producto en un formato intacto no se vería especialmente comprometida tras un tratamiento con APH (600 MPa).

8. La calidad sensorial de los loncheados envasados a vacío de jamón Ibérico se mantiene tras 4 meses de almacenamiento refrigerados. Durante el almacenamiento refrigerado (0 - 4 meses) algunas características de los loncheados, como es su contenido en GIM y la aplicación de un tratamiento con APH, influyen de manera evidente sobre la estabilidad oxidativa del producto, y en consecuencia, sobre la calidad del mismo principalmente por la mayor rancidez percibida.

9. Un atemperado a 20 °C de los loncheados de jamón curado previo a su consumo permite potenciar de forma evidente los atributos sensoriales más relevantes relacionados con el aspecto, la textura táctil y olor del producto. En relación al flavor, se consigue potenciar aunque de forma menos marcada la intensidad y persistencia de los atributos relacionados. Por tanto, resultaría de gran interés indicar en el envase del producto una recomendación a los consumidores en relación a la conveniencia de atemperar el producto antes del consumo.

