

UNIVERSIDAD DE LEÓN
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE HIGIENE Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



universidad
de león

ESTUDIOS SOBRE CARNE DE CORDERO: COMPUESTOS VOLÁTILES Y ESTABILIDAD OXIDATIVA DE LA CARNE DE CORDEROS ALIMENTADOS CON OLEINAS, ESTABILIDAD OXIDATIVA DE UNA HAMBURGUESA CON LUPULO, DESARROLLO DE UNA PIERNA CRUDA-CURADA INCLUYENDO UNA ETAPA DE MASAJEO

STUDIES ON LAMB MEAT: VOLATILE COMPOSITION AND LIPID OXIDATIVE STABILITY OF LAMB MEAT FROM ANIMALS FED WITH SOAPSTOCK, OXIDATIVE STABILITY OF MEAT PATTIES WITH HOP, QUALITY CHARACTERISTICS OF A DRY-CURED LEG AS AFFECTED BY TUMBLING

Memoria presentada por:

Luz Hermila Villalobos Delgado

Ingeniero Agroindustrial y Maestra en Ciencias,
para optar al grado de Doctora por la Universidad de León

Dirigida por:

Dr. Javier Mateo Oyagüe

Profesor Titular del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos

Co-directora:

Dra. Irma Caro Canales

Colaboradora honorífica del Departamento de Higiene de los Alimentos, Profesora Asociada del Departamento de Pediatría e Inmunología, Obstetricia y Ginecología, Nutrición y Bromatología, Psiquiatría e Historia de la Ciencia

León, España. Junio de 2014

Esta Tesis Doctoral estuvo financiada mediante los fondos obtenidos de:

Beca del Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) que otorga la Secretaría de Educación Pública (SEP), México.

Apoyo financiero recibido del Ministerio Español de Ciencia e Innovación (Proyecto AGL2010-19094), de la Junta de Castilla y León (Proyecto CSI263U13) y del proyecto intramural del Consejo Superior de Investigaciones Científicas CSIC(201240E105).

AGRADECIMIENTOS

“A veces el hombre más pobre deja a sus hijos la herencia más rica”

Ruth E. Renkel

En primer lugar, mi eterno agradecimiento a mi director de Tesis, el Dr. Javier Mateo Oyagüe, por todo el apoyo brindado desde un inicio para conseguir la beca PROMEP, por estar **SIEMPRE** al pendiente de cada detalle durante la realización de esta tesis, por animarme a seguir adelante y por todo el apoyo durante estos tres años, MIL GRACIAS!

A la Dra. Irma Caro, por estar siempre dispuesta a ayudar tanto de manera profesional como personal, y por hacerme sentir un poquito más cerca de mi país, MIL GRACIAS!

A Julio Claro, por su buena disposición como apoyo en los análisis de laboratorio, por las charlas sobre la historia de España, por las risas, por la música, por escucharme en los momentos de tristeza y de alegría, por ser tan buen amigo, MIL GRACIAS!

A Domingo Fernández, por estar siempre con buen ánimo y de alguna manera contagiarme, por su incomparable risa en los pasillos, por su buena vibra y por todo.

Al Dr. Javier Giráldez y su equipo de trabajo, por todo el apoyo y cooperación para llevar a cabo los análisis sensoriales en el Instituto Ganadero de la Montaña, así como proveer parte de la materia prima para llevar a cabo esta tesis.

A las personas que de una manera u otra apoyaron con la realización de este trabajo como lo fue Carolina Blanco y los chicos de Giner de los Ríos: Raúl, Alberto, Verónica y Laura.

A la Facultad de Veterinaria, Universidad de León, por haberme permitido usar de sus instalaciones y equipos. A todo el personal del Departamento de Tecnología de los Alimentos, por su amabilidad y apoyo: Ma. Eugenia, Lety, Bernardo, Montse, Merche, Jose Ma. Fresno, Dolores, Tania y Araceli. A las chicas que están en un camino similar al mío (el doctorado): Tamara, Patri, Isabel, Noelia, Erika y Aida; y no me olvido de Ana Fernández que fue una excelente compañera durante el tiempo que compartimos escritorio.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTAL, Unileon), en especial a Javi Sanz y Tiquio, por las facilidades brindadas para determinar los compuestos volátiles y llevar a cabo los análisis sensoriales. Gracias también a mi querida Diana Molina por ser tan linda compañera y amiga.

A CADA UNO de mis compatriotas, por hacerme sentir un poquito más cerca de mi México, lindo y querido.

A mis amigos que están o estuvieron en León: Luca, Laura, Leonardo, Claudia, Andrea, María, Diego, Adriana, Venis, Maiara, Svetlana y Lina (mi rusita rubia querida). A Félix Villafañe (*cazurro*) por los viajes compartidos, por las tardes de tapas, por los cafetines y por su ánimo. A Silvia por todas las charlas que muchas veces nos llevaron a las risas y otras veces a las lágrimas, por las tardes de tapas y por aquellas tardes de cine y exhibiciones de arte. A mis queridas profesoras de Inglés, Amor, Teresa y Bea, por su paciencia y amabilidad, MIL GRACIAS!

A todos mis amigos y compañeros de trabajo en México, en especial a Mario, Pako y al Dr. Guillermo, por su apoyo en la realización de diversos trámites referentes a mi doctorado. A Dana Hornstein que aún en la distancia seguimos con esta linda amistad.

A mi familia en Inglaterra, Mena, “Don” Norman y Nathan por todo su gran cariño y apoyo. Gracias también, a Charlotte y Rustom (los tíos), a Jane, Abbie y Henry, por todo el cariño y las atenciones.

A mi familia en México, a mis queridos padres Ma. Guadalupe y Luis, por ser el claro ejemplo de trabajo y esfuerzo y por ser simplemente todo para mí. A mis hermanos, Luis y Miguel, por estar siempre al pendiente de mí y apoyarme. A mi cuñada y mis queridos sobrinos Luis, Monse y Esmeralda, por todo su cariño, en especial a mi morenita chula, Monse, que siempre se preocupó de estar al pendiente para hablar por skype, MIL GRACIAS!

A Chris Shackley, por ser mi GRAN apoyo en este proyecto, por su enorme paciencia y por todo su cariño y amor, ILY, MIL GRACIAS!

INDICE GENERAL

RESUMEN	2
CAPÍTULO 1. INTRODUCCION GENERAL	26
CAPÍTULO 2. <i>The effect of the addition of sunflower soapstock to early fattening lambs' diet on volatile composition and lipid oxidative stability of lamb meat</i>	59
CAPÍTULO 3. <i>Effect of the addition of hop (infusion or powder) on the oxidative stability of lean lamb patties during storage</i>	78
CAPÍTULO 4. <i>Quality characteristics of a dry-cured lamb leg as affected by tumbling after dry-salting and processing time</i>	104
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES	132

RESUMEN

RESUMEN

Índice

	Página
1. Introducción general	3
2. Justificación	3
3. Objetivos	5
4. Capítulo 2. <i>Compuestos aromáticos y estabilidad a la oxidación de la carne de corderos alimentados con distintos niveles de oleína de girasol</i>	7
5. Capítulo 3. <i>Efecto de la adición de lúpulo (en infusión o en polvo) sobre la estabilidad oxidativa de hamburguesas de cordero durante su almacenamiento</i>	11
6. Capítulo 4. <i>Efecto del masajeo después del salado en seco y el tiempo de maduración sobre las características de calidad de una pierna cruda-curada de cordero</i>	16
7. Bibliografía	22

1. Introducción general

La presente tesis doctoral consta de tres trabajos de investigación sobre carne y productos cárnicos de ovino con valor añadido y se estructura en 5 capítulos: Capítulo 1, introducción (revisión bibliográfica); Capítulo 2, trabajo de investigación sobre los compuestos aromáticos y estabilidad a la oxidación de la carne de corderos alimentados con distintos niveles de oleínas; Capítulo 3, trabajo de investigación sobre la adición de lúpulo (en infusión o en polvo) sobre la estabilidad oxidativa de hamburguesas de cordero durante su almacenamiento; Capítulo 4, trabajo de investigación sobre el efecto del masaje después del salado en seco y el tiempo de maduración sobre las características de calidad de una pierna cruda-curada de cordero; Capítulo 5, Conclusiones. La introducción y las conclusiones están escritas en español y los trabajos de investigación en inglés.

2. Justificación

De acuerdo a las estadísticas relativas a la producción ganadera en España, el sector ovino-caprino, que representa el 8% de la producción final ganadera, no sale favorecido. La producción de ovino-caprino ha disminuido en los últimos años y el consumo de carne de ovino y caprino en España ha registrado en la última década una fuerte reducción. Ante este panorama, están surgiendo entre los agentes involucrados en el sector diferentes estrategias o iniciativas para mejorar la situación. Una de estas acciones se basa en la innovación y desarrollo enfocados hacia los productos cárnicos hechos con carne de cordero (Garnier, 2010; Linares et al., 2012; Cruz et al., 2013).

Un fundamento que sustenta esa acción es que “la disponibilidad de carne de cordero y derivados cárnicos adaptados a las demandas de los consumidores puede captar el interés en la población española y en general en la de toda la región Mediterránea, donde existe gran tradición en la producción ovina”. Es en este fundamento en el que se basa la justificación del presente trabajo de investigación y el que constituye su hilo conductor. El presente trabajo debe de entenderse como una acción más en la suma de esfuerzos de la gente interesada o involucrada en el sector ovino regional, que busca contribuir al desarrollo de dicho sector. En este contexto el presente estudio consta de tres líneas de trabajo relativos al desarrollo de carne y derivados de cordero con un valor añadido.

En la primera línea se ha trabajado con calidad de la carne de ovino procedentes de corderos alimentados con oleínas. Las oleínas son un subproducto de la industria del aceite. Se obtienen del aceite en el proceso de refinado, en el que se separan los ácidos grasos libres (responsables de la acidez de la grasa) de los acil-gliceroles por medio de la adición de NaOH, la centrifugación y decantación. A continuación, la pasta alcalina resultante se neutraliza con ácido sulfúrico, se lava para eliminar el exceso de ácido y se secan dando lugar a la oleína comercial, que se puede emplear para alimentación animal.

En la segunda línea se ha trabajado con hamburguesas de ovino adicionadas con lúpulo como compuesto rico en antioxidantes naturales. Las hamburguesas son productos muy populares y elaborados de muy diferentes maneras que capta la atención de muchos consumidores, entre otras cosas por ser fáciles y rápidos de preparar (Feiner, 2006; Cózar et al., 2013; Linares et al., 2012). Adicionalmente, el uso de antioxidantes naturales y especialmente de plantas con efecto antioxidante, como es el lúpulo, les proporciona a las hamburguesas un valor adicional que no solo se basa en el esperable aumento de su vida útil, sino el en potencial efecto beneficioso que los antioxidantes naturales pueden tener para la salud del consumidor (Zanoli y Zavati, 2008; Karre et al., 2013; Hygreeva et al., 2014). Finalmente, no hay que olvidar que el lúpulo es una materia prima producida en grandes cantidades en la provincia de León.

En la tercera y última línea se ha estudiado un producto cárnico crudo-madurado. Los productos cárnicos de ovino crudos-curados tienen una larga tradición pero su elaboración actualmente es escasa. La recuperación de los productos cárnicos crudos-curados con carne de ovino de carácter tradicional para su producción comercial, parece suscitar un interés creciente. Este interés se sustenta en el valor que otorgan los consumidores a la comida local y tradicional, y también a demanda social de mantener y fomentar mercados locales (McIntyre y Rondeau, 2011). En este sentido, hay iniciativas empresariales en el norte de Europa y también en España para producir productos cárnicos crudos-curados de ovino. En España también se contempla la oportunidad de producir productos cárnicos crudos-curados de ovino para su exportación a países del norte de África, donde la demanda de estos productos puede ser elevada. Por ejemplo, en los medios de comunicación nacionales, recientemente, se ha hablado de una empresa Balkis Gourmet que está elaborando “jamones de ovino” en Andalucía. Este proyecto cuenta con el apoyo del Centro Tecnológico Andaluz del Sector Cárnico y de

la Sociedad Cooperativa Andaluza Comercializadora de Criadores de Ovino Ecológico de la Sierra de Loja (Covecol). http://economia.elpais.com/economia/2014/03/18/agencias/1395157123_583646.html.

Todas estas líneas de trabajo han surgido, se han diseñado y se han desarrollado de forma coordinada entre el grupo de investigación de alimentos de origen animal de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León y el Instituto Ganadero de Montaña (IGM). El IGM es un instituto mixto de investigación constituido por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y la Universidad de León. Su sede está en la Finca Marzanas en Grulleros (León) y su objetivo investigador es la modernización de la gestión y la tecnología de los sistemas agroganaderos y de pastoreo tradicionales. El trabajo de investigación que se presenta se ha llevado a cabo principalmente en el área de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León, aunque la cría de los corderos cuya carne se utilizó en los experimentos, su sacrificio, el muestreo de las piezas cárnicas, han sido realizadas por parte del personal de CSIC del IGM.

3. Objetivos

Los objetivos específicos de la tesis se han planteado de forma individual para cada línea de trabajo tal y cómo se describe a continuación.

Carne de corderos alimentados con oleínas

La hipótesis de este estudio fue que la adición de oleínas en la dieta puede modificar el perfil lipídico y el contenido en antioxidantes de la carne y por lo tanto el perfil de compuestos volátiles de la carne y su estabilidad oxidativa. Consecuentemente, el objetivo de este trabajo de investigación fue conocer el perfil volátil de la carne de cordero cocinada y la estabilidad a la oxidación de la carne de cordero durante su almacenamiento a refrigeración en función de la alimentación de los corderos, que fueron alimentados con distintos niveles de oleínas de girasol, un sub-producto comercial.

Hamburguesa con lúpulo

El lúpulo es rico en polifenoles y se ha demostrado su acción antioxidante *in vitro* y en la cerveza. Por otra parte, el lúpulo tiene un sabor característico, aromático y amargo. Hay numerosos estudios orientados a probar el efecto antioxidante de plantas como orégano, clavo, té, en carne y productos cárnicos. En este contexto, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de lúpulo como ingrediente con propiedades antioxidantes sobre el sabor y la estabilidad a la oxidación de las hamburguesas de cordero, tanto la oxidación lipídica, como la del color o de las proteínas. Se utilizaron dos formas de adición del lúpulo, una fue la adición de infusión de lúpulo y la otra la adición de lúpulo en polvo.

Producto cárnico crudo-curado

Los productos cárnicos de pieza entera de carne de cerdo y vacuno (jamón, paletilla, cecina) son conocidos y populares. Sin embargo, los productos cárnicos de pieza entera elaborados con carne de ovino, aunque se han hecho de forma tradicional desde hace mucho tiempo y aún en día se hacen en ciertas regiones del medio rural en España y otros países europeos, no son muy conocidos y han sido muy poco estudiados. El primer objetivo del estudio fue desarrollar el proceso de elaboración de una pierna crudo-curada de cordero y describir sus características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales a diferentes tiempos de procesamiento. El segundo objetivo fue evaluar el efecto de la inclusión de un proceso de masajeo a vacío justo después de salar, sobre las características ya mencionadas comparando las piernas masajeadas con las no masajeadas. El proceso de masajeo rompe la estructura muscular y puede modificar las cinéticas de salado y secado y la actividad enzimática por lo que puede generar cambios relevantes en la calidad de los productos cárnicos crudo-curados.

4. Capítulo 2. Compuestos aromáticos y estabilidad a la oxidación de la carne de corderos alimentados con distintos niveles de oleína de girasol

En este capítulo se han determinado los compuestos aromáticos y la estabilidad de la oxidación lipídica de la carne cocinada procedente de corderos alimentados con distintos niveles de oleínas de aceite de girasol (un subproducto de la industria del aceite). Este estudio forma parte de un estudio más complejo en el que se evalúa el efecto del uso en la dieta de oleínas de aceite de girasol sobre la digestibilidad de la dieta, los rendimientos productivos de la cría de los corderos, la calidad de la canal y de la carne obtenida de los mismos (componentes mayoritarios, ácidos grasos, dureza, color, etc.). La cría de los animales y los análisis y determinaciones, a excepción de los aquí mostrados, se llevan a cabo en el Instituto Ganadero de Montaña.

Material y métodos

En el estudio se utilizaron 32 músculos *bíceps femoris* provenientes de corderos machos de la raza Merino, que fueron proporcionadas por el Instituto Ganadero de Montaña (IGM; Grulleros, León), en donde los animales fueron criados, alimentados y sacrificados. Los animales, a partir del destete, con 16 kg de peso corporal, fueron alimentados a base de una ración mixta completa preparada en pellets durante todo el período experimental. Los corderos se criaron en corrales individuales y fueron asignados al azar a uno de cuatro grupos diferentes (ocho corderos por tratamiento) de acuerdo a la cantidad de oleínas de girasol ofrecidas en la dieta: 00SS (0 g oleínas de girasol/kg), 15SS (15 g oleínas de girasol/kg), 30SS (30 g oleínas de girasol/kg) y 60SS (60 g oleínas de girasol/kg). La disponibilidad de alimento y agua fue *ad libitum*. Los corderos se sacrificaron cuando alcanzaron 27 kg de peso corporal. Las canales enteras se enfriaron a 4 °C durante 24 horas, y después se separaron las piernas izquierdas y de éstas se obtuvieron los músculos *bíceps femoris*, que en laboratorio de Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria se envasaron al vacío, para posteriormente, ser congelados y almacenados a -47 °C hasta el día de los análisis.

Para su análisis, los músculos se descongelaron a 4 °C durante toda la noche y cada músculo se cortó en tres porciones transversales: proximal (1 cm), central (la más larga) y distal (1 cm). Las porciones proximal y distal fueron descartadas y la porción central fue cocinada después del corte en bolsas herméticas de polietileno durante 40

min en un baño a 75 °C, hasta que la muestra alcanzó una temperatura interna de 70 °C. Después de la cocción, la porción se cortó, transversalmente con respecto al eje longitudinal, en rebanadas de 1,5 cm. Dos rebanadas fueron envasadas al vacío y almacenadas (-47 °C, hasta diez días) y posteriormente se utilizaron para el análisis de compuestos volátiles y de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Otra rebanada se utilizó en el momento para realizar sobre ella prueba de estabilidad a la oxidación lipídica inducida por el hierro que consistió en el análisis de TBARS sobre una dispersión de muestra adicionada con una sal férrica y agua oxigenada, en distintos tiempos de incubación a 37 °C (varias horas). Otra rebanada más se envolvió en una película de polietileno permeable al oxígeno y se almacenó en una cámara de refrigeración durante 48 horas, con iluminación periódica cada 12 horas para simular las condiciones de un expositor de venta de carne. Sobre esta rebanada se realizó en análisis de TBARS al final del período de almacenamiento. Los compuestos volátiles de la carne cocinada se determinaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. La extracción de los volátiles se llevó a cabo mediante microextracción en fase sólida (SPME) en el espacio de cabeza con una fibra de Carboxen-PDMS de 75 µm. La medición del TBARS se realizó siguiendo el método descrito por Nam y Ahn (2003).

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza. En el caso de los volátiles el análisis de varianza fue de una vía, siendo la alimentación el factor de variación. En el caso de los análisis del TBARS, el análisis de varianza fue de dos vías, siendo la alimentación de los corderos y el tiempo (de incubación o de almacenamiento) los factores a analizar.

Resultados

Los compuestos volátiles más abundantes en la carne de cordero cocinada, independientemente del tratamiento de la dieta, fueron los aldehídos seguidos de los alcoholes. El tercer y cuarto grupo en abundancia fueron los hidrocarburos alifáticos y las cetonas, mientras que el quinto y sexto grupo fueron los furanos (2-pentilfurano) y los ácidos grasos. La totalidad de los volátiles de los grupos mencionados provienen de la degradación de lípidos (hidrólisis, descarboxilación y oxidación) durante la cocción de la carne (Nawar, 1969; Frankel, 1982; Sivadier et al., 2008). El tratamiento dietético

(adición de oleínas) afectó los niveles de algunos compuestos volátiles derivados de los lípidos. Los niveles de hidrocarburos alifáticos de cadena lineal, fueron más altos en la carne de los animales que recibieron en su dieta oleínas de girasol que en los controles. Se encontraron mayores cantidades de hidrocarburos y de undecano, el hidrocarburo más abundante, en la carne de los tratamientos 15SS y 30SS que en la carne del tratamiento control. No obstante, la diferencias entre las muestras control y las del grupo 60SS no fueron significativas. También se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para los contenidos de otros volátiles derivados de la degradación de los lípidos tales como 2-heptenal, 2-heptanona, 6-metil-2-heptanona, 1-hexanol, 1-octen-3-ol, 1-octanol y 2-pentilfurano. Sin embargo, las diferencias obtenidas no permitieron diferenciar claramente entre las muestras control y las muestras con oleínas de girasol. En otras palabras, no se pudo relacionar la presencia o cantidad de oleínas en la dieta con la abundancia de aquellos compuestos volátiles, con excepción de 1-octanol que incrementó sus niveles en la carne al incrementarse el nivel de las oleínas en la alimentación.

Por otra parte, el uso de oleínas en la dieta mostró un efecto significativo sobre la suma de los compuestos bencénicos y quinonas, con niveles más altos en las muestras con oleínas que en las muestras control. En este sentido, el Tolueno, el etilbenceno y 2,6-di-terc-butilquinona (DTBQ) no se detectaron a niveles cuantificables en las muestras control (sin oleínas en la dieta de los animales), mientras que en las muestras con oleínas fueron detectados (aunque en cantidades moderadas, entre 10 a 20 ng de undecano por gramo de carne). Además, los niveles medios de benzaldehído fueron más altos en las muestras con oleínas que en los controles, aunque las diferencias no fueron significativas. Hasta donde se ha podido averiguar, la presencia de DTBQ no ha sido descrita previamente en la carne de cordero. La presencia de este compuesto se ha descrito en grasas y aceites y su origen se atribuye al resultado de la degradación de di-terc-butylhidroxitoluene (BHT) utilizado como aditivo antioxidante (Shahidi et al., 1992). La deposición tisular de DTBQ procedente de las oleínas de la dieta puede ser el origen de DTBQ en la carne de cordero estudiada. Esto es debido a que las oleínas de girasol tenían BHT como aditivo. El BHT también se detectó en las muestras de carne; no obstante, sus niveles estuvieron debajo del límite de cuantificación (8 ng undecano/g).

Los valores TBARS de la carne cocinada almacenada a refrigeración con iluminación no mostraron diferencias significativas entre tratamientos (alimentación con oleínas). Sin embargo, el análisis de TBARS en las muestras incubadas con sal de hierro y agua oxigenada (oxidación lipídica inducida), sí ofreció diferencias significativas. La carne de los animales control (sin oleínas) presentó mayores niveles de TBARS (fue menos estable a la oxidación inducida por el hierro) que la carne de animales alimentados con oleínas. Esta diferencia puede atribuirse parcialmente al contenido de antioxidantes en las oleínas (como el BHT). La discrepancia entre los resultados del análisis de TBARS en carne almacenada (no hubo diferencias entre tratamientos) y los resultados del análisis de TBARS inducido por el hierro (sí hubo diferencias a favor de los controles), puede explicarse por diferencias asociadas al proceso analítico y relativas al mecanismo de oxidación lipídica (catalizadores, temperatura, tiempo) y también por una eventual degradación de la capacidad antioxidante de la carne cocinada durante su almacenamiento.

5. Capítulo 3. Efecto de la adición de lúpulo (en infusión o en polvo) sobre la estabilidad oxidativa de hamburguesas de cordero durante su almacenamiento

En este capítulo se estudió el efecto de la adición de lúpulo, en infusión o en polvo, en hamburguesas de cordero sobre su oxidación lipídica, proteica y de pigmento cárnico durante el almacenamiento de las mismas a refrigeración o congelación, crudas o cocinadas. También se realizaron análisis sensoriales para evaluar el efecto del lúpulo sobre la aceptabilidad sensorial de las hamburguesas. Esta parte del capítulo ha sido enviada a la revista *Food Chemistry*.

Material y métodos

Se utilizó en este estudio la carne proveniente de 21 piernas de cordero de otros tantos animales. Las piernas procedieron del Instituto Ganadero de Montaña (IGM), en donde los animales fueron criados, alimentados y sacrificados. Los corderos fueron destetados (6-8 semanas de edad con un promedio en peso corporal de $14 \pm 0,2$ kg) y luego alojados en corrales individuales donde permanecieron hasta alcanzar aproximadamente 24 kg de peso corporal. Los animales se sacrificaron cuando alcanzaron el peso deseado. Las canales se refrigeraron a 4 °C durante 24 h, y luego se partieron a la mitad y se separaron las piernas del lado izquierdo.

Las 21 piernas se asignaron aleatoriamente a uno de dos experimentos: Experimento 1 (n = 10) y Experimento 2 (n = 11). Para todas las piernas se obtuvieron los siguientes grupos de músculos: *M. bíceps femoris* y *M. semitendinosus*; *M. rectus femoris*, *M. vastus intermedius*, *M. vastus lateralis* y *M. vastus medialis*; y *M. Adductor*, *M. Gracilis*, *M. Semimembranosus*, *M. Pectíneus* y *M. Sartorius*. Los músculos de cada pierna se envasaron al vacío y se mantuvieron congelados (-47 °C) para su posterior procesamiento (hasta cinco meses). Los músculos se descongelaron a 4 °C un día antes de la preparación de las hamburguesas. Entonces, para los músculos de cada pierna la grasa y el tejido conectivo visibles se retiraron y la carne fue cortada en cubos y picada en una picadora de carnicería a través de una placa perforada de 9 mm. La carne picada se mezcló manualmente y 30 g de muestra fue usada para el análisis de los componentes mayoritarios.

Por otra parte se preparó lo siguiente. Una infusión de lúpulo que se preparó inmediatamente antes de su uso, a partir de 2 g de lúpulo y 50 ml de agua destilada

hirviendo por 2 minutos. Una dispersión de lúpulo preparada inmediatamente antes de usar, mezclando 2 g de lúpulo con 50 ml de agua destilada con un ultraturrax T18 (IKA Labortechnik, Staufen, Alemania) por 1 minuto a 6,500 rpm. Una solución de ascorbato de sodio, disuelto en agua destilada a una concentración de 0,5g/50ml. El lúpulo (*Humulus lupulus* L.) utilizado en el experimento fue de la variedad Nugget y fue proporcionado por la Sociedad Española de Fomento del Lúpulo (León, España).

El Experimento 1, se puede considerar como un experimento preliminar. Las 10 piernas usadas se consideraron como unidades experimentales. Las piernas se asignaron a tres lotes (dos lotes compuestos de tres piernas y otro lote compuesto de cuatro piernas) al igual que las hamburguesas, las cuales se prepararon a partir de los músculos de cada pierna en tres diferentes días de procesamiento (uno por lote). A la carne picada de cada una de las piernas del experimento se les adicionó sal y el conjunto fue dividido en tres partes iguales: a una se le adicionó agua (50 ml/kg; CONTR1), a otra parte la infusión de lúpulo (HOPINF1) y a la tercera parte la solución de ascorbato de sodio como antioxidante (NaASC). Después, se formaron las hamburguesas, se cocinaron y se almacenaron en refrigeración por 3 días. Sobre las hamburguesas almacenadas se determinó el contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), los niveles de carbonilos de las proteínas y la intensidad del sabor a oxidado (análisis sensorial; prueba de ordenación).

En el experimento 2, los músculos a partir de once piernas se usaron en este experimento. Las piernas se asignaron a tres lotes (dos lotes compuestos de cuatro piernas y otro lote compuesto de tres piernas) al igual que las hamburguesas, las cuales se prepararon a partir de los músculos de cada pierna en tres diferentes días de procesamiento (uno por lote). A la carne picada de cada una de las piernas se les adicionó sal y pimienta, y el conjunto fue dividido en tres partes iguales incorporando en una parte agua (50 ml/kg; CONTR2), en otra la infusión de lúpulo (HOPINF2) y en la tercera la dispersión de lúpulo en polvo (2 g/kg de hamburguesa; HOPPOW). Después se formaron las hamburguesas. Una parte de las hamburguesas obtenidas de cada pierna fue cocinada mientras que otra se mantuvo cruda. Una hamburguesa cocinada se congeló a -47 °C para su posterior análisis sensorial y otra hamburguesa cocinada se mantuvo almacenada a refrigeración durante tres días. Por otra parte, una hamburguesa y media en crudo se almacenaron a refrigeración hasta 7 días y media hamburguesa cruda se almacenó durante 90 días a refrigeración (-18 °C).

En las hamburguesas cocinadas, antes de su almacenamiento, se determinaron las pérdidas por cocimiento y la intensidad de sabor a lúpulo (prueba sensorial de ordenación) y aceptación sensorial (prueba hedónica de preferencia). En las hamburguesas cocinadas almacenadas a refrigeración se determinaron los valores de TBARS analizados al día 1 y 3 de almacenamiento.

En hamburguesas crudas almacenadas en refrigeración, se determinaron los niveles de TBARS, pH y color instrumental en los días 1, 3 y 7 de almacenamiento. Por otra parte, en las hamburguesas crudas almacenadas congeladas, se determinaron (después de su descongelación) los niveles de TBARS, el pH, el color instrumental y la carbonilación de las proteínas.

Resultados

Experimento 1

En el experimento 1 (experimento preliminar), las hamburguesas con infusión de lúpulo (HOPINF1) mostraron valores más bajos en TBARS que las control CONTR1, pero los niveles de TBARS en las hamburguesas con infusión fueron más altos que las hamburguesas con ascorbato (NaASC) ($P<0.05$). Por tanto, la adición de lúpulo mejoró la estabilidad oxidativa en hamburguesas cocinadas y almacenadas en refrigeración, pero no al mismo grado que la adición de ascorbato de sodio. El efecto antioxidante de la infusión de lúpulo sobre lípidos del músculo podría ser atribuido a sus compuestos fenólicos, los cuales parecen ser responsables del poder reductor del lúpulo (Lermusieau et al., 2001). Además, los ácidos amargos del lúpulo podrían también contribuir a dicho efecto antioxidante (Tagashira et al., 1995).

Además, el efecto de infusión de lúpulo sobre los niveles de carbonilos de las proteínas, también fue significativo. Las hamburguesas con infusión mostraron valores más bajos que las control (tendencia a significación estadística; $P<0.1$) y que las hamburguesas con ascorbato ($P<0.05$). Los polifenoles del lúpulo pueden ser responsables de la mayor estabilidad oxidativa de las proteínas mostrada por las hamburguesas con infusión. Por el contrario, el ascorbato habría incrementado la oxidación proteica, rindiendo así niveles más altos de carbonilos con respecto a las otras hamburguesas.

Por otra parte, los panelistas fueron capaces de diferenciar las hamburguesas control como aquellas con mayor intensidad de sabor a oxidado ($P<0.05$), esto con respecto a las hamburguesas con infusión y con ascorbato, las cuales no pudieron ser diferenciadas entre sí. Este resultado indica que la incorporación de infusión de lúpulo redujo el sabor a oxidado de las hamburguesas cocinadas almacenadas durante 3 días a refrigeración con respecto a las hamburguesas control.

Experimento 2

En el experimento dos, en las hamburguesas crudas almacenadas a refrigeración, los análisis de TBARS mostraron que el uso de lúpulo (infusión o en polvo) incrementó la estabilidad a la oxidación lipídica, puesto que los valores de TBARS en hamburguesas con lúpulo fueron menores que los de las hamburguesas control ($P<0.05$). No obstante, el efecto estabilizante del lúpulo en polvo fue significativamente más fuerte que el ejercido por el de la infusión de lúpulo. La estabilidad del color también fue mejorada por la adición de lúpulo, siendo comparable el efecto mostrado por la infusión con el mostrado por el lúpulo en polvo. De esta forma las hamburguesas adicionadas con lúpulo presentaron mejores valores en las características del color responsables del color rojo: valores más altos en a^* , a^*/b^* y el cociente entre la reflexión a 630 y 580 nm ($R_{630/580}$). Por otra parte, la adición de lúpulo en polvo incrementó la coloración amarillenta de las hamburguesas.

La adición de lúpulo (infusión o polvo) sobre las características de hamburguesas crudas almacenadas a congelación, también mostró un efecto positivo sobre la estabilidad oxidativa de los lípidos y el color. La adición de lúpulo disminuyó los valores TBARS y mejoró el color rojo de las hamburguesas. No obstante, el efecto protector del lúpulo a la oxidación de las hamburguesas durante la congelación fue inferior al observado en las hamburguesas durante su almacenamiento a refrigeración. Los carbonilos de las proteínas (oxidación proteica) no se vieron afectados significativamente por la adición de lúpulo.

En las hamburguesas cocinadas la incorporación de lúpulo también mejoró la estabilidad lipídica oxidativa. Como en los resultados presentados anteriormente, el lúpulo en polvo mostró un efecto más marcado que la infusión de lúpulo. El efecto del lúpulo en polvo sobre la disminución de los niveles de TBARS esto con respecto a las

hamburguesas control después de 3 días de almacenamiento, fue comparable con el ejercido por el ascorbato de sodio en el experimento 1.

Finalmente, de los análisis sensoriales las hamburguesas con lúpulo se obtuvieron los siguientes resultados: a) el panel de catadores es capaz de diferenciar por su sabor a lúpulo entre las hamburguesas con lúpulo en polvo y las hamburguesas con infusión y control (estas últimas no se diferenciaron entre sí por su sabor a lúpulo), b) los consumidores valoraron el sabor de las hamburguesas con lúpulo en polvo con una puntuación ligera pero significativamente menor que aquellas con las que valoraron las hamburguesas con infusión y las control (estas dos recibieron puntuaciones similares). El sabor de la hamburguesa con lúpulo en polvo recibió una puntuación promedio de 4.3 puntos sobre nueve, mientras el de las hamburguesas control y con infusión recibieron ambas una puntuación de 5.1 puntos.

6. Capítulo 4. Efecto del masajeo después del salado en seco y del tiempo de maduración sobre las características de calidad de una pierna cruda-curada de cordero

En este capítulo se evaluó el efecto del tiempo de maduración y el masajeo sobre las características microbiológicas, químicas y sensoriales de las piernas crudas-curadas de cordero elaboradas en unas condiciones determinadas. Esta parte del capítulo ha sido publicada en la revista *Meat Science* (Villalobos-Delgado et al., 2014).

Material y métodos

El estudio se llevó a cabo con 27 piernas provenientes de 14 corderos de la raza Merino proporcionadas por el Instituto Ganadero de Montaña (IGM), en donde los animales fueron criados, alimentados y sacrificados. Los corderos fueron destetados a las 6-8 semanas de edad, con un peso corporal promedio de $14 \pm 0,2$ kg y alojados en corrales individuales donde permanecieron durante todo el período experimental. Los corderos fueron alimentados a base de una ración mixta completa (RMC) (18% proteína cruda relación paja de cebada / alimento concentrado de 15 / 85) *ad libitum*. Cuando los animales alcanzaron el peso corporal deseado (27 kg), fueron sacrificados. Las canales fueron refrigeradas a 4 °C durante 24 h y en ese momento se obtuvieron las piernas que se llevaron a laboratorio de Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria donde fueron inmediatamente fueron congeladas (-18 °C) y mantenidas en congelación por 4-6 meses.

Antes de su procesado, las piernas se asignaron al azar a tres lotes de nueve piernas. Cada lote fue procesado en un día diferente. El día anterior a su procesado, las piernas de cada lote fueron descongeladas a 8 °C durante 24 horas. Una vez descongeladas, se llevó a cabo el proceso de recorte o perfilado de cada pierna y se tomó su peso. El salado fue llevado a cabo en dos etapas. La primera se realizó frotando manualmente sobre las piernas con una mezcla de curado (45 g/kg de pierna), conteniendo NaCl (89.3%), nitrato de potasio (1.8%), ascorbato de sodio (2.2%) y dextrosa (6.7%), manteniendo las piernas durante 6 horas en una cámara de refrigeración a 4 °C. En la segunda etapa las piernas fueron cubiertas con una capa de sal gruesa y mantenidas en sal durante 12 horas a 4 °C. Después del salado, las piernas se lavaron con agua corriente y se colgaron durante 5 horas a temperatura ambiente (15

°C), para su escurrido. Las piernas saladas fueron divididas en 3 grupos (3 piernas por grupo) y cada grupo fue sometido a diferentes tratamientos de masaje usando en su caso una masajeadora de jamón: no masajeo (CONTROL), masajeo corto (ST; 100 min a 10 rpm) y masajeo largo (LT; 200 min a 10 rpm). El masajeo fue llevado a cabo con las piernas envasadas al vacío a 8 °C. Tras el masajeo se sacaron las piernas de las bolsas y se colgaron en una cámara de maduración a 9,5 °C y a 78% de humedad relativa (RH) durante 40-43 días, el tiempo necesitado para conseguir en las piernas la pérdida de peso programada (33%). Entonces, las piernas fueron envasadas al vacío para detener el proceso de secado y así fueron mantenidas madurando en las bolsas a 15 °C durante 30 días adicionales (un período total de maduración de 70-73 días de maduración a partir del salado).

El muestreo tuvo un diseño completamente al azar con tres lotes de fabricación (réplicas) de nueve piernas y tres grupos de tres piernas por lote (cada grupo fue asignado a un tratamiento de masajeo). Por cada lote, una pierna de cada tratamiento de masajeo fue muestreada al día 1 de maduración, otra al día 22 y otra al final del período de maduración (día 71).

Después, se extrajeron de las piernas algunos músculos o grupos musculares para los análisis. El *M. Biceps femoris* fue usado para el análisis sensorial y el *M. Adductor* para análisis de perfil de textura (dureza, elasticidad, cohesividad y masticabilidad). El *M. Semimembranosus* fue cortado transversalmente en dos mitades para la medida del color (L^* , a^* y b^*) en las superficies del corte y posteriormente se usó para los análisis de pH, humedad, proteína, grasa, cenizas, ácidos grasos libres (AGL), nitrógeno soluble en agua y compuestos volátiles (estos últimos analizados por la técnica de espacio de cabeza estático y cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas).

El *M. Quadriceps femoris* (*M. rectus femoris*, *M. vastus intermedius*, *M. vastus lateralis* y *M. vastus medialis*) se cortó en 3 secciones perpendiculares a lo largo del eje longitudinal: sección proximal (1 cm), central (el más largo) y distal (2 cm). Las secciones proximal y distal fueron descartadas y la sección central fue transversalmente cortada a la mitad (obteniendo la sección centro-distal y la sección centro-proximal). A su vez, ambas secciones fueron cortadas en dos porciones (externa e interna), con la porción externa (capa superficial) de 1 cm de espesor. Las partes externa e interna de la sección centro-distal se usaron para realizar análisis microbiológicos (Cocos Gram-

positivos catalasa-positivos; bacterias ácido-lácticas; MRS) y las partes externa e interna de la sección centro-proximal para los análisis de cloruros, humedad y actividad de agua (a_w). La división entre parte externa e interna se llevo a cabo para evaluar diferencias eventuales en las características analizadas entre la parte interior y exterior del músculo (ejemplo: diferencias en el contenido microbiológico en la parte externa y parte interna del músculo).

Algunos análisis se llevaron a cabo en el momento de la obtención de los músculos (color, a_w , cloruros, contenido microbiano, textura) y otros se dejaron para un momento posterior. En estos casos las muestras fueron envasadas a vacío y congeladas a -47°C hasta llevar a cabo los análisis. Antes de los análisis, los músculos fueron descongelados toda la noche a 4°C y entonces fueron picados en un procesador de alimentos.

El análisis sensorial consistió en un análisis sensorial descriptivo cuantitativo que a diferencia del resto de los análisis, realizados en pierna de 1, 22 y 71 días de maduración, solo se llevó a cabo en pierna madurada (71 días de maduración). Los descriptores evaluados fueron aquellos relacionados con el secado, la proteólisis y la lipólisis: sabor salado, sabor amargo, gusto a cordero, sensación picante, dureza, jugosidad y pastosidad. Tales descriptores fueron puntuados sobre una escala lineal de 5 puntos, donde 1 representó la ausencia o muy baja intensidad de un sabor específico o un descriptor de textura y 5 una muy alta intensidad.

Con los resultados se llevó a cabo un análisis estadístico mediante análisis de varianza (procedimiento mixto) donde tratamiento de masajeo, tiempo de maduración y la interacción masajeo x tiempo de maduración fueron los efectos fijos y el lote de elaboración fue un efecto aleatorio.

Resultados

Las características microbiológicas y químicas de la pierna de cordero cambiaron como era de esperar con el tiempo de maduración. Por el contrario, no se encontró efecto significativo debido al masajeo, ni a la interacción masajeo x tiempo.

Los recuentos microbiológicos en las piernas de cordero incrementaron del día 1 al 22 ($P < 0,05$) y permanecieron constantes hasta el final del período de maduración. Los cocos Gram-positivos catalasa-positivos llegaron a ser el grupo microbiano

predominante. Sus niveles medios y también aquellos de las bacterias ácido lácticas fueron numéricamente más altos en la capa exterior que en la interior.

El contenido de humedad disminuyó a través del tiempo, lo que estuvo acompañado de un incremento en los niveles de cloruros y una disminución de la a_w . Después del secado, la a_w en piernas de cordero crudo-curadas alcanzó niveles por debajo de 0.90, lo que garantiza su estabilidad microbiológica. También el pH y los contenidos de proteína, grasa y cenizas incrementaron durante el tiempo de maduración. Con respecto al pH, el resultado puede ser atribuido a la proteólisis y a la producción relacionada de compuestos básicos (Kaban, 2009). El incremento en la proteólisis en la pierna de cordero pudo ser evidenciada por el incremento ($P < 0,05$) del nitrógeno soluble en agua en relación al tiempo de maduración, ya que este parámetro se puede utilizar como índice de proteólisis (García de Fernando y Fox, 1991). Además, los niveles de los ácidos grasos libres (AGL) totales, los cuales indican lipólisis, se triplicaron durante la maduración. Este incremento fue más alto para los AGL poliinsaturados (aproximadamente 5 veces) que para los AGL monoinsaturados y saturados (AGLS). Esto indica que durante la maduración de la carne la hidrólisis de fosfolípidos, más ricos en AGL poliinsaturados, fue mayor que la de los triglicéridos, con menor cantidad de AGL poliinsaturados.

Se identificaron un total de 60 compuestos volátiles en el espacio de cabeza de la pierna cruda-curada de cordero. Los volátiles fueron divididos en las siguientes familias químicas: aldehídos de cadena lineal (18), alcoholes (7), cetonas (8), hidrocarburos alifáticos (6), furanos y lactonas (5), ácidos grasos y ésteres (9), aldehídos de cadena ramificada (1), compuestos bencénicos (5) y compuestos terpénicos (1). Además, 9 compuestos no pudieron ser identificados.

Los compuestos más abundantes en las piernas crudo-curadas de cordero fueron los aldehídos de cadena lineal seguidos de los alcoholes, cetonas y compuestos bencénicos. Los aldehídos de cadena lineal, alcoholes y cetonas, junto con los hidrocarburos y el 2-pentilfurano, han sido relacionados a la degradación lipídica (Frankel, 1982; Hierro et al., 2004). La presencia y niveles de los volátiles derivados de compuestos de la oxidación lipídica, especialmente aldehídos de cadena corta, tales como cetonas o 1-octen-3-ol, son relevantes para el sabor de productos cárnicos crudo-madurado debido a su bajo umbral de percepción y sus distintivas características de olor (Dirinck et al., 1997; Pugliese et al., 2010).

El tiempo de maduración mostró un efecto significativo en el perfil volátil de las piernas crudo-curadas de cordero. Disminuyeron significativamente los niveles de muchos de los volátiles derivados de los lípidos. Por ejemplo, disminuyeron los niveles de la suma y la mayoría de los aldehídos de cadena lineal y los alcoholes, así como los de la cetona más importante, la 2,3-octanodiona. No obstante, los niveles de la suma de hidrocarburos, y del pentadecano, tetradecano y 2-pentilfurano no cambiaron con el tiempo ($P > 0,05$), mientras que el undecano y cuatro de ocho cetonas detectadas (2-hexanona, 2-heptanona, 2-nonanona y 2-undecanona) incrementaron ($P < 0,05$). También se observó de forma destacable un incremento con relación al tiempo en los niveles de dos volátiles atribuibles a la degradación de Strecker (3-metilbutanal, formado a partir de la leucina y el fenilacetaldehído, formado a partir de la fenilalanina). Asimismo, en este estudio, los ácidos grasos libres y los ésteres incrementaron a través del tiempo de maduración. Los ácidos grasos libres son formados por lipólisis y los alquil ésteres por esterificación microbiana durante la maduración (Hierro et al., 2004). Los ésteres tienen bajo umbral de olor y han sido asociados al sabor madurado en productos cárnicos curados (Sabio et al., 1998; Hierro et al., 2004;). Igualmente, las lactonas incrementaron con el tiempo de maduración. La existencia de lactonas ha sido atribuida a la degradación lipídica o la lactonización por deshidratación y ciclización de hidroxiácidos que aparecen de forma natural. Las lactonas son compuestos muy potentes de aroma (Dirinck et al., 1997); sin embargo, su contribución al aroma de los productos cárnicos curados no ha sido aún bien establecida (Andrés et al., 2002).

Por otra parte, el masajeo no tuvo efecto significativo sobre los compuestos volátiles. No obstante, la presencia de 3- metil butanal sólo fue detectada en las muestras masajeadas y no en las piernas control. Este resultado indica que el masajeo fue un factor de incremento de la degradación de Strecker de la leucina, causando que la presencia de 3- metil butanal en las piernas masajeadas estuviese por encima de los niveles de detección, con respecto a las piernas no masajeadas. El daño estructural del músculo y la grasa asociados a la acción mecánica del masajeo podría ser la causa de la aparición del 3-metil butanal en piernas masajeadas, el cual a su vez podría tener un efecto sobre el sabor de las piernas tomando en cuenta su bajo umbral de percepción olfativa (Andrés et al., 2002).

Para la evaluación de textura, con respecto al tiempo de maduración, los datos mostraron que la dureza y masticabilidad disminuyeron. La disminución en la dureza

fue significativa del día 1 al 22 y la de la masticabilidad del día 22 al 71. Por otra parte, la elasticidad y la cohesividad presentaron los valores más altos al día 22 ($P < 0,05$). Los cambios en las características de textura en los productos cárnicos crudos-curados dependen tanto del contenido de agua como de la integridad de las proteínas (Monin et al., 1997; Laureati et al., 2014). Por otra parte, L^* y b^* tendieron a disminuir ($P < 0,1$) durante la maduración, mientras que el valor de a^* tendió a incrementar del día 22 al 71 ($P < 0,1$). Finalmente, no se detectaron diferencias entre los tres tratamientos de masajeo en la determinación instrumental de la textura, ni en el color.

Con respecto al análisis sensorial del producto final, el masajeo no ejerció efecto significativo sobre las características del sabor. No obstante, con respecto a la textura, la pastosidad mostró los valores más altos en las piernas masajeadas que en las controles. La pastosidad en exceso puede ser considerada como un defecto de textura de los productos cárnicos crudos-curados, asociado con una terneza excesiva y una pérdida de elasticidad (García-Garrido et al., 1999; Arnau et al., 2007). Tanto la terneza como pastosidad han sido relacionadas a una alta actividad proteolítica. Sin embargo, en este estudio, la alta pastosidad encontrada en las piernas masajeadas no puede ser atribuida a la proteólisis, teniendo en cuenta que los niveles de nitrógeno proteico soluble no fueron afectados por el masajeo. En cambio, sí puede atribuirse a la disrupción de las células y estructuras histológicas del músculo o a la extracción de las proteínas solubles en sal (Plimpton et al., 1991). Debido a la corta diferencia en la puntuación de pastosidad entre piernas masajeadas y no masajeadas (un punto aproximadamente) y el hecho de que la textura instrumental no fuese afectada por el masajeo, la mayor pastosidad de las piernas masajeadas podría no ser considerada como un defecto sensorial.

7. Bibliografía

- Andrés, A. I., Cava, R., & Ruiz, J. (2002). Monitoring volatile compounds during dry-cured ham ripening by solid-phase microextraction coupled to a new direct-extraction device. *Journal of Chromatography A*, *963*, 83-88.
- Arnau, J., Serra, X., Comaposada, P., Gou, P., & Garriga, M. (2007). Technologies to shorten the drying period of dry-cured meat products. *Meat Science*, *77*, 81-89.
- Cózar, A., Linares, M.B., Garrido, M.D., & Vergara, H. (2013). Physicochemical, microbiological quality and oxidative stability in spiced lamb meat. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, *3*, 217-222.
- Cruz, J. (2013). El sector ovino y caprino busca soluciones a la caída del consumo y la subida de costes de producción. *Eurocarne*, *220*, 31-40.
- Dirinck, P., Van Opstaele, F., & Vandendriessche, F. (1997). Flavour differences between northern and southern European cured hams. *Food Chemistry*, *59*, 4, 511-521.
- Feiner, G. (2006). Burger, patties and crumbed products. En *Meat Products Handbook: Practical Science and Technology*. Woodhead Publishing limited, Cambridge, Reino Unido. Págs. 481-492.
- Frankel, E. N. (1982). Volatile lipid oxidation products. *Progress in Lipid Research*, *22*, 1-33.
- García de Fernando, G. D., & Fox, P. F. (1991). Study of proteolysis during the processing of a dry fermented pork sausage. *Meat Science*, *30*, 367-383.
- García-Garrido, J. A., Quiles-Zafra, R., Tapiador, J., & Luque de Castro, M. D. (1999). Sensory and analytical properties of Spanish dry-cured ham of normal and defective texture. *Food Chemistry*, *67*, 423-427.
- Garnier, J.P. (2010). Análisis del mercado mundial de la carne de ovino. *Eurocarne*, *184*, 115-122.
- Hierro, E., de la Hoz, L., & Ordóñez, J. A. (2004). Headspace volatile compounds from salted and occasionally smoked dried meats (cecinas) as affected by animal species. *Food Chemistry*, *85*, 649-657.

- Hygreeva, D., Pandey, M. C., & Radhakrishna, K. (2014). Potential applications of plant based derivatives as fat replacers, antioxidants and antimicrobials in fresh and processed meat products. *Meat Science*, 98, 47-57.
- Kaban, G. (2009). Changes in the composition of volatile compounds and in microbiological and physicochemical parameters during pastirma processing. *Meat Science*, 82, 17-23.
- Karre, L., Lopez, K., & Getty, K.J.K. (2013). Natural antioxidants in meat and poultry products. *Meat Science*, 94, 220-227.
- Laureati, M., Buratti, S., Giovanelli, G., Corazzin, M., Lo Fiego, D., & Pagliarini, E. (2014). Characterization and differentiation of Italian Parma, San Daniele and Toscano dry-cured hams: A multi-disciplinary approach. *Meat Science*, 96, 288-294.
- Lermusieau, G., Liégeois, C., & Collin, S. (2001). Reducing power hop cultivars and beer ageing. *Food Chemistry*, 72, 413-418.
- Linares, M.B., Cózar, A., Garrido, M.D., & Vergara, H. (2012). Chemical and sensory quality of lamb meat burgers from Manchego Spanish breed. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63, 843-852.
- McIntyre, L., & Rondeau, K. (2011). Individual consumer food localism: A review anchored in Canadian Farmwomen's reflections. *Journal of Rural Studies*, 27, 116-124.
- Monin, G., Marinova, P., Talmant, A., Martin, J. F., Cornet, M., Lanore, D., & Grasso, F. (1997). Chemical and structural changes in dry-cured hams (Bayonne hams) during processing and effects of the dehairing technique. *Meat Science*, 47, 29-47.
- Nam, K. C., & Ahn, D. U. (2003). Combination of anaerobic and vacuum packaging to control lipid oxidation and off-odour volatiles of irradiated raw turkey breast. *Meat Science*, 63, 389-395.
- Nawar, W.W. (1969). Thermal degradation of lipids. A review. *Journal Agricultural Food and Chemistry*, 17, 18-21.
- Plimpton, R. F., Perkins, C. J., Sefton, T. L., Cahill, V. R., & Ockerman, H. W. (1991). Rigor condition, tumbling and salt level influence on physical, chemical and

- quality characteristics of cured, boneless hams. *Journal of Food Science*, 56, 1514-1518.
- Pugliese, C., Sirtori, F., Calami, F., & Fanci, 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.
- Sabio, E., Vidal-Aragon, 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.
- Shahidi, F., Janitha, P.K., & Wanasundara, P.D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, 67-103.
- Sivadier, G., Ratel, J., Bouvier, F., & Engel, E. (2008). Authentication of meat products: Determination of animal feeding by parallel GC-MS analysis of three adipose tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9803-9812.
- Tagashira, M., Watanabe., M., & Uemitsu, N. (1995). Antioxidative activity of hop bitter acids and their analogues. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59, 740-742.
- Villalobos-Delgado, L.H., Caro I., Blanco, C., Morán, L., Prieto, N., Bodas, R., Giráldez, F.J., & Mateo, J. (2014). Quality characteristics of a dry-cured lamb leg as affected by tumbling after dry-salting and processing time. *Meat Science*, 97, 115-122.
- Zanoli, P., & Zavatti, M. (2008). Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 383-396.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

CAPITULO 1

Índice

	Página
1. Producción y características de la carne de ovino	27
1.1. <i>Producción de carne de ovino</i>	27
1.2. <i>Características de la carne de ovino</i>	28
2. Productos cárnicos de ovinos crudos-curados elaborados con piezas enteras	29
3. Los procesos de oxidación en el almacenamiento de la carne y los productos cárnicos	30
3.1. <i>Generalidades</i>	30
3.2. <i>Oxidación lipídica</i>	30
3.3. <i>Otros procesos oxidativos que tienen lugar en la carne y productos cárnicos durante su almacenamiento</i>	33
3.4. <i>Interacción entre los distintos procesos oxidativos de la carne</i>	34
4. Métodos de evaluación del estado oxidativo de la carne y productos cárnicos	35
5. Control de la oxidación mediante el uso de antioxidantes	39
5.1. <i>Tipos de antioxidantes según su mecanismo de actuación</i>	39
5.2. <i>Antioxidantes sintéticos y naturales</i>	41
6. Lúpulo como agente antioxidante	45
7. Bibliografía	47

1. Producción y características de la carne de ovino

1.1. Producción de carne de ovino

En los países mediterráneos, la carne de cordero es una carne con características específicas en cuanto a sus sistemas de producción y bastante apreciada para el consumo por su población. España es uno de los países de la región con mayor volumen de producción y consumo de este tipo de carne, concretamente el es segundo país con mayor producción de la Unión Europea (Sañudo et al., 1998; COAG, 2013).

No obstante lo dicho, en los últimos años, el sector ovino, en cuanto a producción y consumo, ha experimentado un descenso significativo. Este declive, especialmente pronunciado en España, se ha visto agravado con la actual crisis económica (COAG, 2013; Garnier, 2010; Cruz, 2013). En la última década, la producción de carne de ovino se ha reducido hasta prácticamente un 50%. Desde el año 2003 se ha pasado de 236.155 toneladas de carne de ovino a 121.999 toneladas, esta última cifra observada en el año 2012. De la misma manera, el consumo per cápita anual ha disminuido desde 2,81 kg en 2004 a 1,9 kg en 2013 (Cruz, 2013; MAGRAMA 2004; 2013). Parte de este descenso se presenta como el resultado del alto precio de la carne de ovino, siendo primeramente causado por los altos costos de producción en materia de alimentación animal, los cuales se incrementan en mayor medida que el valor del producto obtenido, siendo además dicho costo superior que el de la producción de carne de otras especies (Cózar et al., 2013; Blanco et al., 2012). Asimismo, su baja disponibilidad en los mercados en ciertos períodos como en el del mes de agosto también conducen a un incremento en su precio (Muela et al., 2010; Cruz, 2013). Por lo anterior, el sector productivo se enfrenta a la necesidad de evolucionar y realizar cambios en los sistemas de producción para mejorar su competitividad y ajustarse a las nuevas exigencias (Blanco et al., 2012).

En España la mayoría de los corderos producidos para carne son de peso ligero, sacrificándose con una edad entre 25 y 100 días, con 10-24 kg de peso corporal y entre 5-13 kg de peso en canal (Ripoll et al., 2012; Miranda-de la Lama., 2009; Blanco et al., 2012; Sañudo et al., 1998). No obstante, existen diferencias importantes respecto al cordero destinado a la obtención cárnica. Así, el cordero lechal es sacrificado antes del destete, con menos de un mes y medio de edad y con un peso de hasta 8 kg en canal (Almela et al., 2009). Mientras que los corderos ternasco y el recental, son destetados

hacia los 45 o 55 días de vida con unos 14-15 kilogramos de peso vivo, para después ser alimentados con pienso concentrado a voluntad hasta el momento del sacrificio (Miranda-de la Lama., 2009; Aguayo-Ulloa et al., 2013). Cabe señalar que, el cordero ternasco con un peso canal entre 8.5-11.5 kg es más ligero que el recental (11-13 kg). Por su parte, el cordero de cebo precoz es sujeto a un sistema intensivo de alimentación hasta que obtiene una edad normalmente entre 90 y 100 días, alcanzando un peso en canal entre 13-15 kilogramos (Sañudo et al., 1998). Finalmente, el cordero pascual es normalmente sacrificado entre 4 y 6 meses de edad con un peso canal entre 12 y 14 kilogramos (Sañudo et al., 1998), siendo alimentados con pienso y pasto, aunque se considera cordero pascual a los ovinos de hasta un año de edad. Los ovinos de más edad y más peso se engloban en la denominación de ovino mayor, su importancia productiva es baja, ya que son en general animales de desecho.

1.2. Características de la carne de ovino

Como otras carnes, es una rica fuente de proteína de alto valor biológico (18-20%), vitaminas del grupo B (tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantoténico, B₆ y B₁₂) y de algunos minerales incluyendo hierro, fósforo, zinc y selenio. Los corderos españoles tales como el ternasco, son una buena fuente de vitamina B (principalmente niacina y riboflavina), y sus niveles de hierro son de 0.9 a 2.0 mg/100 g mientras que la contribución del Zinc es de 3.3 mg/100 g (Karabagias et al., 2011; Montossi et al., 2013; Linares et al., 2012; Santaliestra-Pasías et al., 2010).

En España, la carne de cordero es altamente apreciada para consumo, esto debido a sus cualidades organolépticas. Además, este tipo de carne es percibida como un producto tradicional y, debido a esto y a su alto precio es consumida principalmente en celebraciones y eventos sociales tales como en reuniones, fechas navideñas y de semana santa, considerándose como alimento de lujo (Linares et al., 2007). La demanda de su consumo, esta condicionada por la edad del consumidor de tal manera que los más jóvenes cuentan con un consumo inferior a la media y los mayores están por encima (Sañudo et al., 1998; Linares et al., 2007; Garnier, 2010; Santaliestra-Pasías et al., 2010; Bernués et al 2012; Cruz, 2013).

2. Productos cárnicos de ovino crudos-curados elaborados con piezas enteras

Los productos cárnicos crudos-curados elaborados con piezas enteras (carne no picada) han sido producidos desde hace muchos siglos en base a prácticas tradicionales y aplicando diversas condiciones de procesamiento, tales como el salado, post-salado y la maduración, ésta última etapa puede extenderse desde varios meses a uno o dos años (Flores et al., 2007; Toldrá, 2006c). Estos productos se consideran microbiológicamente estables a temperatura ambiente. Su estabilidad estriba principalmente en la reducción de la actividad de agua (a_w), la cual depende de las condiciones de secado y la adición de sal, sola o combinada con nitrato ó nitrito (García et al., 1995; Hayes et al., 2007; Toldrá, 2002). Debido a su relativamente baja a_w (en el rango de 0,60-0,90), los productos cárnicos crudos-curados se consideran alimentos de humedad intermedia (Leistner y Rödel, 1976). La reducción de la a_w no solo afecta al crecimiento microbiano, sino también a la actividad enzimática endógena, lo cual influye en las características sensoriales del producto final (Lorenzo, 2014a). La mayoría de estos productos son usualmente comidos en crudo sin la necesidad de un posterior cocinado (Toldrá, 2006a).

Actualmente, los productos cárnicos crudos-curados de pieza entera más populares en Europa y América y probablemente también en Asia, son elaborados con carne de cerdo, siendo el ejemplo más destacable el jamón crudo-curado. No obstante, hay una serie de productos de este tipo elaborados con carne de rumiante en diferentes partes del mundo que gozan de cierta popularidad. Estos productos suelen ser productos autóctonos, tradicionales, circunscritos a zonas muy concretas dentro de los distintos continentes (Salvá, 2010). Entre ellos cabe destacar la cecina en España, la pastirma en Turquía y países limítrofes, la bresaola en Italia o el Bundberfleisch en Suiza, los cuales son elaborados principalmente a partir de carne de bovino, y en algunos lugares son hechos a partir de carne de búfala de agua, caballo u ovino entre otras especies (García, 1998; Paleari et al., 2000; Molinero et al., 2008; Kaban, 2009). El método de preparación es en cierta medida similar a aquel usado en la manufactura del jamón crudo-curado (Rubio et al., 2007; Gök et al., 2008; Hierro et al., 2004).

En Europa, en los países del Mediterráneo, aunque su producción actual es comparativamente baja, es muy tradicional la elaboración de productos cárnicos crudos-curados de pieza entera elaborados con carne de pequeños rumiantes tales como carne de ovino y caprino (Håseth et al., 2008; Paleari et al., 2008; Teixeira et al., 2011).

Algunos típicos ejemplos de estos productos de ovino son la pierna seca-curada de oveja producido en algunas regiones de Slovenia (Kanalec, 2002) y el “Violino di pecora” hecho en Cerdeña, Italia (Cattaneo, 1994). También en España, la carne de ovino es considerada como un producto tradicional con una gran historia de uso, la cual en el presente es aún producida, aunque solo en pequeñas cantidades en áreas específicas rurales (Sañudo et al., 1998; Leizaola, 2008; Santalietsra-Pasias et al., 2010), mientras que en las grandes ciudades los productos hechos con carne de cordero son prácticamente desconocidos, siendo los cortes frescos la principal forma presentada al comercio minorista (Linares et al., 2012). Por su parte, en Europa del Norte también son tradicionales los productos cárnicos crudos-curados de ovino (Håseth, et al., 2008), como es el caso de la pierna cruda-curada llamada Fenalar, cuya tradición se remonta a la época de los vikingos.

3. Los procesos de oxidación en el almacenamiento de la carne y los productos cárnicos

3.1. Generalidades

La oxidación es una de las mayores causas de deterioración de la calidad en productos cárnicos crudos o cocinados durante su almacenamiento en refrigeración o en congelación (Raharjo y Sofos, 1993; Byrne et al., 2001). Los procesos oxidativos en carne conducen a la degradación de lípidos y proteínas los cuales a su vez contribuyen al deterioro de la textura, color, sabor, en definitiva de la calidad sensorial de la carne y los productos cárnicos (Fernández et al., 1997; Hayes et al., 2010; Ganhão et al., 2010; Reihani et al., 2014). Además, la oxidación provoca pérdidas en el valor nutritivo de la carne y los productos cárnicos, y de la misma se generan algunos compuestos tóxicos, como los óxidos del colesterol, dañinos para la salud (Gray et al., 1996; Shahidi, 2002; Vicente et al., 2012).

3.2. Oxidación lipídica

La oxidación lipídica, es una de las principales causas de la deterioración en la carne (Erickson, 2002; Fernández et al., 1997). Los lípidos de los alimentos bajo diferentes condiciones pueden sufrir oxidación: autooxidación durante la conservación, oxidación térmica durante el cocinado u oxidación enzimática en presencia de ciertas

enzimas (Shahidi y Zhong, 2005; Pegg y Shahidi, 2007). La oxidación lipídica puede dar lugar al desarrollo de malos sabores y pérdidas de aminoácidos esenciales, vitaminas solubles en grasa y otros compuestos bioactivos.

En esta sección, debido la temática de la tesis, la oxidación lipídica se va a centrar en la oxidación durante el almacenamiento de la carne, que sigue un proceso de autooxidación. La autooxidación conduce al deterioro oxidativo de la carne (Shahidi y Zhong, 2005; Wrolstad et al., 2005). Ésta se produce siguiendo un proceso complejo mediado por radicales libres (Reische et al., 2002; Kubow, 1992). Los ácidos grasos insaturados en contacto con el oxígeno son susceptibles a los procesos autooxidativos en la presencia de sistemas catalíticos tales como luz, calor, radiación ionizante, enzimas, metales, metaloproteínas y microorganismos (Ericsson, 2002; Wrolstad et al., 2005).

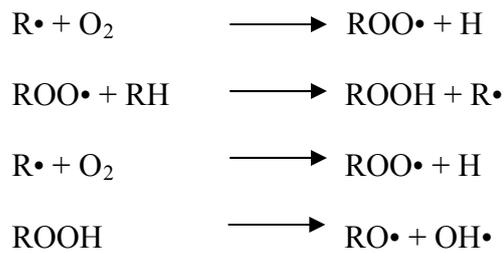
La oxidación lipídica consta de tres etapas consecutivas: iniciación, propagación y terminación. La primera etapa (iniciación) consiste en la formación de un radical libre. Esta etapa ocurre cuando se pierde un hidrógeno de un ácido graso insaturado (RH), resultando en un radical libre (R•) (Toldrá, 2006b; Erickson, 2002; Xu, 2012b; Reische et al., 2002; Kubow, 1992).

1. Iniciación



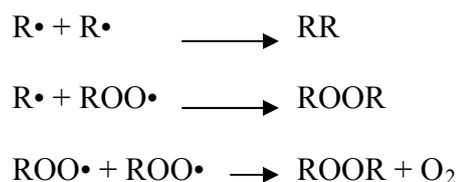
La segunda etapa, propagación, comienza con la formación de radicales peroxilo (ROO•) por reacción de los radicales libres con el oxígeno molecular (Toldrá, 2006b). Durante la propagación, los radicales peroxilo reaccionan con otros ácidos grasos, normalmente insaturados, para formar un hidroperóxido (ROOH) (producto de oxidación primaria) y un nuevo radical (R•), los cuales son muy inestables. El radical, reacciona con el oxígeno para producir otro radical peroxilo, resultando en un proceso cíclico, mecanismo auto-catalizador oxidativo. Los hidroxiperóxidos (ROOH) son inestables y se pueden degradar para producir radicales que más tarde aceleran las reacciones de propagación. Estas reacciones son típicamente referidas como reacciones de ramificación (Toldrá, 2006b; Reische et al., 2002; Erickson, 2002).

2. Propagación



En la última etapa (terminación), las reacciones oxidativas finalizan por la inactivación de los radicales libres cuando ellos reaccionan unos con otros (Toldrá, 2006b) para formar un producto no-radical, o bien, la reacción de propagación es terminada por la presencia de un hidrógeno o un donador de electrones (Kubow, 1992).

3. Terminación



Entre otros resultados negativos de estas reacciones, se generan compuestos volátiles responsables del deterioro del aroma del producto final (Toldrá, 2006b). Los hidroperóxidos, que son identificados como los productos primarios de la autooxidación de los lípidos, son inodoros e insípidos. Sin embargo, sus productos de reacción, según el mecanismo explicado anteriormente, conducen a la formación de complejas mezclas de compuestos de bajo peso molecular, conocidos como productos secundarios de la oxidación lipídica. Algunos de estos productos tienen aromas distintivos y pueden afectar las propiedades del sabor a concentraciones probablemente por debajo de 1 ppm (Ladikos y Lougovois, 1990; Pegg y Shahidi, 2007). Entre ellos se incluyen alcanos, alquenos, aldehídos (como el hexanal), cetonas, alcoholes, ésteres, furanos, lactonas o ácidos. Así, la oxidación de ácidos grasos insaturados de la carne como los ácidos oleico (18:1 *n*-9), linoleico (18:2 *n*-6), y linolénico (18:3 *n*-3) producen un amplio número de compuestos de bajo peso molecular (C₃-C₁₂), algunos de ellos con bajo umbral de percepción olfativa, tales como pentanal, hexanal, trans-2,4-decadienal y

trans-4,5-epoxy (E)-2-decenal. En la carne cocinada oxidada se desarrolla un sabor característico conocido en inglés como warmed over flavor (WOF) (Pegg y Shahidi, 2007; Gray et al., 1996).

3.3. Otros procesos oxidativos que tienen lugar en la carne y productos cárnicos durante su almacenamiento

En carne, además de la oxidación de los lípidos, tienen lugar otros procesos oxidativos que afectan a su calidad. Uno de ellos es la oxidación proteica a la que se atribuye un aumento de la dureza, pérdida de la jugosidad y reducción del valor biológico de la proteína cárnica (Lund et al., 2007; Leygonie et al., 2012).

Se cree que la oxidación de proteínas tiene lugar, de forma similar a la oxidación lipídica, mediante una reacción en cadena promovida por radicales libres (Lund et al., 2011; Ganhão et al., 2010). Son numerosas las sustancias identificadas como iniciadores de la oxidación proteica, siendo todas ellas sustancias reactivas al oxígeno (ROS) (Estévez, 2011). Entre estas sustancias se encuentran los radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperóxido ($HO\cdot_2$) e hidroxilo ($\cdot OH$), así como especies no-radicalarias tales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e hidroperóxidos (ROOH). De la misma manera, ésta oxidación puede estar vinculada a otros factores pro-oxidantes, tales como lípidos oxidados, pigmentos hemo y enzimas oxidativas (Leygonie et al., 2012). La cadena proteica y más concretamente algunos grupos funcionales de los residuos de aminoácidos son el objetivo común para las ROS (Estévez, 2011). Dentro de los aminoácidos susceptibles a las ROS se encuentran cisteína, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina, prolina, arginina, lisina y metionina (Lund et al., 2011). El daño oxidativo a las proteínas incluye la oxidación de los grupos funcionales de dichos aminoácidos que cursa con la formación de carbonilos, la escisión de los enlaces y la formación de algunos enlaces cruzados proteína-proteína (Lund et al., 2011; Zhang et al., 2013).

La formación de compuestos carbonilos es uno de los cambios más notables que ocurren durante la oxidación proteica (Estévez, 2011). Estos pueden ser generados vía oxidación directa de las cadenas laterales de los aminoácidos, por fragmentación del esqueleto peptídico, la reacción con azúcares reductores o la unión a compuestos carbonilos no proteicos (Vuorela et al., 2005). No obstante, la oxidación directa de las

cadena lateral de aminoácidos ha sido destacada como la principal vía para la carbonilación, y el sustrato más importante y potente del ataque oxidativo directo a las proteínas (Estévez, 2011).

Otro fenómeno oxidativo que ocurre en la carne es la oxidación de la mioglobina en la superficie de la carne que cursa con pérdida de color. La mioglobina es la proteína soluble en agua responsable del color de la carne (AMSA, 2012). El cambio en el color de la carne está fuertemente asociado con la oxidación del pigmento que consiste en la conversión de oximioglobina (OxyMb), de color rojo brillante, a metamioglobina (MetMb) de color marrón (Mancini y Hunt, 2005; Faustman et al., 2010; AMSA 2012; Zhang et al., 2013).

3.4. Interacción entre los distintos procesos oxidativos en la carne

Muchos estudios se han dirigido al establecimiento de las interacciones entre la oxidación lipídica, proteica y del color, y aunque la relación no está del todo esclarecida hay evidencias que apoyan la idea de que los productos de oxidación a partir de lípidos o proteínas pueden influir acelerando el resto de procesos oxidativos (Zhang et al., 2013). Los lípidos oxidados pueden reaccionar con las proteínas vía reacción por radicales libres e iniciar la oxidación de proteínas (Estévez, 2011). Los aminoácidos también son susceptibles a dañarse por reacción con productos secundarios de oxidación lipídica tales como los aldehídos (Faustman et al., 2010; Leygonie et al., 2012; Zhang et al., 2013). Los derivados de las interacciones entre los productos de la oxidación lipídica y los aminoácidos residuales pueden causar la formación de enlaces cruzados entre proteínas (Zhang et al., 2013). Asimismo, Estévez y Cava (2006) han sugerido la influencia de la oxidación proteica sobre el deterioro de la calidad asociada a la oxidación del pigmento con cambios en el color. También los productos primarios y los secundarios, concretamente los aldehídos, generados en la oxidación lipídica afectan a la estabilidad de la mioglobina, causando incremento en la oxidación del grupo hemo y pérdida de color (AMSA, 2012). Por otra parte, algunos estudios, indican que la mioglobina es un buen marcador de la formación de carbonilos en los sistemas cárnicos, destacando el papel de la metamioglobina como promotor de la carbonilación de proteínas (Estévez, 2011).

4. Métodos de evaluación del estado oxidativo de la carne y productos cárnicos

Los radicales libres, junto con los compuestos derivados de la oxidación de las grasas constituyen las bases para medir el deterioro oxidativo de los lípidos en los alimentos en general (Shahidi y Zhong, 2005). En carne y productos cárnicos el estado oxidativo puede ser determinado por una variedad de métodos en los cuales se evalúan los cambios en los compuestos primarios o secundarios de la oxidación lipídica (Ladikos y Lougovois, 1990; Fernández et al., 1997). No obstante, para conocer con gran fiabilidad el estado oxidativo de la carne se recomienda el uso de una combinación de métodos, incluyendo análisis químicos y sensoriales (Gray y Monahan, 1992).

Los métodos para evaluar los productos primarios de la oxidación determinan el nivel de peróxidos o dienos conjugados. La principal limitación de estos métodos es la naturaleza transitoria de los productos primarios, cuya concentración llega a ser alta en los momentos de la propagación de la oxidación lipídica pero luego desciende en el producto oxidado (Wrolstad et al., 2005)

Las mediciones de los productos secundarios evalúan compuestos carbonilos, aldehídos (prueba del ácido tiobarbitúrico), compuestos volátiles (aldehídos, cetonas, hidrocarburos, furanos, ácidos grasos) usando cromatografía de gases (GC), o paneles sensoriales (Mottram, 1998; Irwin y Hedges, 2004; Willian, 2013).

Uno de los métodos más utilizados para determinar el grado de oxidación lipídica de la carne es la determinación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico o, en su caso, la determinación de la principal sustancia reactiva: el malonaldehído (MA). Esto es debido a la simplicidad y velocidad del método (Raharjo y Sofos, 1993) y a la buena correlación encontrada entre los resultados de la determinación de las sustancias reactivas al TBA con las puntuaciones sensoriales del sabor a oxidado de las carnes cocinadas (Ladikos y Lougovois, 1990; Pegg y Shahidi, 2007). No obstante, la medición de las sustancias reactivas al TBA no debe emplearse en el estudio de la oxidación en carnes almacenadas por largos periodos de tiempo, dado que el MA presente en los alimentos es altamente reactivo y puede formar enlaces con otras moléculas, obteniéndose valores más bajos de oxidación que los reales (Shahidi y Pegg, 1994). Además, el valor a partir del cual los consumidores sean capaces de detectar el olor o sabor a carne oxidada depende de muchos factores además del contenido en sustancias reactivas al TBA, por ejemplo la especie animal, la alimentación de los mismos, el procesado al que se somete la carne antes de la medida o el procedimiento

analítico empleado, lo cual hace necesario acompañar cada experimento con un análisis sensorial (Fernández et al., 1997).

Durante la oxidación de lípidos se forma, malonaldehído (MA) como un resultado de la degradación de los ácidos grasos poliinsaturados (Shahidi y Zhong, 2005). Dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) reaccionan con una molécula de malonaldehído (MA) para formar un complejo rosa (TBA-MA) que es medido espectrofotométricamente a una absorción máxima a 530-535 nm (Wrolstad et al., 2005; Shahidi y Zhong, 2005). El MA es la sustancia principal de la carne oxidada que reacciona con TBA. No obstante pueden estar implicados en la reacción de coloración otros productos de oxidación, incluyendo α , β -aldehídos insaturados (4-hidroxiálquenos) y algunos precursores no-volátiles (no identificados) de estas sustancias (Fernández et al., 1997; Shahidi y Zhong, 2005; Irwin y Hedges, 2004). Por lo anterior, aunque el grado de oxidación es expresado como miligramos de MA por kilogramo de muestra o micromoles de MA equivalentes por kilogramo o gramo de muestra, en realidad en la reacción intervienen una serie de sustancias conocidas como sustancias reactivas al TBA (Shahidi y Zhong, 2005; Wrolstad et al., 2005; Raharjo y Sofos, 1993).

En la prueba de las sustancias reactivas al TBA se puede proceder a la extracción de estas sustancias por varios procedimientos: sin extracción, extracción acuosa, o destilación (Shahidi y Zong, 2005; Willian, 2013). Como estándar de calibración a utilizar en el método, debido a que el MA es inestable se utilizan compuestos precursores. Así el MA puede ser obtenido por hidrólisis ácida ya sea del 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) o del 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP), en una reacción equimolar. En el caso del TEP, este compuesto bajo condiciones ácidas es hidrolizado a hemiacetal y etanol. Este hemiacetal subsecuentemente se descompone para formar 1,3-propanodiol (malonaldehído) y otro etanol (Raharjo y Sofos, 1993; Fernández et al., 1997).

El hexanal es el principal compuesto (más abundante) derivado de los ácidos grasos durante la oxidación lipídica (Shahidi y Pegg, 1994). Procede fundamentalmente de la oxidación de los ácidos grasos insaturados omega-6, como el ácido linoleico (Shahidi y Zhong, 2005; Wrolstad et al., 2005). El hexanal comúnmente es cuantificado por cromatografía gaseosa, aunque también se utilizan otros métodos como es la

determinación de la intensidad de la banda de carbonilo por espectroscopia de NIR (Shahidi y Zhong, 2005).

Al hexanal se le considera como un indicador de oxidación en carnes, especialmente durante los primeros días de la oxidación (Irwin y Hedges, 2004; Wrolstad et al., 2005; Min y Ahn, 2005). Junto con las sustancias reactivas al TBA es el marcador más común para sabores rancios (Irwin y Hedges, 2004). La concentración de hexanal en la carne está correlacionada con el sabor a oxidado y con los valores TBA (Shahidi y Zhong, 2005; Fernández et al., 1997; Irwin y Hedges, 2004; O'Sullivan et al., 2003; Raharjo y Sofos, 1993). Su uso como indicador de la oxidación de la carne cocinada y almacenada, al igual que lo que se dijo para las sustancias reactivas al TBA está limitado a los primeros días de almacenamiento debido a que este compuesto se volatiliza y reacciona con otros compuestos (Shahidi y Pegg, 1994).

La medición de los componentes volátiles, incluido el hexanal, en el espacio de cabeza de la carne mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) es otra forma de cuantificar los componentes derivados de la oxidación lipídica (Irwin y Hedges, 2004; William, 2013). En la actualidad existen diferentes técnicas de extracción entre las que se incluyen la destilación-extracción simultánea, el espacio de cabeza estático con o sin microextracción en fase sólida, el espacio de cabeza dinámico o la extracción por sorción con barras magnéticas agitadoras (Irwin y Hedges, 2004; Wrolstad et al., 2005).

El espacio de cabeza estático implica el calentamiento de la muestra en un medio ambiente hermético hasta que los volátiles de los lípidos en el alimento alcanzan un equilibrio con aquellos en el aire circundante. En el caso de medición directa, el aire por encima de la muestra (espacio de cabeza) es muestreado y analizado (Wrolstad et al., 2005). Si se utiliza la microextracción en fase sólida (SPME), los componentes volátiles se concentran por adsorción en una fina película adsorbente que recubre un fino filamento acoplado a una jeringa de inyección, que posteriormente se utiliza para inyectar los compuestos en el cromatógrafo. Los volátiles en el filamento de la aguja serán desorbidos en el puerto de inyección caliente del cromatógrafo de gases (Madruga et al., 2009). Esta técnica ha sido altamente aplicada a la medición de los perfiles del aroma y al seguimiento de la oxidación lipídica en carne y productos cárnicos (Watkins, et al., 2012). El límite de detección por SPME puede ser tan bajo como partes por trillón y ha sido exitosamente usada para estimar el contenido de hexanal en carne cocinada y

en cruda (Pignoli et al., 2009). La técnica SPME es económica, no utiliza disolventes, es rápida, sensible, selectiva y de fácil manejo (García- Esteban., 2004; Watkins et al., 2012) que integra el muestreo, extracción, concentración y la introducción de la muestra al cromatógrafo. Por su parte, que el espacio de cabeza dinámico utiliza una purga constante de la muestra con un gas de pureza ultra-alta, típicamente nitrógeno o helio. Los volátiles son entonces adsorbidos en una trampa. Esta trampa de material adsorbente se introduce en el cromatógrafo donde los compuestos son desorbidos por calor.

En relación a la oxidación proteica, el método de medida, de manera general, de la oxidación proteica en carne y productos cárnicos consiste en la cuantificación de compuestos carbonilos usando el método de rutina 2-4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Lund et al., 2011). El método se basa en la reacción entre DNPH con los compuestos carbonilos de las proteínas para formar 2,4-dinitrofenil (DNP) hidrazona, que es un compuesto que muestra un pico de máxima absorbancia de alrededor de 370 nm. El procedimiento implica una determinación simultánea de derivados carbonilos y el contenido de proteínas de la muestra. La concentración de DNP hidrazonas se determina espectrofotométricamente teniendo en cuenta una absorptividad molar de $22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 370 nm. La concentración de proteína es determinada en una muestra control (sin adicionar DNPH) a 280 nm usando seroalbúmina bovina como estándar. Los resultados son usualmente expresados como nmol DNP hidrazonas por mg de proteína (Estévez, 2011; Zhang et al., 2013). Además, y de forma más específica, debido a que como consecuencia de la oxidación algunos aminoácidos se degradan a sustancias determinadas, por ejemplo la treonina es convertida a ácido α -amino-3-ceto butírico, la lisina a semialdehído α -amino adípico (AAS), y arginina y prolina a semialdehído γ -glutámico (GGS), estos productos de reacción también han sido utilizados como biomarcadores/indicadores de daño oxidativo de las proteínas (Estévez, 2011).

Finalmente, la oxidación del color se determina instrumentalmente con espectrofotómetros de reflectancia triestímulo, capaces de determinar el color de la carne en superficie (AMSA, 2012). En la oxidación del pigmento, la carne pierde color rojo y aparece un color marrón, lo cual es detectado mediante cambios en las características del color como una disminución del valor a^* (índice de rojo), el cociente a^*/b^* (siendo b^* el índice de amarillo), disminución del cociente entre las absorbancias 630 nm /580 nm, o el aumento de ángulo de la tonalidad del color (Hue angle).

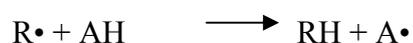
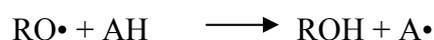
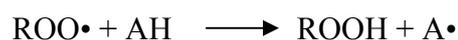
5. Control de la oxidación mediante el uso de antioxidantes

La protección de la carne frente a la oxidación lipídica durante el almacenamiento es indispensable para conservar la calidad y aumentar la vida útil del producto (Andrés et al., 2014). La oxidación lipídica en productos cárnicos puede ser efectivamente controlada, o al menos, minimizada mediante el uso de antioxidantes (Gray et al., 1996; Decker, 1998). Los antioxidantes retrasan el inicio de la oxidación o disminuyen la velocidad a la cual ésta procede, actuando como aceptadores de radicales libres, donares de átomos de hidrógeno, etc. (Reische et al., 2002; Pegg y Shahidi, 2007; Carocho y Ferreira, 2013; Msagati, 2013). Para ser usados en los alimentos, estos deberían ser baratos, no-tóxicos, efectivos a bajas concentraciones, estables y capaces de resistir el procesado, asimismo, el color, sabor y el olor que aportan al alimento deberían ser mínimos (Reische et al., 2002).

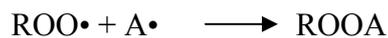
5.1. Tipos de antioxidantes según su mecanismo de actuación

Los antioxidantes pueden ser clasificados de acuerdo a su mecanismo de acción como antioxidantes primarios (Tipo 1) o eliminadores de radicales y antioxidantes secundarios (Tipo 2) que disminuyen la velocidad de oxidación sin intervenir sobre los radicales libres.

Los antioxidantes primarios aceptan radicales libres y así retrasan o inhiben el paso de la iniciación o interrumpen el paso de la propagación en la autooxidación. Los antioxidantes primarios donan átomos de hidrógeno a los radicales lipídicos y producen derivados lipídicos y radicales antioxidantes ($A\bullet$), que son más estables y por lo tanto menos reactivos en el contexto de la autooxidación. Por lo tanto, los radicales libres peroxi y oxi son eliminados por los antioxidantes primarios (Reische et al., 2002; Kubow, 1992; André et al., 2010).



El radical antioxidante producido por la donación de hidrógeno tiene una muy baja reacción con los lípidos. Esta baja reactividad reduce la velocidad de propagación, ya que la reacción del radical antioxidante con el oxígeno o lípidos es muy lenta. Además, los radicales antioxidantes son capaces de participar en reacciones de terminación con radicales peroxi, oxi y otros radicales antioxidantes (Reische et al., 2002).



Algunos ejemplos de este tipo de antioxidantes son Butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), galato de propilo (PG) y terbutil-hidroquinona (TBHQ). Los antioxidantes primarios son más efectivos cuando se agregan durante las etapas de inducción e iniciación de la oxidación, que cuando se agregan en las etapas cíclicas de la propagación (Reische et al., 2002).

Los antioxidantes secundarios (Tipo 2) actúan a través de numerosos mecanismos. Estos antioxidantes disminuyen la velocidad de oxidación por diferentes acciones, pero no convierten a los radicales libres en productos más estables. Estos antioxidantes pueden secuestrar metales prooxidantes y desactivarlos, reincorporar hidrógenos a los antioxidantes primarios, descomponer hidroperóxidos a especies no radicalarias, desactivar el oxígeno singlete, absorber la radiación ultravioleta o actuar como secuestradores (scavenger) de oxígeno. Este tipo de antioxidantes son referidos como sinérgicos debido a que ellos promueven la actividad antioxidante de los antioxidantes Tipo 1. El ácido cítrico, ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, lecitina y el ácido tartárico son ejemplos de antioxidantes sinérgicos (Reische et al., 2002).

Algunos metales pesados promueven la oxidación actuando como catalizadores de las reacciones de radicales libres. El secuestro de los metales por ciertos compuestos con actividad quelante disminuye su efecto prooxidante. Los compuestos quelantes también pueden estéricamente impedir la formación del complejo metal hidroperóxido.

El ácido cítrico, ácido fosfórico y el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) son compuestos capaces de secuestrar metales (Reische et al., 2002).

La función antioxidante de los agentes reductores como ácido ascórbico y ascorbato, palmitato de ascorbilo, ácido eritórbico, eritorbato de sodio y los sulfitos consiste en la facilidad para la donación de átomos de hidrógeno (capacidad de oxidarse), por lo que previenen la oxidación de otros compuestos actuando como reductores (Reische et al., 2002).

Otros antioxidantes, como es el caso de los carotenoides, pueden reaccionar con las formas reactivas del oxígeno conocidas como oxígeno singlete, desactivándolo. El oxígeno singlete, que es responsable de la oxidación, es un estado excitado del oxígeno el cual puede reaccionar directamente con los ácidos grasos insaturados para formar hidroperóxidos (Decker, 1998; Pegg y Shahidi, 2007). Los antioxidantes que reaccionan con él disipan su energía llevando el oxígeno a formas más estables y menos reactivas (Reische et al., 2002).

5.2. Antioxidantes sintéticos y naturales

Los antioxidantes han sido agrupados dentro de dos categorías importantes: sintéticos y naturales (Reische et al., 2002; Armenteros et al., 2012). Los antioxidantes sintéticos o naturales son ampliamente utilizados en la carne y productos cárnicos para controlar la oxidación lipídica (Kingston et al., 1998). La industria cárnica ha empleado un gran número de antioxidantes sintéticos (BHA, BHT, PG y TBHQ) como método eficaz y económico para disminuir la aparición de fenómenos oxidativos (Tang et al., 2001; Hayes et al., 2011; Armenteros et al., 2012; Karre et al., 2013; Lorenzo et al., 2014b). Cabe señalar que el uso de antioxidantes sintéticos está limitado a ciertas cantidades y además, presentan inconvenientes, dado que son bastante volátiles al igual que se descomponen con facilidad a temperaturas altas (Armenteros et al., 2012). Asimismo, su uso ha sido asociado a riesgos potenciales a la salud (McCarthy et al., 2001), debido a que pueden exhibir propiedades tóxicas en los seres humanos, ya que se sospecha que son cancerígenos, lo que contrarresta cualquier efecto beneficioso para el consumidor (He et al., 2012; Lorenzo et al., 2014b).

Por lo anterior, han surgido iniciativas recientes enfocadas hacia la identificación de antioxidantes novedosos provenientes de fuentes naturales (Karre et al., 2013). Estos

antioxidantes naturales provenientes de las plantas (en forma de extractos), han sido obtenidos a partir de diferentes fuentes tales como frutas, vegetales, especias y hierbas. Se están evaluando diferentes productos vegetales como antioxidantes naturales para preservar y mejorar la calidad de la carne y los productos cárnicos (Kähkönen et al., 1999; Hygrieva et al., 2014; Shah et al., 2014).

Los antioxidantes sintéticos principalmente consisten en compuestos fenólicos o secuestradores de metales. Los antioxidantes fenólicos son secuestradores de radicales libres, los cuales forman radicales estables y detienen la propagación de las reacciones de oxidación lipídica en los alimentos; mientras que los secuestradores de metales previenen la oxidación de lípidos en los alimentos por unir e inactivar a los metales catalizadores (Mielche y Bertelsen, 1994). BHA, BHT, PG y TBHQ son antioxidantes sintéticos, de tipo primario, comúnmente usados por la industria de los alimentos (Moure et al., 2001; McCarthy et al., 2001; Pegg y Shahidi, 2007; André et al., 2010).

Entre los antioxidantes naturales, de acuerdo a su solubilidad, podemos diferenciar entre antioxidantes hidrofóbicos o hidrofílicos. Dentro de los antioxidantes hidrofóbicos se incluye la vitamina E y los carotenoides. La vitamina E es un conjunto de compuestos fenólicos conocidos como tocoferoles (α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol y δ -tocoferol) y tocotrienoles (α -tocotrienol, β -tocotrienol, γ -tocotrienol y δ -tocotrienol), los cuales son compuestos monofenólicos naturales con diferentes actividades antioxidantes y se encuentran altamente distribuidos en el reino vegetal (Reische et al., 2002; Armenteros et al., 2012; Carocho y Ferreira, 2013).

Los carotenoides son un grupo de pigmentos liposolubles (amarillo, anaranjado y rojo) que están presentes en plantas verdes, frutas y vegetales. Los carotenoides pueden ser separados dentro de dos grupos: carotenoides hidrocarbonados, conocidos como carotenos (licopeno y β -caroteno), y los carotenoides oxigenados conocidos como xantofilas (zeaxantina y luteína). En los alimentos, los carotenoides (β -caroteno, licopeno y la luteína) actúan típicamente como antioxidantes secundarios extinguiendo al oxígeno singlete (Decker, 1998; Erickson, 2002; Reische et al., 2002; Morrissey y Ferry, 2004; Pegg y Shahidi, 2007; Carocho y Ferreira, 2013).

Dentro de los antioxidantes hidrofílicos se incluyen la vitamina C y los compuestos fenólicos o polifenoles. El ácido L-ascórbico o vitamina C está extendido en la naturaleza como un componente en los tejidos de las plantas y es producido sintéticamente en grandes cantidades. En alimentos, es un antioxidante secundario con

múltiples funciones debido a que puede activar los antioxidantes primarios, extinguir al oxígeno singlete e inactivar prooxidantes (Reische et al., 2002; Cheng et al., 2007). No obstante, el ácido ascórbico a pequeñas concentraciones tiende a funcionar como un prooxidante y como antioxidante a altas concentraciones (Ladikos y Lougovois, 1990; Erickson, 2002).

Por otra parte, existe una gran variedad de compuestos fenólicos que son comúnmente encontrados en plantas (comestibles y no comestibles), frutas, vegetales y/o semillas, los cuales están incrementando el interés en la industria alimentaria debido a que retardan la degradación oxidativa de lípidos y de este modo mejoran la calidad y el valor nutricional de los alimentos (Kähkönen et al., 1999; Armenteros et al., 2012; Rivas-Cañedo et al., 2013). La actividad de los compuestos fenólicos es debida tanto a su capacidad de estabilizar radicales libres como a sus propiedades redox, las cuales permiten a ellos actuar como agentes reductores y extinguidores del oxígeno singlete. Además, pueden tener el potencial de secuestrar metales (Kähkönen et al., 1999). La clasificación de los compuestos fenólicos varía dependiendo del criterio que se utilice. Una forma de clasificarlos es en compuestos monoméricos y poliméricos (Armenteros et al., 2012). A continuación se muestra una relación de los polifenoles más relevantes en función de si son mono o poliméricos

Compuestos monoméricos

- a) Derivados del ácido hidrobenczoico: los ácidos hidroxibenzoicos tienen una estructura general C₆-C₁ que deriva del ácido benzoico. Los distintos ácidos hidroxibenzoicos se distinguen por variaciones en la estructura típica debido a hidroxilaciones y mutilaciones del anillo aromático. Dentro de este grupo los más comunes son los ácidos p-hidroxibenzoico, vainílico, siríngico, y protocatéquico. Asimismo, dos de los ácidos hidroxibenzoicos que más se conoce son el ácido salicílico (2-hidroxibenzoato) y el ácido gálico (Reische et al., 2002; Skerget et al., 2005; Armenteros et al., 2012).
- b) Ácidos fenólicos: son derivados del ácido cinámico y están constituidos por un grupo de compuestos presentes en la pared celular vegetal cuyos principales representantes son los ácidos cumárico (*o*, *m* ó *p*), cafeico, ferúlico, isoferúlico y sinápico. Están muy distribuidos y en raras ocasiones aparecen en estado libre, ya que frecuentemente se encuentran esterificados (Skerget et al., 2005; Armenteros et al., 2012; Xu, 2012a). El ácido cafeico ha sido empleado como antioxidante natural para inhibir la oxidación de lípidos en pescado (He et al., 2012).

- c) Los flavonoides son compuestos polifenólicos derivados naturales del benzo- γ -pirano que constituyen una clase importante de metabolitos secundarios en el reino vegetal y por lo tanto se encuentran en muchos alimentos de origen vegetal (Wood et al., 2002). Su estructura química consiste en dos anillos aromáticos unidos a través de una cadena de tres carbonos y usualmente organizados como un heterociclo oxigenado (Škerget et al., 2005; Fraga et al., 2010). Dependiendo del grado de oxidación del heterociclo pueden ser subdivididos en clases: flavonoles (esencialmente flavan-3-oles), flavanonas, flavonas, catequinas, isoflavonas, antocianidinas, chalconas, dihidrochalconas y auronas (Wood et al., 2002; Škerget et al., 2005; Fraga et al., 2010). Las propiedades antioxidantes de los flavonoides vienen dadas por los grupos hidroxilo asociados a la estructura del anillo. Estos grupos pueden actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno, extinguidores del oxígeno singlete, del radical superóxido y aún como secuestradores de metales (Reische et al., 2002; Wood et al., 2002; Caroch y Ferreira, 2013). Las flavonas y flavonoles frecuentemente muestran alta actividad antioxidante *in vitro*, forman complejos con iones de metal y eliminan radicales libres. Se ha comprobado la eficacia de algunos de estos flavonoides en el control la oxidación lipídica en carnes, aceite de pescado y grasa animal (Škerget et al., 2005). Los flavonoles son los flavonoides más comunes en los alimentos de origen vegetal, y ellos aparecen frecuentemente como combinaciones glicosídicas de miricetina, quercetina y kaempferol o sus ésteres de metilo (Tomás-Barberán y Ferreres, 2012; Reische et al., 2002). Los flavonoles presentan la mayor actividad antioxidante, en particular al grupo de las procianidinas. Las procianidinas consisten en compuestos que contienen catequina, epicatequina y sus derivados; los esteres que aparecen mas comúnmente son *O*-galatos (Wood et al., 2002).
- d) Compuestos poliméricos fenólicos, también denominados taninos (oligómeros y polímeros de flavonoides): son un grupo de metabolitos fenólicos de peso molecular (relativamente alto) entre 500 y 30.000 Da, teniendo habilidad para formar complejos con carbohidratos y proteínas (Serrano et al., 2009). Son clasificados en dos grupos: taninos condensados y taninos hidrolizables (Fraga et al., 2010). Los taninos condensados, también conocidos como proantocianidinas o procianidinas, son polímeros que se forman a partir de flavonoides mediante enlaces C-C o C-O y pueden contener desde 10 hasta 20 unidades monoméricas. Los taninos hidrolizables son polímeros heterogéneos formados por ácidos fenólicos, en particular ácido gálico y

azúcares simples (Armenteros et al., 2012). El ácido gálico es bien conocido como antioxidante. Es usado como aditivo alimentario para eliminar especies reactivas al oxígeno que son responsables de la rancidez de diferentes productos alimenticios (He et al., 2012)

Otras fuentes de antioxidantes naturales incluyen aminoácidos, proteínas hidrolizadas, productos de la reacción de Maillard, fosfolípidos, enzimas y esteroides (Reische et al., 2002).

6. El lúpulo como agente antioxidante

Durante siglos, el lúpulo ha sido utilizado como un ingrediente esencial en la industria cervecera (Haseleu et al., 2009), considerando su uso primordialmente como conservante y para mejorar el sabor (Hampton et al., 2002). El lúpulo usado en cervecería viene en varias formas tales como conos, en polvo, pellets, extractos y extractos isomerizados (Canbaş, et al., 2001).

Los componentes resinosos del lúpulo, los alfa- y beta-ácidos, una vez hidrolizados por calentamiento proporcionan un sabor amargo característico a la cerveza. Además, estos ácidos permiten proteger a la cerveza en contra de bacterias ácido lácticas (genero *Lactobacillus* y *Pediococcus*) y mejoran la estabilidad de la espuma. Los principales α -ácidos son la humolona (35-70% del total de los α -ácidos), la cohumulona (20-65%) y la adhumolona (10-15%). Los principales β -ácidos son la lupulona (30-55% del total de los β -ácidos), la colupulona y la adlupulona.

Por otra parte el lúpulo posee aceites esenciales, responsables en gran medida de su aroma. En los aceites esenciales han sido identificados diferentes componentes como los terpenoides (0.3-1.0 %), principalmente sesquiterpenos (β - cariofileno, farneseno y humuleno) y monoterpenos (mirceno).

Conjuntamente al aceite volátil y los ácidos amargos, han sido identificados algunos flavonoides en lúpulo, siendo el compuesto de este tipo más importante la chalcona xantohumol (Zanoli y Zavatti, 2008). Asimismo, se han identificado otros compuestos polifenólicos como los taninos condensados y los ácidos fenólicos (ferúlico y ácidos clorogénicos) (Zanoli et al., 2005). El lúpulo también es rico en flavonoles glicósidos (kaempferol, quercetina, astragalina, quercitrina, rutina) y catequinas (galato

catequina, galato epicatequina) (Zanoli y Zavatti, 2008). Estos compuestos confieren al lúpulo propiedades antioxidantes (Lermusieau et al., 2001).

En años recientes, el lúpulo ha sido empleado para propósitos culinarios, medicinales y cosméticos (Guarrera, 2003; Zanoli y Zavatti, 2008; Attokaran, 2011; Narvaez et al., 2011). Con respecto a propósitos culinarios, el lúpulo es utilizado como saborizante en algunas bebidas, en confitería, tabacos, productos de panadería, cereales, salsas, mezclas de especias, gomas de mascar. Además, los brotes del lúpulo han sido empleados en ensaladas y sopas en donde el amargor es aceptado, mientras que las inflorescencias secas son usadas en té, ya sea en forma picada como tal o en mezclas.

No obstante lo dicho, a pesar de que se tiene el conocimiento de que el lúpulo posee actividad antioxidante (por su contenido en polifenoles) (Lermusieau et al., 2001), se ha realizado poca o nula investigación del potencial uso del lúpulo como ingrediente con propiedades antioxidantes en carne y productos cárnicos, a pesar de los numerosos estudios sobre el efecto antioxidante de otras plantas que contienen compuestos similares (Kähkönen et al., 1999; Shah et al., 2014). Por lo tanto, el desarrollo y aplicación del lúpulo como antioxidante natural podría ser útil para prolongar la vida útil en carne y productos cárnicos, lo cual es una hipótesis a probar en uno de los capítulos de esta tesis.

7. Bibliografía

- Aguayo-Ulloa, L.A., Miranda-de la Lama, G.C., Pascual-Alonso, M., Fuchs, K., Olleta, J.L., Campo, M.M., Alierta, S., Villaroel, M., & Maria, G.A. (2013). Effect of feeding regime during finishing on lamb welfare, production performance and meat quality. *Small Ruminant Research*, *111*, 147-156.
- Almela, E., Jordán, M.J., Martínez, C., Sotomayor, J.A., Bedía, M., & Bañón, S. (2009). El flavor de la carne cocinada de cordero. *Eurocarne*, *178*, 1-12.
- AMSA (2012). *Guidelines for meat color evaluation*. Champaign, IL: American Meat Science Association.
- André, C., Castanheira, I., Cruz, J.M., Paseiro, P., & Sanches-Silva, A. (2010). Analytical strategies to evaluate antioxidants in food: a review. *Trends in Food Science & Technology*, *21*, 229-246.
- Andrés, S., Huerga, L., Mateo, J., Tejido, M.L., Bodas, R., Morán, L., Prieto, N., Rotolo, L., & Giráldez, F.J. (2014). *Meat Science*, *96*, 806-811.
- Armenteros, M., Ventanas, S., Morcuende, D., Estévez, M., & Ventanas, J. (2012). Empleo de antioxidantes naturales en productos cárnicos. *Eurocarne*, *207*, 63-73.
- Attokaran, M. (2011). Hops. *Humulus lupulus* L (*Urticaceae*). En *Natural food flavours and colorants*. Blackwell Publishing Ltd and Institute of Food Technologies, Iowa, USA. Págs. 241-244.
- Bernúes, A., Ripoll, G., & Panea, B. (2012). Consumer segmentation based on convenience orientation and attitudes towards quality attributes of lamb meat. *Food Quality and Preference*, *26*, 211-220.
- Blanco, C., Bodas, R., Rodríguez, A.B., Prieto, N., Andrés, S., Mantecón, A.R., & Giráldez, F.J. (2012). Nuevos sistemas de alimentación para el cebo intensivo de corderos. *Tierras ovino*, *2*, 42-49.
- Byrne, D.V., O' Sullivan, M.G., Dijksterhuis, G.B., Bredie, W.L.P., & Martens, M. (2001). Sensory panel consistency during development of a vocabulary for warmed-over flavour. *Food Quality and Preference*, *12*, 171-187.

- Canbaş, A., Erten, H., & Özşahin, F. (2001). The effects of storage temperature on the chemical composition of hop pellets. *Process Biochemistry*, *36*, 1053-1058.
- Carocho, M., & Ferreira, C.F.R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future. *Food and Chemical Toxicology*, *51*, 15-25.
- Cattaneo, P. (1994). Prodotti essiccati Di. Carne di pecora (Dry meat products made from lamb or mutton). *Ingegneria Alimentare. Le Conserve Animali*, *10*, 4, 7-13.
- Cheng, J.H., Wang, S.T., & Ockerman, H.W. (2007). Lipid oxidation and color change of salted pork patties. *Meat Science*, *75*, 71-77.
- COAG. (2013). Situación actual del sector ovino. Anuario Agrario 2013. <http://www.coag.org/index.php?s=1&n=5-2>
- Cozar, A., Linares, M.B., Garrido, M.D., & Vergara, H. (2013). Physicochemical, microbiological quality and oxidative stability in spiced lamb meat. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, *3*, 217-222.
- Cruz, J. (2013). El sector ovino y caprino busca soluciones a la caída del consumo y la subida de costes de producción. *Eurocarne*, *220*, 31-40.
- Decker, E.A. (1998). Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of foods to maximize oxidative stability. *Trends in Food Science & Technology*, *9*, 241-248.
- Erickson, M.C. (2002). Lipid oxidation of muscle foods. En *Food lipids: Chemistry, nutrition, and biotechnology*. Eds. Akoh, C.C., Min, D.B. Marcel Dekker, New York, USA. Págs. 365-411.
- Estévez, M. (2011). Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat Science*, *89*, 259-279.
- Estévez, M., & Cava, R. (2006). Effectiveness of rosemary essential oil as an inhibitor of lipid and protein oxidation: Contradictory effects in different types of frankfurters. *Meat Science*, *72*, 348-355.
- Faustman, C., Sun, Q., Mancini, R., & Suman, S.P. (2010). Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat Science*, *86*, 86-94.

- Fernández, J., Pérez-Álvarez, J. A., & Fernández-López, J. A. (1997). Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry*, *59*, 345-353.
- Flores, M., Gianelli, M.P., Pérez-Juan., & Toldrá, F. (2007). Headspace concentration of selected dry-cured aroma compounds in model systems as affected by curing agents. *Food Chemistry*, *102*, 488-493.
- Fraga, C. G., Galleno, M., Verstraeten, S.V., & Oteiza, P. (2010). Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine*, *31*, 435-445.
- Ganhão, R., Morcuende D., & Estévez, M. (2010). Protein oxidation in emulsified cooked Burger patties with added fruit extracts: Influence on color and texture deterioration during chill storage. *Meat Science*, *85*, 402-409.
- 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, I., Díez, V., & Zumalacárregui, J.M. (1998). Changes in nitrogen fractions and free amino acids during ripening of spanish dried beef “cecina”. *Journal of Muscle Foods*, *9*, 257-266.
- García, I., Zumalacárregui, M., & Díez, V. (1995). Microbial succession and identification of *Micrococcaceae* in dried beef cecina, an intermediate moisture meat product. *Food Microbiology*, *12*, 309-315.
- Garnier, J.P. (2010). Análisis del mercado mundial de la carne de ovino. *Eurocarne*, *184*, 115-122.
- Gök, V., Obuz, E., & Akkila, L. (2008). Effects of packaging method and storage time on the chemical, microbiological, and sensory properties of Turkish pastirma- A dry cured beef product. *Meat Science*, *80*, 335-344.
- Gray, J. I., & Monahan, F. J. (1992). Measurement of lipid oxidation in meat and meat products. *Trends in Food Science and Technology*, *3*, 315-319.
- Gray, J.I., Goma, E.A., & Buckley, D.J. (1996). Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Science*, *43*, S111-S123.

- Guarrera, P.M. (2003). Food medicine and minor nourishment in the folk traditions of central Italy (Marche, Abruzzo and Latium). A review. *Fitoterapia*, 74, 515-544.
- Hampton, R., Nickerson, G., Whitney, P., & Haunold, A. (2002). Comparative chemical attributes of native North American hop, *Humulus lupulus* var. *lupuloides* E. Small. *Phytochemistry*, 61, 855-862.
- Haseleu, G., Intelmann, D., & Hofmann, T. (2009). Structure determination and sensory evaluation of novel bitter compounds formed from β -acids of hop (*Humulus lupulus* L.) upon wort boiling. *Food Chemistry*, 116, 71-81.
- Håseth, T. T., Thorkelsson, G., & Sidhu, M. S. (2008). North European Products. En *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. Ed. Toldrá, F. Blackwell Publishing Professional, Ames, USA. Págs. 407-413.
- Hayes, J.E., Allen, P., Brunton, N., O'Grady, M.N., & Kerry, J.P. (2011). Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food Chemistry*, 126, 948-955.
- Hayes, J.E., Kenny, T.A., Ward, P., & Kerry, J.P. (2007). Development of a modified dry curing process for beef. *Meat Science*, 77, 314-323.
- Hayes, J.E., Stepanyan, V., Allen, P., O'Grady, M.N., & Kerry, J.P. (2010). Effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on the quality and shelf-life stability of packaged raw minced beef patties. *Meat Science*, 84, 613-520.
- He, C., Pan, Y., Ji, X., & Wang, H. (2012) Antioxidants: Introduction. En *Antioxidant polymers*. Eds. Cirillo, G., Lemma, F. Scrivener Publishing LLC, New Jersey, USA. Págs. 1-21.
- Hierro, E., de la Hoz, L., & Ordóñez, J. A. (2004). Headspace volatile compounds from salted and occasionally smoked dried meats (cecinas) as affected by animal species. *Food Chemistry*, 85, 649-657.
- Hygreeva, D., Pandey, M. C., & Radhakrishna, K. (2014). Potential applications of plant based derivatives as fat replacers, antioxidants and antimicrobials in fresh and processed meat products. *Meat Science*, 98, 47-57.

- Irwin, J.W., & Hedges, N. (2004). Measuring lipid oxidation. En *Understanding and measuring the shelf-life of food*. Ed. Steele R. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England. Págs. 289-316.
- Kaban, G. (2009). Changes in the composition of volatile compounds and in microbiological and physicochemical parameters during pastirma processing. *Meat Science*, 82, 17-23.
- Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.H., Pihlaja, K., Kujala, T.S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954-3962.
- Kanalec, M. (2002). Ovčji pršut (Dry-cured sheep ham). *Meso in Mesnine*, 3, 38-43.
- Karabagias, I., Bedeka, A., & Kontominas, M.G. (2011). Shelf life extension of lamb using thyme or oregano essential oils and modified atmosphere packaging. *Meat Science*, 88, 109-116.
- Karre, L., Lopez, K., & Getty, K.J.K. (2013). Natural antioxidants in meat and poultry products. *Meat Science*, 94, 220-227.
- Kingston, E.R., Monahan, D.J., Buckley., & Lynch, P.B. (1998). Lipid oxidation in cooked pork as affected by vitamin E, cooking and storage conditions. *Journal of Food Science*, 63, 386-389.
- Kubow, S. (1992). Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. A review. *Free radical Biology and Medicine*, 12, 63-81.
- Ladikos, D., & Lougovois, V. (1990). Lipid oxidation in muscle foods: A review. *Food Chemistry*, 35, 295-314.
- Leistner, L., & Rodel, W. (1976). Intermediate Moisture Foods. London: Elsevier Applied Science Publishers.
- Leizaola, C. F. (2008). Estrategias nutricionales de los pastores vascos: la cecina y otros alimentos de su dieta. *Zainak. Cuadernos de Antropología-Etnografía*, 30, 209-222.
- Lermusieau, G., Liégeois, C., & Collin, S. (2001). Reducing power hop cultivars and beer ageing. *Food Chemistry*, 72, 413-418.

- Leygonie, C., Britz, T. J., & Hoffman, L. C. (2012). Impact of freezing and thawing on the quality of meat: Review. *Meat Science*, *91*, 93-98.
- Linares, M.B., Bornez, R., & Vergara, H. (2007). Effect of different stunning systems on meat quality of light lamb. *Meat Science*, *76*, 675-681.
- Linares, M.B., Cozar, A., Garrido, M.D., & Vergara, H. (2012). Chemical and sensory quality of lamb meat burgers from Manchego Spanish breed. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *63*, 843-852.
- Lorenzo, J.M. (2014a). Changes on physico-chemical, textural, lipolysis and volatile compounds during the manufacture of dry-cured foal “cecina”. *Meat Science*, *96*, 256-263.
- Lorenzo, J.M., Sineiro, J., Amado, I.R., & Franco, D. (2014b). Influence of natural extracts on the shelf life of modified atmosphere-packaged pork patties. *Meat Science*, *96*, 526-534.
- Lund, M. N., Hviid, M. S., & Skibsted, L. H. (2007). The combined effect of antioxidants and modified atmosphere packaging on protein and lipid oxidation in beef patties during chill storage. *Meat Science*, *76*, 226–233.
- Lund, M., Heinonen, M., Baron, C.P., & Estevez, M. (2011). Protein oxidation in muscle foods: A review. *Molecular Nutrition and Food Research*, *55*, 83-95.
- Madruga, M. S., Elmore, J.S., Dodson, A.T., & Mottram, D.S. (2009). Volatile flavour profile of goat meat extracted by three widely used technique. *Food Chemistry*, *115*, 1081-1087.
- MAGRAMA. (2004). Base de datos de consumo en hogares. <http://www.magrama.gob.es/es/>
- MAGRAMA. (2013). Base de datos de consumo en hogares. <http://www.magrama.gob.es/es/>
- Mancini, R.A., & Hunt, M.C. (2005). Current research in meat color. A review. *Meat Science*, *71*, 100-121.
- McCarthy, T.L., Kerry, J.P., Kerry, J.F., Lynch, P.B., & Buckley, D.J. (2001). Assessment of the antioxidant potential of natural food and plant extracts in fresh and previously frozen pork patties. *Meat Science*, *57*, 177-187.

- Mielche, M., & Bertelsen, G. (1994). Approaches to the prevention of warmed-over flavour. *Trends in Food Science & Technology*, 5, 322-326.
- Min, B., & Ahn, D. U. (2005). Mechanism of lipid peroxidation in meat and meatproducts – A review. *Food Science and Biotechnology*, 14, 152–163.
- Miranda-de la Lama, G.C., Villaroel, M., Olleta, J.L., alierta, S., Sañudo, C., & Maria, G.A. (2009). Effect of the pre-slaughter logistic chain on meat quality of lambs. *Meat Science*, 83, 604-609.
- Molinero, C., Martínez, B., Rubio, B., Rovira, J., & Jaime, I. (2008). The effects of extended curing on the microbiological, physicochemical and sensorial characteristics of *Cecina de León*. *Meat Science*, 80, 370-379.
- Montossi, F., Font-i-Furnols, M., del Campo M., San Julián, R., Brito, G., & Sañudo, C. (2013). Sustainable sheep production and consumer preference trends: Compatibilities, contradictions, and unresolved dilemmas. *Meat Science*, 95, 772-789.
- Morrissey, P.A., & Kerry, J.P. (2004). Lipid oxidation and the shelf-life of muscle foods. En *Understanding and measuring the shelf-life of food*. Ed. Steele R. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England. Págs. 357-395.
- Mottram, D. S. (1998). Flavour formation in meat and meat products: a review. *Food Chemistry*, 62, 415-424.
- Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Domínguez, J.M., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M.J., & Parajó, J.C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. A review. *Food Chemistry*, 72, 145-171.
- Msagati, A.M. (2013). Antioxidants and radical scavengers. En *Chemistry of food additives and preservatives*. Wiley and Sons Ltd, Sussex, Reino Unido. Págs. 1-32.
- Muela, E., Sañudo, C., Campo, M.M., Medel, I., & Beltrán, J.A. (2010). Effect of freezing method and frozen storage duration on instrumental quality of lamb throughout display. *Meat Science*, 84, 662-669.
- Narvaez, N., Wang, Y., Xu, Z., & McAllister, T. (2001). Effects of hops on *in vitro* ruminal fermentation of diets varying in forage content. *Livestock Science*, 138, 193-201.

- O'Sullivan, M.G.O., Byrne, D.V., Jensen, M.T., Andersen, H.J., & Vestergaard, J. (2003). A comparison of warmed-over flavour in pork by sensory analysis, GC/MS and the electronic nose. *Meat Science*, *65*, 1125-1138.
- Paleari, M. A., Moretti, V. M., Beretta, G., & Caprino, F. (2008). Chemical parameters, fatty acids and volatile compounds of salted and ripened goat thigh. *Small Ruminant Research*, *74*, 140-148.
- Paleari, M.A., Beretta, G., Colombo, F., Foschini, S., Bertolo, G., & Camisasca, S. (2000). Buffalo meat as a salted and cured product. *Meat Science*, *54*, 365-367.
- Pegg, R.B., & Shahidi, F. (2007). Off flavors and rancidity in foods. En Handbook of meat, poultry and seafood quality. Blackwell Publishing, Iowa, USA. Págs. 217-228.
- Pignoli, G., Bou, R., Rodriguez- Estrada, M.T., & Decker, E.A. (2009). Suitability of saturated aldehydes as lipid oxidation markers in washed turkey meat. *Meat Science*, *83*, 412-416.
- Raharjo, S., & Sofos, J.N. (1993). Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: a review. *Meat Science*, *35*, 145-169.
- Reihani, S.F.S., Tan., T.C., Huda, N., & Easa, A.M. (2014). Frozen storage stability of beef patties incorporated with extracts from Ulan raja leaves (*Cosmos caudatus*). *Food Chemistry*, *155*, 17-23.
- Reische, D.W., Lillard, D.A., & Eitenmiller, R.R. (2002). Antioxidants. En *Food lipids*. Akoh, C.C., Min, D.B. Marcel Dekker, New York, USA.
- Ripoll, G., Albertí, P., & Joy, M. (2012). Influence of alfalfa grazing-based feeding systems on carcass fat colour and meat quality of lights lambs. *Meat Science*, *90*, 457-464.
- Rubio, B., Martínez, B., González-Fernández, C., García-Cachan, D., Rovira, J., & Jaime, I. (2007). Effect of modified atmosphere packaging on the microbiological and sensory quality on a dry cured beef products: "Cecina de león". *Meat Science*, *75*, 515-522.
- Salvá, B. K. (2010). Caracterización de la carne y charqui de alpaca (*Vicugna pacos*). *Tesis doctoral*. Universidad de León, León, España.

- Santaliestra-Pasías, A.M., Mesana, G.M.I., & Moreno, A.L.A. (2010). La carne de cordero en la alimentación española: importancia de la carne de cordero. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*, 30, 42-48.
- Sañudo, C., Sánchez, A., & Alfonso, M. 1998. Small ruminant production systems and factors affecting lamb meat quality. *Meat Science*, 49, S29-S64.
- Serrano, J., Puupponen-Pimiä, R., Dauer, A., Aura, A.M., & Saura-Calixto, F. (2009). Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. A review. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53, S310-329.
- Shah, M.A., Don Bosco, S.J., & Mir, S.A. (2014). Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. A review. *Meat Science*, 98, 21-33.
- Shahidi, F. (2002). Lipid-derived flavours in meat products. En *Meat processing. Improving quality*. Eds. Kerry, J., Kerry, J., Ledward, D. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Reino Unido. Págs. 105-121.
- Shahidi, F., & Pegg, R. B. (1994). Hexanal as an indicator of the flavor deterioration of meat and meat products. *ACS symposium series*, 558, 18-29.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2005). Lipid Oxidation: Measurement methods. En *Bayle's industrial oil and fat products*. Ed. Shahidi.F. Wiley and Sons, Sussex, Reino Unido. Págs. 357-385.
- Škerget, Mojca., Kotnik, P., Hadolin, M., Rižner, H.A., Simonič, M., & Knez, Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89, 191-198.
- Tang, S., Kerry, J.P., Sheenan, D., Buckley, D.J., & Morrissey, P.M. (2001). Antioxidative effect of added tea catechins on susceptibility of cooked red meat, poultry and fish patties to lipid oxidation. *Food Research International*, 34, 651-657.
- Texeira, A., Pereira, E., & Rodrigues, E. S. (2011). Goat meat quality. Effects of salting, air-drying and ageing processes. *Small Ruminant Research*, 98, 55-58.
- Toldrá, F. (2002). Manufacturing of dry-cured ham. *Dry cured, Meat products*. Food and Nutrition Press, Connecticut, USA. Págs. 27-62.

- Toldrá, F. (2006a). Biochemical proteolysis basis for improved processing of dry-cured meats. En *Advanced technologies for meat processing*. Eds. Nollet, L.M.L. Taylor & Francis, USA. Págs. 329-351.
- Toldrá, F. (2006b). Biochemistry of processing. Meat and poultry. En *Food biochemistry and food processing*. Ed. Y.H. Hui. Blackwell Publishing, Iowa, USA. Págs. 315-336.
- Toldrá, F. (2006c). The role of muscle enzymes in dry-cured meat products with different drying conditions. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 164-168.
- Tomás-Barberán & Ferreres, F. (2012). Analytical methods of flavonols and flavones. En *Analysis of antioxidant-rich phytochemicals*. Eds. Xu, Z., Howard, L. R. Wiley and Sons Ltd, Sussex, Reino Unido. Págs. 207-246.
- Vicente, S. J. V., Sampaio, G. R., Ferrari, C. K. B., & Torres, E. A. F. S. (2012). Oxidation of Cholesterol in Foods and Its Importance for Human Health. *Food Reviews International*, 28, 47-70.
- Vicente, S. J. V., Sampaio, G. R., Ferrari, C. K. B., & Torres, E. A. F. S. (2012). Oxidation of cholesterol in foods and its importance for human health. *Food Reviews International*, 28, 47-70.
- Vuorela, S., Salminen, H., Makela, M., Kivikari, R., Karonen, M., & Heinonen, M. (2005). Effect of plant phenolics on protein and lipid oxidation in cooked pork meat patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8492–8497.
- Watkins, P.J., Rose, G., Warner, R.D., Dunshea, F.R., & Pethick, D.W. (2012). A comparison of solid-phase microextraction (SPME) with simultaneous distillation-extraction (SDE) for the analysis of volatile compounds in heated beef and sheep fats. *Meat Science*, 91, 99-107.
- Willian, K. (2013). Lipids and lipid oxidation. En *The science of meat quality*. Ed. Kerth, C.H. Wiley and Sons, Inc., Sussex, Reino Unido. Págs, 147-175.
- Wood, J.E., Senthilmohan, S.T., & Peskin, A.V. (2002). Antioxidant activity of procyanidin-containing plant extracts at different pHs. *Food Chemistry*, 77, 155-161.
- Wrolstad, R.E., Acree, T.E, Decker, Penner, M.H., Reid, D.S., Schwartz, S.J., Shoemaker, C.F., Smith, D., & Sporns, P. (2005). Lipid oxidation/stability. En

- Handbook of food analytical chemistry: water, proteins, enzymes, lipids and carbohydrates.* Wiley and Sons, New Jersey, USA. Págs, 513-564.
- Xu, Z. (2012a). Analysis methods of phenolic acids. En *Analysis of antioxidant-rich phytochemicals*. Eds. Xu, Z., Howard, L. R. Wiley and Sons Ltd, Sussex, Reino Unido. Págs. 69-104.
- Xu, Z. (2012b). Important antioxidant phytochemicals in agricultural food products. En *Analysis of antioxidant-rich phytochemicals*. Eds. Xu, Z., Howard, L. R. Wiley and Sons Ltd, Sussex, Reino Unido. Págs. 1-24.
- Zanoli, P., & Zavatti, M. (2008). Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 383-396.
- Zanoli, P., Rivasi, M., Zavatti, M., Brusiani, F., & Baraldi, M. (2005). New insight in the neuropharmacological activity of *Humulus lupulus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 102, 102-106.
- Zhan W., Xiao, S., & Ahn, D.U. (2013). Protein Oxidation: Basic principles and implications for meat quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 1191-1201.

CAPÍTULO 2

CHAPTER 2

The effect of the addition of sunflower soapstock to early fattening lambs' diet on volatile composition and lipid oxidative stability of lamb meat

CAPÍTULO 2

Index

	Page
Abstract	60
1. Introduction	61
2. Materials and methods	62
2.1. <i>Meat</i>	62
2.2. <i>Chemical analyses</i>	63
2.3. <i>Statistical analysis</i>	64
3. Results and discussion	64
4. Conclusions	67
References	68
Tables	72

Abstract

This study investigated the volatile composition and the lipid stability of lamb meat obtained from lambs fed with different amounts of sunflower soapstock. *M. Biceps femoris* from thirty-two male lambs, provided by the Instituto Ganadero de Montaña (IGM) (Marzanas, León), were used. Lambs (15 kg of body weight) were fed on total mixed rations (Table 1) with different amount of sunflower soapstok per kg of feed (eight lambs per treatment): 0 g, 15 g, 30 g and 60 g, until reaching 27 kg of body weight, when lambs were slaughtered. 24 h post mortem muscles were cooked and sliced. Volatile composition of cooked lamb was determined by static headspace (solid phase microextraction)-gas chromatography coupled to mass spectrometry. Iron-induced lipid oxidation by the thiobarbituric acid reactive sustances (TBARS) analysis was also determined. Cooked meat slices were anaerobically displayed under simulated retail conditions and TBARS levels were determined on days 0 and 2. Sunflower soapstock in lambs' diet did not shown a clear effect on the lipid-derived volatiles of the cooked lamb. However, toluene and 2,6-Di-tert-butylquinone (a degradation product from BHT) were quantified in lamb from the soapstock group and not in meat from the control group. Lamb meat from the soapstock groups showed higher stability to iron-induced lipid oxidation than control meat. No significant differences on TBARS levels in cooked meat between lambs' dietary treatments were found during display.

Keywords: lipid oxidation, meat flavour, refrigerated storage, oil by-products

1. Introduction

Ruminant meat seems to be a major source of saturated fatty acids (SFA) in human diet. SFA have been implicated in diseases associated with modern life, especially in developed countries (Wood et al., 2003). A low ratio of polyunsaturated fatty acids (PUFA) to saturated fatty acids (SFA), as found in lamb, increases the risk of cardiovascular and other diseases (Enser et al., 1996; Wood et al., 2003). Another important nutritional index affecting cardiovascular and other diseases is the ratio of n-6/n-3 PUFA. Furthermore, fat composition significantly affects flavour, juiciness and texture of meat (Enser et al., 1998). For these reasons, numerous research works have aimed to explore ways to change the fatty acid composition in ruminant meat, specifically to reduce concentrations of SFA and increase n-3 PUFA (Nute et al., 2007).

Several studies have shown that fatty acid composition of lamb meat is affected by the lambs' diet (Ponnampalam et al., 2001; Demirel et al., 2004; Juárez et al., 2008). Furthermore, a number of studies have been published in which vegetable oils are used as lipid supplement in the diet of ruminants to enhance meat composition (Raes et al., 2004; Jerónimo et al., 2012; Ferreira et al., 2014). The vegetable oils used in lambs' diet can be those also destined for human consumption, such as olive, sunflower or soybean oils, or by-products from the oil production (cakes, soap residue). Between these two alternatives, using by-products is a strategy that allows to reduce feeding cost and to cope with the need to recycle waste material from food manufacture facilities (Vasta et al., 2008). Sunflower soapstock is a commercial by-product derived from the oil industry with a fatty acid profile very similar to the oil from which it becomes. Moreover, sunflower soapstocks contain high levels of vitamin E and, eventually, synthetic antioxidants which may contribute to the lipid oxidative stability of meat.

Fatty acid composition of lamb, mainly PUFA content, affects the composition of lipid-derived volatile compounds formed during lamb cooking and, thus, modifications of the fatty acid profile of meat could affect lamb flavour (Mottram, 1998; Campo et al., 2003; Dransfield, 2008). Moreover, as said before, modifications of the fatty acid profile of lamb could result in changes in the lipid stability showed by lamb during storage. Lipid oxidation plays a key role in meat discolouration and undesirable flavour development, thus reducing meat quality and shelf life (Elmore et al., 1999). Therefore, the objective of the present study was to investigate the volatile composition

and the lipid stability of lamb meat from lambs fed with different amounts of sunflower soapstock added to their diet.

2. Materials and methods

2.1. Meat

The left-side *M. Biceps femoris* from thirty two weaned male merino lambs were used in the experiment. These muscles were provided by the Instituto Ganadero de Montaña (IGM) (Marzanas, León), where the lambs were reared. According to the IGM lambs were fed on total mixed rations (TMR) pellets (Table 1) (Blanco et al., 2014). Lambs were penned individually at an average body weight of 15 kg. They were randomly allocated to one of four different groups (eight lambs per treatment), according to the amount of sunflower soapstocks offered in the diet: 00SS (0 g sunflower soapstock/kg TMR pellets), 15SS (15 g sunflower soapstock/kg TMR pellet), 30SS (30 g sunflower soapstock/kg TMR pellets) and 60SS (60 g sunflower soapstock/kg TMR pellet). Each lamb was fed the corresponding experimental diet *ad libitum* and fresh drinking water was always available.

The amount of feed offered was adjusted daily on the basis previous day's intake, allowing refusals of ca. 200 g/kg offered. All handling practices followed the recommendations of European Council Directive 86/609/EEC for the protection of animals used for experimental and other scientific purposes, and all of the animals were able to see and hear other lambs. When animals reached 27 kg of BW they were slaughtered by stunning and exsanguination from the jugular vein, prior to being eviscerated and skinned. After 24 h post mortem, left-side *M. Biceps femoris* were obtained and transported to the Laboratory at 4 °C. In the laboratory, *M. Biceps femoris* were frozen and stored at -47 °C until further analysis.

Once thawed overnight at 4 °C, each *M. Biceps femoris* was cut into three portions perpendicular to the long axis: proximal (1 cm), central (the largest) and distal (1 cm). The proximal and distal portions were discharged and the central portion was cooked just after cutting. This portion was placed into polyethylene bags and was then cooked in a water bath (JP Selecta, Barcelona, Spain) for 40 min at 75 °C until the sample reached a core temperature of 70 °C. After cooking, the portion was cut into 1.5-cm slices, perpendicular to the long axis. Two slices were vacuum packaged and stored

(-47 °C, up to ten days) for further volatile compound analysis. One slice was immediately used for analysis of iron-induced lipid oxidation. Finally, one slice was wrapped in an oxygen-permeable polyvinylchloride film (580 ml m⁻² h⁻¹) and stored at 4 °C during 48 h while exposed at a light source (12 h per day). This with the purpose of simulating retail display conditions. After the display time, the slices were frozen at -47 °C until further analysis of thiobarbituric reactive substances (TBARS).

2.2. Chemical analyses

Volatile compounds were determined by static headspace-gas chromatography coupled to mass spectrometry. Extraction of volatile compounds from the cooked slices of *M. Biceps femoris* slices was carried out using solid phase microextraction (SPME) with a 75 µm carboxen/polydimethylsiloxane-coated fused silica fibre (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Meat samples were minced using a domestic mincer and four g were weighed into a 15-ml vial, sealed with polytetrafluoroethylene lined silicone septa. The vial was placed in a 200-W ultrasonic water bath (JP Selecta, Barcelona, Spain) for 30 min at 40 °C for equilibration. Then the ultrasound was switched off and the SPME fibre was exposed to the sample for 30 min at 40 °C. The compounds adsorbed by the fibre were desorbed in a CG 7890A gas chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) injection port for 2 min at 260 °C in splitless-mode. The chromatographic and mass detector operation conditions and the identification and quantification procedures were those described by Vieira et al. (2012), with the exception that in this case the series of n-alkanes used for calculating the experimental linear retention index was in the range C5 to C15.

The stability of lamb against lipid oxidation was assessed by measuring iron-induced lipid oxidation in duplicate. The analysis was carried out on the *Biceps femoris* slice sampled immediately after the cooking procedure, following the procedure described by Mercier et al. (2004) for sample preparation and incubation of sample solutions, with incubation times of 0 (immediate measurement without incubation), 0, 2.5, 5 and 7 hours and incubation temperature of 37 °C. Afterwards, the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay solution was carried out with 1 ml of incubated sample according to the method proposed by Nam & Ahn (2003). Furthermore, the

oxidative status in 48-h displayed lamb cooked slices was assessed in duplicate using the TBARS analysis as described by Nam & Ahn (2003).

2.3. Statistical analysis

The results on the volatile compounds were subjected to one-way analysis of variance, with the dietary treatment as the only source of variation. TBARS results were subjected to two-way analysis of variance, being feeding treatment and time (incubation or storage time) and their interactions the factors used in the model. The general linear models (GLM) procedure of SAS package was used for the analysis of variance, which was followed by the Duncan test.

3. Results and discussion

Table 2 shows the volatile composition of cooked meat samples as a function of the dietary treatment. Volatiles were divided in the following chemical families: acyclic hydrocarbons (9), acyclic aldehydes (9), acyclic ketones (4), acyclic alcohols (8), furans (1), fatty acids (2), and benzene compounds and quinones (4). Additionally, other five acyclic branched hydrocarbons, for which the molecular structure could not be positively determined (and with levels under 40 ng of heptane/g of meat) and two totally-unknown compounds were also quantified, although these were not shown in the Table for brevity.

The most abundant compounds in cooked lamb meat, regardless of the dietary treatment, were aldehydes followed by alcohols. The dominance of the aliphatic aldehydes in headspace of the lamb meat was in agreement with that found in other studies (Vasta et al., 2012; Andrés et al., 2014). Hydrocarbons and ketones were the third and fourth more abundant volatiles; however, the rank order for those volatiles depended on the dietary treatment, with the first family being more abundant in the meat samples from lambs supplemented with soapstocks. The fifth and sixth groups in abundance were that of furans (2-pentylfuran) and fatty acids. The totality of volatiles from all those above-mentioned groups are generally thought to arise from lipid degradation (hydrolysis, decarboxylation, and oxidation) taking place during cooking of meat (Nawar, 1969; Frankel, 1982; Sivadier et al., 2008).

Dietary treatment affected to the levels of some lipid-derived volatile compounds in the headspace of meat samples (Table 2). Actually, acyclic hydrocarbons, specifically saturated hydrocarbons, seemed to be higher in soapstock meat than in control meat. In this regard, statistical differences were found between controls and both 15SS and 30SS samples for total hydrocarbons (and for undecane, the most abundant hydrocarbon); however, the difference between control and 60SS samples was not significant. Furthermore, the group of fatty acids (composed by octanoic and nonanoic acids) appeared to be at the highest level in 60SS samples, being the control samples in an intermediate position. Significant differences were also found for other individual lipid-breakdown volatiles, i.e., 2-heptenal, 2-heptanone, 6-methyl-2-heptanone, 1-hexanol, 1-octen-3-ol, 1-octanol and 2-pentyl-furan. All these differences do not allow to differentiate neatly between control and soapstock meat samples, or to relate the amount of soapstock in diet with the abundance of those volatiles, except for 1-octanol that seemed to increase as the dietary soapstock level increased.

The data provided by the IGM, where the intramuscular fat content and fatty acid composition of the intramuscular fat from the lambs used in the present study (unpublished data), show that dietary treatment was not affected by dietary treatment and that few differences were found in fatty acid profile between the experimental groups. Therefore, the limited differences found between dietary treatments regarding lipid-breakdown volatile levels seems consistent with the scarce difference found in fatty acid profiles and similar fat content in meat between treatments. According to Dransfield (2008), there is a close relationship between fatty acid composition of meat and meat volatiles.

Nonetheless, apart from the fatty acid profile, lipid-derived volatiles formed during meat cooking has been related to differences in the muscle antioxidant status, which in turn could depend not only on fat unsaturation but also on the presence of antioxidants such as tocopherols or synthetic antioxidants (Osorio et al., 2008; Wood et al., 2008; Ponnampalam et al., 2012). In the present study, differences in the degree of lipid oxidation due to the thermal effect of cooking between experimental groups seems not relevant, taking into account that aldehydes (and specifically hexanal), which are indicatives for lipid oxidation (Shahidi and Pegg, 1994), did not show significant variations.

One of the most remarkable effects of the addition of soapstock to lambs' diet on meat volatiles was the significant effect on the sum of benzene compounds and quinones, with levels higher in soapstock samples than in control samples. Toluene, ethylbenzene and 2,6-di-tert-butylquinone (DTBQ) were not detected at quantifiable levels in controls, while in soapstock samples were detected (in amounts from 10 to 20 ng of undecane per g of meat). Furthermore, the mean levels of benzaldehyde were higher in soapstock samples than in controls, although differences were not significant. The presence of the benzene compounds detected in this study has been reported in previous studies on lamb volatiles (Elmore et al., 2005; Sivadier et al., 2010). According to these authors, their presence in meat could be attributable to several origins, i.e., degradation of carotenoids from pasture, thermal decomposition of fatty acids or intake of feed polluted with those compounds. On the contrary, the presence of DTBQ has not been previously reported in lamb meat. This compound has been found to result from the degradation of di-tert-butylhydroxitoluene (BHT) in oils (Shahidi et al., 1992). This can be the origin of DTBQ in the lamb meat studied because BHT was an antioxidant used in the soapstock. In fact, BHT was detected in the meat samples analysed; however, BHT levels were under the quantification limit (8 ng of undecane per g of meat). BHT is an additive used to retard lipid oxidation in oils and specifically this was in the soapstock used in this experiment.

Results on iron-induced lipid oxidation of cooked meat, generated via Fenton reaction ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$) and quantified by the TBARS assay, are shown in Table 3. This assay (iron-induced TBARS) has been used to assess the animals' diet influence on meat oxidation processes (Mercier et al., 2004). Iron-induced lipid oxidation showed no-significant differences between the different treatments at incubation times (0, 2.5 and 5 h). However, the TBARS values of control meat was higher ($P<0.05$) at 7 h of incubation than that showed by rest the treatments. Furthermore, considering the mean values from all the incubation times, control meat showed higher TBARS values than soapstock meat ($P<0.05$). This means that dietary soapstock increased the lipid resistance to iron-induced oxidation, which could be partly explained by the presence of synthetic antioxidant (DTBQ, BHT) in the soapstock meat, as a result of the presence of BHT in the sunflower soapstock.

Finally, the TBARS analysis carried out on cooked meat during simulated retail display (Table 4) showed a no-significant effect of dietary treatment on lipid oxidation.

Therefore, the effect of the addition of sunflower soapstock to diet on lipid oxidation stability of cooked meat differs between the two analyses carried out: a significant effect on iron-induced TBARS values of recently cooked meat (Table 3) and no significant effect on TBARS values of displayed cooked meat. This discrepancy could be attributed to methodological differences between both analytical procedures on the lipid oxidation process, i.e., catalysis pathway, temperature, time. One other possible reason might be an eventual time-related degradation of antioxidant capacity cooked meat during display.

4. Conclusions

The addition of dietary sunflower soapstock at the conditions used in this study did not show a clear effect on the lipid-derived volatile compounds in the headspace of cooked lamb meat. However, the use of soapstock resulted in the presence of the volatile benzene compounds toluene and 2,6-Di-tert-butylquinone (a degradation product of the antioxidant BHT), which were quantified in meat from the soapstock group and not in meat from the control group. Furthermore, lamb meat from the sunflower-soapstock groups showed higher stability to iron-induced lipid oxidation than control meat. However, differences in the stability to lipid oxidation of cooked meat during simulated aerobic display between lambs' dietary could not be demonstrated with the TBARS analysis.

References

- Andrés, S., Huerga, L., Mateo, J., Tejido, M. L., Bodas, R., Morán, L., Prieto, N., Rotolo, L., & Giráldez, F. J. (2014). The effect of quercetin dietary supplementation on meat oxidation processes and texture of fattening lambs. *Meat Science*, *96*, 806–811.
- Blanco, C., Bodas, R., Prieto, N., Andrés, S., López, S., & Giráldez, F. J. (2014). Concentrate plus ground barley straw pellets can replace conventional feeding systems for light fattening lambs. *Small Ruminant Research*, *116*, 137-143.
- Campo, M. M., Nute, G. R., Wood, J. D., Elmore, S. J., Mottram, D. S., & Enser, M. (2003). Modelling the effect of fatty acids in odour development of cooked meat in vitro; part I—Sensory perception. *Meat Science*, *63*, 367–375.
- Demirel, G., Wood, J.D., & Enser, M. (2004). Conjugated linoleic acid content of the lamb muscle and liver fed different supplements. *Small Ruminant Research*, *52*, 23-28.
- Dransfield, E. (2008). The taste of fat. *Meat Science*, *80*, 37–42.
- Elmore, J.E., Cooper, S.L., Enser, M., Mottram, D.S., Sinclair, L.A., Wilkinson, R.G., & Wood, J.D. (2005). Dietary manipulation of fatty acid composition in lamb meat and its effect on the volatile aroma compounds of grilled lamb. *Meat Science*, *69*, 233-242.
- Elmore, J.S., Mottram, D.S., Enser, M., & Wood, J.D. (1999). Effect of polyunsaturated fatty acid composition of beef muscle on the profile of aroma volatiles. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, *457*, 1619-1625
- Enser, M., Hallet, K., Hewitt, B., Fursey, G.A.J., & Wood, J.D. (1996). Fatty acid content and composition of English beef, lamb and pork at retail. *Meat Science*, *42*, 443-446.
- Enser, M., Hallet, K., Hewitt, B., Fursey, G.A.J., Wood, J.D., & Harrington, G. (1998). Fatty acid content and composition of UK beef and lamb muscle in relation to production system and implications for human nutrition. *Meat Science*, *49*, 329-341.

- Ferreira, E. M., Pires, A. V., Susin, I., Gentil, R. S., Parente, M. O. M., Nolli, C. P., Meneghini, R. C. M., Mendes, C. Q., & Ribeiro, C. V. D. M. (2014). Growth, feed intake, carcass characteristics, and meat fatty acid profile of lambs fed soybean oil partially replaced by fish oil blend. *Animal Feed Science and Technology*, *187*, 9-18.
- Frankel, E. N. (1982). Volatile lipid oxidation products. *Progress in Lipid Research*, *22*, 1-33.
- Jerónimo, E., Alfaia, C. M. M., Alves, S. P., Dentinho, M. T. P., Prates, J. A. M., Vasta, V., Santos-Silva, J., & Bessa, R. J. B. (2012). Effect of dietary grape seed extract and *Cistus ladanifer* L. in combination with vegetable oil supplementation on lamb meat quality. *Meat Science*, *92*, 841-847.
- Juárez, M., Horcada, A., Alcalde, M. J., Valera, M., Mullen, A. M., & Molina, A. (2008). Estimation of factors influencing fatty acid profiles in light lambs. *Meat Science*, *79*, 203-210.
- Mercier, Y., Gatellier, P., & Renner, M. (2004). Lipid and protein oxidation in vitro, and antioxidant potential in meat from Charolais cows finished on pasture or mixed diet. *Meat Science*, *66*, 467-473.
- Mottram, D. S. (1998). Flavour formation in meat and meat products: A review. *Food Chemistry*, *62*, 415-424.
- Nam, K. C., & Ahn, D. U. (2003). Combination of anaerobic and vacuum packaging to control lipid oxidation and off-odour volatiles of irradiated raw turkey breast. *Meat Science*, *63*, 389-395.
- Nawar, W.W. (1969). Thermal degradation of lipids. A review. *Journal Agricultural Food and Chemistry*, *17*, 18-21.
- Nute, G.R., Richardson, R.I., Wood, J.D., Hughes, S.I., Wilkinson, R.G., Cooper, S.L., & Sinclair, L.A. (2007). Effect of dietary oil source on the flavour and the colour and lipid stability of lamb meat. *Meat Science*, *77*, 547-555.
- Osorio, M.T., Zumalacárregui, J.M., Alfonso-Cabeza, E., Figueira, A., & Mateo, J. (2008). Effect of rearing system on some meat quality traits and volatile compounds of suckling lamb meat. *Small Ruminant Research*, *78*, 1-12.

- Ponnampalam, E.N., Butler, K.L., McDonagh, M.B., Jacobs, J.L., & Hopkins, D.L. (2012). Relationship between muscle antioxidant status, forms of iron, polyunsaturated fatty acids and functionality (retail colour) of meat in lambs. *Meat Science*, *90*, 297–303.
- Ponnampalam, E.N., Trout, G.R., Sinclair, A.J., Egan, A.R., & Leury, B.J. (2001). Comparison of the color stability and lipid oxidative stability of fresh and vacuum packaged lamb muscle containing elevated omega-3 and omega-6 fatty acid levels from dietary manipulation. *Meat Science*, *58*, 151-161.
- Raes, K., De Smet, S., & Demeyer, D. (2004). Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: a review. *Animal Feed Science and Technology*, *113*, 199-221
- Shahidi, F., Janitha, P.K., & Wanasundara, P.D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *32*, 67-103.
- Shahidi F., & Pegg, R. B. (1994). Hexanal as an indicator of meat flavour deterioration. *Journal Food Lipid*, *1*, 177-186.
- Sivadier, G., Ratel, J., Bouvier, F., & Engel, E. (2008). Authentication of meat products: Determination of animal feeding by parallel GC–MS analysis of three adipose tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 9803–9812.
- Sivadier, G., Ratel, J., & Engel, E. (2010). Persistence of pasture feeding volatile biomarkers in lamb fats. *Food Chemistry*, *118*, 418-425.
- Vasta, V., Nudda, A., Cannas, A., Lanza, M., & Priolo, A. (2008). Review. Alternative feed resources and their effects on the quality of meat and milk from small ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, *147*, 223-246.
- Vasta, V., Ventura, V., Luciano, G., Andronico, V., Pagano, R. I., Scerra, M., Biondi, L., Avondo, M., & Priolo, A. (2012). The volatile compounds in lamb fat are affected by the time of grazing. *Meat Science*, *90*, 451–456.
- Vieira, C., Fernández-Diez A., Mateo J., Bodas R., Soto, S., & Manso, T. (2012). Effects of addition of different vegetable oils to lactating dairy ewes' diet on meat quality characteristics of suckling lambs reared on the ewes' milk. *Meat Science*, *91*, 277-283.

Wood, J.D., Enser, M., Fisher A.V., Nute, G.R. Sheard, P.R. Richardson, R.I., Hughes, S.I., & Whittington F.M. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science*, 78, 343-358.

Wood, J.D., Richardson, R.I., Nute, G.R., Fisher, A.V., Campo, M.M., Kasapidou, E., Sheard, P.R., & Enser. M. (2003). Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Science*, 66, 21-32.

Table 1. Experimental feeds: ingredients and chemical composition.

	Experimental diets			
	00SS	15SS	30SS	60SS
Ingredients (g/kg)				
Barley	433	417	404	375
Corn	150	145	140	130
Soybean meal	237	243	246	255
Barley straw	150	150	150	150
Sunflower soapstock ²	-	15	30	60
Mineral/vitamin premix	30	30	30	30

00SS = TMR pellet without sunflower soapstock (SS), 15SS = TMR pellet containing 15 g SS/kg, 30SS = TMR pellet containing 30 g SS/kg, 60SS = TMR pellet containing 60 g SS/kg

²Sunflower soapstocks FA profile was analysed (palmitic acid 16.4%, linoleic acid 38.1 %, linolenic acid 1.0%, stearic acid 11.4%, oleic acid 24.9% and others 8.2%).

Data provided by the Instituto Ganadero de Montaña (León, Spain).

Table 2. Volatile composition (ng of undecane per g of meat) in cooked meat (*Biceps femoris*) from lambs fed with different levels of sunflower soapstocks.

	00SS	15SS	30SS	60SS	RSD	<i>P</i> -value
<i>Acyclic hydrocarbons</i>	284 ^b	701 ^a	799 ^a	487 ^{ab}	347.5	0.040
1-Heptene (682) [#]	21	22	29	21	11.6	0.502
1-Octene (790)	23	24	33	34	12.9	0.260
Octene (800)	NC	23	23	14	27.9	0.609
Decane (1000)	19	105	108	36	75.2	0.052
Undecane (1100)	77 ^c	227 ^{ab}	315 ^a	167 ^{bc}	133.8	0.014
Dodecane (1200)	67	81	81	89	22.0	0.253
Undecane, 2,6-dimethyl (1213)	NC	11	11	11	3.5	0.283
Tetradecane (1400)	14 ^b	22 ^a	17 ^{ab}	18 ^{ab}	5.4	0.029
Pentadecane (1500)	10	19	12	16	8.7	0.224
<i>Acyclic aldehydes</i>	10410	10374	10454	11102	2033.6	0.875
Pentanal (704)	528	552	635	554	127.6	0.419
Hexanal (807)	7097	6974	7142	7235	1465.8	0.988
Heptanal (903)	580	665	579	740	269.5	0.595
2-Heptenal, (Z)- (959)	23 ^{ab}	17 ^b	13 ^b	35 ^a	13.1	0.014
Octanal (1005)	888	890	948	1063	178.9	0.193
2-Octenal, (E)- (1060)	27	35	48	43	19.9	0.197
Nonanal (1106)	1237	1195	1053	1391	213.3	0.391
2-Nonenal, (E)- (1162)	10	14	11	11	5.1	0.335
Decanal (1207)	NC	30	26	31	6.0	0.120
<i>Acyclic ketones</i>	458	427	382	586	184.6	0.192
2-Heptanone (891)	64 ^{ab}	66 ^{ab}	54 ^b	83 ^a	24.2	0.152
2-Heptanone, 6-methyl- (955)	13 ^{ab}	12 ^{ab}	10 ^b	17 ^a	5.9	0.142
2,5-Octanedione (985)	368	327	279	450	156.7	0.208

2-Decanone (1192)	12	22	21	18	8.6	0.142
<i>Aliphatic alcohols</i>	1219	1317	1993	1456	296.3	0.314
1-Penten-3-ol (680)	13	18	21	14	7.4	0.103
1-Pentanol (760)	313	374	368	364	105.0	0.643
1-Hexanol (871)	78 ^b	151 ^a	155 ^a	116 ^{ab}	54.6	0.033
1-Heptanol (971)	78	81	84	101	25.8	0.298
1-Octen-3-ol (981)	555 ^a	500 ^{ab}	374 ^b	622 ^a	151.4	0.027
1-Hexanol, 2-ethyl (1030)	NC	28	22	NC	16.3	0.031
2-Octen-1-ol, (E)- (1068)	57	11	NC	57	71.6	0.356
1-Octanol (1072)	124 ^b	153 ^{ab}	168 ^a	180 ^a	41.0	0.061
<i>Furan compounds</i>						
Furan, 2-penthyl (991)	196 ^{ab}	186 ^b	148 ^b	278 ^a	80.9	0.029
<i>Fattyacids</i>	58 ^b	37 ^{bc}	35 ^c	112 ^a	21.1	<0.001
Octanoicacid (1169)	23 ^b	14 ^b	17 ^b	56 ^a	12.4	<0.001
Nonanoicacid (1265)	35 ^b	23 ^c	18 ^c	56 ^a	11.1	<0.001
<i>Benzene compounds and quinones</i>	46 ^b	100 ^a	93 ^a	92 ^a	22.5	0.0006
Toluene (755)	NQ	14	10	17	9.2	0.046
Benzene, ethyl (861)	NQ	17	16	10	14.9	0.089
Benzaldehyde (966)	46	70	68	65	22.2	0.160
2,6-Di-tert-butylquinone (1484)	NQ	NC	18	18	8.2	0.006

00SS = TMR pellet without sunflower soapstock (SS), 15SS = TMR pellet containing 15 g SS/kg, 30SS = TMR pellet containing 30 g SS/kg, 60SS = TMR pellet containing 60 g SS/kg

The relative retention times found for each compound is shown into the brackets.

NQ: Non-quantified (levels under the detection limit: 8 ng of undecane per g of meat).

Means with different superscripts (^{a,b,c}) indicate statistical differences ($P < 0.05$).

Table 3. Iron-induced lipid oxidation of cooked meat (*Biceps femoris*) expressed as mg of malondialdehyde per kg of meat, from lambs receiving diets added with sunflower soapstock at different percentages

	00SS (n=8)	15SS (n=8)	30SS (n=8)	60SS (n=8)	Mean (SEM)
Incubation time (h)					
0	2,06 ^{a3}	1,48 ^{a2}	1,39 ^{a3}	1,59 ^{a3}	1,64 (0,11) ³
2,5	5,64 ^{a2}	5,31 ^{a1}	4,03 ^{a2,3}	4,29 ^{a2,3}	4,84 (0,50) ²
5	7,64 ^{a2}	4,83 ^{a1,2}	5,08 ^{a1,2}	5,33 ^{a1,2}	5,74 (0,54) ²
7	11,63 ^{a1}	5,51 ^{b1}	7,77 ^{b1}	8,19 ^{b1}	8,23 (0,83) ¹
Media (SEM)	6,74 (0,78) ^a	4,28 (0,56) ^b	4,57 (0,72) ^b	4,85 (0,67) ^b	

00SS = TMR pellet without sunflower soapstock (SS), 15SS = TMR pellet containing 15 g SS/kg, 30SS = TMR pellet containing 30 g SS/kg, 60SS = TMR pellet containing 60 g SS/kg

SEM: Standard error of the mean.

^{a,b,c}: Values in the same row (time) with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

^{1,2,3}: Values in the same column (treatment) with different numbers are significantly different ($P < 0.05$).

Table 4. Lipid oxidation, expressed as mg of malondialdehyde per kg, in cooked lamb meat (*Biceps femoris*) during simulated aerobic retail display as a function of the percentage of soapstock in the lambs' diet.

	00SS (n=8)	15SS (n=8)	30SS (n=7)	60SS (n=8)	Mean (SEM)
Display day					
0	1.03 ²	0.95 ²	0.86 ²	0.89 ²	0.93 (0.08) ²
2	6.45 ¹	6.24 ¹	6.07 ¹	5.84 ^{a1}	6.15 (0.16) ¹
Mean (SEM)	3.74 (0.73) ^a	3.59 (0.72) ^a	3.46 (0.74) ^a	3.37 (0.65) ^a	

00SS = TMR pellet without sunflower soapstock (SS), 15SS = TMR pellet containing 15 g SS/kg, 30SS = SEM: Standard error of the mean.

^{1,2,3}: Values in the same column (treatment) with different numbers are significantly different ($P < 0.05$).

CAPÍTULO 3

CHAPTER 3

Effect of the addition of hop (infusion or powder) on the oxidative stability of lean lamb patties during storage

CAPITULO 3

Index

	Page
Abstract	79
1. Introduction	80
2. Materials and methods	81
2.1. <i>Animals and meat</i>	81
2.2. <i>Experimental design</i>	82
2.3. <i>Hop preparation and patty manufacture and storage</i>	83
2.4. <i>Chemical and instrumental analysis</i>	84
2.5. <i>Sensory analysis</i>	84
2.6. <i>Statistical analysis</i>	87
3. Results and discussion	87
3.1. <i>Preliminary experiment (Experiment 1)</i>	87
3.2. <i>Effect of the use of hop infusion and hop powder on the oxidative stability of refrigerated-stored raw patties</i>	88
3.3. <i>Effect of the use of hop infusion and hop powder on the oxidative stability of frozen-stored raw patties</i>	89
3.4. <i>Effect of the use of hop on patty sensory quality and oxidative stability of refrigerated-stored cooked patties</i>	90
4. Conclusions	91
References	93
Figures	97
Tables	99

Abstract

The effects of adding hop to lamb patties on their oxidative stability were evaluated. Two experiments were performed. In the first experiment, patties were prepared by adding water (control), hop infusion (2 g infused hop/kg) or a sodium ascorbate solution (0.5 g/kg), then cooked and refrigerated stored for 3 days. In the second one, patties were prepared by adding water (control), hop infusion (2 g infused hop/kg) or a hop powder dispersion (2 g hop/kg), and then stored either raw: 4 °C for 7 days or -18° C for 90 days, or cooked: 4 °C for 3 days. The antioxidant effect of hop was assessed by means of thiobarbituric acid reactive substances, protein carbonyls, colour, and sensorial analysis. Hop showed a significant antioxidant effect, which was stronger for hop powder than for hop infusion. The addition of hop powder caused a slight decrease in the consumer acceptance of patties as compared to control and hop infusion-added patties.

Keywords: lipid oxidation; meat discoloration; shelf life; protein oxidation; frozen storage; refrigerated storage

1. Introduction

Ground meat preparations, such as meat patties, burgers, fresh sausages, meatballs, and so on are produced in many different ways worldwide and with different types of meat (Feiner, 2006). Hence, increasing the production and quality of ground lamb preparations could provide an interesting option in order to favour the sheep sector in those regions with tradition in sheep meat production and consumption.

Muscle foods are under constant oxidative stress that results in a damage of lipids and proteins (Decker, 1998; Min & Ahn, 2005; Estévez, 2011). In fact, meat preparations are highly susceptible to oxidation as mincing, the addition of common salt and cooking promote the occurrence and intensity of oxidative reactions (Faustman, Sun, Mancini & Suman, 2010; Leygonie, Britz, & Hoffman, 2012). Oxidation processes is a main cause of deterioration of flavour, texture and colour of meat and meat products, and have been related to adverse changes in their nutritive value and the production of toxic compounds (Gray, Gooma, & Buckley, 1996; Shahidi, 2002; Vicente, Sampaio, & Ferrari, 2012). Regarding flavour deterioration, in cooked meat, lipid oxidation results in a distinctive off-flavour defined as rancid, stale, cardboard-like, and so on, and known as warmed over flavour (Byrne, O'Sullivan, & Dijksterhuis, 2001; Tikk, Haugen, Andersen, & Aaslyng, 2008).

Meat oxidation could be controlled or at least minimized through the use of antioxidants. A recent approach to improve oxidative stability of meat and meat products has been the direct addition of natural antioxidants, including a selection of food sources which are naturally high in antioxidants, e.g., polyphenols (Decker, 1998; Jayathilakan, Sharma, Radhakrishna, & Bawa, 2007; Karre, Lopez, & Getty, 2013; Hygreeva, Pandey, & Radhakrishna, 2014). The rationale for this approach is that naturally occurring compounds showing antioxidant properties not only contribute to extend the shelf life of these products but also could present potential health benefits.

Numerous studies have been aimed at assessing the effect of different plant materials on the oxidative deterioration of meat and meat products (Karre et al., 2013; Hygreeva et al., 2014). However, to our knowledge none of them have investigated the effect of the addition of hop (*Humulus lupulus L.*). Hop, which is rich in polyphenolic compounds and acyl phloroglucides, has long been widely used in brewing to preserve beer and to give it characteristic aroma and flavour, and to some extent in traditional

medicine (Zanoli & Zavatti, 2008). In recent years, hop has been increasingly used for culinary, medicinal, and cosmetic purposes (Attokaran, 2011; Zanoli & Zavatti, 2008). The antioxidant effect of hop has mainly been related to its polyphenol content, which greatly depends on the hop variety (Lermusiau, Liégeois, & Collin, 2001). Taking into account all this; the aim of this study was to evaluate the potential use of hop as a natural antioxidant in meat preparations. This study specifically intended to evaluate the effect of the addition of hop (hop powder or hop infusion) on the oxidative stability of lipids, proteins and/or colour in raw and cooked patties during storage (refrigerated or frozen), and the sensory acceptance of these patties.

2. Materials and methods

2.1. Animals and meat

The meat from the legs of twenty-one lambs was used in this study. The lambs were weaned (6-8 week old and average body weight of 14 kg) and then housed in individual pens where they remained until reaching approximately 24 kg of body weight. Lambs were fed following a conventional system consisting on barley straw and concentrate in separated feeding troughs. Fresh drinking water was constantly provided. All handling practices followed the recommendations of the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes, and all of the animals used could see and hear the other sheep. When the lambs reached the intended body weight, they were stunned and slaughtered by exsanguination from the jugular vein and then eviscerated and skinned. Carcasses were refrigerated at 4 °C for 24 h and subsequently halved. Then the left-side legs were separated from the carcasses. The twenty-one legs were randomly assigned to one of two experiments: Experiment 1 (n=10) and Experiment 2 (n=11). The following groups of muscles were then obtained from the legs using a boning knife: *M. Biceps femoris* and *M. Semitendinosus*; *M. rectus femoris*, *M. vastus intermedius*, *M vastus lateralis* and *M. vastus medialis*, and *M. Adductor*; *M. Gracilis*, *M. Semimembranosus*, *M. Pectineus* and *M. Sartorius*. The muscles from each leg were vacuum packaged and kept frozen (-47 ° C) until further processing (up to five months). The muscles were thawed at 4 °C for one day before patty preparation. Then, visible fat and connective tissues were removed and the lean meat from each leg was cut into cubes and minced in

a butcher mincer through a 9-mm plate hole. Minced meat was manually mixed and a 30-g sample was used for the determination of moisture, fat and protein (Official Methods 950.46, 991.36 and 981.10, respectively; AOAC, 1999). The composition (%) of the lamb meat used for the patties was as follows (mean \pm standard deviation; n=21): moisture, 75.3 \pm 0.4; fat, 2.3 \pm 0.4; protein, 19.1 \pm 2.3.

2.2. Experimental design

The experimental design for the two Experiments carried out in this study is shown in Table 1. Experiment 1 was a preliminary study intended to find out whether the use of hop infusion as ingredient in lamb patties could improve their oxidative stability. The ten legs used in this experiment were the experimental units. Legs were assigned to three batches (two batches composed of three legs and the other one of four legs) so as patties were prepared from each leg muscles in three different processing days (one per batch). Muscles were salted and minced and the minced meat from each leg was divided into three equal parts. Water was added to part one (CONTR1), hop infusion to part two (HOPINF1), a solution of the antioxidant additive sodium ascorbate to part three (NaASC). Afterwards, the patties were formed, cooked, and then stored under refrigeration (4 °C) for three days. The content of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and protein carbonyls and the intensity of oxidised flavour (sensory ranking test) were determined in the three-day stored cooked lamb patties.

Experiment 2 evaluated the antioxidant effect of the addition of hop infusion or hop powder on the oxidative stability of raw and cooked lamb patties. The muscles from 11 legs were used in this experiment. Legs were assigned to three batches (two batches composed of four legs and the other one of three legs) so as patties were prepared from each leg muscles in three different processing days (one per batch). Muscles from each legs were salted, spiced and minced. The minced meat from each leg was divided into three equal parts. Water was added to part one (CONTR2), hop infusion to part two (HOPINF2), and a dispersion of hop powder to part three (HOPPOW), and afterwards patties were formed. For each leg and treatment (part), half of the patties formed were cooked and refrigerated-stored (4 °C), and the other half was either refrigerated-stored (raw, i.e., not-cooked; 4 °C) or was frozen-stored (raw; -18 °C) for 90 days. Cooked patties were analysed for cooking loss, hop flavour intensity (sensory ranking test) and

preference (hedonic test) and TBARS content; this last analysis was carried out at days 1 and 3 of storage. TBARS content, pH and instrumental colour were analysed in refrigerated-stored raw patties at days 1, 3 and 7 of storage. Freeze-stored raw patties (-18 °C) were analysed after thawing (overnight at 4 °C) for TBARS content, pH, instrumental colour and protein carbonyls. Protein carbonyl analysis was also performed over the patties before freezing (Table 1).

2.3. Hop preparation and patty manufacture and storage

Pelleted powdered hop (*Humulus lupulus* L.) cones of the Nugget variety, which is the most produced in Spain, supplied by the Sociedad Española de Fomento del Lúpulo (León, Spain), was used in this study. Hop pellets were stored in a dark container under refrigeration (4° C) before use. Hop infusion was prepared immediately before use by boiling hop pellets (2 g) in deionised water (50 ml) for 2 min. The infusion was filtered through paper, and then cooled at room temperature (20 °C) for up to one hour. Hop dispersion was also prepared also immediately before use by mixing hop with deionised water at a solid/liquid ratio of 2 g/50 ml with an Ultraturrax T18 (IKA Labortechnik, Staufen, Germany) for 1 min at 6,500 rpm.

The minced lamb obtained from each leg (approximately 260 g) was separately added with salt (1.5 g per 100 g meat) and, only for Experiment 2, black pepper (0.2 g per 100 g meat). Salted lamb was minced in a Umc5 mixer (Stephan Machinery, Hameln, Germany), operating at 1500 rpm for 3 min. Afterwards, the corresponding deionised water, hop infusion, sodium ascorbate solution (0.5 g/50 ml) or hop dispersion, depending on the experimental treatment, was added to the minced meat, at a ratio of 50 ml of liquid per 950 g of meat. Finally, the mixtures were manually mixed for five min. Four 65-g lamb patties from each treatment were subsequently formed using a manual patty shaper press and plastic wraps.

In Experiment 1, for each leg, four patties per treatment were placed on baking trays and cooked in a forced-air oven at 135 °C for 15 min until reaching an internal temperature of 72 °C. After cooling (15 min), cooked patties were placed on impermeable polypropylene trays, wrapped in an oxygen-permeable polyvinylchloride PVC film (580 ml/m².h) and stored in darkness at 4 °C for up to three days. Of the four

patties formed from the muscles of each leg, one was used for chemical analysis and the other were vacuum packaged and kept frozen (-47 °C) until further sensory analysis.

In Experiment 2, two patties out of the four were cooked and refrigerated stored as described for patties from Experiment 1. Of them, one and a half patties were sampled at day 1 and the rest (one half) at day 3 of storage. Afterwards, samples were vacuum packaged and kept frozen at -47 °C until further analysis (up to two months). Moreover other one and a half patties were packaged in trays as previously described for the cooked patties and stored in darkness at 4 °C for up to 7 days. During storage, on days 1, 3 and 7, a half patty was sampled. Finally, the remaining half raw patty was wrapped in the PVC film and frozen and stored at -18 °C for 90 days; afterwards, the half patties were thawed at 4 °C for a day and analysed.

2.4. Chemical and instrumental analysis

The pH value of patties was determined in duplicate using a pH meter (Crison GLP22, Barcelona, Spain) equipped with a glass electrode, on a homogenate with 4 g of sample and 4 ml of distilled water. Cooking loss of patties was calculated as percentage of weight loss after cooking in relation to raw weight. TBARS concentrations were analysed using the methodology described by Nam and Ahn (2003). Protein carbonyl (total carbonyl contents) was assessed according to the method described by Oliver, Ahn, Moerman, Goldstein, and Stadtman (1987) and Lorenzo and Gómez (2012). Instrumental colour determinations were carried out in triplicate at three selected locations directly on the surface of raw patties, using a portable spectrophotometer CM-700d (Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan) operating with a D65 illuminant, SCI mode, 11 mm aperture for illumination and 8 mm for measurement, and 10° visual angle. Results were expressed as lightness (L^*), redness (a^*) to yellowness (b^*) ratio (a^*/b^*), chroma (C^*) [$(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$], hue angle (H^*) [$\tan^{-1}(b^*/a^*) \times (180/\pi)$], and ratio of reflectance at 630 nm and 580 nm (R_{630}/R_{580}) (AMSA, 2012).

2.5. Sensory analysis

A ranking test was carried out in Experiment 1 following the recommendations provided by ISO (2006), with the three-day refrigerated-stored cooked patties in order to rank the experimental treatments (CONTR1, HOPINF1 and NaASC) by oxidised

flavour intensity. Seven panellists chosen from the staff members and postgraduate students at the Department of Food Hygiene and Technology at the University of León (León, Spain) were involved in the analysis. Before the analysis, panellists were trained in two one-hour sessions. In the first session, cooked-meat oxidised flavour (warmed-over flavour) was defined and descriptors associated with this flavour, i.e., metallic and wet cardboard flavour and rancid fat smell were recognised. For this purpose, a FeSO_4 solution (0.1 g/l), a “cardboard solution” (obtained by soaking 2 g of cardboard in 500 ml of distilled water for 24 h, then filtering and boiling the filtrate) and rancid fat were used as training materials. Moreover, the panel was provided with training samples of freshly cooked and 6-day refrigerated-stored cooked lamb patties as reference patties for non-oxidised cooked meat flavour and extremely high oxidised flavour, respectively. In the second session, the above mentioned reference patties were tasted again and one training samples consisting on three-day stored cooked lamb patties were evaluated by panellists according their oxidised flavour, giving scores to the samples using a 5-point descriptive scale, in which 1 denoted imperceptible oxidised flavour and 5 denoted extremely high oxidised flavour.

The training and the analysis were carried out in the sensory laboratory at the Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (University of León, Spain). The tasting was carried out in individual partitioned-off booths, under red light and at 20 °C. Before analysis, patties were thawed overnight at 4 °C and then individually cut into square prism-shaped 8-g portions which were placed in cups (30 cups: patties from 10 lamb legs x 3 treatments) and heated at 60 °C in an oven, where cups were kept for up to 30 min until tasting. Just before tasting, for a particular lamb leg, three patty portions, one from each of the experimental treatments, were placed in white plastic dishes and coded with randomly chosen 3-digit numbers. A total of 20 dishes were prepared, and two dishes were randomly served in succession to each panellist for analysis. Panellists were asked to rank the three samples by oxidised flavour intensity. A small cup of still mineral water and salt-free bread crackers were also given to the panellists to cleanse their palate between samples. Panellists were allowed to swallow the sample cubes if so desired.

Two sensory analyses were carried out in Experiment 2 with freshly (not refrigerated-stored) cooked lamb patties: a ranking test in order to rank the experimental treatments (CONTR2, HOPINF1 and HOPPOW) by hop flavour intensity, and a

hedonic test in order to assess the flavour acceptance of patties from the three experimental treatments. The ranking test was carried out with six of the above-mentioned panelists and under the same conditions as those described before (for the ranking test of Experiment 1). Training consisted of one half-hour session where hop flavour was defined and recognised by smelling hop powder and tasting a hop infusion (obtained from 4 g of hop dispersed in 100 ml of water, heated at 72 °C for 2 min and filtrated). Panellists were then asked to rank the three samples by hop flavour intensity. Each panellist tasted three set of samples in order to increase the confidence level.

A total of 126 consumers were involved in the hedonic analysis. The analysis was carried out in three separate tasting sessions. The first was carried out with 58 students and the staff members from the Catering School (Centro Integrado de Formación Profesional Ciudad de León, León, Spain), the second with 40 students from the Department of Food Hygiene and Technology (University of León, León, Spain), and the third with 28 staff members from the Instituto de Ganadería de Montaña research centre (Grulleros, León, Spain). Tasting samples were prepared as follows: one patty from each lamb leg (11) and treatment (3) were used. Patties were thawed overnight at 4 °C and then the eleven patties from each treatment minced together in a domestic food processor to obtain a uniform mixture. The mixtures (one per treatment) were divided into three equals parts (one for each tasting section), each parts was then vacuum packaged and stored as -50 °C until analysis (up to one month). Before analysis, minced lamb patty mixtures were thawed overnight and heated inside the vacuum packaging bag in a water bath at 60 °C for one hour. Afterwards, 4 g of sample mix were placed on small plastic flat spoons and, in turn, three spoons with sample (one per treatment) were randomly placed in white plastic dishes and coded with randomly chosen 3-digit numbers. Dishes were kept at 55 °C for up to 30 min until analysis. A dish was served to each consumer, who tasted the samples in individual partitioned-off booths, under white light and at 20 °C. Panellists were asked to assess the flavour score of each patty sample using a structured hedonic scale ranging from 1 to 9, where 1 represented extremely disliking and 9 extremely liking. A small cup of still mineral water and salt-free bread crackers were also given to the consumers to cleanse their palate between samples. Consumers were allowed to swallow the sample cubes if so desired.

2.6. Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using the Statistica for Windows software (v.6.0; Statsoft Inc. 2001). In Experiment 1, the effect of the use of antioxidants on TBARS and carbonyl proteins of cooked lamb patties was analysed by a mixed model analysis of variance (ANOVA) including ingredient addition (treatment) as fixed factor and batch as random factor. When the fixed factor showed significance by the ANOVA ($P<0.05$), means were compared by using the Duncan's test.

A mixed model ANOVA was also used in Experiment 2. In order to assess the significance of hop addition, storage time on the pH, TBARS, colour characteristics of refrigerated-stored raw and cooked patties, treatment and storage time were included as fixed factors and batch as random factor. Then, when a fixed factor or their double interactions showed significance ($P<0.05$), the ANOVA was followed by the Duncan's test. Moreover, results from the frozen stored patties were analysed by ANOVA as described for Experiment 1.

With regard to the sensory analysis, the ranking test results from both Experiments, 1 and 2 were analysed using the Friedman rank sum followed by the calculation of the least significant ranked differences (LSRD), considering $P<0.05$ as the significance level of to determine whether the panellists were able to distinguish between treatments. Moreover, results from the sensory hedonic test were analysed by non-parametric tests (Kruskal–Wallis, Mann–Whitney U).

3. Results and discussion

3.1. Preliminary experiment (Experiment 1)

Table 2 shows the effect of the use of hop infusion on the oxidative status of refrigerated-stored cooked lamb patties as compared to control patties and patties added with sodium ascorbate. HOPINF1 patties showed lower TBARS levels than control patties (CONTR1) but higher levels than NaASC patties ($P<0.05$). These results show that the addition of 50 ml of hop infusion (prepared from 2 g of hop) per kg of patty, improved the lipid stability of refrigerated-stored cooked lamb patties. However, the effect of hop infusion was lower than that of sodium ascorbate (added at a rate 0.5 g per kg of lamb), which is a reducing agent commonly used as muscle food additive (Erickson, 2002). The antioxidant effect of hop infusion on muscle lipids could be

attributed to their polyphenolic compounds, which appeared to be responsible for the reducing power of hop (Lermusieau et al., 2001). Moreover, hop bitter acids could also contribute to the antioxidant effect (Tagashira, Watanabe, & Uemitsu, 1995).

The use of hop infusion on protein carbonyl levels was also significant, although the effect partially differed from that found for TBARS levels. Thus, HOPINF1 patties showed lower values than those showed by both CONTR1 (trend to statistical significance; $P<0.1$) and NaASC ($P<0.05$) patties. Protein carbonyls, which are oxidation products of certain amino acids, have been related to protein oxidation in meat during storage (Estévez, 2011). Besides, the effect of certain antioxidants, specifically polyphenols, on protein oxidation has been evidenced (Vuorela, Salminen, Makela, Kivikari, Karonen, & Heinonen, 2005). In agreement, hop polyphenols could be responsible for the trend towards the significant improvement of protein oxidative stability found in HOPINF1 cooked patties with regard to control patties ($P<0.1$). However, the use of sodium ascorbate in NaASC patties would have enhanced protein oxidation, thus rendering higher protein carbonyls with regard to control patties ($P<0.05$). The enhancing effect of ascorbate on meat protein oxidation has been previously reported (Srinivasan, Xiong, & Decker, 1996; Lund, Hviid, & Skibsted, 2007).

Finally, as regards to the sensory analysis (ranking test), the rank sum differences for the pairwise comparison between treatments were 36 vs 24, 36 vs 24 and 24 vs 24, for CONTR1 vs HOPINF1, CONTR1 vs NaASC and HOPINF1 vs NaASC, respectively (data not shown in Tables). Therefore, panellists were able to differentiate control patties as those with higher oxidised flavour intensity ($P<0.05$) with respect to patties from the other two treatments, which could not be differentiated from each other by their oxidised flavour intensity. Thus, the addition of hop infusion reduced the oxidised flavour of patties as much as sodium ascorbate.

3.2. Effect of the use of hop infusion and hop powder on the oxidative stability of refrigerated-stored raw patties

The effects of using hop infusion or hop powder and storage time on pH, TBARS and colour characteristics of raw lamb patties stored under refrigeration conditions are shown in Table 3. Results from the TBARS analysis in this part of the

study showed that the use of hop (infusion or powder) increased lipid oxidative stability in the refrigerated-stored raw patties ($P < 0.05$). Moreover, the effect of hop powder was significantly stronger than that exerted by hop infusion.

Colour stability also improved by the addition of hop, with the effect of hop infusion being comparable to that of hop powder (Table 3). Thus, hop-added patties presented higher redness and lower discoloration than control patties, i.e., higher a^* , a^*/b^* and R_{630}/R_{580} values and lower hue angle (AMSA, 2012) during storage ($P < 0.05$). The effects of hop on colour of patties could be attributed to hop compounds with antioxidant effect. Moreover, hop powder addition significantly increased b^* and Chroma and decreased L^* of stored raw patties with respect to the other two treatments, which did not show any significant differences between them for these characteristics. This effect was already significant on day 1 of storage ($P < 0.05$). On day 1, HOPPOW patties showed mean b^* values of 18.2, whereas those of CONTR2 were HOPINF2 were 17.0 and 17.4, respectively (data not shown in Tables).

The effect of storage time in refrigerated-stored raw patties (Table 3) resulted, as was expected, in an increase in basic microbial metabolites (increase of pH; Nychas, Skandamis, Tassou, & Koutsoumanis, 2008) and lipid oxidation (increase in TBARS levels) and a loss of redness (increase in Hue, and decrease in a^* , b^* , Chroma, a^*/b^* and R_{630}/R_{580}). Treatment x storage time interaction were found for TBARS, hue and a^*/b^* . These interactions indicated that lipid and colour oxidation rates were the highest for CONTR2 patties, followed by those for HOPINF2 patties and then for HOPOW patties. For example, regarding to the levels of TBARS, as shown in Fig 1, on day 1 of storage no significant differences were detected between HOPINF2 and HOPPOW, although significant differences were found between control and hop-added patties. In contrast, on days 3 and 7 differences between treatments were higher than those on day 1, and significant differences were found between all the three treatments

3.3. Effect of the use of hop infusion and hop powder on the oxidative stability of frozen-stored raw patties

The effect of the addition of hop (infusion or powder) on the characteristics of 90-day frozen-stored and thawed patties is shown in Table 4. An improving effect of the addition of hop on the oxidative (lipid and colour) stability of patties was found, i.e., the

addition of hop decreased the TBARS levels ($P<0.05$) and increased the R_{630}/R_{580} ratio ($P<0.01$). Furthermore, as observed in refrigerated-stored patties, the addition of hop powder increased b^* and chroma and decreased L^* ($P<0.05$) of frozen-stored patties. On the other hand, no significant differences were found in protein carbonyl levels of frozen-stored raw patties between treatments. However, carbonyl protein levels significantly increased during frozen storage (data not shown in Tables): when data from the three treatments were analysed together, protein carbonyls before and after frozen-storage were 10.37 and 12.63 ng of hydrazones per mg of protein, respectively. In agreement with this finding, carbonylation of proteins during frozen storage has been reported in several studies on meat from different species, i.e. pork, poultry, beef (Estévez, 2011).

By comparing Table 3 and 4, it can be seen that the extent of lipid oxidation (as assessed by TBARS levels) found in the 90-days frozen-stored patties (after thawing), regardless of the treatment, was lower than that found in the 7-day refrigerated-stored patties. In contrast, patty redness (as assessed by a^* , a^*/b^* , hue and R_{630}/R_{580} values) was more affected by the frozen storage than by the refrigerated storage. This agrees with the studies by Akamittath, Brekke, and Schanus (1990) and Andersen and Skibsted (1991), who found that colour deterioration of frozen meat occurred much earlier than lipid oxidation. A part of the discoloration of frozen-stored patties could have occurred not only during storage but also during thawing. Freezing seems to have a deleterious effect on meat colour stability due to several factors such as tissue structural damage, myoglobin denaturation, decrease of the metmyoglobin reducing activity, resulting in an acceleration of myoglobin oxidation (and metmyoglobin accumulation) during thawing and post-freezing storage (Leygonie et al., 2012).

3.4. Effect of the use of hop on patty sensory quality and oxidative stability of refrigerated-stored cooked patties

When patties were cooked, cooking losses of CONTR2, HOPINF2 and HOPPOW patties were 28.3%, 29.9% and 30.8%, respectively, with significant differences due to treatment between the first and the last (data not shown in Tables). Furthermore, the rank sum differences found in the sensory ranking test, carried out with recently cooked patties, from the pairwise comparison of treatments were as

follows: 29 vs 29, 29 vs 50 and 29 vs 50, for CONTR2 vs HOPINF2, CONTR2 vs HOPPOW and HOPINF2 vs HOPPOW, respectively (data not shown in Tables). These results indicate that the hop flavour intensity of HOPPOW patties was significantly higher than in CONTR2 and HOPINF2 patties ($P<0.05$), while flavour intensity of CONTR2 and HOPINF2 was not significantly different from each other. Furthermore, the hedonic test revealed significant differences ($P<0.05$) in flavour acceptance between HOPPOW and both CONTR2 and HOPINF2 patties. HOPPOW patty flavour received an average score of 4.3 points (using a 1 to 9 structured scale), while CONTR2 and HOPINF2 were both scored with 5.1 points (data not shown in Tables). Thus, the addition of hop powder (used at amounts of 2 g per kg) modified the flavour of patties. Hop is characterised by an intense smell and a bitter taste for which the numerous components of its essential oil and resin are responsible (Steinhaus; Wilhelm, & Schieberle, 2007; Canbaş, Erten, & Özşahin, 2001; Attokaran, 2011).

Finally, hop addition and storage time affected TBARS values of cooked lamb patties ($P<0.001$ and $P<0.01$, respectively). Hop addition significantly improved the lipid oxidative stability (Fig. 2). As found in raw patties, powdered hop appeared to exert a stronger effect than hop infusion. The effect of hop powder on the decrement of TBARS levels with respect to control patties after 3 days of storage was comparable with that found when using sodium ascorbate (Fig. 2 and Table 2).

Taking into account the results from this study, hop or hop extracts could be successfully used as a natural antioxidant ingredient in meat products manufacture. Further studies are suggested in order to optimise the use of hop in meat products as antioxidant. These studies should consider several factors that include extraction procedures of hop antioxidant compounds, level of hop, hop varieties, or combinations of hop with other antioxidants.

4. Conclusions

Hop used as an ingredient at amount of 2 g per kg as hop powder or hop infusion demonstrated antioxidant activity in lamb patties. The addition of hop improved lipid and colour stability of raw patties during refrigerated and frozen storage, although the improvement was stronger in refrigerated-stored patties. Similarly, the use of hop appeared to reduce lipid and protein oxidation of cooked patties during refrigerated

storage. Hop powder showed higher antioxidant effect than hop infusion. However, the use of hop powder caused a flavour change that slightly, but significantly, decreased the acceptance of freshly prepared patties by consumers.

References

- Akamittath, J. G., Brekke, C. J., & Schanus, E.G. (1990). Lipid oxidation and color stability in restructured meat systems during frozen storage. *Journal of Food Science*, *55*, 1513-1517.
- AMSA (2012). *Guidelines for meat color evaluation*. Champaign, IL: American Meat Science Association.
- Andersen, H.J., & Skibsted, L. H. (1991). Oxidative stability of frozen pork patties. Effect of light and added salt. *Journal of Food Science*, *56*, 1182-1184.
- AOAC (1999). Official methods 950.46 moisture, 981.10 crude protein and 991.36 fat (crude) contents in meat and meat products. In P. Cunniff (Ed.), *Official methods of analysis of the AOAC international* (Vol. II, 16th ed.) (pp. 1–15). Gaithersburg, MD: AOAC.
- Attokaran, M. (2011). Hops. *Humulus lupulus* L (*Urticaceae*). In M. Attokaran (Ed.), *Natural food flavours and colorants* (pp. 241-244). Ames, Iowa: Blackwell Publishing Ltd and Institute of Food Technologies.
- Byrne, D.V., O' Sullivan, M.G., Dijksterhuis, G.B., Bredie, W.L.P., & Martens, M. (2001). Sensory panel consistency during development of a vocabulary for warmed-over flavour. *Food Quality and Preference*, *12*, 171-187.
- Canbaş, A., Erten, H., & Özşahin, F. (2001). The effects of storage temperature on the chemical composition of hop pellets. *Process Biochemistry*, *36*, 1053-1058.
- Decker, E.A. (1998). Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of foods to maximize oxidative stability. *Trends in Food Science & Technology*, *9*, 241-248.
- Erickson, M.C. (2002). Lipid oxidation of muscle foods. In C.C. Akoh & D.B. Min (Eds.), *Food lipids: Chemistry, nutrition, and biotechnology* (pp. 365-411). New York: Marcel Dekker.
- Estévez, M. (2011). Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat Science*, *89*, 259-279.

- Faustman, C., Sun, Q., Mancini, R., & Suman, S.P. (2010). Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat Science*, 86, 86-94.
- Feiner, G. (2006). *Burgers, patties and crumbed products*. Meat products handbook: Practical science and technology. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, CRC Press, 481–498.
- Gray, J.I., Gomaa, E.A., & Buckley, D.J. (1996). Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Science*, 43, S111-S123.
- Hygreeva, D., Pandey, M. C., & Radhakrishna, K. (2014). Potential applications of plant based derivatives as fat replacers, antioxidants and antimicrobials in fresh and processed meat products. *Meat Science*, 98, 47-57.
- ISO (2006). International standard ISO 8587. Sensory analysis. Methodology. Ranking. Geneva: International Organization for Standardization.
- Jayathilakan, K., Sharma, G. K., Radhakrishna, K., & Bawa, A. S. (2007). Antioxidant potential of synthetic and natural antioxidants and its effect on warmed-over-flavour in different species of meat. *Food Chemistry*, 105, 908–916.
- Karre, L., Lopez, K., & Getty, K.J.K. (2013). Natural antioxidants in meat and poultry products. *Meat Science*, 94, 220-227.
- Lermusieau, G., Liégeois, C., & Collin, S. (2001). Reducing power hop cultivars and beer ageing. *Food Chemistry*, 72, 413-418.
- Leygonie, C., Britz, T. J., & Hoffman, L. C. (2012). Impact of freezing and thawing on the quality of meat: Review. *Meat Science*, 91, 93-98.
- Lorenzo, J. M., & Gómez, M. (2012). Shelf life of fresh foal meat under MAP, overwrap and vacuum packaging conditions. *Meat Science*, 92, 610-618.
- Lund, M. N., Hviid, M. S., & Skibsted, L. H. (2007). The combined effect of antioxidants and modified atmosphere packaging on protein and lipid oxidation in beef patties during chill storage. *Meat Science*, 76, 226–233.
- Min, B., & Ahn, D. U. (2005). Mechanism of lipid peroxidation in meat and meat products – A review. *Food Science and Biotechnology*, 14, 152–163.

- Nam, K. C., & Ahn, D. U. (2003). Combination of anaerobic and vacuum packaging to control lipid oxidation and off-odour volatiles of irradiated raw turkey breast. *Meat Science*, *63*, 389-395.
- Nychas, G. J., E., Skandamis, P.N., Tassou, C. C., & Koutsoumanis, K. P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, *78*, 77-89.
- Oliver, C., Ahn, B., Moerman, E., Goldstein, S., & Stadtman, E. (1987). Age-related changes in oxidized proteins. *Journal of Biological Chemistry*, *262*, 5488-5491.
- Shahidi, F. (2002). Lipid-derived flavours in meat products. In J. Kerry., J. Kerry., & D, Ledward (Eds), *Meat processing. Improving quality* (pp. 105-121). Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.
- Srinivasan, S., Xiong, Y. L., & Decker, E. A. (1996). Inhibition of protein and lipid oxidation in beef heart surimi-like material by antioxidants and combinations of pH, NaCl, and buffer type in the washing media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*, 119–125.
- StatSoft Inc. (2001). Statistica 6.0 software. Tucksa, USA: StatSoft. <<http://www.statsoft.com>>.
- Steinhaus, M., Wilhelm, W., & Schieberle, P. (2007). Comparison of the most odour-active volatiles in different hop varieties by application of a comparative aroma extract dilution analysis. *European Food Research and Technology*, *226*, 45–55.
- Tagashira, M., Watanabe, M., & Uemitsu, N. (1995). Antioxidative activity of hop bitter acids and their analogues. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *59*, 740–742.
- Tikk, K., Haugen, J. E., Andersen, H.J., & Aaslyng, M.D. (2008). Monitoring of warmed-over flavour in pork using the electronic nose-correlation to sensory attributes and secondary lipid oxidation products. *Meat Science*, *80*, 1254-1263.
- Vicente, S. J. V., Sampaio, G. R., Ferrari, C. K. B., & Torres, E. A. F. S. (2012). Oxidation of cholesterol in foods and its importance for human health. *Food Reviews International*, *28*, 47-70.

- Vuorela, S., Salminen, H., Makela, M., Kivikari, R., Karonen, M., & Heinonen, M. (2005). Effect of plant phenolics on protein and lipid oxidation in cooked pork meat patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 8492–8497.
- Zanoli, P., & Zavatti, M. (2008). Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus*L. *Journal of Ethnopharmacology*, *116*, 383-396.

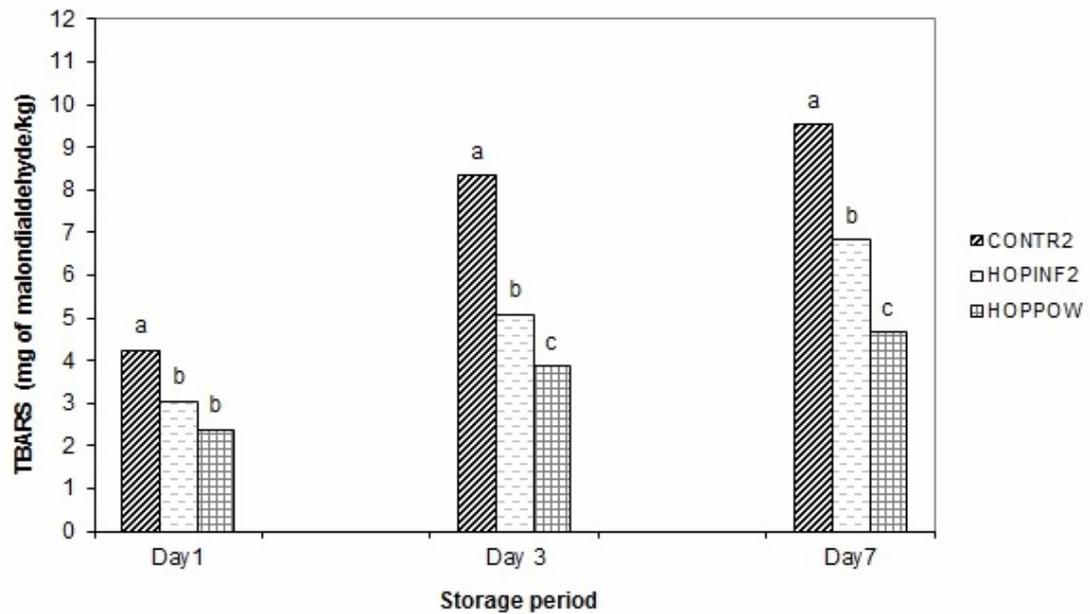


Fig.1. Effect of the addition of hop to lamb patties on the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels in raw patties during refrigerated storage. CONTR2: Control patties; HOPINF2: hop infusion added to patties; HOPPOW: hop powder added to patties (2 g/kg of patty mix).^{a,b,c}: Values for bars within each storage day showing different letters are significantly different ($P < 0.05$; Duncan's test).

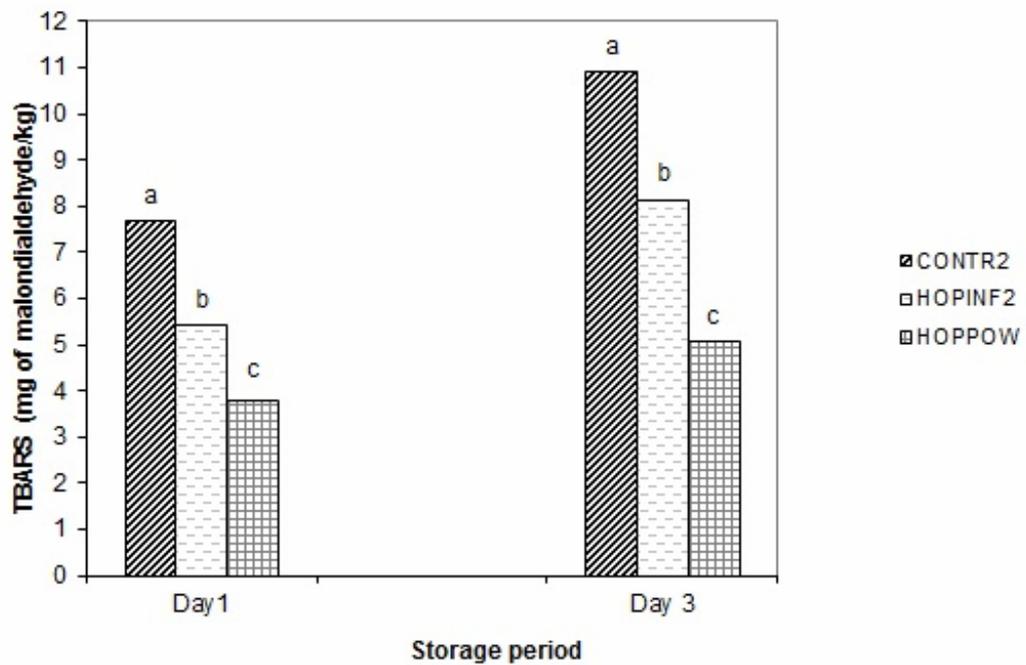


Fig. 2. Effect of the addition of hop (hop infusion or hop powder) to lamb patties on the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in cooked patties during storage. CONTR2: Control patties; HOPINF2: hop infusion added to patties; HOPPOW: hop powder added to patties (2 g/kg of patty mix). ^{a,b,c}: Values for bars within each storage day showing different letters are significantly different ($P < 0.05$; Duncan's test).

Table 1. Experimental design for the evaluation of the effect of hop addition to lamb patties on their oxidative status, pH, cooking loss, colour and sensory acceptance

	Experiment 1	Experiment 2
No. of legs ^a	10 (three batches of 3, 3 and 4 legs)	11 (three batches of 4, 4 and 3 legs)
Experimental treatments (ingredients added ^b)	CONTR1 (water) HOPINF1 (hop infusion) NaASC (ascorbate solution)	CONTR2 (water) HOPINF2 (hop infusion) HOPPOW (hop powder dispersion)
<u>Analysis carried out on patties^c</u> (sampling day during storage)		
Refrigerated-stored raw patties	-	TBARS (1, 3 and 7) pH (1, 3 and 7) Colour (1, 3 and 7)
Frozen-stored raw patties after thawing	-	TBARS (90) pH (90) Colour (90) Protein carbonyls (0, 90)
Refrigerated-stored cooked patties	TBARS (3) Protein carbonyls (3) Oxidized flavour (3)	Cooking loss (0) Hop flavour(0) Acceptance (0) TBARS (1 and 3)

^aLeft-side lamb legs (legs from each batch were processed in different days).

^bIngredients added to lamb other than common salt and black pepper (used only in Experiment 2).

^cFour patties were prepared per leg and treatment; in Experiment 2, one and a half patties among the four were used for refrigerated-stored raw patty analysis, half for frozen-stored raw patty analysis and two for refrigerated-stored cooked patty analysis.

Table 2. Effect of the addition of hop infusion or sodium ascorbate on the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS; expressed as mg of malondialdehyde/kg of meat) and protein carbonyls (expressed as nmol of hydrazones/mg of protein) of three-day stored cooked lamb patties

	Treatment(n=10)			SEM	P-level
	CONTR1	HOPINF1	NaASC		
TBARS	8.25 ^a	6.32 ^b	4.36 ^c	0.394	**
Protein carbonyls	10.44 ^{ab}	8.77 ^b	11.15 ^a	0.425	*

CONTR1: Control patties; HOPINF1: hop infusion added to patties; NaASC: sodium ascorbate added to patties.

SEM: Standard error of the mean.

^{a,b,c}: Means in the same row with different letters are significantly different ($P < 0.05$; Duncan's test). NS: not significant; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

Table 3. Effect of the addition of hop (infusion or powder) and storage time on pH, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS, mg of malondialdehyde/kg of meat) and colour characteristics of raw lamb patties stored under refrigeration

	Treatment (n=11)			Storage day (n=11)			SEM	Significance		
	CONTR2	HOPINF2	HOPPOW	1	3	7		T	S	T x S
pH	5.57	5.59	5.59	5.54 ^b	5.56 ^b	5.66 ^a	0.007	NS	***	NS
TBARS	7.37 ^a	4.99 ^b	3.63 ^c	3.23 ^c	5.76 ^b	7.01 ^a	0.258	**	**	**
<i>Colour</i>										
<i>L*</i>	46.08 ^a	45.56 ^a	44.52 ^b	45.00 ^b	44.97 ^b	46.19 ^a	0.204	*	**	NS
<i>a*</i>	5.34 ^b	6.71 ^a	6.99 ^a	7.48 ^a	6.49 ^b	5.07 ^c	0.146	**	***	NS
<i>b*</i>	16.83 ^b	16.83 ^b	17.54 ^a	17.52 ^a	17.35 ^a	16.32 ^b	0.119	*	*	NS
Chroma	17.69 ^b	18.14 ^b	18.91 ^a	19.07 ^a	18.55 ^b	17.12 ^c	0.142	*	**	NS
Hue	72.48 ^a	68.35 ^b	68.35 ^b	66.95 ^c	69.53 ^b	72.70 ^a	0.390	**	***	**
<i>a*/b*</i>	0.32 ^b	0.40 ^a	0.40 ^a	0.43 ^a	0.37 ^b	0.31 ^c	0.008	**	***	**
<i>R₆₃₀/R₅₈₀</i>	1.42 ^b	1.67 ^a	1.75 ^a	1.83 ^c	1.61 ^b	1.41 ^a	0.027	*	**	NS

CONTR2: Control patties; HOPINF2: hop infusion added to patties; HOPPOW: hop powder added to patties (2 g/kg of patty mix).

SEM: Standard error of the mean.

Significance of the fixed effects: T, treatment; S, storage day; T x S: treatment x storage day interaction.

^{a,b,c}: Means in the same row with different letters are significantly different ($P < 0.05$; Duncan's test). NS: not significant; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

Table 4. Effect of the addition of hop (infusion or powder) on pH, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS, mg malondialdehyde/kg of meat), protein carbonyls (expressed as nmol of hydrazones/mg of protein) and colour characteristics of thawed raw lamb patties previously stored at -18 °C for 90 days.

	Treatment (n=11)			SEM	<i>P</i> -level
	CONTR2	HOPINF2	HOPPOW		
pH	5.52	5.53	5.53	0.009	NS
TBARS	5.77 ^a	4.65 ^b	3.82 ^b	0.239	*
Protein carbonyls	13.14	13.33	11.42	0.397	NS
<i>Colour</i>					
<i>L</i> *	46.13	45.96	44.50	0.317	*
<i>a</i> *	4.26	4.41	4.42	0.219	NS
<i>b</i> *	17.34 ^b	17.24 ^b	18.66 ^a	0.166	*
Chroma	17.86 ^b	17.80 ^b	19.19 ^a	0.164	*
Hue	76.19	75.66	76.64	0.264	NS
<i>a</i> */ <i>b</i> *	0.25	0.26	0.24	0.005	NS
R ₆₃₀ /R ₅₈₀	1.23 ^b	1.27 ^a	1.29 ^a	0.008	**

CONTR2: Control patties; HOPINF2: hop infusion added to patties; HOPPOW: hop powder added to patties (2 g/kg of patty mix).

SEM: Standard error of the mean;

^{a,b,c}: Means in the same row with different letters are significantly different ($P < 0.05$; Duncan's test).

P-level: Significance; NS: not significant; +: $P < 0.1$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

CAPÍTULO 4

CHAPTER 4

*Quality characteristics of a dry-cured lamb leg as affected by tumbling
after dry-salting and processing time*

CAPITULO 4

Index

	Page
Abstract	105
1. Introduction	106
2. Materials and methods	107
2.1. <i>Animals</i>	107
2.2. <i>Manufacture and design of the dry-cured legs</i>	107
2.3. <i>Sampling and sample preparation</i>	108
2.4. <i>Microbial and chemical analysis</i>	109
2.5. <i>Volatile compounds</i>	110
2.6. <i>Colour, texture and sensory evaluation</i>	110
2.7. <i>Statistical analysis</i>	112
3. Results and discussion	112
3.1. <i>Microbial and chemical analysis</i>	112
3.2. <i>Volatile compounds</i>	114
3.3. <i>Colour, texture and sensory evaluation</i>	116
4. Conclusions	118
References	119
Tables	124

Abstract

The aim of this study was to evaluate selected quality characteristics of a dry-cured lamb leg with different tumbling treatments after salting. The characteristics were measured at different processing times. Three batches of dry-cured lamb legs (nine legs per batch) were prepared with no-, short- and long- tumbling treatments, and microbial counts, NaCl, a_w , proximate composition, pH, free fatty acids, water soluble nitrogen, volatile compounds, texture and colour were evaluated at days 1, 22 and 71 of processing. Furthermore, a descriptive sensory analysis (flavour and texture) was performed in the final product (day 71). Time-related changes were observed for most of the characteristics studied. The effect of tumbling was only observed for the sensory attribute pastiness that was higher in tumbled legs. Methyl-branched butanal was only detected in tumbled legs.

Keywords:

Meat ripening; Ruminant meat; Traditional meat products; Volatile compounds.

1. Introduction

A number of dry-cured ruminant whole (non-comminuted) meat products are highly demanded in different parts of the world. These are usually made from beef, e.g., cecina (García, Zumalacárregui, & Díez, 1995; Molinero, Martínez, Rubio, Rovira, & Jaime, 2008), bresaola (Paleari, Moretti, Beretta, & Caprino, 2008) or pastirma (Kaban, 2009), following traditional processes. Moreover, although less frequently, dry-cured meat products are made from small ruminant meat such as mutton or sheep meat (Håseth, Thorkelsson, & Sidhu, 2008; Texeira, Pereira, & Rodrigues, 2011)

Sheep meat is widely consumed in European Mediterranean countries where it has a strong traditional component (Bernués, Ripoll, & Panea, 2012). Actually, dry-salted sheep meat is considered as a traditional product with a long history of use, which at present is still produced, although only in small quantities, in specific rural areas (Cattaneo, 1994). However, nowadays, the development of high-quality air-dried salted sheep meat products adapted to meet consumer demands can represent an interesting option in the Mediterranean region (and other regions around the world with tradition in sheep meat production and consumption) in order to favour sheep sector. This statement is based on increased interest of consumers in traditional and local food and how local food can help in maintaining and developing local markets (McIntyre & Rondeau, 2011). Moreover, traditional food can meet the market for people who have migrated from their place of origin (Jamal, 2013).

Tumbling of meat has been described as a feasible technique to be used in the making process of dry-cured meat products (Arnau, Serra, Comaposada, Gou, & Garriga, 2007). This treatment results in structural damages of fat and muscle tissues (Cheng & Ockerman, 2003). Studies on tumbling effect on the quality of dry-cured meat have been mainly focused in the salting diffusion process and, thus, tumbling has been suggested as a mean to accelerate the dry-salting step (Hayes, Kenny, Ward, & Kerry, 2007). However, to the best of our knowledge, the effect of tumbling on the presence of substances derived from the biochemical processes taking place during ripening of salted meat products, i.e., proteolysis, lipolysis, lipid oxidation and amino acid degradation has not been reported.

In this context, the first aim of this study was to describe selected physicochemical, microbial and sensory characteristics of a dry-cured lamb leg at

different processing times, and the second aim was to evaluate the effect of the inclusion of a vacuum tumbling process just after salting on those quality characteristics.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Fourteen Merino lambs (6-8 week old and mean body weight of 14 ± 0.2 kg at the beginning of the experiment) were used in this study. After weaning, lambs were housed in individual pens, where they remained during the entire experimental period, and were fed a commercial total mixed ration (18% crude protein; 15:85 barley straw:concentrate feed) *ad libitum*; fresh drinking water was provided. All handling practices followed the recommendations of the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes, and all of the animals used were able to see and hear the other sheep.

When an animal reached the intended body weight (27 kg), feed and water were withdrawn, and after 1 h the lamb was weighed again, stunned and slaughtered by exsanguination from the jugular vein, eviscerated and skinned. The dressed carcass was obtained from the whole body of each lamb and after chilling the carcass at 4 °C for 24 h, the legs were obtained (Colomer-Rocher, Morand-Fehr, Kirton, Delfa, & Sierra-Alfranca, 1988).

2.2. Manufacture and design of the dry-cured legs

The present study was carried out with 27 legs from the 14 lambs. The legs were immediately frozen (-18 °C) and kept frozen for 4-6 months. Afterwards, legs randomly assigned to three batches of nine, each batch of legs being processed in a different day.

For each batch (nine legs per batch), once thawed at 8 °C for 24 hours, the tailbone and hip bone were removed from the legs, the upper part of the leg was trimmed in order to give it a round shape, and legs were then weighed (mean weight \pm standard deviation of $1380 \text{ g} \pm 81 \text{ g}$). Salting was carried out in two steps, the first one by manually rubbing the legs with a curing mixture (45 g/kg of leg) containing NaCl (89.3%), potassium nitrate (1.8%), sodium ascorbate (2.2%) and dextrose (6.7%),

followed by a 6-h chilling in a cold chamber at 4 °C. In the second step, legs were covered with a layer of coarse salt and kept for 12 h at 4 °C. Afterwards, legs were washed with running water, and hung for up to 5 h at room temperature (15 °C). Salted legs were divided in three groups (3 legs per group) and each group was subjected to a different tumbling treatment: no tumbling (Control), short tumbling (ST; 100 min at 10 rpm) and long tumbling (LT; 200 min at 10 rpm). The tumbling was carried out with the legs packaged under vacuum, at 8 °C using a 200-l capacity SM-Pulmax tumbler (Technical, Girona, Spain). The legs were then removed from the bags. All legs were hung in a ripening chamber at 9.5 °C and 78% relative humidity (RH) for 40-43 days, during the time needed for the moisture loss of legs on drying to reach the targeted value of $32.5\% \pm 0.5\%$. Then, the legs were vacuum packaged to stop the drying process and maintained at 15 °C for 30 additional days (a total of 71-day ripening period from the day of salting).

2.3. Sampling and sample preparation

The sampling had a completely randomized design with three replicate batches of nine legs each (three legs per tumbling treatment). From each batch, one leg per tumbling treatment group was sampled at day 1 of ripening, other at day 22 and the other at the end of the ripening period (day 71). After sampling, several muscles were extracted by dissection from the legs for further analysis. *M. Biceps femoris* was used for sensory evaluation and *M. Adductor* for texture profile analysis. *M. Semimembranosus* was transversely cut in two halves and the colour was measured in the cut surfaces. This muscle was used afterwards for the analysis of pH, moisture, protein, fat, ash, free fatty acids, water soluble nitrogen and volatile compounds. *M. Quadriceps femoris* (*M. rectus femoris*, *M. vastus intermedius*, *M. vastus lateralis* and *M. vastus medialis*) was cut into three sections perpendicular to the long axis: proximal (1 cm), central (the largest) and distal (2 cm). The proximal and distal section were discharged and the central section was transversely halved, with the distal part being used for microbiological analysis, just after cutting, and the proximal part for NaCl, moisture and water activity (a_w) analyses. Before analysis, both halves were subsequently cut into two portions (external and internal), with the external portion (a surface layer) being 1 cm thick. This last division was carried out to assess eventual differences in the characteristics analysed between the inner and outer part of the

muscle. Finally, muscle samples, except for the portion of *M. Quadriceps femoris*, used for microbial analysis, and *M. Abductor*, were individually packed on aluminium foil and plastic bags and frozen and stored at -47 °C until the analyses were performed. Prior to analysis, the muscles were thawed at 4 °C overnight and then minced in a food processor.

2.4. Microbial and chemical analysis

Samples from internal and external layers of the distal part of *M. Quadriceps femoris* were aseptically prepared. Twenty five grams of each layer were taken and homogenised with 225 ml of peptone water (0.1% peptone and 0.85% NaCl; w/v) for 2 min in a plastic bag using a Stomacher-400 circulator equipment (Seward, West Sussex, UK). The counts of Gram-positive catalase-positive cocci and lactic acid bacteria, which are the principal bacterial groups in dry-cured whole (not-comminuted) meat products (García et al., 1995), were determined. Serial decimal dilutions were prepared and plated out in duplicate on relevant media (Oxoid Ltd. Basingstoke, UK; Merck, Darmstadt, Germany) and incubated as follows: de Man-Rogosa-Sharpe (MRS; CM 0361) agar in double layer at 30 °C for 72 h, and Mannitol Salt Agar (MSA; CM 85) at 35 °C for 48 h.

The a_w value was determined at 25 °C using an Aqualab CX-2 hygrometer (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA). Chloride content was analysed in duplicate by titration (ISO, 1996) using a 719 S Titrino titrator coupled with a combined silver-ring electrode and a 728 stirrer (Metrohm Ltd., Herisau, Switzerland). Moisture, fat, protein and ash were determined according to the Official Methods 950.46, 991.36, 981.10, and 920.153, respectively (AOAC, 1999). Furthermore, pH was determined in duplicate using a pH meter model (Crison Model GLP 22, Barcelona, Spain) equipped with a glass electrode, on a homogenate with 3 g of sample and 7 ml of distilled water. For analysis of free fatty acids (FFA), fat was first extracted as described by Bligh and Dyer (1959) from 30 g of minced sample, FFA were then extracted from the fat using solid phase extraction columns, and then methylated (García-Regueiro, Gibert, & Díaz, 1994). Afterwards, FFA methyl esters were extracted with 2 ml of hexane, and analysed by gas chromatography (Osorio, Zumalacárregui, Figueira, & Mateo, 2007).

For water soluble nitrogen (WSN) determination, 5 g of sample were homogenized in 40 ml of distilled water with an Ultraturrax T18 (IKA, Labortechnik, Stafen, Germany) at 9500 rpm for two min and, then, the mixture was centrifuged at 3000 rpm for 15 min. The supernatant was collected, the residue was washed with 35 ml distilled water and the mixture was centrifuged again. A total of 25 ml of the combined supernatants were analysed for nitrogen content (Method 981.10; AOAC, 1999).

2.5. Volatile compounds

Volatile compounds were determined by static headspace-gas chromatography coupled to mass spectrometry. Extraction of volatile compounds was done using solid phase microextraction (SPME; Supelco, Bellefonte, PA, USA) with a 75 µm carboxen/polydimethylsiloxane-coated fused silica fibre. Four g of minced sample were weighed into a 15-ml vial, sealed with polytetrafluoroethylene lined silicone septa. The vial was placed in a 200-W ultrasonic water bath (JP Selecta, Barcelona, Spain) for 30 min at 40 °C for equilibration. Then ultrasounds were switched off and the SPME fibre was exposed to the sample for 30 min at 40 °C. The compounds adsorbed by the fibre were desorbed in a GC 7890A gas chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) injection port for 2 min at 260 °C in splitless-mode. The chromatographic and mass detector operation conditions and the identification and quantification procedures were those described by Vieira, Fernández-Díez, Mateo, Bodas, Soto, and Manso (2012).

2.6. Colour, texture and sensory evaluation

Instrumental colour determinations were carried out in triplicate on the *M. semimembranosus* cut surface using a spectrophotometer CM-700d (Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan) operating with a D65 illuminant, SCI mode, 11 mm aperture for illumination and 8 mm for measurement, and 10° visual angle. Previously to the measurement the cut muscle was maintained into a tightly sealed container at room temperature in the dark for 60 min. Results were expressed as lightness (L^*), redness (a^*) and yellowness (b^*).

Texture Profile Analysis (TPA) was performed with a Texture Analyzer TA-XT2i (Stable Micro Systems, Godalming, Surrey, UK) with a cylindrical probe of 5-cm

diameter set to run at 0.5 mm/s. Three 1.0-cm thick slices were cut transversely from the medial part of the *M. Adductor* with a sharp scalpel. Then a 1-cm³ cube was cut from the core of each slice, discarding the outer layers of the slices. Cubes were compressed twice (50% of the thickness of the sample) with a 5-s elapse between the 2 compression cycles. Samples were tempered at room temperature (approximately 21°C) for 1 h before texture analysis. Mean values for hardness, springiness and cohesiveness were obtained from the force–time curves. Chewiness, representing the work required to masticate the sample before swallowing, was calculated as hardness x springiness x cohesiveness.

A quantitative descriptive sensory analysis was carried out on the 71-day dry-cured *M. Biceps femoris* samples. The descriptors evaluated in the sensory analysis were saltiness, bitterness, lamb flavour, pungent flavour, hardness, juiciness and pastiness. Except for lamb flavour, those descriptors have been used in previous studies on dry-cured meat products and appeared to be related to dehydration, proteolysis or lipolysis (Guerrero, Gou, & Arnau, 1999; Carrapiso, Bonilla, & García, 2003). Hardness and pastiness were defined respectively as the amount of pressure required to completely compress the sample, and the feeling of paste detected in mouth during mastication (Guerrero et al., 1999), and juiciness as the feeling of moisture perceived during mastication.

Twelve panellists (aged between 20 and 50 years) were involved in the analysis. These were staff of the ‘Instituto de Ganadería de Montaña’ (IGM; Grulleros, León, Spain) who have been regularly involved in the sensory analysis of ruminant meat. Before the analysis, panellists were specifically trained in two one-hour sessions. During training, the flavour and texture characteristics to be evaluated were defined, identified and discussed. For this purpose, pork and beef dry-cured meat products purchased from the market were tasted.

The analysis was carried out in one session, at the IGM’s tasting room, in individual partitioned-off booths under soft white lighting and at 20 °C. Nine dry-cured muscles (*M. Biceps femoris*), three per tumbling treatment, were used. Muscles were cut into three sections perpendicular to the long axis: proximal (1 cm), central (the largest) and distal (1 cm). The central section was subsequently sliced (3 mm thick slices). Two slices from each muscle sample were placed in white plastic dishes and coded with randomly chosen 3-digit numbers. A total of 54 dishes (pairs of slices) were thus

prepared (18 dishes per tumbling treatment, and from 5 to 7 dishes per muscle, depending on each muscle size). Then, the dishes were immediately served to the panellists at room temperature following a randomized incomplete block design, in order that each panellist tasted from 4 to 5 samples, at least one and no more than two per treatment. A small cup of still mineral water and salt-free bread crackers were also given to the panellists to cleanse their palate between samples.

Panellists were asked to assess the selected flavour characteristics. Descriptors were scored on a five-point linear scale, where 1 represented the absence or very low intensity of a specific flavour or texture descriptor and 5 a very high intensity. Panellists were allowed to swallow the sample slices if so desired.

2.7. Statistical analysis

A two-way analysis of variance (ANOVA) was carried out in order to assess the significance of tumbling treatment and processing day on all the characteristics studied, except for those from the sensory analysis. Analyses were performed using the general lineal model (GLM) procedure of the SAS software package (version 8.0; SAS Inst. Inc., Cary, NC). For that, tumbling treatment, processing day and their interaction were considered as fixed effects, batch was included in the model as a random term; significance was declared at $P < 0.05$ and means were compared by using the Duncan's test. Moreover, the significant differences in sensory attributes between tumbling treatments were determined by non-parametric tests with a $P = 0.05$ (Kruskal–Wallis, Mann–Whitney U) using the NPAR1WAY procedure of the SAS software.

3. Results and discussion

3.1. Microbial and chemical analysis

Table 1 shows the microbial counts, moisture, NaCl and a_w levels found in the dry-cured lamb legs grouped by tumbling treatment and day of processing. The ANOVA significance levels for the fixed effects (tumbling, time and tumbling x time interaction) and the random effect (batch) are also showed. Measurements were carried out in both the internal and external layers of *M. Quadriceps femoris*.

The observations in the present study showed that time was the only factor with significant effect on microbial and chemical characteristics; no effect was found for tumbling treatment and the interaction tumbling x time. Bacterial counts of lamb legs increased from day 1 to 22 ($P<0.05$) and remained constant until the end of the ripening period. Besides, Gram-positive catalase-positive cocci (MSA growth) became the predominant microbial group. Their mean levels and also those of lactic acid bacteria (LAB) were numerically higher in the outer than the inner muscle layer. Results on microbial counts are in agreement with those found by García et al. (1995) and Kaban (2009) in dry-cured beef cecina and pastirma, respectively, during their processing.

Neither moisture, a_w nor NaCl levels were significantly affected by the tumbling treatment. Furthermore, as expected, moisture content decreased with sampling time, which resulted in an increase of NaCl levels and a decrease of a_w . Moisture and NaCl contents numerically differed between the internal and the external muscle layers; however, a_w and NaCl/moisture ratio were similar in both sampling points – the ratio is not shown, but it can be calculated from the Table. After drying, a_w in dry-cured lamb legs reached levels below 0.90. Values of a_w between 0.60 and 0.90 correspond to the so-called intermediate-moisture meat products and provide the whole meat products with microbial stability at ambient temperature (Feiner, 2006). In accord with the present study, common raw dry-cured ruminant-meat products presented a_w levels between 0.85 and 0.90 (García et al., 1995, Molinero et al., 2008).

The proximate composition of dry-cured lamb legs is shown in Table 2. No differences were found in moisture between tumbling treatments; likewise, the other components were neither affected. On the other hand, moisture content decreased ($P<0.05$) and consequently protein, fat and ash contents increased with sampling time. The proximate composition found in the dry-cured leg of the present study was comparable to that reported for several similar dry-cured (intermediate-moisture) ruminant meat products (Cattaneo, 1994; Paleri et al., 2008; Molinero et al., 2008).

As shown in Table 2, the pH values significantly increased ($P<0.05$) during the ripening process. This finding could be attributed to proteolysis and the related production of basic compounds (Kaban, 2009). Actually, proteolysis in the dry-cured lamb leg can be evidenced by the time-related increase ($P<0.05$) in WSN (García de Fernando & Fox, 1991). Moreover, the levels of total FFA, which indicate lipolysis, tripled during ripening. This increase was higher for polyunsaturated FFA

(approximately 5-fold) than for monounsaturated and saturated FFA (3-fold) (data not shown in tables, i.e., total FFA content was only shown for brevity). This indicates a more intense hydrolysis of phospholipids, richer in polyunsaturated fatty acids, than of triglycerides during meat ripening (Toldrá, 2006). The percentages of SFA, MUFA and PUFA in the dry-cured lamb legs at day 71 were 39.8, 34.2 and 26.0%, respectively, with oleic (18:1), palmitic (16:0), linoleic (18:2), stearic (18:0) and arachidonic (20:4) acids being the most abundant FFA (data not shown). The pH, FFA and WSN values of the dry-cured lamb legs (day 71) were similar to those found by other authors in analogous meat products from ruminants (Cattaneo, 1994; Molinero et al., 2008; Kaban, 2009). Finally, no significant effect ($P > 0.05$) of tumbling and of the interaction tumbling x time on those characteristics was found. Thus, the values and the variation showed by the lipolysis and proteolysis indexes were comparable for all tumbling treatments.

3.2. Volatile compounds

A total of 60 volatile compounds were identified in the dry-cured lamb legs (Table 3). Volatiles were divided in the following chemical families: straight-chain aldehydes (18), alcohols (7), ketones (8), aliphatic hydrocarbons (6), furans and lactones (5), fatty acids and esters (9), branched-chain aldehydes (1), benzene compounds (5) and terpenic compounds (1); additionally, 9 compounds could not be identified. The most abundant compounds in the dry-cured lamb legs were the straight-chain aldehydes followed by the alcohols, ketones and benzene compounds, which is in general agreement with other research on the headspace volatile profile of dry-cured ruminant or pork whole meat products (Dirinck, Van Opstaele, & Vandendriessche, 1997; Hierro, de la Hoz, & Ordóñez, 2004; Narváez-Rivas, Gallardo, & León-Camacho, 2012; Paleari et al., 2008). Straight-chain aldehydes, alcohols and ketones, together with hydrocarbons and 2-pentylfuran, have been related to lipid degradation (Frankel, 1982; Hierro et al., 2004). The levels of lipid oxidation derived compounds, especially short-straight-chain aldehydes, ketones or 1-octen-3-ol, are relevant for the flavour of dry dry-cured meat products due to their low perception threshold and their distinctive characteristic odours (Dirinck et al., 1997; Pugliese, Sirtori, Calami, & Fanci, 2010; Sabio, Vidal-Aragón, Bernalte, & Gata, 1998).

Among the fixed factors included in the ANOVA, only time showed a significant effect of the volatile profile of dry-cured lamb legs. Ripening time resulted in a significant decrease in the levels of many of the above mentioned volatiles derived from lipids, i.e., the sum and most of the straight-chain aldehydes and alcohols, and the major ketone 2,3-octanedione. However, the levels of the sum of hydrocarbons, and of pentadecane, tetradecane and 2-pentylfuran did not change with time ($P>0.05$), and those of undecane and of four out of the eight ketones detected (2-hexanone, 2-heptanone, 2-nonanone and 2-undecanone) increased ($P<0.05$). In partial discrepancy with the results found in the present study, several studies on time-related changes in volatiles of pork hams reported that a major part of the lipid oxidation products, mainly straight-chain aldehydes, increase during the first part of ripening and decrease afterwards, possibly due to further reactions with other compounds (Andrés, Cava, & Ruiz, 2002; Pugliese et al., 2010). The difference found between the present study and the above mentioned studies could be based on a lower ripening temperature (in this experiment) and differences in meat composition due to species variation.

The presence of 3-methylbutanal, benzaldehyde and phenylacetaldehyde could be explained by the Strecker degradation of amino acids. In general agreement with results reported on the volatile composition of dry-cured pork hams (Dirinck et al., 1997; Pugliese et al., 2010), in the present study a time-related increase in the levels of the two main volatiles attributable to non-enzymatic Strecker degradation, i.e., 3-methylbutanal from leucine and phenylacetaldehyde from phenylalanine, was observed. These compounds have been considered as major contributors of dry-cured ham flavour. On the other hand, benzaldehyde decreased with ripening. This compound has been found to be a secondary Strecker degradation product from phenylalanine (Adamiec, Rössner, Velišek, Cejpek, & Šavel, 2001); however, its high presence in the legs at day 1 suggests another origin for benzaldehyde, namely lipid oxidation (O'Grady, Monahan, & Brunton, 2001). The trend described for benzaldehyde was also observed for ethylbenzaldehyde, which seem also to be linked to both lipid oxidation and amino acid catabolism (Andrade, Córdoba, Sánchez, Casado, & Rodríguez, 2009; Elmore, Campo, Enser, & Mottram, 2002). Furthermore, among the benzene compounds, a significant increase of 1,3-dimethoxybenzene along the ripening process was observed. This compound has been detected by Paleari et al. (2008) on dry-cured goat leg. However, its

origin was not established, and neither it was possible to explain the above-mentioned increase.

Volatile FFA are formed by lipolysis and FFA alkyl esters seems to be formed by microbial esterification during ripening (Hierro et al., 2004). Esters have low odour thresholds and have been associated to ripened flavour in cured meat products (Hierro et al., 2004; Sabio et al., 1998). In the present study, both FFA and esters were found to increase through the ripening, which is in agreement with the trend reported by Pugliese et al. (2010) and Huan, Zhou, Zhao, Xu, and Zengi, (2005) in dry-cured pork hams for the two-three first months of ripening.

The occurrence of lactones have been attributed to either lipid degradation or lactonization by dehydration and cyclization of natural-occurring hydroxyacids (Dirinck et al., 1997; Gonzalez & Ockerman, 2000). Lactones are very potent aroma compounds (Dirinck et al., 1997); however, its contribution to the aroma of dry-cured meat products has not been well established yet (Andrés, Cava, Ventanas, Muriel, & Ruiz, 2007). In the present study, lactones increased with ripening time, and similarly these volatiles appeared to increase during the first months of ripening of pork hams (Pugliese et al., 2010; Narváez-Rivas et al., 2012).

As said before tumbling had not significant effect on any volatile compound; however the presence of 3-methylbutanal was observed in tumbled samples and not in controls. This finding could indicate that tumbling would have enhanced Strecker degradation of leucine in tumbled legs, causing the presence of 3-methylbutanal to be above detection levels with respect to non-tumbled legs. The muscle and fat-tissue structural damage associated to mechanical action of tumbling (Cheng & Ockerman, 2003) could be the cause of the appearance of 3-methylbutanal, which in turn could have an effect on the dry-cured leg flavour taking into account its low odour threshold (Andrés et al., 2002).

3.3. Colour, texture and sensory evaluation

Table 4 shows the results on the instrumental texture and colour of the dry-cured lamb legs. No significant differences were found on instrumental measurement of texture between the three tumbling treatments. However, data regarding processing time showed that hardness and chewiness decreased during ripening. The decrease in

hardness was significant from day 1 to 22 and that of chewiness from day 22 to 71. On the other hand, springiness and cohesiveness presented the highest values at day 22 ($P < 0.05$). Changes in texture characteristics in dry-cured legs depend on both water content and state of proteins (Laureati, Buratti, Giovanelli, Corazzin, Lo Fiego, & Pagliarini, 2014; Monin et al., 1997). In the studies of Ruiz-Ramírez, Arnau, Serra, & Gou (2005) hardness of dry-cured pork legs appeared to show an inverse correlation with water content and proteolysis; nonetheless, that correlation was only significant for a water content/dry matter ratio < 0.6 . In the present study, the effect of moisture content on hardness could be considered as a secondary factor, because the water content/dry matter ratio was (for all sampling points) higher than 1. Therefore, the decrease of hardness observed could be attributed to proteolysis. Furthermore, springiness and cohesiveness have been directly correlated with water content (Ruiz-Ramírez et al., 2005). In accordance, the decrease of springiness and cohesiveness observed between day 21 and day 72 could be explained, at least partially, by the decrease in water content.

With respect to colour, tumbling treatment did not exert a significant effect on colour of dry-cured lamb legs. On the other hand, during the ripening of legs, L^* and b^* tended to decrease ($P < 0.1$) while a^* value tended to increase from day 22 to 71 ($P < 0.1$). A reduction of L^* and an increase of a^* were found by Molinero et al. (2008) during the drying of dry-cured beef cecina, which can be explained by the decrease in water content, and the consequent increase in pigment concentration.

Table 5 shows the results for the sensory analysis of lamb legs after the ripening period (final product). Due to some limitations on the methodology used in the sensory analysis, i.e., reference samples were not available in training sessions and panellists' reliability could not be tested (because of a small sample size, the slices obtained from a sample was low), results should be taken with caution. No significant differences for flavour characteristics between tumbling treatments were found. However, for texture, pastiness showed higher values in tumbled than in control legs.

Pastiness denotes a mouth coating sensation during mastication, and in excess it can be considered as a texture defect associated with excessive softness and a loss of elasticity (Arnau et al., 2007; García-Garrido, Quiles-Zafra, Tapiador, & Luque de Castro, 1999). Softness and pastiness have been related to high proteolysis activity (García-Garrido et al., 1999). However, in this study, the higher pastiness found in

tumbled legs can not be attributed to proteolysis, having into account that WSN levels were not affected by tumbling (Table 2). Instead, disruption of muscle cells and connective tissue around muscle fibres and/or extraction of salt-soluble proteins could be suggested as possible reasons for the difference in pastiness (Plimpton, Perkins, Sefton, Cahill, & Ockerman, 1991). Due to the low increment in pastiness score between tumbled and non-tumbled legs (one point approximately) and the finding that no texture differences were noticed by the TPA analysis, the higher pastiness of tumbled legs would not be so strong as to be considered a defect of dry-cured legs eating quality.

4. Conclusions

With the present study, selected quality characteristics, including the volatile profile, of a dry-cured lamb leg have been described at different processing times. Quality of dry-cured lamb legs are mainly affected by the ripening time. Tumbling treatments used in the present study only have a significant effect on perceived pastiness, which was higher in tumbled legs. Moreover, the tumbling treatments can be related to the presence of a 3-methylbutanal (derived from Strecker degradation of leucine), because this compound was found in tumbled legs and not in non-tumbled legs. The presence of that compound could have an impact on leg flavour. The effect of more intense tumbling treatments on the quality, i.e., texture and flavour, of dry-cured whole meat products could be the subject of further studies.

References

- Adamiec, J., Rössner, J., Velišek., Cejpek, K., & Šavel, J. (2001). Minor Strecker degradation products of phenylalanine and phenylglycine. *European Food Research and Technology*, *212*, 135-140.
- 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.
- Andrés, A. I., Cava, R., & Ruiz, J. (2002). Monitoring volatile compounds during dry-cured ham ripening by solid-phase microextraction coupled to a new direct-extraction device. *Journal of Chromatography A*, *963*, 83-88.
- 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.
- AOAC (1999). Official methods 920.153 ash, 950.46 moisture, 981.10 crude protein and 991.36 fat (crude) contents in meat and meat products. In P. Cunniff (Ed.), *Official methods of analysis of the AOAC international* (Vol. II, 16th ed.) (pp. 1–15). Gaithersburg, MD: AOAC.
- Arnau, J., Serra, X., Comaposada, P., Gou, P., & Garriga, M. (2007). Technologies to shorten the drying period of dry-cured meat products. *Meat Science*, *77*, 81-89.
- Bernués, A., Ripoll, G., & Panea, B. (2012). Consumer segmentation based on convenience orientation and attitudes towards quality attributes of lamb meat. *Food Quality and Preference*, *26*, 211-220.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, *37*, 911–917.
- Carrapiso, A. I., Bonilla, F., García, C. (2003). Effect of crossbreeding and rearing system on sensory characteristics of Iberian ham. *Meat Science*, *65*, 623-629.
- Cattaneo, P. (1994). Prodotti essiccati Di. Carne di pecora (Dry meat products made from lamb or mutton). *Ingegneria Alimentare. Le Conserve Animali*, *10*, 4, 7-13.

- Cheng, J., & Ockerman, H. W. (2003). Effect of phosphate with tumbling on lipid oxidation of precooked roast beef. *Meat Science*, *65*, 1353-1359.
- Colomer-Rocher, F., Morand-Fehr, P., Kirton, A. H., Delfa, R., & Sierra-Alfranca, I. (1988). Método normalizado para el estudio de los caracteres cuantitativos y cualitativos de las canales ovinas producidas en el área Mediterránea, según los sistemas de producción. *Cuadernos del INIA*, *17*, 19-41.
- Dirinck, P., Van Opstaele, F., & Vandendriessche, F. (1997). Flavour differences between northern and southern European cured hams. *Food Chemistry*, *59*, 4, 511-521.
- Elmore, J. S., Campo, M. M., Enser, M., & Mottram, D. S. (2002). Effect of lipid composition on meat-like model systems containing cysteine, ribose, and polyunsaturated fatty acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 1126-1132.
- Feiner, G. (2006). Cured-dried meat products. *Meat Products Handbook: Practical Science and Technology* (pp. 417-441). Cambridge, Woodhead Publishing limited, CRC Press.
- Frankel, E. N. (1982). Volatile lipid oxidation products. *Progress in Lipid Research*, *22*, 1-33.
- García de Fernando, G. D., & Fox, P. F. (1991). Study of proteolysis during the processing of a dry fermented pork sausage. *Meat Science*, *30*, 367-383.
- García, I., Zumalacárregui, M., & Díez, I. (1995). Microbial succession and identification of *Micrococcaceae* in dried beef cecina, an intermediate moisture meat product. *Food Microbiology*, *12*, 309-315.
- García-Garrido, J. A., Quiles-Zafra, R., Tapiador, J., & Luque de Castro, M. D. (1999). Sensory and analytical properties of Spanish dry-cured ham of normal and defective texture. *Food Chemistry*, *67*, 423-427.
- García-Regueiro, J. A., Gibert, J., & Díaz, I. (1994). Determination of neutral lipids from subcutaneous fat of cured ham by capillary gas chromatography and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *667*, 225-233.

- González, C. B., & Ockerman, H. W. (2000). Dry-cured mediterranean hams: long process, slow changes and high quality: a review. *Journal of Muscle Foods*, *11*, 1-17.
- Guerrero, L., Gou, P., & Arnau, J. (1999). The influence of meat pH on mechanical and sensory textural properties of dry-cured ham. *Meat Science*, *52*, 267–273.
- Håseth, T. T., Thorkelsson, G., & Sidhu, M. S. (2008) North European Products. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (pp. 407-413). Ames, IA, USA: Blackwell Publishing Professional.
- Hayes, J. E., Kenny, T. A., Ward, P., & Kerry, J. P. (2007). Development of a modified dry curing process for beef. *Meat Science*, *77*, 314-323.
- Hierro, E., de la Hoz, L., & Ordóñez, J. A. (2004). Headspace volatile compounds from salted and occasionally smoked dried meats (cecinas) as affected by animal species. *Food Chemistry*, *85*, 649–657.
- Huan, Y., Zhou, G., Zhao, G., Xu, X., & Zengqi, P. (2005). Changes in flavor compounds of dry-cured Chinese Jinhua ham during processing. *Meat Science*, *71*, 291-299.
- ISO (1996). International Standard 1841-2. Determination of Chloride Content –Part 2: Potentiometric Method (Reference Method). Meat and Meat Products. Genève, Switzerland: International Organization for Standardization.
- Jamal, A. (2003). Retailing in a multicultural world: the interplay of retailing, ethnic identity and consumption. *Journal of Retailing and Consumer Services*, *10*, 1-11.
- Kaban, G. (2009). Changes in the composition of volatile compounds and in microbiological and physicochemical parameters during pastirma processing. *Meat Science*, *82*, 17-23.
- Laureati, M., Buratti, S., Giovanelli, G., Corazzin, M., Lo Fiego, D., & Pagliarini, E. (2014). Characterization and differentiation of Italian Parma, San Daniele and Toscano dry-cured hams: A multi-disciplinary approach. *Meat Science*, *96*, 288-294.

- McIntyre, L., & Rondeau, K. (2011). Individual consumer food localism: A review anchored in Canadian Farmwomen's reflections. *Journal of Rural Studies*, 27, 116-124.
- Molinero, C., Martínez, B., Rubio, B., Rovira, J., & Jaime, I. (2008). The effects of extended curing on the microbiological, physicochemical and sensorial characteristics of *Cecina de León*. *Meat Science*, 80, 370-379.
- Monin, G., Marinova, P., Talmant, A., Martin, J. F., Cornet, M., Lanore, D., & Grasso, F. (1997). Chemical and structural changes in dry-cured hams (Bayonne hams) during processing and effects of the dehairing technique. *Meat Science*, 47, 29-47.
- Narváez-Rivas, M., Gallardo, E., & León-Camacho, M. (2012). Analysis of volatile compounds from Iberian hams: a review. *Grasas y Aceites*, 64, 432-454.
- O'Grady, M. N., Monahan, F. J., & Brunton, N. P. (2001). Oxymyoglobin oxidation and lipid oxidation in bovine muscle-mechanistic Studies. *Food Chemistry and Toxicology*, 66, 386-392.
- Osorio, M. T., Zumalacárregui, J. M., Figueira, A. C., & Mateo, J. (2007). Physicochemical properties of perirenal and omental fat from suckling lamb carcasses evaluated according to the type of milk source. *Small Ruminant Research*, 72, 111-118.
- Paleari, M. A., Moretti, V. M., Beretta, G., & Caprino, F. (2008). Chemical parameters, fatty acids and volatile compounds of salted and ripened goat thigh. *Small Ruminant Research*, 74, 140-148.
- Plimpton, R. F., Perkins, C. J., Sefton, T. L., Cahill, V. R., & Ockerman, H. W. (1991). Rigor condition, tumbling and salt level influence on physical, chemical and quality characteristics of cured, boneless hams. *Journal of Food Science*, 56, 1514-1518.
- Pugliese, C., Sirtori, F., Calami, F., & Fanci, 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.

- Ruiz-Ramírez, J., Arnau, J., Serra, X., & Gou, P. (2005). Relationship between water content, NaCl content, pH and texture parameters in dry-cured muscles. *Meat Science*, *70*, 579-587.
- Sabio, E., Vidal-Aragon, 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.
- Texeira, A., Pereira, E., & Rodrigues, E. S. (2011). Goat meat quality. Effects of salting, air-drying and ageing processes. *Small Ruminant Research*, *98*, 55-58.
- Toldrá, F. (2006). The role of muscle enzymes in dry-cured meat products with different drying conditions. *Trends in Food Science & Technology*, *17*, 164-168.
- Vieira C., Fernández-Diez A., Mateo J., Bodas R., Soto, S., & Manso, T. (2012). Effects of addition of different vegetable oils to lactating dairy ewes' diet on meat quality characteristics of suckling lambs reared on the ewes' milk. *Meat Science*, *91*, 277-283.

Table 1. Mean values of microbial counts (log CFU/g), moisture (%), NaCl (%) and water activity (a_w) in dry-cured lamb legs (*M. Quadriceps femoris*), grouped by sampling point (external or internal muscle layer), tumbling treatment (no tumbling, Control; short tumbling, ST; long tumbling, LT) and processing time (days)

	Sampling point	Treatment (n=9)			Day (n=9)			SEM	Significance			
		Control	ST	LT	1	22	71		T	t	Txt	Batch
<i>Microbial counts</i>												
MRS	External	5.07	5.06	5.16	3.41 ^b	6.22 ^a	5.67 ^a	0.712	NS	*	NS	+
	Internal	3.47	3.21	3.54	2.02 ^b	4.39 ^a	3.81 ^a	0.332	NS	***	NS	NS
MSA	External	6.44	6.41	6.38	3.85 ^b	8.03 ^a	7.35 ^a	0.784	NS	*	NS	*
	Internal	3.99	3.72	4.28	2.30 ^b	4.81 ^a	4.87 ^a	0.257	NS	***	NS	NS
<i>Moisture, NaCl and a_w</i>												
Moisture	External	58.55	58.30	58.65	68.60 ^a	57.65 ^b	49.24 ^c	0.647	NS	***	NS	*
	Internal	65.06	65.11	65.11	72.88 ^a	66.21 ^b	56.19 ^c	0.619	NS	***	NS	NS
NaCl	External	6.84	6.93	6.81	6.41 ^b	6.56 ^b	7.62 ^a	0.244	NS	*	NS	**
	Internal	5.95	5.90	5.95	2.75 ^c	6.75 ^b	8.29 ^a	0.203	NS	***	NS	**
a_w	External	0.91	0.91	0.91	0.94 ^a	0.92 ^b	0.88 ^c	0.003	NS	***	NS	**
	Internal	0.93	0.93	0.93	0.97 ^a	0.93 ^b	0.89 ^c	0.003	NS	***	NS	*

CFU: colony-forming units.

MRS: De Man-Rogosa-Sharpe; MSA: Mannitol Salt Agar.

SEM: Standard error of the mean.

Significance: Fixed effects; T, tumbling treatment; t, time; Txt, time-tumbling treatment interaction; Random effect: Batch; NS: not significant; +: $P < 0.1$; *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$.

^{a,b,c}: Mean in the same row, for either treatment or day aggrupation, with different letters are significantly different ($P < 0.05$; Duncan's test).

Table 2. Mean values of proximate composition (%), pH, free fatty acids (FFA; % of total lipids) and water soluble nitrogen (WSN; % of total nitrogen) of dry-cured lamb legs (*M. Semimembranosus*) grouped by tumbling treatment (no tumbling, Control; short tumbling, ST; long tumbling, LT) and processing day

	Treatment (n=9)			Day (n=9)			SEM	Significance			
	Control	ST	LT	1	22	71		T	t	Txt	Batch
<i>Proximate composition</i>											
Moisture	61.00	61.26	61.32	70.03 ^a	61.87 ^b	51.69 ^c	0.428	NS	***	NS	*
Protein	27.80	27.81	27.08	21.53 ^c	26.67 ^b	34.50 ^a	0.540	NS	***	NS	*
Fat	2.44	2.14	2.35	1.76 ^b	2.48 ^{ab}	2.69 ^a	0.254	NS	*	NS	NS
Ash	6.69	6.71	6.61	5.32 ^c	6.44 ^b	8.25 ^a	0.172	NS	***	NS	+
<i>pH, FFA and WSN</i>											
pH	5.82	5.85	5.88	5.69 ^c	5.84 ^b	6.02 ^a	0.021	NS	***	NS	**
FFA	8.15	8.29	8.73	4.01 ^c	7.69 ^b	13.47 ^a	0.721	NS	***	NS	*
WSN	26.05	25.96	26.58	21.95 ^c	25.41 ^b	31.24 ^a	0.949	NS	***	NS	*

SEM: Standard error of the mean.

Significance: Fixed effects; T, tumbling treatment; t, time; Txt, time-tumbling treatment interaction; Random effect: Batch; NS: not significant; +: $P < 0.1$; *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$.

^{a,b,c}: Mean in the same row, for either treatment or day aggrupation, with different letters are significantly different ($P < 0.05$; Duncan's test).

Table 3. Mean values (ng of undecane per g) of volatile compounds in dry-cured lamb legs (*M. Semimembranosus*) grouped by tumbling treatment (no tumbling, Control; short tumbling, ST; long tumbling, LT) and processing day

	RRT	Treatment (n=9)			Day (n=9)			SEM	Significance			
		Control	ST	LT	1	22	71		T	t	Txt	Batch
<i>Straight-chain aldehydes</i>												
Pentanal	667	492.96	415.91	463.91	801.74 ^a	368.84 ^b	202.21 ^b	65.035	NS	***	NS	*
Hexanal	802	16.97	25.57	18.01	33.83 ^a	14.29 ^b	12.43 ^b	4.606	NS	**	NS	NS
4-Heptenal, (Z)-	892	205.41	188.43	199.44	379.06 ^a	153.70 ^b	60.52 ^b	36.918	NS	***	NS	*
Heptanal	893	0.10	0.30	0.52	0.72	0.20	ND	0.219	NS	+	NS	NS
2-Heptenal, (Z)-	949	37.84	30.20	32.04	61.91 ^a	23.93 ^b	14.25 ^b	7.248	NS	***	NS	NS
Octanal	995	1.50	0.93	1.16	3.22 ^a	0.38 ^b	ND	0.376	NS	***	NS	+
2-Octenal, (E)-	1050	46.79	38.55	39.72	74.47 ^a	33.06 ^b	17.54 ^b	5.849	NS	***	NS	NS
4-Nonenal	1088	4.48	3.85	3.29	8.91 ^a	1.42 ^b	1.29 ^b	1.045	NS	***	NS	*
Nonanal	1095	0.60	0.72	1.04	1.91 ^a	0.45 ^b	ND	0.304	NS	**	NS	NS
2-Nonenal, (E)-	1152	116.5	90.79	119.07	164.86 ^a	100.92 ^b	60.53 ^b	14.004	NS	**	NS	*
4-Decenal, (E)-	1186	8.03	4.02	4.70	13.15 ^a	2.21 ^b	1.41 ^b	2.081	NS	**	NS	NS
Decanal	1198	0.73	0.64	0.74	1.49	0.31	0.30	0.380	NS	+	NS	NS
2,4-Nonadienal, (E,E)-	1210	13.06	9.13	13.09	14.47	11.55	9.26	1.812	NS	NS	NS	NS
2-Decenal, (E)-	1261	0.78	0.38	0.42	1.46 ^a	0.12 ^b	ND	0.268	NS	**	NS	NS
Undecanal	1313	7.59	3.01	3.93	10.33 ^a	2.83 ^b	1.36 ^b	1.797	NS	*	NS	*
2,4-Decadienal	1329	3.44	2.39	3.90	3.91	3.16	2.67	0.594	NS	NS	NS	NS
Dodecanal	1374	3.60	2.88	2.89	4.85	1.83	2.70	1.099	NS	NS	NS	+
2-Undecenal	1414	21.14	11.09	16.00	15.04	16.58	16.60	4.582	NS	NS	NS	NS
<i>Alcohols</i>												
1-Pentanol	684	4.44	3.04	3.92	8.14 ^a	1.91 ^b	1.35 ^b	1.359	NS	**	NS	+
1-Hexanol	864	71.99	71.44	78.02	97.65 ^a	70.35 ^b	47.98 ^b	7.101	NS	***	NS	NS
1-Heptanol	961	7.88	7.30	8.75	14.60 ^a	8.94 ^b	0.40 ^c	1.481	NS	***	NS	NS
1-Octen-3-ol	971	7.42	9.77	10.73	5.35 ^b	8.27 ^b	14.31 ^a	1.578	NS	**	NS	***
2-Ethyl-1-hexanol	1019	4.14	4.85	6.58	4.64	6.92	4.00	1.160	NS	NS	NS	NS
		25.13	24.34	29.47	39.63 ^a	23.16 ^b	16.15 ^b	2.857	NS	***	NS	*
		2.04	2.55	2.63	4.09 ^a	1.98 ^{ab}	1.16 ^b	0.713	NS	*	NS	NS

2-Octen-1-ol, (E)-	1058	5.70	4.60	5.31	9.30 ^a	4.35 ^b	1.96 ^b	1.185	NS	**	NS	*
1-Octanol	1061	19.11	13.11	14.54	20.04 ^a	16.72 ^{ab}	10.00 ^b	2.385	NS	*	NS	NS
<i>Ketones</i>		40.93	41.90	50.64	66.47 ^a	31.74 ^b	35.26 ^b	9.921	NS	*	NS	NS
2-Hexanone	790	0.33	0.47	0.57	ND	0.23 ^b	1.14 ^a	0.185	NS	**	NS	*
2-Heptanone	882	5.52	6.97	7.25	5.01 ^b	4.85 ^b	9.89 ^a	0.843	NS	***	NS	NS
2-Heptanone, 6-methyl-	945	0.05	0.10	0.12	0.26	ND	ND	0.052	NS	-	NS	NS
2,3-Octanedione	976	29.60	28.32	34.45	55.68 ^a	22.28 ^b	14.41 ^b	9.320	NS	*	NS	NS
2-Nonanone	1082	1.33	2.33	3.68	0.72 ^b	1.66 ^{ab}	4.96 ^a	1.187	NS	*	NS	NS
3,5-Octanedione	1085	1.37	1.59	2.55	2.32	1.89	1.30	0.467	NS	NS	NS	NS
2-Decanone	1183	1.94	1.28	1.45	1.96	1.04	1.64	0.264	NS	+	NS	NS
2-Undecanone	1292	0.78	0.84	0.58	0.50 ^b	0.38 ^b	1.33 ^a	0.134	NS	***	NS	***
<i>Aliphatic hydrocarbons</i>		21.29	13.66	17.29	15.64	17.83	18.75	2.823	NS	NS	NS	NS
Octane	800	0.33	0.55	0.61	0.39 ^{ab}	0.15 ^b	0.95 ^a	0.232	NS	+	NS	NS
Undecane	1090	0.42	0.76	0.74	0.08 ^b	0.32 ^b	1.53 ^a	0.324	NS	*	NS	NS
Dodecane	1191	1.51	1.42	1.46	1.38 ^{ab}	1.07 ^b	1.95 ^a	0.222	NS	*	NS	NS
Tridecane	1300	2.04	1.89	1.88	2.47 ^a	1.30 ^b	2.03 ^{ab}	0.260	NS	*	NS	NS
Tetradecane	1400	6.06	3.32	4.56	4.20	5.04	4.70	0.917	NS	NS	NS	NS
Pentadecane	1500	10.92	5.72	8.03	7.13	9.96	7.59	1.471	NS	NS	NS	NS
<i>Furans and lactones</i>		11.02	12.51	13.79	13.87 ^{ab}	7.19 ^b	16.27 ^a	2.274	NS	*	NS	NS
Furan, 2-pentyl-	982	9.19	10.80	11.69	13.29	6.17	12.23	2.065	NS	+	NS	*
γ-Ethylbutyrolactone	1046	0.17	0.09	0.26	ND	0.08 ^b	0.44 ^a	0.106	NS	*	NS	*
γ-Propiobutyrolactone	1144	0.16	0.21	0.29	ND	0.17 ^b	0.48 ^a	0.116	NS	*	NS	NS
γ-Butylbutyrolactone	1254	0.86	0.70	0.72	0.58	0.59	1.11	0.175	NS	+	NS	NS
γ-Pentylbutyrolactone	1372	0.64	0.71	0.83	ND	0.16 ^b	2.01 ^a	0.167	NS	***	NS	NS
<i>Fatty acids and esters</i>		8.58	9.92	11.72	7.42 ^b	6.10 ^b	16.70 ^a	1.833	NS	**	NS	*
Butanoic acid	763	0.98	0.56	0.65	0.54 ^b	0.40 ^b	1.26 ^a	0.221	NS	*	NS	**
Butanoic acid, 3-methyl ester	837	0.39	0.28	0.38	ND	ND	1.06	0.274	NS	-	NS	+
Hexanoic acid	969	3.47	4.30	4.74	3.40	3.73	5.38	1.090	NS	NS	NS	NS
Hexanoic acid, ethyl ester	989	0.21	0.72	0.58	ND	0.30	1.21	0.357	NS	+	NS	+

Octanoic acid	1156	0.71	1.30	1.63	0.70 ^b	0.74 ^b	2.21 ^a	0.293	NS	**	NS	NS
Octanoic acid, ethyl ester	1186	0.58	0.41	0.44	0.67	0.14	0.61	0.161	NS	+	NS	**
Nonanoic acid	1258	0.69	0.97	1.18	1.52	0.20	1.12	0.608	NS	NS	NS	NS
Decanoic acid	1369	0.60	0.51	0.80	0.37 ^b	0.21 ^b	1.33 ^a	0.266	NS	*	NS	NS
Decanoic acid, ethyl ester	1396	0.94	0.87	1.30	0.20 ^b	0.38 ^b	2.53 ^a	0.386	NS	***	NS	NS
<i>Methyl-branched aldehydes</i>												
1-Butanal, 3-methyl	670	ND	0.91	0.84	ND	ND	1.76		NS	-	-	NS
<i>Benzene compounds</i>												
Benzaldehyde	956	47.24	40.62	50.89	58.46 ^a	42.91 ^{ab}	37.38 ^b	5.461	NS	*	NS	NS
Phenylacetaldehyde	1037	27.32	26.11	27.52	42.75 ^a	28.03 ^b	10.17 ^c	2.803	NS	***	NS	+
Benzaldehyde, ethyl	1158	4.31	3.44	3.88	2.60 ^b	2.40 ^b	6.63 ^a	0.693	NS	***	NS	NS
Benzene, 1,3-dimethoxy-	1160	2.13	1.86	2.47	4.26 ^a	1.84 ^{ab}	0.35 ^b	0.898	NS	*	NS	NS
Benzaldehyde, 4-pentyl	1473	1.86	4.24	4.38	ND	1.10 ^b	9.39 ^a	1.565	NS	**	NS	+
		11.62	4.96	12.63	8.84	9.53	10.84	2.888	NS	NS	NS	NS
<i>Terpenic compounds</i>												
Limonene	1022	10.82	8.83	11.59	15.40 ^a	7.07 ^b	8.74 ^b	2.058	NS	*	NS	NS
<i>Unknown[#]</i>												
133, 151/66, 43/48, 45/34, 58/31	887	1.41	0.98	0.94	0.67	1.27	1.37	0.398	NS	NS	NS	NS
67, 95/58, 124/28, 41/23, 109/21	1024	0.17	0.53	0.46	1.02 ^a	0.13 ^b	ND	0.120	NS	***	NS	NS
43, 99/24, 71/22, 87/21, 55/19	1074	0.78	1.21	1.45	1.89 ^a	1.04 ^{ab}	0.51 ^b	0.387	NS	+	NS	NS
91, 92/53, 122/22, 65/18, 51/7	1105	0.74	1.33	1.57	ND	ND	3.64 ^a	0.573	NS	***	NS	***
55, 56/99, 43/96, 57/90, 70/81	1162	0.89	0.66	0.94	1.22	0.82	0.45	0.212	NS	+	NS	+
135, 79/76, 150/65, 56/63, 71/52	1217	1.05	0.33	0.35	1.69 ^a	0.04 ^b	ND	0.350	NS	**	NS	*
55, 57/96, 79/60, 41/53, 56/47	1265	1.89	1.30	1.90	3.19 ^a	1.11 ^b	0.79 ^b	0.334	NS	***	NS	NS
8 57, 43/75, 71/59, 141/42, 41/31	1281	1.55	1.00	1.90	3.48 ^a	0.90 ^b	0.06 ^b	0.674	NS	**	NS	NS
9 43, 69/58, 41/35, 107/17, 55/18	1455	2.34	1.51	2.07	2.24	1.65	2.01	0.301	NS	NS	NS	NS

RRT: Relative retention time. SEM: Standard error of the mean.

Significance: Fixed effects; T, tumbling treatment; t, time; Txt, time-tumbling treatment interaction; Random effect: Batch; NS: not significant; +: $P < 0.1$; *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$.

^{a,b,c}: Mean in the same row, for either treatment or day aggrupation, with different letters are significantly different ($P < 0.05$; Duncan's test).

ND: not detected. [#] Mayor fragments/relative abundance

Table 4. Means of instrumental measurement texture (*M. Adductor*) and colour (*M. Semimembranosus*) in the dry-cured lamb legs grouped by tumbling treatment (no tumbling, Control; short tumbling, ST; long tumbling, LT) and processing day

	Treatment (n=9)			Day (n=9)			SEM	Significance			
	Control	ST	LT	1	22	71		T	t	Txt	Batch
<i>Texture profile analysis</i>											
Hardness (N)	14.39	10.64	14.92	16.87 ^a	11.74 ^b	11.36 ^b	1.299	+	*	NS	*
Springiness	0.60	0.63	0.65	0.68 ^b	0.75 ^a	0.45 ^c	0.021	NS	***	NS	NS
Cohesiveness	0.33	0.35	0.35	0.33 ^b	0.38 ^a	0.32 ^b	0.010	NS	***	NS	NS
Chewiness	2.78	2.40	3.34	3.54 ^a	3.23 ^a	1.74 ^b	0.287	+	***	NS	*
<i>Colour</i>											
<i>L</i> *	26.61	28.14	26.93	27.94	28.10	25.65	0.849	NS	+	NS	NS
<i>a</i> *	10.12	9.55	10.65	9.56	9.09	11.67	0.837	NS	+	NS	NS
<i>b</i> *	15.96	13.96	15.09	15.96	16.08	12.98	1.097	NS	+	NS	NS

SEM: Standard error of the mean.

Significance: Fixed effects; T, tumbling treatment; t, time; Txt, time-tumbling treatment interaction; Random effect: Batch; NS: not significant; +: $P < 0.1$; *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$.^{a,b,c}: Mean in the same row, for either treatment or day aggrupation, with different letters are significantly different ($P < 0.05$; Duncan's test).

Table 5. Sensory descriptors (medians, mean values between brackets; scale from 1-lowest to 5-highest) of 71-day dry-cured lamb legs (*M. Biceps femoris*) grouped by tumbling treatment (no tumbling, Control; short tumbling, ST; long tumbling, LT)

	Treatment (n=18)			Significance
	Control	ST	LT	
<i>Flavour</i>				
Saltiness	4.0 (3.4)	4.0 (3.6)	3.0 (3.2)	NS
Bitterness	1.0 (1.6)	1.0 (1.8)	1.0 (1.6)	NS
Lamb flavour	3.0 (3.1)	3.0 (3.1)	2.0 (2.7)	NS
Pungent flavour	1.0 (1.4)	1.5 (1.8)	1.0 (1.4)	NS
<i>Texture</i>				
Hardness	2.0 (2.3)	2.0 (2.2)	2.0 (2.3)	NS
Juiciness	3.5 (3.3)	4.0 (3.4)	3.0 (3.2)	NS
Pastiness	2.0 ^b (1.9)	3.0 ^a (3.2)	3.0 ^a (2.8)	***

Significance: level of significance found by Kruskal-Wallis test. NS: not significant; ***: $P < 0.001$

^{a,b,c}: Values in the same row with different letters showed to be significantly different ($P < 0.05$) by the Mann-Whitney U test.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

Compuestos aromáticos y estabilidad a la oxidación de la carne de corderos alimentados con distintos niveles de oleína de girasol

La incorporación de oleínas de girasol en la dieta de los corderos en las condiciones utilizadas en este estudio (cantidad administrada, tiempo de administración) no mostró un efecto claro, ni relevante, sobre las concentraciones de los compuestos volátiles derivados de los lípidos en la carne de cordero cocinada. No obstante, el uso de oleínas de girasol se relacionó con la presencia de compuestos volátiles tales como tolueno y 2,6-di-tert-butilquinona (un producto de degradación del antioxidante butilhidroxitolueno), los cuales fueron cuantificados en la carne de los corderos alimentados con oleínas de girasol y no en la carne del grupo control. Además, la carne de los corderos alimentados con oleínas de girasol mostró mayor estabilidad a la oxidación lipídica inducida por el hierro que la carne del grupo control. Sin embargo, no se encontraron diferencias en la estabilidad a la oxidación lipídica de carne cocinada almacenada a refrigeración por dos días, en condiciones de aerobiosis y con exposición a la luz.

Efecto de la adición de lúpulo (en infusión o en polvo) sobre la estabilidad oxidativa de hamburguesas de cordero durante su almacenamiento

El lúpulo usado como un ingrediente de las hamburguesas de cordero, ya sea en infusión o en polvo, a una cantidad de 2 g por kg, demostró actividad antioxidante durante el almacenamiento de las hamburguesas. La incorporación del lúpulo mejoró la estabilidad lipídica y el color de hamburguesas crudas durante su almacenamiento en refrigeración y congelación, aunque la mejoría fue más evidente en las hamburguesas almacenadas en refrigeración que en las almacenadas en congelación. De manera similar, el uso del lúpulo redujo la oxidación lipídica y proteica de las hamburguesas cocinadas durante su almacenamiento en refrigeración. El lúpulo en polvo mostró mayor efecto antioxidante que el lúpulo en infusión. No obstante, el uso del lúpulo en polvo causó un cambio en el sabor y una menor aceptabilidad de las hamburguesas por parte de los consumidores. Esta menor aceptabilidad, aunque significativa en términos numéricos, fue poco acusada.

Efecto del masaje después del salado en seco y el tiempo de maduración sobre las características de calidad de una pierna cruda-curada de cordero

Las propiedades microbiológicas, químicas y sensoriales que definen la calidad de las piernas crudo-curadas fueron fuertemente afectadas por el tiempo de maduración. Los tratamientos de masaje empleados después del salado en seco solo tuvieron efecto significativo sobre la sensación de pastosidad de la pierna madurada, percibida en el análisis sensorial. Así, la pastosidad fue más alta en las piernas masajeadas que en las no masajeadas. Además, los tratamientos de masaje estuvieron relacionados con la presencia de 3-metilbutanal (derivado a partir de la degradación de Strecker de la leucina) en el espacio de cabeza, debido a que este compuesto fue encontrado en piernas masajeadas y no en el grupo de piernas sin masaje. La presencia o no de ese compuesto puede tener un impacto sobre el sabor de las piernas. Sería interesante en posteriores estudios evaluar el efecto de un masaje más intenso sobre la calidad (textura y sabor) de la pierna de cordero cruda-curada.