



centro tecnolóxico da **carne**



Universidade de Vigo
Departamento Ingeniería
Química

EFFECTO DEL TIEMPO DE SALADO SOBRE EL PERFIL DE COMPUESTOS VOLÁTILES Y CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL LACÓN. INFLUENCIA DEL EMPLEO DE LEVADURAS AUTÓCTONAS

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Laura Purriños Pérez

Bajo la dirección de los doctores

Francisco Javier Carballo García
José Manuel Lorenzo Rodríguez
Daniel José Franco Ruíz

Ourense, 2013

Laura Purriños Pérez, Licenciada en Ciencias Químicas por la Universidad de Santiago de Compostela, presenta la Tesis Doctoral titulada *“Efecto del tiempo de salado sobre el perfil de compuestos volátiles y características organolépticas del lacón. Influencia del empleo de levaduras autóctonas”* como uno de los requisitos para optar al grado de Doctor por la Universidad de Vigo.

En Ourense a de de 2013

La Doctoranda

Fdo.: Laura Purriños Pérez

D. Francisco Javier Carballo García, Catedrático del Departamento de Ingeniería Química del Área Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Vigo.

HACE CONSTAR: Que D^a Laura Purriños Pérez, licenciada en Ciencias Químicas, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado “Efecto del tiempo de salado sobre el perfil de compuestos volátiles y características organolépticas del lacón. Influencia del empleo de levaduras autóctonas”, que cumple los requisitos de calidad científica necesarios para optar al grado de Doctor por la Universidad de Vigo.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Ourense, a de de 2013.

Fdo: D. Francisco Javier Carballo García

D. José Manuel Lorenzo Rodríguez, Jefe de Investigación Agroalimentaria del Centro Tecnolóxico da Carne de Galicia.

HACE CONSTAR: Que D^a Laura Purriños Pérez, licenciada en Ciencias Químicas, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado “Efecto del tiempo de salado sobre el perfil de compuestos volátiles y características organolépticas del lacón. Influencia del empleo de levaduras autóctonas” en el Centro Tecnolóxico da Carne de Galicia.

Y considerando que constituye trabajo de tesis, autoriza su presentación en la Universidad de Vigo.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Ourense, a de de 2013.

Fdo: D. José Manuel Lorenzo Rodríguez

D. Daniel José Franco Ruíz, Investigador del Centro Tecnolóxico da Carne de Galicia.

HACE CONSTAR: Que D^a Laura Purriños Pérez, licenciada en Ciencias Químicas, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado “Efecto del tiempo de salado sobre el perfil de compuestos volátiles y características organolépticas del lacón. Influencia del empleo de levaduras autóctonas” en el Centro Tecnolóxico da Carne de Galicia.

Y considerando que constituye trabajo de tesis, autoriza su presentación en la Universidad de Vigo.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Ourense, a de de 2013.

Fdo: D. Daniel José Franco Ruíz

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. LA SAL	3
I.1.1. HISTORIA DE LA SAL	3
I.1.2. FUNCIONES DE LA SAL EN LOS PRODUCTOS CÁRNICOS CURADOS	4
I.1.2.1. Estabilización microbiológica del producto	4
I.1.2.2. Contribución al sabor salado	4
I.1.2.3. Solubilización parcial de las proteínas miofibrilares	5
I.1.2.4. Regulación de la actividad de las enzimas proteolíticas musculares	5
I.1.2.5. Modificación de la capacidad de retención de agua	5
I.1.2.6. Efecto sobre el color	6
I.1.2.7. Acción prooxidante	6
I.1.3. DINÁMICA DE PENETRACIÓN DE LA SAL EN PRODUCTOS CÁRNICOS CURADOS	6
I.1.4. EFECTO DE LA SAL EN LA SALUD	7
I.2. EL LACÓN	9
I.2.1. HISTORIA DEL LACÓN	9
I.2.2. PROCESO TECNOLÓGICO DE ELABORACIÓN DEL LACÓN	10
I.3. COMPUESTOS VOLÁTILES	11
I.3.1. GENERACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES	11
I.3.1.1. Reacciones bioquímicas: proteolisis y lipolisis	12
I.3.1.1.1. <i>Proteolisis</i>	12
I.3.1.1.2. <i>Lipolisis</i>	13
I.3.1.2. Reacciones químicas: oxidación lipídica, reacciones de Maillard y reacciones de Strecker	14
I.3.1.2.1. <i>Oxidación lipídica</i>	14

I.3.1.2.2. <i>Reacciones de Maillard</i>	16
I.3.1.2.3. <i>Reacciones de Strecker</i>	16
I.3.2. FACTORES QUE AFECTAN A LA CALIDAD SENSORIAL DEL LACÓN	19
I.3.3. EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES	20
I.3.3.1. Técnicas de extracción	21
I.3.3.1.1. <i>Extracción con disolventes</i>	21
I.3.3.1.2. <i>Extracción con flúidos supercríticos</i>	22
I.3.3.1.3. <i>Técnica de espacio de cabeza estático</i>	22
I.3.3.1.4. <i>Técnica de espacio de cabeza dinámico</i>	23
I.3.3.1.4. <i>Microextracción en fase sólida</i>	27
I.3.3.1. Técnicas de separación e identificación. Cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS)	29
I.4. ANÁLISIS SENSORIAL	31
I.5. LAS LEVADURAS	34
I.5.1. POBLACIÓN DE LEVADURAS EN PRODUCTOS CÁRNICOS CURADOS	34
I.5.2. CULTIVOS INICIADORES EN LA INDUSTRIA CÁRNICA	35
I.5.3. IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS POR TÉCNICAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	36
I.5.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa	37
I.5.3.2. Métodos basados en el análisis de regiones ribosómicas	39
I.5.3.2.1. <i>Secuenciación de regiones ribosómicas</i>	40
I.5.3.2.2. <i>Análisis de restricción de las regiones ribosómicas</i>	40
I.5.3.3. Análisis de restricción del ADN mitocondrial	40
I.5.3.4. PCR aleatoria o RAPD-PCR	41

II. OBJETIVOS DE ESTA TESIS DOCTORAL	45
III. DISCUSIÓN GENERAL	49
III.1. CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE COMPUESTOS VOLÁTILES DURANTE LA ELABORACIÓN DEL LACÓN	49
III.2. EFECTO DEL TIEMPO DE SALADO SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DEL LACÓN	56
III.3. EFECTO DEL TIEMPO DE SALADO SOBRE LA GENERACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES DURANTE LA ELABORACIÓN DEL LACÓN	60
III.4. EFECTO DEL TIEMPO DE SALADO SOBRE EL RECuento, ESPECIES Y CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE LEVADURAS DURANTE LA ELABORACIÓN DEL LACÓN	63
III.5. INFLUENCIA DE LA INOCULACIÓN DE <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Candida deformans</i> y <i>Candida zeylanoides</i> SOBRE EL PERFIL AROMÁTICO DEL LACÓN	68
IV. CONCLUSIONES	75
V. BIBLIOGRAFÍA	79
VI. PUBLICACIONES	99
VI.1. "Development of Volatile Compounds during the Manufacture of Dry-Cured "Lacón", a Spanish Traditional Meat Product"	101
VI.2. "Influence of salt content and processing time on sensory characteristics of cooked "lacón""	113
VI.3. "Influence of the salting time on volatile compounds during the manufacture of dry-cured pork shoulder "lacón""	123
VI.4. "Study of the counts, species and characteristics of the yeast population during the manufacture of dry-cured "lacón". Effect of salt level"	133
VI.5. "The influence of <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Candida deformans</i> and <i>Candida zeylanoides</i> on the aroma formation of dry-cured "lacón""	143

VII. ANEXOS	153
--------------------	------------

VII.1. INFORMACIÓN Y CRITERIOS DE CALIDAD DE LAS PUBLICACIONES	153
--	-----

I.INTRODUCCIÓN

I.1. LA SAL

I.1.1. HISTORIA DE LA SAL

Desde la antigüedad la sal ha tenido un destacado protagonismo en la historia del hombre, siendo habitual que los autores clásicos hicieran mención a ella. Homero destacó las cualidades del que denominó “el más básico de los minerales”; Platón dijo de ella que era uno de los “primeros componentes de la vida” y Plinio el Viejo, en su Historia Natural, al hablar del papel de la sal en la conservación de los alimentos, manifestó: “los dioses saben que la civilización no es posible sin la sal”.

Debido a que la sal era una necesidad básica del hombre, su posesión ha sido motivo de intercambios comerciales y de conflictos bélicos. Así, en la Antigua Grecia, se intercambiaba sal por esclavos, lo que dio origen a la expresión “no vale un puñado de sal”. Posteriormente, en el Imperio Romano se crearon rutas específicas para el transporte de este preciado producto. Los soldados que cuidaban de la seguridad de estas rutas percibían parte de su paga en bolsitas con sal, lo que se llamaba *Salarium Argentum* (dinero de sal), término del que deriva la palabra salario en castellano.

Conscientes de la importancia de la sal, durante la Edad Media los señores feudales se hicieron con el control de las explotaciones salinas cobrando elevados impuestos por el uso y explotación de la sal, llegando a ser uno de los ingresos más importantes de las arcas reales. El cobro de impuestos sobre la sal ha sido universal, pero donde su aplicación desencadenó importantes consecuencias fue en Francia. Este tributo denominado “la gabelle” fue fijado por Felipe VI de Valois para pagar la Guerra de los Cien Años; cada persona tenía que comprar al año siete libras de sal de las salinas del gobierno a un precio diez veces mayor a su valor real, el cual siempre tenía un alza durante las épocas de crisis, en especial durante los conflictos bélicos. Este impuesto francés provocó numerosos motines y revueltas siendo uno de los desencadenantes de la Revolución Francesa (1789). En el siglo XIX se declaró libre la explotación y venta de sal en toda Europa (en España se liberalizó en 1869), culminando el libre comercio de la misma durante el siglo XX (Laszlo, 2001).

La adición de sal a los alimentos es una técnica que se ha empleado durante siglos para su conservación. Según las primeras referencias históricas disponibles, la cultura

china y egipcia fueron las que primero desarrollaron un proceso de salado garantizando el consumo de alimentos perecederos tales como carne y pescado en épocas de escasez y permitiendo a su vez el desarrollo de mercados por diferentes culturas (Gallart et al., 2005). Posiblemente fueron los romanos los que en mayor medida, industrializaron este proceso de conservación, con factorías repartidas por todo el Mediterráneo dedicadas a las salazones de pescado y de carne y de las que existen aún numerosos vestigios repartidos por diversas ciudades. Este procedimiento tradicional de conservación de la carne ha pervivido hasta nuestros días. Aunque en los últimos años la tecnología empleada en el curado de la carne se ha diversificado enormemente, el ingrediente fundamental e indiscutible sigue siendo la SAL COMÚN.

I.1.2. FUNCIONES DE LA SAL EN LOS PRODUCTOS CÁRNICOS CURADOS

La sal es un ingrediente fundamental en los productos cárnicos curados debido a sus numerosos beneficios tecnológicos. Entre ellos se pueden destacar:

I.1.2.1. Estabilización microbiológica del producto

La sal o cloruro sódico actúa como agente bacteriostático, limitando el crecimiento microbiano debido fundamentalmente a su capacidad para disminuir la actividad de agua (a_w). El cloruro sódico es capaz de ionizarse completamente en soluciones acuosas en los iones Na^+ y Cl^- . Algunas moléculas de agua quedan fijadas alrededor de los iones Na^+ disociados, provocando una reducción en la disponibilidad de la cantidad de agua necesaria para un posible desarrollo bacteriano. Sin embargo, la sal no puede garantizar por sí sola la seguridad microbiológica ya que la estabilización total sólo se puede lograr cuando ha penetrado en los tejidos más profundos una suficiente cantidad de sal. Por lo tanto, el efecto estabilizador del NaCl se encuentra condicionado por la concentración de sal añadida al producto.

I.1.2.2. Contribución al sabor salado

La sal confiere a los productos cárnicos un ligero sabor salado y potencia el desarrollo de su sabor característico. Existe cierta controversia sobre si el sabor salado se produce por estimulación del ión Cl^- o del Na^+ sobre las papilas gustativas de la lengua. En cualquier caso, el sabor salado también se ve influido por la presencia de compuestos con

sabor salado (aminoácidos), potenciadores del sabor (aminoácidos y nucleótidos) y la proporción de grasa intramuscular (a más grasa, menor percepción del sabor salado).

I.1.2.3. Solubilización parcial de las proteínas miofibrilares

La penetración de la solución salina en la masa muscular provoca un incremento de la fuerza iónica del medio, aumentando la solubilidad de las proteínas musculares. Las proteínas sarcoplasmáticas son solubles en soluciones con baja fuerza iónica por lo que se encuentran solubilizadas en el sarcoplasma sin necesidad de adición de sal. Las miofibrilares son solubles en soluciones de una fuerza iónica intermedia-alta, siendo las que fundamentalmente van a poder solubilizarse como consecuencia de la adición de sal.

Una vez solubilizadas, éstas van a sufrir procesos de desnaturalización parcial y reorganización que darán lugar a un gel proteico, que va a permitir una mejor ligazón de la masa muscular, mejorando la terneza y la jugosidad del producto (Ruusunen y Puolanne, 2005; Desmond, 2006). Los principales agentes causantes de estos procesos de desnaturalización son la sal y la temperatura (Antequera y Martín, 2001).

I.1.2.4. Regulación de la actividad de las enzimas proteolíticas musculares

El sistema enzimático muscular implicado en la proteólisis es bastante complejo y está dividido en dos grandes grupos de enzimas: las endoproteasas y las exopeptidasas. Estas enzimas juegan un papel importante ya que originan una serie de productos (péptidos y aminoácidos libres) que están implicados en el desarrollo del aroma y del flavor del producto final (Toldrá, 1998). La actividad de algunas de estas enzimas está influida por el contenido salino, de tal manera que elevadas concentraciones de sal inhiben en gran medida su actividad mientras que bajas concentraciones provocan el efecto contrario. Una elevada actividad tiene consecuencias negativas en la textura de los productos cárnicos curados. Por tanto la concentración de sal va a modular en gran medida la actividad de estas enzimas a lo largo de la maduración de estos productos (Toldrá y Flores, 1998).

I.1.2.5. Modificador de la capacidad de retención de agua

La presencia de cloruro sódico en la carne aumenta la capacidad de retención de agua de la misma. La mayoría del agua presente en la carne se encuentra retenida por fenómenos de capilaridad entre los miofilamentos de las fibras musculares formados fundamentalmente por la actina y miosina. El anión Cl^- se une a los grupos cargados

positivamente de las proteínas, provocando una disminución del punto isoelectrico. Como consecuencia se produce un aumento del número neto de cargas negativas en las proteínas, y por fenómenos de repulsión, un aumento del espacio entre las proteínas, con el consiguiente incremento de la capacidad de retención de agua (Andrés y Ruíz, 2001).

I.1.2.6. Efecto sobre el color

Los valores de índice de rojo (a^*) aumentan con el incremento del contenido de sal, debido al aumento que experimenta la capacidad de retención de agua, reduciendo el agua en la superficie lo que incrementa la concentración de mioglobina (Carrapiso y García, 2005). El color típico de las carnes curadas se asocia al uso de nitratos en las sales de curado. El nitrato es reducido a nitrito por la acción de microorganismos, posteriormente se reduce a óxido nítrico que reacciona con la metamioglobina (producto de la oxidación de la mioglobina por acción del nitrito) para formar nitrosometamioglobina que se va a reducir con posterioridad a nitrosomioglobina, pigmento responsable del color de las carnes curadas. (Skibsted, 1992).

I.1.2.7. Acción prooxidante

El cloruro sódico es un potente prooxidante que va a favorecer el enranciamiento oxidativo de los lípidos. Mientras en otros alimentos los fenómenos de oxidación de los lípidos se consideran negativos ya que se asocian a sensaciones rancias y a los llamados “off-flavors”, en los productos cárnicos curados estos fenómenos juegan un papel determinante en el desarrollo del aroma característico del producto, aunque si las reacciones oxidativas se producen en exceso podrían generar olores y sabores desagradables. Por tanto, es fundamental que exista un equilibrio entre factores prooxidantes y antioxidantes para modular esta oxidación.

I.1.3. DINÁMICA DE PENETRACIÓN DE LA SAL EN PRODUCTOS CÁRNICOS CURADOS

La penetración de la sal en el interior de los productos cárnicos curados involucra fenómenos mecanismos simultáneos de ósmosis y de difusión. La ósmosis es el fenómeno que rige los intercambios de moléculas entre dos soluciones separadas por una membrana semipermeable. Una solución está caracterizada por su fuerza iónica, que depende de la

concentración de solutos y de sus cargas libres. De esta manera, existe una migración de solutos de la solución más concentrada hacia la menos concentrada y una migración de agua en sentido inverso, hasta que las dos soluciones tienen la misma fuerza iónica. La difusión es el fenómeno que rige los movimientos de un soluto o del agua hacia el interior de un cuerpo, de la zona más concentrada a la zona de menor concentración hasta que las concentraciones se igualan.

Tanto los fenómenos de ósmosis como de difusión se inician en la fase acuosa por lo que es necesaria la formación de una salmuera saturada en la superficie de la carne, lo cual explica que la sal húmeda penetre más rápidamente que la seca. Por ello es importante que la humedad relativa de las cámaras de salado sea elevada, ya que la sal va a tomar la humedad ambiental y transformarse en salmuera. La elevación de la temperatura va a favorecer la difusión de la sal, sin embargo durante las etapas de salado y post-salado es necesario utilizar temperaturas bajas para evitar el desarrollo microbiano (Arnau y col., 1987).

Existen otros factores que pueden afectar a la difusión de la sal. Así, los valores de pH excesivamente ácidos determinan una baja capacidad de retención de agua y por tanto la existencia de una gran cantidad de agua libre en la superficie de los músculos que facilita la solubilización y difusión de la sal, penetrando rápidamente en la pieza cárnica. Por el contrario valores altos tendrán como consecuencia una menor velocidad de salazón y de migración de la sal en el interior de la pieza. Otro factor a considerar es el contenido de tejido adiposo, tanto subcutáneo como intramuscular e intermuscular, ya que la grasa frena la penetración de la sal hacia el interior debido a que difunde peor en este tejido que en el magro (Gou, 1998).

I.1.4. EFECTO DE LA SAL EN LA SALUD

El cloruro sódico está compuesto por un 40% de sodio y un 60% de cloro. Tanto el ión Na^+ como el ión Cl^- , desempeñan funciones de vital importancia en el organismo. El sodio es un nutriente esencial relacionado con la regulación del balance hídrico corporal, la transmisión del impulso nervioso y la inervación muscular. El cloruro por su parte forma parte del líquido intra y extracelular, siendo necesario para mantener el equilibrio ácido-base y la osmolaridad de los tejidos.

Sin embargo, estudios epidemiológicos (INTERSALT, INTERMAP, EPIC-Norfolk y WHO-Cardiac) y de intervención clínica (DASH) han confirmado la relación existente entre el origen de la hipertensión arterial (HTA) y las enfermedades cardiovasculares con el excesivo consumo de sodio, que se ingiere en la dieta fundamentalmente en forma de cloruro sódico.

Para prevenir el aumento progresivo de la incidencia de enfermedades cardiovasculares la OMS recomienda una ingesta diaria de sal de 5 g o lo que equivale a 2 g de sodio por día. Debido a esta problemática, uno de los principales retos planteados por los Estados miembros de la UE es la reducción del consumo de sal a través de los alimentos. En España, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) inició en 2008 un plan de reducción con unos objetivos concretos que permitieran pasar progresivamente de la ingesta de 9,7 g/día a una ingesta inferior a 8,0 g/día en el año 2014.

Del estudio realizado por AESAN (2009) en España acerca de la ingesta de sodio a través de la dieta (Figura I.1), se dedujo que el 20% de la sal ingerida se añade en la cocina/mesa mientras que un 72% se encuentra en alimentos procesados. Dentro de estos últimos hay cuatro grupos de alimentos que suministran casi el 60% de la ingesta como son: productos cárnicos curados (26,2%), pan y panes especiales (19,1%), quesos (6,7%) y platos preparados (4,9%).

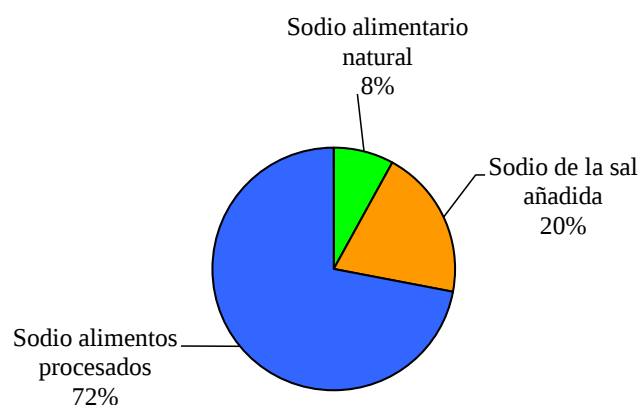


Figura I.1. Ingesta de sodio a través de la dieta. Fuente: AESAN (2009)

I.2. EL LACÓN

I.2.1. HISTORIA DEL LACÓN

El término lacón es una voz gallega que carece de traducción al castellano y que hace referencia al brazuelo o pata delantera del cerdo, especialmente a su carne curada.

A lo largo de los años se ha hecho alusión al lacón tanto con carácter histórico como en el marco de la tradición gastronómica gallega. Así, la primera cita encontrada acerca de este producto hace referencia al tiempo de ayuno y abstinencia en determinados días que tenía lugar en Galicia en el siglo XVI. Durante el siglo XVII y principios del XVIII, el lacón fue un producto limitado a las clases privilegiadas, extendiéndose su consumo a todas las clases sociales a partir del siglo XVIII, disfrutando desde entonces de un amplio mercado en toda Galicia. Diversos textos han hecho referencia a este producto, “Los pazos de Ulloa” de Emilia Pardo Bazán (1886), “La Cocina Práctica” de Manuel Puga y Parga (1905) y “A Cociña Galega” de Alvaro Cunqueiro (1973) (Anónimo, 2000). Actualmente, las referencias a su consumo aparecen por doquier, ya que se trata de un producto íntimamente relacionado con la tradición gastronómica gallega.



Figura I.2. Logotipo de la IGP “Lacón Gallego”

Mediante Orden de 7 de febrero de 1997 (DOG 17.02.97), la Consellería de Agricultura, Gandería e Montes, de la Xunta de Galicia reconoció la Denominación Específica “Lacón Gallego” para las extremidades delanteras del ganado porcino, tradicionalmente designadas con este nombre, producidas y elaboradas en la Comunidad Autónoma de Galicia. Posteriormente, la Orden de 20 de noviembre de 1997 (DOG 27.11.97) de la Consellería de Agricultura, Gandería e Montes, aprobó el Reglamento de la Denominación Específica Lacón Gallego y de su Consejo Regulador, ratificado con posterioridad en la Orden del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), del 21 de julio de 1998 (BOE 07.08.98). Finalmente, en 2001, fue creada y registrada la

Indicación Geográfica Protegida “Lacón Gallego” (Figura I.2) en virtud del Reglamento de la Comunidad Europea (CE) 898/2001, de la Comisión, de 7 de mayo de 2001 (DOCE 08.05.01).

I.2.2. PROCESO TECNOLÓGICO DE ELABORACIÓN DEL LACÓN

El proceso tecnológico de elaboración del lacón es similar al del jamón Serrano, aunque la duración de las distintas etapas (o fases) de elaboración es menor en el lacón, debido tanto al menor tamaño de las piezas (aproximadamente 4 kg) como a que el producto final se consume normalmente cocido, lo que exige un período de maduración más corto. Comprende básicamente cuatro etapas importantes: recepción de la materia prima, salado, post-salado y secado-maduración (Figura I.3).

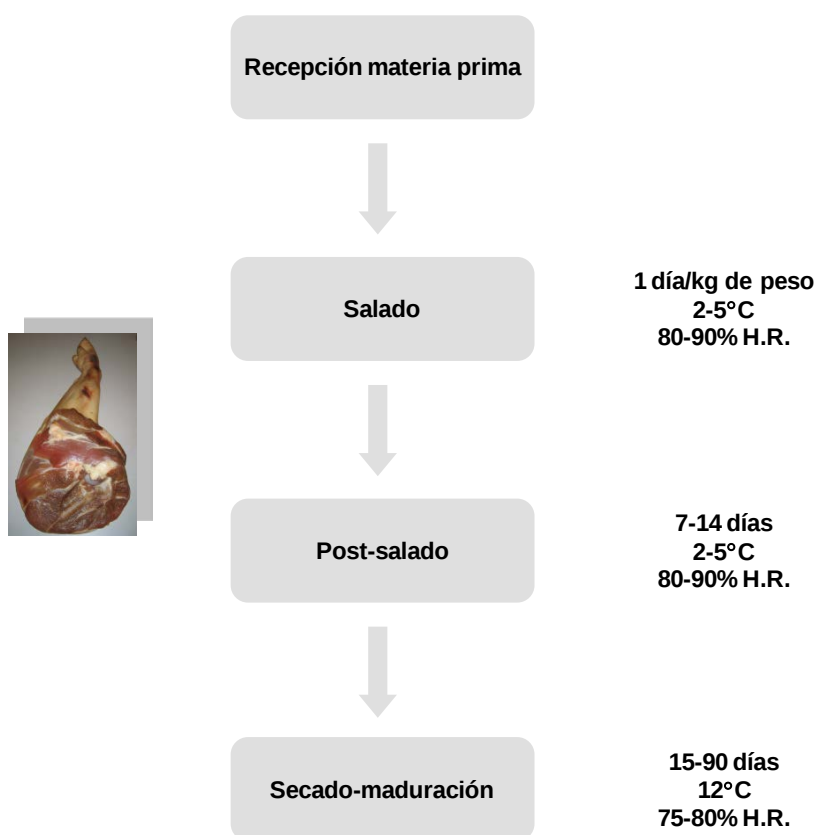


Figura I.3. Esquema del proceso tecnológico de elaboración del lacón

Las piezas de lacón (brazuelos frescos) son seleccionadas y clasificadas por peso. El peso es un factor importante ya que determinará el tiempo de permanencia en sal. La salazón o salado tiene como finalidad que el brazuelo adquiera un contenido en sal

suficiente para que una vez distribuido por toda la pieza en las etapas posteriores y en combinación con la paulatina deshidratación, se inhiba el desarrollo de microorganismos alterantes y/o potencialmente patógenos para el consumidor. Asimismo, se persigue la consecución de un ligero sabor salado en el producto final y regular la actividad enzimática endógena y las reacciones químicas durante la maduración. Las piezas de lacón son saladas en seco empleando sal gruesa. Esta fase se realiza a una temperatura entre 2-5°C y una humedad relativa en torno al 80-90%. El tiempo de salado varía en función del peso de las piezas, siendo alrededor de 1 día de salado por kilogramo de peso de la pieza, con una duración total entre 4 y 7 días. Una vez finalizado el período de salazón, se elimina la sal superficial de los brazuelos, mediante cepillado y lavado. A continuación se dejan escurrir en cámaras durante un periodo de tiempo no superior a 24 horas.

Durante la etapa de post-salado también denominada de asentamiento o equilibrado, la sal difunde en el interior de la pieza, distribuyéndose de un modo homogéneo por toda la masa cárnica. La concentración salina alcanzada tanto en la superficie como en el interior del brazuelo, unida a la deshidratación parcial producida en esta etapa, produce una reducción significativa de la actividad de agua (a_w). Esta fase se realiza en cámaras a temperaturas en torno a 2-5°C y humedades relativas entre 80-90%. La duración de esta fase varía según el tamaño de la pieza oscilando en torno a los 14 días y no siendo nunca inferior a 7 días.

Una vez finalizada la etapa de post-salado, las piezas son transferidas a una cámara de secado. La permanencia de las piezas de lacón en las cámaras de secado es como mínimo de 15 días, a una temperatura de 12°C y una humedad relativa del 75-80%. En esta fase del procesado, el lacón adquiere las propiedades organolépticas características mediante temperaturas más elevadas y humedades relativas más bajas que en las anteriores etapas. El producto resultante, según el grado de maduración, puede consumirse cocido o crudo.

I.3. COMPUESTOS VOLÁTILES

I.3.1. GENERACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES

Entre los caracteres organolépticos que determinan la aceptación de un producto alimenticio destacan el olor y el aroma. Estos atributos son debidos principalmente a la

presencia de compuestos volátiles y a su umbral de olfacción. En el caso de los productos cárnicos curados, estos compuestos volátiles son el resultado de las numerosas reacciones químicas y bioquímicas que tienen lugar durante las diferentes fases implicadas en su elaboración. Las principales reacciones bioquímicas son consecuencia de las actividades de una gran variedad de sistemas enzimáticos, en su mayor parte de origen endógeno, aunque también pueden ser de origen microbiano. Destacan los fenómenos de proteolisis, que afecta a las proteínas musculares y la lipolisis que afecta a los triglicéridos y fosfolípidos (Toldrá, 1992; Toldrá y Flores, 1998). De forma simultánea y/o consecutiva a estas reacciones, tienen lugar un conjunto de reacciones químicas tanto primarias (formación de precursores de los compuestos volátiles) como secundarias (formación de compuestos volátiles aromáticos) que, aunque de menor importancia que las bioquímicas, contribuyen al sabor y, en particular, al aroma. La oxidación lipídica, la reacción de Maillard y la degradación vía Strecker de aminoácidos se encuentran entre las reacciones químicas más importantes que se desarrollan durante la elaboración de los productos cárnicos curados.

I.3.1.1. Reacciones bioquímicas: proteolisis y lipolisis

I.3.1.1.1. Proteolisis

Entre las transformaciones que se producen en las proteínas a lo largo del proceso de elaboración de los productos cárnicos curados se encuentra la proteolisis, que es un proceso de naturaleza enzimática, responsable, en gran medida, de la calidad del producto final, ya que influye directamente sobre la textura y el sabor e indirectamente sobre el desarrollo del aroma (Toldrá y Flores, 1998; Toldrá 2006).

El sistema enzimático implicado en la proteolisis es bastante complejo y engloba dos grandes grupos de enzimas, las endopeptidasas que se asocian con la hidrólisis de proteínas, y las exopeptidasas, que se asocian con la generación de péptidos pequeños y aminoácidos libres (Toldrá y Flores, 1998; Toldrá y Aristoy, 2010).

En general, la proteolisis sigue un proceso que se puede resumir en dos etapas. La primera etapa consiste en la hidrólisis de las proteínas miofibrilares y sarcoplasmáticas por la acción de las endopeptidasas musculares (catepsinas, calpaínas, proteasoma y caspasas), que actúan fundamentalmente sobre la miosina y la troponina, lo que provoca un aumento de la terneza de la carne y la generación de grandes polipéptidos (Lametsch y col., 2003; Nagaraj y col., 2005). En una segunda etapa los polipéptidos generados por las

endopeptidasas son degradados en péptidos más pequeños y aminoácidos libres por la acción de las exopeptidasas (Toldrá y Aristoy, 2010).

De entre los principales grupos de exopeptidasas se distinguen:

- aminopeptidasas, dipeptidilpeptidasas y tripeptidilpeptidasas que degradan la cadena peptídica a partir del extremo amino terminal liberando un aminoácido, un dipéptido o un tripéptido, respectivamente.
- otras enzimas comunes pero menos estudiadas en carne y productos cárnicos. Las carboxipeptidasas que actúan a partir del extremo carboxi terminal generando aminoácidos libres. Las peptidildipeptidasas que liberan dipéptidos a partir del extremo carboxi terminal de polipéptidos y las dipeptidasas y tripeptidasas, que actúan hidrolizando dipéptidos y tripéptidos respectivamente (Toldrá y col. 1997).

Los aminoácidos libres y péptidos pequeños generados durante la proteólisis tienen un efecto directo sobre el sabor y el aroma del producto final (Toldrá, 1998). Además, los aminoácidos libres constituyen el sustrato de nuevas reacciones químicas como las reacciones de Maillard y/o la degradación de Strecker (Flores y col., 1998b), contribuyendo de forma indirecta al aroma característico de los productos cárnicos curados.

Entre los principales factores extrínsecos que van a determinar la acción de las enzimas destacan el grado de secado, el pH, la temperatura y la cantidad de sal (Toldrá, 1998). Durante el secado se produce una disminución de la actividad de las catepsinas, debido principalmente al descenso de la actividad de agua (Virgili y col., 1995). Las catepsinas B, D y L son activas a valores de pH ligeramente ácidos, las calpaínas I y II, y la catepsina H a pHs neutros, mientras que el proteasoma es activo a pH ligeramente alcalino. La actividad de las enzimas también está condicionada por la temperatura, siendo el valor óptimo de 30°C para la catepsina B y de 37°C para las catepsinas H y L (Sánchez-Molinero, 2003). En relación con la sal, cuando la concentración es baja las enzimas presentan su máxima actividad, por el contrario cuando la concentración de sal aumenta la actividad proteolítica disminuye (Antequera y Martín, 2001).

1.3.1.1.2. Lipolisis

La lipolisis es un proceso enzimático de carácter hidrolítico que se desarrolla sobre los lípidos y que genera ácidos grasos libres mediante la hidrólisis de los enlaces éster que

los vincula con la molécula de glicerol. Estos ácidos grasos libres van a servir de sustratos para una sucesión de reacciones oxidativas que darán origen a diferentes compuestos volátiles aromáticos de gran importancia en los productos cárnicos curados. En el lacón, al igual que en otras salazones cárnicas, existen dos tipos de lípidos, los intramusculares y los que se encuentran en el tejido adiposo o capa externa de grasa visible. La fracción lipídica intramuscular está constituida fundamentalmente por triglicéridos (aproximadamente en un 90%) y fosfolípidos (Antequera y Martín, 2001), mientras que la fracción del tejido adiposo está constituida en un 99% por triglicéridos.

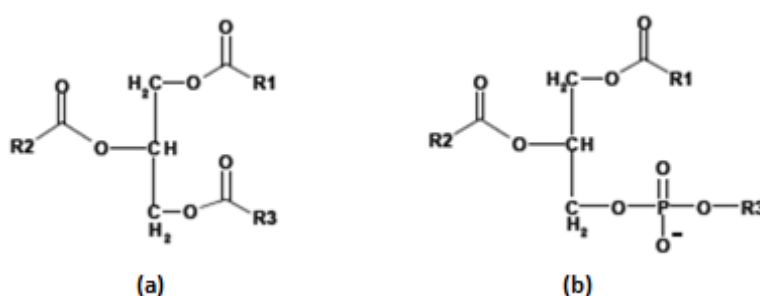


Figura I.4. Estructura básica de los triglicéridos (a) y fosfolípidos (b)

Las enzimas endógenas más importantes son las lipasas (ácida lisosomal y neutra) y las fosfolipasas (A1, A2, C y D). Las primeras tienen como principal diana los triglicéridos, mientras las segundas hidrolizan los fosfolípidos, liberando ácidos grasos, tanto saturados como mono y poliinsaturados (Motilva y col., 1993; Buscailhon y col., 1994). En el tejido adiposo la principal enzima con actividad es la lipasa sensible a hormona que actúa sobre los triglicéridos generando mono y diglicéridos y liberando gran cantidad de ácidos grasos.

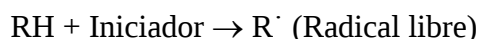
I.3.1.2. Reacciones químicas: oxidación lipídica, reacciones de Maillard y reacciones de Strecker

I.3.1.2.1. Oxidación lipídica

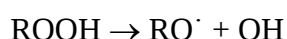
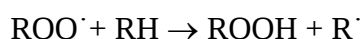
Las reacciones oxidativas de los lípidos son un conjunto de reacciones químicas (autooxidación) tanto primarias (formación de peróxidos lipídicos) como secundarias (compuestos volátiles aromáticos), en las que el oxígeno molecular reacciona con los

ácidos grasos libres generados en la hidrólisis enzimática. El mecanismo es de tipo radicalario y consta de tres fases características: iniciación, propagación y terminación.

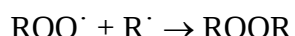
- Iniciación, en la que se forman los radicales libres a partir de los ácidos grasos libres por rotura homolítica del enlace C-H o abstracción de un átomo de hidrógeno por la acción de catalizadores (luz, iones metálicos o calor), o de enzimas (cicloxigenasa o lipoxigenasa).



- Propagación, en la que los radicales libres formados en la etapa de iniciación ($R^{\cdot}$) pueden reaccionar con el oxígeno para formar radicales peróxido ($ROO^{\cdot}$), los cuales forman los hidroperóxidos ($ROOH$) capturando otro hidrógeno a un ácido graso y propagando la reacción en cadena. Los hidroperóxidos generados pueden fragmentarse por acción térmica o por catálisis inducida por metales de transición, lo que genera nuevos radicales que autoalimentan el proceso de oxidación. Estos hidroperóxidos son compuestos sin sabor ni olor y frecuentemente se conocen como productos primarios de la oxidación; se caracterizan por su inestabilidad descomponiéndose de forma rápida para dar una serie de compuestos volátiles como aldehídos, cetonas o alcoholes, que tienen un gran impacto desde el punto de vista sensorial.



- Terminación, en la que los hidroperóxidos pueden reaccionar con proteínas, péptidos o aminoácidos y polimerizarse (Buscailhon et al., 1993), o romperse en moléculas volátiles de bajo peso molecular (aldehídos, cetonas, alcoholes, hidrocarburos y ácidos).



La composición de los lípidos influye en la oxidación lipídica, así los ácidos grasos insaturados se oxidan más rápidamente que los saturados y ambos se oxidan a una velocidad más rápida cuando están en forma libre que cuando están esterificando al

glicerol. También influyen en la velocidad de reacción el número, posición y geometría de los dobles enlaces [los enlaces cis se oxidan más que los trans y los dobles enlaces conjugados son más reactivos que los no conjugados (Flores, 1997)]. Los fosfolípidos presentan una mayor proporción de ácidos grasos insaturados que los triglicéridos lo que hace que las reacciones oxidativas se inicien en la fracción de fosfolípidos (Gray y Pearson, 1987).

I.3.1.2.2. Reacciones de Maillard

Las reacciones de Maillard (glucosilación no enzimática de las proteínas) son reacciones complejas en las que intervienen un grupo amino, proveniente de proteínas, aminoácidos libres y/o aminas, y un azúcar reductor, dando lugar a compuestos que a su vez pueden reaccionar entre sí o con grupos carbonilo de origen lipídico, generando numerosos compuestos volátiles. Los principales sustratos de estas reacciones van a ser los aminoácidos liberados en los procesos de proteólisis y los compuestos carbonilos que provienen de los ácidos grasos liberados en los procesos lipolíticos y degradados por las reacciones de oxidación lipídica.

En general, los compuestos volátiles generados por la reacción de Maillard se pueden dividir en tres grupos: a) productos de la fragmentación de azúcares: furanos, pirazinas, ciclopentanos, carbonilos y ácidos, b) productos de la degradación de aminoácidos: aldehídos y compuestos azufrados, y c) productos de reacciones secundarias: pirroles, piridinas, imidazoles, tiazoles y compuestos de condensación aldólica.

La reacción de Maillard o de pardeamiento no enzimático ocurre normalmente bajo tratamiento térmico de los alimentos o bien durante almacenamientos prolongados a temperatura ambiente, contribuyendo a la formación del flavor.

I.3.1.2.3. Reacciones de Strecker

Las reacciones de Strecker constituyen otra ruta de formación de compuestos volátiles y forman parte del mecanismo de la reacción de Maillard o pardeamiento no enzimático (Cremer y Eichner, 2000). Involucran la desanimación oxidativa y la descarboxilación de aminoácidos en presencia de compuestos α -dicarbonilos, para producir aminocetonas, aldehídos y dióxido de carbono.

Los compuestos generados a partir de la degradación de Strecker poseen características aromáticas intensas y pueden contribuir al desarrollo del aroma final del

producto. Se trata de una ruta de formación de compuestos volátiles tales como el 2-metil propanal, 2-metil butanal y 3-metil butanal procedentes de los aminoácidos valina, isoleucina y leucina, respectivamente. También se forman compuestos volátiles azufrados a partir de aminoácidos ricos en azufre como la metionina y cisteína.

A continuación se nombran las principales familias químicas a las que pertenecen los compuestos volátiles responsables del aroma y el olor de los productos cárnicos curados. La contribución de cada uno de los compuestos volátiles en el aroma y olor global depende de la cantidad de compuesto, de su umbral olfativo y de sus posibles interacciones entre ellos y con otros compuestos de la matriz.

Aldehídos

Constituye una de las familias más importantes en el análisis cuantitativo de compuestos volátiles presentes en productos cárnicos curados (Sabio y col., 1998; García y col., 1991; López y col., 1992). Estos compuestos tienen mucha importancia en el aroma debido a que presentan un bajo umbral de olfacción (Shahidi y col., 1986). Los aldehídos lineales tienen su origen en la oxidación de los ácidos grasos insaturados, los que presentan un bajo número de átomos de carbonos (C3-C4) se caracterizan por un olor fuerte e irritante, mientras que los aldehídos lineales de cadena larga (C10-C12) poseen un marcado olor a cítrico (Forss, 1972).

Tabla I.1. Aldehídos derivados de la oxidación de diferentes ácidos grasos. (Fuente: Bading, H.T. (1970))

Ac. oleico (n-9)	Ac. linoleico (n-6)	Ac. linolénico (n-3)	Ac. araquidónico (n-6)
nonanal	hexanal	2,4-heptadienal	hexanal
octanal	2-heptenal	propanal	2,4-decadienal
trans-2-undecenal	2-nonenal	2-hexanal	2,4,7-tridecatrienal
decanal	propanal	2-heptenal	2-heptenal
trans-2-decenal	2-octenal	2-pentenal	2-octenal
heptanal	2,4-nonadienal	2-butenal	pentanal
	2,4-decadienal		4-decenal
			2,6-dodecadial
			3-nonenal

Otro tipo de aldehídos (ramificados, cíclicos y azufrados) tienen su origen en la desaminación-descarboxilación oxidativa de aminoácidos por la vía de Strecker (García y col., 1991; López y col., 1992).

Alcoholes

Los alcoholes son en su mayoría productos de oxidación de los lípidos (Shahidi y col., 1986) y presentan un aroma muy característico. El umbral de olfacción de estos compuestos es más elevado que el de los aldehídos y, por lo tanto, su influencia es menor (Drumm y Spanier, 1991). En el caso de los alcoholes alifáticos saturados el umbral olfativo disminuye al aumentar la longitud de la cadena.

Hidrocarburos

En general, los alcanos lineales saturados no contribuyen significativamente al aroma y sabor de la carne debido a que no poseen ningún poder aromático (Shahidi y col., 1986). Por el contrario, la presencia de insaturaciones en la cadena disminuye el umbral de olfacción.

Cetonas

Proviene fundamentalmente de la oxidación lipídica. Las metilcetonas se generan a partir de la β -oxidación de ácidos grasos libres seguida de la descarboxilación del β -ceto ácido (Belitz y Grosch, 1988).

Ácidos carboxílicos

Los ácidos carboxílicos provienen de la hidrólisis de triglicéridos y fosfolípidos. Las enzimas responsables de esta hidrólisis son activas durante el proceso de curado (Motilva y col., 1993).

Ésteres

Estos compuestos contribuyen con ciertas notas agradables en los alimentos. Los ésteres se forman mediante la esterificación enzimática o no enzimática de ácidos grasos libres y alcoholes generados durante la oxidación lipídica en el tejido intramuscular (Shahidi y col., 1986), aunque también se ha descrito la formación de ésteres debido a la actividad esterásica de ciertos microorganismos (Ventanas, 2001).

Lactonas

Las lactonas resultan de la degradación de lípidos por la formación de compuestos cíclicos a partir de los correspondientes hidroxiácidos que son subproductos del metabolismo de los ácidos grasos (Forss, 1972).

Compuestos azufrados

Los compuestos volátiles que contienen azufre se forman a partir de aminoácidos azufrados como cisteína, cistina y metionina mediante la degradación de Strecker (Shahidi y col., 1986). Estos compuestos son importantes en el aroma y sabor de la carne porque tienen un bajo umbral de olfacción (Chang y Petersen, 1977; Drumm y Spanier, 1991).

Compuestos clorados

El origen más probable de estos compuestos es la ingestión por parte de los cerdos de residuos de pesticidas encontrados en piensos comerciales (Buscailhon y col., 1993).

Furanos

Estos compuestos se forman a partir de la oxidación de ácidos grasos y contribuyen al olor a carne cocinada (Shahidi y col., 1986).

Compuestos nitrogenados

En estos compuestos destacan las pirazinas por su poder aromático. Son compuestos muy característicos resultantes de las reacciones de Maillard, que ocurre principalmente cuando la carne es cocinada.

Terpenos

Estos compuestos son constituyentes fundamentalmente de la fracción insaponificable de la grasa vegetal. En el caso de los productos cárnicos, su origen proviene de la alimentación acumulándose en la grasa del animal (Sabio y col., 1998).

I.3.2. FACTORES QUE AFECTAN A LA CALIDAD SENSORIAL DEL LACÓN

Las características organolépticas o sensoriales de los productos cárnicos curados determinan la mayor o menor aceptabilidad del producto por el consumidor y son el resultado de un proceso complejo sobre el que actúan numerosas variables que pueden modificarlo. Los compuestos volátiles que van a determinar el aroma de los productos

cárnicos curados son el resultado de las reacciones químicas y bioquímicas que tienen lugar durante su elaboración y que van a estar condicionadas por la materia prima (genética, alimentación, condiciones ambientales, etc.) y el proceso tecnológico utilizado (sal y aditivos, temperatura, humedad, tiempo de elaboración, etc.). (González y Ockermann, 2000).

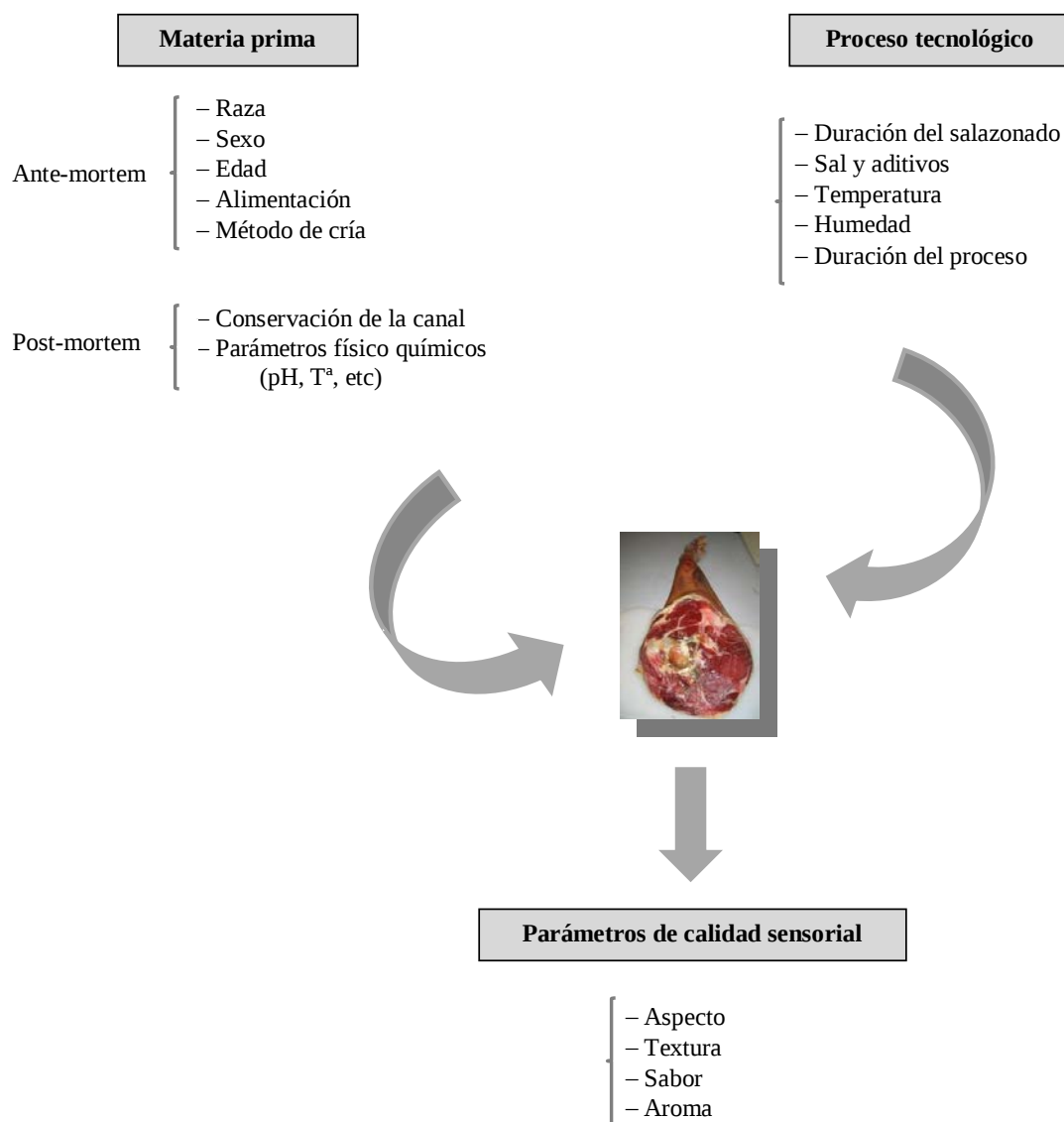


Figura I.4. Factores que condicionan la calidad sensorial del lacón

I.3.3. EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES

El análisis de los compuestos volátiles en alimentos es una tarea complicada debido en gran medida a la complejidad de las matrices alimentarias y a la gran diversidad de compuestos presentes. La obtención de perfiles de volátiles para un mismo producto puede

diferir notablemente según la técnica elegida (poder extractivo y selectividad hacia cada tipo de compuesto). Cada compuesto tiene una estructura diferente y por tanto presenta una volatilidad y unas propiedades físicas características que afectan a los coeficientes de partición (Ruiz y col., 2001).

Para la extracción y posterior identificación de los compuestos volátiles presentes en los productos cárnicos curados se pueden definir dos etapas:

- Separación de la fracción volátil y concentración de los compuestos volátiles
- Separación e identificación de los distintos compuestos volátiles

Las técnicas utilizadas para la separación y concentración se basan en la volatilidad de los compuestos (extracción de espacio de cabeza y destilación) o en su alta polaridad con respecto al resto de los componentes de la muestra (extracción con disolventes y técnicas de adsorción). Para la separación e identificación de los compuestos volátiles, las técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas (MS) son las más utilizadas. La elección del método dependerá de varios factores entre los que se encuentran las características físico-químicas, concentración, estabilidad térmica y polaridad de los compuestos volátiles de interés.

A continuación, se describen las metodologías más empleadas actualmente para la extracción e identificación de los compuestos volátiles responsables del aroma en carne y productos cárnicos.

I.3.3.1. Técnicas de extracción

I.3.3.1.1. Extracción con disolventes

La técnica de extracción con disolventes se basa en la distinta polaridad de la mayoría de los compuestos volátiles con respecto a los componentes de la matriz. La mayor desventaja de esta técnica es que es necesaria una etapa adicional de limpieza del extracto para la separación del residuo no volátil y para ello se suele utilizar la destilación. Una alternativa a esta metodología es la realización de una destilación inicial sobre la muestra seguida de una extracción del destilado acuoso con disolvente. Esta técnica presenta varias desventajas, requiere múltiples etapas, gran cantidad de tiempo y no es posible la automatización.

I.3.3.1.2. Extracción con fluidos supercríticos

Esta técnica de separación se basa en el aumento en el poder de solvatación de ciertos fluidos cuando estos se encuentran por encima de su presión y de su temperatura crítica. La mayor ventaja de esta técnica es el uso de disolventes no contaminantes, siendo el más utilizado es el CO₂, en ocasiones modificado con otros disolventes orgánicos como etanol o metanol. El rango de presiones (2000-4000 psi) y temperaturas de trabajo es elevado. Su principal ventaja es que generalmente se obtienen extractos limpios por lo que no es necesario añadir una etapa de limpieza posterior. Las desventajas de esta técnica son la gran dependencia de la eficacia de la extracción con la matriz de la muestra y el requerimiento de operadores expertos para llevarla a cabo.

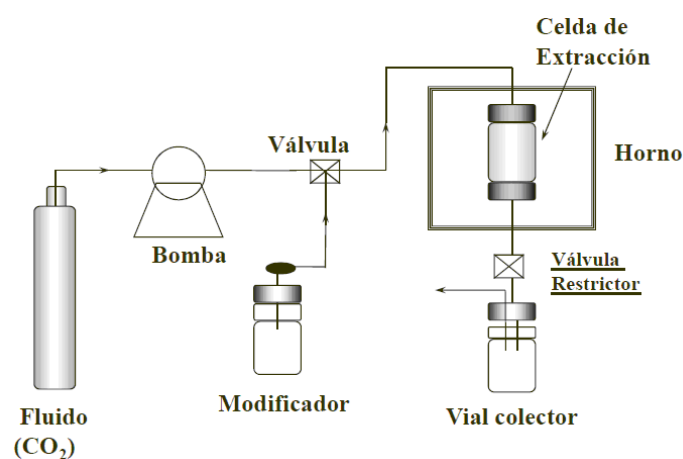


Figura I.5. Instrumentación de la extracción analítica con fluidos supercríticos

I.3.3.1.3. Técnica de espacio de cabeza estático

La técnica de espacio de cabeza estático es probablemente la técnica de preparación de muestra sin disolventes más sencilla. La muestra se coloca en un vial que posteriormente es sellado, en algunos casos la muestra es calentada para facilitar la vaporización de los compuestos volátiles y se mantiene un periodo de tiempo suficiente para que se realice la transferencia de los analitos desde la matriz de la muestra al espacio de cabeza hasta que se alcanza el equilibrio. Una vez alcanzado el equilibrio, se retira una alícuota del gas presente en el espacio de cabeza con una jeringa y se inyecta en el cromatógrafo de gases.

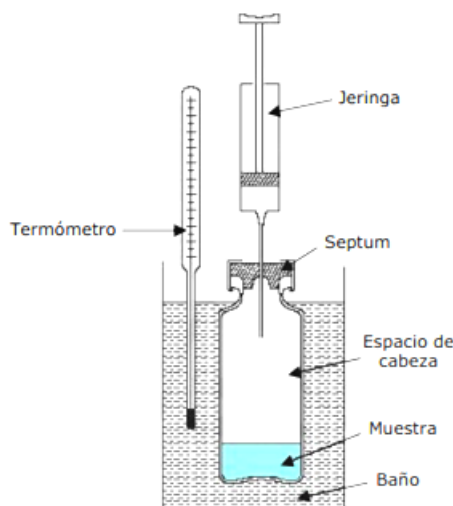


Figura I.6. Esquema de la técnica de espacio de cabeza estático

Las principales ventajas de esta técnica radican en que es un método rápido, barato, no destructivo y que no necesita la preparación previa de la muestra. Sin embargo, presenta algunos inconvenientes; tiene una baja sensibilidad debido a que carece de un efecto de concentración, no es útil para el análisis de compuestos con alto punto de ebullición, ya que estos compuestos permanecen en la muestra original junto con los componentes no volátiles, y la optimización debe ser muy rigurosa para cada compuesto, tanto en el tiempo como en la temperatura del proceso.

1.3.3.1.4. Técnica de espacio de cabeza dinámico

En la técnica de espacio de cabeza dinámico (purge and trap) la muestra es sometida al paso de un flujo constante de un gas inerte que arrastra los compuestos volátiles presentes en la fase vapor en equilibrio con la muestra. Al contrario que en la extracción estática, los analitos volátiles no alcanzan el equilibrio entre la fase gas y la matriz debido a que están siendo retirados de la muestra continuamente.

Esta técnica consta de tres etapas fundamentales:

- Arrastre continuo de la muestra mediante un flujo de gas inerte (He o N₂)

El gas portador pasa a través de la muestra arrastrando tanto los compuestos volátiles que se encuentran en el espacio de cabeza como los que están atrapados en la matriz. El flujo de gas actúa como fuerza distorsionadora del equilibrio termodinámico, el cual en estas condiciones no se mantiene, con lo que los

compuestos volátiles del espacio de cabeza no vuelven a la muestra. Durante esta etapa se han de controlar los siguientes parámetros:

- ❖ *Temperatura de la muestra*: el aumento de temperatura influye en la recuperación de cada componente volátil al aumentar la presión de vapor. Sin embargo, hay que considerar las posibles reacciones secundarias y de transformación que pudieran darse entre los compuestos de la matriz original.
- ❖ *Flujo de gas*: este valor dependerá del tipo de muestra en particular.
- ❖ *Tiempo de arrastre*: relacionado con el flujo de gas, ya que el valor importante es, en realidad, el volumen total utilizado, de acuerdo a la siguiente expresión.

$$\text{Volumen de purga} = \text{tiempo} \times \text{flujo}$$

– Retención de los compuestos volátiles

Los volátiles se recogen en trampas, las cuales deben retener los compuestos de interés a bajas temperaturas, permitiendo que tanto el gas de arrastre como el agua pasen sin ser adsorbidos, y resorber los compuestos de interés de forma rápida y eficaz cuando se calientan a altas temperaturas. Por el contrario, no deben contribuir con volátiles propios ni facilitar reacciones químicas de transformación o modificación en los compuestos, y han de ser estables en el tiempo.

Las trampas utilizadas para la concentración de los compuestos volátiles pueden ser de diferentes tipos:

- ❖ *Trampas con relleno adsorbente*. El adsorbente retiene a los compuestos al pasar a través de él el gas procedente de la muestra.
- ❖ *Trampas criogénicas*. La corriente se hace circular a través de una trampa refrigerada en la que se condensan los compuestos que se pretende concentrar.
- ❖ *Trampas con disolventes*. El gas burbujea a través de un disolvente, quedando disueltos los volátiles solubles.
- ❖ *Trampas capilares*. Consiste en un capilar polimérico, con igual o distinta composición que la columna que se coloca antes de la entrada de la misma.

- ❖ *Concentración “on-column”*. La columna cromatográfica actúa como trampa.

Los tipos más utilizados son las trampas con relleno adsorbente y criogénicas. La selección del adsorbente está basada en las características del analito de interés que se desea retener, así como también en las condiciones de adsorción y desorción de los materiales adsorbentes. Un factor importante a considerar en la elección de la trampa es el problema del “breakthrough”, que ocurre cuando el volumen de purga es excesivo. La trampa se satura y los compuestos de interés eluyen prematuramente desde la misma perdiéndose sin ser determinados. Antes de ser utilizadas, estas trampas han de ser acondicionadas. El procedimiento consiste en calentar a una temperatura superior a la utilizada para la desorción, mientras se hace pasar una corriente de gas inerte a un flujo bajo.

– Transferencia de los compuestos volátiles desde la trampa a la columna cromatográfica

Puede ser realizada de dos formas muy diferentes:

- ❖ *Lavado con un pequeño volumen de disolvente*, el cual posteriormente ha de ser concentrado antes de la inyección en el cromatógrafo. La desorción mediante disolvente permite realizar varias inyecciones de un mismo arrastre. Este sistema, no obstante, posee fuentes de error adicionales en el análisis en las etapas de lavado y evaporación del disolvente donde se pierden también analitos de interés.
- ❖ *Mediante desorción térmica*. Solo se puede realizar un análisis de un mismo concentrado, pero la sensibilidad es mucho mayor que en el proceso anterior.

La principal fortaleza de la técnica de espacio de cabeza dinámico es que ofrece las mismas ventajas que la técnica de espacio de cabeza estático, es decir, eliminación de un frente de disolvente, automatización y simplicidad en la preparación de la muestra y, además, es una técnica más sensible, permitiendo el análisis de compuestos volátiles presentes a niveles de partes por billón. Los principales inconvenientes son que los instrumentos son complejos (válvulas, zonas de calefacción...), requiere más tiempo de preparación y la adsorción de los compuestos volátiles depende del material adsorbente utilizado.

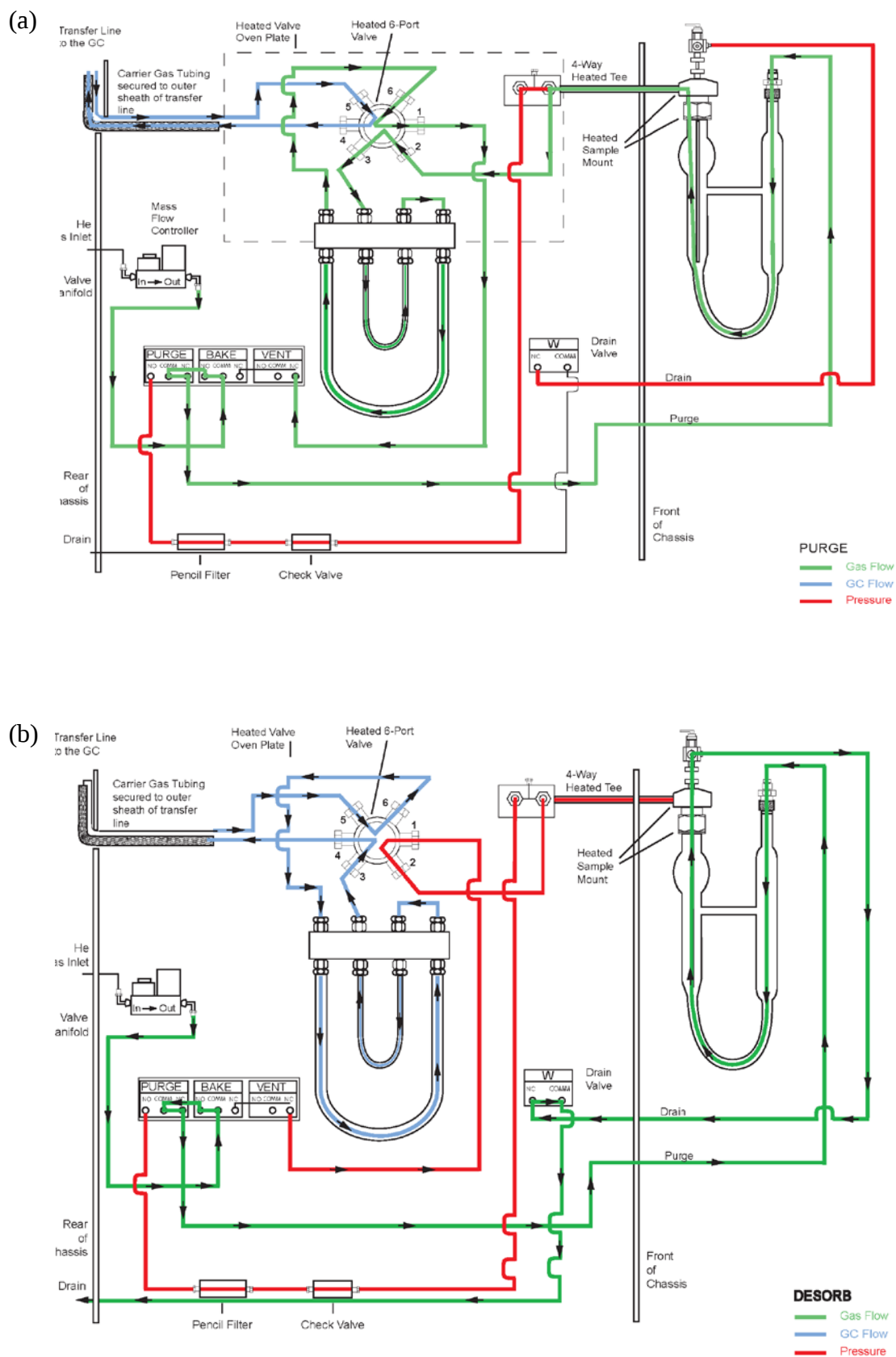


Figura I.7. Sistema de purga y trampa. (a) Proceso de transferencia de los analitos volátiles a la trampa; (b) transferencia de los analitos volátiles desde la trampa hasta el cromatógrafo de gases. (Fuente: www.teledynetekmar.com)

I.3.3.1.5. Microextracción en fase sólida

La microextracción en fase sólida (SPME) se basa en la extracción de los compuestos volátiles de la muestra mediante una fibra de sílice fundida que está recubierta de un adsorbente, seguida de la desorción de los compuestos mediante temperatura o por empleo de disolventes orgánicos. El pequeño tamaño de la fibra (generalmente de 1 cm de longitud y 0,11 mm de diámetro interno) y su geometría cilíndrica permiten incorporarla en una jeringa.



Figura I.8. Dispositivo de SPME comercializado por Supelco. (Fuente: www.sigmaaldrich.com)

El proceso de microextracción en fase sólida del espacio de cabeza de las muestras consta de dos etapas básicas en su modalidad más sencilla: extracción y desorción.

- En la etapa de extracción la fibra se expone a la muestra durante un determinado tiempo durante el que los compuestos volátiles son adsorbidos en la fibra. La geometría de la SPME permite la colocación de la fibra recubierta directamente en la muestra o en el espacio de cabeza situado sobre la muestra.
- En la etapa de desorción, los compuestos son transferidos al cromatógrafo térmicamente o bien mediante la utilización de un disolvente orgánico. La utilización de una desorción u otra va a depender de la técnica analítica utilizada a posteriori. Así, si se trata de un cromatógrafo de gases, la fibra se introduce durante un tiempo a elevada temperatura en el inyector, donde los analitos son desorbidos de la fibra e introducidos directamente en el instrumento de medida. En caso de que la técnica analítica seleccionada sea la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o electroforesis capilar (CE), la desorción se realiza mediante un disolvente que debe ser compatible con la fase móvil en HPLC o con la disolución tampón empleada en CE.

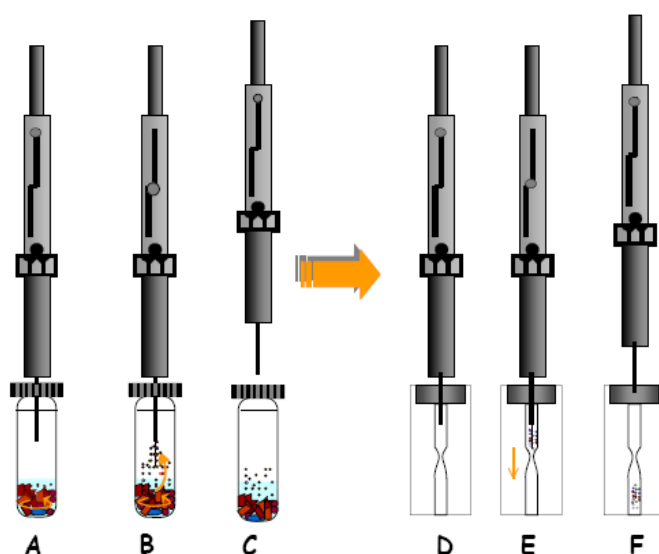


Figura I.9. Etapas del proceso de extracción mediante SPME. (A) Inyección en el septum del vial; (B) Extracción de la fibra para toma de muestras; (C) Retracción de la fibra; (D) Inyección en el inyector del Cromatógrafo de gases; (E) Extracción de la fibra para la desorción de los volátiles; (F) Retracción de la fibra

Cuando se diseña un método de análisis mediante SPME existen varios factores que deben tenerse en cuenta ya que pueden afectar directamente a la eficacia de la extracción.

- Recubrimiento de la fibra. Su elección va a venir condicionada por el analito a determinar. El volumen del recubrimiento afecta a la capacidad de la fibra y al volumen del analito que es capaz de extraer.
- Temperatura de extracción. Va a afectar a la cinética de extracción, a la termodinámica y a la selectividad del proceso. Un aumento de temperatura favorece el proceso de extracción, ya que conlleva un coeficiente de reparto mayor en el equilibrio muestra-espacio de cabeza.
- Tiempo de extracción. En SPME se debe tener en cuenta el tiempo necesario para llegar al estado de equilibrio. El tiempo de equilibrio es característico de cada sistema compuesto-fibra; una vez alcanzado el equilibrio no se puede extraer más cantidad de compuesto. Un método para favorecer la difusión de los compuestos, y así rebajar el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio y por lo tanto el tiempo de extracción, es someter las muestras a agitación durante la extracción.

- Volumen de muestra. En principio, un aumento en el volumen de la muestra incrementa la cantidad de analito extraído. La eficacia de la extracción será mayor cuanto más concentrados estén los analitos en el espacio de cabeza; no obstante, una excesiva concentración de volátiles puede dar lugar a la formación de interacciones competitivas por los lugares activos de la superficie de la fibra, desembocando en una reducción de la eficacia.
- Efecto salino. La adición de una sal (NaCl o KCl) determina un aumento en la fuerza iónica de las muestras, provocando una disminución en la solubilidad de los compuestos en agua de forma que se desplazan hacia otras fases del sistema (espacio de cabeza y fibra).

Entre las ventajas que presenta esta técnica se encuentran su rapidez y sencillez, en el mercado están disponibles diferentes fibras adsorbentes con lo que se puede conseguir cierta selectividad, se puede acoplar fácilmente a otras técnicas de separación (GC y HPLC), no requiere ningún disolvente y es una técnica económica. Como desventajas: está limitada a muestras líquidas o compuestos volátiles (espacio de cabeza) y no permite conservar el extracto para otros análisis.

I.3.3.2. Técnicas de separación e identificación. Cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS).

La introducción en los años cincuenta de la cromatografía de gases supuso un gran avance en el análisis de compuestos volátiles, convirtiéndose en la actualidad en la técnica más utilizada para la determinación de estos compuestos en alimentos, ya que ninguna otra técnica analítica puede ofrecer su capacidad de separación y su sensibilidad a la hora de identificar este tipo de compuestos. Su fundamento se basa en la diferencia de volatilidad de los solutos y en la distinta capacidad de interacción de los mismos con la fase estacionaria. Los límites de su utilización están marcados fundamentalmente por la estabilidad térmica de los compuestos a separar.

Para realizar una separación mediante cromatografía de gases, se inyecta una pequeña cantidad de la muestra a separar en una corriente de un gas inerte (fase móvil) a elevada temperatura; esta corriente de gas, atraviesa una columna cromatográfica (fase estacionaria) que separará los componentes de la mezcla por medio de un mecanismo de partición (cromatografía gas líquido), de adsorción (cromatografía gas sólido) o, en

muchos casos, por medio de una mezcla de ambos. La velocidad de migración de cada componente (y en consecuencia su tiempo de retención en la columna) será función de su distribución entre la fase móvil y la fase estacionaria. Así, los componentes fuertemente retenidos por la fase estacionaria se moverán lentamente en la fase móvil, mientras que los débilmente retenidos lo harán de modo rápido. Como consecuencia de esta diferencia de movilidad, los diversos componentes de la muestra se separarán en bandas que pueden analizarse tanto cualitativa como cuantitativamente mediante el empleo de detectores.

La espectrometría de masas es una técnica de detección rápida, universal y muy específica ya que ofrece de forma simultánea información cualitativa y cuantitativa. Se basa en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos, estos iones se separan de acuerdo con su masa y su carga, y finalmente se detectan por medio de un dispositivo adecuado.

El fundamento básico de este tipo de sistemas consiste en la emisión de electrones mediante el paso de corriente por un filamento caliente de wolframio y que posteriormente son acelerados por un potencial de aproximadamente 70V que se aplica entre el filamento y el ánodo. Estos electrones chocan con las moléculas que emergen de la columna del cromatógrafo provocando su ionización. Si la energía de los electrones es superior al potencial de ionización de la molécula, ésta se ioniza positivamente, formando el ión molecular y liberando un electrón ($M + e^- \rightarrow M^+ + 2 e^-$). Si el choque se produce de una forma muy eficaz provoca la rotura de uno o más enlaces del ión molecular generándose una fragmentación específica de esa molécula llamada Huella de Fragmentación que sirve para su identificación.

Las especies ionizadas pasan al analizador cuadrupolar. Este consta de cuatro barras o polos de sección cilíndrica o hiperbólica, alineadas paralelamente entre sí, equidistantes a un eje central imaginario situado sobre el eje z. Mediante la aplicación de voltajes variables de corriente continua y de radiofrecuencia a cada pareja de barras opuestas, se consigue que los iones de una relación masa/carga (m/z) determinada pasen por el túnel formado por las cuatro barras siguiendo trayectorias oscilantes estables que los conducen al detector mientras que el resto de los iones se desvía. Variando rápidamente el voltaje aplicado, se pueden seleccionar los iones de diferentes masas que llegan al detector. De este modo, el cuadrupolo actúa como un filtro de iones, discriminándolos en función de su relación m/z . El detector convierte el haz de iones en una señal eléctrica que es registrada y procesada dando lugar a un pico cromatográfico.

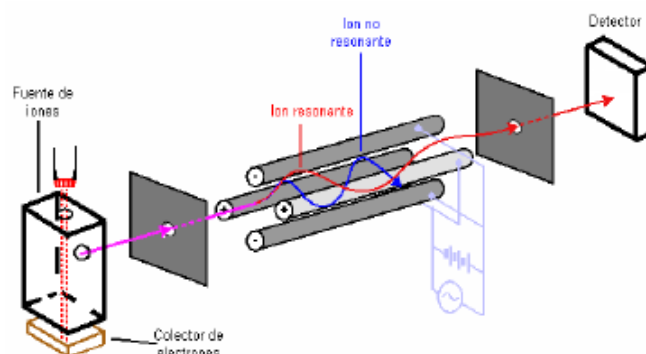


Figura I.10. Esquema de un analizador de masas cuadrupolar

El acoplamiento técnico de la cromatografía de gases con la espectrometría de masas (GC-MS) es, probablemente, la técnica combinada de más amplia utilización, ya que auna la enorme capacidad de separación que ofrece el cromatógrafo de gases con la sensibilidad y capacidad de aportar información estructural del espectrómetro de masas.

El principal problema que presenta el acoplamiento de estas dos técnicas radica en que la técnica cromatografía trabaja a una presión ligeramente superior a la atmosférica, mientras que la espectrometría trabaja bajo alto vacío. Además, hay que tener en cuenta que el gas procedente del cromatógrafo de gases es en su mayor parte gas portador, de forma que, si se utiliza el mismo gas que sale de la columna para realizar el espectro, los picos del espectro correspondientes al componente de la muestra serían casi invisibles en relación con el pico del gas. Este inconveniente se solventa utilizando columnas capilares que, al requerir flujos de gas portador pequeños (1-2 ml/min), son tolerados perfectamente por el espectrómetro de masas, empleando bombas de vacío de elevado caudal para mantener el nivel de vacío necesario en el espectrómetro.

I.4. ANÁLISIS SENSORIAL

El análisis sensorial es la disciplina científica empleada para medir, analizar e interpretar las reacciones humanas a las características de los alimentos y materiales, así como la manera en que éstos son percibidos por los sentidos de la vista, olfato, gusto, tacto y oído (Harper, 1983). Se complementa con el análisis estadístico, que le da objetividad a las apreciaciones de los jueces sensoriales, mediante una transformación e interpretación

de los datos obtenidos. Si la comparamos con otras disciplinas científicas, como la química o la microbiología, es una disciplina “joven”. Su nacimiento y evolución metodológica se produjo en la segunda mitad del siglo XX y su consolidación, tanto a nivel académico como industrial, no ocurrió hasta la década de los 80 (Moskowitz, 1993; Costell, 2000).

El proceso sensorial se inicia por la presencia de un estímulo físico o químico que actúa sobre los receptores especializados que se encuentran en los sentidos. Estos receptores sensoriales son estructuras en las cuáles existen células capaces de responder con una gran sensibilidad a señales específicas del entorno, y de transferir la información recibida al Sistema Nervioso. Los receptores captan las señales, las codifican, las transforman en flujo nervioso y las transportan a las regiones especializadas de la corteza cerebral, donde se interpreta como sensación. La interpretación de esta sensación se denomina percepción.

El análisis sensorial de los alimentos aporta una valiosa información que permite un conocimiento más complejo de sus características, debido a que las percepciones de estímulos por los seres humanos son difíciles o imposibles de replicar o predecir con los métodos instrumentales. Estos últimos nos informan aisladamente de las características físicas y químicas de los alimentos, pero no nos aportan información de las sensaciones percibidas debido a sus interacciones. Por todo ello, el análisis sensorial se ha convertido en una de las herramientas más importantes en la industria alimentaria, tanto en la cuantificación de los atributos perceptibles de los alimentos como en el estudio de la influencia de modificaciones en la formulación o del proceso de fabricación sobre el producto final.

Según Flores y col. (1997c), la percepción sensorial de un alimento ocurre en dos fases bien diferenciadas: en primer lugar se reciben unas sensaciones externas tanto por la vista (aspecto general) como por el olfato (olor). Una vez ingerido el alimento y mientras se mastica saliva y deglute, se percibe el sabor, el aroma y un conjunto de sensaciones complementarias de tipo somatosensorial. El conjunto de sabor, aroma y sensaciones somatosensoriales constituyen lo que se denomina “flavor”.

- *Aspecto general.* Es la primera información que se recibe sobre un alimento y en la mayoría de los casos la única que se posee para elegir la compra del mismo. La propiedad sensorial más importante asociada con el sentido de la vista es el color.

- *Olor*. Mediante el olfato se perciben y discriminan moléculas en fase gaseosa por vía nasal directa (olor) o retronasal (aroma).
- *Sabor*. El sentido del gusto reside principalmente en la lengua, donde se encuentran los receptores específicos (papilas gustativas) para los cinco sabores fundamentales: dulce, salado, amargo, ácido y umami. Los componentes de la carne y productos cárnicos con mayor influencia en el gusto son el NaCl, los aminoácidos, los péptidos y los nucleótidos. En las salazones cárnicas, el sabor salado no depende sólo de la cantidad de sal, también influye la cantidad de grasa, los compuestos derivados de la proteólisis (Careri y col., 1993), así como la formación de complejos entre los iones sodio y cloruro y las proteínas de la carne (Arnau, 2000).
- *Textura*. Conjunto de todos los atributos mecánicos, geométricos, de cuerpo y de superficie de un producto perceptibles a través de los receptores cinestésicos y somáticos y (si corresponde) visuales y auditivos desde el primer bocado hasta la deglución final. Estos atributos se dividen en primarios y secundarios. Los primarios son los que se correlacionan con una propiedad mecánica tal como una fuerza, deformación o energía (dureza, cohesividad, elasticidad, adhesividad y viscosidad) y los secundarios son los que resultan de la combinación de propiedades primarias (fragilidad, masticabilidad y gomosidad). En la boca, la textura de un alimento se percibe mediante los receptores táctiles situados en la lengua, las encías, la garganta y el paladar. Además se perciben sensaciones de temperatura, sabor y dolor.
- *Flavor*. Combinación compleja de sensaciones olfativas, gustativas y trigeminales percibidas durante la degustación.

Actualmente, el análisis sensorial es una herramienta imprescindible para obtener información sobre algunos aspectos de la calidad de los alimentos y que no se puede obtener con otras técnicas analíticas. Sin embargo, la caracterización sensorial y su correlación con las características físico-químicas de los alimentos, es necesaria para definir lo que se entiende por perfil sensorial de los mismos.

En la industria alimentaria es difícil predecir las posibles diferencias sensoriales originadas cuando un alimento se modifica al variar la materia prima, su formulación o las condiciones de los procesos de transformación o de almacenamiento. El análisis sensorial

descriptivo permite obtener los perfiles sensoriales de los alimentos aportando una información objetiva de sus atributos sensoriales.

Los métodos de Análisis Descriptivo empezaron a utilizarse en los años cincuenta del pasado siglo con el desarrollo del perfil del sabor (Cairncross y Sjöstron, 1950; Sjöstron y col., 1953; Caul y col., 1958) y han continuado a lo largo del tiempo con la aplicación del perfil de textura (Szczesniak, 1963), del análisis descriptivo cuantitativo (Stone y col., 1974), del método Spectrum (Meilgaard y col., 1991) y del perfil de libre elección (Williams y Langron, 1984; Arnold y Williams, 1986; Oreskowich y col., 1991).

El Análisis Descriptivo Cuantitativo (QDA) (Stone y col., 1974) surgió como respuesta a la necesidad de aplicar un tratamiento estadístico adecuado a los datos obtenidos. Para su aplicación, se requiere un equipo de entre 8 y 12 jueces, los cuales, se seleccionan tomando como criterio su capacidad para diferenciar las muestras del alimento en estudio empleando las propiedades sensoriales. Los catadores identifican y cuantifican los atributos del producto según el orden de aparición. La selección de los atributos utilizados para describir el alimento, así como, el orden de aparición de los mismos, se decide de forma consensuada por todo el equipo. Las muestras se presentan siguiendo diseños estadísticos equilibrados y la intensidad de los atributos es evaluada con escalas no estructuradas con los extremos definidos por expresiones descriptivas (Stone y Sidel, 1985; Moskowitz 1984; Meilgaard y col., 1991).

I.5. LAS LEVADURAS

I.5.1. POBLACIÓN DE LEVADURAS EN PRODUCTOS CÁRNICOS CURADOS

Las condiciones ambientales de temperatura y humedad relativa junto con los valores de concentración de cloruro sódico y pH alcanzados durante el procesado de los productos cárnicos curados condicionan la estabilidad microbiológica de las piezas y determinan la población microbiana capaz de desarrollarse. Dentro de los principales grupos microbianos que se desarrollan durante el procesado de estos productos se encuentran las levaduras (Rodríguez y col., 1994; Núñez y col., 1996).

Las levaduras son microorganismos eucariotas heterótrofos unicelulares, aerobios o anaerobios facultativos, capaces de desarrollarse en ambientes con actividad de agua

intermedia y con una temperatura de crecimiento óptima en torno a los 25°C, aunque algunas de ellas pueden desarrollarse a temperaturas de refrigeración.

Varios estudios han demostrado que, en los productos cárnicos curados, las levaduras son uno de los grupos de microorganismos más abundantes en las etapas más avanzadas, mostrando unos recuentos finales de 10^6 ufc/g (Encinas y col., 2000; Cocolin y col., 2006; Simoncini y col., 2007). Sus recuentos son bajos en la pieza antes de salar, pero su número aumenta rápidamente durante las etapas posteriores (Vilar y col., 2000; Lorenzo y col., 2005). Las especies *Debaryomyces hansenii* y *Candida zeylanoides* han sido identificadas como las especies mayoritarias en diferentes productos cárnicos (Núñez y col., 1996, Gardini y col., 2001; Encinas y col., 2000; Simoncini y col., 2006; Asefa y col., 2009). Generalmente, *C. zeylanoides* domina en las primeras fases de la elaboración, mientras que *D. hansenii* aparece en las etapas posteriores al salado en productos cárnicos de larga curación (Núñez y col., 1996; Cocolin y col., 2006; Simoncini y col., 2007). La presencia de *D. hansenii* en las últimas etapas del procesado está justificada por su tolerancia a la sal (Kurita y Yamazaki, 2002), su capacidad de crecer a bajas temperaturas (Fleet, 1990), y por su viabilidad a valores bajos de pH y de a_w (Núñez, 1995).

Estudios recientes han puesto de manifiesto la contribución que las levaduras tienen en las características sensoriales de los productos cárnicos debido a sus actividades proteolíticas y lipolíticas (Martín y col., 2004; Simoncini y col., 2007), así como su papel en la génesis de compuestos volátiles que contribuyen al aroma característico de este tipo de productos (Flores y col., 2004; Bolumar y col., 2006; Martín y col., 2006; Andrade y col., 2009a, 2009b).

I.5.2. CULTIVOS INICIADORES EN LA INDUSTRIA CÁRNICA

Los cultivos iniciadores son microorganismos que se presentan en estado puro o mixto, seleccionados de acuerdo con sus propiedades específicas y que se añaden a determinados alimentos con la finalidad de mejorar su aspecto, aroma y sabor (Leistner y Echardt, 1979).

En la industria cárnica los cultivos iniciadores más empleados son las bacterias ácido-lácticas, micrococáceas y levaduras (inoculación en profundidad) y mohos y levaduras (inoculación en superficie). El uso de cultivos iniciadores está muy extendido en

la industria alimentaria, ya que permite obtener mayor uniformidad en el producto aumentando su homogeneidad y calidad, así como incrementar el tiempo de conservación, e incluso la producción, al disminuir los tiempos de procesado (Wigley, 1999).

En los productos cárnicos curados el uso de las levaduras como cultivos iniciadores puede producir un efecto bioprotector al inhibir por exclusión competitiva el desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes (Carrascosa, 2001) y pueden también aprovechar los productos resultantes de los fenómenos lipolíticos y proteolíticos desencadenados durante su curación para la formación de compuestos volátiles de relevancia en el aroma del producto final.

Investigaciones llevadas a cabo sobre la inoculación de levaduras en distintos productos cárnicos han demostrado que aunque no contribuyen de un modo importante a la proteólisis (Rodríguez y col., 1998; Martín, 2000), sí que afectan a las características sensoriales contribuyendo a la generación de determinados compuestos volátiles deseables en los productos cárnicos curados (Martín, 2000).

A pesar de la existencia de levaduras comerciales para usar como cultivos iniciadores en la industria cárnica, éstas no están adaptadas para todo tipo de productos por lo que sería deseable utilizar cepas de levaduras específicas aisladas de cada producto local, y que por tanto estén adaptadas a las condiciones ambientales durante todo el procesado, limitando la selección en base a sus características tecnológicas (actividades enzimáticas). Esto permitiría diversificar y mejorar los actuales cultivos iniciadores.

I.5.3. IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS POR TÉCNICAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

De forma habitual, la identificación y caracterización de las diferentes especies de levaduras se ha realizado mediante métodos convencionales basados principalmente en sus características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas (Barnett y col., 1990). Estos métodos, en general, producen ambigüedades e incorrecciones en los resultados, debido a que las características morfológicas y fisiológicas están fuertemente influenciadas por las condiciones de cultivo (Golden y col., 1994).

Actualmente, los métodos moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) constituyen la mejor alternativa a los métodos tradicionales. Se

caracterizan por ser métodos de elevada precisión y discriminación, así como rápidos y sencillos en la realización. Todos ellos se fundamentan en el mismo principio general, amplificación de genes o secuencias de ADN por PCR e identificación de los productos de amplificación por separación electroforética o secuenciación.

I.5.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa

La PCR es un método utilizado para amplificar “*in vitro*” secuencias específicas de ADN mediante ciclos repetidos de síntesis, utilizando cebadores (primers) específicos y la enzima ADN polimerasa. Consiste en la repetición cíclica de tres etapas (Watson y col., 1992):

- *Desnaturalización del ADN bicatenario* presente en la muestra para separar las dos cadenas, mediante la aplicación de temperaturas superiores a 90°C.
- *Unión específica de los cebadores* (oligonucleótidos sintéticos) a las cadenas sencillas mediante complementariedad de bases. La temperatura a la que se realiza esta unión (T_a , annealing temperatura) es muy importante para controlar la especificidad de la reacción. Se suelen emplear dos cebadores que se unen cada uno a una cadena diferente, delimitando la secuencia diana que se pretende amplificar. La selección de los cebadores constituye uno de los puntos más críticos de la técnica PCR.
- *Extensión de la cadena de ADN a copiar a partir de los cebadores*, utilizando los nucleótidos presentes en la solución. Dicha extensión la lleva a cabo la enzima ADN polimerasa, que inicia su actividad tras reconocer la unión de los cebadores a las cadenas de ADN de la muestra.

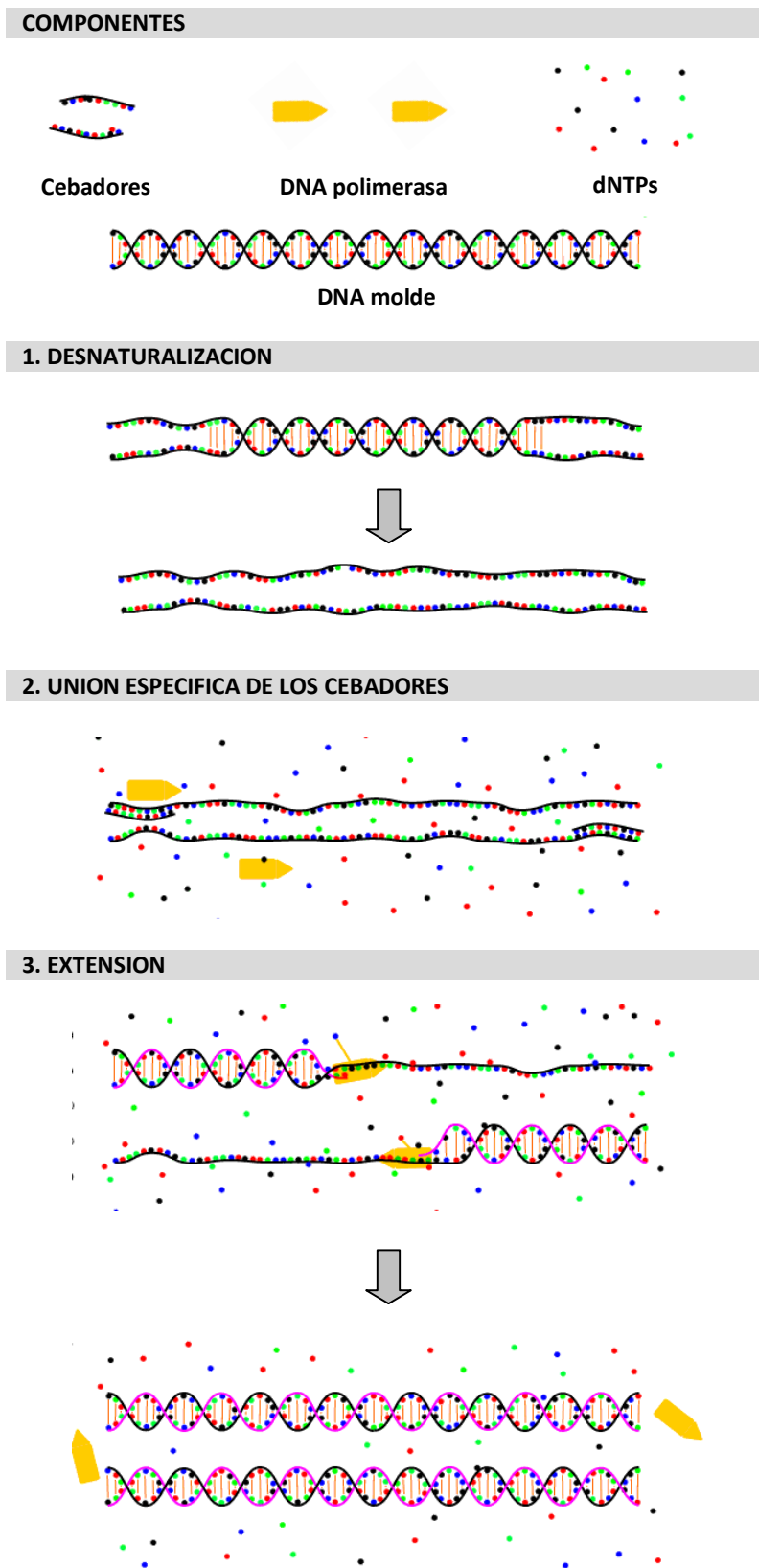


Figura I.11. Representación esquemática de las etapas de una PCR

Después de cada ciclo se obtiene como resultado la duplicación de la secuencia de ADN diana delimitada por la pareja de cebadores específicos. Dado que las nuevas copias también sirven como patrones en los subsiguientes ciclos, la cantidad de ADN generado se incrementa exponencialmente. De este modo, al final de n ciclos el número de copias de ADN por cada molécula será de 2^n .

Los fragmentos amplificados se detectan fácilmente mediante electroforesis en geles de agarosa o de poliacrilamida, y tinción con bromuro de etidio. El bromuro de etidio es una sustancia fluorescente que se intercala entre los pares de bases adyacentes del ADN, posibilitando su visualización cuando se ilumina con luz ultravioleta.

La PCR tiene dos características importantes que explican su utilidad en un rango muy amplio de aplicaciones:

- La amplificación se realiza de forma exponencial debido a la repetición del ciclo de PCR. Una amplificación típica suele tener de 20 a 40 ciclos siendo el resultado de alrededor de un millón de copias de la zona de ADN originalmente amplificada (Parson, 1988).
- Es una técnica altamente selectiva. El fragmento de ADN que se amplifica es únicamente el de la región comprendida entre los dos cebadores empleados.

I.5.3.2. Métodos basados en el análisis de regiones ribosómicas

Los genes ribosómicos (5,8S, 18S, y 26S) se agrupan en tándem formando unidades de transcripción que se repiten en el genoma de las levaduras entre 100 y 150 veces (White y col., 1990; Kurtzman, 1992). En cada unidad de transcripción existen otras dos regiones, los espaciadores internos (ITS) y los externos (ETS), que se transcriben pero son procesadas no formando parte de la molécula de ARNr final. A su vez, las unidades codificantes están separadas por los espaciadores intergénicos IGS, también llamados NTS.

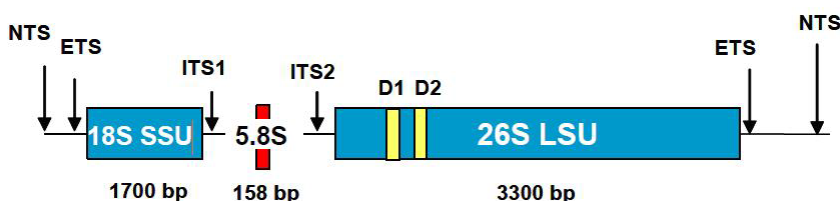


Figura I.12. Esquema de la organización de los genes ribosomales

Estos genes, junto con los espaciadores, constituyen herramientas eficaces para la identificación de especies (Kurtzman y Robnett, 1998) por contener secuencias relativamente conservadas (26S, 18S y 5,8S) y otras de mayor variabilidad. Empleando la información de estas regiones ribosómicas se han desarrollado distintas técnicas para la identificación de levaduras.

I.5.3.2.1. Secuenciación de regiones ribosómicas

Los métodos de identificación basados en la secuenciación del ADN_r están siendo ampliamente aplicados para la identificación de especies de levaduras en la industria alimentaria. Se basan en la determinación y comparación de las secuencias nucleotídicas de estas regiones con las secuencias disponibles en bases de datos electrónicas (GenBank, EMBL, DDBJ,...).

Las dos regiones más utilizadas son las correspondientes a los dominios D1 y D2 situados en el extremo 5' del gen 26S (Kurtzman y Robnett, 1998; Lopandic y col., 2006; Quirós y col., 2008) y el gen 18S (James y col., 1997; Oguntoyinbo, 2008).

La disponibilidad de las secuencias de estas regiones en bases de datos, sobre todo en el caso de la región D1/D2 del gen 26S, hacen que esta técnica sea muy útil para asignar una levadura desconocida a una especie concreta cuando el porcentaje de homología de sus secuencias es superior o igual a 99% (Kurtzman y Robnett, 1998).

I.5.3.2.2. Análisis de restricción de regiones ribosómicas

Las enzimas de restricción tienen la capacidad de fragmentar el ADN por secuencias de bases específicas. Se generan por tanto fragmentos de ADN de longitud variable que se visualizan en geles de agarosa.

I.5.3.3. Análisis de restricción del ADN mitocondrial

El ADN mitocondrial presenta una gran variabilidad de secuencia, característica que lo convierte en un valioso instrumento para la identificación de levaduras. Esta técnica se basa en las diferencias existentes en la composición en pares de bases entre el ADN mitocondrial y el ADN genómico debido a que es posible realizar digestiones enzimáticas que degraden completamente este último y producir por tanto bandas provenientes exclusivamente del ADN mitocondrial. Para ello se utilizan enzimas de restricción que

reconocen las secuencias ricas en guanina citosina (GC), con pocas dianas en el ADN mitocondrial (Zamarocky y Bernardi, 1986), al contener éste un 95% de pares adenina timina (AT). Así, el ADN nuclear se degradará en pequeños fragmentos y en pocos el ADN mitocondrial obteniéndose fragmentos de mayor tamaño de este último que pueden visualizarse claramente como bandas definidas.

I.5.3.4. PCR aleatoria o RAPD-PCR

La técnica RAPD (Williams y col., 1990) permite la detección de polimorfismos del ADN, por medio de amplificaciones aleatorias de múltiples regiones del genoma mediante PCR. El resultado es un patrón de productos amplificados de diferente peso molecular que pueden ser detectados mediante electroforesis en gel de agarosa. Esta técnica se caracteriza porque utiliza un único cebador el cual presenta como características especiales una corta longitud (aproximadamente 10 nucleótidos) y una secuencia arbitraria. Su principal ventaja es que no necesita información previa sobre la secuencia para el diseño del cebador.

II. OBJETIVOS

La calidad de un producto alimenticio se define como el grado en el que cumple un conjunto de características o rasgos diferenciadores que le confieren la aptitud para satisfacer las necesidades o expectativas establecidas (ISO 9000:2005). Al calificar la calidad de un alimento, se pueden aplicar diversos criterios de acuerdo con el punto de vista desde el que sea contemplado, los cuales, a su vez, van a ser los determinantes de sus características específicas:

- *Calidad nutricional*, que se refiere al aporte cualitativo y cuantitativo de nutrientes con el que ese alimento contribuye a las necesidades del organismo.
- *Calidad organoléptica*, que es aquello que determina la aceptabilidad de un alimento, delimitada en la práctica por la impresión percibida por los sentidos de aquellos efectos provocados por los atributos sensoriales.
- *Calidad sanitaria*, que se refiere a la conformidad del producto respecto a unas especificaciones o normas cuyo objetivo es combatir el fraude y garantizar la salubridad de los productos.
- *Calidad tecnológica*, que se ciñe a la correcta ejecución de los procesos de elaboración o producción.
- *Calidad económica*, que valora la accesibilidad para los consumidores y la relación calidad/precio.

Los atributos que más condicionan la aceptabilidad de un alimento por parte del consumidor son los relacionados con la calidad organoléptica o sensorial. En este sentido, uno de los atributos organolépticos más complejos y determinantes es el aroma. Este hecho explica el interés que existe, tanto en el campo científico como en el industrial, por conocer la composición y las posibles rutas de formación de los compuestos volátiles presentes en los alimentos.

Por otra parte, las nuevas tendencias del mercado, que demanda productos con un bajo contenido en sal, han marcado un gran reto a la industria alimentaria. En el caso de los productos cárnicos curados, la sal es el ingrediente fundamental debido a los numerosos beneficios tecnológicos que aporta a las características organolépticas del producto final y a su efecto modulador sobre la actividad de microorganismos y enzimas. Por tanto, se hace

necesario un estudio para determinar las posibles consecuencias o alcances que pueda tener la reducción del contenido salino sobre las características sensoriales de estos productos.

Además, debido a que en la industria alimentaria es difícil predecir las posibles diferencias sensoriales de productos tan heterogéneos como los cárnicos curados y, por tanto, proveer al mercado de alimentos aromáticamente estandarizados disminuyendo su variabilidad, se ha extendido el uso de cultivos iniciadores que permiten obtener una mayor uniformidad en los productos finales. Mantener un alto nivel de calidad del producto y una homogeneidad organoléptica en el mercado son aspectos que se han definido como claves en la consolidación de un producto de confianza.

Los estudios que se han realizado hasta el momento sobre el lacón con el fin de mejorar su calidad y subsanar los problemas derivados de la heterogeneidad de los productos presentes en el mercado han versado sobre la caracterización bioquímica del producto final (Marra y col., 1999), los cambios microbiológicos (Vilar y col., 2000) y bioquímicos (Lorenzo y col., 2003; Veiga y col., 2003) que tienen lugar durante su elaboración, el efecto de la utilización de distintos aditivos en el procesado (Lorenzo y col., 2007, 2008a, 2008b, 2010) y, más recientemente, el efecto del tiempo de salado sobre los cambios proteolíticos durante la maduración (Garrido y col., 2012).

A la vista del conocimiento científico actual de este producto, y dados los aspectos descritos que quedan por abordar, se planteó la presente Tesis Doctoral con los siguientes objetivos:

1. Determinar el perfil de compuestos volátiles durante la elaboración del lacón.
2. Determinar la influencia del tiempo de salado sobre las características sensoriales de este producto cárnico.
3. Determinar la influencia del tiempo de salado sobre los contenidos de algunos de los compuestos volátiles más característicos.
4. Determinar la influencia del tiempo de salado sobre el recuento de levaduras durante la elaboración del lacón e identificar las especies presentes.
5. Evaluar el efecto de la adición de cepas de levaduras seleccionadas en el perfil de compuestos volátiles generados durante la elaboración del lacón.

III. DISCUSIÓN GENERAL

III.I CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE COMPUESTOS VOLÁTILES DURANTE LA ELABORACIÓN DEL LACÓN

La calidad de los productos cárnicos curados depende, en gran medida, del aroma y sabor generados durante su elaboración. El proceso tecnológico y la materia prima utilizada son factores fundamentales que van a condicionar las características sensoriales y por tanto la calidad del producto final. La proteólisis y lipólisis representan dos de los procesos degradativos enzimáticos más importantes, que, junto con otras reacciones químicas que ocurren durante la elaboración de estos productos, van a ser responsables directamente del sabor y del aroma final (Flores y col., 1998; Toldrá y Flores, 2007). El sabor se asocia principalmente con los compuestos no volátiles como los aminoácidos libres y los oligopéptidos que se acumulan al final del proceso de elaboración, mientras que el aroma se relaciona con la generación de compuestos volátiles. Debido a la relación del aroma con la calidad final del producto, en los últimos años se han llevado a cabo diversas investigaciones relacionadas con la caracterización de productos cárnicos curados en base a su perfil de compuestos volátiles, así como el estudio de los factores que pueden influir en la generación de estos compuestos.

El primer objetivo de esta Tesis Doctoral fue caracterizar el perfil de compuestos volátiles responsables del flavor característico del lacón. A lo largo de su proceso de elaboración se identificaron 101 compuestos volátiles pertenecientes a las siguientes familias químicas: aldehídos (23), alcoholes (9), cetonas (15), hidrocarburos (37), ésteres (4), ácidos (3), furanos (4), compuestos azufrados (1), compuestos clorados (1) y otros compuestos no agrupados en las familias anteriores (4). Parte de estos compuestos fueron identificados positivamente comparando sus espectros de masas e índices de retención de Kovats con los patrones de referencia analizados en las mismas condiciones cromatográficas. El resto de compuestos fueron identificados tentativamente, comparando sus espectros de masas con los existentes en la base de datos de la librería NIST05, y por comparación de sus índices de Kovats con los existentes en la bibliografía.

En la pieza fresca solo se detectaron veintisiete compuestos volátiles con un área total de $875,20 \times 10^6$ unidades de área. Durante el proceso de elaboración se produjo un importante aumento tanto en número de compuestos como en área total, con 62 compuestos y un área de $1957,88 \times 10^6$ unidades de área al final del proceso de elaboración (Figura III.1). Este incremento fue más marcado durante la etapa de secado-maduración,

demostrando que es durante esta fase cuando se generan la mayoría de compuestos volátiles que forman el perfil aromático característico del lacón.

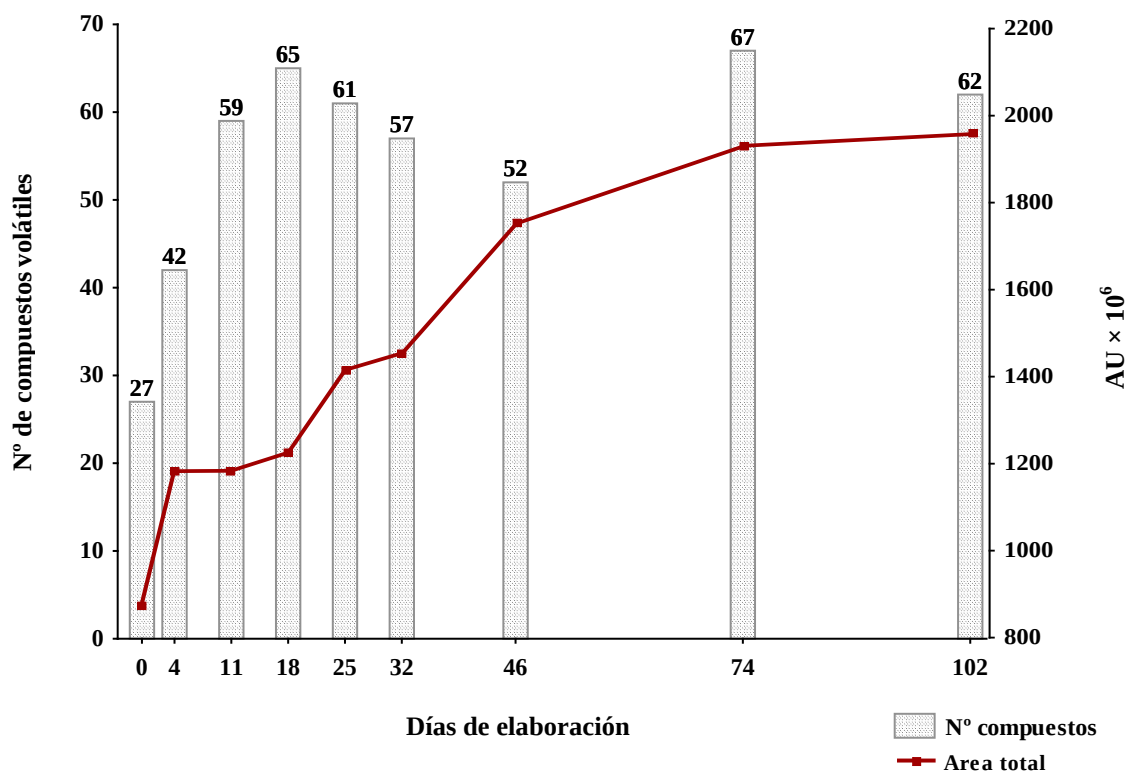


Figura III.1. Evolución del número de compuestos volátiles y del área total durante la elaboración del lacón

La mayor parte de los compuestos identificados en este estudio han sido previamente descritos en otros productos cárnicos crudo-curados (López y col., 1992; Sabio y col., 1998; Flores y col., 1998; Ruiz y col., 1998; Ruiz y col., 1999; Ruiz y col., 2002; Huan y col., 2005; Martín y col., 2006; Marušić y col., 2011). La familia química más abundante al final del proceso de elaboración del lacón, fue la de los aldehídos (Figura III.2). Este resultado coincide con lo descrito por otros autores en el jamón curado (López y col., 1992; Sabio y col., 1998; Ruiz y col., 1999; Ruiz y col., 2002; Huan y col., 2005; Sánchez-Peña y col., 2005; Kaban, 2009; Pugliese y col., 2010; Marušić y col., 2011). Otros estudios, sin embargo, mostraron que en el jamón “San Daniele” y en el lomo curado Ibérico la familia más abundante fueron los alcoholes (Gaspardo y col., 2008; Muriel y col., 2004), mientras que para el jamón de “Parma” predominaron mayoritariamente los ésteres (Bolzoni y col., 1996).

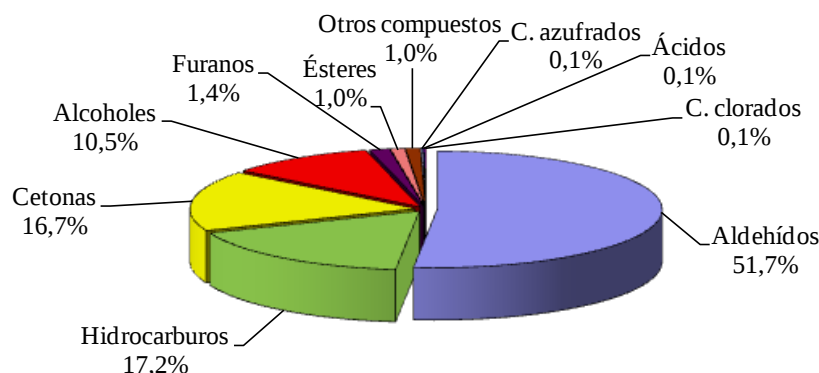


Figura III.2. Porcentaje de las distintas familias químicas de compuestos volátiles del lacón al final de su elaboración

Los aldehídos son compuestos carbonílicos, productos secundarios de la oxidación lipídica, que juegan un importante papel en el aroma final de los productos cárnicos crudos-curados (Muriel y col., 2004; Ramírez y Cava, 2007) debido a su bajo umbral de percepción y a sus olores característicos (Dirinck y col., 1997). Los precursores de los aldehídos son diversos dependiendo del tipo de aldehído considerado; así, los aldehídos lineales son productos típicos de la autooxidación de ácidos grasos insaturados como el oleico, linoleico, linolénico y araquidónico (Pastorelli y col., 2003), mientras que los aldehídos ramificados lo son de la desaminación-decarboxilación oxidativa de aminoácidos vía degradación de Strecker o del metabolismo microbiano (Forss, 1972; Ventanas y col., 1992; Sabio y col., 1998; Pastorelli y col., 2003). Dentro de la familia de los aldehídos lineales, el hexanal, ampliamente descrito como indicador del nivel de oxidación en productos cárnicos (Shahidi y Pegg, 1994; Ruiz y col., 1999; Ramírez y Cava, 2007), fue el compuesto más abundante en todos los puntos de muestreo estudiados, representando en el producto final un 31,77% del área total. Estos resultados coinciden con los recogidos en trabajos publicados por otros autores sobre jamón (García y col., 1991; Ruiz y col., 1999; Ramírez y Cava, 2007), donde el hexanal fue también el compuesto mayoritario. Otros aldehídos lineales como el pentanal y el heptanal aumentaron su área desde el brazuelo fresco hasta el final del proceso de elaboración. Entre los aldehídos ramificados, el 3-metilbutanal fue el más abundante al final del secado ($31,57 \times 10^6$ unidades de área). La formación de este compuesto ha sido atribuida a las reacciones de degradación de Strecker o al metabolismo microbiano, como se ha señalado anteriormente, aunque en el caso del lacón la ruta más probable parece ser la segunda ya que las condiciones de elaboración de este producto no son las más favorables para las reacciones de Strecker, que requieren temperaturas moderadamente altas, tiempos

muy largos de maduración y valores relativamente bajos de a_w (Bruna y col., 2001). La familia de aldehídos fue aumentando durante todo el proceso de elaboración alcanzando los mayores valores en el punto final. En todas las etapas la presencia de aldehídos lineales fue mayor que la de los ramificados.

Las familias químicas que le siguen en abundancia en el perfil de compuestos volátiles del lacón fueron los hidrocarburos y cetonas, cuyo origen se atribuye también a la oxidación lipídica (Flores y col., 1997a; Ansorena y col., 2001; Ruiz y col., 2002). Los hidrocarburos lineales saturados más abundantes al final del procesado fueron el pentano, heptano y octano, lo cual no es muy relevante puesto que estos compuestos tienen una repercusión escasa o nula en el aroma final debido principalmente a sus altos umbrales de percepción (Drumm y Spanier, 1991; García y Timón, 2001; Bianchi y col., 2007); sin embargo, la presencia de insaturaciones en la cadena disminuyen estos umbrales. La tendencia general de esta familia estuvo marcada por un incremento después de 7 días de post-salado, para disminuir y volver a aumentar durante la última fase del proceso de elaboración. En relación con las cetonas, en especial las 2-cetonas, se considera que tienen una gran influencia en el aroma de la carne y productos cárnicos (Novelli y col., 1995; Muriel y col., 2004). Durante el procesado, el punto de muestreo donde se obtuvo la mayor área para esta familia fue a los 28 días de secado-maduración. La cetona más abundante en el producto final fue la 3-octen-2-ona, alcanzando un valor final de $158,8 \times 10^6$ unidades de área, seguida por la 3,5-octadien-2-one y la 2-heptanona, esta última relacionada con el aroma a carne curada (Buscailhon y col., 1994).

Los alcoholes fueron la cuarta familia más abundante. Los alcoholes alifáticos, tanto saturados como insaturados, son productos de la autooxidación de ácidos grasos poliinsaturados (Pham y col., 2008), pero debido a sus altos umbrales de percepción en comparación con los aldehídos, su influencia en el desarrollo del aroma es mínima. Entre los alcoholes alifáticos detectados en este estudio se encuentran el 1-pentanol, 1-penten-3-ol, 1-hexanol y 1-octen-3-ol, que también han sido detectados por otros autores en productos cárnicos curados (García-Esteban y col., 2004; Muriel y col., 2004; Ramírez y Cava, 2007; Kaban, 2009). El 1-octen-3-ol es un alcohol insaturado que tiene un umbral de percepción muy bajo, por lo que es esperable tenga un papel importante en el aroma final (Sabio y col., 1998). Este compuesto ha sido observado por diversos autores en jamones (Sabio y col., 1998; Pugliese y col., 2010) y se asocia con el olor a champiñón (Barbieri y col., 1992). Los alcoholes ramificados con grupos metilo, sin embargo, son el resultado de la degradación de

Strecker de aminoácidos y de la degradación microbiana de los respectivos aldehídos ramificados (Gaspardo y col., 2008). En el presente estudio, los alcoholes más abundantes en el lacón crudo-curado fueron el 1-pentanol ($59,50 \times 10^6$ unidades de área) y el 1-octen-3-ol ($135,64 \times 10^6$ unidades de área). La evolución de esta familia química no siguió una tendencia determinada, incrementando y disminuyendo su valor de área total durante todo el proceso de elaboración hasta alcanzar su máximo a los 56 días de secado-maduración, para disminuir levemente en el punto final. En la Figura III.3 se muestra la evolución de las familias de compuestos químicos mayoritarias durante el proceso de elaboración del lacón.

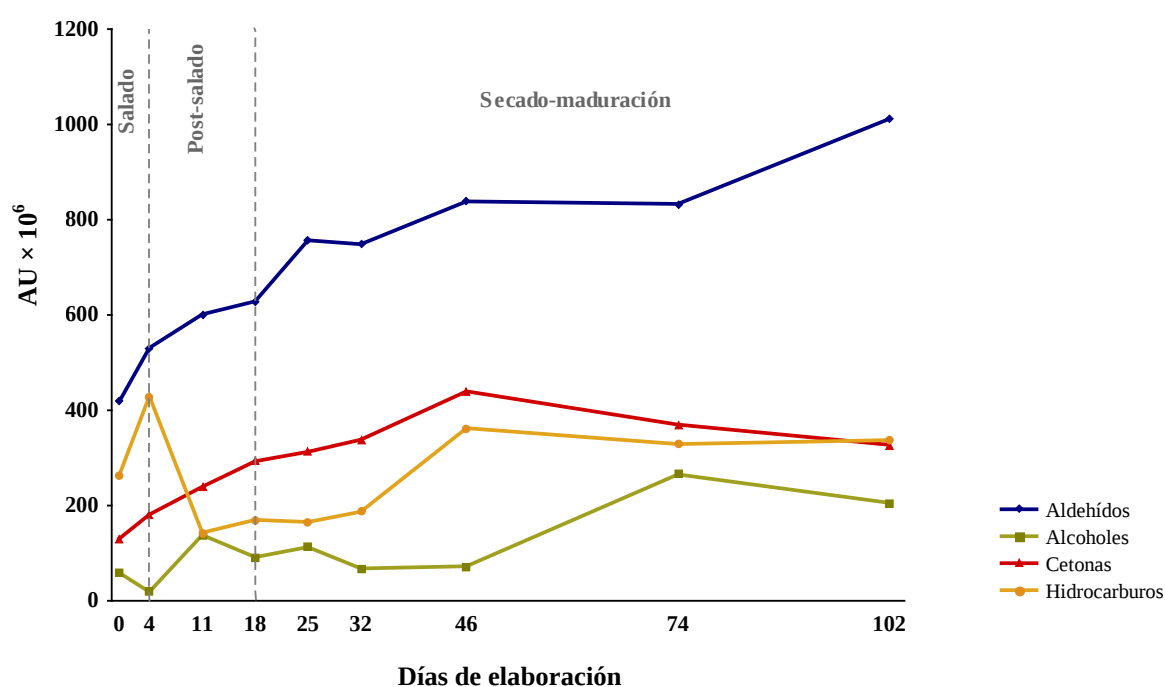


Figura III.3. Evolución de los compuestos volátiles pertenecientes a las familias mayoritarias durante la elaboración del lacón

Entre las familias minoritarias detectadas en el perfil aromático del lacón se encuentran los furanos, ésteres, ácidos, compuestos clorados y compuestos azufrados. Dentro de los furanos, el compuesto más destacado fue el 2-pentilfurano, producto de la oxidación del ácido linoleico y de otros ácidos grasos *n*-6 (Frankel, 1991; Ruiz y col., 2002) y que ha sido identificado en jamón Serrano, donde se le describe con aroma a “jamón” (Flores y col., 1997b) y frecuentemente en productos cárnicos crudo-curados (Ruiz y col., 1999; Dirinck y col., 1997; Berdagué y col., 1993). Los furanos suelen presentar umbrales de olfacción relativamente altos y por tanto se considera que su contribución no es

importante en el aroma global de los alimentos (Elmore y col., 1999). Sin embargo, el 2-pentilfurano muestra un bajo umbral de percepción (Fay y Brevard, 2005) por lo que su presencia podría ser importante en el aroma global del lacón.

Los ésteres se forman a partir de la condensación de ácidos grasos de cadena corta y media con alcoholes. La presencia de estos compuestos ha sido observada en otros productos cárnicos crudo-curados (Sabio y col., 1998; Ruiz y col., 1999; Muriel y col., 2004; Ramírez y Cava, 2007; Kaban, 2009; Pugliese y col., 2010), siendo más abundantes en las últimas etapas de elaboración del lacón crudo-curado (56 y 84 días de secado-maduración).

Los ácidos solo aparecen en la etapa de secado maduración (28 y 84 días). Los ácidos de cadena corta juegan un papel importante en el desarrollo del aroma debido a su bajo umbral de olfacción, mientras que los de cadena larga no influyen directamente en el aroma debido a su alto umbral de percepción, aunque su principal función es la de servir de precursores de otros compuestos volátiles (Muriel y col., 2004). En el producto final solo aparece el ácido hexanoico en cantidades muy pequeñas.

El único compuesto azufrado detectado durante todo el proceso de elaboración del lacón fue el dimetil disulfuro en la etapa de salado y al final de la etapa de secado-maduración. Su procedencia es la degradación de los aminoácidos azufrados probablemente mediante desaminación por parte de microorganismos (Berlitz y Grosch, 1999) y su olor ha sido descrito como “aroma a pies” (Flores y col., 1997b). Flores y col. (1997b) observaron que este compuesto disminuía durante el proceso del curado en el jamón, indicando que su presencia en productos cárnicos no es deseable en niveles elevados, debido a que origina normalmente olores desagradables (Flores y col., 1998).

Los compuestos clorados detectados en la elaboración del lacón provienen principalmente de los residuos de los pesticidas que el cerdo ingiere en su dieta (Buscailhon y col., 1991). En la Figura III.4 se muestra la evolución de las familias químicas minoritarias durante el proceso de elaboración del lacón.

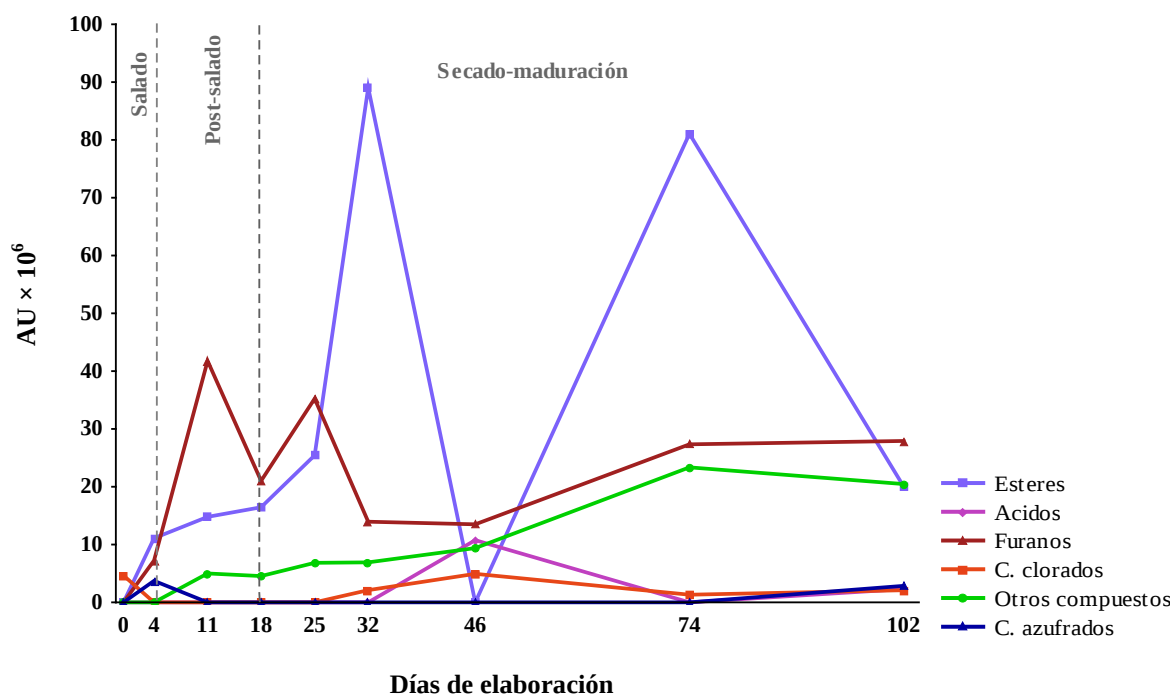


Figura III.4. Evolución de los compuestos volátiles pertenecientes a las familias minoritarias durante la elaboración del lacón

Al final del proceso de elaboración del lacón (a los 84 días de secado-maduración) su perfil aromático estuvo formado por 62 compuestos volátiles: 19 aldehídos, 5 alcoholes, 11 cetonas, 17 hidrocarburos, 2 ésteres, 1 ácido, 3 furanos, 1 compuesto azufrado, 1 compuesto clorado y otros 2 compuestos no pertenecientes a ninguna de las familias citadas. En base a estos resultados, se puede considerar que el perfil de compuestos volátiles detectados en el espacio de cabeza del lacón está principalmente definido por los compuestos derivados de las reacciones de oxidación lipídica. La cantidad de compuestos que conforman el perfil aromático del lacón al final de su elaboración es mucho menor que la observada para otros productos cárnicos crudo-curados como el jamón curado. Esto podría ser debido principalmente al menor tiempo de elaboración del lacón (~3 meses) en comparación con el tiempo de elaboración del jamón curado (6-12 meses) (Sabio y col., 1998; Ruiz y col., 1999; Sánchez-Peña y col., 2005).

Es importante tener en cuenta que los valores están expresados en unidades de área y no pueden explicar la contribución de cada compuesto al flavor global, ya que la cantidad de un compuesto no es necesariamente medida de su impacto, pues este depende fundamentalmente de su umbral de percepción y de sus coeficientes de partición en cada una de las fases (Carrapiso y col., 2002a; Carrapiso y col., 2002b; García-González y col., 2008).

III.2. EFECTO DEL TIEMPO DE SALADO SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DEL LACÓN

Las características sensoriales de los productos cárnicos crudo-curados dependen no sólo de la calidad de la materia prima, sino también de su proceso de elaboración. Pequeñas variaciones en el contenido de los compuestos sápidos y aromáticos pueden influir de una manera importante en la sensación percibida por los consumidores (Shahidi y col., 1986). Debido a esto, las modificaciones de la materia prima o las introducidas en el procesado pueden tener gran repercusión en la aceptabilidad del producto, ya que son los atributos aromáticos los que están más directamente relacionados con la calidad (Ruiz, 1996; Cava, 1997). Actualmente, debido a la probada relación existente entre el consumo de sal y el padecimiento de algunas enfermedades cardiovasculares, se está produciendo un importante incremento en la demanda de alimentos con un contenido reducido en sal. En el caso de los productos cárnicos crudo-curados, esta reducción puede derivar en un posible deterioro de la textura, comprometiendo la calidad sensorial de las salazones cárnicas.

El hecho de que los lacones salados durante 5 días (HS) presentaran un contenido en cloruros (17,36 y 20,89 g/100g de extracto seco a los 56 y 84 días de secado-maduración, respectivamente), significativamente mayor ($P < 0,001$) que los pertenecientes a los lotes MS (salados durante 4 días) y LS (salados durante 3 días), hizo que los catadores los percibieran más salados, otorgándoles puntuaciones significativamente ($P < 0,001$) superiores. De hecho, el sabor salado y el contenido en sal mostraron una correlación significativa a los 56 y 84 días de secado maduración ($r=0,62$, $P < 0,01$; $r=0,65$, $P < 0,01$). Por el contrario, el nivel de sal no afectó a las características sensoriales de textura estudiadas: fibrosidad, dureza, jugosidad y masticabilidad (Figura III.6). Arnau y col. (1997) tampoco encontraron diferencias en la dureza entre jamones con un contenido diferente en sal (6,5% vs. 7,9%). Los atributos sensoriales relacionados con la apariencia, olor y flavor (Figura III.5) tampoco mostraron diferencias significativas ($P > 0,05$) asociadas al nivel de sal. Estos resultados ponen de manifiesto que los diferentes tiempos de salado utilizados en este estudio parecen afectar solo al sabor salado y no al resto de atributos sensoriales.

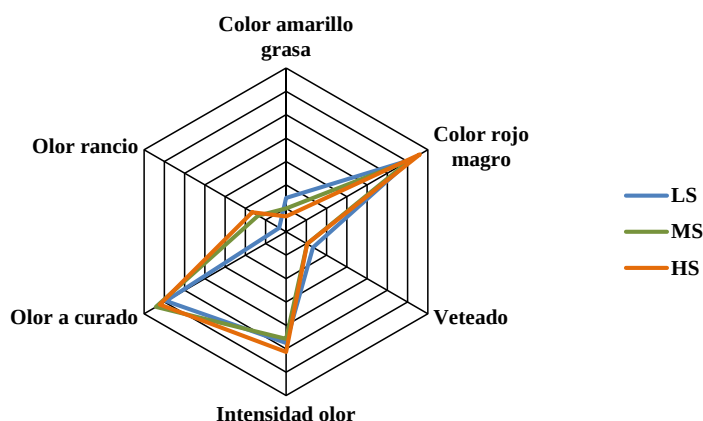


Figura III.5. Diagrama de araña que muestra los atributos de apariencia y olor de los tres lotes de lacón estudiados

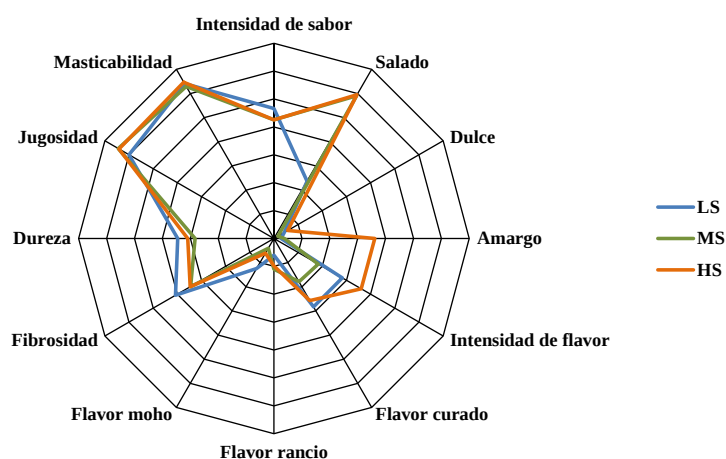


Figura III.6. Diagrama de araña que muestra los atributos de sabor, flavor y textura de los tres lotes estudiados

El contenido acuoso de los productos cárnicos crudo-curados disminuye en el salado debido al efecto osmótico producido por la sal y durante el secado por deshidratación. En el caso del lacón, el contenido en humedad expresado en porcentaje siguió una tendencia significativamente descendente ($P < 0,001$) en los tres lotes estudiados al aumentar el tiempo de procesado (56 y 84 días) como cabría esperar, sin embargo el descenso del contenido en humedad debido al incremento del tiempo de salazonado solo fue significativo ($P < 0,001$) al final del proceso de elaboración. Los valores finales de humedad obtenidos en los tres lotes oscilaron entre el 44 y 49% coincidente con lo obtenido por otros autores (Marra y col., 1999; Cobos y col., 2001; Lorenzo y col., 2003, 2008a) para el lacón; por tanto, las diferencias observadas en el contenido acuoso podrían ser debidas más a ligeras diferencias

en los parámetros ambientales que al nivel de sal. Gou (1998) dividió los factores que influyen en el secado del jamón en los relacionados con las propiedades del jamón y los relacionados con los parámetros del secadero. Entre los primeros se encontraban el espesor, el coeficiente de difusión (que depende del contenido en agua, grasa, sal, etc.) y el tipo de pulido del jamón, mientras que entre los segundos se hallaban la temperatura, la humedad relativa y la velocidad del aire.

El color es el atributo que mayor influencia ejerce sobre el consumidor ya que se relaciona íntimamente con la calidad del alimento (Zanardi y col., 1999). La coordenada a^* (rojo-verde) no se vio afectada mientras que la b^* (coordenada azul-amarillo) y la L^* (luminosidad) presentaron diferencias significativas ($P < 0,001$) al final del proceso de elaboración asociadas al nivel de sal. Los valores de luminosidad disminuyeron al aumentar el tiempo de salado (35,23 vs. 35,07 vs. 32,42 para LS, MS y HS, respectivamente) al igual que los valores de b^* (8,08 vs. 7,80 vs. 7,27 para LS, MS y HS, respectivamente). Estos resultados coinciden con los observados por Sánchez-Rodríguez y col. (2001) en jamón Ibérico y con los descritos por Chizzolini y col. (1996) en jamón curado. Sin embargo, otros autores (García-Esteban y col., 2003) observaron el efecto contrario en jamón curado, obteniendo mayores valores de b^* en los músculos que poseían menor concentración de sal. No obstante, las variaciones en la apariencia en las piezas curadas enteras están relacionadas principalmente con su heterogeneidad así como con su grado de deshidratación.

Una cantidad insuficiente de NaCl en los productos cárnicos crudo-curados favorece una proteólisis excesiva, que da lugar a la aparición de texturas blandas y pastosas, las cuales reducen la aceptabilidad del producto (Arnau y col., 1991). La sal tiene un efecto estabilizador sobre las actividades enzimáticas y facilita cambios en la estructura miofibrilar debido al aumento de la presión osmótica favoreciendo la accesibilidad de las proteasas a las proteínas miofibrilares. Distintos autores (Toldrá y Eteherington, 1988; Sárraga y col., 1989; Rico y col., 1990; Arnau y col., 1998; Gil y col., 1999) comprobaron que la sal inhibe la acción de las enzimas proteolíticas. Generalmente está aceptado que cuanto menor es el contenido en sal, más blando es el jamón como consecuencia del efecto inhibidor de la sal sobre las enzimas (Parolari y col., 1988; Parolari, 1994, 1996; Arnau y col., 1997). La medida instrumental de la dureza de los tres lotes de lacón estudiados en este trabajo mostró un incremento significativo tanto al aumentar el tiempo de procesado como el tiempo de salado. En esta medida influyen varios factores relacionados con la muestra entre los que se pueden destacar la temperatura de cocinado, la uniformidad de la muestra a analizar, la

dirección de las fibras musculares, la cantidad y distribución de la materia grasa y de tejido conectivo y la temperatura de la muestra. Otros autores (Gou y col., 2008; Morales y col., 2007) observaron en músculos de jamón curado un resultado similar a los obtenidos en este trabajo acerca del efecto de la sal sobre la dureza. A la vista de estos resultados, podemos afirmar que la dureza está influenciada por el contenido en NaCl, ya que los lacones sometidos a un mayor tiempo de salado presentan mayor dureza, debido a que altos contenido en sal compactan la estructura miofibrilar (Shomer y col., 1987) y a que la sal produce un efecto inhibitorio en la actividad de las calpaínas (Geesink y Koohmaraie, 1999, 2000).

La variabilidad entre las medidas sensoriales e instrumentales en este estudio se puede atribuir principalmente al cocinado del lacón para el análisis sensorial. Antes del cocinado, las muestras fueron desaladas durante 48 horas. Este desalado se puede considerar como una operación de extracción sólido-líquido en la que se produce una transferencia de componentes, principalmente iones Na^+ y Cl^- , y proteínas solubles del lacón salado al agua de desalado, pudiendo esta transferencia afectar a los atributos sensoriales. Posteriormente, las muestras fueron cocinadas durante 2 horas; durante este tratamiento térmico se producen dos cambios fundamentales, endurecimiento de las fibras musculares por coagulación de las proteínas y ablandamiento del tejido conectivo debido a la transformación del colágeno en gelatina (Lawrie, 1998). La temperatura alcanzada influye especialmente en la ternura de las fibras musculares mientras que el tiempo de cocción lo hace sobre el tejido conectivo (Varnam y Sutherland, 1998). De acuerdo con lo expuesto, podemos considerar que tanto la operación de desalado como la de cocinado pudieron repercutir en determinados atributos sensoriales del producto final y por tanto influir en las diferencias mostradas entre el análisis sensorial y el análisis instrumental.

La combinación de los métodos sensoriales, que aportan datos globales de la medida de la percepción del aroma y del sabor, con los métodos instrumentales permite obtener un cuadro completo de los perfiles aromáticos generados durante el consumo del alimento (Taylor, 1996). Estos estudios combinados de ambas técnicas han permitido demostrar que la medida de un perfil de volátiles durante el consumo difiere del perfil que muestran alimentos sin cocinar.

III.3. EFECTO DEL TIEMPO DE SALADO SOBRE LA GENERACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES DURANTE LA ELABORACIÓN DEL LACÓN

Debido a que el número de compuestos volátiles identificado en el perfil del lacón es muy numeroso, para realizar este estudio se eligieron 13 aldehídos, 4 alcoholes, 6 cetonas, 13 hidrocarburos, 3 ésteres, 2 furanos y 3 compuestos no pertenecientes a las familias químicas anteriores, en base al anterior estudio teniendo en cuenta su área y presencia en el lacón crudo-curado. Asimismo, se disminuyeron los puntos de muestreo limitándolos al final de cada etapa: pieza fresca, después del salado, al final de la etapa de post-salado y al final de la etapa de secado-maduración.

En la Figura III.7 se muestra la evolución del área cromatográfica (expresada en $UA \times 10^6$) obtenida para el total de compuestos volátiles estudiados durante el proceso de elaboración del lacón con distintos niveles de sal (LS= 3 días de salado; MS= 4 días de salado y HS= 5 días de salado).

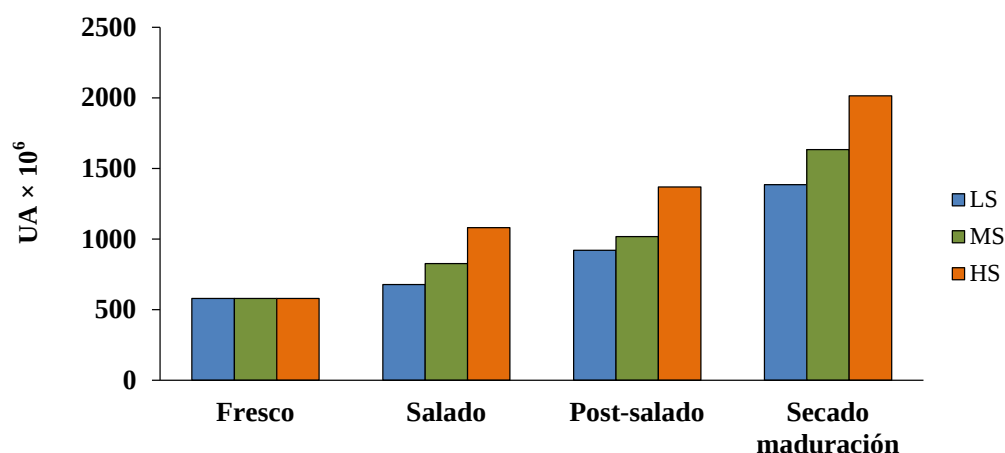


Figura III.7. Efecto del tiempo de salado en la abundancia relativa del total de compuestos volátiles durante la elaboración del lacón

En los tres lotes, el área cromatográfica total detectada en el espacio de cabeza de los lacones aumentó de forma significativa ($P < 0,001$) con el tiempo de procesado; este aumento estuvo condicionado en todo momento por el contenido en sal, presentando el lote salado durante 5 días (HS) los mayores valores de área al final de cada etapa.

Se encontraron diferencias entre los distintos niveles de sal para las familias químicas de aldehídos, alcoholes, cetonas y ésteres al final de la etapa de secado-maduración; mientras que los hidrocarburos, furanos y otros compuestos no presentaron diferencias significativas. La familia más abundante al final del proceso de elaboración del lacón fue la de los aldehídos para los tres lotes estudiados (LS, MS y HS).

La suma total del área de los aldehídos mostró diferencias significativas ($P < 0,001$) entre los distintos niveles de sal en cada punto de muestreo, siendo mayores los valores en el lote salado durante 5 días (HS). Entre los aldehídos lineales, productos de la autooxidación de ácidos grasos insaturados (Pastorelli y col., 2003), pentanal, hexanal y heptanal fueron los compuestos más abundantes, mostrando importantes diferencias cuantitativas ($P < 0,01$ para el pentanal y $P < 0,001$ para hexanal y heptanal) debidas al nivel de sal, siendo mayor su valor en el lote HS. Estos resultados indican una mayor oxidación lipídica en el lote salado durante más tiempo, relacionada con el efecto prooxidante de la sal (Kanner y col., 1991). Otros autores (Sárraga y col., 1998; Aguirrezábal y col., 1991) han observado este efecto prooxidante de la sal tanto en sistemas modelo como en productos cárnicos. Pérez-Juan y col. (2006) también detectaron que la oxidación de ácidos grasos insaturados a compuestos orgánicos volátiles es favorecida en el jamón por la concentración de sal. Por el contrario, en otros estudios (Andrés y col., 2007; Stahnke, 1995) no se mostraron variaciones debido al nivel de sal.

Entre los aldehídos ramificados, el 3-metilbutanal, cuya formación se atribuye a las reacciones de degradación de Strecker o al metabolismo microbiano, apareció en la pieza fresca, disminuyendo después del salado en todos los lotes, (no se detectaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en este punto de muestreo), para después aumentar significativamente ($P < 0,001$) durante la etapa de post-salado y secado-maduración en los tres lotes estudiados, siendo este incremento más marcado en el lote LS (57.44 vs. 31.57 y 25.52×10^6 unidades de área para los lotes LS, MS y HS, respectivamente). Este resultado indica que el nivel de sal influyó significativamente sobre la dinámica del contenido en 3-metilbutanal en la pieza final del lacón, poniendo de manifiesto que los altos contenidos en sal inhiben parcialmente la proteólisis y las reacciones de degradación de Strecker de los aminoácidos y el metabolismo microbiano.

El tiempo de salado también afectó significativamente al contenido en alcoholes y cetonas, siendo estas diferencias más marcadas al final de la etapa de secado-maduración. En ambos casos se alcanzaron los mayores valores en el lote salado durante 5 días (HS).

Entre los alcoholes, el predominante al final del proceso de elaboración fue el 1-octen-3-ol, proveniente de la rotura oxidativa del ácido linoleico. Otros estudios (Rabe y col., 2003; Salles, 2006) observaron que el NaCl incrementa la volatilidad del 1-octen-3-ol debido a la disminución de moléculas de agua para su solubilización. Estos resultados están en concordancia con el efecto prooxidante de la sal. Las cetonas, (cuyo origen es la oxidación lipídica), más abundantes fueron la 2-heptanona y la 3-octen-2-ona. Ambas presentaron diferencias significativas ($P < 0,01$) asociadas al nivel de sal al final del proceso de elaboración, alcanzando sus valores máximos en las piezas pertenecientes al lote HS ($102,20$ y $204,60 \times 10^6$ unidades de área, para la 2-heptanona y la 3-octen-2-ona, respectivamente).

Con respecto a los ésteres, también se observó un efecto significativo del tiempo de salado ($P < 0,001$), tanto al final del salado como al final de la etapa de secado-maduración, alcanzándose en esta última fase los mayores niveles en los lotes LS y MS. Estos resultados pueden ser debidos a la actividad antimicrobiana de la sal (Gaspardo y col., 2008), mostrando el lote con mayor contenido en sal la menor cantidad de ésteres ($0,16 \times 10^6$ unidades de área vs. $2,09$ y $2,49 \times 10^6$ unidades de área en los lotes HS, LS y MS, respectivamente).

Los resultados obtenidos en este trabajo no concuerdan con los obtenidos en el estudio sensorial descrito previamente, debido principalmente a la relación existente entre el contenido en hexanal y el flavor rancio (Lai y col., 1995). El estudio de los compuestos volátiles en productos cárnicos crudo-curados está normalmente basado en su abundancia sin tener en cuenta su contribución al aroma final. De acuerdo con algunos autores (Carrapiso y col., 2002a; Carrapiso y col., 2002b; García-González y col., 2008) la cantidad de un compuesto en un alimento no es necesariamente una medida exacta de su impacto sensorial, debido a que este impacto depende de su umbral de olfacción, así como de las interacciones entre compuestos. Por tanto, el valor del área de los compuestos volátiles no puede explicar la contribución individual de cada compuesto al flavor global. Andrés y col. (2007) propusieron varias relaciones entre el contenido de hexanal y otros compuestos volátiles. Otros autores (Antequera y col., 1992; Ruíz y col., 2002) indicaron como un posible marcador de notas aromáticas agradables en jamón la relación entre los compuestos derivados de los ácidos grasos *n*-6 y los compuestos del ácido oleico. En el presente estudio, la relación entre las áreas del hexanal (principal responsable del aroma a rancio) y el resto de los compuestos aldehídos volátiles (aroma agradable) al final del procesado de elaboración del lacón fueron: $1,76$, $1,98$ y $1,98$ ($P > 0,05$) para las muestras de los lotes LS, MS y HS,

respectivamente. Esta falta de efecto significativo sugiere que la relación entre el principal precursor del aroma a rancio (hexanal) y los precursores de aromas agradables podrían explicar los resultados obtenidos en el análisis sensorial. Otra explicación para lo observado podría ser que las diferencias en las unidades de área del hexanal entre lotes no fueron suficientes para superar el umbral de diferenciación del rancio por parte de los panelistas y, por tanto, esta diferencia no fue detectada.

III.4. EFECTO DEL TIEMPO DE SALADO SOBRE EL RECuento, ESPECIES Y CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE LEVADURAS DURANTE LA ELABORACIÓN DEL LACÓN

De acuerdo con estudios recientes (Martín y col., 2006; Andrade y col., 2009a, 2009b), las levaduras parecen tener una importante contribución en las características sensoriales de los productos cárnicos curados debido principalmente a sus actividades proteolíticas y lipolíticas (Martín y col., 2004; Simoncini y col., 2007), así como a su participación en la generación de compuestos volátiles que contribuyen al aroma de este tipo de productos (Flores y col., 2004; Bolumar y col., 2006; Martín y col., 2006; Andrade y col., 2009a, 2009b).

En el presente estudio el tiempo de procesado influyó significativamente ($P < 0,001$) en el recuento de levaduras en los tres lotes estudiados (LS-3 días de salado, MS-4 días de salado y HS-5 días de salado), tanto en la superficie como en el interior de las piezas. En las figuras III.8 y III.9 se representan los valores medios de los recuentos a lo largo de las fases de post-salado y secado-maduración para los tres lotes (LS, MS y HS) y las dos localizaciones (superficie e interior) estudiadas. Durante la fase de post-salado los recuentos pertenecientes a los tres lotes y a las dos localizaciones experimentaron un notable incremento (del orden de 1 unidad logarítmica). En el interior de las piezas saladas 3 días (LS) se produjo un aumento de los recuentos durante los primeros 7 días de la etapa de secado-maduración (del orden de 2 unidades logarítmicas) para después disminuir ligeramente hasta el día 14 de esta etapa y mantenerse constantes a partir de ese momento hasta el final del proceso de elaboración (102 días). En el interior de las piezas saladas 4 días y en la superficie de los lacones de los lotes LS (3 días de salado) y MS (4 días de salado), los recuentos experimentaron un incremento durante los 14 primeros días de la etapa de secado-maduración, seguido de un descenso hasta el día 46 de elaboración, para después

mantenerse constantes durante el resto del periodo de secado-maduración, alcanzando valores de 6,46, 6,59 y 6,32 log cfu/g, respectivamente. En el caso de las piezas de lacón saladas durante 5 días (HS), los recuentos de levaduras en la superficie y en el interior siguieron una tendencia similar; incremento hasta el día 46 de elaboración seguido de un ligero descenso constante hasta el final del proceso de elaboración.

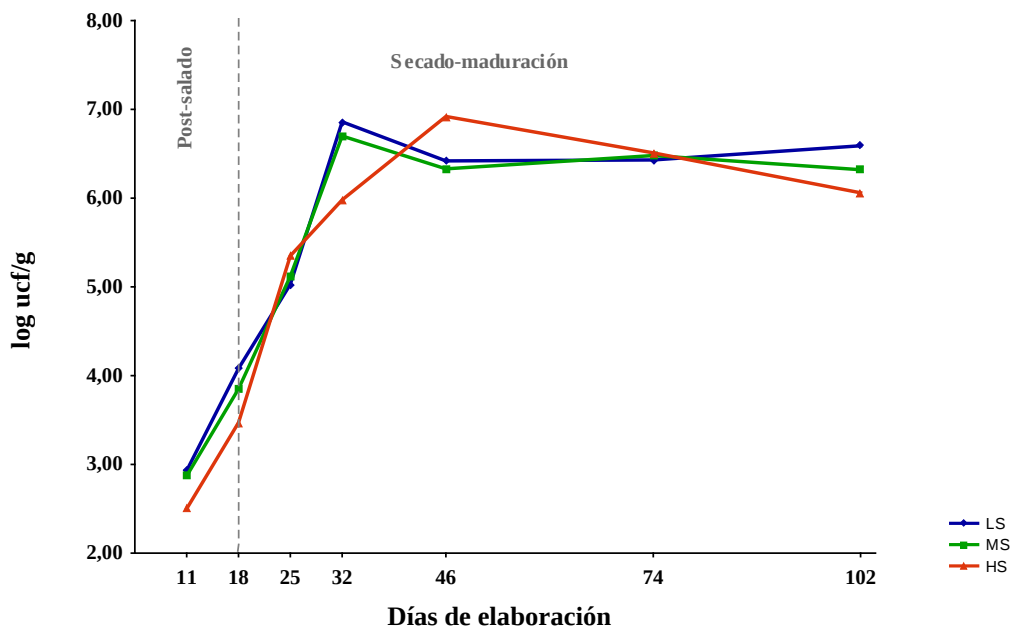


Figura III.8. Evolución del recuento de levaduras en la superficie de las piezas durante las etapas de post-salado y secado-maduración

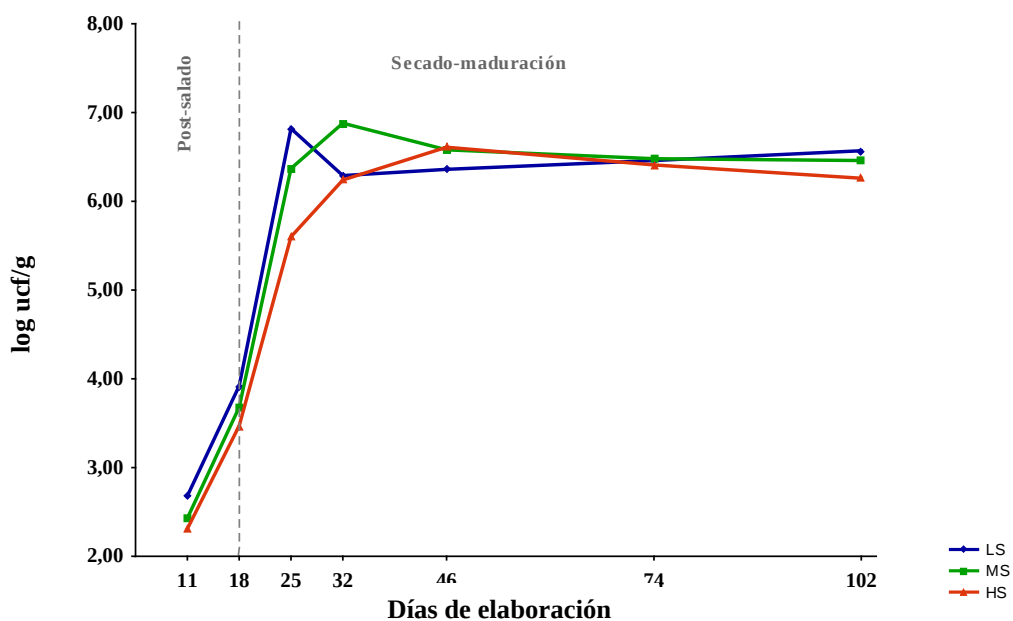


Figura III.9. Evolución del recuento de levaduras en el interior de las piezas durante las etapas de post-salado y secado-maduración

Después de 7 días de post-salado, el recuento de levaduras en la superficie de las piezas fue mayor en los lotes elaborados con menor cantidad de sal (2,93 vs. 2,87 y 2,50 log ufc/g en la superficie y 2,31 vs. 2,43 y 2,68 log ufc/g en el interior de las piezas para los lotes LS, MS y HS, respectivamente). Estos recuentos fueron menores que los observados por Vilar y col. (2000) en este mismo producto, aunque coinciden con los valores obtenidos por otros autores en jamón y cecina (Huerta y col., 1988; Núñez y col., 1996; García y col., 1995). Durante la etapa de secado-maduración, el recuento de levaduras permaneció constante hasta el final del proceso, observándose unos valores medios finales de 6,37 log ufc/g, los cuales están en la misma línea de los obtenidos por otros autores en productos cárnicos crudo-curados (García y col., 1995; Silla y col., 1989). Durante la etapa de secado-maduración, el recuento de levaduras en la superficie no presentó diferencias significativas asociadas al nivel de sal ($P > 0,05$). Por el contrario, en el interior de las piezas se observaron diferencias significativas ($P < 0,01$) entre los distintos tiempos de salado, presentando el lote con menor tiempo de salado los mayores recuentos (6,57 vs. 6,46 y 6,26 log ufc/g al final del secado-maduración para LS, MS y HS, respectivamente).

Durante la etapa de secado-maduración se obtuvieron 226 aislados (Tabla III.1), de los cuáles 64 se perdieron en la fase de obtención de cultivos puros y 11 se identificaron como bacterias. Los 151 restantes se identificaron a nivel especie mediante técnicas moleculares amplificación por PCR y posterior secuenciación.

Tabla III.1. Número de aislados obtenidos en la superficie y en el interior de las piezas de lacón de los tres lotes estudiados en cada punto de muestreo de la etapa de secado-maduración

		Número de aislados durante la etapa de secado-maduración					
		7 días	14 días	28 días	56 días	84 días	Total
LS	Interior	10	13	9	7	8	47
	Superficie		10	7	5	6	28
MS	Interior	5	10	7	7	9	38
	Superficie	4	11	8	9	9	41
HS	Interior	6	8	7	8	6	35
	Superficie	2	9	7	10	9	37
							226

La amplificación de las zonas de ADN_r señaladas (Figura III.10) utilizando los iniciadores Its-1 e Its-4 y la posterior secuenciación de los fragmentos amplificados permite identificar las levaduras.

Figura III.10. Estructura del ADN ribosómico con los fragmentos ITS (Internal Transcriber Spacers)

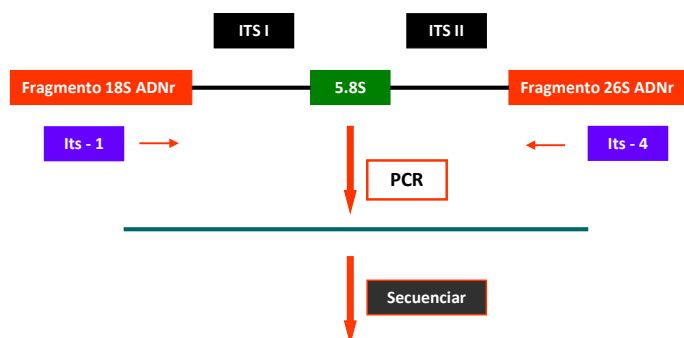


Figura III.10. Estructura del ADN ribosómico con los fragmentos ITS (Internal Transcriber Spacers)

Las 151 levaduras identificadas pertenecieron a 4 géneros diferentes: *Debaryomyces*, *Candida*, *Cryptococcus* y *Rhodotorula*. A continuación se muestra la distribución de las especies de levaduras identificadas tanto del interior como en la superficie del lacón en los tres lotes estudiados (LS, MS y HS).

Tabla III.2. Distribución de las especies de levaduras aisladas durante la elaboración del lacón en los lotes LS, MS y HS

LS	Superficie	Profundidad
<i>Debaryomyces hansenii</i>	16	20
<i>Cryptococcus curvatus</i>	1	3
<i>Candida deformans</i>	2	1
<i>Candida zeylanoides</i>	3	-
MS	Superficie	Profundidad
<i>Debaryomyces hansenii</i>	26	19
<i>Cryptococcus curvatus</i>	-	2
<i>Candida zeylanoides</i>	-	4
<i>Candida spp.</i>	2	1
<i>Rhodotorula glutinis</i>	1	1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	-
HS	Superficie	Profundidad
<i>Debaryomyces hansenii</i>	18	18
<i>Candida zeylanoides</i>	1	4
<i>Candida spp.</i>	-	1
<i>Candida deformans</i>	1	4
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	1

Durante este trabajo se aislaron 79 levaduras en la superficie y 72 en el interior de las piezas. Se identificaron las especies *Debaryomyces hansenii*, *Candida zeylanoides*, *Candida deformans*,

Cryptococcus curvatus, *Rhodotorula mucilaginosa* y *Rhodotorula glutinis*, siendo la primera la dominante con cerca del 48 y 56% del total de los aislados del interior y exterior de las piezas, respectivamente; cuatro cepas adscritas al género *Candida* no pudieron ser identificadas de modo fiable a nivel de especie. Estos resultados coinciden básicamente con los observados por otros autores en productos cárnicos crudo-curados (Andrade y col., 2009a, 2009b; Cocolin y col., 2006; Comi y Cantoni, 1983; Encinas y col., 2000; Gardini y col., 2001; Huerta y col., 1988; Núñez y col., 1996; Simoncini y col., 2007) en los que *D. hansenii* fue también la levadura predominante. La temperatura óptima para el crecimiento de *D. hansenii* es de 10 °C (Van den Tempel y Jakobsen, 2000), esta circunstancia junto con su tolerancia a la sal, explica que fuera la especie predominante durante la etapa de secado-maduración en todos los lotes estudiados.

La segunda levadura más abundante entre los aislamientos realizados fue *C. zeylanoides*, que representó un 6,6% y un 3,8% del total de aislados en el interior y exterior, respectivamente, de las piezas estudiadas. Esta especie fue aislada principalmente durante los primeros días del proceso de secado-maduración, lo que concuerda con lo descrito por otros autores (Cocolin y col., 2006; Núñez y col., 1996; Simoncini y col., 2007) que observaron que esta especie solo estaba presente en las primeras etapas del curado de los productos cárnicos crudo-curados, desapareciendo después durante el proceso de elaboración. *C. deformans* (3,5%), *Cryptococcus curvatus* (2,6%), *Candida* spp. (1,8%), *Rhodotorula glutinis* (0,9%) y *Rhodotorula mucilaginosa* (0,9%) fueron las especies aisladas con menor frecuencia.

Posteriormente, se llevó a cabo el estudio de la actividad lipolítica y proteolítica de las cepas identificadas. Un 47,7% mostraron actividad lipolítica frente a la tributirina, mientras que solo un 19,2% mostraron actividad proteolítica. Huerta y col. (1988) observaron actividad lipolítica en la mayoría de las levaduras aisladas en jamón curado. Sesenta y cuatro de las cepas identificadas como *D. hansenii* mostraron actividad lipolítica y 5 de ellas también mostraron actividad proteolítica.

Tabla III.3. Número de aislados de cada especie de levaduras obtenidas del exterior y el interior de las piezas de lacón, y actividad proteolítica y lipolítica de estos aislados

	Muestras interior	Muestras exterior	Lipólisis total (%)		Proteólisis total (%)	
	total (%)	total (%)	Interior	Exterior	Interior	Exterior
<i>Debaryomyces hansenii</i>	57(65,8)	60(83,3)	44(55,6)	20(27,7)	8(10,1)	8(11,1)
<i>Candida zeylanoides</i>	8(10,1)	4(5,5)	6(7,6)			1(1,4)
<i>Candida deformans</i>	5(6,3)	3(4,2)		1(1,4)	5(6,3)	3(4,2)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	5(6,3)	1(1,4)	1(1,2)			
<i>Candida</i> spp.	2(2,5)	2(2,8)			2(2,5)	2(2,8)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1(1,3)	1(1,4)				
<i>Rhodotorula glutinis</i>	1(1,3)	1(1,4)				
Total	79(100)	72(100)	51(64,5)	21(29,2)	15(18,9)	14(19,4)

Algunos estudios han mostrado que cepas de *D. hansenii* aisladas de jamón curado presentan una intensa actividad proteolítica sobre las proteínas miofibrilares cuando son inoculadas en carne de cerdo fresca (Rodríguez y col., 1998) y provocan un incremento en la proteólisis y lipólisis de otros productos cárnicos crudo-curados (Patrignani y col., 2007).

La actividad lipolítica estuvo relacionada con la cepa y no con la localización en las piezas (interior o superficie), lo cual está en concordancia con lo observado por otros autores (Saldanha-da-Gama y col., 1997; Simoncini y col., 2007).

La importancia de las levaduras en los procesos de elaboración de productos cárnicos crudo-curados se debe principalmente a su posible contribución a la generación de compuestos volátiles. La caracterización por tanto de las levaduras en base a esta propiedad y su asociación a la generación de compuestos volátiles podría ser de gran interés para la industria, ya que permitiría seleccionar las más adecuadas para usar como cultivos iniciadores. De esta forma, se podrían conseguir lotes de producción de mejor calidad organoléptica, con caracteres sensoriales más constantes y homogéneos.

III.5. INFLUENCIA DE LA INOCULACIÓN DE *Debaryomyces hansenii*, *Candida deformans* y *Candida zeylanoides* SOBRE EL PERFIL AROMÁTICO DEL LACÓN

Con el objetivo de evaluar la influencia de las levaduras en la formación de compuestos volátiles durante la elaboración del lacón crudo-curado se inocularon tres lotes de lacones con tres cepas distintas de levaduras autóctonas aisladas e identificadas en el trabajo previo ya descrito y discutido. La selección de estas cepas, *Debaryomyces hansenii* (DH), *Candida deformans* (CD) y *Candida zeylanoides* (CZ) se basó en su abundancia y en sus particulares actividades proteolítica y lipolítica. *Debaryomyces hansenii* (cepa 2106) presentó una actividad proteolítica negativa y una actividad lipolítica positiva muy elevada, *Candida deformans* (cepa 2149) presentó una actividad proteolítica positiva y una actividad lipolítica negativa y *Candida zeylanoides* (cepa 2146) mostró una actividad proteolítica negativa y una actividad lipolítica positiva y muy elevada.

Una vez transcurridos los 84 días de secado-maduración, se identificaron un total de 42 compuestos volátiles en los 4 lotes de lacones elaborados (control, DH, CD y CZ). Desde un punto de vista cualitativo, el perfil aromático global fue muy similar entre todos los lotes. Sin embargo, desde el punto de vista cuantitativo se observaron diferencias significativas ($P < 0,001$) en el área total, siendo ésta mayor en los lotes inoculados que en el lote control. Teniendo en cuenta que todos los lotes fueron elaborados bajo las mismas condiciones tecnológicas, es lógico pensar que fueron las diferentes levaduras inoculadas las que produjeron estas diferencias en el perfil aromático. En el lote

control no inoculado se detectaron 30 compuestos volátiles; en el DH, 33 compuestos; en el CD, 28 compuestos y en el CZ, 29 compuestos.

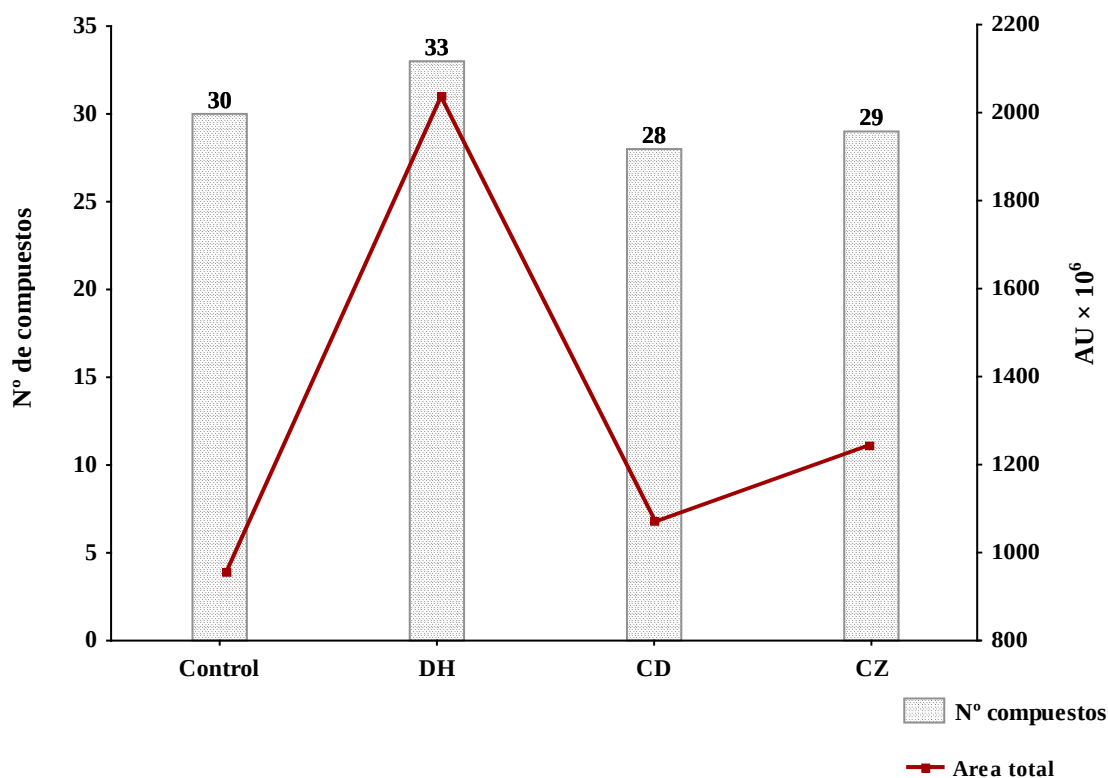


Figura III.12. Número de compuestos volátiles y área total ($UA \times 10^6$) en los lotes de lacón estudiados: control, inoculado con *Debaryomyces hansenii* (DH), inoculado con *Candida deformans* (CD) e inoculado con *Candida zeylanoides* (CZ)

Los ésteres fueron la familia química más abundante alcanzando los valores de área más elevados en los lotes inoculados con *D. hansenii* ($627,86$ vs. $403,72$ vs. $298,89 \times 10^6$ unidades de área, para DH, CD y control, respectivamente). Por el contrario, en el lote inoculado con *C. zeylanoides* (CZ) los hidrocarburos fueron la familia mayoritaria. Los ésteres se forman mediante la esterificación enzimática o no enzimática de ácidos grasos libres y alcoholes generados durante la oxidación lipídica en el tejido intramuscular (Shahidi y col., 1986), aunque también se ha descrito la formación de ésteres debido a la actividad esterásica de ciertos microorganismos (Ventanas, 2001). La contribución de las levaduras a la generación de estos compuestos volátiles mediante la esterificación de alcoholes y ácidos carboxílicos ha sido previamente descrita en productos cárnicos crudo-curados inoculados con este grupo microbiano (Shahidi y col., 1986; Olesen y Stahnke, 2000; Alonso, 2004; Flores y col., 2004). Los ésteres más abundantes fueron el isopentanoato de metilo y el hexanoato de metilo. El contenido de estos compuestos fue significativamente mayor ($P < 0,001$)

en los lacones inoculados con *D. hansenii* y *C. deformans*. El éster heptanoato de metilo sólo se identificó en los lotes DH y CZ, mientras que el propanoato de metilo sólo se observó en los lacones inoculados con *D. hansenii*.

Entre los hidrocarburos lineales, el hexano fue el compuesto mayoritario en todos los lotes estudiados, mostrando diferencias significativas ($P < 0,01$) entre el lote control y los lotes inoculados. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0,001$) entre los valores de la suma de todos los hidrocarburos lineales de cada lote (141,26; 71,93; 62,84 y $43,16 \times 10^6$ unidades de área, en los lotes DH, CD, CZ y control, respectivamente), siendo mayor el valor en los lotes inoculados que en el lote control. Estos resultados no son relevantes en cuanto a la repercusión sobre el aroma, debido a que los hidrocarburos lineales presentan altos umbrales de olfacción (Shahidi y col., 1986; Bianchi y col., 2007). En relación a los hidrocarburos ramificados, el lote inoculado con CZ presentó los valores de área más altos ($372,71 \times 10^6$ unidades de área) debido principalmente a los elevados valores de 2,6-dimetil octano y 2,8-dimetil undecano, representando estos compuestos el 50% del área total de esta familia química. Estos resultados están en consonancia con los mostrados por Tejeda y col. (2001), quienes comprobaron que algunos microorganismos pueden contribuir a las diferencias encontradas en n-alcanos en jamón. Otros autores (Ruiz y col., 1999; Martín y col., 2006) observaron que el incremento de los hidrocarburos lineales y ramificados podría ser debido a la actividad lipolítica microbiana.

Los lotes inoculados presentaron una menor área de aldehídos que el lote control ($P < 0,001$). Esta diferencia viene determinada principalmente por la cantidad de hexanal en el lote control ($105,99 \times 10^6$ unidades de área). Este resultado sugiere una menor oxidación lipídica en las muestras inoculadas, probablemente debido a que la actividad catalasa descrita en algunas levaduras podría contribuir a una menor actividad oxidativa (Martín y col., 2003). Esta actividad antioxidante de las levaduras fue observada previamente por Lücke (1985). Por otro lado, algunos autores (Konopka y col., 1995; Shu-Mei y col., 1995) han descrito un efecto positivo sobre el aroma y la calidad sensorial del producto final al inhibir el desarrollo de la rancidez. En otros estudios previos, Flores y col. (2004) señalaron una reducción en el contenido de heptanal, octanal y nonanal en muestras inoculadas con *Debaryomyces hansenii*, mientras que otros autores (Andrade y col., 2010b; Carrapiso y col., 2002a) constataron mayores valores de estos aldehídos en las muestras inoculadas. En el presente estudio, el nonanal solo fue identificado en el lote control y en el lote inoculado con *Candida zeylanoides*. Dentro de los aldehídos ramificados el 3-metilbutanal fue detectado en el lote control, y en los lotes CD y DH, siendo en este último donde alcanzó su mayor área. La formación de este compuesto ha sido atribuida a las reacciones de degradación de Strecker (García y col., 1991; Barbieri y col., 1992; Ventanas y col., 1992) o al metabolismo microbiano (Hinrichsen y Pedersen, 1995; Martín y col., 2006). Una vez más, en el caso del lacón, la ruta más probable parece ser debida al metabolismo microbiano ya que las reacciones de Strecker requieren temperaturas moderadamente

altas, un tiempo de madurado muy largo y valores de a_w relativamente bajos (Bruna y col., 2001), condiciones que no se dan en las fases de elaboración del lacón.

Durante este estudio, la familia química de los alcoholes mostró diferencias significativas ($P < 0,001$) entre los lotes estudiados, siendo mayor el área en el lote DH. La capacidad de las levaduras para producir alcoholes a partir del metabolismo de carbohidratos y aminoácidos ramificados es conocida (Olesen y Stahnke, 2000). El alcohol 3-metilbutanol se detectó en todos los lotes inoculados, alcanzando los valores más elevados en los lotes DH y CD, mientras que el 2-metilbutanol sólo se detectó en el lote inoculado con *D. hansenii*; ambos compuestos se forman a partir de la reducción del aldehído correspondiente (Stahnke, 2002). La producción de 2-metilpropanol asociada a la ausencia del correspondiente precursor puede ser atribuida a la conversión de los aminoácidos ramificados a través de la ruta de Ehrlich empleada por las levaduras (Schoondermark-Stolk y col., 2006), a través de la que generan a partir de aminoácidos derivados con grupo aldehído, que posteriormente son reducidos a los correspondientes alcoholes ramificados. Dickinson y col. (2000) comprobaron que los productos finales generados por las levaduras a partir de los aminoácidos fueron preferentemente alcoholes ramificados. Este hecho explicaría la mayor producción de este alcohol ramificado que de aldehídos precursores observada en el presente estudio.

El lote inoculado con *D. hansenii* mostró los valores más altos de área para la familia química de las cetonas ($69,90 \times 10^6$ unidades de área) en comparación con los otros lotes estudiados ($48,53$; $15,98$ y $21,59 \times 10^6$ unidades de área para los lotes control, CD y CZ, respectivamente). Entre ellas, la más abundante fue la 2-heptanona que presentó un área mayor en el lote control que en el resto, siendo el lote CZ el que presentó menores niveles. Sólo se detectó un furano (2-pentilfurano) en las muestras de lacón inoculadas con *D. hansenii*. Martín y col. (2003) no observaron ninguna influencia de la inoculación con *D. hansenii* en la generación de furanos en lomos curados. Entre los ácidos, el acético, derivado de la fermentación de los carbohidratos, sólo fue detectado en el lote DH, mientras que el ácido malónico se identificó en todos los lotes estudiados.

Al evaluar en conjunto la generación de compuestos volátiles de los distintos lotes estudiados no se observaron diferencias muy relevantes en el número de compuestos pero sí en los valores de área correspondiente a cada uno de ellos. Los lacones no inoculados mostraron en general valores menores de compuestos derivados de la oxidación lipídica, excepto para la familia de los aldehídos lineales donde se alcanzaron valores mayores que en los lotes inoculados, debido a la presencia de hexanal. En vista de los resultados obtenidos, parece clara la intervención de las distintas cepas de levaduras inoculadas (*Debaryomyces hansenii*, *Candida deformans* y *Candida zeylanoides*) en la formación de los compuestos volátiles del lacón. El lote DH presentó el mayor número de compuestos volátiles y la mayor área total para ésteres y alcoholes ramificados, productos del metabolismo microbiano. El lote CD presentó 28 compuestos volátiles, siendo los hidrocarburos y los ésteres las familias más abundantes. Por último, el lote CZ presentó el mayor número de

hidrocarburos, con el contenido más elevado en área de esta familia. Estos resultados ponen de manifiesto una vez más la complejidad de las interacciones entre microorganismos y de las reacciones que dan lugar a la formación de los compuestos volátiles en los productos cárnicos crudo-curados.

IV. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

PRIMERA. El perfil de compuestos volátiles identificados en el lacón al final del proceso madurativo está constituido por 62 compuestos volátiles comprendidos en las siguientes familias químicas: 19 aldehídos, 5 alcoholes, 11 cetonas, 17 hidrocarburos, 2 ésteres, 1 ácido, 3 furanos, 1 compuesto azufrado, 1 compuesto clorado y otros 2 compuestos no clasificados en las familias anteriores.

SEGUNDA. La mayoría de los compuestos volátiles que caracterizaron el perfil aromático del lacón provienen de la oxidación lipídica, siendo el hexanal el compuesto más abundante en todas las fases de elaboración del lacón.

TERCERA. El aumento del tiempo de salazón incrementó la percepción del sabor salado; los tiempos de salazón utilizados en este estudio no afectaron, sin embargo, al resto de los atributos sensoriales del lacón.

CUARTA. El tiempo de salazón influyó en la generación de compuestos volátiles durante la elaboración del lacón. De acuerdo con su efecto prooxidante, mayores niveles de sal incrementaron la cantidad de hexanal y redujeron los contenidos de 3-metilbutanal.

QUINTA. El tiempo de salazón no afectó significativamente al recuento de levaduras durante la elaboración del lacón, aunque los recuentos más altos se obtuvieron en el lote menos salado.

SEXTA. *Debaryomyces hansenii* fue la levadura más abundante de entre las aisladas durante el proceso de elaboración del lacón.

SÉPTIMA. La inoculación de cepas seleccionadas de *Debaryomyces hansenii*, *Candida deformans* y *Candida zeylanoides* tuvo una repercusión sobre la formación de compuestos volátiles, determinando áreas más bajas de aldehídos, en particular de hexanal, principal determinante del aroma a rancio.

OCTAVA. Una apropiada selección de levaduras como cultivos iniciadores puede tener un efecto positivo en el perfil aromático final del lacón.

V. BIBLIOGRAFÍA

A

- Aguirrezábal, M.M., Mateo, J., Domínguez, J.M., & Zumalacárregui, J.M. (2000). The effect of páprika, garlic and salt on rancidity in dry sausages. *Meat Science*, 54, 77-81.
- Alonso, M. (2004). Efecto de la utilización de cultivos iniciadores de *Penicillium chrysogenum* Pg222, *Debaryomyces hansenii* Dh345 y *Staphylococcus xylosus* Sx5EA en productos cárnicos. *Tesis Doctoral*. Universidad de Extremadura.
- Andrade, M.J., Rodríguez, M., Casado, E.M., Bermúdez, E., & Córdoba, J.J. (2009a). Differentiation of yeasts growing on dry-cured Iberian ham by mitochondrial DNA restriction analysis, RAPD-PCR and their volatile compounds production. *Food Microbiology*, 26, 578-586.
- Andrade, M.J., Córdoba, J.J., Sánchez, B., Casado, E.M., & Rodríguez M. (2009b). Evaluation and selection of yeasts isolated from dry-cured Iberian ham by their volatile compound production. *Food Chemistry*, 113, 457–463.
- Andrade, M.J., Córdoba, J.J., Casado, E.M., Córdoba, M.G., & Rodríguez, M. (2010b). Effect of selected strains of *Debaryomyces hansenii* on the volatile compound production of dry fermented sausage “salchichon”. *Meat Science*, 85, 256–264.
- Andrés, A.I., & Ruíz, J. (2001). Tecnología del Salazonado del jamón Ibérico. En: *Tecnología del jamón Ibérico de los Sistemas Tradicionales a la Explotación Racional del Sabor y el Aroma*, J. Ventanas (Coord.). Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Andrés, A.I., Cava, R., Ventanas, S., Muriel, E., & Ruiz, J. (2007). Effect of salt content and processing conditions on volatile compounds formation throughout the ripening of Iberian ham. *European Food Research and Technology*, 225, 677-684.
- Ansorena, D., Gimeno, O., Astiasarán, I., & Bello, J. (2001). Analysis of volatile compounds by GC-MS of a dry fermented sausage: Chorizo de Pamplona. *Food Research Internacional*, 34, 67-75.
- Antequera, T., Lopez-Bote, C.J., García, C., Asensio, M.A., Ventanas, J., García-Regueiro, J.A., & Díaz, I. (1992). Lipid oxidative changes in the processing of Iberian pig hams. *Food Chemistry*, 45, 105-110.

- Antequera, T., & Martín, L. (2001). Reacciones químicas y bioquímicas que se desarrollan durante la maduración del jamón Ibérico. En: *Tecnología del jamón Ibérico de los Sistemas Tradicionales a la Explotación Racional del Sabor y el Aroma*, J. Ventanas (Coord.). Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Arnau, J., Hugas, M., & Monfort, J.M. (1987). *Jamón Curado. Aspectos Técnicos*. Grafis-Sant S.A., Girona, España.
- Arnau, J., Guerrero, L., & Gou, P. (1997). Effects of temperature during the last month of ageing and of salting time on dry-cured ham aged for six months. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74, 387-392.
- Arnau, J., Guerrero, L., & Sárraga, C. (1998). The effect of green ham pH and NaCl concentration on cathepsin activities and sensory characteristics of dry-cured hams. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 387-392.
- Arnau, J. (2000). Aspectos tecnológicos que afectan al desarrollo de la textura y del flavor. En: *II Symposium Internacional del Jamón Curado*, I.R.T.A y Eurocarne (Eds.).
- Arnold, G.M., & Williams, A.A. (1986). The use of Generalized Procrustes techniques in sensory analysis. In: *Statistical Procedures in Food Research*, J.R. Piggott (Ed.). Elsevier Applied Science, Londres.

B

- Barbieri, G., Bolzoni, L., Parolari, G., Virgili, R., Buttini, R., Careri, M., & Mangia, A. (1992). Flavor compounds of dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 2389-2394.
- Barnett, J.A., Payne, R.W., & Yarrow, D. (1990). *Yeasts: Characteristics and Identification*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Belitz, H.D. & Grosch, W. (1998). *Química de los Alimentos*. Springer, Berlin.
- Berdagué, J.L., Monteil, P., Montel, M.C., & Talon, R. (1993). Effects of starter cultures on the formation of flavour compounds in dry sausage. *Meat Science*, 35, 275-287.
- Bianchi, F., Cantoni, C., Careri, M., Chiesa, L., Musci, M., & Pinna, A. (2007). Characterization of the aromatic profile for the authentication and differentiation of typical Italian dry-sausages. *Talanta*, 72, 1552-1563.

- Bolumar, T., Sanz, Y., Flores, M., Aristoy, M.C., Toldrá, F., & Flores, J. (2006). Sensory improvement of dry-fermented sausages by the addition of cell-free extracts from *Debaryomyces hansenii* and *Lactobacillus sakei*. *Meat Science*, 72, 457–466.
- Bolzoni, L., Barbieri, G., & Virgili, R. (1996). Changes in volatile compounds of Parma ham during maturation. *Meat Science*, 43, 301-310.
- Buscailhon, S., Berdagué, J.L., & Monin, G. (1991). Time-related changes in volatile compounds of lean tissue during processing of French dry-cured ham. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 63, 69-75.
- Buscailhon, S., Berdagué, J.L., & Monin, G. (1993). Time-related changes in volatile compounds of lean tissue during processing of French dry-cured ham. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 63, 69-75.
- Buscailhon, S., Gandemer, G., & Monin, G. (1994). Time-related changes in intramuscular lipids of French dry-cured ham. *Meat Science*, 37, 245-255.
- Bruna, J.M., Hierro, E.M., de la Hoz, L., Mottram, D.S., Fernández, M., & Ordóñez, J.A. (2001). The contribution of *Penicillium aurantiogriseum* to the volatile composition and sensory quality of dry fermented sausages. *Meat Science*, 59, 97-107.

C

- Caircross, SE., & Sjöström LB. (1950). Flavor profiles. A new approach to flavor problems. *Food Technology*, 4, 308-311.
- Careri, M., Mangia, A., Barbieri, G., Bolzoni, L., Virgili, R., & Parolari, G. (1993). Sensory property relationships to chemical data of Italian-type dry-cured ham. *Journal of Food Science*, 58, 968-972.
- Carrapiso, A.I., Ventanas, J., & García, C. (2002a). Characterization of the most odor-active compounds of Iberian ham headspace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1996-2000.
- Carrapiso, A.I., Jurado, A., & Timon, M.L. (2002b). Odor-active compounds of Iberian hams with different aroma characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6453-6458.
- Carrapiso, A.I., & García, D., (2005). Instrumental color of Iberian ham subcutaneous fat and lean (*biceps femoris*): influence of crossbreeding and rearing system. *Meat Science*, 71, 284-290.

- Carrascosa, A.V. (2001). Cultivos iniciadores para la industria cárnica. En: *Enciclopedia de la carne y de los productos cárnicos*, S. Martín Bejarano (Coord.). Ediciones Martín y Macías, Plasencia, España.
- Caul, J.F., Cairncross, S.E., & Sjöström, L.B. (1958). The flavour profile in review. Flavor Research and Food Acceptance, Arthur D. Little, Inc. Reinhold Publishing Company, New York.
- Cava, R. (1997). Influencia de la alimentación sobre los fenómenos oxidativos desarrollados durante la maduración del jamón de cerdo Ibérico. *Tesis Doctoral*. Universidad de Extremadura.
- Cobos, A., Barrera, E., Rodríguez-Núñez, E., & Díaz-Rubio, O. (2001). Cambios en la composición química durante la elaboración del Lacón Gallego. *Alimentaria*, 320, 49-52.
- Cocolin L., Urso R., Rantsiou K., Cantoni C., & Comi G. (2006). Dynamics and characterization of yeasts during natural fermentation of Italian sausages. *FEMS Yeast Research*, 6, 692-701.
- Comi, G., & Cantoni, C. (1983). Presenza di lieviti nei prosciutti crudi stagionati. *Industrie Alimentari*, 22, 102-104.
- Costell, E. (2000). Análisis sensorial: Evolución, situación actual y perspectivas. *Industria y Alimentos Internacional*, 2, 34-39.
- 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.
- Chang, S.S., & Peterson, R.J. (1997). Symposium: The basis of quality in muscle foods. Recent developments in the flavor of meat. *Journal of Food Science*, 42, 298-305.
- Chizzolini, R., Novelli, E., Campanini, G., Dazzi, G., Madarena, G., Zanardi, E., Pacchioli, M.T., & Rossi, A. (1996). Lean colour of green and matured Parma hams: comparative evaluation and technological relevance of sensory and objective data. *Meat Science*, 44, 159-172.

D

- Desmond, E. (2006). Reducing salt: A challenge for the meat industry. *Meat Science*, 74, 188-196.
- Dickinson, J.R., Harrison, S.J., Dickinson, J.A., & Hewlins, M.J.E. (2000). An investigation of the metabolism of isoleucine to active amyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 10937-10942.
- Dirinck, P., Van Opstaele, F., & Vandendriessche, F. (1997). Flavour differences between northern and southern European cured hams. *Food Chemistry*, 59, 511-521.
- Drumm, T.D., & Spanier, A.M. (1991). Changes in the content of lipid autoxidation and sulphur-containing compounds in cooked beef storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 336-343

E

- Elmore, J.S., Mottram, D.S., Enser, M., & Wood, J.D. (1999). Effect of the polyunsaturated fatty acid composition of beef muscle on the profile of aroma volatile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1619-1625.
- Encinas, J.P., López-Díaz, T.M., García-López, M.L., Otero A., & Moreno B. (2000). Yeast populations on Spanish fermented sausages. *Meat Science*, 54, 203-208.

F

- Fay, L.B., & Brevard, H. (2005). Contribution of mass spectrometry of the Maillard reaction in food. *Mass Spectrometry*, 24, 487-507.
- Fleet, G.H. (1990). Yeast in dairy products. *Journal of Applied Bacteriology*, 68, 199-211.
- Flores, J. (1997). Mediterranean vs Northern European meat products. Processing Technologies and main differences. *Food Chemistry*, 59, 505-510.
- Flores, M., Aristoy, M.C., Spanier, A.M., & Toldrá, F. (1997a). Non-volatile components effects on quality of "Serrano" dry-cured ham as related to processing time. *Journal of Food Science*, 62, 1235-1239.
- Flores, M., Grimm, C.C., Toldrá, F., & Spanier, A.M. (1997b). Correlations of sensory and volatile compounds of Spanish "Serrano" dry-cured ham as a function of two processing times. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2178-2186.

- Flores, M., Ingram, D.A., Bett, K.L., Toldrá, F., & Spanier, A.M. (1997c). Sensory characteristics of Spanish “Serrano” dry-cured ham. *Journal of Sensory Studies*, 12, 169-179.
- Flores, M., Spanier, A.M., & Toldrá, F. (1998). Flavour analysis of dry cured ham. In: *Flavor of meat, meat products and seafoods*, F. Shahidi (Ed.). Blackie Academic and Professional, Londres.
- Flores, M., Dura, M.A., Marco, A., & Toldrá F. (2004). Effect of *Debaryomyces* spp. on aroma formation and sensory quality of dry fermented sausages. *Meat Science*, 68, 439–446.
- Forss, D.A. (1972). Odor and flavor compounds from lipids. *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids*, 13, 181-258.
- Frankel, E.N. (1991). Recent advances in lipid oxidation. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 54, 495-511.

G

- Gallart-Jornet, L., Escriche, I., & Fito, P. (2005). La salazón del pescado: una tradición mediterránea. UPV. Valencia, España.
- 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, C., & Timón, M.L. (2001). Los compuestos responsables del “flavour” del jamón. Variaciones en los distintos tipos de jamones. En: *Tecnología del jamón Ibérico de los sistemas tradicionales a la explotación racional del sabor y el aroma*, J. Ventanas (Ed.). Mundi-Prensa, Madrid.
- García-Esteban, M., Ansorena, D., Gimeno, O., & Astiasarán, I. (2003). Optimization of instrumental colour análisis in dry-cured ham. *Meat Science*, 63, 287-292.
- García-Esteban, M., Ansorena, D., Astiasarán, I., & Ruiz, J. (2004). Study of the effect of different fiber coatings and extraction conditions on dry cured ham volatile compounds extracted by solid-phase microextraction (SPME). *Talanta*, 64, 458-466.
- García-González, D.L., Tena, N., Aparicio-Ruiz, R., & Morales, M.T. (2008). Relationship between sensory attributes and volatile compounds qualifying dry-cured hams. *Meat Science*, 80, 315-325.

- Gardini, F., Suzzi, G., Lombardi, A., Galgano, F., Crudele, M.A., Andrigueto, C., Schirone, M., & Tofalo, R. (2001). A survey of yeasts in traditional sausages of Southern Italy. *FEMS Yeast Research*, 1, 161-167.
- Garrido, R., Domínguez, R., Lorenzo, J.M., Franco, I., & Carballo, J. (2012). Effect of the length of salting time on the proteolytic changes in dry-cured lacón during ripening and on the sensory characteristics of the final product. *Food Control*, 25, 789-796.
- Gaspardo, B., Procida, G., Toso, B., & Stefanon, B. (2008). Determination of volatile compounds in San Daniele ham using headspace GC-MS. *Meat Science*, 80, 204-209.
- Geesink, G.H., & Koohmaraie, M. (1999). Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by μ -calpain under *post-mortem* conditions. *Journal of Animal Science*, 78, 2685-2692.
- Geesink, G.H., & Koohmaraie, M. (2000). Ionic strength-induced inactivation of μ -calpain in postmortem muscle. *Journal of Animal Science*, 78, 2336-2343.
- Gil, M., Guerrero, L., & Sárraga, C. (1999). The effect of meat quality, salt and ageing time on biochemical parameters of dry-cured Longissimus dorsi muscle. *Meat Science*, 51, 329-337.
- Golden, D.A., Beuchat, L.R., & Hitchcock, H.L. (1994). Changes in fatty acid composition of *Zygosaccharomyces rouxii* as influenced by solutes, potassium sorbate and incubation temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 21, 293-303.
- Gou, P. (1998). Dinámica del secado del jamón curado. En: Jamón Curado: *Tecnología y Análisis del Consumo*, IRTA (Ed.). Barcelona, España.
- Gou, P., Morales, R., Serra, X., Guàrdia, M.D., & Arnau, J. (2008). Effect of a 10-day ageing at 30°C on the texture of dry-cured hams processed at temperatures up to 18°C in relation to raw meat pH and salting time. *Meat Science*, 80, 1333-1339.
- Gray, I.A., & Pearson, A.M. (1987). Rancidity and warmed-over flavour. In: *Advances in Meat Research*, A.M. Pearson y T.R. Dutson (Eds.). Van Nostrand Reinhold Company, New York.

H

Hinrichsen, L.L., & Pedersen, S.B. (1995). Relationship among flavor, volatile compounds, chemical changes, and microflora in Italian-type dry-cured ham curing processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2932-2940.

Huan, Y., Zhou, G., Zhao, G., Xu, X., & Peng, Z. (2005). Changes in flavor compounds of dry-cured Chinese Jinhua ham during processing. *Meat Science*, 71, 291-299.

Huerta, T., Querol, A., & Hernández-Haba, J. (1988). Yeast of dry cured hams: quantitative and qualitative aspects. *Microbiologie Aliments Nutrition*, 6, 227-231.

I

ISO (International Organization for Standardization) (2005). Sistemas de gestión de la calidad – Fundamentos y vocabulario. ISO 9000:2005. En: International Organization for Standardization. Ginebra. Suiza.

J

James, S.A., Cai, J., Roberts, I.N., & Collins, M.D. (1997). A phylogenetic analysis of the genus *Saccharomyces* based on 18S rRNA gene sequences: description of *Saccharomyces kunashirensis* sp. nov. and *Saccharomyces martiniae* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 453-460.

K

Kaban, G. (2009). Changes in the composition of volatile compounds and in microbiological and physicochemical parameters during pastirma processing. *Meat Science*, 82, 17-23.

Kanner, J., Harel, S., & Joffe, R. (1991). Lipid peroxidation of muscle food as affected by NaCl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1017-1024.

Konopka, U.C., Guth, H., & Grosch, W. (1995). Potent odorants formed by lipid peroxidation as indicators of the warmed-over flavour (WOF) of cooked meat. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 193, 123-125.

Kurita, O., & Yamazaki, E. (2002). Growth under alkaline conditions of the salt tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* IFO10939. *Current Microbiology*, 45, 277-280.

Kurtzman, C.P. (1992). rRNA sequence comparisons for assessing phylogenetic relationships among yeast. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42, 1-6.

Kurtzmann, C.P., & Robnett, C.J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 331-371.

L

Lai, S., Gray, J., Boored, A., Crackel, R., & Gill, J. (1995). Assessment of off-flavor development in restructured chicken nuggets using hexanal and TBARS measurements and sensory evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67, 447-452.

Lametsch, R., Karlsson, A., Rosenvold, K., Andersen, H.J., Roepstorff, P., & Bendixen, E. (2003). Postmortem proteome changes of porcine muscle related to tenderness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6992-6997.

Lawrie, R.A. (1998). The conversion of muscle to meat. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, England.

Leistner, L., & Echardt, C. (1979). Vorkommen toxischer. Penicillien bei Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtschaft*, 59, 1892-1896.

Lopandic, K., Zelgen, S., Bánszky, L.K., Eliskases-Lechner, F., & Priliinguer, H. (2006). Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiology*, 23, 341-350.

López, M.O., de la Hoz, L., Cambero, M.I., Gallardo, E., Reglero, G., & Ordóñez, J.A. (1992). Volatile compounds of dry hams from Iberian pigs. *Meat Science*, 31, 267-277.

Lorenzo, J.M., Prieto, B., Carballo, J., & Franco, I. (2003). Compositional and degradative changes during the manufacture of dry-cured "lacón". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 593-601.

Lorenzo, J.M., González, E., Vidal Lago, J.L., Franco, I., & Carballo, J. (2005). Estudio de las mermas en peso, y de los parámetros bioquímicos de estabilidad, durante la elaboración del lacón crudo-curado con y sin aditivos. *Alimentaria*, 367, 56-65.

Lorenzo, J.M., García Fontán, M.C., Franco, I., & Carballo, J. (2007). Microbiological succession throughout the manufacture process of dry-cured lacón. Effect of the use of additives. *Fleischwirtschaft*, 22, 88-92.

- Lorenzo, J.M., García Fontán, M.C., Franco, I., & Carballo, J. (2008a). Proteolytic and lipolytic modifications during the manufacture of dry-cured lacón, a Spanish traditional meat product: Effect of some additives. *Food Chemistry*, 110, 137-149.
- Lorenzo, J.M., García Fontán, M.C., Franco, I., & Carballo, J. (2008b). Biochemical characteristics of dry-cured lacón (a Spanish traditional meat product) throughout the manufacture, and sensorial properties of the final product. Effect of some additives. *Food Control*, 19, 1148-1158.
- Lorenzo, J.M., García Fontán, M.C., Cachaldora, A., Franco, I., & Carballo, J. (2010). Study of the lactic acid bacteria throughout the manufacture of dry-cured lacón (a Spanish traditional meat product). Effect of some additives. *Food Microbiology*, 27, 229-235.
- Lücke, F.K. (1985). Fermented sausages. In: Microbiology of fermented foods. Wood. B.J.B. Elsevier, Amsterdam.
- M**
-
- Marra, A.I., Salgado, A., Prieto, B., & Carballo, J. (1999). Biochemical characteristics of dry cured lacón. *Food Chemistry*, 67, 33-37.
- Martín, A., Córdoba, J.J., Benito, M.J., Aranda, E., & Asensio, M.A. (2003). Effect of *Penicillium chrysogenum* and *Debaryomyces hansenii* on the volatile compounds during controlled ripening of pork loins. *International Journal of Food Microbiology*, 84, 327-338.
- Martín, A., Córdoba, J.J., Núñez, F., Benito, M.J., & Asensio, M.A. (2004). Contribution of a selected fungal population to proteolysis on dry-cured ham. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 55-66.
- Martín, A., Córdoba, J.J., Aranda, E., Córdoba, M.G., & Asensio, M.A. (2006). Contribution of a selected fungal population to the volatile compounds on dry-cured ham. *International Journal of Food Microbiology*, 110, 8-18.
- Marušić, N., Petrović, M., Vidaček, S., Petrak, T., & Medić, H. (2011). Characterization of traditional Istrian dry-cured ham by means of physical and chemical analysis and volatile compounds. *Meat Science*, 88, 786-790.
- Meilgaard, M.C., Civillie, G.V., & Carr, B.T. (1991). Sensory evaluation techniques. 2nd. Edition. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.

- Morales, R., Guerrero, L., Serra, X., & Gou, P. (2007). Instrumental evaluation of defective texture in dry-cured hams. *Meat Science*, 76, 536-542.
- Moskowitz, H.R. (1993). Sensory analysis procedures and viewpoints: Intellectual history, current debates, future outlooks. *Journal of Sensory Studies*, 8, 241-256.
- Moskowitz, H.R. (1994). Food concepts and products. Just-in-time development. Food and Nutrition Press, Inc., Trumbull, CT.
- Motilva, M.J., & Toldrá, F. (1993). Effect of curing agents and water activity on pork muscle and adipose subcutaneous tissue lipolytic activity. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 196, 228-232.
- Motilva, M.J., Toldrá, F., Nieto, P., & Flores, J. (1993). Muscle lypolysis phenomena in the processing of dry-cured ham. *Food Chemistry*, 48, 121-125.
- Muriel, E., Antequera, T., Petrón, M.J., Andrés, A.I., & Ruiz, J. (2004). Volatile compounds in Iberian dry-cured loin. *Meat Science*, 68, 391-400.

N

- Nagaraj, N.S., & Santhanam, K. (2006). Effects of muscle proteases, endogenous protease inhibitors and myofibril fragmentation on *post-mortem* aging of goat meat. *Journal of Food Biochemistry*, 30, 269-291.
- Novelli, E., Gandemer, G., Meynier, A., Zanardi, E., & Chizzolini, R. (1995). Composizione dell'aroma di due prodotti di salumeria: mortadela e salame milano. Parma: Atti del congresso Grassi e qualità delle carni. pp. 133-153.
- Núñez, F., Rodríguez, M.M., Córdoba, J.J., Bermúdez, M.E., & Asensio, M.A. (1996). Yeast population during ripening of dry-cured Iberian ham. *International Journal of Food Microbiology*, 29, 271-280.

O

- Oguntoyinbo, F.A. (2008). Evaluation of diversity of *Candida* species isolated from fermented cassava during traditional small scale *gari* production in Nigeria. *Food Control*, 19, 465-469.
- Olesen, P.T., & Stahnke, L.H. (2000). The influence of *Debaryomyces hansenii* and *Candida utilis* on the aroma formation in garlic spiced fermented sausages and model minces. *Meat Science*, 56, 357-368.

Oreskovisch, D.C., Klein, B.P., & Sutherland, J.W. (1991). Procrustes analysis and its applications to free-choice and other sensory profiling. In: *Sensory Science Theory and Applications in Food*, H.T. Lawless y B.P. Klein (Eds.). Marcel and Dekker Inc, New York.

P

Parolari, G., Rivaldi, P., Leonelli, C., Bellati, M., & Bovis, N. (1988). Colore e consistenza del prosciutto crudo in rapporto alla materia prima e alla tecnica di stagionatura. *Industria Conserve*, 63, 45-49.

Parolari, G., Virgili, R., & Schivazappa, C. (1994). Relationship between cathepsin-B activity and compositional parameters in dry-cured hams of normal and defective texture. *Meat Science*, 38, 117-122.

Parolari, G. (1996). Review: Achievements, needs and perspectives in dry-cured ham technology: the example of Parma ham. *Food Science and Technology International*, 2, 69-78.

Parson, G. (1988). Development of DNA probe-based commercial assays. *Journal of Clinical Immunoassay*, 11, 38-152.

Pastorelli, G., Magni, S., Rossi, R., Pagliarini, E., Baldini, P., Dirinck, P., Van Opstaele, F., & Corino, C. (2003). Influence of dietary fat, on fatty acid composition and sensory properties of dry-cured Parma ham. *Meat Science*, 65, 571-580.

Patrignani, F., Iucci, L., Vallicelli, M., Guerzoni, M.E., Gardini, F., & Lanciotti, R. (2007). Role of surface-inoculated *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* strains in dried fermented sausage manufacture. Part 1: Evaluation of their effects on microbial evolution, lipolytic and proteolytic patterns. *Meat Science*, 75, 676-686.

Pérez-Juan, M., Flores, M., & Toldrá, F. (2006). Model studies on the efficacy of protein homogenates from raw pork muscle and dry-cured ham in binding selected flavor compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4802-4808.

Pham, A.J., Schilling, M.W., Mikel, W.B., Williams, J.B., Martin, J.M., & Coggins, P.C. (2008). Relationships between sensory descriptors, consumer acceptability and volatile flavor compounds of American dry-cured ham. *Meat Science*, 80, 728-737.

Pugliese, C., Sirtori, F., Calamai, L., & Franci, O. (2010). The evolution of volatile compounds profile of “Toscano” dry-cured ham during ripening as revealed by SPME-GC-MS approach. *Journal of Mass Spectrometry*, 45, 1056-1064.

Q

Quirós, M., Martorell, P., Querol, A., Barrio, E. Peinado, J.M., & de Silóniz, M.I. (2008). Four new *Candida cretensis* strains isolated from Spanish fermented sausages (chorizo): taxonomic and phylogenetic implications. *FEMS Yeast Research*, 8, 485-491.

R

Rabe, S., Krings, U., & Berger, R. G. (2003). Initial dynamic flavor release from sodium chloride solutions. *European Food Research and Technology*, 218, 32-39.

Ramírez, R., & Cava, R. (2007). Volatile profiles of dry-cured meat products from three different Iberian X Duroc genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1923-1931.

Rico, E., Toldrá, F., & Flores, J. (1990). Activity of cathepsin D as affected by chemical and physical dry-curing parameters. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 191, 20-23.

Rodríguez, M., Núñez, F., Córdoba, J.J., Sanabria, C., Bermúdez, E., & Asensio, M.A. (1994). Characterization of *Staphylococcus* spp. and *Micrococcus* spp. isolated from Iberian ham throughout the ripening process. *International Journal of Food Microbiology*, 24, 329-335.

Rodríguez, M.M., Núñez, F., Córdoba, J.J., Bermúdez, M.E., & Asensio, M.A. (1998). Evaluation of proteolytic activity of *Micrococcaceae*, moulds and yeasts isolated from dry cured ham. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 905-912.

Ruiz, J. (1996). Estudio de parámetros sensoriales y físico-químicos implicados en la calidad del jamón Ibérico. *Tesis Doctoral*. Universidad de Extremadura.

Ruiz, J., Cava, R., Ventanas, J., & Jensen, M.T. (1998). 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.P., 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.

Ruiz, J., Muriel, E., & Ventanas, J. (2002). The flavour of Iberian ham. In: *Research advances in the quality of meat and meat products*, F. Toldrá (Ed.). Research Signpost, Trivandrum, India.

Ruusunen, M., & Puolanne, E. (2005). Reducing sodium intake from meat products. *Meat Science*, 70, 531-541.

S

Sabio, E., Vidal-Aragón, M.C., Bernalte, M.J., & Gata, J.L. (1998). Volatile compounds present in six types of dry-cured ham from south European countries. *Food Chemistry*, 61, 490-503.

Saldanha-da-Gama, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (1997). Characterization of yeasts associated with Portuguese pork based products. *International Journal of Food Microbiology*, 37, 201-207.

Salles, C. (2006). Odour-taste interactions in flavour perception. In: *Flavour in food*, A. Voillwy y P. Etievant (Eds.). Woodhead Publishing in Food Science, Technology and Nutrition, Cambridge, England.

Sánchez-Molinero, F. (2003). Modificaciones Tecnológicas para mejorar la seguridad y calidad del jamón curado. *Tesis Doctoral*. Universitat de Girona.

Sánchez-Peña, C., Luna, G., García-González, D.L., & Aparicio-Ruiz, R. (2005). Characterization of French and Spanish dry-cured hams: Influence of the volatiles from the muscles and the subcutaneous fat quantified by SPME-GC. *Meat Science*, 69, 635-645.

Sánchez-Rodríguez, M.E., Pérez-Alvarez, J.A., Alonso-Mateos, A., De la Gándara-Medino, J.M., Sayás-Barbera, M.E., Fernández-López, J., & Almendral, M.J. (2001). Parámetros de color de jamón Ibérico de bellota D.O. Guijuelo del periodo de maduración. *Alimentaria*, 321, 33-39.

Sárraga, C., & García-Regueiro, J. A. (1998). Oxidation of Microsomal fraction in the processing conditions of dry-cured ham. The in vitro effect of brin. *Meat Science*, 50, 295-302.

- Schoondermark-Stolk, S.A., Jansen, M., Verkleij, A.J., Verrips, C.T., Euverink, G.J.W., Dijkhuizen, L., & Boonstra, J. (2006). Genome-wide transcription survey on flavor production in *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 1347-1356.
- Shahidi, F., Rubin, L.J., & D'Souza, L.A. (1986). Meat flavour volatiles: A review of the composition, techniques of analysis, and sensory evaluations. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 24, 141-243.
- Shahidi, F., & Pegg, R.B. (1994). Hexanal as an indicator of meat flavour deterioration. *Journal of Food Lipids*, 1, 177-186.
- Shomer, I., Weinberg, Z.G., & Vasiliver, R. (1987). Structural binding properties of silvercarp (*hypophthalmichthys molitrix*) muscle affected by NaCl and CaCl₂ treatments. *Food Microstructure*, 6, 199-207.
- Shu-Mei, L., Gray, J.I., Booren, A.M., Crackel, R.L., & Gill, J.L. (1995). Assessment of off-flavor development in restructured chicken nuggets using hexanal and TBARS measurements and sensory evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67, 447-452.
- Silla, H., Molina, I., Flores, J., & Silvestre, D. (1989). A study of the microbial flora of dry-cured ham. 1. Isolation and growth. *Fleischwirtsch*, 69, 1128-1131.
- Simoncini, N., Rotelli, D., Virgili, R., & Quintavalla, S. (2007). Dynamics and characterization of yeasts during ripening of typical Italian dry-cured ham. *Food Microbiology*, 24, 577-584.
- Sjöström, L.B., Cairncross, S.E., & Caul, J.F. (1953). Methodology of the flavour profile. *Food Technology*, 4, 56-58.
- Skibsted, L. (1992). Cured meat products and their oxidative stability. In: *The Chemistry of Muscle-based Foods*, D.A. Ledward, D.E. Johnston y M.K. Knight (Eds.), pp 266-286. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, England.
- Stahnke, L.H. (1995). Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredient levels – Part II. Volatile compounds. *Meat Science*, 41, 193-209.

- Stahnke, L. H., Holck, A., Jensen, A., Nilsen, A. y Zanardi, E. (2002). Maturity acceleration by *Staphylococcus carnosus* in fermented sausage — Relationship between maturity and taste compounds. *Journal of Food Science*, 67, 1914–1921.
- Stone, H., Sidel, J., Oliver, S., Woolsey, A., & Singleton, R.C. (1974). Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. *Food Technology*, 28, 11-24.
- Stone, H., & Sidel, J.L. (1985). *Sensory Evaluation Practices*. 2nd. ed. Academic Press, Inc. Orlando.
- Szczesniak, A.S. (1963). Clasification of textural characteristics. *Journal of Food Science*, 28, 385-390.

T

- Taylor, A.J. (1996). Volatile flavor release from foods during eating. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 765-784.
- Tejeda, J.F., García, C., Petró, M.J., Andrés, A.I., & Antequera, T. (2001). N-alkane content of intramuscular lipids of Iberian fresh ham from different feeding systems and crossbreeding. *Meat Science*, 57, 371-377.
- Toldrá, F. (1992). The enzymology of dry-curing of meat products. In: *New Technologies for Meat and Meat Products*, F.J.M. Smulders, F. Toldrá, J. Flores y M. Prieto (Eds.). New Technologies for Meat and Meat Products, Nijmegen, Audet.
- Toldrá, F., Flores, M., & Sanz, Y. (1997). Dry-cured ham flavour: Enzymatic generation and process influence. *Food Chemistry*, 59 (4), 523-530.
- Toldrá, F. (1998). Proteolysis and lipolysis in flavour development of dry-cured meat products. *Meat Science*, 49, S101-S110.
- Toldrá, F. (2006). Dry-cured ham. In: *Handbook of Food Science Technology and Engineering*, Y.H. Hui y col. (Eds.). CRC Press, Boca Raton, FL, E.E.U.U.
- Toldrá, F., & Aristoy, M.C. (2010). Dry-cured ham. In: *Handbook of meat processing*, F. Toldrá (Ed.), pp 351-362. Willey-Blackwell. Ames, Iowa, USA.
- Toldrá, F., & Etherington, D.J. (1988). Examinations of cathepsines B, D, H and L activities in dry-cured hams. *Meat Science*, 23, 1-7.

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(4), 331-352.

Toldrá, F., & Flores, M. (2007). Processed pork meat flavors. In: *Handbook of Food Product Manufacturing*, Y.H. Hui y col. (Eds.). Hoboken, NJ: John Wiley Interscience of NY.

V

Van den Tempel, T., & Jacobsen, M. (2000). The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. *International Dairy Journal*, 10, 263-270.

Varnam, A., & Sutherland, J. (1998). Carne y productos cárnicos: Tecnología, química y microbiología. Acribia S.A. Zaragoza, España.

Veiga, A., Cobos, A., Ros, C., & Díaz, O. (2003). Chemical and fatty acid composition of “Lacón gallego” (dry-cured pork foreleg): differences between external and internal muscles. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 121-132.

Ventanas, J., Córdoba, J.J., Antequera, T., García, C., López-Bote, C., & Asensio, M.A. (1992). Hidrolysis and maillard reactions during ripening of iberian ham. *Journal of Food Sciences*, 57, 813-815.

Ventanas, J., Ruiz, J., & Córdoba, J.J. (2001). El jamón curado de cerdo Ibérico: descripción del proceso tradicional de elaboración. En: *Tecnología del Jamón Ibérico*, J. Ventanas (Coord.). Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.

Vilar, I., García Fontán, M.C., Prieto, B., Tornadijo, M.E., & Carballo, J. (2000). A survey on the microbiological changes during the manufacture of dry-cured lacón, a Spanish traditional meat product. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 1018-1026.

Virgili, R., Parolari, G., Schivazappa, C., Soresi Bordini, C., & Borri, M. (1995). Sensory and texture quality of dry cured ham as affected by endogenous cathepsin B activity and muscle composition. *Journal of Food Science*, 60, 1183-1186.

W

Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J., & Zoller, M. (1992). The polymerase chain reaction. In: *Recombinant DNA*, pp.79-95. Scientific American Books, EE.UU.

- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes form phylogenetics. In: *PCR protocols: a guide to methods and applications*, M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky y T.J. White (Eds.). Academic Press, San Diego.
- Wigley, R.C. (1999). Starter cultures. Uses in the Food Industry. In: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, San Diego.
- Williams, A.A., & Langron, S.P. (1984). The use of free-choice profiling for the evaluation of commercial ports. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35, 558-568.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., & Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531-6535.

Z

- Zamarocky, M., & Bernardi, G. (1986). The primary structure of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae* - a review. *Gene*, 47, 155-177.
- Zanardi, E., Novelli, E., Ghiretti, G.P., Dorigoni, V., & Chizzolini, R. (1999). Colour stability and vitamin E content of fresh and processed pork. *Food Chemistry*, 67, 163-171.

VI. PUBLICACIONES

PUBLICACIÓN VI.1:

“Development of Volatile Compounds during the Manufacture of Dry-Cured “Lacón”, a Spanish Traditional Meat Product”

Laura Purriños, Roberto Bermúdez, Daniel Franco, Javier Carballo, José M. Lorenzo

Journal of Food Science, 76(1) (2011) C89-C97

Development of Volatile Compounds during the Manufacture of Dry-Cured "Lacón," a Spanish Traditional Meat Product

Laura Purriños, Roberto Bermúdez, Daniel Franco, Javier Carballo, and José M. Lorenzo

Abstract: Volatile compounds were determined throughout the manufacture of dry-cured "lacón," a traditional dry-salted, and ripened meat product made in the north-west of Spain from the foreleg of the pig following a similar process to that of dry-cured ham. Volatiles were extracted by a purge-and-trap method and analyzed by gas chromatographic/mass spectrometry. One hundred and two volatile compounds were identified. In raw material, only 34 volatile compounds were found and at very low levels. The number of volatile compounds increased during processing. The substances identified belonged to several chemical classes: aldehydes (23), alcohols (9), ketones (15), hydrocarbons (37), esters (4), acids (3), furans (4), sulphur compounds (1), chloride compounds (1), and other compounds (4). Results indicated that the most abundant chemical family in flavor at the end of the manufacturing process was aldehydes, followed by hydrocarbons and ketones. Lipids were the most important precursor of flavor compounds of dry-cured "lacón."

Keywords: dry-cured lacón, GC/MS, purge-and-trap, volatile compounds

Introduction

The acceptance of dry-cured products by consumers is mainly determined by their sensory quality. The aroma is perhaps the most important quality parameter, and it is markedly affected by raw material, processing techniques, and aging time (Dirinck and others 1997; Sánchez-Peña and others 2005).

Dry-cured "lacón" is a traditional cured meat product made in the north-west of Spain from the pigs foreleg that is cut at the shoulder blade-humerus joint, following very similar manufacturing processes to those used in the production of dry-cured ham. In the Galicia region, this product has been awarded a Geographically Protected Identity (Official Journal of the European Communities 2001).

Nowadays, a wide variety of dry-cured meat products are produced from different raw materials and processing conditions (Toldrá 2006). In general, important reductions in both moisture content and water activity take place during the production process of dry-cured meat products. This reduction can vary depending on drying conditions, and the decreasing water activity may affect enzyme activity, which influences the sensory characteristics of the final product (Toldrá 2006).

In dry-cured products, chemical and biochemical changes during ripening lead to a large number of volatile compounds that contribute to their characteristic flavor (Ruiz and others 2002). Proteolysis and lipolysis are 2 of the most important mechanisms that have an impact on final sensory quality. Proteolytic events have been shown to be an important source of aroma and flavor,

as they release several compounds related to flavor development, such as free amino acids (Naes and others 1995; Ordóñez and others 1999). Lipolysis also plays an important role in the development of sensory characteristics, because it causes an increase in free fatty acid content, and it also catalyses other reactions such as oxidation, which leads to the production of a large number of volatile compounds that are responsible for the characteristic flavor of certain food (Yang and others 2005).

Several studies have been done so far in which microbiology, sensory, and some physicochemical (pH, moisture, protein, fat, amino acids, fatty acids, biogenic amines) characteristics of lacón (Lorenzo and others 2007a, 2007b, 2008a, 2008b) have been evaluated. However, there are no references about the volatile compounds that are present in this product.

It is of interest to follow the changes in volatile compounds during processing of dry-cured lacón, as a 1st step in the aroma genesis research. Indeed, understanding this aspect could help to optimize the processing time, which is empirically determined in industrial standard practice. In the present study, the composition of volatile compounds was determined at various stages of dry-cured "lacón" processing.

Materials and Methods

Samples

Twenty-seven units of dry-cured "lacón" were manufactured in our pilot plant. Fresh pieces of 4.03 ± 0.13 kg were used. The pieces were salted with coarse salt, forming piles alternating between meat and salt; pieces remained in the pile for 4 d (a day per kg of weight), the temperature of the salting room was in the range 2 to 5 °C and 80% to 90% relative humidity. After the salting stage, the pieces were taken from the pile, brushed, washed to remove salt excess, and transferred to a postsalting chamber where they stayed for 14 d at 2 to 5 °C and 85% to 90% relative humidity. After the postsalting stage, the pieces were transferred to a room at 12 °C and 74% to 78% relative humidity where drying-ripening

MS 20100723 Submitted 6/28/2010, Accepted 10/14/2010. Authors Purriños, Bermúdez, Franco, and Lorenzo are with Centro Tecnológico de la Carne de Galicia, Rúa Galicia Nº 4, Parque Tecnológico de Galicia, San Cibrán das Viñas, Ourense 32900, Spain. Author Carballo is with Área de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias de Ourense, Univ. de Vigo, Ourense 32004, Spain. Direct inquiries to author Lorenzo (E-mail: jmlorenzo@ceteca.net).

Journal compilation © 2010 Institute of Food Technologists®

No claim to original government works

doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01955.x

Further reproduction without permission is prohibited

took place for 84 d. The air convection in the drying room was intermittent and the air velocity around the pieces when the fan was running ranged between 0.3 and 0.6 m/s.

In each batch, samples were taken from the fresh pieces, after the end of the salting stage, after 7 and 14 d of postsalting, and after 7, 14, 28, 56, and 84 d of drying-ripening. Each sample consisted of one whole "lacón" piece. Samples were transported to the laboratory under refrigerated conditions ($<4^{\circ}\text{C}$) and analyzed at this point. Once in the laboratory, the entire pieces were skinned, deboned, and finally minced in a high-capacity mincer. The samples were stored in air-tight bottles, frozen at -80°C in dark, for no longer than 4 wk until analysis.

Analysis of volatile compounds

Samples were lyophilized (Labconco Corp., Freezone, Kans., U.S.A.) during 48 h at -40°C and then samples were ground in a domestic blender, and 10 g weighed, put into a dynamic headspace vial. The volatile compounds were extracted and concentrated in a purge-and-trap concentrator coupled with a cryofocusing module (Teledyne Tekmar, Mason, Ohio, U.S.A.).

Dynamic headspace volatile concentration. Lyophilized samples were transferred into headspaced vials and concentrated in a purge-and-trap concentrator (Stratum, Teledyne Tekmar, Mason) equipped with a cryofocusing module was connected to an autosampler (Solatek 72 Multimatrix Vial Autosampler, Teledyne Tekmar, Mason). The sample was maintained at 80°C for 1 min and then flushed with helium at a flow rate of 40 mL/min for 22 min. The volatile compounds were adsorbed on a Tenax Trap (Supelco, Bellefonte, Pa., U.S.A.). Volatile compounds were thermally desorbed from the Tenax trap at 225°C for 4 min with a helium flow rate of 300 mL/min. The desorbed compounds were cryofocused at -30°C using liquid nitrogen at the entrance of a DB-624 capillary column (J&W Scientific, Folsom, Calif., U.S.A.).

Gas chromatography/mass spectrometry. A gas chromatograph 6890N (Agilent Technologies Spain, S.L., Madrid, Spain) equipped with mass detector 5973N (Agilent Technologies Spain, S.L.) was used with a DB-624 capillary column (J&W scientific: 30 m $\times$ 0.25 mm i.d., 1.4- μm film thickness). The sample was injected in split mode (1:20). Helium was used as a carrier gas with a linear velocity of 36 cm/s. The temperature program used was as follows: 40°C maintained for 2 min and then raised from 40 to 100°C at $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$, then from 100 to 180°C at $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, and from 180 to 250°C at $9^{\circ}\text{C}/\text{min}$ with a final holding time of 5 min; total run time 50.78 min. Injector and detector temperatures were set at 220 and 260°C , respectively.

The mass spectra were obtained using the mass selective detector by electronic impact at 70 eV, a multiplier voltage of 1576 V, and collecting data at a rate of 6.34 scans/s over the m/z 40 to 300. Compounds were identified by comparing their mass spectra with those contained in the NIST05 (Natl. Inst. of Standards and Technology, Gaithersburg, Md., U.S.A.) library or standard alkanes (C_5 to C_{14}) (for calculating Kovats indices, Supelco 44585-U, Bellefonte) and by matching their retention indices with those reported in literature.

Twenty-seven "lacón" samples were analyzed in triplicate. Results were reported as relative abundance expressed as total area counts ($\text{AU} \times 10^6$).

Statistical analysis

For the statistical analysis of the results, data were analyzed using the SPSS 15.0 for Windows (SPSS, Chicago, Ill., U.S.A.) software

package. One-way analysis of variance was used to analyze the effect of stage processing on volatile compounds composition. The least squares mean (LSM) were separated using Duncan's *t*-test. All statistical test of LSM were performed for a significance level <0.05 .

Results

The average contents of extracted volatile compounds at different processing stages are shown in Table 1. One hundred and two volatile compounds were identified from dry-cured "lacón" samples. In raw material (before curing), only 34 of them were found and they demonstrate very low levels. The number of volatile compounds increased during processing: 42 at the end of salting, 59 at 7 d of postsalting, 65 at 14 d of postsalting, 61 at 7 d of drying-ripening, 57 at 14 d of drying-ripening, 52 at 28 d of drying-ripening, 67 at 56 d of drying-ripening, and 62 at 84 d of drying-ripening. The ones that were identified and quantified compounds were assigned to the following chemical families: aldehydes (23), alcohols (9), ketones (15), hydrocarbons (37), esters (4), acids (3), furans (4), sulphur compounds (1), chloride compounds (1), and other compounds (4).

The amount of volatile compounds determined in "lacón" was lesser than those observed in ham. Due to the shorter manufacturing period of "lacón" (around 3 mo) than other raw-cured meat products made from whole pieces such as European dry-cured ham (between 6 and 12 mo) (Sabio and others 1998; Ruiz and others 1999; Sánchez-Peña and others 2005).

As we can observe in the chromatogram (Figure 1), there are a number of peaks that were not included in the list of volatile compounds (Table 1). Most of these peaks were tentatively identified as siloxanes or silanes and the most probable origin will be the trap (fiber), although some of them could also be explained considering the chromatographic column.

Among the 62 compounds at the end of final stage, 41 of them were not detected in raw pieces. The distributions of these 41 compounds were 12 aldehydes, 4 alcohols, 4 ketones, 12 hydrocarbons, 2 esters, 1 acid, 3 furans, 1 sulphur compounds, and 2 compounds of other chemical families. All the esters, acids, furans, disulfide dimethyl, and other compounds identified at the end of ripening process were not found in the raw material. The chromatographic areas obtained for of flavor compounds extracted in fresh piece, postsalting period, and at the end of ripening process showed significant variations ($P < 0.05$). Volatile compounds during processing were very uncertain for different chemical families (Figure 2 and 3). Aldehydes increased significantly ($P < 0.001$) during the process of dry-cured "lacón," reaching the highest value at 84 d of drying-ripening. Hydrocarbons showed the highest level on salting stage, decreasing significantly ($P < 0.001$) after 7 d of postsalting and increased after 14 d of drying-ripening until final processing stage. Ketones increase significantly ($P < 0.01$) after salting step, reaching maximum values in the middle of drying-ripening stage. Large variations were found for furans and esters, which reached the highest values at 7 d of postsalting and 14 d of drying-ripening, respectively. Other compounds (not classified in none of the aforementioned chemical families) increased continuously and showed significant variations ($P < 0.001$) during the manufacture process (Figure 3).

Discussion

Results indicated that the most abundant chemical family that can explain the flavor at the end of the manufacturing process was aldehydes. These carbonyl compounds play an important role in

Table 1—Evolution of volatile compounds during the processing of dry-cured "Iacón," expressed as total area counts (AU × 10⁶) (mean area ± standard deviation).

Peak number ^a	Compounds	KI	R	Fresh piece	After salting	Postsalting (d)		Drying-ripening (d)				S	
						7	14	7	14	28	56		84
<i>Aldehydes</i>													
1	Propanal, 2-methyl-	588	k, t	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	2.28 ± 0.00 ^b	2.68 ± 0.57 ^c	Pungent, malt, green
2	Butanal	629	k, m	3.47 ± 0.34 ^d	0.00 ± 0.00 ^a	0.91 ± 0.23 ^b	1.08 ± 0.00 ^b	1.68 ± 0.14 ^{bc}	1.13 ± 0.14 ^b	2.05 ± 0.51 ^c	2.09 ± 0.19 ^c	2.87 ± 0.57 ^{cd}	Pungent, green
3	2-Pentenal, (E)-	642	m	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.84 ± 0.00 ^b	1.41 ± 0.14 ^d	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	1.53 ± 0.00 ^c	Strawberry, fruit, tomato
4	Butanal, 3-methyl-	692	k, m	9.15 ± 0.93 ^c	4.18 ± 0.33 ^a	4.44 ± 0.46 ^a	6.01 ± 0.00 ^{ab}	7.69 ± 0.28 ^b	12.00 ± 0.71 ^d	16.74 ± 0.17 ^e	16.33 ± 0.57 ^c	31.57 ± 2.30 ^f	Malt, cheese, green
5	Pentanal	737	k, m	56.48 ± 3.64 ^a	37.26 ± 0.00 ^b	35.87 ± 1.82 ^b	35.68 ± 0.48 ^b	46.15 ± 0.84 ^c	44.17 ± 2.26 ^c	65.77 ± 2.90 ^d	63.61 ± 1.71 ^d	101.20 ± 9.95 ^e	Almond, malt, pungent
6	2-Pentenal, 2-methyl-	747	k, t	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.60 ± 0.24 ^b	1.40 ± 0.14 ^c	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	Aldehydic, green, grassy
7	3-Cyclohexene-1-carboxaldehyde	764	m	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^{ab}	0.48 ± 0.00 ^b	0.98 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	
8	Hexanal	842	k, m	309.86 ± 10.33 ^a	441.84 ± 12.42 ^b	408.03 ± 12.41 ^c	391.07 ± 1.32 ^d	470.59 ± 20.56 ^{bc}	510.46 ± 33.16 ^f	526.70 ± 9.40 ^f	511.72 ± 7.22 ^f	607.80 ± 67.92 ^g	Green, grass, tallow, fat
9	2-Butenal, 2-ethyl-	867	m	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	1.08 ± 0.12 ^b	1.96 ± 0.14 ^c	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	1.33 ± 0.00 ^d	3.25 ± 0.19 ^e	
10	2-Pentenal, 2-methyl-	880	m	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	4.56 ± 0.46 ^b	4.33 ± 0.24 ^b	6.01 ± 0.56 ^c	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	4.75 ± 0.19 ^b	7.65 ± 3.06 ^c	
11	2-Hexenal, (E)-	905	k, m	5.42 ± 0.08 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	10.02 ± 0.57 ^{db}	8.17 ± 0.12 ^c	10.49 ± 0.14 ^d	10.16 ± 0.71 ^{bd}	10.93 ± 0.51 ^d	9.68 ± 0.19 ^b	11.48 ± 0.57 ^d	Green, leaf
12	Heptenal	945	k, m	24.22 ± 0.59 ^c	21.21 ± 0.88 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	56.71 ± 1.08 ^d	69.78 ± 2.24 ^e	72.54 ± 1.69 ^f	84.22 ± 3.25 ^e	84.31 ± 0.57 ^f	90.11 ± 5.17 ^e	Fat, citrus, rancid
13	2-Heptenal, (E)-	1006	k, t	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	39.98 ± 1.37 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	36.54 ± 8.80 ^b	Soap, fat, almond
14	Octanal	1025	k, m	9.48 ± 0.51 ^a	0.00 ± 0.00 ^b	26.88 ± 0.80 ^c	25.95 ± 0.72 ^c	32.58 ± 1.68 ^d	24.56 ± 0.56 ^c	28.87 ± 2.22 ^c	34.37 ± 0.19 ^d	34.25 ± 0.19 ^d	Fat, soap, lemon, green, fresh
15	2,4-Hepadienal, (E,E)-	1043	k, m	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	17.20 ± 3.07 ^d	17.54 ± 0.72 ^d	16.36 ± 0.98 ^d	10.58 ± 0.56 ^c	12.81 ± 1.20 ^e	20.51 ± 2.09 ^d	7.46 ± 9.18 ^b	Nut, fat
16	2-Heptenal, 2-methyl-	1046	m	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	2.85 ± 0.38 ^b	8.80 ± 0.96 ^c	
17	5-Ethylcyclopent-1-enecarboxaldehyde	1048	m	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	14.12 ± 0.34 ^c	0.00 ± 0.00 ^a	13.15 ± 0.56 ^c	7.62 ± 1.13 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	13.48 ± 0.38 ^c	23.34 ± 9.95 ^d	
18	2-Octenal, (E)-	1063	k, m	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	42.02 ± 1.48 ^c	42.29 ± 1.08 ^c	42.65 ± 1.26 ^c	21.31 ± 1.55 ^d	15.55 ± 6.32 ^b	19.75 ± 0.38 ^b	28.89 ± 3.63 ^c	Green, nut, fat
19	Nonanal	1077	k, m	0.00 ± 0.00 ^a	26.60 ± 3.85 ^b	24.60 ± 0.68 ^b	25.59 ± 1.80 ^b	26.15 ± 0.42 ^b	26.11 ± 4.23 ^b	31.78 ± 2.73 ^{bc}	33.04 ± 0.76 ^c	5.36 ± 0.38 ^d	Fat, citrus, green
20	2-Nonenal, (E)-	1218	k, m	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	7.52 ± 0.57 ^f	6.61 ± 0.72 ^c	5.59 ± 0.70 ^{de}	3.81 ± 0.42 ^{cb}	3.08 ± 0.68 ^b	4.75 ± 0.00 ^c	4.40 ± 2.49 ^{bc}	Cucumber, fat, green
21	2,4-Nonadienal, (E,E)-	1278	k, m	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	2.39 ± 0.23 ^c	2.40 ± 0.24 ^c	1.26 ± 0.28 ^b	1.55 ± 0.28 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	3.61 ± 0.38 ^d	2.49 ± 0.77 ^c	Fat, wax, green
22	2-Decenal, (E)-	1314	k, m	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	2.05 ± 0.11 ^c	2.04 ± 0.00 ^c	1.12 ± 0.14 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	Tallow
23	2,4-Decadienal, (E,E)-	1392	k, m	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.80 ± 0.23 ^{bc}	1.08 ± 0.24 ^{bc}	0.42 ± 0.14 ^b	1.27 ± 0.99 ^c	0.00 ± 0.00 ^a	4.75 ± 1.33 ^d	0.00 ± 0.00 ^a	Fried, wax, fat
<i>Alcohols</i>													
24	1-Penten-3-ol	734	k, m	21.85 ± 1.78 ^c	2.75 ± 0.11 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	Butter, pungent, onion
25	2-Pentanol	749	k, t	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.60 ± 0.48 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	2.12 ± 0.14 ^{cd}	2.90 ± 0.68 ^d	2.47 ± 0.19 ^c	3.25 ± 0.57 ^d	Green
26	1-Pentanol	824	k, m	37.09 ± 1.27 ^c	16.05 ± 7.91 ^c	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	3.78 ± 1.68 ^b	32.46 ± 0.71 ^d	52.79 ± 2.05 ^f	62.28 ± 2.47 ^g	59.50 ± 5.17 ^g	Balsamic
27	3-Pentanol, 2-methyl-/3-Octanol	869	m	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	3.07 ± 0.46 ^c	3.72 ± 0.24 ^d	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	1.71 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	
28	2,3-Butanediol	876	m	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	7.76 ± 1.27 ^{bc}	5.30 ± 3.25 ^{bc}	4.18 ± 0.00 ^d	5.93 ± 0.57 ^b	Fruit, onion
29	1-Hexanol	921	k, m	0.00 ± 0.00 ^a	2.86 ± 1.43 ^b	11.39 ± 0.11 ^d	12.62 ± 0.36 ^c	15.10 ± 0.14 ^f	21.31 ± 0.85 ^g	11.45 ± 1.71 ^{de}	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	Resin, flower, green
30	1-Octen-3-ol	1016	k, m	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	110.81 ± 3.99 ^c	74.85 ± 31.12 ^b	93.98 ± 27.41 ^{bc}	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	183.61 ± 1.52 ^d	135.64 ± 6.31 ^e	Mushroom
31	4-Ethylcyclohexanol	1034	k, t	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	12.87 ± 3.87 ^{de}	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	3.25 ± 0.42 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	10.06 ± 0.19 ^c	0.00 ± 0.00 ^a	
32	Butyrald hydroxytoluene	>1400	k, m	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	1.13 ± 0.14 ^c	0.34 ± 0.00 ^b	1.14 ± 0.00 ^c	1.34 ± 0.19 ^c	
<i>Ketones</i>													

(Continued)

Table 1-Continued

Peak number ^a	Compounds	KI	R	Fresh piece	After salting	Postsalting (d)		Drying-ripening (d)				S	
						7	14	7	14	28	56		84
33	2,3-Butanedione	633	k, t	10.59 ± 1.19 ^d	18.79 ± 6.15 ^{de}	14.01 ± 0.34 ^d	5.05 ± 0.12 ^b	2.80 ± 0.00 ^a	9.03 ± 0.28 ^c	7.69 ± 0.68 ^f	4.75 ± 0.38 ^b	4.97 ± 1.15 ^b	Butter
34	2-Butanone	639	k, t	4.66 ± 0.85 ^f	0.00 ± 0.00 ^a	0.46 ± 0.34 ^b	1.32 ± 0.00 ^c	1.12 ± 0.14 ^c	2.40 ± 0.42 ^d	2.73 ± 0.51 ^d	2.28 ± 0.19 ^d	2.49 ± 0.77 ^d	Ether
35	1-Penten-3-one	728	m	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.72 ± 0.12 ^b	0.70 ± 0.28 ^{bc}	0.99 ± 0.14 ^c	2.22 ± 0.17 ^d	2.09 ± 0.19 ^d	3.06 ± 0.19 ^c	Fish, pungent
36	2-Pentanone	731	k, t	5.50 ± 0.34 ^e	0.00 ± 0.00 ^a	1.14 ± 0.11 ^b	1.44 ± 0.24 ^{bc}	1.96 ± 0.56 ^c	2.26 ± 0.14 ^d	4.10 ± 0.51 ^e	3.61 ± 0.19 ^f	5.55 ± 0.19 ^e	Ether, fruit
37	3-Hexanone	740	k, t	0.00 ± 0.00 ^a	5.72 ± 0.99 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	21.63 ± 1.92 ^{cd}	20.70 ± 0.42 ^c	24.56 ± 3.10 ^{de}	39.12 ± 2.39 ^e	28.10 ± 1.52 ^{de}	0.00 ± 0.00 ^a	Ether, grape
38	2-Hexanone	834	k, m	5.84 ± 0.34 ^c	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	3.08 ± 0.17 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	Ether, floral, apple
39	2-Heptanone	936	k, m	21.34 ± 1.35 ^b	13.85 ± 1.21 ^a	22.89 ± 0.46 ^b	24.03 ± 0.24 ^c	33.28 ± 0.98 ^d	28.51 ± 0.56 ^c	38.44 ± 2.90 ^f	48.04 ± 1.14 ^g	59.69 ± 11.48 ^b	Soap
40	1-Hepten-3-one	1010	t	7.96 ± 0.51 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	28.23 ± 2.22 ^d	39.12 ± 2.22 ^d	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	Metal
41	3-Octanone	1013	t	48.02 ± 7.79 ^b	93.97 ± 0.66 ^c	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	142.96 ± 4.52 ^d	194.24 ± 5.98 ^e	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	Herb, butter, resin
42	5-Hepten-2-one, 6-methyl-	1018	k, t	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	2.39 ± 0.11 ^c	2.76 ± 0.24 ^c	3.08 ± 0.28 ^d	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	3.80 ± 0.19 ^e	2.68 ± 0.96 ^c	Pepper, mushroom, rubber
43	2-Octanone	1020	k, m	3.81 ± 0.85 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	9.91 ± 0.23 ^d	10.57 ± 0.24 ^d	12.17 ± 0.14 ^c	6.77 ± 0.56 ^f	6.32 ± 0.17 ^f	10.63 ± 0.76 ^d	10.14 ± 4.97 ^{de}	Soap, gasoline
44	3-Octen-2-one, (E)-	1053	k, m	16.94 ± 2.12 ^c	48.80 ± 2.31 ^b	127.77 ± 6.04 ^c	147.30 ± 5.05 ^f	167.82 ± 2.38 ^g	61.67 ± 7.48 ^e	70.39 ± 4.44 ^c	175.07 ± 7.03 ^g	158.79 ± 20.85 ^{fg}	Nut, crushed
45	3,5-Octadien-2-one,	1070	k, m	5.67 ± 0.85 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	51.70 ± 1.25 ^d	68.12 ± 3.24 ^f	58.46 ± 1.54 ^c	22.86 ± 2.96 ^c	21.01 ± 4.61 ^c	77.28 ± 4.18 ^g	65.24 ± 6.50 ^f	Fruit, fat, mushroom
46	Acetophenone/2-Nonanone	1072	k, t	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	9.11 ± 0.23 ^d	10.09 ± 0.12 ^c	10.77 ± 0.56 ^{ef}	5.65 ± 0.71 ^b	8.03 ± 1.03 ^c	11.01 ± 0.38 ^f	12.44 ± 6.12 ^{c,de}	Must, flower, almond, soap
47	2-Decanone	1235	m	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	2.54 ± 0.28 ^{bd}	3.25 ± 0.85 ^d	3.23 ± 0.19 ^{de}	2.49 ± 0.77 ^{bcd}	
49	Hydrocarbons	467	k, m	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	20.73 ± 5.12 ^b	36.52 ± 0.12 ^c	34.12 ± 17.76 ^{bc}	41.63 ± 17.08 ^{bcd}	68.34 ± 23.58 ^d	63.61 ± 4.37 ^{cd}	78.25 ± 7.84 ^d	Alkane
50	Pentane	514	k, t	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.76 ± 0.00 ^b	2.10 ± 2.10 ^b	
51	1,3-Pentadiene, (Z)-	595	k, m	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	1.59 ± 0.00 ^b	1.68 ± 0.24 ^b	2.38 ± 0.14 ^c	2.68 ± 0.28 ^c	5.30 ± 1.20 ^e	3.80 ± 0.00 ^d	4.97 ± 0.00 ^e	Alkane, green, mold
52	Benzene	684	k, m	3.64 ± 1.44 ^d	0.00 ± 0.00 ^a	1.71 ± 0.57 ^b	1.80 ± 0.12 ^b	2.52 ± 0.42 ^{bc}	2.82 ± 0.00 ^{cd}	3.42 ± 0.85 ^{cd}	3.23 ± 0.38 ^{cd}	3.25 ± 0.96 ^{cd}	
53	Heptane	698	k, m	36.84 ± 0.17 ^c	7.58 ± 0.33 ^a	11.05 ± 0.80 ^b	11.77 ± 0.96 ^b	15.94 ± 0.00 ^c	27.94 ± 3.81 ^d	79.10 ± 4.10 ^f	60.76 ± 1.71 ^g	75.38 ± 8.23 ^f	Alkane
54	Toluene	790	k, m	44.29 ± 7.62 ^c	13.85 ± 1.10 ^c	8.09 ± 0.57 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	8.47 ± 0.99 ^b	12.30 ± 0.51 ^c	16.52 ± 0.76 ^d	0.00 ± 0.00 ^a	Paint
55	1-Octene	794	k, m	5.25 ± 0.51 ^d	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	1.83 ± 0.42 ^b	3.08 ± 0.34 ^c	3.80 ± 0.19 ^c	3.44 ± 0.57 ^c	
56	Octane	799	k, m	143.28 ± 9.82 ^c	31.43 ± 2.86 ^a	34.62 ± 1.71 ^{ab}	37.85 ± 0.96 ^{ab}	46.29 ± 3.36 ^c	73.39 ± 3.53 ^d	164.69 ± 8.03 ^g	137.47 ± 1.14 ^f	134.88 ± 5.17 ^f	Alkane
57	4-Octene, (E)-	808	k, m	25.49 ± 2.20 ^d	5.50 ± 0.22 ^a	6.83 ± 0.34 ^b	7.21 ± 0.48 ^{bc}	8.39 ± 0.70 ^c	6.63 ± 0.28 ^b	8.54 ± 0.85 ^{cd}	9.11 ± 0.19 ^d	7.46 ± 1.53 ^{bc}	
58	2-Octene	819	m	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	1.14 ± 0.11 ^b	1.56 ± 0.24 ^c	2.10 ± 0.14 ^d	2.54 ± 0.00 ^e	0.00 ± 0.00 ^a	3.42 ± 0.19 ^e	2.68 ± 0.57 ^d	
59	Cyclooctene	837	m	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	3.95 ± 1.55 ^b	3.42 ± 0.17 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	
60	Heptane, 3-ethyl-	873	m	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	1.15 ± 0.19 ^b	
61	2,4-Octadiene	877	m	0.00 ± 0.00 ^a	4.51 ± 0.11 ^c	1.48 ± 0.57 ^{bcd}	1.20 ± 0.12 ^{bc}	0.00 ± 0.00 ^a	0.85 ± 0.14 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	1.71 ± 0.00 ^d	0.00 ± 0.00 ^a	
62	p-Xylene	894	k, m	0.00 ± 0.00 ^a	5.94 ± 0.44 ^d	2.28 ± 0.23 ^b	2.04 ± 0.12 ^b	2.38 ± 0.42 ^b	2.26 ± 0.14 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	3.23 ± 0.19 ^c	2.49 ± 1.34 ^{bc}	Geranium, smoked, phenolic
63	Nonane	898	k, t	4.40 ± 0.17 ^b	12.31 ± 0.99 ^c	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	Alkane, crackers
64	3-Hexene, 2,2-dimethyl-, (E)-	957	m	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	1.44 ± 0.12 ^c	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	2.09 ± 0.19 ^d	0.38 ± 0.00 ^b	
65	Octane, 3-ethyl-	970	m	0.00 ± 0.00 ^a	5.17 ± 0.44 ^d	1.94 ± 0.23 ^{bc}	2.28 ± 0.12 ^{bc}	2.52 ± 0.42 ^c	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.19 ^c	2.49 ± 0.77 ^{bc}	
66	Cyclohexene, 4-methyl-	973	m	0.00 ± 0.00 ^a	3.85 ± 0.33 ^c	5.58 ± 0.11 ^c	5.65 ± 0.00 ^c	5.59 ± 1.12 ^{ef}	2.82 ± 0.14 ^b	3.25 ± 0.17 ^c	4.18 ± 0.19 ^d	6.12 ± 0.19 ^f	
67	4-Decene/cis-3-Decene	993	m	0.00 ± 0.00 ^a	7.25 ± 0.11 ^c	2.62 ± 0.11 ^c	2.28 ± 0.24 ^c	3.64 ± 0.28 ^d	0.00 ± 0.00 ^a	1.37 ± 0.17 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	
68	Decane	996	k, m	0.00 ± 0.00 ^a	32.86 ± 3.96 ^c	10.82 ± 0.57 ^d	10.09 ± 0.24 ^d	11.19 ± 1.12 ^d	3.10 ± 1.41 ^b	2.90 ± 1.37 ^b	4.94 ± 0.19 ^c	4.40 ± 4.40 ^{abc}	Alkane
69	Decane, 2-methyl-	1036	m	0.00 ± 0.00 ^a	21.98 ± 1.21 ^c	6.95 ± 3.19 ^b	5.89 ± 0.36 ^b	5.31 ± 0.28 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	
70	Decane, 3-methyl-	1040	m	0.00 ± 0.00 ^a	21.98 ± 1.65 ^c	3.64 ± 0.34 ^b	4.08 ± 0.36 ^b	3.92 ± 0.42 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	
71	Decane, 3,8-dimethyl-	1045	m	0.00 ± 0.00 ^a	20.55 ± 0.66 ^d	4.56 ± 0.68 ^{bc}	5.41 ± 0.24 ^c	4.75 ± 0.28 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	
72	1,3-Hexadiene, 3-ethyl-2-methyl-, (Z)-	1049	m	0.00 ± 0.00 ^a	18.79 ± 0.33 ^c	0.00 ± 0.00 ^a	11.53 ± 0.72 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	

Continued

(Continued)

Table 1—Continued

Peak number ^a	Compounds	KI	R	Fresh piece	After salting	Postsalting (d)		Drying-ripening (d)					S
						7	14	7	14	28	56	84	
73	Undecane, 5-methyl-	1061	<i>m</i>	0.00 ± 0.00 ^a	18.03 ± 0.44 ^d	4.78 ± 0.46 ^b	5.77 ± 0.24 ^c	5.17 ± 0.14 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	Alkane
74	Undecane	1102	<i>k, m</i>	0.00 ± 0.00 ^a	98.59 ± 2.09 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	
75	Decane, 3,6-dimethyl-	1116	<i>m</i>	0.00 ± 0.00 ^a	15.06 ± 0.66 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	
76	Undecane, 2-methyl-	1169	<i>m</i>	0.00 ± 0.00 ^a	11.10 ± 0.77 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	
77	Undecane, 3-methyl-	1166	<i>m</i>	0.00 ± 0.00 ^a	23.41 ± 0.99 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	Alkane
78	1-Dodecene	1192	<i>m</i>	0.00 ± 0.00 ^a	6.15 ± 0.55 ^d	1.25 ± 0.11 ^b	1.80 ± 0.12 ^c	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	
79	Dodecene	1195	<i>k, m</i>	0.00 ± 0.00 ^a	20.66 ± 1.32 ^c	6.49 ± 2.05 ^d	6.13 ± 0.60 ^d	6.29 ± 1.12 ^d	3.53 ± 0.42 ^b	4.44 ± 0.17 ^c	4.56 ± 0.57 ^c	5.55 ± 4.40 ^d	
80	Undecane, 2,6-dimethyl-	1211	<i>m</i>	0.00 ± 0.00 ^a	7.25 ± 0.11 ^d	1.59 ± 0.23 ^c	1.56 ± 0.36 ^c	0.98 ± 0.14 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	
81	Benzene, 1,3-dimethoxy-	1220	<i>m</i>	0.00 ± 0.00 ^a	6.48 ± 0.11 ^c	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.95 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	Alkane
82	Dodecene, 2-methyl-	1258	<i>m</i>	0.00 ± 0.00 ^a	3.19 ± 0.11 ^d	0.57 ± 0.46 ^{bc}	0.96 ± 0.36 ^c	0.28 ± 0.14 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	
83	1-Tridecene	1285	<i>m</i>	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.72 ± 0.12 ^c	0.42 ± 0.14 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	
84	Tridecene	1287	<i>k, m</i>	0.00 ± 0.00 ^a	6.05 ± 1.10 ^d	2.73 ± 0.68 ^c	2.16 ± 0.12 ^c	1.26 ± 0.42 ^b	2.68 ± 0.99 ^c	2.39 ± 0.51 ^c	2.47 ± 0.57 ^c	2.30 ± 0.77 ^c	
85	1-Tetradecene	1314	<i>m</i>	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.60 ± 0.12 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	Fruit, fresh, sweet, boiled meat
86	Formic acid, pentyl ester	822	<i>k, t</i>	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	2.66 ± 0.19 ^b	2.49 ± 0.77 ^b	
87	Formic acid, hexyl ester	887	<i>m</i>	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	21.84 ± 0.57 ^c	17.60 ± 0.38 ^b	
88	Hexanoic acid, methyl ester	936	<i>k, m</i>	0.00 ± 0.00 ^a	11.10 ± 1.54 ^b	14.80 ± 0.91 ^c	16.46 ± 0.84 ^c	25.45 ± 3.08 ^d	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	
89	4-Hydroxymandelic acid, ethyl ester, di-TMS	1075	<i>m</i>	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	89.05 ± 10.02 ^c	0.00 ± 0.00 ^a	56.58 ± 9.68 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	Rancid, butter, cheese, fatty
90	Propanoic acid, 2-methyl-	852	<i>k, t</i>	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	6.15 ± 1.37 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	
91	Butanoic acid, 3-methyl-	931	<i>m</i>	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	4.61 ± 2.22 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	
92	Heptanoic acid	1037	<i>t</i>	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	2.30 ± 0.96 ^b	
93	Furans	719	<i>k, m</i>	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	2.73 ± 0.11 ^b	2.76 ± 0.12 ^b	3.50 ± 0.28 ^c	2.96 ± 0.14 ^b	5.13 ± 1.03 ^{de}	4.94 ± 0.00 ^d	6.12 ± 0.96 ^c	Sweet, acid, sour, lemony
94	3(2H)-Furanone, dihydro-2-methyl-	741	<i>t</i>	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	17.65 ± 0.11 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	
95	2-n-Butyl furan	909	<i>k, m</i>	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	2.62 ± 0.11 ^d	2.16 ± 0.12 ^c	3.78 ± 0.14 ^c	1.83 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	2.28 ± 0.19 ^c	4.02 ± 1.53 ^c	
96	Furan, 2-pentyl-	1003	<i>k, m</i>	0.00 ± 0.00 ^a	7.25 ± 1.84 ^b	18.79 ± 1.02 ^d	16.10 ± 0.60 ^c	27.97 ± 1.12 ^c	9.17 ± 0.71 ^b	8.37 ± 0.68 ^b	20.13 ± 1.71 ^d	17.79 ± 9.95 ^{de}	
97	Chloride compounds	655	<i>k, m</i>	4.66 ± 0.42 ^d	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	2.12 ± 0.14 ^c	4.95 ± 0.85 ^d	1.33 ± 0.19 ^b	2.10 ± 0.19 ^c	Green
98	Trichloromethane	676	<i>m</i>	0.00 ± 0.00 ^a	3.74 ± 0.33 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	2.87 ± 1.34 ^b	
99	Sulphur compounds	776	<i>t</i>	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.80 ± 0.11 ^b	0.96 ± 0.12 ^b	1.12 ± 0.28 ^b	2.26 ± 0.00 ^d	2.73 ± 0.17 ^c	1.90 ± 0.19 ^c	0.00 ± 0.00 ^a	Onion, cabbage, putrid, socks
100	Pentane, 1-chloro-	785	<i>k, m</i>	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	3.23 ± 0.57 ^b	3.44 ± 0.38 ^b	
101	Pyridine	939	<i>k, m</i>	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	3.99 ± 0.19 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	
102	Pyridine, 2-ethyl-	948	<i>m</i>	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	4.21 ± 0.57 ^c	3.60 ± 0.00 ^b	5.73 ± 1.40 ^d	4.66 ± 0.14 ^{bc}	6.66 ± 0.17 ^d	14.24 ± 0.76 ^c	17.03 ± 10.14 ^f	

^a–^hValues in the same row not followed by a common letter differ significantly ($P < 0.05$).^aPeak number corresponds to the elution order show in Figure 1.

A = Kovats index calculated for DB-624 capillary column (J&W Scientific: 30 m × 0.25 mm i.d., 1.4-μm film thickness) installed on a gas chromatograph equipped with a mass selective detector.

R = reliability of identification: k = Kovats index in agreement with literature (Barbieri and others 1992; Buscalioni and others 1993; Mateo and Zumalacárregui 1996; Ruiz and others 1999; Vaillon and others 1996; Flores and others 1997; Liu and others 2007; Yu and others 2008; Jurado and others 2009); m = mass spectrum agreed with mass database (NIST05); t = tentative identification by mass spectrum.

S = sensory descriptions found in literature (Flores and others 1997; Moon and others 2006; García-González and others 2008; Olivares and others 2009).

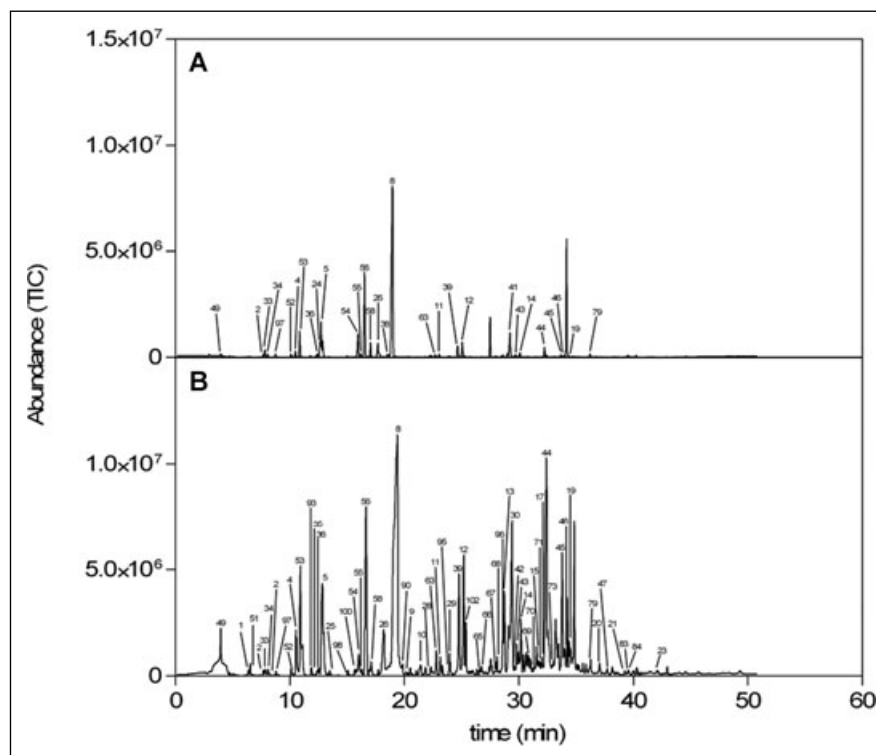


Figure 1—Gas chromatogram of the volatile compounds from "lacón": (A) fresh piece and (B) at the end of process. For peak numbers see Table 1.

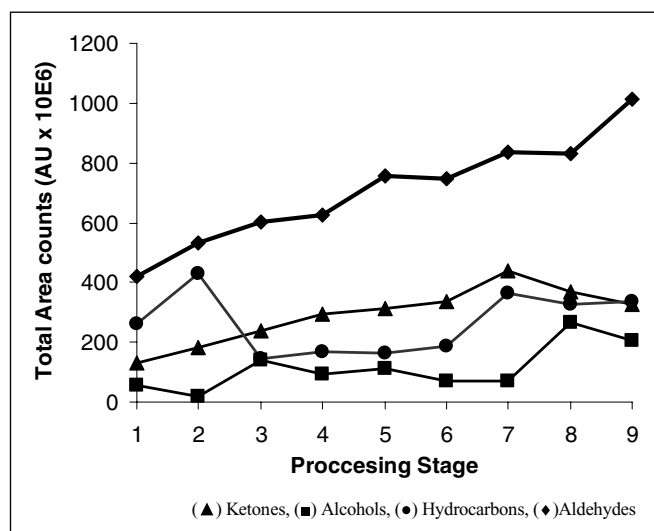


Figure 2—Evolution of majority chemical families of volatile compounds from "lacón" during processing.

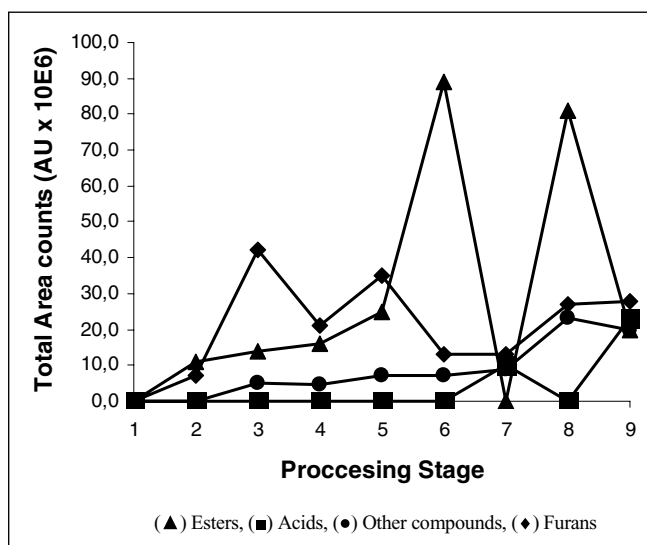


Figure 3—Evolution of minority chemical families of volatile compounds from "lacón" during processing.

the aroma of dry-cured "lacón," because they have a low perception threshold. The results were in accordance with findings reported by other authors (López and others 1992; Sabio and others 1998; Huan and others 2005; Sánchez-Peña and others 2005), as they obtained that the main compounds in dry-cured ham were aldehydes. However, Gasparido and others (2008) concluded that alcohols were the most abundant, representing 41.38% of the total volatile fraction in "San Daniele" ham. Those authors suggested that the high concentration of alcohols could be associated to the length of the seasoning period. Also, Muriel and others (2004) pointed out that alcohols were quantitatively and qualitatively the most important chemical family in Iberian dry-cured loin, (at least 35% of total chromatographic area) followed by acids and ketones,

with 18% and 12% of total chromatographic area, respectively. Other authors (Bolzoni and others 1996) found that the esters were the compounds family that registered the highest percentage among Parma ham volatile compounds. These differences in comparison with results reported in others typical European hams could be attributable either to the fact that samples were taken from a central section, either to differences in processing technology or raw material.

Aldehydes, such as propanal, 2 methyl, 2-pentanal, and nonanal, that do not appear in the fresh piece are present in the final stages. Others aldehydes, such as 3-methylbutanal or heptanal, appeared in the fresh product and in the final stages in greater counts (90.1×10^6 area units). Anyway, aldehydes percentage was strongly

conditioned by levels of hexanal, which was the main component of these compounds in "lacón" samples during the whole process, showing 31.77% of the total area at the end of drying-ripening. Our results agree with those reported by other authors (García and others 1991; Ruiz and others 1999; Ramírez and Cava 2007), where hexanal was the most abundant of the identified dry hams volatile compounds. Levels of hexanal increased from 300 to 607×10^6 area units, around 102% during the "lacón" process. This aldehyde is generally considered as a good indicator of the oxidation level (Shahidi and Pegg 1994). In a previous study (Lorenzo and others 2008a), it can be observed an increased in thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) values for this product (under similar condition of process). Its aroma has been described as strong, rancid, unpleasant (MacLeod and Coppock 1976), hot, nauseating (Persson and Von Sydow 1973), green leaves, and vegetables (Stahnke 1994). Hexanal must have an effect on the "lacón" aroma, although it is modulated by other aromatic compounds accumulated at the same time. The 2-methylpropanal and 3-methylbutanal are more likely formed as a consequence of Strecker degradation of the amino acid valine and leucine, respectively (Belitz and Grosch 1997), or due to microbial metabolism (Hinrichsen and Pedersen 1995).

Other aldehydes, such as pentanal, hexanal, heptanal, octanal, and butanal-3-methyl, were also important and all increasing from raw piece to the final process in 80%, 102%, 275%, 258%, and 244%, respectively. From a biochemical point of view, the origin of linear saturated aldehydes could be related to the autoxidation of unsaturated fatty acids: oleic, linoleic, linolenic, and arachidonic (Chan and Coxon 1987), whereas the branched saturated aldehyde could be related to proteolysis/amino acid degradation (Pastorelli and others 2003).

Hydrocarbons reached high contents in all samples, and they were formed via lipid oxidation in "lacón" samples. For instance, pentane increased significantly ($P < 0.001$) after 7 d of postsalting stage until at the end of process where reaching maximum values (78.25×10^6 area units), whereas heptane had an increment from 36.8×10^6 area units in raw piece to 75.4×10^6 area units at 84 d of drying-ripening. Within branched hydrocarbons of 10 and 11 carbons atoms, it is remarkable those appeared (decane, 2-methyl; decane, 3-methyl; decane 3,8-dimethyl; undecane, 5-methyl) in the salting stage for disappeared at 14 d of drying-ripening and no appear in rest of stages. Most of these hydrocarbons, such as heptane, decane, and undecane, have been already described by several authors in the Iberian ham and dry-cured loin (Sánchez-Peña and others 2005; Soto and others 2008; Narváez-Rivas and others 2010). However, it has been remarked that hydrocarbons probably had not substantial impact on flavor, because they have relatively high odor threshold values (Drumm and Spanier 1991; García and Timón 2001).

The presence of the volatile compounds belonging to acids family in the elaborating process of "lacón" was marginal. Acids only materialize in one processing stage and it never appears in higher than 0.40%. Acetic acid was the most abundant acid reported by other authors in meat products (Muriel and others 2004; Pérez-Juan and others 2006). Its origin is mainly the microbial metabolism of glucides (Kandler 1983). However, we have not detected this acid in our study.

On the other hand, branched chain acids, such as 2-methylpropanoic acid and 3-methylbutanoic acid, have been identified as products of valine and leucine microbial metabolism, respectively (Stahnke 1995a). However, short-chain acids (<6 carbon atoms) have an important effect in aroma development due to

their characteristic odors, described as vinegar, cheese, or cucumber (Stahnke 1995b) and to their low threshold values (Belitz and Grosch 1997). In this sense, Schmidt and Berger (1998) found 3-methylbutanoic acid to be a key compound among the odor-active compounds in different types of dry-cured sausages.

Furans were not detected in the raw material, keeping the same pattern as ester and acid compounds. However, 2-methyl furan, 3 (2H)-furanone, 2-n-buthyl furan, and 2-pentyl furan were identified during different stages of the manufacture process (Table 1). The area units of these chemicals were below 45×10^6 during processing (Figure 3). Among these compounds, 2-pentyl furan showed the highest level in this group (18.8×10^6 area units). It is a noncarboxylic compound derived from linoleic acid and other *n*-6 fatty acids (Frankel 1991), frequently found in dry-cured ham, with relatively low threshold and vegetable aromatic note (Fay and Brevard 2005). Furans are connected to the heating process, and they have been found in other dry-cured meat products that were manufactured from whole pieces such as dry-cured loin (Muriel and others 2004), dry-cured Iberian ham (Ruiz and others 1999), and dry-cured ham (Flores and others 1997).

Regarding alcohols family, only 2 alcohols were detected in the raw pieces. During processing, 9 different alcohols were determined at different levels (Table 1). The proportion of them in total area was maximum at 56 d of drying-ripening, reaching 13.98%. Alcohols have a low odor threshold, so they are crucial contributors to the aroma of these products (Sabio and others 1998). At the end of process, 1-octen-ol was the most abundant alcohol representing a 65% of the total alcohol volatile compounds. It is responsible for a mushroom note, and hence it may play an important role for dry-cured "lacón." The 1-pentanol increased around a 61% at the end of elaborated process, while the 1-penten-3-ol appeared in the fresh piece (21.8×10^6 area units) and disappeared in the postsalting stage. This secondary alcohol also originated from oxidation of fatty acids (Hsieh and Kinsella 1989) had a lower threshold value, thus may play an important role in the odor of this product.

Alcohols are often described as an important component of meat volatiles, closely related to the characteristic fatty flavor of meat, and it is considered as a product of the autoxidation of linoleic acid or other polyunsaturated fatty acid (Pham and others 2008). Among alcohols, 1-pentanol, 1-penten-3-ol, 1-hexanol, 1-octen-3-ol detected in present study have also been detected in other raw-cured meat products (García-Esteban and others 2004; Muriel and others 2004; Ramírez and Cava 2007; Kaban 2009).

The majority of ketones come out in the raw pieces, whereas only 5 new ketones were generated during manufacturing process. The percentage of these compounds matched the levels described by Muriel and others (2004) in Iberian dry-cured loin (Figure 1). 2-pentanone, 2-hexanone, 2-heptanone, and 2-nonanone were detected in present study, and they have also been reported to be an oxidation product of fatty acids (Flores and others 1997). The most abundant ketone at the end of manufacturing process was 3-octen-2-one hitting values of 158.8×10^6 area units. It is remarkable, the impressive increase of 3-octen-2-one and 3-5-octadien-2-one from his content in the fresh piece to the final process with increasing percentage values of 829 and 1061, respectively. Production of 2-butanone and other "methyl-ketones" has also been associated with β -oxidation activity of moulds that were growing in the surface of dry-cured products (Sunesen and Stahnke 2003), as we found in a previous report on dry-cured "lacón" (Lorenzo and others 2007a). Ketones, especially 2-ketones, are considered to have a great influence on the aroma of meat and

meat products, as they turn up in large amounts and they have a peculiar aroma, such as ethereal, butter, spicy notes, or blue cheese notes (Novelli and others 1995).

Other ketones, such as 2-3-butadienone and 2-butanone, appeared in the fresh piece to be reduced in a 50% on final processing stage (from 10.6 and 4.6 to 4.9 and 2.5×10^6 area units, respectively), while 2-nonanone are maintained constant in all elaborated process (range between 5.6 and 12.4×10^6 area units).

Esters, they were not detected in the fresh pieces. During "lacón" elaboration process, the area units of the esters varied between 0 and 89×10^6 (Figure 3). Esters from short-chain fatty acids, acetates, propanoates, and butanoates exhibit fruity notes and low odor thresholds, and thus they can contribute to dry-cured sausage aroma (Stahnke 1995a, 1995b). According to Hinrichsen and Pedersen (1995), ethyl esters are formed enzymatically in the final stage of ripening by alcohol and acids combination, and one ethyl esters were identified at 14 and 28 d of drying-ripening of "lacón" process in our study. Esters have also been recognized in other dry-cured meat products (Sabio and others 1998; Ruiz and others 1999; Muriel and others 2004; Ramírez and Cava 2007; Kaban 2009).

Sulphur compounds were mainly formed from the sulphur that is incorporated in amino acids, such as methionine, cysteine, and cystine, via Strecker degradation to thiols. Dimethyl disulfide has been presented at the end of salting (3.7×10^6 area units) and at the end of "lacón" dry-curing process (2.9×10^6 area units) in our study. Its source an oxidation product of methane thiol and it could react to form dimethyl trisulfide and dimethyl sulfide (Flores and others 1997). Chlorinated compounds (1-chloro pentane and trichloromethane) observed during dry-cured "lacón" process might come from pesticide residues that the pig ingested in its diet (Buscailhon and others 1991).

A large number of compounds originated from oxidation of fatty acids (Buscailhon and others 1993; Mottram 1998; Andrés and others 2004; Hierro and others 2004), that is, the aliphatic unbranched aldehydes, alkanes and alkenes, ketones, alcohols, and alkylfurans were detected in dry-cured hams. At the final dry-cured "lacón" (84 d of drying-ripening), the flavor compounds that were likely to be originated from lipid were composed of 3 alcohols (2-pentanol, 1-pentanol, and 1-octen-3-ol), 8 aldehydes (from pentanal to nonanal plus 2-hexenal, 2-heptenal, and 2-nonenal), 3 ketones (2-pentanone, 2-heptanone, and 2-nonanone), 6 hydrocarbons (from hexane to octane plus undecane, 1-octene, and 2-octene), and 2 furans (2-ethylfuran and 2-pentylfuran). Their total contents were 73.12% of the total flavor compounds.

Only 3 compounds came from amino acids at the end of dry-cured "lacón" process. Within this molecules, we observed 2 aldehydes (2-methyl propanal and 3-methyl butanal) and one sulphur compound (dimethyl disulfide). Their total contents were 1.92% of the total flavor compounds. The 2-butanone (represented a 0.13%) was a volatile compound that source is the fermentation of carbohydrates.

Conclusion

A large amount of them are obtained from lipid oxidation. In the final dry-cured "lacón," aldehydes were the richest chemical family among flavor substances, followed by hydrocarbons, and ketones. The most abundant volatile compound was hexanal. Flavor formation of dry-cured "lacón" began from salting stage.

Acknowledgments

This work was part of the research Project O7TAL003CT granted by the Xunta de Galicia (The Regional Government).

References

- Andrés AI, 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 Chem* 84:375–81.
- Barbieri G, Bolzoni L, Parolari G, Virgili R, Buttini R, Careri M, Mangia A. 1992. Flavor compounds of dry-cured ham. *J Agric Food Chem* 40:2389–94.
- Belitz HD, Grosch W. 1997. *Química de los alimentos*. 2a edición. Zaragoza: Ed. Acribia.
- Bolzoni L, Barbieri G, Virgili R. 1996. Changes in volatile compounds of Parma ham during maturation. *Meat Sci* 43:301–10.
- Buscailhon S, Berdagué JL, Monin G. 1991. Time-related changes in volatile compounds of lean tissue during processing of French dry-cured ham. *J Sci Food Agric* 63:69–75.
- Buscailhon S, Berdagué JL, Monin G. 1993. Time-related changes in volatile compounds of lean tissue during processing of French dry-cured ham. *J Sci Food Agric* 63:69–75.
- Chan HWS, Coxon DT. 1987. Lipid hydroperoxides. In: Chan HWS, editor. *Autoxidation of unsaturated lipids*. New York: Academic Press. p 17–51.
- Dirinck P, Van Opstaele F, Vandendriessche F. 1997. Flavour differences between northern and southern European cured hams. *Food Chem* 59:511–21.
- Drumm TD, Spanier AM. 1991. Changes in the content of lipid autoxidation and sulfur-containing compounds in cooked beef during storage. *J Agric Food Chem* 39:336–43.
- Fay LB, Brevard H. 2005. Contribution of mass spectrometry of the Maillard reaction in food. *Mass Spectrom Rev* 24:487–507.
- Flores M, Grimm CC, Toldrá F, Spanier AM. 1997. Correlations of sensory and volatile compounds of spanish "Serrano" dry-cured ham as a function of two processing times. *J Agric Food Chem* 45:2178–86.
- Frankel EN. 1991. Recent advances in lipid oxidation. *J Sci Food Agric* 54(4):495–511.
- García C, Berdagué JJ, Antequera T, López-Bote C, Córdoba JJ, Ventanas J. 1991. Volatile components of dry cured Iberian ham. *Food Chem* 41:23–32.
- García C, Timón ML. 2001. Los compuestos responsables del "flavour" del jamón. Variaciones en los distintos tipos de jamones. In: Ventanas J, editor. *Tecnología del jamón Ibérico: de los sistemas tradicionales a la explotación racional del sabor y el aroma*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. p 391–418.
- García-Esteban M, Ansorena D, Astiasarán I, Ruiz J. 2004. Study of the effect of different fiber coatings and extraction conditions on dry cured ham volatile compounds extracted by solid-phase microextraction (SPME). *Talanta* 64:458–66.
- García-González DL, Tena N, Aparicio-Ruiz R, Morales MT. 2008. Relationship between sensory attributes and volatile compounds qualifying dry-cured hams. *Meat Sci* 80:315–25.
- Gaspardo B, Procià G, Toso B, Stefanon B. 2008. Determination of volatile compounds in San Daniele ham using headspace GC-MS. *Meat Sci* 80:204–9.
- Hierro E, de la Hoz L, Ordóñez JA. 2004. Headspace volatile compounds from salted and occasionally smoked dried meats (cecinas) as affected by animal species. *Food Chem* 85:649–57.
- Hinrichsen LL, Pedersen SB. 1995. Relationship among flavor, volatile compounds, chemical changes and microflora in Italian-type dry-cured ham during processing. *J Agric Food Chem* 43:2932–40.
- Huan Y, Zhou G, Zhao G, Xu X, Peng Z. 2005. Changes in flavor compounds of dry-cured Chinese Jinhua ham during processing. *Meat Sci* 71:291–9.
- Hsieh RJ, Kinsella JE. 1989. Oxidation of polyunsaturated fatty acids: mechanisms, products and inhibition with emphasis on fish. *Adv Food Nutr Res* 33:233–341.
- Jurado A, Carrapio AI, Ventanas J, García C. 2009. Changes in SPME-extracted volatile compounds from Iberian ham during ripening. *Grasas y Aceites* 60:262–70.
- Kaban G. 2009. Changes in the composition of volatile compounds and in microbiological and physicochemical parameters during pastirma processing. *Meat Sci* 82:17–23.
- Kandler O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49:209–24.
- Liu Y, Xu XL, Zhou GH. 2007. Comparative study of volatile compounds in traditional Chinese Nanjing marinated duck by different extraction techniques. *Intl J Food Sci Technol* 42:543–50.
- López MO, de la Hoz L, Cambero MI, Gallardo E, Reglero G, Ordóñez JA. 1992. Volatile compounds of dry hams from Iberian pigs. *Meat Sci* 31:267–77.
- Lorenzo JM, García Fontán MC, Franco I, Carballo J. 2008a. Biochemical characteristics of dry-cured lacón (a Spanish traditional meat product) throughout the manufacture, and sensorial properties of the final product. Effect of some additives. *Food Control* 19:1148–58.
- Lorenzo JM, García Fontán MC, Franco I, Carballo J. 2008b. Proteolytic and lipolytic modifications during the manufacture of dry-cured lacón, a Spanish traditional meat product: effect of some additives. *Food Chem* 110:137–49.
- Lorenzo JM, García Fontán MC, Franco I, Carballo J. 2007a. Microbiological of dry-cured lacón. *Fleischwirtschaft Intl* 22:88–92.
- Lorenzo JM, Martínez S, Franco I, Carballo J. 2007b. Biogenic amine content during the manufacture of dry-cured lacón, a Spanish traditional meat product: effect of some additives. *Meat Sci* 77:287–93.
- MacLeod G, Coppock B. 1976. Volatile flavor components of beef boiled conventionally and by microwave radiation. *J Agric Food Chem* 24:835–43.
- Mateo J, Zumalacárregui JM. 1996. Volatile compounds in chorizo and their changes during ripening. *Meat Sci* 44:255–73.
- Moon SY, Cliff MA, Li-Chan ECY. 2006. Odour-active components of simulated beef flavour analysed by solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry and -olfactometry. *Food Res Intl* 39:294–308.
- Mottram DS. 1998. Flavor formation in meat and meat products: a review. *Food Chem* 62:415–24.
- Muriel E, Antequera T, Petró MJ, Andrés AI, Ruiz J. 2004. Volatile compounds in Iberian dry-cured loin. *Meat Sci* 68:391–400.
- Naes H, Holck AL, Axelsson L, Andersen HJ, Blom H. 1995. Accelerated ripening of dry fermented sausage by addition of a *Lactobacillus* proteinase. *Intl J Food Sci Technol* 29: 651–9.

- Narváez-Rivas M, Vicario IM, Alcalde MJ, Lén-Camacho M. 2010. Volatile hydrocarbon profile of Iberian dry-cured hams. A possible tool for authentication of hams according to the fattening diet. *Talanta* 81:1224–8.
- Novelli E, Gandemer G, Meynier A, Zanardi E, Chizzolini R. 1995. Composizione dell'aroma di due prodotti di salumeria: mortadella e salame milano. Parma: Atti del congresso Grassi e qualità delle carni. p 133–53.
- Official Journal of the European Communities. 2001. COMMISSION REGULATION (EC) No 898/2001 of 7 May 2001 L 126, Vol. 44, 8 May 2001 (p 18). Supplementing the Annex to Regulation (EC) No 2400/96 on the entry of certain names in the "Register of protected designations of origin and protected geographical indications" provided for in Council Regulation (EEC) No 2081/92 on the protection of geographical indications and designations of origin for agricultural products and foodstuffs.
- Olivares A, Navarro JL, Flores M. 2009. Establishment of the contribution of volatile compounds to the aroma of fermented sausages at different stages of processing and storage. *Food Chem* 115:1464–72.
- Ordóñez JA, Hierro EM, Bruna JM, de la Hoz L. 1999. Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Crit Rev Food Sci Nutr* 39:329–67.
- Pastorelli G, Magni S, Rossi R, Pagliarini E, Baldini P, Dirinck P, Van Opstaele F, Corino C. 2003. Influence of dietary fat, on fatty acid composition and sensory properties of dry-cured Parma ham. *Meat Sci* 65:571–80.
- Pérez-Juan M, Flores M, Toldrá F. 2006. Generation of volatile flavour compounds as affected by the chemical composition of different dry-cured ham sections. *Eur Food Res Technol* 222:658–66.
- Persson T, Von Sydow E. 1973. Aroma of canned beef: gas chromatographic and mass spectrometric analysis of the volatiles. *J Food Sci* 33:377–82.
- Pham AJ, Schilling MW, Mikel WB, Williams JB, Martin JM, Coggins PC. 2008. Relationships between sensory descriptors, consumer acceptability and volatile flavor compounds of American dry-cured ham. *Meat Sci* 80:728–37.
- Ramírez MR, Cava R. 2007. Effect of Iberian × Duroc genotype on dry-cured loin quality. *Meat Sci* 76:333–41.
- Ruiz J, Muriel E, Ventanas J. 2002. The flavour of Iberian ham. In: Toldrá F, editor. *Research advances in the quality of meat and meat products*. Trivandrum, India: Research Signpost.
- Ruiz J, Ventanas J, Cava R, Andrés A, García C. 1999. Volatile compounds of dry-cured Iberian ham as affected by the length of the curing process. *Meat Sci* 52:19–27.
- Sabio E, Vidal-Aragón MC, Bernalte MJ, Gata JL. 1998. Volatile compounds present in six types of dry-cured ham from south European countries. *Food Chem* 61:493–503.
- Sánchez-Peña CM, Luna G, García-Gómez DL, Aparicio R. 2005. Characterization of French and Spanish dry-cured hams: influence of the volatiles from the muscles and the subcutaneous fat quantified by SPME-GC. *Meat Sci* 69:635–45.
- Schmidt S, Berger RG. 1998. Aroma compounds in fermented sausage of different origins. *Lebensm Wiss Technol* 31:559–67.
- Shahidi F, Pegg RB. 1994. Hexanal as an indicator of meat flavour deterioration. *J Food Lipids* 1:177–86.
- Stahnke LH. 1994. Aroma components from dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus*. *Meat Sci* 38:39–53.
- Stahnke LH. 1995a. Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredient levels. Part II. Volatile components. *Meat Sci* 41:193–209.
- Stahnke LH. 1995b. Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredient levels. Part III. Sensory evaluation. *Meat Science* 41:211–23.
- Soto E, Hoz L, Ordóñez JA, Hierro E, Herranz B, López-Bote C, Cambero MI. 2008. Impact to feeding and rearing systems of Iberian pig on volatile profile and sensory characteristics of dry-cured loin. *Meat Sci* 79:666–76.
- Sunesen LO, Stahnke L. 2003. Mould starter cultures for dry sausages-selection, application and effects. *Meat Sci* 65:935–48.
- Toldrá F. 2006. The role of muscle enzymes in dry-cured meat products with different drying conditions. *Trends Food Sci Technol* 17:164–8.
- Viallon C, Berdagué JL, Montel MC, Talon R, Martin JF, Kondjoyan N, Denoyer C. 1996. The effect of stage of ripening and packaging on volatile content and flavour of dry sausage. *Food Res Int* 29:667–74.
- Yang H, Ma C, Qiao F, Song Y, Du M. 2005. Lipolysis in intramuscular lipids during processing of traditional Xuanwei ham. *Meat Sci* 71:670–5.
- Yu AN, Sun BG, Tian DT, Qu WY. 2008. Analysis of volatile compounds in traditional smoke-cured bacon (CSCB) with different fibre coatings using SPME. *Food Chem* 110:233–8.

PUBLICACIÓN VI.2:

*“Influence of salt content and processing time on sensory characteristics of cooked
“lacón””*

Laura Purriños, Roberto Bermúdez, Sara Temperán, Daniel Franco, Javier Carballo, José
M. Lorenzo

Meat Science, 87 (2011) 436-442



Influence of salt content and processing time on sensory characteristics of cooked “lacón”

Laura Purriños^a, Roberto Bermúdez^a, Sara Temperán^a, Daniel Franco^a, Javier Carballo^b, José M. Lorenzo^{a,*}

^a Centro Tecnológico de la Carne de Galicia, Rúa Galicia N° 4, Parque Tecnológico de Galicia, San Cibrán das Viñas, 32900 Ourense, Spain

^b Área de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias de Ourense, Universidad de Vigo, 32004 Ourense, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 May 2010

Received in revised form 22 November 2010

Accepted 24 November 2010

Keywords:

Dry-cured “lacón”

Sensory properties

Processing time

Salt content

ABSTRACT

The influence of salt content and processing time on the sensory properties of cooked “lacón” were determined. “Lacón” is a traditional dry-cured and ripened meat product made in the north-west of Spain from the fore leg of the pig, following a similar process to that of dry-cured ham. Six batches of “lacón” were salted with different amounts of salt (LS (3 days of salting), MS (4 days of salting) and HS (5 days of salting)) and ripened during two times (56 and 84 days of dry-ripening). Cured odour in all batches studied, red colour and rancid odour in MS and HS batches, flavour intensity in MS batch and fat yellowness, rancid flavour and hardness in the HS batch were significantly different with respect to the time of processing. Appearance, odour, flavour and texture were not significantly affected by the salt content ($P > 0.05$). However, the saltiness score showed significant differences with respect to the salt levels in all studied batches (56 and 84 days of process). The principal component analysis showed that physicochemical traits were the most important ones concerning the quality of dry-cured “lacón” and offered a good separation of the mean samples according to the dry ripening days and salt level.

© 2010 The American Meat Science Association. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The acceptance of dry-cured products by consumers is mainly determined by their sensory quality. The aroma is perhaps the most important quality parameter and it is markedly affected by raw material, processing techniques, and aging time (Dirinck, Van Opstaele, & Vandendriessche, 1997; Sánchez-Peña, Luna, García-Gómez, & Aparicio, 2005).

Dry-cured “lacón” is a traditional cured meat product made in the north-west of Spain from the fore leg of the pig which is cut at the shoulder blade-humerus joint, following very similar manufacturing processes to those used in the production of dry-cured ham as described by Marra, Salgado, Prieto, and Carballo (1999). In Galicia (NW Spain), this product has been awarded as Geographically Protected Identity (G.P.I.) (Official Journal of the European Communities, 2001).

Nowadays, a wide variety of dry-cured meat products is produced from different raw materials and under different processing conditions (Toldrá, 2006). On the other hand, consumers demand less salty meat products (Guerrero, Gelabert, Gou, Guardia, & Arnau, 2000) due to the health recommendations to lessen hypertension (Morgan, Aubert, & Brunner, 2001). In order to reach these aims, it is becoming very usual to decrease the salt content and the processing time of dry-cured meat products (Ventanas & Cava, 2001). Regarding the ripening time the

meat industry has tried to use shorter processes in order to minimise the costs, even though hams with a shorter ripening time have a lower price in the market.

In dry-cured products, chemical and biochemical changes during the ripening lead to a large number of volatile compounds which contribute to their characteristic flavour (Ruíz, Muriel, & Ventanas, 2002). Proteolysis and lipolysis are two of the most important mechanisms that have an impact on the final sensory quality. Proteolysis events have been shown to be an important source of aroma and flavour, as they release several compounds related to the flavour development, such as free amino acids (Naes, Holck, Axelsson, Andersen, & Blom, 1995; Ordóñez, Hierro, Bruna, & de la Hoz, 1999). Lipolysis also plays an important role in the development of sensorial characteristics because it causes an increase in free fatty acid content, and it also catalyses oxidation reactions which leads to the release of a large number of volatile compounds that are responsible for the characteristic flavour of a certain food (Yang, Ma, Qiao, Song, & Du, 2005).

Several studies have been done so far in which microbiology and some physicochemical (pH, moisture, protein, fat, amino acids, fatty acids, biogenic amines) characteristics of “lacón” (Lorenzo, García Fontán, Franco, & Carballo, 2007, 2008a, 2008b; Lorenzo, Martínez, Franco, & Carballo, 2007) have been evaluated.

Thus, the goals of this study were (1) to determine the differences in the sensory characteristics of dry-cured “lacón” reaching the longest and the shortest processing time and (2) to study the influence of salt content on these organoleptic properties.

* Corresponding author. Tel.: +34 988 548 277; fax: +34 988 548 276.
E-mail address: jmlorenzo@ceteca.net (J.M. Lorenzo).

2. Material and methods

2.1. Samples

In order to carry out this study, six batches of “lacón” were manufactured. Each batch consisted of four “lacón” pieces that in the green stage (fresh pieces) weighed around 4 kg. Raw pieces were salted with an excess of coarse salt. A heap was formed consisting of alternating layers of “lacón” pieces and layers of salt. In this way, the pieces were totally covered with salt. Two batches were salted during 3 days (LS), two batches during 4 days (MS) and the remaining two during 5 days (HS) in a salting room with a temperature between 2 and 5 °C and relative humidity between 80 and 90%. After the salting stage the pieces were taken from the heap, brushed, washed, and transferred to a post-salting room where they stayed for 14 days at 2–5 °C and around 85–90% relative humidity. After the post-salting stage the pieces were transferred to a room at 12 °C and 74–78% relative humidity where a drying–ripening process took place for 56 and 84 days. One piece of each batch was used for the sensorial analysis and the other one for the physicochemical determinations, for every sampling point.

From each batch, the samples were taken after 56 and 84 days of drying–ripening. Each sample consisted of one whole “lacón” piece. Previous to the sensorial analysis, the samples were desalted in a container with water for 48 h. The water was removed every 16 h. After this period, the samples were cooked in boiling water for 2 h.

For physicochemical traits *Triceps brachii* muscle was used for the colour determination and textural properties whereas the rest of the piece was skinned and deboned and finally minced in a high-capacity mincer to do the rest of measurements. The samples were stored in air-tight bottles, frozen at –80 °C in the dark, for no longer than four weeks until the analysis.

2.2. Analytical methods

The weight loss was measured by gravimetric difference in each sampling point. The moisture and total chlorides were quantified according to the ISO recommended standards 1442:1997 (ISO, 1997) and to the Carpentier–Vohlard official method (ISO 1841-1:1996), respectively. A portable colourimeter (Konica Minolta CR-400, Osaka, Japan) was used to measure the meat colour in the CIELAB space (lightness, L^* ; redness, a^* ; yellowness, b^*) (CIE, 1976). The samples were cooked placing vacuum package bags in a water bath with automatic temperature control (JP Selecta, Precisdg, Barcelona, Spain) until it reached an internal temperature of 70 °C, controlled by thermocouples type K (Comark, PK23M, UK), connected to a data logger (Comark Dilligence EVG, N3014, UK). After cooking the samples were cooled at room temperature, placing vacuum package bags in a circulatory water bath set at 18 °C during a period of 30 min and the percentage cooking loss was recorded. All samples were cut perpendicular to the muscle fibre direction at a crosshead speed of 3.33 mm/s in a texture Analyzer (TA.XT, plus of Stable Micro Systems, Vienna Court, UK). Seven meat pieces of 1 × 1 × 2.5 cm (height × width × length) were removed parallel to the muscle fibre direction and were completely cut using a Warner–Braztler (WB) shear blade with a triangular slot cutting edge (1 mm of thickness). The maximum shear force (Møller, 1980) necessary to cut the sample was obtained. The water-holding capacity (WHC) was measured as cooking loss (CL) and was calculated by measuring the difference in weight between the cooked and dry-cured samples.

2.3. Sensorial analysis

The taste panel evaluation was conducted with eight panellists selected from the Meat Technology Centre of Galicia. The panellists were trained according to the methodology proposed by UNE regulations (UNE 87-024-95) during one year with the attributes

and the scale to be used. The samples were individually labelled with three-digit random numbers and served hot to the panellists using a heater apparatus (Lady Braun Epilette, C20, Spain). Eighteen sensory traits of dry-cured “lacón”, grouped in appearance (fat yellowness, redness and marbling), odour (intensity, rancidity and cured), texture of the lean (fibrousness, hardness, juiciness and chewiness), taste (saltiness, sweetness and bitterness), and flavour (intensity, cured, rancid and mould) were assessed according to the methodology proposed by UNE regulations (UNE 87-013-96, UNE 87-017-92, UNE 87-025-96, UNE 87-026-00). The sensory traits, their definitions and extremes are explained in Table 1 (Ruíz, Ventanas, Cava, Timón, & García, 1998).

The intensity of every attribute was expressed on a structured scale from 0 (very low) to 9 (very high) in two sessions, a specific session for these samples and the evaluation session. During the sensory evaluation the panellists were situated in a private cabinet illuminated with red light, according to the UNE regulations (UNE 87-001-94, UNE 87-004-79). Water to clean the palates and remove residual flavours was given to the panel at the beginning of the session and in between samples.

2.4. Statistical analysis

Mean as well as standard deviation and standard error were calculated for all quantified variables. For the statistical analysis of the results of sensory and physicochemical traits a two-way analysis of variance was performed, using the two factors salt level and processing time. The least squares means (LSM) were separated using Duncan's range test. All statistical tests of LSM were performed for a significance level of $P < 0.05$. Correlations between variables ($P < 0.05$) were determined by a correlation analysis using the Pearson's linear correlation coefficient.

Table 1
Sensory attributes, definitions and extremes.

Attribute	Definition
<i>Appearance</i>	
Fat yellowness	Level of yellow colour of the fat that may be present in the fat due to oxidation process (white to intense yellow)
Red colour	Intensity of red colour in the lean (pale pink to dark red)
Marbling	Level of visible intramuscular fat (very lean to intense marbled)
<i>Odour</i>	
Odour intensity	Level of overall odour before eating the samples (odourless to very intense odour)
Cured odour	Intensity of the typical odour of cured meat products (very low to very high)
Rancid odour	Intensity of the rancid odour (very low to very high)
<i>Taste</i>	
Taste intensity	Level of overall taste of cured meat products (tasteless to very intense taste)
Sweetness	Level of sweet taste (not to very sweet)
Saltiness	Level of salt taste (not to very salty)
Bitterness	Level of bitter taste (not to very bitter)
<i>Flavour</i>	
Flavour intensity	Level of overall flavour (flavourless to very intense flavour)
Cured	Intensity of the typical flavour of cured meat products (very low to very high)
Rancid	Intensity of the rancid flavour (very low to very high)
Mould	Intensity of the mould flavour (very low to very high)
<i>Texture</i>	
Fibrousness	Extent to which fibres/strands are perceived on chewing (not to very fibrous)
Hardness	Effort required to bite through lean and to convert the samples to a swallowable state (very tender to very firm)
Juiciness	Impression of lubricated food during chewing (not to very juicy)
Chewiness	The time or number of chews required to get the food or sample ready for swallowing.

Data from Ruíz et al. (1998).

The principal component analysis (PCA) was conducted in order to identify the most important factors involved in the sensorial quality of dry-cured “lacón” from salt levels (LS, MS and HS) and drying–ripening times (56 and 84 days). The samples were divided into 6 groups: LS56, LS84, MS56, MS84, HS56 and HS84. The PCA was performed on the correlation matrix. All the statistical analyses were carried out using the SPSS 15.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA) software package.

3. Results and discussion

3.1. Effect of processing time

Table 2 shows the scores of two different processing times and three salt levels. Only one attribute (cured odour) in LS batches, four attributes (red colour, cured odour, rancid odour and flavour intensity) in MS batches and six attributes (fat yellowness, red colour, cured odour, rancid odour, rancid flavour and hardness) in HS batches were significantly affected by the processing time.

The red colour of the lean increased with the processing time although this result was only significant in MS and HS batches ($P < 0.01$ and 0.05 , respectively; Table 2). We found a significant ($r = 0.37$, $P < 0.01$) correlation between lean redness and index of red (a^*) in MS batches. In all studied batches, there were lower redness values in found “lacón” samples after 56 days of drying–ripening (6.00 vs. 6.16, 5.16 vs. 6.12 and 6.00 vs. 6.61, for LS, MS and HS batches, respectively).

There were differences in redness among the batches affected by processing time and salt level (Table 3), although these did not reach statistical significance in all cases. At any rate, data about colour traits in cured meat products from whole pieces are scarce. Cilla, Martínez, Beltrán, and Roncales (2005) reported small non-significant changes

in colour parameters, with the exception of redness index, which increased significantly throughout ripening of dry-cured ham.

With regard to fat yellowness it is considered a defect in fresh meat (Barton-Gade, 1984) and in several meat products (Arvanitoyannis, Bloukas, Pappa, & Psomiadou, 2000). In this work, low values (below to 1.5) for this attribute in all studied batches were observed.

Regarding odour attributes, we only observed significant differences ($P < 0.001$) in cured odour traits which showed higher scores in “lacón” samples with a longer processing time (3.15 vs. 5.92, 3.50 vs. 6.42 and 3.41 vs. 6.23, for LS, MS and HS batches, respectively). This outcome showed that “lacón” samples with a longer processing time had higher cured odour values, agreeing with results reported in other dry-cured meat products made from whole pieces, such as ham (Ruíz, Ventanas, Cava, Timón, & García, 1998).

The negative influence of some textural traits like fibrousness or dryness on overall acceptability has been previously described in meat products (Chambers & Bowers, 1993). Fibrousness is caused by both the presence of insoluble collagen and myofibrillar aggregation of the proteins due to the dehydration occurred during the ripening process (Córdoba et al., 1994). Dryness is mainly determined by the moisture content retained in the ham after the processing (Chizzolini et al., 1996). Therefore, these two traits depend strongly on the dehydration degree achieved during the processing, which is controlled by the temperature and relative humidity conditions underwent by the hams during the ripening process, and the characteristics of the raw material, especially the WHC and the fat amount. A significant ($r = 0.41$, $P < 0.01$; $r = 0.67$, $P < 0.01$) correlation between the WHC and the moisture content for “lacón” samples after 56 and 84 days of drying–ripening, respectively has been observed in this research.

Table 2
Mean values and standard deviation of sensory properties of cooked “lacón” samples. Effect of process time and salt level.

Sensory attributes	Salt levels									SEM	Significance of salt level	
	LS (3 days)			MS (4 days)			HS (5 days)				56 days	84 days
	Drying–ripening (days)			Drying–ripening (days)			Drying–ripening (days)					
	56	84	Sig	56	84	Sig	56	84	Sig			
<i>Appearance</i>												
Fat yellowness	1.23 ± 1.23	1.45 ± 1.25	n.s.	0.87 ± 0.90	1.00 ± 1.06	n.s.	1.25 ± 0.94	0.66 ± 0.79	*	0.09	n.s.	n.s.
Red colour	6.00 ± 1.00	6.16 ± 1.16	n.s.	5.16 ± 1.20	6.12 ± 0.94	**	6.00 ± 1.06	6.61 ± 0.92	*	0.10	n.s.	n.s.
Marbling	0.76 ± 0.72	1.33 ± 1.09	n.s.	1.52 ± 0.92	1.04 ± 0.91	n.s.	1.61 ± 1.01	1.04 ± 1.02	n.s.	0.89	n.s.	n.s.
<i>Odour</i>												
Odour intensity	5.53 ± 1.12	4.75 ± 2.26	n.s.	4.37 ± 1.61	4.58 ± 1.97	n.s.	4.95 ± 1.94	5.14 ± 1.35	n.s.	0.15	n.s.	n.s.
Cured odour	3.15 ± 0.98	5.92 ± 0.92	***	3.50 ± 1.10	6.42 ± 0.77	***	3.41 ± 0.92	6.23 ± 0.76	***	0.14	n.s.	n.s.
Rancid odour	0.15 ± 0.37	0.33 ± 1.23	n.s.	0.25 ± 0.60	1.37 ± 2.42	*	0.25 ± 0.73	1.66 ± 2.03	**	0.13	n.s.	n.s.
<i>Taste</i>												
Taste intensity	6.00 ± 1.63	4.66 ± 2.07	n.s.	5.04 ± 1.39	4.25 ± 2.00	n.s.	4.75 ± 1.89	4.25 ± 1.40	n.s.	0.15	n.s.	n.s.
Sweetness	0.53 ± 1.33	0.42 ± 1.05	n.s.	0.62 ± 1.43	0.16 ± 0.56	n.s.	0.33 ± 0.91	0.57 ± 1.43	n.s.	0.10	n.s.	n.s.
Saltiness	2.69 ± 1.43	2.37 ± 1.24	n.s.	5.62 ± 1.01	5.91 ± 0.77	n.s.	6.50 ± 1.06	5.95 ± 0.97	n.s.	0.17	***	***
Bitterness	0.38 ± 1.38	0.25 ± 0.73	n.s.	0.16 ± 0.81	0.37 ± 1.01	n.s.	3.33 ± 2.66	3.61 ± 1.83	n.s.	0.09	n.s.	n.s.
<i>Flavour</i>												
Flavour intensity	3.61 ± 2.75	2.83 ± 2.71	n.s.	3.50 ± 2.90	1.83 ± 2.38	*	3.33 ± 2.64	3.61 ± 1.84	n.s.	0.22	n.s.	n.s.
Cured	1.61 ± 2.25	2.83 ± 2.76	n.s.	2.54 ± 2.87	1.79 ± 2.57	n.s.	1.95 ± 2.77	2.57 ± 2.18	n.s.	0.23	n.s.	n.s.
Rancid	0.61 ± 1.04	0.25 ± 0.60	n.s.	0.45 ± 1.28	0.54 ± 1.10	n.s.	0.04 ± 0.20	0.47 ± 0.98	*	0.08	n.s.	n.s.
Mould	0.46 ± 1.66	1.25 ± 1.79	n.s.	0.79 ± 1.84	0.41 ± 1.17	n.s.	0.87 ± 1.48	0.61 ± 1.24	n.s.	0.13	n.s.	n.s.
<i>Texture</i>												
Fibrousness	3.69 ± 1.31	4.08 ± 1.63	n.s.	3.20 ± 0.83	3.45 ± 1.28	n.s.	3.20 ± 1.06	3.47 ± 0.92	n.s.	0.10	n.s.	n.s.
Hardness	2.92 ± 0.75	3.45 ± 1.58	n.s.	3.16 ± 1.37	2.83 ± 1.43	n.s.	2.41 ± 0.93	3.09 ± 0.99	*	0.11	n.s.	n.s.
Juiciness	6.76 ± 0.92	6.00 ± 1.79	n.s.	6.66 ± 0.91	6.45 ± 1.10	n.s.	6.66 ± 0.76	6.42 ± 0.87	n.s.	0.10	n.s.	n.s.
Chewiness	6.23 ± 1.01	6.41 ± 0.83	n.s.	6.33 ± 0.70	6.29 ± 0.91	n.s.	6.41 ± 0.82	6.47 ± 1.03	n.s.	0.07	n.s.	n.s.

n.s. = not significant.

SEM: standard error of mean.

* $P < 0.05$.

** $P < 0.01$.

*** $P < 0.001$.

Table 3

Mean values and standard deviation of physicochemical properties of dry-cured “lacón” samples. Effect of process time and salt level.

Physicochemical	Salt levels									SEM	Significance of salt level	
	LS (3 days)			MS (4 days)			HS (5 days)					
	Drying-ripening (days)			Drying-ripening (days)			Drying-ripening (days)				56 days	84 days
	56	84	Sig	56	84	Sig	56	84	Sig			
Moisture (%)	54.45 ± 2.22	48.86 ± 2.94	***	52.04 ± 3.31	44.70 ± 2.37	***	52.10 ± 4.91	46.99 ± 3.21	***	0.40	n.s.	***
Total chlorides (%)	14.16 ± 0.11	14.31 ± 0.09	***	17.17 ± 2.04	16.76 ± 1.59	n.s.	17.36 ± 0.70	20.89 ± 0.77	***	0.21	***	***
Lightness (L*)	23.91 ± 1.88	35.23 ± 1.58	***	32.99 ± 0.51	35.07 ± 2.27	***	34.10 ± 0.56	32.42 ± 1.93	***	0.16	***	***
Redness (a*)	6.00 ± 1.61	6.29 ± 1.42	n.s.	5.05 ± 0.74	5.75 ± 1.62	n.s.	4.30 ± 0.86	5.44 ± 0.96	***	0.12	***	n.s.
Yellowness (b*)	7.31 ± 0.21	8.08 ± 0.40	***	8.02 ± 0.20	7.80 ± 0.76	n.s.	6.92 ± 0.66	7.27 ± 0.72	n.s.	0.06	***	***
Shear force (kg/cm²)	130.15 ± 29.49	186.66 ± 33.05	***	166.00 ± 46.14	176.33 ± 32.96	n.s.	181.00 ± 36.03	233.67 ± 13.60	***	3.79	**	***
Water holding capacity (%)	6.36 ± 1.17	4.63 ± 0.76	***	4.69 ± 0.20	3.88 ± 0.11	***	6.24 ± 0.69	3.38 ± 0.31	***	0.11	***	***

n.s. = not significant.

SEM: Standard error of mean.

** $P < 0.01$.*** $P < 0.001$.

The moisture content decreased linearly (data not shown) as the processing time increased reaching a final value of 48, 44 and 46 g/100 g for LS, MS and HS, respectively at 84 days (Table 3). These values were in the same range as those shown in dry-cured “lacón” by Marra et al. (1999) and Lorenzo et al. (2008a). However, they were slightly higher than those obtained by other authors at the end of the ripening process of Spanish Serrano ham (Huerta, Hernández, Guamis, & Hernández, 1988) and Spanish “cecina” (García, Díaz, & Zumalacarre, 1997).

The total weight loss increased as the processing period increased, although during the manufacturing process and at the end of the manufacture there were no significant differences in weight loss among three salt addition levels, reaching a mean value of 32%.

The rest of the evaluated sensory attributes did not show significant differences ($P > 0.05$) with respect to the processing time, except for flavour intensity in MS batches where higher scores were observed in samples after 56 days of processing. Rancid and hardness traits also showed significant differences in HS batches after 84 days of drying–ripening. The hardness trait increased significantly ($P < 0.05$) with the processing time in “lacón” samples elaborated with HS and showed a significant ($r = -0.33$, $P < 0.05$; $r = -0.45$, $P < 0.01$) correlation with moisture and WHC respectively. This result is in agreement with those reported by other authors in dry-cured ham (Buscailhon et al., 1994; Ruíz et al., 1998) who detected an increase in hardness of dry-cured ham with a longer processing time.

3.2. Effect of salt level

Appearance, odour, flavour and texture traits were not significantly affected by the salt content ($P > 0.05$). However, the saltiness showed significant differences with respect to the salt levels in all studied batches (56 and 84 days of processing). As expected, a more intense saltiness was observed in “lacón” samples with a higher salt content. In fact, the salty taste and the salt content showed a significant correlation ($r = 0.62$, $P < 0.01$; $r = 0.65$, $P < 0.01$ after 56 and 84 days of drying–ripening). However, salt is not the only factor which determines the salty taste because this attribute can also be influenced by other compounds such as amino acids or nucleotides having a salty taste (Careri et al., 1993) or a low intramuscular fat proportion (Buscailhon, Touraille, Girard, & Monin, 1995; Cambero, Ordoñez, Pereira, Cobos, & De la Hoz, 1994).

The chloride content values in the interior of the “lacón” pieces expressed as g/100 g of the total solids increased as the salt level increased, reaching a final value of 20.89 in HS batch at 84 days of processing (Table 3). At this point our values were four and six points higher than those observed by Marra et al. (1999) and Lorenzo et al. (2008a) and they were slightly higher (19.5 g/100 g of total solids) than the ones found by Lorenzo, Prieto, Carballo, and Franco (2003). These values are found in the upper extreme of the range of those

observed by other authors in other dry-cured meat products made from whole pieces (Monin et al., 1997). These high values can be explained by the greater surface and lesser thickness of the “lacón” pieces which favour the penetration of salt during the salting process.

The salt level did not significantly affect the texture characteristics. This outcome agrees with data reported by Arnau, Guerrero, and Gou (1997), who did not find differences in hardness of hams with a different salt content (6.5% vs. 7.9% of salt w/w). On the contrary, Andrés, Cava, Ventanas, Muriel, and Ruíz (2004) observed significant differences ($P < 0.05$) in several texture properties, such as hardness, dryness or fibrousness whereas juiciness and pastiness were not significantly influenced by the salt content ($P > 0.05$).

The effect of salt on aroma traits was not significantly ($P > 0.05$) affected. The rancid aroma is related to the presence of some compounds derived from lipid oxidation which exhibit rancid notes, especially those originating from the oxidation of linoleic and arachidonic acids (Decker, 1998; Flores, Grimm, Toldrá, & Spanier, 1997; Ruíz, Ventanas, Cava, Andrés, & García, 1999), such as hexanal (Shahidi & Pegg, 1994). A big rancid aroma has been observed in samples with higher levels of salt. This fact has been explained by the prooxidant effect of salt (Kanner, Harel, & Joffe, 1991). A similar finding has been observed by Andrés et al. (2004) in Iberian ham samples.

Numerous studies reveal the great importance of the aroma in the overall quality of dry-cured ham (Buscailhon et al., 1995; Parolari, Virgili, & Schivazappa, 1994; Ruíz et al., 2002). Among the volatile compounds related to the aroma of hams, those derived from lipid oxidation stand out as the most important compounds (Kaban, 2009; Ruíz et al., 1999). The meat industry and consumers consider that very rancid hams are defective (Andrés et al., 2004). Ruíz et al. (2002) reported a certain negative influence of rancidity on the acceptability of Iberian ham.

Some texture traits are related to protein hydrolysis (Andrés et al., 2004). Several authors have observed an inhibitory effect of the salt on protease activity (Sárraga, Gil, Arnau, & Monfort, 1989; Toldrá, Flores, & Sanz, 1997). In our study the “lacón” samples from MS batches showed the lowest values of hardness.

Texture defects are currently frequent in the dry-cured ham industry because of decreasing the time of salting. Soft and pasty textures are the most common texture defects (García-Garrido, Quiles-Zafra, Tapiador, & Luque de Castro, 2000). From our results, we can deduce that salt levels used in this study did not produce a texture alteration in “lacón” samples. On the contrary, Andrés et al. (2004) observed a negative effect on some texture properties such as hardness, fibrousness and dryness in hams with a lower salt content.

Table 3 shows the changes in the shear force during the manufacturing process. There were significant changes in the samples that belonged to LS and MS batches. For both groups the shear force

increased significantly ($P<0.001$) as the processing time increased, and it reached a considerable value of 233 kg/cm² in the HS batch. The texture properties are very important for this product, because it is normally cut in steaks of 3–4 cm and it is consumed after cooking. In this aspect we have not found any data about shear force or other textural traits in the literature. The high value of the shear force is due to changes in hardness during the ripening of dry-cured meat products which have been attributed to both the water content and the state of proteins (Monin et al., 1997).

The WHC decreased significantly ($P<0.001$) during the processing in all studied batches. At the end of the process the lowest values were obtained in the HS batch. Modifications of the water content are due to the drying–ripening process and to the volume/surface ratio characteristic of “lacón” pieces. Furthermore, another important decrease in the water content is produced when the “lacón” piece is cooked which was confirmed by the cooking loss of 3.96% (mean value of the three batches) showed by the “lacón” pieces at the end of the process (84 days).

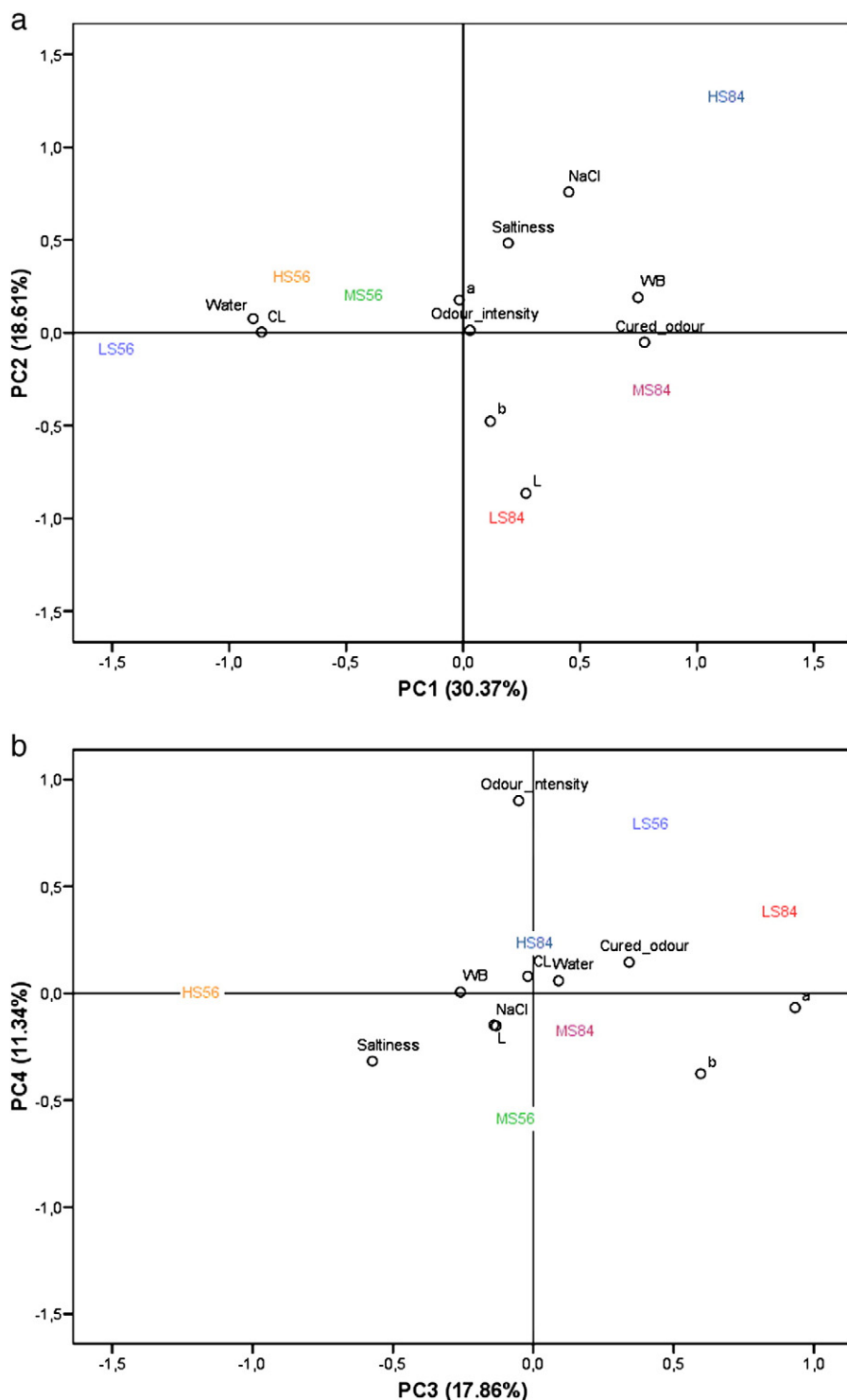


Fig. 1. (a) and (b). Relationships among dry-cured “lacón” physicochemical and sensorial characteristics obtained by PCA a) projection of the variables and dry-cured “lacón” groups in the plane defined by the first two principal components b) projection of the variables in the plane defined by PCs three and four.

Juiciness also has an important role in the overall quality of meat products (Chambers & Bowers, 1993) because it is related to the lubrication degree of food during the chewing and the subsequent swallowing. Anyway, 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). Intramuscular fat stimulates the saliva secretion and contributes itself to the juiciness by coating on the tongue, teeth and other parts of the mouth (Dikeman, 1987). Due to the dehydration that takes place during the processing of dry-cured products, the direct contribution of intramuscular fat itself plays a very important role in the juiciness of this type of product (Ruíz et al., 1998). For this study we observed a significant ($r=0.48$; $P<0.01$) correlation between moisture and juiciness for the batches manufactured with the lowest salt content.

3.3. Principal component analysis

A PCA was done to determine the sensory and physicochemical characteristics which explain the greatest proportion of dry-cured “lacón” variation according to the salt level and the drying–ripening period. The PCA allows one to obtain a better overall idea of the relation between variables and samples. We excluded those sensorial attributes and psychochemical traits with communality <0.7 , since we selected a four-factor model that explains 78.2% of the total variance. In Fig. 1(a) and (b) the results of the first four principal components are plotted. Fig. 1(a) shows that the variable loading and the average score of each type of dry-cured “lacón” depend on the salt level and the drying–ripening day effects on the space defined by the two first principal components. The first component (PC1) with a 30.37% of total variance includes the textural variables (cooking loss and maximum shear force), moisture content and odour sensorial traits (cured odour and odour intensity). The PC1 was highly positively related to cured odour and maximum shear force and negatively related to water content and cooking loss. The variables aligned with PC2 (18.61% of total variance) were instrumental colour traits (L^* , a^* and b^*). PC2 was highly negatively related to L^* and to a lesser degree with b^* whereas a^* was slightly related in the positive axis. PC3 and PC4 representing 17.84 and 11.34% respectively of the total variability in dry-cured “lacón” quality are shown in Fig. 1(b). The important variables in the PC3 and PC4 placed farthest from the origin were redness and odour intensity, respectively, since the last variable had a strong contribution to the variability of PC4 (loading >0.9).

The PCA offered a good separation of the mean samples according to the drying–ripening days and to the salt level because PC1 separated the samples of “lacón” that were ripened for 56 days from those ripened for 84 days, placing this last group in a positive range; samples with a higher salt content were located in the positive axis of PC2. With these results it is possible to say that the water content and the maximum shear force could differentiate the dry-cured “lacón” samples ripened for different times.

The obtained results show that textural properties and colour instrumental parameters explain the most of the total variation in relation to the salt level and the ripening time whereas sensorial traits showed less variation in the present study. However, the colour parameter affects the consumer's purchase choice but not his eating satisfaction which is more related to textural parameters, fat content and organoleptic acceptance. Thus, a sensorial analysis must be required to determine whether our differences may be detectable by consumers.

4. Conclusions

Dry-cured “lacón” processed with lower salt contents is, as expected, less salty. This agrees with consumer demands and health requirements, with the advantage that this salt content did not promote softer textures, which did not affect the overall quality of dry-cured “lacón”.

Cured odour and colour are the most important properties in the overall acceptability of dry-cured “lacón”. As the processing time increased, the cured odour and red colour increased for all studied batches. However, the texture traits were not improved by the processing time.

The principal component analysis showed that physicochemical traits were the most important ones in the quality of dry-cured “lacón” and offered a good separation of the mean samples according to the dry-ripening days and the salt level.

This information could be very useful to the industry allowing modifying the salting process in order to improve quality in the final product and satisfied the consumer demands.

Acknowledgements

This work was part of the research Project O7TAL003CT granted by the Xunta de Galicia (The Regional Government).

References

- Andrés, A. I., Cava, R., Ventanas, J., Muriel, E., & Ruíz, 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.
- Arnau, J., Guerrero, L., & Gou, P. (1997). Effects of temperature during the last month of ageing and of salting time on dry-cured ham aged for six months. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74, 193–198.
- Arvanitoyannis, I. S., Bloukas, J. G., Pappa, I., & Psomiadou, E. (2000). Multivariate data analysis of Cavournas – A Greek cooked meat product. *Meat Science*, 54, 71–75.
- Barton-Gade, P. A. (1984). Some experiences on measuring the quality of pork fat. In J. D. Wood (Ed.), *Fat quality in lean pigs* (pp. 47–52). Langford: AFRC Meat Research Institute.
- Buscailhon, S., Berdagué, J. L., Bousset, J., Cornet, M., Gandemer, G., Touraille, C., et al. (1994). Relations between compositional traits and sensory qualities of French dry-cured ham. *Meat Science*, 37, 229–243.
- Buscailhon, S., Touraille, C., Girard, J. P., & Monin, G. (1995). Relationship between muscle tissue characteristics and sensory quality of dry-cured ham. *Journal of Muscle Foods*, 6, 9–22.
- Camero, M. I., Ordoñez, J. A., Pereira, C. I., Cobos, A., & De la Hoz, L. (1994). Alimentación, equipos y tecnología, enero/febrero. *Perspectivas en la fabricación de productos cárnicos hiposódicos* (pp. 111–116).
- Careri, M., Mangia, A., Barbieri, G., Bolzoni, L., Virgili, R., & Parolari, G. (1993). Sensory property relationship to chemical data of Italian type dry-cured ham. *Journal of Food Science*, 58, 968–972.
- Chambers, E., & Bowers, J. R. (1993). Consumer perception of sensory qualities in muscle foods. *Food Technology*, 47, 116–120.
- Chizzolini, R., Novelli, E., Campanini, G., Dazzi, G., Madarena, G., Zanardi, E., et al. (1996). Lean colour of green and matures Parma hams: Comparative evaluation of sensory and objective data. *Meat Science*, 44, 159–172.
- CIE (1976). *Colorimetry: Official recommendations of the International Commission on Illumination*. Paris: Comisión Internationale de l'Éclairage [International Commission on Illumination] CIE No. 15 (E-1.3.1).
- Cilla, I., Martínez, L., Beltrán, J. A., & Roncales, P. (2005). Factors affecting acceptability of dry-cured ham throughout extended maturation under “bodega” conditions. *Meat Science*, 69, 789–795.
- Córdoba, J. J., Antequera, T., Ventanas, J., López-Bote, C., García, C., & Asensio, M. A. (1994). Hydrolysis and loss of extractability of proteins during ripening of Iberian ham. *Meat Science*, 37, 217–227.
- Decker, E. A. (1998). Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of foods to maximize oxidative stability. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 241–248.
- Dikeman, M. E. (1987). Fat reduction in animals and the effects on palatability and consumer acceptance of meat products. *Proceedings of the Reciprocal Meat Conference*, 40, 93–105.
- Dirinck, P., Van Opstaele, F., & Vandendriessche, F. (1997). Flavour differences between Northern and Southern European cured hams. *Food Chemistry*, 59, 511–521.
- Flores, M., Grimm, C. C., Toldrá, F., & Spanier, A. M. (1997). Correlations of sensory and volatile compounds of Spanish “Serrano” dry-cured ham as a function of two processing times. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2178–2186.
- García, I., Díaz, V., & Zumalacarregui, J. M. (1997). Changes in proteins during the ripening of Spanish dried beef “cecina”. *Meat Science*, 46, 379–385.
- García-Garrido, J. A., Quiles-Zafra, R., Tapiador, J., & Luque de Castro, D. (2000). Activity of cathepsin B, D, H and L in Spanish dry-cured ham of normal and defective texture. *Meat Science*, 56, 1–6.
- Guerrero, L., Gelabert, J., Gou, P., Guardia, M. D., & Arnau, J. (2000). Efecto de la disminución del contenido en sodio del jamón curado sobre sus propiedades sensoriales y reológicas. *Eurocarne, II Simposium Internacional del Jamón Curado* (pp. 94–95).
- Huerta, T., Hernández, J., Guamis, B., & Hernández, E. (1988). Microbiological and physico-chemical aspects in dry-salted Spanish ham. *Zentralblatt Mikrobiologie*, 143, 475–482.

- ISO (International Organization for Standardization) (1996). Determination of chloride content—Part 1: Volhard method, ISO 1841-1:1996 standard. *International standards meat and meat products*. Genève, Switzerland: International Organization for Standardization.
- ISO (International Organization for Standardization) (1997). Determination of moisture content, ISO 1442:1997 standard. *International standards meat and meat products*. Genève, Switzerland: International Organization for Standardization.
- Kaban, G. (2009). Changes in the composition of volatile compounds and in microbiological and physicochemical parameters during pastirma processing. *Meat Science*, 82, 17–23.
- Kanner, J., Harel, S., & Joffe, R. (1991). Lipid peroxidation of muscle food as affected by NaCl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1017–1024.
- Lorenzo, J. M., García Fontán, M. C., Franco, I., & Carballo, J. (2007). Microbiological of dry-cured lacón. *Fleischwirtschaft International*, 22, 88–92.
- Lorenzo, J. M., García Fontán, M. C., Franco, I., & Carballo, J. (2008a). Biochemical characteristics of dry-cured lacón (a Spanish traditional meat product) throughout the manufacture, and sensorial properties of the final product. Effect of some additives. *Food Control*, 19, 1148–1158.
- Lorenzo, J. M., García Fontán, M. C., Franco, I., & Carballo, J. (2008b). Proteolytic and lipolytic modifications during the manufacture of dry-cured lacón, a Spanish traditional meat product: Effect of some additives. *Food Chemistry*, 110, 137–149.
- Lorenzo, J. M., Martínez, S., Franco, I., & Carballo, J. (2007). Biogenic amine content during the manufacture of dry-cured lacón, a Spanish traditional meat product: Effect of some additives. *Meat Science*, 77, 287–293.
- Lorenzo, J. M., Prieto, B., Carballo, J., & Franco, I. (2003). Compositional and degradative changes during the manufacture of dry-cured “lacón”. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 593–601.
- Marra, A. I., Salgado, A., Prieto, B., & Carballo, J. (1999). Biochemical characteristics of dry-cured “lacón”. *Food Chemistry*, 67, 33–37.
- Møller, A. (1980). Analysis of Warner Bratzler shear force pattern with regard to myofibrillar and connective tissue components of tenderness. *Meat Science*, 5, 247–260.
- Monin, G., Marinova, P., Talmant, A., Martin, J. F., Cornet, M., Lanore, D., et al. (1997). Chemical and structural changes in dry-cured hams (Bayonne hams) during processing and effects of the dehairing technique. *Meat Science*, 47, 29–47.
- Morgan, T., Aubert, J. F., & Brunner, H. (2001). Interaction between sodium intake, angiotensin II, and blood pressure as a cause of cardiac hypertrophy. *American Journal of Hypertension*, 14, 914–920.
- Naes, H., Holck, A. L., Axelsson, L., Andersen, H. J., & Blom, H. (1995). Accelerated ripening of dry fermented sausage by addition of a *Lactobacillus* proteinase. *International Journal of Food Science & Technology*, 29, 651–659.
- Official Journal of the European Communities (2001). Commission regulation (EC) No 898/2001, of 7 May 2001. L 126, Vol. 44, 8 May 2001.
- Ordóñez, J. A., Hierro, E. M., Bruna, J. M., & de la Hoz, L. (1999). Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39, 329–367.
- Parolari, G., Virgili, R., & Schivazappa, C. (1994). Relationship between cathepsin-B activity and compositional parameters in dry-cured hams of normal and defective texture. *Meat Science*, 38, 117–122.
- Ruiz, J., Muriel, E., & Ventanas, J. (2002). The flavour of Iberian ham. In F. Toldrá (Ed.), *Research advances in the quality of meat and meat products*. Trivandrum, India: Research Signpost.
- Ruiz, J., Ventanas, J., Cava, R., Andrés, A., & García, 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., Timón, M. L., & García, C. (1998). Sensory characteristics of Iberian ham: influence of processing time and slice location. *Food Research International*, 31, 53–58.
- Sánchez-Peña, C. M., Luna, G., García-Gómez, D. L., & Aparicio, R. (2005). Characterization of French and Spanish dry-cured hams: influence of the volatiles from the muscles and the subcutaneous fat quantified by SPME-GC. *Meat Science*, 69, 635–645.
- Sárraga, C., Gil, M., Arnau, J., & Monfort, J. M. (1989). Effect of curing salt and phosphate on the activity of porcine muscle proteases. *Meat Science*, 25, 241–249.
- Shahidi, F., & Pegg, R. B. (1994). Hexanal as an indicator of meat flavour deterioration. *Journal of Food Lipids*, 1, 177–186.
- Toldrá, F. (2006). The role of muscle enzymes in dry-cured meat products with different drying conditions. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 164–168.
- Toldrá, F., Flores, M., & Sanz, Y. (1997). Dry-cured flavour: Enzymatic generation and process influence. *Food Chemistry*, 59, 523–530.
- UNE 87-001-94 (1994). Norma Española. Análisis sensorial. Vocabulario.
- UNE 87-004-79 (1979). Norma Española. Análisis sensorial. Guía para la instalación de una sala de cata.
- UNE 87-013-96 (1996). Norma Española. Análisis sensorial. Iniciación y entrenamiento de jueces en la detección y reconocimiento de olores.
- UNE 87-017-92 (1992). Norma Española. Análisis sensorial. Metodología para establecer el perfil olfato-gustativo.
- UNE 87-024-95 (1995). Norma Española. Análisis sensorial. Guía para la selección, entrenamiento y control de jueces.
- UNE 87-025-96 (1996). Norma Española. Análisis sensorial. Perfil de Textura.
- UNE 87-026-00 (2000). Norma Española. Análisis sensorial. Guía general y método para la evaluación del color de los alimentos.
- Ventanas, J., & Cava, R. (2001). Dimámica y control del proceso de secado del jamón Ibérico en secaderos y bodegas naturales y en cámaras climatizadas. In J. Ventanas (Ed.), *Tecnología del jamón Ibérico* (pp. 255–292). Barcelona: Multi-prensa.
- 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.
- Yang, H., Ma, C., Qiao, F., Song, Y., & Du, M. (2005). Lipolysis in intramuscular lipids during processing of traditional Xuanwei ham. *Meat Science*, 71, 670–675.

PUBLICACIÓN VI.3:

*“Influence of the salting time on volatile compounds during the manufacture of dry-cured
pork shoulder “lacón””*

Laura Purriños, Daniel Franco, Javier Carballo, José M. Lorenzo

Meat Science, 92 (2011) 627-634



Influence of the salting time on volatile compounds during the manufacture of dry-cured pork shoulder “lacón”

Laura Purriños^a, Daniel Franco^a, Javier Carballo^b, José M. Lorenzo^{a,*}

^a Centro Tecnológico de la Carne de Galicia, Rúa Galicia No 4, Parque Tecnológico de Galicia, San Cibrán das Viñas, 32900 Ourense, Spain

^b Área de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias de Ourense, Universidad de Vigo, 32004 Ourense, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 January 2012

Received in revised form 7 June 2012

Accepted 8 June 2012

Keywords:

Salt content

GC/MS

Purge-and-trap

ABSTRACT

The effect of the length of salting time on volatile compounds throughout the manufacture of dry-cured “lacón” was studied using a purge-and-trap extraction and GC/MS analysis. For this study, six treatments of “lacón” were salted with different amounts of salt (LS (3 days of salting), MS (4 days of salting) and HS (5 days of salting)). The total area of volatile compounds increased significantly ($P < 0.001$) as the length of salting time increased. Significant differences were found for the total area of all aldehydes for each salting time at the end of process. Hexanal presented the most relative abundance, showing highest content in HS treatments while LS treatments showed the lowest one at the end of salting, post-salting and drying-ripening stage. The influence of salting time on the content of 3-Octen-2-one was significant on salting stage ($P < 0.001$) and drying-ripening stage ($P < 0.01$). The salting time affected ($P < 0.001$) the relative abundance of esters at the end of salting and at the end of drying-ripening stage. The salting time affected significantly ($P < 0.001$) on alcohols content at the end of drying-ripening process. However, no significant effect of salt level ($P > 0.05$) was detected on total hydrocarbons and total furans at the end of process.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Dry-cured “lacón” is a traditional cured meat product made in the north-west of Spain from the fore leg of the pig which is cut at the shoulder blade–humerus joint, following very similar manufacturing processes to those used in the production of dry-cured ham as described by Marra, Salgado, Prieto, and Carballo (1999). In Galicia (NW Spain), this product has been awarded as Geographically Protected Identity (G.P.I.) (Official Journal of the European Communities, 2001).

Salt is an essential ingredient in dry-cured products due to its numerous technological benefits. It has a preservative and antimicrobial effect as a consequence of the capacity of sodium chloride to reduce water activity achieving microbiological stability and extension of shelf life in meat products (Durack, Gonzalez, & Wilkinson, 2008; Hutton, 2002; Taomina, 2010). It also has effects on the solubility of the myofibrillar meat proteins myosin and actin allowing gel formation and development of an optimum texture in these products (Desmond, 2006). It is considered to be also a flavor enhancer because of the fact that its addition prompts the formation of strong ion–dipole interactions between the salt ions and water (Rabe, Krings, & Berger, 2003) decreasing availability of water molecules for the solubilisation of flavor compounds. This phenomenon known as the “salting-out” effect influences in an increased flavor from meat products.

On the other hand, sodium is an essential nutrient which is involved in muscle contraction including heartbeat, nerve impulses, and the digestion of body-building protein. It is the major extracellular electrolyte responsible for regulating water balance, pH and osmotic pressure. Despite its nutritional contribution, excessive sodium intake has undesirable physiological effects like as high blood pressure and cardiovascular diseases (Guinee, 2004; Jessica, Mcneely, Gwen, & David, 2008; Muguerza, Gimeno, Ansorena, & Astiasarán, 2004; Ruusunen & Puolanne, 2005). The consumption of meat and meat products contributes about 15–25% to the total daily intake of sodium chloride (WHO, 2003). The WHO recommends as little as 5 g of salt per day, which is equivalent to 2 g sodium per day (WHO, 2003). However, sodium intake exceeds the nutritional recommendations in many industrialized countries. In the case on Spain, in 2008 the Spanish Food Safety and Nutrition Agency (AESAN) started a salt reduction plan with certain specific goals enabling intake to go down from the current value of 9.7 g/day to an intake of less than 8.0 g/day by 2014.

Due to the connection between sodium and coronary heart diseases, the demand of consumers for a variety of low salt meat products with the same quality characteristics has increased. Numerous studies have showed that salt has an impact on some chemical and biochemical reactions such as proteolysis (Martín, Antequera, Córdoba, Timón, & Ventanas, 1998), lipolysis (Martín, Córdoba, Ventanas, & Antequera, 1999; Vestegaard, Schivazappa, & Virgili, 2000) and lipid oxidation (Ventanas, Estevez, Tejeda, & Ruiz, 2006; Andrés, Cava, Ventanas, Muriel, & Ruiz, 2004), which are involved in the development of the typical flavor of dry-cured meat

* Corresponding author. Tel.: +34 988 548 277; fax: +34 988 548 276.

E-mail address: jmlorenzo@ceteca.net (J.M. Lorenzo).

products (Countron-Gambotti et al., 1999; Parolari, Virgili, & Schivazappa, 1994; Virgili et al., 1995).

Several studies have shown the effect of curing agents mainly salt, nitrate and nitrite, on the generation of volatile compounds in dry-cured meat products and model systems (Andrés et al., 2004; Olesen, Meyer, & Stahnke, 2004; Ventanas, Mustonen, Puolanne, & Tuorila, 2010a). However, there are not references about the effect of different salt content on the generation of volatile compounds in dry-cured “lacón”. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of the length of salting time on volatile compounds during the manufacture of dry-cured “lacón”.

2. Material and methods

2.1. Samples

In order to carry out this study, six batches of “lacón” were manufactured. Each batch consisted of four “lacón” pieces that in the green stage (fresh pieces) weighed around 4 kg. Raw pieces were salted with an excess of coarse salt. A heap was formed consisting of alternating layers of “lacón” pieces and layers of salt. In this way, the pieces were totally covered with salt. Two batches were salted during 3 days (LS), two batches during 4 days (MS) and the remaining two during 5 days (HS) in a salting room with a temperature between 2 and 5 °C and relative humidity between 80 and 90%. After the salting stage the pieces were taken from the heap, brushed, washed, and transferred to a post-salting room where they stayed for 14 days at 2–5 °C and around 85–90% relative humidity. After the post-salting stage the pieces were transferred to a room at 12 °C and 74–78% relative humidity where a drying–ripening process took place for 84 days. From each batch, the samples were taken fresh piece, after salt process, after 14 days of post-salting stage and after 84 days of drying–ripening. The air convection in the drying room was intermittent and the air velocity around the pieces when the fan was running ranged between 0.3 and 0.6 m/s. Each sample consisted of one whole “lacón” piece. Samples were transported to the laboratory under refrigerated conditions (<4 °C) and analyzed at this point. Once in the laboratory, the entire pieces were skinned, deboned, and *Triceps brachii* muscle was extracted and finally minced in a high-capacity mincer. The samples were stored in air-tight bottles, frozen at –80 °C in dark, for no longer than four weeks until analysis.

2.2. Analytical methods

2.2.1. Analysis of volatile compounds

Samples were ground in a domestic blender, and 10 g weighed, put into a dynamic headspace vial. The volatile compounds were extracted and concentrated in a purge and trap concentrator coupled with a cryofocusing module (Teledyne Tekmar, Mason, OH, USA).

2.2.1.1. Dynamic headspace volatile concentration. Samples were transferred into headspace vials and concentrated in a purge-and-trap concentrator (Stratum, Teledyne Tekmar, Mason, OH, USA) equipped with a cryofocusing module connected to an autosampler (Solatek 72 Multimatrix Vial Autosampler, Teledyne Tekmar, Mason, OH, USA). The sample was maintained at 60 °C for 5 min and then flushed with helium at a flow rate of 60 mL/min for 20 min. Volatile compounds were adsorbed on a Tenax Trap (Strat trap, 30.48 cm, Agilent Technologies Spain, S.L., Madrid, Spain) and subsequently were thermally desorbed from the Tenax trap at 225 °C for 4 min with a helium flow rate of 300 mL/min. The desorbed compounds were cryofocused at –30 °C using liquid nitrogen at the entrance of a DB-624 capillary column (J&W scientific, Folsom, CA, USA).

2.2.1.2. Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). A gas chromatograph 6890N (Agilent Technologies Spain, S.L., Madrid, Spain) equipped with mass detector 5973N (Agilent Technologies Spain,

S.L., Madrid, Spain) was used with a DB-624 capillary column (J&W scientific: 30 m×0.25 mm id, 1.4 µm film thickness). The sample was injected in split mode (1:20). Helium was used as a carrier gas with a linear velocity of 36 cm/s. The temperature program used was as follows: 40 °C maintained for 2 min and then raised from 40 to 100 °C at 3 °C/min, then from 100 to 180 °C at 5 °C/min, and from 180 to 250 °C at 9 °C/min with a final holding time of 5 min; total run time 50.8 min. Injector and detector temperatures were set at 220 and 260 °C, respectively.

The mass spectra were obtained using a mass selective detector working in electronic impact at 70 eV, with a multiplier voltage of 1953 V and collecting data at a rate of 6.34 scans/s over the range m/z 40–300. Compounds were identified comparing their mass spectra with those contained in the NIST05 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg) library and/or by calculation of retention index relative to a series of standard alkanes (C_5 – C_{14}) (for calculating Kovats indexes, Supelco 44585-U, Bellefonte, PA, USA) and matching them with data reported in literature.

Twenty-four “lacón” samples were analyzed in triplicate. Results were reported as relative abundance expressed as total area counts ($AU \times 10^6$).

2.3. Statistical analysis

For the statistical analysis of the results, data were analyzed using the SPSS 19.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA) software package. One way analysis of variance was used to analyze the effect of salt content (salting time) on volatile compounds composition. The least squares mean were separated using Duncan's *t*-test. All statistical test of LSM were performed for a significance level <0.05.

The principal component analysis (PCA) was conducted in order to identify the most important factors involved on volatile compounds at the end of process of dry-cured “lacón” from three different salt levels (LS, MS and HS). The PCA was performed on the correlation matrix. All the statistical analyses were carried out using the SPSS 19.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA) software package.

3. Results and discussion

Since the number of volatile compounds is very high, only compounds regarded as mainly representative for their presence and abundance to aroma have been taken into account according to previous study (Purriños, Bermúdez, Franco, Carballo, & Lorenzo, 2011a). Table 1 shows selected volatile compounds evolution throughout the manufacture of dry-cured “lacón” processed with different length of salting time (3, 4 and 5 days of salting). At the end of process salt content observed was 14.31, 16.76 and 20.89% of dry matter for LS, MS and HS groups, respectively (Purriños et al., 2011b) (data not shown).

A significant ($P < 0.001$) increase on the total amount of volatile compounds was observed during the manufacturing process, from an initial average value of 578.89×10^6 area units to 1385.32, 1633.45 and $\times 2013.82 \times 10^6$ area units for LS, MS and HS groups, respectively, being this increase more marked in samples from higher salt levels (see Fig. 1). At the end of drying–ripening process MS and HS batches maintained the relationship aldehydes > ketones > alcohols > hydrocarbons > furans > others compounds > esters, while LS batch showed greater amount of hydrocarbons than alcohols. Differences among treatments were detected in the amount of aldehydes, alcohols, ketones and esters at the end of process, however hydrocarbons, furans and other compounds did not presented significant differences among the three salting times studied. We found that the area units increased 1.25 and 1.50 times in the case of aldehydes, between 1.19 and 1.45 times for alcohols and 1.27 and 1.82 times for esters in samples from MS and HS treatments, respectively respect to “lacón” samples from LS group.

Aldehydes are known as the major contributors to the unique flavor of dry-cured ham due to their rapid formation in lipid oxidation and their low flavor thresholds (Dirinck, Opstaele, & Vandendriessche, 1997). Significant differences ($P < 0.001$) were found for the sum of all aldehydes for each treatment and ripening time. In general, the values observed were significantly higher in the dry-cured “*lacón*” salted during 5 days (see Table 1). Among linear saturated aldehydes, hexanal was the most abundant compound, showing the highest content in samples from HS treatments while LS groups showed the lowest one at the end of salting, post-salting and drying-ripening stages. The increase of hexanal from raw piece to the final process was 1.5, 2 and 2.3 times for LS, MS and HS treatments, respectively. Hexanal is generally considered as a good indicator of the oxidation level (Shahidi & Pegg, 1994). Its aroma has been described as strong, rancid, unpleasant (MacLeod & Coppock, 1976), hot, nauseating (Persson & Von Sydow, 1973), green leaves, and vegetables (Stahnke, 1994). In the case of the other linear aldehydes like butanal, pentanal, heptanal and nonanal, the amount found in HS salting times at the end of the process was significantly higher than the other ones, with the exception of butanal, which showed higher concentration in LS treatments (10.10 , 2.87 and 7.63×10^6 area units for LS, MS and HS groups, respectively). The lower contents of straight chain aldehydes such as pentanal, hexanal heptanal and nonanal in LS and MS groups than HS treatments throughout the process of dry-cured “*lacón*” suggest a lesser importance of lipid oxidation. This effect was expected due to the prooxidant effect of salt (Kanner, Harel, & Joffe, 1991). Our results were in accordance with reported by Pérez-Juan, Flores, and Toldrá (2006) who observed that the oxidation of unsaturated fatty acids to volatile carbonile compounds is favored in the center of the ham where the higher salt content acts as prooxidant. Other authors have also detected a prooxidant effect of sodium chloride in model systems (Sárraga & García-Regueiro, 1998) and meat products (Aguirrezábal, Mateo, Domínguez, & Zumalacárregui, 2000; Kanner et al., 1991). On the contrary, Andrés, Cava, Ventanas, Muriel, and Ruiz (2007) did not observe variations in hexanal content between dry cured Iberian hams with different salt content (6% vs. 3% of salt w/w), and also Stahnke (1995) did not find variations in hexanal content between sausages cured with different salt levels (1.5% vs. 3.5% w/w). The 2-enal and 2,4-enal compounds add sweet, fruity and fatty features to the flavor (Hamilton, 1989). The compounds 2-Octenal (E)- and 2-Nonenal (E)- showed the highest areas at the end of the post-salting stage for the three salting times studied, and then decreasing during drying-ripening. Similar evolution was observed by 2,4-Decadienal, while the aldehyde 2,4-Nonadienal was increasing from the post-salting stage until the end of the drying-ripening step in all three groups studied. Among branched saturated aldehydes, propanal, 2-methyl and butanal, 3-methyl were detected at the end of process in all treatments. Both are considered as a product of the Strecker degradation reactions of the amino acids valine and leucine respectively (Forss, 1972; Ventanas et al., 1992). The aldehyde propanal, 2-methyl only appeared in the fresh piece and at the end of drying-ripening stage showing the lowest content in the dry-cured “*lacón*” salting five days and the highest values in the dry-cured “*lacón*” salting three days (1.82 and 5.03×10^6 area units, respectively). The butanal, 3-methyl appeared in the fresh piece (9.15×10^6 area units), decreasing after salting in all treatments, where no significant differences were observed ($P > 0.05$). During the post-salting and drying-ripening stages, this compound increased significantly ($P < 0.001$) in three groups studied and this increase was more marked during maturation reaching the highest values in samples from LS treatments (57.44×10^6 area units). These results indicated that the highest salt contents retarded proteolysis and Strecker degradation reactions of amino acids. In agreement with our results Stahnke (1995) observed that 3.5% of salt concentration with respect to 1.5% promoted a higher formation of butanal, 3 methyl in fermented sausages. On the other hand, Andrés et al. (2007) observed that the effect of salt level on the amount of butanal, 3 methyl was no significant throughout the ripening of dry-cured Iberian hams

with different salt content (6% vs. 3% of salt w/w), and in the same line Andersen and Hinrichsen (1995) did not find either influence of salt level on branched aldehydes content in bacon.

Alcohols due to their low odor threshold are considerable important contributors to the aroma of dry cured products (Sabio, Vidal-Aragón, Bernalte, & Gata, 1998). The length of salting time significantly affected ($P < 0.001$) on the content of these compounds at the end of drying-ripening process (165.04 , 196.48 vs. 238.80×10^6 area counts for LS, MS and HS, respectively) showed the highest values in samples from 5 days of salting. During the rest of the stages (after salting and after post-salting) the differences found among the three salting times were slight ($P < 0.05$). In drying-ripening stage, the predominant alcohol was 1-Octen-3-ol, originating from the oxidative breakdown of linoleic acid and often described as an important component of meat volatiles, it is considered the responsible for a mushroom note (Meynier, Novella, Chizzolini, Zanardi, & Gandemer, 1999; Novelli, Gandemer, Meynier, Zanardi, & Chizzolini, 1995). Some authors (Rabe et al., 2003; Salles, 2006) have observed that NaCl is likely to increase the volatility of the most hydrophobic compound as 1-Octen-3-ol by decreasing the water molecules available for its solubilisation.

Ketones likely arises from oxidation of fatty acids (Flores et al., 1997) among them, especially 2-ketones, are considered to have a great influence on the aroma of meat and meat products (Muriel, Antequera, Petró, Andrés, & Ruíz, 2004). 2-Pentanone, 2-Heptanone and 2-Decanone have been reported to be an oxidation product of fatty acids (Flores et al., 1997) and they present a peculiar aroma, such as ethereal, butter, spicy notes or blue cheese notes (Novelli et al., 1995). 2-Heptanone decreased after salting stage from 21.34 to 8.29 and 13.85×10^6 area units, in samples from LS and MS treatments, respectively, while increased in samples from HS salting times (to 29.91×10^6 area units). During the rest of the sampling days, this ketone showed an increase, reaching maximum values at the end of process (61.69 , 59.69 and 102.20×10^6 area units for LS, MS and HS groups, respectively). The differences among salting times for almost all compounds of this chemical family were more marked at the drying ripening stage where samples from HS groups showed a higher abundance of ketones than the other ones (see Table 1). The predominant ketone in all salting times studied was 3-Octen-2-one, (E). The influence of salting time on the content of this compound was significant on salting stage ($P < 0.001$) and drying-ripening stage ($P < 0.01$) while the effect of the length of salting time did not reach statistical significance among treatments ($P > 0.05$) on post-salting stage.

The presence of hydrocarbons seems to have a limited influence on dry-cured product aroma (Ansorena, Gimeno, Astiasarán, & Bello, 2001) due to their high threshold values. Aliphatic hydrocarbons with less than 10 carbons atoms arise mainly from lipid oxidation (Ansorena et al., 2001; Ruíz, Muriel, & Ventanas, 2002), while those with longer chains could be accumulated in the fat depots of the animal, probably from feeding (Meynier et al., 1999; Tejeda, García, Petró, Andrés, & Antequera, 2001). The overall evolution of hydrocarbons showed a marked decrease from the salting to the post-salting steps for all groups studied (135.90 vs. 90.96 , 194.21 vs. 76.40 and 213.90 vs. 112.66×10^6 area units, LS, MS and HS salting times, respectively) showing statistic differences among treatments ($P < 0.01$), increasing thereafter at the end of the drying-ripening step, being higher contents in samples from LS group than in samples from HS group (see Table 1). At the end of salting stage, straight chain aliphatic hydrocarbons with more than eight carbons presented the highest values for the three salting times, being the undecane the most abundant (86.64 , 98.59 and 101.89×10^6 area units for LS, MS and HS groups, respectively), while at the end of drying-ripening stage, the predominant hydrocarbons were those with shorter chain length (pentane, hexane and heptanes). Although there were no statistical differences ($P > 0.05$) among the three salting times analyzed at the end of process in total hydrocarbons, most individual hydrocarbons showed significant differences in the drying-ripening stage.

Table 1Evolution of volatile compounds during the processing of dry-cured “lacón”, expressed as total area counts ($\text{AU} \times 10^6$) (mean area $\pm$ standard deviation). Effect of the length of salting time.

Compound	KI	R	Fresh piece	After salting			SIG	Post-salting			SIG	Drying-ripening			SIG
				LS	MS	HS		LS	MS	HS		LS	MS	HS	
Aldehydes															
Propanal, 2-methyl-	588	k,t	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	n.s.	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	n.s.	5.03±0.72 ^b	2.68±0.57 ^a	1.82±0.37 ^a	**
Butanal	629	k,m	3.47±0.34	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	n.s.	2.01±0.53 ^b	1.08±0.00 ^a	3.07±0.29 ^c	***	10.10±0.29 ^c	2.87±0.57 ^a	7.63±0.55 ^b	***
Butanal, 3-methyl-	692	k,m	9.15±0.93	3.93±0.60	4.18±0.33 ^a	3.84±0.62	n.s.	6.59±0.08 ^c	6.01±0.00 ^b	5.06±0.29 ^a	***	57.44±1.54 ^b	31.57±2.30 ^a	25.52±4.39 ^a	***
Pentanal	737	k,m	56.48±3.64	26.68±0.14 ^a	37.26±0.00 ^a	74.92±6.28 ^b	***	20.78±2.15 ^a	35.68±0.48 ^b	54.33±0.73 ^c	***	89.90±2.64 ^a	101.20±9.95 ^a	131.46±11.38 ^b	**
Hexanal	842	k,m	309.86±10.33	383.70±4.30 ^a	441.84±12.42 ^b	501.33±26.44 ^c	**	384.87±14.82 ^a	391.07±1.32 ^{ab}	422.88±18.71 ^b	n.s.	466.58±11.80 ^a	607.80±67.92 ^b	731.52±37.30 ^c	***
2-Pentenal, 2-methyl-	747	k,t	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	n.s.	0.11±0.03 ^a	0.60±0.24 ^b	0.58±0.05 ^b	**	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	n.s.
Heptanal	945	k,m	24.22±0.59	17.35±0.64 ^a	21.21±0.88 ^a	33.32±2.48 ^b	***	51.88±3.48 ^a	56.71±1.08 ^a	82.62±5.14 ^b	***	59.41±2.05 ^a	90.11±5.17 ^b	95.34±7.42 ^b	***
2-Heptenal, (E)-	1006	k,t	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	n.s.	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	n.s.	21.69±1.10 ^a	36.54±8.80 ^b	45.86±4.99 ^b	**
2-Octenal, (E)-	1063	k,m	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	n.s.	30.42±4.79 ^a	42.29±1.08 ^b	66.25±6.68 ^c	***	12.02±0.12 ^a	28.89±3.63 ^b	35.60±1.18 ^c	***
Nonanal	1077	k,m	0.00±0.00	11.14±1.73 ^a	26.60±3.85 ^b	23.06±2.28 ^b	**	24.96±2.96 ^a	25.59±1.80 ^a	39.02±7.64 ^b	*	6.06±0.55 ^a	5.36±0.38 ^a	8.71±0.27 ^b	***
2-Nonenal, (E)-	1218	k,m	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	n.s.	3.72±0.38 ^a	6.61±0.72 ^b	10.86±0.70 ^c	***	2.19±0.20 ^a	4.40±2.49 ^a	5.96±0.50 ^b	*
2,4-Nonadienal, (E,E)-	1278	k,m	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	n.s.	1.12±0.12 ^a	2.40±0.24 ^b	7.12±0.18 ^c	***	1.25±0.12 ^a	2.49±0.77 ^a	9.96±1.73 ^b	***
2,4-Decadienal, (E,E)-	1392	k,m	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	n.s.	0.46±0.09 ^a	1.08±0.24 ^b	1.90±0.35 ^c	**	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.15±0.02 ^b	***
Alcohols															
1-Pentanol	824	k,m	37.09±1.27	12.98±0.17	16.05±7.91	21.38±0.99	n.s.	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	n.s.	48.40±5.31 ^a	59.50±5.17 ^b	87.65±1.16 ^c	***
1-Hexanol	921	k,m	0.00±0.00	2.40±0.08 ^a	2.86±1.43 ^a	14.47±3.07 ^b	**	0.77±0.15 ^a	12.62±0.36 ^b	18.85±1.35 ^c	***	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.42±0.05 ^b	***
1-Octen-3-ol	1016	k,m	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	n.s.	69.66±21.85	74.85±31.12	115.55±12.23	n.s.	114.74±1.09 ^a	135.64±6.31 ^b	148.79±9.97 ^b	**
4-Ethylcyclohexanol	1034	k,t	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	n.s.	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.07±0.00 ^b	***	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	n.s.
Butylated hydroxytoluene	> 1400	k,m	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	n.s.	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	n.s.	1.90±0.25	1.34±0.19	1.95±0.33	n.s.
Ketones															
2-Pentanone	731	k,t	5.50±0.34	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	n.s.	0.57±0.14 ^a	1.44±0.24 ^b	3.26±0.04 ^c	***	1.89±0.12 ^a	5.55±0.19 ^c	2.88±0.24 ^b	***
2-Heptanone	936	k,m	21.34±1.35	8.29±0.24 ^a	13.85±1.21 ^b	29.91±0.54 ^c	***	17.51±1.65 ^a	24.03±0.24 ^b	36.15±4.20 ^c	***	61.69±0.16 ^a	59.69±11.48 ^a	102.20±8.60 ^b	**
5-Hepten-2-one, 6-methyl-	1018	k,t	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	n.s.	2.09±0.06 ^a	2.76±0.24 ^a	10.47±0.66 ^b	***	2.15±0.08 ^a	2.68±0.96 ^a	10.12±0.18 ^b	***
3-Octen-2-one, (E)-	1053	k,m	16.94±2.12	54.71±0.47 ^a	48.80±2.31 ^a	92.81±6.26 ^b	***	152.11±7.45 ^{ab}	147.30±5.05 ^a	188.80±25.75 ^b	n.s.	144.20±8.10 ^a	158.79±20.85 ^a	204.60±7.37 ^b	**
3,5-Octadien-2-one	1070	k,m	5.67±0.85	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	n.s.	28.21±3.50 ^a	68.12±3.24 ^b	131.18±22.17 ^c	***	21.10±1.50 ^a	65.24±6.50 ^b	97.00±10.50 ^c	***
2-Decanone	1235	m	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	n.s.	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	n.s.	0.19±0.01 ^a	2.49±0.77 ^b	3.99±0.48 ^c	***

<i>Hydrocarbons</i>															
Pentane	467	k,m	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	n.s.	42.08 ± 8.53 ^b	36.52 ± 0.12 ^b	17.32 ± 1.81 ^a	**	63.87 ± 4.65 ^{ab}	78.25 ± 7.84 ^b	61.61 ± 6.96 ^a	n.s.
Hexane	595	k,m	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	n.s.	14.16 ± 0.85 ^c	1.68 ± 0.24 ^a	4.87 ± 0.95 ^b	***	39.04 ± 6.33 ^c	4.97 ± 0.00 ^a	18.19 ± 1.75 ^b	***
Benzene	684	k,m	3.64 ± 1.44	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	n.s.	0.41 ± 0.15 ^a	1.80 ± 0.12 ^c	1.01 ± 0.16 ^b	***	1.50 ± 0.03 ^a	3.25 ± 0.96 ^b	4.45 ± 0.47 ^c	**
Heptane	698	k,m	36.84 ± 0.17	5.57 ± 0.06 ^a	7.58 ± 0.33 ^{ab}	12.14 ± 3.23 ^b	n.s.	15.65 ± 2.61	11.77 ± 0.96	15.58 ± 0.90	n.s.	86.07 ± 4.20	75.38 ± 8.23	74.09 ± 7.04	n.s.
Toluene	790	k,m	44.29 ± 7.62	7.34 ± 0.15 ^a	13.85 ± 1.10 ^b	15.63 ± 1.25 ^b	**	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	n.s.	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	n.s.
2-Octene	819	m	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	n.s.	1.57 ± 0.15	1.56 ± 0.24	1.78 ± 0.11	n.s.	4.65 ± 0.30 ^b	2.68 ± 0.57 ^a	3.02 ± 0.25 ^a	**
Heptane, 3-ethyl-	873	m	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	n.s.	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	n.s.	1.65 ± 0.12 ^b	1.15 ± 0.19 ^a	2.58 ± 0.25 ^c	***
Cyclohexene, 4-methyl-	973	m	0.00 ± 0.00	7.04 ± 0.14 ^c	3.85 ± 0.33 ^b	1.74 ± 0.28 ^a	***	5.93 ± 0.26 ^b	5.65 ± 0.00 ^b	1.69 ± 0.12 ^a	***	7.14 ± 0.65 ^c	6.12 ± 0.19 ^b	1.71 ± 0.15 ^a	***
2,4-Octadiene	877	m	0.00 ± 0.00	2.28 ± 0.09 ^a	4.51 ± 0.11 ^b	9.74 ± 0.20 ^c	***	0.28 ± 0.04 ^a	1.20 ± 0.12 ^b	4.09 ± 0.32 ^c	***	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.32 ± 0.03 ^b	***
Nonane	898	k,t	4.40 ± 0.17	3.17 ± 0.16 ^a	12.31 ± 0.99 ^b	16.96 ± 3.03 ^b	**	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	n.s.	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	n.s.
Decane	996	k,m	0.00 ± 0.00	10.83 ± 0.82 ^a	32.86 ± 3.96 ^b	32.62 ± 4.54 ^b	**	8.89 ± 0.62 ^a	10.09 ± 0.24 ^a	25.62 ± 3.42 ^b	***	2.88 ± 0.05	4.40 ± 4.40	6.03 ± 0.14	n.s.
Undecane	1102	k,m	0.00 ± 0.00	86.64 ± 4.13 ^a	98.59 ± 2.09 ^b	101.89 ± 0.29 ^b	**	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.12 ± 0.01 ^b	***	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.07 ± 0.02 ^b	***
Dodecane	1195	k,m	0.00 ± 0.00	13.03 ± 0.24 ^a	20.66 ± 1.32 ^b	23.17 ± 3.83 ^b	*	1.97 ± 0.08 ^a	6.13 ± 0.60 ^b	40.56 ± 1.38 ^c	***	2.19 ± 0.13 ^a	5.55 ± 4.40 ^a	26.32 ± 3.64 ^b	***
<i>Esters</i>															
Formic acid, pentyl ester	822	k,t	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	n.s.	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	n.s.	2.07 ± 0.06 ^b	2.49 ± 0.77 ^b	0.09 ± 0.01 ^a	***
Hexanoic acid, methyl ester	936	k,m	0.00 ± 0.00	13.52 ± 0.01	11.1 ± 1.54	14.81 ± 1.88	n.s.	16.30 ± 1.89	16.46 ± 0.84	19.20 ± 1.60	n.s.	0.02 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	***
4-Hydroxymandelic acid, ethyl ester, di-TMS	1075	m	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	49.47 ± 4.08 ^b	***	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	n.s.	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.07 ± 0.01 ^b	***
<i>Furans</i>															
Furan, 2-ethyl-	719	k,m	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	n.s.	3.63 ± 0.38 ^a	2.76 ± 0.12 ^a	11.01 ± 1.02 ^b	***	14.30 ± 0.75 ^c	6.12 ± 0.96 ^b	3.66 ± 0.42 ^a	***
Furan, 2-pentyl-	1003	k,m	0.00 ± 0.00	6.12 ± 0.36	7.25 ± 1.84	6.66 ± 2.30	n.s.	9.49 ± 2.58 ^a	16.10 ± 0.60 ^b	22.75 ± 1.05 ^c	***	15.21 ± 1.04	17.79 ± 9.95	23.94 ± 0.77	n.s.
<i>Other compounds</i>															
Pentane, 1-chloro-	776	t	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	n.s.	0.35 ± 0.04 ^a	0.96 ± 0.12 ^b	1.03 ± 0.05 ^b	***	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.06 ± 0.01 ^b	***
Pyridine	785	k,m	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	n.s.	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	n.s.	3.47 ± 0.16 ^a	3.44 ± 0.38 ^a	4.57 ± 0.43 ^b	*
Hexanenitrile	948	m	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.04 ± 0.01 ^b	***	0.95 ± 0.12 ^a	3.60 ± 0.00 ^b	4.36 ± 0.46 ^c	***	13.34 ± 0.66	17.03 ± 10.14	22.51 ± 1.82	n.s.

^{a-c}Means with different superscripts and the same ripening time (stage) within a row with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

Significance levels: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, n.s. = not significant

KI: Kovats index calculated for DB-624 capillary column (J&W scientific: 30 m × 0.25 mm id, 1.4 μm film thickness) installed on a gas chromatograph equipped with a mass selective detector.

R: Reliability of identification; k: Kovats index in agreement with literature (Barbieri et al., 1992; Buscailhon et al., 1993; Flores et al., 1997; Jurado et al., 2009; Liu et al., 2007; Mateo and Zumalacárregui, 1996; Ruiz et al., 1999; Viallon et al., 1996; Yu, Sun, Tian, & Qu, 2008); m: mass spectrum agreed with mass database (NIST05); t: tentative identification by mass spectrum.

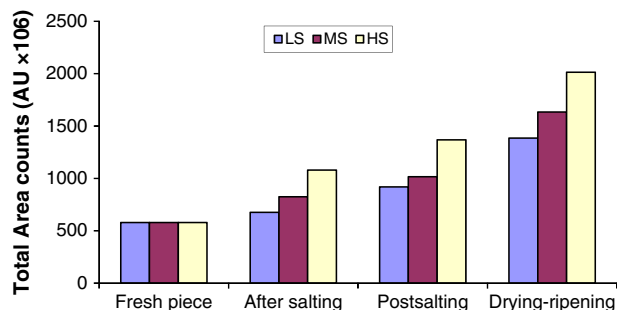


Fig. 1. Effect of salting time on the relative abundance of total volatile compounds during the manufacture of dry-cured "lacón".

Little information about the effect of sodium chloride on formation of hydrocarbons in dry-cured meat products is available in the scientific literature due to its little contribution on the final aroma.

With respect to esters, there was a significant effect of the length of salting time ($P < 0.001$) at the end of salting stage (13.52 , 11.10 and 64.28×10^6 area units for LS, MS and HS groups, respectively) and at the end of drying-ripening step (2.09 , 2.49 and 0.16×10^6 area units for LS, MS and HS groups, respectively). All salting times studied showed similar amounts of hexanoic acid, methyl ester in the first stages. On the other hand, at the end of the process, samples from HS treatments showed the greatest content of 4-Hydroxymandelic acid, ethyl ester, di-TMS, while samples from LS and MS groups showed the highest abundance of formic acid, penthyl ester (see Table 1). Ethyl esters have lower air threshold than methyl esters (Burdock, 2002) which results in a higher aroma impact. The low proportion of esters of the total area at the end of drying-ripening is probably related to the antimicrobial activity of sodium chloride (Gaspardo, Procida, Toso, & Stefanon, 2008), showing the lowest amount in samples from HS salting time.

Furans increased during processing keeping the same pattern and reached the highest content at the final stage (29.51 , 23.91 and 27.60×10^6 area units for LS, MS and HS groups, respectively), although no differences were detected among treatments at the end of the

process ($P > 0.05$). Among these compounds, 2-penthyl furan was the most abundant, it is a noncarboxylic compound derived from linoleic acid and other n-6 fatty acids (Frankel, 1991), with relatively low threshold and vegetable aromatic note (Fay & Brevard, 2005). In this sense, Andrés et al. (2007) showed that hams with a higher salt content presented a lower content of 2-penthyl furan than the other ones. However, other authors (Mottram, 1984; Stahnke, 1995) evidenced the influence of salt content on this compound in meat products.

Among other compounds group, pentane, 1-chloro-, is considered a product from pesticide residues that the pig ingested in its diet (Buscailhon, Berdagué, & Monin, 1991) and this component was only detected after post-salting stage in the three salting times studied. On the other hand, hexanenitrile was the most abundant component observed at the end of drying-ripening stage; however, no significant difference were observed ($P > 0.05$) among three salting times studied.

In a parallel sensory work carried out on the same samples (Purriños, Bermúdez, Temperán, et al., 2011b), we observed that differences in rancid aroma were not significantly affected by the length of salting time. This sensory result seems not to be related with results obtained in the present study due to the fact that there is a well-established relationship between hexanal content and rancid flavor (Lai, Gray, Boored, Crackel, & Gill, 1995). The study of volatile compounds in meat products was usually based on their abundance without considering their contribution to the final aroma. According to some authors (Carrapiso, Jurado, & Timón, 2002b; Carrapiso, Ventanas, & García, 2002a; García-González, Tena, Aparicio-Ruiz, & Morales, 2008) the amount of a compound in a food is not necessarily a measure of its sensory impact, because it depends on its sensory threshold. Due to the fact that values of volatile compounds expressed as area units cannot explain the individual contribution of each compound to the overall flavor. Andrés et al. (2007) proposed several ratios showing the relationship between the amount of hexanal and other volatile compounds. Other authors (Antequera et al., 1992; Ruiz et al., 2002) pointed out as a possible marker of pleasant of dry-cured Iberian ham the ratio between the compounds derived from n-6 fatty acids and compounds from oleic acid. The ratio between the areas of hexanal (main responsible of rancid aroma) and the rest of volatile compound aldehydes (pleasant aroma) studied in the present work at the end of the manufacture dry-cured

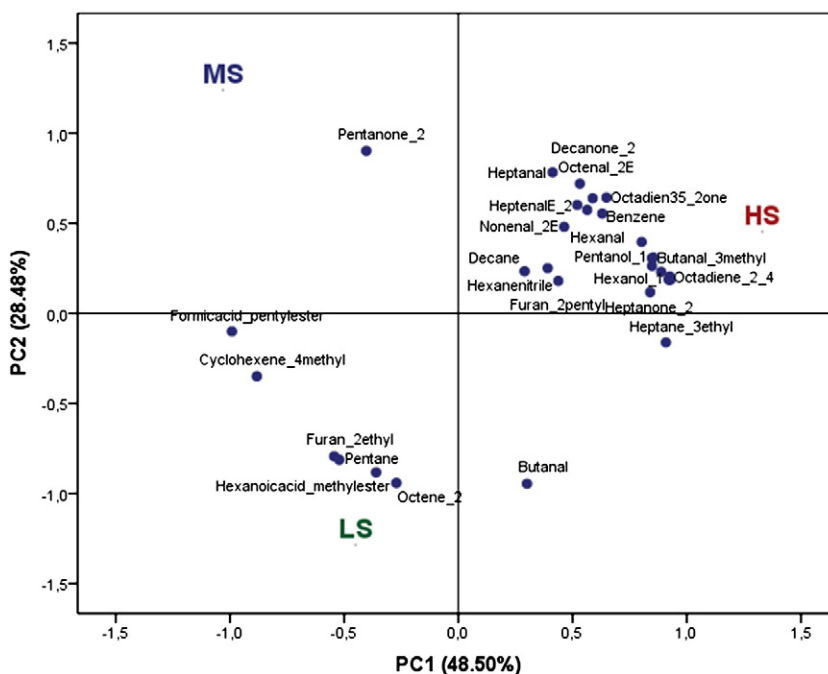


Fig. 2. Relationships among dry-cured "lacón" manufactured with three different salt levels (LS, MS and HS) and volatile compounds obtained by PCA. a) Projection of the variables and dry-cured "lacón" groups in the plane defined by the first two principal components.

“Iacón” were: 1.76, 1.98 and 1.98; $P > 0.05$ for samples from LS, MS and HS salting times, respectively. This lack of a significant effect showed in the relationship between rancid aromatic precursor and pleasant aromatic precursors could explain results obtained in the sensory analysis. Another explanation could be that though individual hexanal area units showed significant variations among the three salting times studied at the end of the drying–ripening process, these differences were not sufficient to overcome the difference threshold by hexanal and therefore to be detected by the panelists.

3.1. Principal components analysis

Principal component analysis allows obtaining a better overall idea of the relationship between variables. Results for PCA applied to mean values of the parameters are summarized in Fig. 2. The PCA showed that about 76.98% of the variability was explained by two first principal components. The correlation matrix for this model has a determinant close to zero indicating significant correlations among variables and suitability for PCA (Table 2). As can be seen in Fig. 2, mean value of samples from LS group is in the negative side of both PC1 and PC2, mean value of samples from MS group is in the negative side of PC1 and in the positive side of PC2, while mean value of samples from HS treatment appear at PC1 > 0 and in the positive side of PC2.

Principal component 1 (PC1) was the most important variable in terms of differences among salting times as it accounted for 48.50% of the total variability. The PC1 axis was mainly composed of five hydrocarbons (Heptane-3-methyl, Cyclohexene-4-methyl, 2,4-Octadiene, Undecane and Dodecane), three aldehydes (Butanal-3-methyl, Hexanal and 2,4-Nonadienal-(E,E)), two alcohols (1-Pentanol and 1-Hexanol), two ketones (2-Heptanone and 5-Hepten-2-one-6-methyl) and two esters (Formic acid, pentyl ester and 4-Hydroxymandelic acid, ethyl ester, di-TMS) (see Table 2). The formation pathway in all of these compounds is related to lipid oxidation (Soto et al., 2008). From a biochemical point of view, the origin of linear saturated aldehydes could be related to the autooxidation of unsaturated fatty acids: oleic, linoleic, linolenic, and arachidonic (Chan & Coxon, 1987), whereas the branched saturated aldehydes could be related to proteolysis/amino acid degradation (Pastorelli et al., 2003).

PC2 was determined by three aldehydes (Butanal, Hexanal, Heptanal and 2-Octenal-(E)), one ketone (2-Pentanone), one hydrocarbon (Pentane), and one ester (Hexanoic acid, methyl ester). Finally, PC3 was mainly related to one aldehyde (2-Nonenal-(E)), one hydrocarbon (Decane) and one furan (Furan, 2-pentyl) (see Table 2). Some compounds may have multiple origins, i.e. 2-Pentanone could result from the degradation of carbohydrates, amino acids or lipids.

4. Conclusions

Significant differences have been observed in the total amount of volatile compounds among three salting times studied. Increasing salting time favors the formation of volatile compounds with a potential contribution to the aroma of dry-cured pork shoulder “Iacón”. Salt content would play a key role on dry-cured “Iacón” volatile profile generation, since salt acts as pro-oxidizing and solubilizing agent, increasing the relative levels of volatile compounds from lipid oxidation, among others. In addition, salt also contributes to higher levels of hexanal and lower levels of propanal, 2-methyl and butanal, 3-methyl, which is in accordance with its prooxidant effect

Acknowledgments

This work was part of the research Project O7TAL003CT granted by the Xunta de Galicia (The Regional Government).

Table 2
Results of principal component analysis on volatile compounds.

Compounds	PC1	PC2	Communality
Pentane	−0.522	−0.813	0.988
Butanal	0.300	−0.946	0.989
Benzene	0.564	0.575	0.972
Butanal_3methyl	0.854	0.310	0.960
Furan_2ethyl	−0.544	−0.794	0.993
Pentanone_2	−0.403	0.903	0.992
Octene_2	−0.272	−0.942	0.962
Pentanol_1	0.802	0.397	0.981
Hexanal	0.630	0.554	0.973
Formicacid_pentylester	−0.992	−0.100	0.995
Heptane_3ethyl	0.909	−0.161	0.970
Hexanol_1	0.922	0.189	0.986
Heptanone_2	0.839	0.118	0.954
Heptanal	0.412	0.783	0.961
Hexanoicacid_methylester	−0.360	−0.883	0.997
Hexanenitrile	0.391	0.251	0.988
Cyclohexene_4methyl	−0.883	−0.350	0.983
Octadiene_2_4	0.925	0.205	0.986
Decane	0.290	0.234	0.988
Furan_2pentyl	0.437	0.180	0.995
HeptenalE_2	0.520	0.602	0.955
Hepten_5_2one_6methyl	0.888	0.231	0.998
Undecane	0.922	0.187	0.964
Octenal_2E	0.532	0.720	0.998
Octadien35_2one	0.648	0.643	0.974
Hydroxymandelic4_acid_ethylster_diTMS	0.926	0.191	0.974
Dodecane	0.848	0.264	0.980
Nonenal_2E	0.463	0.480	0.973
Decanone_2	0.588	0.639	0.984
Nonadienal_24EE	0.847	0.306	0.946
Decadienal_24EE	0.928	0.187	0.987
Eigen value	23.681	4.962	
Percent of variance	76.389	16.005	
Accumulative percentage	76.389	92.395	

PC1: Principal component 1.

PC2: Principal component 2.

Communality: Proportion of variance of a particular item that is due to common factors.

References

- Aguirrezábal, M. M., Mateo, J., Domínguez, J. M., & Zumalacárregui, J. M. (2000). The effect of páprika, garlic and salt on rancidity in dry sausages. *Meat Science*, 54, 77–81.
- Andersen, H. J., & Hinrichsen, L. L. (1995). Changes in curing agents, microbial counts and volatile compounds during processing of green bacon using two different production technologies. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 68, 477–487.
- 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., Cava, R., Ventanas, S., Muriel, E., & Ruiz, J. (2007). Effect of salt content and processing conditions on volatile compounds formation throughout the ripening of Iberian ham. *European Food Research and Technology*, 225, 677–684.
- Ansorena, D., Gimeno, O., Astiasarán, I., & Bello, J. (2001). Analysis of volatile compounds by GC–MS of a dry fermented sausage: Chorizo de Pamplona. *Food Research International*, 34, 67–75.
- Antequera, T., López-Bote, C. J., García, C., Asensio, M. A., Ventanas, J., Garcia-Regueiro, J. A., et al. (1992). Lipid oxidative changes in the processing of Iberian pig hams. *Food Chemistry*, 45, 105–110.
- Barbieri, G., Bolzoni, L., Parolari, G., Virgili, R., Buttini, R., Careri, M., & Mangia, A. (1992). Flavor compounds of dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 2389–2394.
- Burdock, G. A. (2002). *Fenaroli's handbook of flavor ingredients* (4th ed.). Boca Raton, Florida: CRC Press Inc.
- Buscailhon, S., Berdagué, J. L., & Monin, G. (1991). Time-related changes in volatile compounds of lean tissue during processing of French dry-cured ham. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 63, 69–75.
- Buscailhon, S., Berdagué, J. L., & Monin, G. (1993). Time-related changes in volatile compounds of lean tissue during processing of French dry-cured ham. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 63, 69–75.
- Carrapiso, A. I., Jurado, A., & Timón, M. L. (2002). 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. (2002). Characterization of the most odor-active compounds of Iberian ham headspace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1996–2000.
- Chan, H. W. -S., & Coxon, D. T. (1987). Lipid hydroperoxides. In H. W. -S. Chan (Ed.), *Autooxidation of unsaturated lipids* (pp. 17–50). Academic Press Inc.

- Counton-Gambotti, C., Gandemer, G., Rousset, S., Maestrini, O., & Casabianca, F. (1999). Reducing salt content of dry-cured ham: Effect on lipid composition and sensory attributes. *Food Chemistry*, 64, 13–19.
- Desmond, E. (2006). Reducing salt: A challenge for the meat industry. *Meat Science*, 74, 188–196.
- Dirinck, P., Opstaele, F. V., & Vandendriessche, F. (1997). Flavour differences between northern and southern European cured hams. *Food Chemistry*, 59(4), 511–521.
- Durack, E., Gonzalez, M. A., & Wilkinson, M. G. (2008). Salt: A review of its role in food science and public health. *Current Nutrition and Food Science*, 4, 290–297.
- Fay, L. B., & Brevard, H. (2005). Contribution of mass spectrometry of the Maillard reaction in food. *Mass Spectrometry Reviews*, 24, 487–507.
- Flores, M., Grimm, C. C., Toldrá, F. A., & Spanier, A. M. (1997). Correlations of sensory and volatile compounds of Spanish Serrano dry-cured ham as a function of two processing times. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2178–2185.
- Forss, D. A. (1972). Odor and flavor compounds from lipids. *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids*, 13(4), 181–258.
- Frankel, E. N. (1991). Recent advances in lipid oxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 54(4), 495–511.
- García-González, D. L., Tena, N., Aparicio-Ruiz, R., & Morales, M. T. (2008). Relationship between sensory attributes and volatile compounds qualifying dry-cured hams. *Meat Science*, 80, 315–325.
- Gaspardo, B., Procidia, G., Toso, B., & Stefanon, B. (2008). Determination of volatile compounds in San Daniele ham using headspace GC–MS. *Meat Science*, 80, 204–209.
- Guinee, T. P. (2004). Salting and the role of salt in cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 99–109.
- Hamilton, R. J. (1989). The chemistry of rancidity in foods. In J. C. Allen, & R. J. Hamilton (Eds.), *Rancidity in foods* (pp. 123–145). London: Elsevier Applied Science.
- Hutton, T. (2002). Technological functions of salt in the manufacturing of food and drink products. *British Food Journal*, 104, 126–152.
- Jessica, D., Mcneely, B., Gwen, W., & David, E. A. (2008). Dietary sodium effects on heart rate variability in salt sensitivity of blood pressure. *Psychophysiology*, 45, 405–411.
- 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, 262–270.
- Kanner, J., Harel, S., & Joffe, R. (1991). Lipid peroxidation of muscle food as affected by NaCl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1017–1024.
- Lai, S., Gray, J., Boored, A., Crackel, R., & Gill, J. (1995). Assessment of off-flavor development in restructured chicken nuggets using hexanal and TBARS measurements and sensory evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67, 447–452.
- Liu, Y., Xu, X. L., & Zhou, G. H. (2007). Comparative study of volatile compounds in traditional Chinese Nanjing marinated duck by different extraction techniques. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 543–550.
- MacLeod, G., & Coppock, B. (1976). Volatile flavor components of beef boiled conventionally and by microwave radiation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24, 835–843.
- Marra, A. I., Salgado, A., Prieto, B., & Carballo, J. (1999). Biochemical characteristics of dry-cured “Iacón”. *Food Chemistry*, 67, 33–37.
- Martín, L., Antequera, T., Córdoba, J. J., Timón, M. L., & Ventanas, J. (1998). Effects of salt and temperature in proteolysis during ripening of Iberian ham. *Meat Science*, 49(2), 145–153.
- Martín, L., Córdoba, J. J., Ventanas, J., & Antequera, T. (1999). Changes in intramuscular lipids during ripening of Iberian dry-cured ham. *Meat Science*, 51(2), 129–134.
- Mateo, J., & Zumalacárregui, J. M. (1996). Volatile compounds in chorizo and their changes during ripening. *Meat Science*, 44, 255–273.
- Meynier, A., Novella, E., Chizzolini, R., Zanardi, E., & Gandemer, G. (1999). Volatile compounds of commercial Milano salami. *Meat Science*, 51, 175–183.
- Mottram, D. S. (1984). Organic nitrates and nitriles in the volatiles of cooked cured pork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32, 343–345.
- Muguerza, E., Gimeno, O., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2004). New formulations for healthier dry fermented sausages: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 452–457.
- Muriel, E., Antequera, T., Petrón, M. J., Andrés, A. I., & Ruiz, J. (2004). Volatile compounds in Iberian dry-cured loin. *Meat Science*, 68, 391–400.
- Novelli, E., Gandemer, G., Meynier, A., Zanardi, E., & Chizzolini, R. (1995). Composizione dell'aroma di due prodotti di salumeria: mortadella e salame milano. Parma: Atti del congresso Grassi e qualità della carni.
- Official Journal of the European Communities (2001). *Commission Regulation (EC) No 898/2001, of 7 May 2001. L 126, Vol. 44.* (pp. 18) (8 May 2001).
- Olesen, P. T., Meyer, A. S., & Stahnke, L. H. (2004). Generation of flavor compounds in fermented sausages—The influence of curing ingredients, *Staphylococcus starter* culture and ripening time. *Meat Science*, 66, 675–687.
- Parolari, G., Virgili, R., & Schivazappa, C. (1994). Relationship between cathepsin B activity and compositional parameters in dry-cured hams of normal and defective texture. *Meat Science*, 38, 117–122.
- Pastorelli, G., Magni, S., Rossi, R., Pagliarini, E., Baldini, P., Dirinck, et al. (2003). Influence of dietary fat, on fatty acid composition and sensory properties of dry-cured Parma ham. *Meat Science*, 65, 571–580.
- Pérez-Juan, M., Flores, M., & Toldrá, F. (2006). Model studies on the efficacy of protein homogenates from raw pork muscle and dry-cured ham in binding selected flavor compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4802–4808.
- Persson, T., & Von Sydow, E. (1973). Aroma of canned beef: gas chromatographic and mass spectrometric analysis of the volatiles. *Journal of Food Science*, 33, 377–382.
- Purriños, L., Bermúdez, R., Franco, D., Carballo, J., & Lorenzo, J. M. (2011). Development of volatile compounds during the manufacture of dry-cured “Iacón” a Spanish traditional meat product. *Journal of Food Science*, 76, C89–C97.
- Purriños, L., Bermúdez, R., Temperán, S., Franco, D., Carballo, J., & Lorenzo, J. M. (2011). Influence of salt content and processing time on sensory characteristics of cooked “Iacón”. *Meat Science*, 87, 436–442.
- Rabe, S., Krings, U., & Berger, R. G. (2003). Initial dynamic flavor release from sodium chloride solutions. *European Food Research and Technology*, 218(1), 32–39.
- Ruiz, J., Muriel, E., & Ventanas, J. (2002). The flavour of Iberian ham. In F. Toldrá (Ed.), *Research advances in the quality of meat and meat products*. (pp. 289–310). Trivandrum, India: Research Signpost.
- Ruiz, J., Ventanas, J., Cava, R., Andrés, A., & García, C. (1999). Volatile compounds of dry-cured Iberian ham as affected by the length of the curing process. *Meat Science*, 52, 19–27.
- Ruusunen, M., & Puolanne, E. (2005). Reducing sodium intake from meat products. *Meat Science*, 70, 531–541.
- Sabio, E., Vidal-Aragón, M. C., Bernalte, M. J., & Gata, J. L. (1998). Volatile compounds present in six types of dry-cured ham from south European countries. *Food Chemistry*, 61, 493–503.
- Salles, C. (2006). Odour–taste interactions in flavour perception. In A. Voilley, & P. Etievant (Eds.), *Flavour in food* (pp. 345–368). Cambridge: Woodhead Publishing in Food Science, Technology and Nutrition.
- Sárraga, C., & García-Regueiro, J. A. (1998). Oxidation of microsomal fraction in the processing conditions of dry-cured ham. The in vitro effect of brine. *Meat Science*, 50, 295–302.
- Shahidi, F., & Pegg, R. B. (1994). Hexanal as an indicator of meat flavor deterioration. *Journal Food Lipids*, 1, 177–186.
- Soto, E., Hoz, L., Ordóñez, J. A., Hierro, E., Herranz, B., López-Bote, C., & Cambero, M. I. (2008). Impact to feeding and rearing systems of Iberian pig on volatile profile and sensory characteristics of dry-cured loin. *Meat Science*, 79, 666–676.
- Stahnke, L. H. (1994). Aroma components from dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosum*. *Meat Science*, 38, 39–53.
- Stahnke, L. H. (1995). Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosum* at different temperatures and with different ingredient levels. Part II. Volatile components. *Meat Science*, 41(2), 211–223.
- Taomina, P. J. (2010). Implications of salt and sodium reduction on microbial food safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50, 209–227.
- Tejeda, J. F., García, C., Petrón, M. J., Andrés, A. I., & Antequera, T. (2001). N-alkane content of intramuscular lipids of Iberian fresh ham from different feeding systems and crossbreeding. *Meat Science*, 57, 371–377.
- Ventanas, J., Córdoba, J. J., Antequera, T., García, C., López-bote, C., & Asensio, M. A. (1992). Hydrolysis and Maillard reactions during ripening of Iberian ham. *Journal of Food Science*, 57(4), 813–815.
- Ventanas, S., Estevez, M., Tejeda, J. F., & Ruiz, J. (2006). Protein and lipid oxidation in *longissimus dorsi* and dry cured loin from Iberian pig as affected by crossbreeding and diet. *Meat Science*, 72, 647–655.
- 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(5), 453–462.
- Vestegaard, C. S., Schivazappa, C., & Virgili, R. (2000). Lipolysis in dry-cured ham maturation. *Meat Science*, 55(1), 1–5.
- Viallon, C., Berdagué, J. L., Montel, M. C., Talon, R., Martin, J. F., Kondjoyan, N., & Denoyer, C. (1996). The effect of stage of ripening and packaging on volatile content and flavour of dry sausage. *Food Research International*, 29, 667–674.
- Virgili, R., Parolari, G., Schivazappa, C., Soresi Bordini, C., & Borri, M. (1995). Sensory and texture quality of dry cured ham as affected by endogenous cathepsin B activity and muscle composition. *Journal of Food Science*, 60, 1183–1186.
- WHO (World Health Organization) (2003). Technical report series no 916: Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. *Report of a joint WHO/FAO expert consultation*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Yu, A. N., Sun, B. G., Tian, D. T., & Qu, W. Y. (2008). Analysis of volatile compounds in traditional smoke-cured bacon (CSCB) with different fibre coatings using SPME. *Food Chemistry*, 110, 233–238.

PUBLICACIÓN VI.4:

“Study of the counts, species and characteristics of the yeast population during the manufacture of dry-cured “lacón”. Effect of salt level”

Laura Purriños, María C. García Fontán , Javier Carballo, José M. Lorenzo

Food Microbiology, 34 (2013) 12-18



Study of the counts, species and characteristics of the yeast population during the manufacture of dry-cured “lacón”. Effect of salt level

Laura Purriños^a, María C. García Fontán^a, Javier Carballo^b, José M. Lorenzo^{a,*}

^a Centro Tecnológico de la Carne de Galicia, Rúa Galicia N° 4, Parque Tecnológico de Galicia, San Cibrán das Viñas, 32900 Ourense, Spain

^b Área de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias de Ourense, Universidad de Vigo, 32004 Ourense, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 July 2012

Received in revised form

4 October 2012

Accepted 10 November 2012

Available online 27 November 2012

Keywords:

Dry-cured meat product

Salt level

Yeast species

Proteolysis

Lipolysis

ABSTRACT

The aim of this work was to study the yeast population during the manufacture of dry-cured “lacón” (a Spanish traditional meat product) and the effect of the salting time. For this study, six batches of “lacón” were manufactured with three different salting times (LS (3 days of salting), MS (4 days of salting) and HS (5 days of salting)). Yeast counts increased significantly ($P < 0.001$) during the whole process from 2.60 to 6.37 log cfu/g. An increased length of salting time did not affect yeast counts throughout the manufacture of dry-cured “lacón”, although the highest yeast counts were obtained from LS batches. A total of 226 isolates were obtained from dry-cured “lacón” during drying-ripening stage, of which 151 were yeasts and were identified at the species level using molecular techniques. The total of 151 identified yeasts belonged to 4 different genera: *Debaryomyces*, *Candida*, *Cryptococcus* and *Rhodotorula*. *Debaryomyces hansenii* was the most abundant species isolated throughout the whole process as much in the interior as in the exterior of the pieces of three salt levels of “lacón” studied, while *Candida zeylanoides* was only isolated from the interior of MS and HS batches and from the exterior of LS and HS groups, but at lesser proportion than *D. hansenii*.

© 2012 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Dry-cured “lacón” is a traditional cured meat product made in the north-west of Spain from the fore leg of the pig which is cut at the shoulder blade-humerus joint, following very similar manufacturing processes to those used in the production of dry-cured ham as described by Marra et al. (1999). In Galicia (NW Spain), this product has been awarded as Geographically Protected Identity (G.P.I.) (Official Journal of the European Communities, 2001).

During ripening stage of dry-cured meat products enzymatic and chemical reactions are involved in the development of flavour. The typical microflora of these meat products is made up of *Micrococcaceae*, lactic acid bacteria and moulds and yeasts, with the involvement of the *Micrococcaceae* being very important (Lorenzo et al., 2007). Studies on the Spanish raw ham evidenced that the profile of yeast population greatly changed during processing (Núñez et al., 1996). Proteolysis and lipolysis constitute the main biochemical reactions in the generation of flavour precursors, where the endogenous enzymes play the most important role

(Toldrá, 1998). However, recently, several studies revealed yeast contribution to sensory characteristics of dry-cured meat products thanks to their proteolytic and lipolytic activity (Martín et al., 2004; Rodríguez et al., 1998; Simoncini et al., 2007; Sørensen, 1997) and their role in volatile compound generation (Andrade et al., 2009a,b; Bolumar et al., 2006; Flores et al., 2004; Martín et al., 2006).

Yeasts are usually found in high numbers, up to 10^6 cfu/g, in dry-cured meat products (Cocolin et al., 2006; Encinas et al., 2000; Simoncini et al., 2007) even if they are not added as starter cultures in traditional methods of spontaneous curing. These high levels could suggest that this microbial group may play an important role in the maturation process. Yeast colonization on the exterior of dry-cured meat products could also play an important role against pathogenic microorganisms which may cause health problems to the consumer, such as *Staphylococcus aureus* (Metaxopoulos et al., 1996).

Salt has been used since ancient times for the preservation of meat products and is one of most commonly used ingredient in processed meats. In modern meat industry salt is used as a flavouring or flavour enhancer and is also responsible for the desired textural properties of processed meats. The consumption of meat and meat products contributes about 15–25% to the total daily intake of sodium chloride (WHO, 2003). The WHO recommends as little as 5 g of salt per day, which is equivalent to 2 g sodium per day

* Corresponding author. Tel.: +34 988 548 277; fax: +34 988 548 276.
E-mail address: jmlorenzo@ceteca.net (J.M. Lorenzo).

(WHO, 2003). However, sodium intake exceeds the nutritional recommendations in many industrialized countries. In the case on Spain, in 2008 the Spanish Food Safety and Nutrition Agency (AESAN) started a salt reduction plan with certain specific goals enabling intake to go down from the current value of 9.7 g/day to an intake lower than 8.0 g/day by 2014. Salt reduction is not so easy to achieve in dry-cured meat products because salt has a preservative and antimicrobial effect as a consequence of the capacity of sodium chloride to reduce water activity achieving microbiological stability and extension of shelf life in meat products (Durack et al., 2008; Hutton, 2002; Taomina, 2010). It also has effects on the solubility of the myofibrillar meat proteins myosin and actin allowing gel formation and development of an optimum texture in these products (Desmond, 2006).

The objective of this research was to study the levels, species and characteristics of the yeasts throughout the manufactured of dry-cured “lacón” and to study the influence of salt content on counts and species of yeast present. The characterization included the assessment of lipolytic and proteolytic properties in order to evaluate their suitability to be used as starter cultures in a productive process.

2. Materials and methods

2.1. Processing samples

In order to carry out this study, six batches of “lacón” were manufactured. Each batch consisted of seven different “lacón” pieces that in the green stage (fresh pieces) weighed around 4 kg. Raw pieces were salted with an excess of coarse salt. A heap was formed consisting of alternating layers of “lacón” pieces and layers of salt. In this way, the pieces were totally covered with salt. Two batches were salted during 3 days (LS), two batches during 4 days (MS) and the remaining two during 5 days (HS) in a salting room with a temperature between 2 and 5 °C and relative humidity between 80 and 90%. After the salting stage the pieces were taken from the heap, brushed, washed, and transferred to a post-salting room where they stayed for 14 days at 2–5 °C and around 85–90% relative humidity. After the post-salting stage the pieces were transferred to a room at 12 °C and 74–78% relative humidity where a drying-ripening process took place for 84 days. The air convection in the drying room was intermittent and the air velocity around the pieces when the fan was running ranged between 0.3 and 0.6 m/s. In each batch, samples were taken at 7 and 14 days of post-salting stage and at 7, 14, 28, 56 and 84 days of drying-ripening. Each sample consisted of one whole “lacón” piece.

2.2. Sampling points and yeast enumeration (yeast counting)

2.2.1. Interior point

Layers of approximately 2 mm thickness, were aseptically removed from different areas of the lean interior of piece, and collected together in a sterile bag. The samples were weighed and diluted 1:3 (w/w) with peptone physiological solution (PPS) composed of 8.5 g NaCl (Merck, Darmstadt, Germany), 1 g tryptone (Oxoid Ltd., Basingstokes, UK) and 1000 mL distilled water. They were homogenized using a masticator blender (IUL Instruments mod. Masticator, Barcelona, Spain) for 2 min at room temperature.

2.2.2. Exterior point

Layers of approximately 2 mm thickness, were aseptically removed from the more fatty exterior area of the piece, and collected together in a sterile bag. The samples were weighed and diluted 1:3 (w/w) with PPS, adding 1% (w/w) Tween 80 (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy) and homogenized using a masticator

blender (IUL Instruments mod. Masticator, Barcelona, Spain) for 2 min at room temperature.

For each sample and for the enumeration of yeasts, tenfold serial dilutions were performed, and aliquots (0.1 mL) of the appropriate dilutions were plated on OGYEA (Oxytetracycline Glucose Yeast Extract-Agar, Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) supplied with 20 ppm OGYE Selective Supplement (Merck, Darmstadt, Germany) to inhibit bacterial growth. Yeast counts were obtained after incubation at 25 °C for 4–5 days and plates with 30–300 colonies were counted. Results were expressed as log₁₀ cfu/g.

2.3. Yeast isolation

During drying-ripening stage in general 8 isolates (4 from the interior and 4 from the exterior area) were obtained from each “lacón” piece. Seventy five isolates from LS batches (47 from interior and 28 from exterior), 79 isolates from MS batches (38 from interior and 41 from exterior) and 72 isolates from HS batches (35 from interior and 37 from exterior) were obtained. Yeast colonies were randomly chosen from the plates counted, using a Harrison disk (Harrigan and McCance, 1976). A total of 226 isolates were obtained and purified by repeated cultures on MEA (Malt Extract Agar, Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) at 25 °C. Pure cultures were maintained at –80 °C in MEB (Malt Extract Broth, Oxoid Ltd., Basingstokes, UK) containing 20% glycerol (w/v) as cryoprotector agent.

2.4. Yeast identification: DNA extraction, amplification and sequencing

Yeasts were initially confirmed by staining with 1% methylene blue and later microscope observation. Isolates confirmed as yeasts were later identified at species level using molecular techniques. Yeast cells from the pure cultures of the all isolates were transferred to 1.5 mL microcentrifuge tubes using a 4 mm inoculation rod.

DNA extraction was conducted using an EZNA™ Yeast DNA Kit (Cat. No. D3370-01, OMEGA Bio-tek, Norcross, GA, USA) as directed by the manufacturer. Negative controls were processed in parallel to detect possible contaminations.

The fungus-specific universal primers ITS1 (5'-TCCGTAGGT-GAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') were used to amplify genes encoding the region (White et al., 1990). This primer pair was used to amplify the intervening 5.8S rRNA and the adjacent ITS1 and ITS2 regions. All PCRs were carried out with a thermocycler (MyCycler, Bio-Rad, Hercules, California, USA), and the PCR conditions were as follows: 50 µL reaction cocktail containing 25 µL of iQ™ Supermix (Cat. No. 170-8860, Bio-Rad, Hercules, California, USA), 0.8 µM of each primer, with the remaining volume consisting of distilled water and 5 µL of DNA template. The thermocycler program consisted of an initial denaturation at 94 °C for 4 min followed by 30 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 1 min; and a final extension step at 72 °C for 4 min. Negative controls (from DNA extraction) were included in all PCR experiments. Negative control reactions without any template DNA were carried out simultaneously.

Amplified products were purified using an Ultra Clean PCR Clean-Up Kit (Cat. No. 12500-50, Mobio latoratorie, Inc., Carlsbad, Canada) before being sequenced. Sequencing was run on an ABI 3730xl capillary sequencer (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Sequence comparisons were performed using the basic local alignment search tool (BLAST) in GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) after editing and trimming the sequences by BioEdit sequence alignment editor, version 7.0.0. The yeast isolates were identified based on a 99–100% similarity criterion.

2.5. Yeast characterization

Yeast characterization was performed by determining proteolytic and lipolytic activity. Proteolytic activity was evaluated streaking pure cultures of yeasts onto a culture medium composed of 40 g/L gelatine (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) and 24 g/L tryptone glucose extract agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK). Plates were incubated up to 21 days at 25 °C and gelatine liquefaction was assessed after flooding plates with 8–10 ml of a mercuric chloride solution composed of 15 g mercuric chloride (Sigma Inc., St. Louis, MO, USA), 20 ml HCl 37% (Scharlau, Barcelona, Spain) and 100 mL distilled water (Harrigan and McCance, 1976). Unhydrolysed gelatine formed a white opaque precipitate with the reagent, while hydrolysed gelatine appeared as a clear zone. Lipolytic activity was evaluated by measuring the clear halos in a culture medium composed of 5 g/L tributyrin (Sigma Inc., St. Louis, MO, USA), 5 g/L Tween 80 (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy) and 24 g/L Tryptone Glucose Extract agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK), after incubation at 25 °C for 7 days (Saldanha-da-Gama et al., 1997).

2.6. ClNa content

To determine salt content, the lacón piece was skinned and deboned and finally minced in a high-capacity mincer. The total chlorides were quantified according to the Carpentier–Vohlard official method (ISO, 1841-1:1996).

2.7. Statistical analysis

For the statistical analysis of the results, an analysis of variance (ANOVA) using the General Linear Model (GLM) procedure of the SPSS package (SPSS 19.0, Chicago, IL, USA) was performed for yeast count. The least squares mean were separated using Duncan's *t*-test. All statistical test of LSM were performed for a significance level ($P < 0.05$). When we studied the effect of salt level and ripening time on yeast count, fixed effect of ripening time and salt level was included in the model. The model used was:

$$Y_{ij} = \mu + S_i + A_j + \varepsilon_{ij}$$

where Y_{ij} is the observation of dependent variables, μ is the overall mean, S_i is the effect of ripening time, A_j is the effect of salt content, and ε_{ij} is the residual random error associated with the observation.

3. Results and discussion

3.1. Yeast population changes during processing

The evolution of yeast counts obtained from the exterior and interior throughout the manufacture of the batches of dry-cured “lacón” made with three different salt levels (LS, MS and HF) is

shown in Table 1. No significant differences ($P > 0.05$) were observed between sampling points during the manufacture process. At the end of process salt content observed was 14.31, 16.76 and 20.89% of dry matter for LS, MS and HS groups, respectively (Purriños et al., 2011a) (data not shown). Processing time influenced significantly ($P < 0.001$) on yeasts counts in the three salt levels studied in both sampling points (exterior and interior). The yeast counts obtained from the exterior and interior of the pieces increased progressively during post-salting and first week of drying-ripening stage and then remained unchanged up to the end of ageing (84 days) (Table 1). Our results observed after 7 days of post-salting (values ranged 2.31 and 2.93 log cfu/g) were lower than those found by Vilar et al. (2000) who showed values of 7.12 log cfu/g obtained from the exterior of “lacón” pieces. These differences on yeast counts could be related with brushing and washing procedures and an adaptation period in the environmental (temperature and relative moisture) and product conditions (sodium content, water activity and available nutrients). However, these results obtained after 7 days of post-salting are in agreement with those showed in other raw cured meat products made from whole pieces, such as ham (Huerta et al., 1988; Núñez et al., 1996) and Spanish beef “cecina” (García et al., 1995).

After 7 days of post-salting stage, yeast counts were higher in the batches manufactured with less salt content (2.93 vs. 2.87 and 2.50 for LS, MS and HS groups, respectively) for samples obtained from the exterior and (2.68 vs. 2.43 and 2.31 for LS, MS and HS batches, respectively) for samples obtained from the interior. This tendency has been observed in almost all sampling times of “lacón” process studied. Salt levels only affected significantly ($P < 0.01$) yeast counts obtained from the interior of the pieces at day 7 and 14 of dry-ripening stage (Table 1). This salting effect could be indicated that yeasts are slightly sensitive to salt levels.

During the drying-ripening stage yeast counts remained constant until the end of the process (84 days of drying-ripening) obtained mean values of 6.37 log cfu/g that are in agreement with those reported previously by other authors in dry-cured meat products (García et al., 1995; Silla et al., 1989). These counts observed at the end of process were higher than those showed by Vilar et al. (2000) who found final values of 4.22 log cfu/g. In agreement, Núñez et al. (1996) reported similar values (around 6.2 log cfu/g) in Iberian ham samples; Simoncini et al. (2007) also observed very close counts (6.52 log cfu/g) in Italian dry-cured ham. The high numbers of yeast observed during the latest stages of the drying-ripening periods suggest that the yeasts can play an important role in the manufacture of dry-cured “lacón” and could contribute to sensory characteristics of final product due to their proteolytic and lipolytic activities (Rodríguez et al., 1998; Simoncini et al., 2007; Sørensen, 1997) and their role in volatile compounds generation (Andrade et al., 2009a, 2009b; Bolumar et al., 2006; Flores et al., 2004). In fact, some studies carried out with different yeast strains have shown that they contribute to the development

Table 1

Evolution of yeast counts (log cfu/g) obtained from the surface and interior of pieces during the manufacture of dry-cured “lacón”. Effect of salt levels.

Sampling point	Salt content	Post-salting (days)		Dry-ripening (days)					Significance			SEM
		7	14	7	14	28	56	84	Time	Salt level	T*S	
Surface	LS	2.93 ± 0.27 ^a	4.08 ± 0.67 ^b	5.03 ± 0.20 ^c	6.86 ± 0.53 ^d	6.42 ± 0.16 ^d	6.43 ± 0.04 ^d	6.59 ± 0.50 ^d	***	n.s.	*	0.32
	MS	2.87 ± 0.28 ^a	3.85 ± 0.53 ^b	5.12 ± 0.20 ^c	6.70 ± 0.24 ^d	6.33 ± 0.05 ^d	6.48 ± 0.20 ^d	6.32 ± 0.35 ^d	***	n.s.	*	0.31
	HS	2.50 ± 0.11 ^a	3.47 ± 0.37 ^b	5.35 ± 0.11 ^c	5.98 ± 0.26 ^d	6.92 ± 0.48 ^e	6.51 ± 0.18 ^{de}	6.06 ± 0.30 ^d	***	n.s.	*	0.34
Interior	LS	2.68 ± 0.30 ^a	3.92 ± 0.25 ^b	6.82 ± 0.34 ^{by}	6.29 ± 0.06 ^{bx}	6.36 ± 0.25 ^{bc}	6.46 ± 0.05 ^{bc}	6.57 ± 0.24 ^c	***	**	**	0.33
	MS	2.43 ± 0.23 ^a	3.68 ± 0.49 ^b	6.37 ± 0.39 ^{cy}	6.88 ± 0.20 ^{cy}	6.58 ± 0.33 ^c	6.48 ± 0.20 ^c	6.46 ± 0.16 ^c	***	**	**	0.36
	HS	2.31 ± 0.26 ^a	3.47 ± 0.36 ^b	5.60 ± 0.38 ^{cx}	6.24 ± 0.07 ^{dx}	6.61 ± 0.20 ^d	6.41 ± 0.05 ^d	6.26 ± 0.10 ^d	***	**	**	0.35

^{a–d} Different letters in the same row show significant differences ($P < 0.05$, Duncan test).

^{x–y} Different letters in the same column show significant differences ($P < 0.05$, Duncan test).

Table 2

Distribution of the species of yeasts throughout the manufacture of dry-cured “lacón” obtained from LS salt level.

Species		Dry-ripening (days)					Total	
		7	14	28	56	84		
		N° isolates	N° isolates	N° isolates	N° isolates	N° isolates	N° isolates	%
Interior	<i>Debaryomyces hansenii</i>	6	4	6		4	20	42.5
	<i>Cryptococcus curvatus</i>		3				3	6.4
	<i>Candida deformans</i>		1				1	2.2
	Strains lost	3	5	3	6	3	20	42.5
	Bacterias	1			1	1	3	6.4
	Total of isolates	10	13	9	7	8	47	100
Exterior	<i>D. hansenii</i>		4	5	2	5	16	57.1
	<i>C. curvatus</i>		1				1	3.6
	<i>C. deformans</i>		2				2	7.1
	<i>Candida zeylanoides</i>		1	1	1		3	10.7
	Strains lost		1	1	2	1	5	17.9
	Bacterias		1				1	3.6
	Total of isolates		10	7	5	6	28	100

of the characteristic flavour of dry-cured meat products (Andrade et al., 2009a,b; Martín et al., 2006).

3.2. Identification and characterization of the isolates

A total of 226 isolates were obtained from dry-cured “lacón” during drying-ripening stage, of which 151 were yeasts and were identified at the species level using molecular techniques. Traditionally, yeasts have been characterized by morphological and physiological traits (Barnett et al., 2000; Núñez et al., 1996). These methods are laborious and time-consuming, and are, therefore, not suitable for routine analysis on quality control systems. The introduction of molecular methods provided new approaches to industrial yeast differentiation (Andrade et al., 2009a; Querol and Ramón, 1996; Loureiro and Querol, 1999). In fact, molecular techniques have proved to be reliable methods for identifying yeasts detected in food products (Baleiras Couto et al., 1996; Cappa and Coconcelli, 2001; Kurtzman and Robnett, 1998; Lieckfeld et al., 1993; Lopandic et al., 2006; Oguntoyinbo, 2008; Torriani et al., 1999) and may be used for the routine analysis of yeast strains that grow in dry-cured meat products.

In our study, 64 of the 226 strains isolated were lost during the phase of obtaining pure cultures and 11 were classified as bacteria. The 151 identified yeasts belonged to 4 different genera: *Debaryomyces*, *Candida*, *Cryptococcus* and *Rhodotorula* (Tables 2–4).

The distribution of yeast strains among the species isolated from three salt levels (LS, MS and HS) of dry-cured “lacón” obtained from the exterior and interior of the pieces is shown in Tables 2–4, respectively. Seventy nine yeasts were isolated from the interior and 72 from the exterior of the pieces of “lacón”. The most frequently isolated species obtained from the interior and exterior of “lacón” samples and from the three different salt contents (LS, HM and MS) was *Debaryomyces hansenii*, which represented about 48 and 56% of the total isolated strains from the interior and exterior of pieces, respectively. *D. hansenii* dominated the yeast population during dry-ripening stage (51.8% of yeasts isolated) followed by *Candida zeylanoides* (5.3%), while *Candida deformans* (3.5%), *Cryptococcus curvatus* (2.6%), *Candida* spp. (1.8%), *Rhodotorula glutinis* (0.9%) and *Rhodotorula mucilaginosa* (0.9%) were less often isolated. These results are in agreement with those previously reported in Italian and Spanish dry-cured meat products (Andrade et al., 2009a,b; Coccolin et al., 2006; Comi and Cantoni, 1983; Encinas et al., 2000; Gardini et al., 2001; Huerta et al., 1988; Núñez et al., 1996; Simoncini et al., 2007), since *D. hansenii* was the predominant isolated species. *D. hansenii* is a species known for its ability to grow at extremely high salt concentrations and low water activity (Fleet, 1992; Viljoen and Greyling, 1995), and so its isolation from products with high salt contents is expected as it happens in our study.

Table 3

Distribution of the species of yeasts throughout the manufacture of dry-cured “lacón” obtained from MS salt level.

Species		Dry-ripening (days)					Total	
		7	14	28	56	84		
		N° isolates	N° isolates	N° isolates	N° isolates	N° isolates	N° isolates	%
Interior	<i>Debaryomyces hansenii</i>	4	3	4	4	4	19	50.0
	<i>Cryptococcus curvatus</i>		1	1			2	5.3
	<i>Candida</i> spp.		1				1	2.6
	<i>Candida zeylanoides</i>		1		1	2	4	10.5
	<i>Rhodotorula glutinis</i>					1	1	2.6
	Strains lost	1	2	2	1	2	8	21.1
	Bacterias		2		1		3	7.90
	Total of isolates	5	10	7	7	9	38	
Exterior	<i>D. hansenii</i>		7	7	6	6	26	63.4
	<i>Candida</i> spp.		2				2	4.9
	<i>R. glutinis</i>		1				1	2.4
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>			1			1	2.4
	Strains lost	4	1		2	3	10	24.5
	Bacterias				1		1	2.4
	Total of isolates	4	11	8	9	9	41	100

Table 4

Distribution of the species of yeasts throughout the manufacture of dry-cured “lacón” obtained from HS salt level.

Species		Dry-ripening (days)					Total	
		7	14	28	56	84	N° isolates	%
		N° isolates	N° isolates	N° isolates	N° isolates	N° isolates		
Interior	<i>Debaryomyces hansenii</i>	5	2	5	2	4	18	51.4
	<i>Candida deformans</i>		4				4	11.4
	<i>Candida</i> spp.		1				1	2.9
	<i>Candida zeylanoides</i>		1		2	1	4	11.4
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>					1	1	2.9
	Strains lost	1		2	3		6	17.1
	Bacterias				1		1	2.9
	Total of isolates	6	8	7	8	6	35	100
Exterior	<i>D. hansenii</i>		2	6	7	3	18	48.7
	<i>C. deformans</i>				1		1	2.7
	<i>C. zeylanoides</i>			1			1	2.7
	Strains lost	2	5		2	6	15	40.5
	Bacterias		2				2	5.4
	Total of isolates	2	9	7	10	9	37	100

The low temperatures were reported like an ideal condition for the growth of *C. zeylanoides*, while temperature of 10 °C and above has been reported as optimal for a strong growth and lipolytic activity of *D. hansenii* (Van den Tempel and Jakobsen, 2000). This statement supports our finding since *D. hansenii* was the predominant isolated species during the dry-ripening stage where the temperature reaches values of 12 °C. These results are in agreement with those previously reported by other authors (Cocolin et al., 2006; Encinas et al., 2000; Núñez et al., 1996) who found a higher adaptation of *D. hansenii* than *C. zeylanoides* during the ageing process of dry-cured meat products. Consequently, *D. hansenii* characterized by its tolerance to salt and nitrate, and high oxygen demands could be proposed for use as starter cultures and enhance flavour development of dry-cured “lacón”. At the end of drying process, 100, 77 and 78% of isolated yeast obtained from LS, MS and HS batches, respectively were identified as *D. hansenii* (Tables 2–4).

The profile of yeast populations scarcely changed during drying-ripening phase as shown in Tables 2–4. There was a low diversity of species in the yeasts population growing on “lacón” throughout the ripening stage and these results are in agreement with those observed by other authors for dry-cured Iberian ham (Andrade et al., 2009a). However, Simoncini et al. (2007) observed that the profile of yeast population greatly changed during processing of Italian dry-cured ham.

The second most abundant isolated yeast was *C. zeylanoides*, which represented about 6.6 and 3.8% of the total isolated strains from the interior and exterior of pieces, respectively. *C. zeylanoides* was only isolated from the interior of MS and HS batches and from the exterior of LS and HS groups, but at lesser proportion than

D. hansenii. *C. zeylanoides* was mainly isolated at the first days of dry-ripening process which is in agreement with that reported by other authors (Cocolin et al., 2006; Núñez et al., 1996; Simoncini et al., 2007) who observed that *C. zeylanoides* was isolated during the first stages of curing process and then it disappeared. This fact could be related with increase of salt content during the last stages of manufacture process. At the end of process salt content observed was 14.31, 16.76 and 20.89% of dry matter for LS, MS and HS groups, respectively (Purriños et al., 2011a) (data not shown).

Table 5 reports the extracellular lipolytic and proteolytic properties of the identified yeast strains. A great number of strains (47.7%) showed lipolytic activity on tributyrin, while few strains of yeasts isolated (19.2%) showed proteolytic activity. These properties are important for the sensory qualities of dry-cured meat products (Andrade et al., 2009a; Bolumar et al., 2006; Martín et al., 2006). Sixty four of strains identified as *D. hansenii* showed lipolytic activity (around 54.7%) and 5 of them also exhibited proteolytic activity (around 4.2%). Some studies have reported that strains of *D. hansenii* isolated from dry-cured ham showed intense proteolytic activity against myofibrillar proteins when they were inoculated on raw pork (Rodríguez et al., 1998) and increased proteolysis and lipolysis activities of dry-cured meat products (Patrignani et al., 2007).

The lipolytic activity was strain-related and not influenced by sampling location (interior or exterior) which is in agreement with data reported by other author (Saldanha-da-Gama et al., 1997; Simoncini et al., 2007). The extracellular lipolytic activity may contribute to flavour development during the curing process by means of the relapses of aroma precursors such as long chain free fatty acids (Purriños et al., 2011a,b). In the same line, Huerta et al.

Table 5

Number of isolates for each species of yeast isolated from surface and interior of pieces during manufacture of dry-cured “lacón” and activities on tributyrin and gelatine.

	Interior sample total (%)	Exterior sample total (%)	Lipolysis ^a total (%)		Proteolysis ^a total (%)	
			Interior	Exterior	Interior	Exterior
<i>Debaryomyces hansenii</i>	57 (65.8)	60 (83.3)	44 (55.6)	20 (27.7)	8 (10.1)	8 (11.1)
<i>Candida zeylanoides</i>	8 (10.1)	4 (5.5)	6 (7.6)			1 (1.4)
<i>Candida deformans</i>	5 (6.3)	3 (4.2)		1 (1.4)	5 (6.3)	3 (4.2)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	5 (6.3)	1 (1.4)	1 (1.2)			
<i>Candida</i> spp.	2 (2.5)	2 (2.8)			2 (2.5)	2 (2.8)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1 (1.3)	1 (1.4)				
<i>Rhodotorula glutinis</i>	1 (1.3)	1 (1.4)				
Total	79 (100)	72 (100)	51 (64.5)	21 (29.2)	15 (18.9)	14 (19.4)

^a Number of strains giving positive results.

(1988) also found lipolytic activity for most yeast isolated from cured hams. Gardini et al. (2001) and Saldanha-da-Gama et al. (1997) observed that oleic and palmitic acids were the predominant fatty acid produced by *D. hansenii* and its anamorphic form *C. famata* isolated from southern Italy traditional sausages and from Portuguese dry-cured ham, respectively.

Moreover, the interest in yeast also takes into account their possible contribution to product flavour compound from precursors arising from lipolysis and proteolysis reactions. Dry-cured meat products are a source of peptides, free amino acids and free fatty acids released by endogenous and exogenous proteolytic and lipolytic enzymes (Motilva et al., 1993; Virgili et al., 1999). Yeast catabolic activities against free amino acids and fatty acids to generate volatile compounds during dry-cured meat products (Andrade et al., 2009a,b; Martín et al., 2006) may be an additional requirement to select yeasts for dry-cured “lacón” colonization and flavour improvement.

4. Conclusions

From the results obtained we can conclude that an increased length of salting time did not affect yeast counts or species throughout the manufacture of dry-cured “lacón”, although the highest yeast counts were obtained from LS batches. Although several factors may influence the flora of dry-cured meat products, the presence of yeast at levels between 3 and 6 logarithmic units/g throughout manufacturing of dry-cured “lacón” seems to be constant and suggests the participation of this group of microorganisms, and particularly *D. hansenii*, the dominant isolated yeast, in the process. Among these yeasts, 5 strains of *D. hansenii* showed proteolytic and lipolytic activities, which could be suitable for use as starter cultures to promote sensory characteristics of dry-cured “lacón”.

Acknowledgements

This work was part of the research Project O7TAL003CT granted by the Xunta de Galicia (The Regional Government).

References

- Andrade, M.J., Rodríguez, M., Casado, E.M., Bermúdez, E., Córdoba, J.J., 2009a. Differentiation of yeasts growing on dry-cured Iberian ham by mitochondrial DNA restriction analysis, RAPD-PCR and their volatile compounds production. *Food Microbiol.* 26, 578–586.
- Andrade, M.J., Córdoba, J.J., Sánchez, B., Casado, E., Rodríguez, M., 2009b. Evaluation and selection of yeasts isolated from dry-cured Iberian ham by their volatile compounds production. *Food Chem.* 113, 457–463.
- Baleiras Couto, M.M., Eijssma, B., Hofstra, H., Huis in't Veld, J.H.H., Van der Vossen, J.M.B.M., 1996. Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *App. Environ. Microbiol.* 62, 41–46.
- Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D., 2000. *Yeasts: Characteristics and Identification*, third ed. Cambridge University Press, Cambridge, London.
- Bolumar, T., Sanz, Y., Flores, M., Aristoy, M.C., Toldrá, F., Flores, J., 2006. Sensory improvement of dry-fermented sausages by the addition of cell-free extracts from *Debaryomyces hansenii* and *Lactobacillus sakei*. *Meat Sci.* 72, 457–466.
- Cappa, F., Cocconcelli, P.S., 2001. Identification of fungi from dairy products by means of 18S rRNA analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 19, 157–160.
- Cocolin, L., Urso, R., Rantsiou, K., Cantoni, C., Comi, G., 2006. Dynamics and characterization of yeasts during natural fermentation of Italian sausages. *FEMS Yeast Res.* 6, 692–701.
- Comi, G., Cantoni, C., 1983. Presenza di lieviti nei prosciutti drudi stagionati. *Ind. Aliment.* 22, 102–104.
- Desmond, E., 2006. Reducing salt: a challenge for the meat industry. *Meat Sci.* 74, 188–196.
- Durack, E., González, M.A., Wilkinson, M.G., 2008. Salt: a review of its role in food science and public health. *Curr. Nutr. Food Sci.* 4, 290–297.
- Encinas, J.P., López-Díaz, T.M., García-López, M.L., Otero, A., Moreno, B., 2000. Yeast population on Spanish fermented sausages. *Meat Sci.* 54, 203–208.
- Fleet, G.H., 1992. Spoilage yeasts. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 12, 1–44.
- Flores, M., Dura, M.A., Marco, A., Toldrá, F., 2004. Effect of *Debaryomyces* spp. on aroma formation and sensory quality of dry-fermented sausages. *Meat Sci.* 68, 439–446.
- García, I., Zumalacárregui, J.M., Díez, V., 1995. Microbial sucesión and identification of *Micrococcaceae* in dried beef cecina, an intermediate moisture meat product. *Food Microbiol.* 12, 309–315.
- Gardini, F., Suzzi, G., Lombardi, A., Galgano, F., Crudele, M.A., Andrighetto, C., Schirone, M., Tofalo, R., 2001. A survey of yeasts in traditional sausages of southern Italy. *FEMS Yeast Res.* 1, 161–167.
- Harrigan, W.F., McCance, M.E., 1976. *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology*. Academic Press Inc., London, UK.
- Huerta, T., Hernández, J., Guamis, B., Hernández, E., 1988. Microbiological and physico-chemical aspects in dry salted Spanish ham. *Zeit. für Mikrobiol.* 143, 475–482.
- Hutton, T., 2002. Technological functions of salt in the manufacturing of food and drink products. *Br. Food J.* 104, 126–152.
- ISO (International Organization for Standardization), 1996. Determination of chloride content—Part 1: Volhard method, ISO 1841-1:1996 standard. In: *International Standards Meat and Meat Products*. International Organization for Standardization, Genève, Switzerland.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit 26S ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 331–371.
- Lieckfeld, E., Meyer, W., Borner, T., 1993. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *J. Basic Microbiol.* 33, 413–425.
- Lopandic, K., Zelger, S., Banský, L.K., Eliskases-Lechner, F., Prillinger, H., 2006. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiol.* 23, 341–350.
- Lorenzo, J.M., García Fontán, M.C., Franco, I., Carballo, J., 2007. Microbiology of dry-cured lacón. *Fleischwirtsch. Int.* 22, 88–92.
- Loureiro, V., Querol, A., 1999. The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. *Trends Food Sci. Technol.* 10, 356–365.
- Marra, A.I., Salgado, A., Prieto, B., Carballo, J., 1999. Biochemical characteristics of dry-cured “lacón”. *Food Chem.* 67, 33–37.
- Martín, A., Córdoba, J.J., Aranda, E., Córdoba, M.G., Asensio, M.A., 2006. Contribution of a selected fungal population to the volatile compounds on dry-cured ham. *Int. J. Food Microbiol.* 110, 8–18.
- Martín, M., Córdoba, J.J., Núñez, F., Benito, M.J., Asensio, M.A., 2004. Contribution of a selected fungal population to proteolysis on dry-cured ham. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 55–66.
- Metaxopoulos, J., Stavropoulos, S., Kakouri, A., Samelis, J., 1996. Yeasts isolated from traditional Greek dry salami. *Ital. J. Food Sci.* 1, 25–32.
- Motilva, M.J., Toldrá, F., Nieto, P., Flores, J., 1993. Muscle lipolysis phenomena in the processing of dry-cured ham. *Food Chem.* 48, 121–125.
- Núñez, F., Rodríguez, M.M., Córdoba, J.J., Bermúdez, M.E., Asensio, M.A., 1996. Yeast population during ripening of dry-cured Iberian ham. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 271–280.
- Official Journal of the European Communities, 2001. Commission Regulation (EC) No 898/2001, of 7 May 2001. L 126, Vol. 44, 8 May 2001, p. 18.
- Oguntoyinbo, F.A., 2008. Evaluation of diversity of *Candida* species isolated from fermented cassava during traditional small scale *gari* production in Nigeria. *Food Control* 19, 465–469.
- Patrignani, F., Lucci, L., Vallicelli, M., Guerinzi, M.E., Gardini, F., Lanciotti, R., 2007. Role of surface-inoculated *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* strains in dried fermented sausage manufacture. Part 1: Evaluation of their effects on microbial evolution, lipolytic and proteolytic patterns. *Meat Sci.* 75, 676–686.
- Purriños, L., Bermúdez, R., Tempeán, S., Franco, D., Carballo, J., Lorenzo, J.M., 2011a. Influence of salt content and processing time on sensory characteristics of cooked “lacón”. *Meat Sci.* 87, 436–442.
- Purriños, L., Bermúdez, R., Franco, D., Carballo, J., Lorenzo, J.M., 2011b. Development of volatile compounds during the manufacture of dry-cured “lacón” a Spanish traditional meat product. *J. Food Sci.* 76, C89–C97.
- Querol, A., Ramón, D., 1996. The application of molecular techniques in wine microbiology. *Trends Food Sci. Technol.* 7, 73–78.
- Rodríguez, M., Núñez, F., Córdoba, J.J., Bermúdez, M.E., Asensio, M.A., 1998. Evaluation of proteolytic activity of microorganisms isolated from dry cured ham. *J. Appl. Microbiol.* 85, 905–912.
- Saldanha-da-Gama, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 1997. Characterization of yeasts associated with Portuguese pork-based products. *Int. J. Food Microbiol.* 37, 201–207.
- Silla, H., Molina, I., Flores, J., Silvestre, D., 1989. A study of the microbial flora of dry-cured ham. I. Isolation and growth. *Fleischwirtsch.* 69, 1128–1131.
- Simoncini, N., Rotelli, D., Virgili, R., Quintavalla, S., 2007. Dynamics and characterization of yeasts during ripening of typical Italian dry-cured ham. *Food Microbiol.* 24, 577–584.
- Sørensen, B.B., 1997. Lipolysis of pork fat by the meat starter culture *Debaryomyces hansenii* at various environmental conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 34, 187–193.
- Taomina, P.J., 2010. Implications of salt and sodium reduction on microbial food safety. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 50, 209–227.
- Toldrá, F., 1998. Proteolysis and lipolysis in flavour development of dry-cured meat products. *Meat Sci.* 49, S101–S110.
- Torriani, S., Zapparoli, G., Suzzi, G., 1999. Genetic and phenotypic diversity of *Saccharomyces sensu stricto* strains isolated from Amarone wine. *Antonie van Leeuwenhoek* 5, 207–215.

- Van den Tempel, T., Jakobsen, M., 2000. The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. *Int. Dairy J.* 10, 263–270.
- Vilar, I., García-Fontán, M.C., Prieto, B., Tornadijo, M.E., Carballo, J., 2000. A survey on the microbial changes during the manufacture of dry-cured lacón, a Spanish traditional meat product. *J. Appl. Microbiol.* 89, 1018–1026.
- Viljoen, B.C., Greyling, T., 1995. Yeasts associated with Cheddar and Gouda making. *Int. J. Food Microbiol.* 28, 79–88.
- Virgili, R., Parolari, G., Soresi-Bordini, C., Schivazappa, C., Cornet, M., Monin, G., 1999. Free amino acids and dipeptides in dry-cured ham. *J. Muscle Foods* 10, 119–130.
- WHO (World Health Organization), 2003. Technical report series n° 916: Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, New York, NY, USA, pp. 315–332.

PUBLICACIÓN VI.5:

*“The influence of Debaryomyces hansenii, Candida deformans and Candida zeylanoides
on the aroma formation of dry-cured “lacón””*

Laura Purriños, Javier Carballo, José M. Lorenzo

Meat Science, 93 (2013) 344-350



The Influence of *Debaryomyces hansenii*, *Candida deformans* and *Candida zeylanoides* on the aroma formation of dry-cured “lacón”

Laura Purriños ^a, Javier Carballo ^b, José M. Lorenzo ^{a,*}

^a Centro Tecnológico de la Carne de Galicia, Rúa Galicia No 4, Parque Tecnológico de Galicia, San Cibrán das Viñas, 32900 Ourense, Spain

^b Área de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias de Ourense, Universidad de Vigo, 32004 Ourense, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 April 2012

Received in revised form 26 July 2012

Accepted 27 September 2012

Keywords:

Yeast strain

Debaryomyces hansenii

GC/MS

Purge-and-trap

ABSTRACT

The volatile profile of dry-cured “lacón” that has been inoculated with three different yeasts were determined and compared with a non-inoculated dry-cured “lacón”. Yeasts (*Debaryomyces hansenii*, *Candida deformans* and *Candida zeylanoides*) that were used as starter cultures in the present study were selected among yeasts that were isolated from native dry-cured “lacón” at different stages of ripening process. These starters were spread on dry-cured “lacón” surface in order to test their capacity to contribute on the generation of volatile compounds. A total of forty two volatile compounds were detected by dynamic headspace sampling followed by gas chromatography–mass spectrometry analysis. Significant differences ($P < 0.001$) on the volatile profiles of different batches were found in comparison with non-inoculated samples, showing the highest total area values for the inoculated ones. Esters were the most abundant chemical family in all batches studied except for *C. zeylanoides* batch, which showed greater amount of hydrocarbons than esters. The second more abundant family was hydrocarbons for control and *C. deformans* batches (147.6 and 445.24×10^6 area units, respectively), alcohols for *D. hansenii* (363.77×10^6 area units) and esters for *C. zeylanoides* (248.33×10^6 area units). However, the aldehyde compound group in control batch samples was found to be significantly higher than in the inoculated ones ($P < 0.001$). Among inoculated batches, *D. hansenii* batch showed the lowest hexanal content (14.42×10^6 area units) in comparison with non-inoculated batch (105.99×10^6 area units). Among all batches studied, *D. hansenii* batch presented the highest area values for esters, alcohols, linear hydrocarbons, ketones, acids and furans; control batch for aldehydes and *C. zeylanoides* batch for branched hydrocarbons. Therefore, the study showed that every yeast strain produced a specific volatile profile which was also different from that of the control dry-cured “lacón”.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Dry-cured “lacón” is a traditional dry-cured meat product made in the north-west of Spain from the pig foreleg that is cut at the shoulder blade–humerus joint, following very similar manufacturing processes to those used in the production of dry-cured ham as described by Marra, Salgado, Prieto, and Carballo (1999). In Galicia, this product has been awarded a Geographically Protected Identity (Official Journal of the European Communities, 2001).

Dry-cured meat products are appreciated because of their unique flavor. It is important to know the factors influencing meat flavor in order to produce quality meat products due to the relationship between flavor and consumer acceptability. The aroma is perhaps the most important quality parameter of dry-cured meat products, and it is markedly affected by raw material, processing techniques and aging time (Sánchez-Peña, Luna, García-González, & Aparicio-Ruiz, 2005). Its perception depends on the concentration and odor threshold of volatile

compounds and on their interactions with other food components that will affect its gas phase concentration (Guichard, 2002). The compounds that are implicated in flavor generation arise from many sources, such as spices, sugar metabolism, lipolysis and lipid oxidation, proteolysis and amino acid degradation (Toldrá, Sanz, & Flores, 2001). The main enzymatic reactions related to formation of flavor precursors are proteolysis and lipolysis. Both reactions take place by the contribution of endogenous proteases and lipases, enzymes that are either naturally originated by microbes or added during the manufacturing process. The role of microorganisms in the generation of volatile compounds is well documented for dry-fermented sausages (Bruna et al., 2001; Zapelena, Astiasarán, & Bello, 1999). In the case of dry-cured ham the role of microorganisms is considered to be less important because the microbial population inside the ham is relatively low (Silla, Molina, Flores, & Silvestre, 1989).

Yeasts are one of the predominant microbial groups during the ripening period of dry-cured meat products (Cocolin, Urso, Rantsiou, Cantoni, & Comi, 2006; Núñez, Rodríguez, Córdoba, Bermúdez, & Asensio, 1996). Several studies carried out with different yeast strains have shown that they contribute to the development of the characteristic flavor of these

* Corresponding author. Tel.: +34 988 548 277; fax: +34 988 548 276.
E-mail address: jmlorenzo@ceteca.net (J.M. Lorenzo).

products (Andrade, Córdoba, Casado, Córdoba, & Rodríguez, 2010; Martín, Córdoba, Benito, Aranda, & Asensio, 2003; Patrignani et al., 2007). Moreover, some authors (Andrade, Córdoba, Sánchez, Casado, & Rodríguez, 2009; Regodon, Perez, & Ramirez, 2006) have reported differences in flavor development related to the particular yeast species and the particular strain on the species. Among yeasts, *Debaryomyces* spp. have showed to have a positive impact on the volatile compounds that are involved in flavor development of dry cured meat products (Martín, Córdoba, Aranda, Córdoba, & Asensio, 2006). In the same line, Flores, Dura, Marco, and Toldrá (2004) observed that an appropriate inoculum level of *Debaryomyces* spp. influenced volatile production by inhibiting lipid oxidation due to its antioxidative effect and by promoting the generation of ethyl esters. This information about the effect of yeasts on volatile compounds formation is increasing the interest in developing and using yeast starter in dry cured meat products (Andrade, Rodríguez, Sánchez, Aranda, & Córdoba, 2006; Bolumar et al., 2006) to improve some of their sensorial characteristics. The evaluation of yeast strains ability to produce volatile compounds can be done using a meat model system (Martín et al., 2003) or directly on dry-cured meat products (Andrade et al., 2010; Martín et al., 2006; Patrignani et al., 2007).

Given that it is not possible to keep dry-cured “lacón” as sterile control without interfering with manufacturing process, the contribution of the tested strains on the volatile compounds has to be tested against “lacón” with a wild microbial population. Thus, the aim of this study was to evaluate the contribution of selected strains in the production of dry-cured “lacón” volatile compounds.

2. Material and methods

2.1. Samples

2.1.1. Yeast strains

Yeast strains tested in this study were obtained from the indigenous flora of dry cured “lacón” at different ripening stages. Each sample was homogenized in masticator IUL (IUL Instruments, Barcelona, Spain) using 0.1% w/v peptone water as diluent. Further decimal dilutions were prepared by mixing 1 mL of the previous dilution with 9 mL of the same diluent and 0.1 mL portions were spread onto the surface of OGYEA (OGYE agar, Base, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) agar plates. They were incubated at 25 °C for 5 days. All the yeasts were purified on repeat cultivation on MEB (malt extract broth, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and maintained at –80 °C in MEB containing 30% v/v glycerol until analysis. Identification of these strains has been described by molecular techniques in a pending work yet to be published. Three different yeast strains (*Debaryomyces hansenii* (DH), *Candida deformans* (CD) and *zeylanoides zeylanoides* (CZ)) were chosen to be inoculated in the present study.

2.1.2. Preparation of yeast inocula

The cultures were successively subcultured on MEA (malt extract agar, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The cell concentration was calculated by comparison with the absorbance at 625 nm in a spectrophotometer 8453 (Agilent Technologies Spain, S.L., Madrid, Spain). The cells were obtained by centrifugation (4500 rpm for 20 min at 4 °C), washed with sterile distilled water and centrifuged again. The pellet cells were concentrated in 15 ml of sterile distilled water and inoculated by spraying on the surface of the dry cured “lacón”. The starters were inoculated at 10^6 CFU/cm².

2.1.3. Preparation of dry-cured “lacón”

In order to carry out this study, four batches of “lacón” were manufactured. Each batch consisted of eight “lacón” pieces weighing around 4 kg in the green stage (fresh pieces). Raw pieces were salted using an excess of coarse salt. A heap was formed consisting of alternating layers of “lacón” pieces and layers of salt. Pieces were totally covered in salt following this structure, remaining this way for four days

(a day per kg) in salting room (temperature between 2 and 5 °C; relative humidity between 80 and 90%). After the salting stage the pieces were taken from the heap, brushed and washed. Then, all pieces were divided into four batches, three of them were inoculated with the different yeast strains and the remaining one was used as control batch (without starter culture). Then, batches were transferred to a post-salting room and kept for 14 days at 2–5 °C and around 85–90% relative humidity. After the post-salting stage the pieces were transferred to a room at 12 °C and 74–78% relative humidity where a drying–ripening process took place for 84 days. The air convection in the drying room was intermittent and the air velocity around the pieces when the fan was running ranged between 0.3 and 0.6 m/s. Each sample consisted of one whole “lacón” piece. Samples were transported to the laboratory under refrigerated conditions (<4 °C) and analyzed at this point. Once in the laboratory, the entire pieces were skinned, deboned, and *Triceps brachii* muscle was extracted and finally minced in a high-capacity mincer. The samples were stored in air-tight bottles, frozen at –80 °C in dark, for no longer than 4 weeks until analysis.

2.2. Analytical methods

2.2.1. Analysis of volatile compounds

Samples were ground in a domestic blender, and a 10 g sample was put into a dynamic headspace vial. The volatile compounds were extracted and concentrated in a purge and trap concentrator that was coupled with a cryofocusing module (Teledyne Tekmar, Mason, OH, USA).

2.2.1.1. Dynamic headspace volatile concentration. Samples were transferred into headspace vials and concentrated in a purge-and-trap concentrator (Stratum, Teledyne Tekmar, Mason, OH, USA) that was equipped with a cryofocusing module in connection with an autosampler (Solatex 72 Multimatrix Vial Autosampler, Teledyne Tekmar, Mason, OH, USA). They were kept at 60 °C for 5 min and then flushed with helium at a flow rate of 60 mL/min for 20 min. Volatile compounds were adsorbed on a Tenax Trap (Strat trap, 30.48 cm, Agilent Technologies Spain, S.L., Madrid, Spain) and thermally desorbed from the Tenax trap at 225 °C for 4 min with a helium flow rate of 300 mL/min. The desorbed compounds were cryofocused at –30 °C using liquid nitrogen at the entrance of a DB-624 capillary column (J&W scientific, Folsom, CA, USA).

2.2.1.2. Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). A gas chromatograph 6890 N (Agilent Technologies Spain, S.L., Madrid, Spain) equipped with mass detector 5973 N (Agilent Technologies Spain, S.L., Madrid, Spain) was used with a DB-624 capillary column (J&W scientific: 30 m × 0.25 mm id, 1.4 µm film thickness). The sample was injected in split mode (1:20). Helium was used as a carrier gas with a linear velocity of 36 cm/s. The temperature program used was as follows: we started at 40 °C for 2 min and then temperature was raised from 40 to 100 °C at 3 °C/min, then from 100 to 180 °C at 5 °C/min, and from 180 to 250 °C at 9 °C/min with a final holding time of 5 min; total run time 50.8 min. Injector and detector temperatures were set at 220 and 260 °C, respectively.

The mass spectra were obtained by means of a mass selective detector working in electronic impact at 70 eV, with a multiplier voltage of 1953 V and collecting data at a rate of 6.34 scans/s over the range m/z 40–300. Compounds were identified by comparing their mass spectra with those contained in the NIST05 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg) library and/or by calculating retention index in relation to a series of standard alkanes (C₅–C₁₄) (to obtain Kovats indexes, Supelco 44585-U, Bellefonte, PA, USA) and matching them with literature reported data.

A total of 32 units of dry-cured “lacón” samples were analyzed in triplicate. Results were expressed in relative abundance units and measured as total area counts (AU × 10⁶).

2.3. Statistical analysis

For the statistical analysis of the results, data were analyzed using the SPSS 19.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA) software package. One way analysis of variance was used to analyze the effect of yeast strains on volatile compounds composition. The least squares mean were separated using Duncan's *t*-test. All statistical tests of LSM were performed for $\alpha < 0.05$ significance level.

The principal component analysis (PCA) was conducted in order to identify the most important factors involved on volatile compounds at the end of process of dry-cured "lacón" from four different batches (Control, DH, CD and CZ). The PCA was performed on the correlation matrix. All the statistical analyses were carried out using the SPSS 19.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA) software package.

3. Results and discussion

Over 42 volatile compounds were identified in samples corresponding to "lacón" at the end of process. Table 1 shows mean values of chromatographic areas ($\text{AU} \times 10^6$) grouped by chemical families. Overall, from the qualitative point of view, the global volatile profile was very similar among batches. Nevertheless, significant quantitative differences ($P < 0.001$) in the total area of volatile profiles were detected. The total area of volatile compounds was significantly higher in the inoculated batches ($1395, 774$ and 886×10^6 area units, for DH, CD and CZ groups, respectively) than in control batch (701×10^6 area units). The predominant volatile compound family was esters for all batches studied, with the exception of CZ batch, which showed higher values of hydrocarbons than esters (see Fig. 1). The second more abundant families

Table 1
Volatile compounds of dry-cured "lacón", expressed as total area counts ($\text{AU} \times 10^6$) (mean area $\pm$ standard deviation).

Volatile compounds	IK	R	Control	Inoculated yeast strains ¹			P value
				DH	CD	CZ	
Linear hydrocarbons							
Pentane	467	k,m	0.00 ± 0.00 ^a	2.76 ± 1.55 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	1.18 ± 0.31 ^a	0.000
Hexane	595	k,m	37.38 ± 6.85 ^a	57.54 ± 6.36 ^b	60.20 ± 6.97 ^b	54.34 ± 9.32 ^b	0.002
Heptane	698	k,m	5.78 ± 1.72 ^a	80.96 ± 7.73 ^b	11.73 ± 2.77 ^a	7.32 ± 3.21 ^a	0.000
Octane	799	k,m	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	9.70 ± 1.38 ^b	0.000
Branched hydrocarbons							
Heptane, 2,2,3,5-tetramethyl	1006	k,m	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	2.53 ± 0.50 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.000
Heptane, 2,5-dimethyl	1052	k,m	0.00 ± 0.00 ^a	37.17 ± 4.24 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	78.15 ± 8.75 ^c	0.000
Octane, 2,5,6-trimethyl	1056	k,m	30.50 ± 0.79 ^c	8.62 ± 0.83 ^a	20.69 ± 4.56 ^b	36.19 ± 4.85 ^d	0.000
2,2,7,7-Tetramethyloctane	1065	k,t	9.43 ± 3.07 ^c	0.00 ± 0.00 ^a	5.48 ± 1.47 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.000
Nonane, 3,7-dimethyl	1088	k,m	4.71 ± 0.30 ^a	15.74 ± 2.83 ^b	3.66 ± 0.75 ^a	33.85 ± 5.50 ^c	0.000
Hexane, 2,2,5-trimethyl	1092	k,m	23.46 ± 1.19 ^b	15.06 ± 5.96 ^a	17.02 ± 3.84 ^a	12.79 ± 1.47 ^a	0.000
Octane, 2,6-dimethyl	1097	k,m	16.14 ± 0.62 ^b	10.93 ± 1.77 ^a	11.75 ± 1.97 ^{ab}	94.12 ± 6.03 ^c	0.005
Undecane, 2,8-dimethyl	1111	k,m	16.16 ± 0.73 ^a	12.81 ± 3.91 ^a	10.47 ± 2.50 ^a	96.36 ± 14.54 ^b	0.000
Undecane, 4,8-dimethyl	1119	k,m	4.03 ± 1.05 ^a	11.08 ± 2.62 ^b	2.59 ± 0.25 ^a	21.25 ± 5.48 ^c	0.000
Alcohols							
2-Methylpropanol	636	k,m	0.00 ± 0.00 ^a	3.54 ± 0.56 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.000
1-Penten-3-ol	734	k,m	0.00 ± 0.00 ^a	3.63 ± 0.81 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.000
3-Methylbutanol	768	k,m	9.18 ± 0.92 ^a	320.14 ± 63.58 ^c	125.38 ± 31.45 ^b	7.82 ± 1.81 ^a	0.000
1-Hexanol	921	k,m	26.71 ± 6.75 ^b	36.46 ± 7.75 ^c	9.66 ± 1.75 ^a	12.97 ± 4.64 ^a	0.000
Ketones							
2,3-Butanedione	633	k,t	13.26 ± 1.87 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	15.24 ± 1.35 ^c	0.000
Methyl vinyl ketone	597	m	0.00 ± 0.00 ^a	58.05 ± 13.59 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.000
2-Pentanone	731	k,t	12.03 ± 2.46 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.000
2-Heptanone	936	k,m	16.32 ± 4.22 ^b	11.85 ± 1.71 ^b	12.28 ± 5.21 ^b	6.35 ± 2.05 ^a	0.007
2-Nonanone	1159	k,m	6.91 ± 0.94 ^c	0.00 ± 0.00 ^a	3.68 ± 1.12 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.000
Aldehydes							
3-Methylbutanal	692	k,m	10.99 ± 3.12 ^b	27.81 ± 6.59 ^c	14.21 ± 3.22 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.000
Hexanal	842	k,m	105.99 ± 4.88 ^c	14.42 ± 3.63 ^a	22.60 ± 9.62 ^a	61.34 ± 9.18 ^b	0.000
Nonanal	1077	k,m	4.06 ± 0.85 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	4.24 ± 1.54 ^b	0.000
3-Cyclopentene-1-acetaldehyde, 3-trimethyl	1199	m	5.01 ± 1.02 ^b	1.77 ± 1.09 ^a	4.30 ± 1.00 ^{ab}	9.37 ± 3.35 ^c	0.000
Esters							
Methyl isobutanoate	670	k,m	14.23 ± 2.85 ^a	54.87 ± 11.46 ^c	29.26 ± 4.92 ^b	12.25 ± 4.67 ^a	0.000
Methyl butanoate	713	k,m	51.56 ± 6.05 ^a	50.21 ± 6.25 ^a	50.81 ± 19.38 ^a	59.85 ± 16.40 ^a	0.665
Methyl isopentanoate	781	k,m	96.39 ± 14.79 ^b	336.67 ± 11.03 ^d	174.09 ± 20.97 ^c	50.36 ± 17.74 ^a	0.000
Methyl pentanoate	844	k,m	7.73 ± 1.39 ^a	14.70 ± 2.52 ^b	13.61 ± 3.31 ^b	6.82 ± 3.27 ^a	0.001
Methyl hexanoate	936	k,m	99.37 ± 12.05 ^b	118.23 ± 17.28 ^b	106.32 ± 33.81 ^b	68.07 ± 16.51 ^a	0.016
Methyl heptanoate	1080	k,m	0.00 ± 0.00 ^a	8.24 ± 1.96 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	15.63 ± 3.53 ^c	0.000
Methyl octanoate	1170	k,m	4.65 ± 1.08 ^a	6.98 ± 1.44 ^b	7.08 ± 1.68 ^b	5.74 ± 0.44 ^{ab}	0.036
3-Hidroximandelic acid, ethyl ester, di-TMS	1164	m	24.96 ± 1.91 ^{ab}	26.16 ± 2.29 ^{ab}	22.55 ± 1.84 ^a	29.62 ± 5.25 ^b	0.025
Methyl propionate	618	k,m	0.00 ± 0.00 ^a	11.80 ± 3.06 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.000
Acids							
Acetic acid	664	k,m	0.00 ± 0.00 ^a	12.82 ± 1.72 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.000
Malonic acid	1292	m	3.67 ± 0.27 ^b	3.48 ± 0.74 ^{ab}	2.74 ± 0.31 ^a	4.71 ± 0.85 ^c	0.001
Furans							
Furan, 2-pentyl	1003	k,m	0.00 ± 0.00 ^a	5.32 ± 0.95 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.000
Other compounds							
Camphene	991	k,m	13.23 ± 1.84 ^a	9.07 ± 2.10 ^a	9.76 ± 2.29 ^a	62.51 ± 16.94 ^b	0.000
Octadecane, 1-chloro	1073	t	18.83 ± 1.29 ^c	0.00 ± 0.00 ^a	12.44 ± 2.90 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.000
Camphor	1224	m	9.02 ± 0.94 ^b	6.29 ± 0.66 ^a	7.68 ± 1.47 ^{ab}	8.67 ± 3.03 ^{ab}	0.139

^{a-c}Means with different superscripts were significantly different for $P < 0.05$.

IK: Kovats index calculated for DB-624 capillary column (J&W scientific: 30 m $\times$ 0.25 mm id, 1.4 μ m film thickness) installed on a gas chromatograph equipped with a mass selective detector. R: Reliability of identification: k: Kovats index in agreement with literature (Flores et al., 1997; Jurado, Carrapiso, Ventanas, & García, 2009; Liu, Xu, & Zhou, 2007; Ruiz, Ventanas, Cava, Andrés & García, 1999); m: mass spectrum agreed with mass database (NIST05); and t: tentative identification by mass spectrum.

¹ "Lacón" samples inoculated with yeast strains: *D. hansenii* (DH), *C. deformats* (CD) and *C. zeylanoides* (CZ).

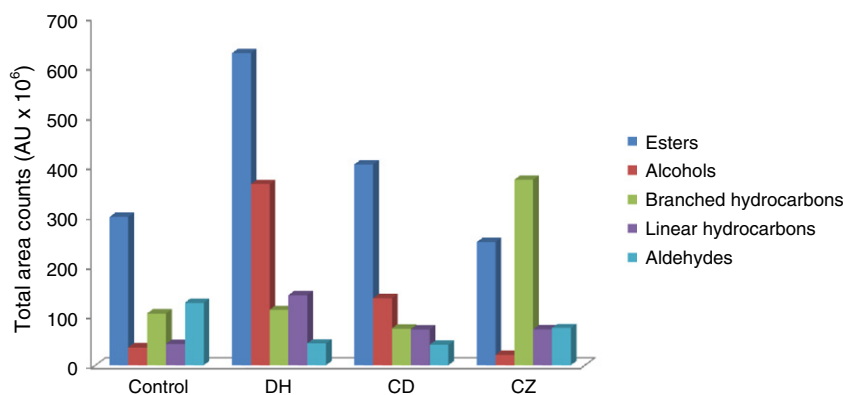


Fig. 1. Majority chemical families of volatile compounds from dry-cured “lacón” samples inoculated with yeast strains: *D. hansenii* (DH), *C. deformans* (CD) and *C. zeylanoides* (CZ).

were hydrocarbons (for control and CD batch), alcohols (for DH group) and esters (for CZ group) (see Fig. 1). Acids and furans showed the lowest values in all batches studied. Taking into account that all the batches were produced under the same technological conditions, it seems that the different inoculated yeasts were responsible for these different volatile profiles.

Formation of hydrocarbons can be attributed to lipid autooxidation of fatty acids that are released from triglycerides (Ordóñez, Hierro, Bruna & de la Hoz, 1999), playing an important role on both linear and branched hydrocarbon formations in dry-cured meat (Ruiz, Ventanas, Cava, Andrés & García, 1999). Linear hydrocarbons were approximately 6–10% of volatile compounds total area. The profile of these CD batch-obtained compounds was similar to that displayed by control group and different to those of the other ones. Significant differences ($P < 0.001$) were found for the sum of all linear hydrocarbons for each batch. In general, the observed values were significantly higher in the inoculated batches ($141, 72$ and 73×10^6 area units, for DH, CD and CZ groups, respectively) than in the control group (43×10^6 area units) (see Fig. 1). Among these compounds, hexane was the most abundant, showing CD treatment the highest content (60.20×10^6 area units) while control group showed the lowest one (37.38×10^6 area units). In the case of heptane, the amount found in control batch (5.78×10^6 area units) was also lower than in DH group (80.96×10^6 area units). On the other hand, pentane and octane only appeared in some inoculated batches (DH and CZ). These results are not relevant given that linear hydrocarbons are not important contributors to the meat product flavor because of their high odor thresholds (Ansorena, Gimeno, Astiasarán, & Bello, 2001; Bianchi et al., 2007).

The group of branched hydrocarbons in CZ batch (372.71×10^6 area units) was found to be significantly higher than in the control one (104×10^6 area units, $P < 0.001$) (see Fig. 1). The batch inoculated with *C. zeylanoides* showed the highest value compared to the rest of batches studied due mainly to the high values of octane, 2,6-dimethyl (94.12×10^6 area units) and undecane, 2,8-dimethyl (96.36×10^6 area units). On the other hand, CD batch showed lower values than control group (74.19×10^6 area units). The most abundant branched hydrocarbon in control and CD batches was octane, 2,5,6-trimethyl (30.50 and 20.69×10^6 area units, respectively) while undecane, 2,8-dimethyl was more common in CZ group (96.36×10^6 area units, respectively) and heptane, 2,5-dimethyl was prevalent in DH batch (37.17×10^6 area units). The profile of these volatile compound groups was quite similar except for DH and CZ batches, which showed high values for one specific volatile compound (heptane, 2,5-dimethyl) (see Table 1). Total amount of hydrocarbons in CZ batch was remarkably high, representing around 50% of total volatile compounds area. These results are in agreement with those reported by Tejeda, Antequera, Martín, Ventanas, and García (2001) who observed that some microorganisms may contribute to the differences in n-alkanes found in dry cured ham, while other authors (Martín et al., 2006; Ruiz et al., 1999) have

observed that the increase of linear and branched hydrocarbons can be attributed to a microbial lipolytic activity. Regardless of their origin, linear and branched hydrocarbons have been considered as non-contributors to meat flavor (Ansorena et al., 2001), and they are not among the most odor active compounds described for dry-cured ham (Carrapiso, Ventanas & García, 2002).

Significant differences ($P < 0.001$) in volatile aldehydes were detected in all batches studied, they are known as the major contributors to the unique flavor of dry-cured ham due to their rapid formation in lipid oxidation and their low odor thresholds (Dirinck, Opstaele, & Vandendriessche, 1997). In general, total aldehydes showed lower levels in inoculated “lacón” samples ($44, 41$ and 75×10^6 area units, for DH, CD and CZ groups, respectively) than in the control group (126×10^6 area units) (see Fig. 1). Among the linear aldehydes, hexanal was detected in all batches studied while nonanal was only found in control and CZ groups. The level of hexanal was markedly ($P < 0.001$) higher in the control (106×10^6 area units), which surface was not inoculated, than in the other batches studied ($14, 23$ and 61×10^6 area units, for DH, CD and CZ groups, respectively) (see Table 1). The presence of linear aldehydes is related to the oxidation (Ansorena et al., 2001; Ordóñez, Hierro, Bruna, & de la Hoz, 1999). This result suggests a smaller fat oxidation in the inoculated samples, probably due to a lower lipolytic activity of the strains used and a positive effect on flavor by inhibiting the development of rancidity. This antioxidative effect of yeast has been reported previously by Lücke (1985). These results are in agreement with those reported by Flores et al. (2004) who found a reduction on heptanal, octanal and nonanal contents in fermented sausage samples that were inoculated *D. hansenii*. However, other authors (Andrade et al., 2010; Carrapiso, Ventanas, & García, 2002) observed higher values for these aldehydes in the inoculated sausages than in the control. The branched aldehyde 3-methylbutanal derives from amino acids by Strecker degradation (Barbieri et al., 1992; Ventanas et al., 1992) but it can also be generated by microbial metabolism (Durá, Flores, & Toldra, 2004; Martín et al., 2006); it was detected in all batches with the exception of CZ batch. This aldehyde was found in lower amounts in control and CD group (10.99 and 14.21×10^6 area units, respectively), while “lacón” samples inoculated with *D. hansenii* showed the higher values (27.81×10^6 area units) (see Table 1). This compound has been reported to contribute considerably to the overall flavor of dry cured ham (Carrapiso et al., 2002; Martín et al., 2006).

Alcohols showed significant differences ($P < 0.001$) among batches studied ($36, 364, 135$ and 21×10^6 area units, for control, DH, CD and CZ groups, respectively) (see Fig. 1). The yeast ability to produce alcohols from both carbohydrate metabolism and branched amino acids is well known (Olesen & Stahnke, 2000). The branched alcohols 2-methylpropanol and 3-methylbutanol are formed by reduction of the corresponding aldehydes (Stahnke, 1994). The production of 2-methylpropanol associated to the absence of the corresponding precursor can be attributed to the conversion of branched amino acids through

the Ehrlich pathway used by yeasts (Schoondermark-Stolk et al., 2006). The most abundant alcohol was 3-methylbutanol for DH and CD batches (320.14 and 125.38×10^6 area units, respectively) while 1-hexanol was more extensive for control and CZ groups (26.71 and 12.97×10^6 area units, respectively) (see Table 1). On the other hand, 2-methylpropanol and 1-penten-3-ol were only detected in “lacón” sample inoculated with *D. hansenii*. Alcohols are considered important contributors to the aroma of dry-cured meat products due to their low odor threshold (Sabio, Vidal-Aragon, Bernalte, & Gata, 1998).

Ester compounds are formed by the esterification of carboxylic acids and alcohols. The enzymes involved in this reaction are esterase enzymes which are produced by different microorganisms (yeasts, molds and bacteria) (Jelén & Wasowicz, 1998; Stahnke, Holck, Jensen, Nilsen, & Zanardi, 2002). They can modulate the global flavor due to their low odor thresholds, imparting fruity qualities (Marco, Navarro, & Flores, 2006; Stahnke, 1994). Their presence, together with branched aldehydes, has been associated with a “ripened flavor” in cured meat products (Barbieri et al., 1992; Careri et al., 1993; Montel, Reitz, Talon, Berdagué, & Rousset-Akrim, 1996). In general esters were the majority volatile compounds group for all batches studied except for the one inoculated with *C. zeylanoides*. In dry-cured “lacón” samples, they reached high values showing statistically significant differences ($P < 0.001$) among batches. The amount of esters was higher in inoculated “lacón” samples (628 and 404×10^6 area units, for DH and CD groups, respectively) than in control and CZ batch (299 and 248×10^6 area units, respectively) (see Fig. 1) and it could be related to microbial esterase activity (Stahnke, 1995). The most numerous esters were methyl isopentanoate and methyl hexanoate. The content of these compounds was significantly higher ($P < 0.001$) in “lacón” samples inoculated with *D. hansenii* and *C. deformans* than in the other ones. Methyl heptanoate only appeared in DH and CZ batches (8.24 and 15.63×10^6 area units, respectively), while methyl propanoate only appeared in “lacón” samples inoculated with *D. hansenii* (11.80×10^6 area units) (see Table 1). Methyl isobutanoate, methyl butanoate, methyl pentanoate, methyl octanoate and 3-hydroximandelic acid, ethyl ester, di-TMS appeared in all batches studied. For methyl isobutanoate the lowest amounts were found in control and CZ batches while for methyl butanoate the highest amounts were observed in “lacón” samples inoculated with *C. zeylanoides*. On the other hand, the lowest amounts of methyl pentanoate were detected in control and CZ groups, while the lowest contents of methyl octanoate were observed in control samples. For 3-hydroximandelic acid, ethyl ester, di-TMS from “lacón” samples inoculated with *C. zeylanoides* showed the highest value (29.62×10^6 area units) while “lacón” samples inoculated with *C. deformans* presented the lowest (22.55×10^6 area units).

Ketones are mainly formed by catabolism or fermentation of carbohydrate chains and by β -oxidation of fatty acids (Flores, Grimm, Toldrá, & Spanier, 1997; Ordóñez et al., 1999; Sondergaard & Stahnke, 2002). Total ketones showed significantly higher contents in “lacón” samples inoculated with *D. hansenii* (69.90×10^6 area units) than in the other ones (48.53 , 15.98 and 21.59×10^6 area units, for control, CD and CZ groups, respectively) (see Fig. 2). Among them, especially 2-ketones are considered to have a great influence on the aroma of meat and meat products. 2-pentanone, 2-heptanone and 2-decanone present a peculiar aroma: ethereal, butter, spicy notes or blue cheese notes (Novelli, Gandemer, Meynier, Zanardi, & Chizzolini, 1995). In our study, 2-heptanone presented higher levels in control and DH and CD groups (16.3 , 11.9 and 12.3×10^6 area units, respectively) than CZ batch (6.4×10^6 area units). On the other hand, 2-pentanone was only detected in control group.

Furans (furan, 2-pentylfuran) have been detected in “lacón” samples inoculated with *D. hansenii*, so the inoculated strains contribution to its production could be considered. Furans are commonly found in dry-cured hams (Ruiz, Ventanas, Cava, Andrés, & García, 1999), nevertheless they are not among the most odor active compounds described for dry-cured ham (Carrapiso et al., 2002). On the other hand, Martín et

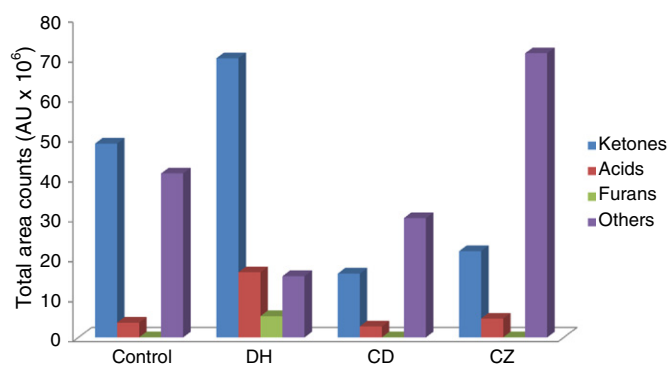


Fig. 2. Minority chemical families of volatile compounds from dry-cured “lacón” samples inoculated with yeast strains: *D. hansenii* (DH), *C. deformans* (CD) and *C. zeylanoides* (CZ).

al. (2003) found that *Penicillium chryso* and *D. hansenii* did not affect furan formation in dry-cured pork loins.

3.1. Principal components analysis

A principal component analysis (PCA) was carried out to determine the relationship between the volatile compounds and to discriminate dry-cured “lacón” by their inoculated yeast strains. PCA results for mean values of the parameters are summarized in Fig. 3 (a) and (b). PCA showed that about 86.42% of the variability was explained by the first three principal components. The correlation matrix for this model had a close to zero determinant indicating significant correlations among variables and suitability for PCA (Table 2). Principal component 1 (PC1) was the most important variable in terms of differences among inoculated yeast strains as it accounted for 54.91% of the total variability. PC1 was positively related to linear hydrocarbons (heptane), alcohols (3-methylbutanol and 1-hexanol) and esters (methyl isobutanoate, methyl pentanoate and methyl hexanoate) and negatively correlated to branched hydrocarbons (octane, 2,5,6-trimethyl) and aldehydes (3-cyclopentene-1-acetaldehyde). Dry-cured “lacón” that was inoculated with *D. hansenii* had the greatest component 1 value; this was related to heptane, 1-hexanol, 3-methylbutanol, methyl isobutanoate and methyl isopentanoate. As shown in Fig. 3 (a), DH group is in the positive side of both PC1 and PC2; control and CD batches were on the negative side of PC1 and PC2, while CZ group was on the negative side of PC1 and on the positive side of PC2.

On the other hand, principal component 2 (21.53%) was positively related to branched hydrocarbons (nonane, 3,7-dimethyl, octane, 2,6-dimethyl, undecane, 2,8-dimethyl and undecane, 4,8-dimethyl) and acids (malonic acid) and negatively correlated with ketones (2-heptanone) and esters (methyl hexanoate). Control and CD batches were on the negative PC2 axis while DH and CZ groups were on the positive PC2 axis. Finally, PC3 (9.98%) was positively related to aldehydes (hexanal) and negatively correlated to linear hydrocarbons (hexane). *C. deformans* inoculated dry-cured “lacón” had the greatest component 3 value; this was related to hexane content. CZ, CD and DH batches were on the negative PC3 axis while control group was on the positive PC3 axis.

In conclusion, PC1 differentiated the dry-cured “lacón” that was inoculated with *D. hansenii* from the other ones. This result were related to heptane, 3-methylbutanol, 1-hexanol, methyl isobutanoate and methyl isopentanoate contents, which were more abundant in “lacón” samples that were inoculated with *D. hansenii* and they had a positive effect on final flavor.

4. Conclusions

Results from this research showed that the tested yeast strains that were inoculated remarkably alter the total area of volatile compounds when compared to the wild yeast population. This study demonstrated

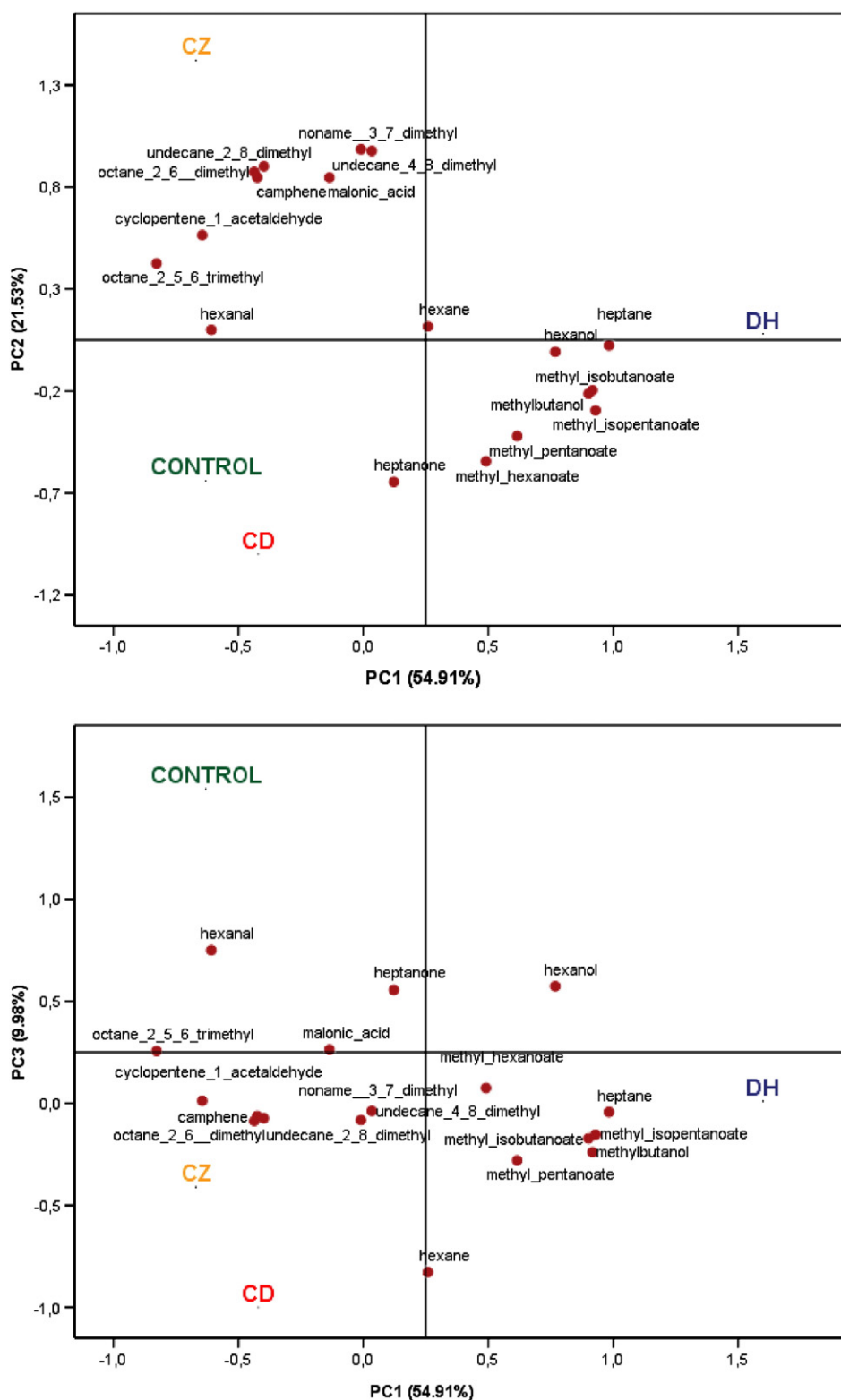


Fig. 3. Relationships among dry-cured “lacón” inoculated with three different yeast strains (*D. hansenii* (DH), *C. deformans* (CD) and *C. zeylanoides* (CZ)) and one control batch and volatile compounds obtained by PCA. a) Projection of the variables and dry-cured “lacón” groups in the plane defined by the first two principal components. b) Projection of the variables in the plane defined by PCA first and three.

that the inoculated yeasts had an important impact on volatile compounds generation. The reduction of total aldehyde compound values that is caused by the inoculation suggested a smaller fat oxidation of dry-cured “lacón”. In particular, hexanal contents decrease could be related to a positive effect on flavor by inhibiting rancid odor. However, the production of volatile compounds clearly differed among inoculated

batches. In fact, the use of *D. hansenii* was able to produced high contents of esters, alcohols and ketones which play an important role in the aroma due to their low odor threshold. Based on these results, we could conclude that appropriate selection of yeast starter cultures could result in a positive impact on the volatile compounds that are involved on aroma development of dry-cured “lacón”.

Table 2

Factor loadings for each parameter studied on the first three principal components obtained.

Compounds	PC1	PC2	PC3	Communality
Hexane	0.259	0.117	−0.828	0.766
Heptane	0.983	0.024	−0.043	0.969
Octane, 2,5,6-trimethyl	−0.827	0.425	0.256	0.931
Nonane, 3,7-dimethyl	−0.009	0.985	−0.082	0.977
Octane, 2,6-dimethyl	−0.437	0.874	−0.087	0.962
Undecane, 2,8-dimethyl	−0.398	0.902	−0.073	0.977
Undecane, 4,8-dimethyl	0.034	0.977	−0.038	0.957
3-Methylbutanol	0.917	−0.196	−0.240	0.937
1-Hexanol	0.768	−0.008	0.573	0.919
2-Heptanone	0.122	−0.645	0.556	0.740
Hexanal	−0.608	0.100	0.750	0.942
3-Cyclopentene-1-acetaldehyde	−0.645	0.564	0.012	0.734
Methyl isobutanoate	0.901	−0.213	−0.172	0.887
Methyl isopentanoate	0.930	−0.295	−0.153	0.974
Methyl pentanoate	0.616	−0.420	−0.280	0.634
Methyl hexanoate	0.491	−0.544	0.075	0.543
Malonic acid	−0.135	0.847	0.263	0.805
Camphene	−0.425	0.847	−0.062	0.902
Eigenvalue	9.883	3.876	1.797	
Percent of variance	54.905	21.533	9.984	
Accumulative percentage	54.905	76.438	86.421	

Acknowledgments

This work was part of the research Project O7TAL003CT granted by the Xunta de Galicia (The Regional Government).

References

- Andrade, M. J., Córdoba, J. J., Casado, E. M., Córdoba, M. G., & Rodríguez, M. (2010). Effect of selected strains of *Debaryomyces hansenii* on the volatile compound production of dry fermented sausage "salchichón". *Meat Science*, 85, 256–264.
- Andrade, M. J., Córdoba, J. J., Sánchez, B., Casado, E. M., & Rodríguez, M. (2009). Evaluation and selection of yeasts isolated from dry-cured Iberian ham by their volatile compound production. *Food Chemistry*, 113, 457–463.
- Andrade, M. J., Rodríguez, M., Sánchez, B., Aranda, E., & Córdoba, J. J. (2006). DNA typing methods for differentiation of yeast related to dry-cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 107, 48–58.
- Ansorena, D., Gimeno, O., Astiasarán, I., & Bello, J. (2001). Analysis of volatile compounds by GC/MS of a dry fermented sausage: Chorizo de Pamplona. *Food Research International*, 34, 67–75.
- Barbieri, G., Bolzoni, L., Parolari, G., Virgili, R., Careri, M., & Mangia, A. (1992). Flavor compounds of dry-cured hams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 2389–2394.
- Bianchi, F., Cantoni, C., Careri, M., Chiesa, L., Musci, M., & Pinna, A. (2007). Characterization of the aromatic profile for the authentication and differentiation of typical Italian dry-sausages. *Talanta*, 72, 1552–1563.
- Bolumar, T., Sanz, Y., Flores, M., Aristoy, M. C., Toldrá, F., & Flores, J. (2006). Sensory improvement of dry-fermented sausages by the addition of cell-free extracts from *Debaryomyces hansenii* and *Lactobacillus sakei*. *Meat Science*, 72, 457–466.
- Bruna, J. M., Hierro, E. M., de la Hoz, L., Mottram, D. S., Fernández, M., & Ordoñez, J. A. (2001). The contribution of *Penicillium aurantiogriseum* to the volatile composition and sensory quality of dry fermented sausages. *Meat Science*, 59, 97–107.
- Careri, M., Mangia, A., Barbieri, G., Bolzoni, L., Virgili, R., & Parolari, G. (1993). Sensory property relationships to chemical data of Italian-type dry-cured ham. *Journal of Food Science*, 58, 968–972.
- Carrapiso, A. I., Ventanas, J., & García, C. (2002). Characterization of the most odor-active compounds of Iberian ham headspace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1996–2000.
- Cocolin, L., Urso, R., Rantsiou, K., Cantoni, C., & Comi, G. (2006). Dynamics and characterization of yeasts during natural fermentation of Italian sausages. *FEMS Yeast Research*, 6, 692–701.
- Dirinck, P., Opstaele, F. V., & Vandendriessche, F. (1997). Flavour differences between northern and southern European cured hams. *Food Chemistry*, 59, 511–521.
- Durá, M. A., Flores, M., & Toldrá, F. (2004). Effect of growth phase and dry-cured sausage processing conditions on *Debaryomyces* spp. generation of volatile compounds from branched-chain amino acids. *Food Chemistry*, 86, 391–399.
- Flores, M., Dura, M. A., Marco, A., & Toldrá, F. (2004). Effect of *Debaryomyces* spp. on aroma formation and sensory quality of dry fermented sausages. *Meat Science*, 68, 439–446.
- Flores, M., Grimm, C. C., Toldrá, F., & Spanier, A. M. (1997). Correlation of sensory and volatile compounds of Spanish "Serrano" dry-cured ham as a function of two processing times. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2178–2186.
- Guichard, E. (2002). Interactions between flavor compounds and food ingredients and their influence on flavor perception. *Food Reviews International*, 18, 49–70.
- Jelén, H., & Wasowicz, E. (1998). Volatile fungal metabolites and their relation to the spoilage of agricultural commodities. *Food Reviews International*, 14, 391–426.
- 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, 262–270.
- Liu, Y., Xu, X. L., & Zhou, G. H. (2007). Comparative study of volatile compounds in traditional Chinese Nanjing marinated duck by different extraction techniques. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 543–550.
- Lücke, F. K. (1985). In B. J. B. Wood (Ed.), *Fermented sausages. Microbiology of fermented foods* (pp. 41–83). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science.
- Marco, A., Navarro, J. L., & Flores, M. (2006). The influence of nitrite and nitrate on microbial, chemical and sensory parameters of show dry fermented sausage. *Meat Science*, 73, 660–673.
- Marra, A. I., Salgado, A., Prieto, B., & Carballo, J. (1999). Biochemical characteristics of dry cured lacón. *Food Chemistry*, 67, 33–37.
- Martín, A., Córdoba, J. J., Aranda, E., Córdoba, M. G., & Asensio, M. A. (2006). Contribution of a selected fungal population to the volatile compounds on dry-cured ham. *International Journal of Food Microbiology*, 110, 8–18.
- Martín, A., Córdoba, J. J., Benito, M. J., Aranda, E., & Asensio, M. A. (2003). Effect of *Penicillium chrysogenum* and *Debaryomyces hansenii* on the volatile compounds during controlled ripening of pork loins. *International Journal of Food Microbiology*, 84, 327–338.
- Montel, M. C., Reitz, J., Talon, R., Berdagué, J. L., & Rousset-Akrim, S. (1996). Biochemical activities of *Micrococcaceae* and their effects on the aromatic profiles and odours of a dry sausage model. *Food Microbiology*, 13, 489–499.
- Novelli, E., Gandemer, G., Meynier, A., Zanardi, E., & Chizzolini, R. (1995). Composizione dell'aroma di due prodotti di salumeria: mortadella e salame milano. Parma: Atti del congresso Grassi e qualità della carne.
- Núñez, F., Rodríguez, M. M., Córdoba, J. J., Bermúdez, M. E., & Asensio, M. A. (1996). Yeast population during ripening of dry-cured Iberian ham. *International Journal of Food Microbiology*, 29, 271–280.
- Official Journal of the European Communities (2001). Commission Regulation (EC) No. 898/2001 of 7 May supplementing the Annex to Regulation (EC) No. 2400/96 on the entry of certain names in the Register of protected designations of origin and protected geographical indications provided for in Council Regulation (EEC) No. 2081/92 on the protection of geographical indications and designations of origin for agricultural products and foodstuffs. *Official Journal*, L 126, 18–19.
- Olesen, P. T., & Stahnke, L. H. (2000). The influence of *Debaryomyces hansenii* and *Candida utilis* on the aroma formation in garlic spiced fermented sausages and model minces. *Meat Science*, 56, 357–368.
- Ordóñez, J. A., Hierro, E. M., Bruna, J. M., & de la Hoz, L. (1999). Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39, 329–367.
- Patrignani, F., Lucchi, L., Vallicelli, M., Guerzoni, M. E., Gardini, F., & Lanciotti, R. (2007). Role of surface-inoculated *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* strains in dried fermented sausage manufacture. Part 1: Evaluation of their effects on microbial evolution, lipolytic and proteolytic patterns. *Meat Science*, 75, 676–686.
- Regodon, J. A., Perez, F., & Ramirez, M. (2006). Influence of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain on the major volatile compounds of wine. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 151–157.
- Ruiz, J., Ventanas, J., Cava, R., Andrés, A., & García, C. (1999). Volatile compounds of dry cured Iberian ham as affected by the length of the curing process. *Meat Science*, 52, 19–27.
- Sabio, E., Vidal-Aragón, M. C., Bernalte, M. J., & Gata, J. L. (1998). Volatile compounds present in six types of dry-cured ham from south European countries. *Food Chemistry*, 61, 493–503.
- Sánchez-Peña, C., Luna, G., García-González, D. L., & Aparicio-Ruiz, R. (2005). Characterization of French and Spanish dry-cured hams: Influence of the volatiles from the muscles and the subcutaneous fat quantified by SPME-GC. *Meat Science*, 69, 635–645.
- Schoondermark-Stolk, S. A., Jansen, M., Verkleij, A. J., Verrips, C. T., Euverink, G. J. W., Dijkhuizen, L., et al. (2006). Genome-wide transcription survey on flavour production in *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 1347–1356.
- Silla, H., Molina, I., Flores, J., & Silvestre, D. (1989). A study of the microbial flora of dry-cured ham. 1. Isolation and growth. *Fleischwirtschaft*, 69, 1128–1131.
- Sondergaard, A. K., & Stahnke, L. H. (2002). Growth and aroma production by *Staphylococcus xylosum*, *S. carnosus* and *S. equorum* — A comparative study in model systems. *International Journal of Food Microbiology*, 75, 99–109.
- Stahnke, L. H. (1994). Aroma components from dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosum*. *Meat Science*, 38, 39–53.
- Stahnke, L. H. (1995). Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosum* at different temperatures and different ingredient levels. Part II. Volatile components. *Meat Science*, 41, 193–209.
- Stahnke, L. H., Holck, A., Jensen, A., Nilsen, A., & Zanardi, E. (2002). Maturity acceleration by *Staphylococcus carnosus* in fermented sausage — Relationship between maturity and taste compounds. *Journal of Food Science*, 67, 1914–1921.
- Tejeda, J. F., Antequera, T., Martín, L., Ventanas, J., & García, C. (2001). Study of the branched hydrocarbon fraction of intramuscular lipids from Iberian fresh ham. *Meat Science*, 58, 175–179.
- Toldrá, F., Sanz, Y., & Flores, M. (2001). Meat fermentation technology. In Y. H. Kui, W. -K. Nip, R. W. Rogers, & O. A. Young (Eds.), *Meat science and applications* (pp. 537–561). New York: Marcel Dekker.
- Ventanas, J., Córdoba, J. J., Antequera, T., García, C., López-Bote, C. J., & Asensio, M. A. (1992). Hydrolysis and Maillard reactions during ripening of Iberian ham. *Journal of Food Science*, 57, 813–815.
- Zapelena, M. J., Astiasarán, I., & Bello, J. (1999). Dry fermented sausages made with a protease from *Aspergillus oryzae* and or a starter culture. *Meat Science*, 52, 403–409.

VII. ANEXOS

VII.1. INFORMACION Y CRITERIOS DE CALIDAD DE LAS PUBLICACIONES

En la normativa interna de la Universidad de Vigo sobre Tesis Doctorales formadas por compendio de artículos se indica que para la admisión de la Tesis debe incluirse una descripción del factor de impacto u otros criterios de calidad de la revista en la que están publicados los artículos que forman parte de la memoria. Deben quedar claramente explícitos los nombres de todos los autores y su orden, su filiación, el nombre de la publicación, la editorial y el ISSN o ISBN.

A continuación se da la información requerida de cada uno de los artículos, incluyendo factores de impacto de las revistas donde están publicados sus posiciones relativas dentro de los epígrafes en los que se encuentran.

ARTICULO I

Autores: **Laura Purriños^a**, Roberto Bermúdez^a, Daniel Franco^a, Javier Carballo^b y José M. Lorenzo^a.

Filiación: ^a Centro Tecnológico de la Carne de Galicia, Rúa Galicia N°4, Parque Tecnológico de Galicia, San Cibrán das Viñas, 32900 Ourense. ^b Area de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias de Ourense, Universidad de Vigo, 32004 Ourense.

Título: Development of Volatile Compounds during the Manufacture of Dry-Cured “Lacón”, a Spanish Traditional Meat Product.

Revista: Journal of Food Science

Editorial: Blackwell Science Publ

ISSN: 0022-1147

Epígrafe: Food Science & Technology

Factor de impacto (2.011): 1,66

Posición relativa de la revista en el epígrafe (2.011): 44/128

Cuartil: Q2

ARTICULO II

Autores: **Laura Purriños**^a, Roberto Bermúdez^a, Sara Temperán^a, Daniel Franco^a, Javier Carballo^b y José M. Lorenzo^a.

Filiación: ^a Centro Tecnológico de la Carne de Galicia, Rúa Galicia Nº4, Parque Tecnológico de Galicia, San Cibrán das Viñas, 32900 Ourense. ^b Area de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias de Ourense, Universidad de Vigo, 32004 Ourense.

Título: Influence of salt content and processing time on sensory characteristics of cooked “lacón”.

Revista: Meat Science

Editorial: Elsevier Science Ltd

ISSN: 0309-1740

Epígrafe: Food Science & Technology

Factor de impacto (2.011): 2,275

Posición relativa de la revista en el epígrafe (2.011): 26/128

Cuartil: Q1

ARTICULO III

Autores: **Laura Purriños**^a, Daniel Franco^a, Javier Carballo^b y José M. Lorenzo^a.

Filiación: ^a Centro Tecnológico de la Carne de Galicia, Rúa Galicia Nº4, Parque Tecnológico de Galicia, San Cibrán das Viñas, 32900 Ourense. ^b Area de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias de Ourense, Universidad de Vigo, 32004 Ourense.

Título: Influence of the salting time on volatile compounds during the manufacture of dry-cured pork shoulder “lacón”.

Revista: Meat Science

Editorial: Elsevier Science Ltd

ISSN: 0309-1740

Epígrafe: Food Science & Technology

Factor de impacto (2.011): 2,275

Posición relativa de la revista en el epígrafe (2.011): 26/128

Cuartil: Q1

ARTICULO IV

Autores: **Laura Purriños^a**, María C. García Fontán^a, Javier Carballo^b y José M. Lorenzo^a.

Filiación: ^a Centro Tecnológico de la Carne de Galicia, Rúa Galicia N°4, Parque Tecnológico de Galicia, San Cibrán das Viñas, 32900 Ourense. ^b Area de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias de Ourense, Universidad de Vigo, 32004 Ourense.

Título: Study of the Counts, Species and Characteristics of the Yeast Population during the Manufacture of Dry-Cured “Lacón”. Effect of Salt Level.

Revista: Food Microbiology

Editorial: Academic Press Ltd-Elsevier Sc

ISSN: 0740-0020

Epígrafe: Food Science & Technology

Factor de impacto (2.011): 3,283

Posición relativa de la revista en el epígrafe (2.011): 10/128

Cuartil: Q1

ARTICULO V

Autores: **Laura Purriños^a**, Javier Carballo^b y José M. Lorenzo^a.

Filiación: ^a Centro Tecnológico de la Carne de Galicia, Rúa Galicia N°4, Parque Tecnológico de Galicia, San Cibrán das Viñas, 32900 Ourense. ^b Area de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias de Ourense, Universidad de Vigo, 32004 Ourense.

Título: The Influence of *Debaryomyces hansenii*, *Candida deformans* and *Candida zeylanoides* on the aroma formation of dry-cured “lacón”.

Revista: Meat Science

Editorial: Elsevier Science Ltd

ISSN: 0309-1740

Epígrafe: Food Science & Technology

Factor de impacto (2.011): 2,275

Posición relativa de la revista en el epígrafe (2.011): 26/128

Cuartil: Q1

“Algunos datos incluidos se han obtenido de Journal Citation Reports ®, Inc. (Thomson®), Philadelphia, Pennsylvania, USA: © Copyright.