



INSTITUTO DE
AGROQUÍMICA Y
TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA
DE VALENCIA
Departamento de Tecnología
de Alimentos



INTERACCIÓN DE LOS COMPUESTOS AROMÁTICOS DEL JAMÓN CURADO CON LA MATRIZ PROTEICA

Tesis Doctoral

María Pérez Juan

Valencia, 2006



INSTITUTO DE
AGROQUÍMICA Y
TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA
DE VALENCIA
Departamento de Tecnología
de Alimentos



D. Fidel Toldrá Vilardell, Profesor de Investigación y Dña. Mónica Flores Llovera, Científico Titular, ambos del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

HACEN CONSTAR: que el trabajo de investigación titulado **“INTERACCIÓN DE LOS COMPUESTOS AROMÁTICOS DEL JAMÓN CURADO CON LA MATRIZ PROTEICA”** que presenta Dña. María Pérez Juan por la Universidad Politécnica de Valencia, ha sido realizada en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC) bajo nuestra dirección y que reúne las condiciones para optar al grado de Doctor.

Valencia, Mayo de 2006

Fdo: Prof. Dr. Fidel Toldrá Vilardell

Fdo: Dra. Mónica Flores Llovera

RESUMEN

En este trabajo de tesis se estudió el efecto de la matriz en la generación y percepción de la principal característica que define la calidad del jamón curado, su aroma. Para ello, se analizó en las diferentes secciones de jamón curado de 7 y 12 meses la composición en proteínas, aminoácidos, ácidos grasos libres y compuestos volátiles. Las principales diferencias entre las secciones del jamón se encontraron en la composición de aminoácidos y compuestos volátiles, siendo esta más elevada en el centro que en las otras secciones estudiadas, aunque la proporción de compuestos volátiles se vió modificada con el tiempo de curado.

Asimismo, se analizó la interacción existente entre las proteínas de la matriz y determinados compuestos volátiles utilizando la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) y la cromatografía de gases. En este sentido, la capacidad de interacción de las proteínas sarcoplásmicas de músculo porcino fue mayor que la capacidad que mostraron las proteínas de jamón de 7 y 12 meses. Además, se puso de manifiesto una menor capacidad de interacción de las proteínas miofibrilares.

Por otra parte, se purificaron la actomiosina y actina de músculo porcino en estado post-rigor mediante un proceso simultáneo el cual, permitió conservar sus propiedades y obtener cantidad suficiente de proteína para estudiar su capacidad de interacción con los compuestos volátiles. En este sentido, se demostró que el efecto de la concentración y conformación de actomiosina y actina puras afectó a la capacidad de interacción con los compuestos volátiles aunque dicho efecto dependía del compuesto volátil estudiado.

Estos resultados demuestran la existencia de interacciones entre la matriz proteica y los compuestos volátiles responsables del aroma además de demostrar el efecto que la concentración y conformación proteica ejercen en dicha interacción. Todo ello, supone un aumento del conocimiento del proceso de interacción y su posible repercusión en la percepción del aroma del jamón curado.

ABSTRACT

In this thesis work, the main quality characteristic of dry-cured ham, its flavour, was analyzed through the study of the matrix effect on flavour generation and perception. The composition in proteins, free amino acids, free fatty acids and volatile compounds were analysed in different sections of dry-cured ham of 7 and 12 months of processing. The main differences among sections were detected in free amino acids and volatile compounds being higher in the centre section than in the other sections although the curing time changed the proportion of volatile compounds among sections.

Furthermore, the binding ability of protein matrix was studied using solid phase micro extraction (SPME) and gas chromatography analysis. The binding ability of sarcoplasmic proteins from pork muscle was higher than the ability showed by 7 and 12 months dry-cured ham sarcoplasmic homogenates and also higher than the binding ability of myofibrillar homogenates.

On the other hand, actomyosin and actin were isolated from post-rigor porcine muscle by a simultaneous process that maintained their properties and produced enough quantity for its use in binding ability studies. In this sense, the concentration and conformation affected the binding ability of isolated actomyosin and actin although, this effect was different depending on the volatile compound studied.

These results showed the existence of interactions between the protein matrix and the volatile compounds responsible for aroma. The effect of protein concentration and conformation on the binding was also demonstrated. All of these increase the knowledge about the binding process and its possible role on dry-cured ham aroma perception.

RESUM

En aquest treball de tesis, s'estudià l'efecte de la matriu en la generació de l'aroma, principal característica que defineixen la qualitat del pernil. Per això, s'analitzà la composició en proteïnes, aminoàcids, àcids grassos lliures i compostos volàtils en les diferents seccions del pernil de 7 i 12 mesos. Les principals diferències entre les seccions estudiades es trobaren en la composició d'aminoàcids i compostos volàtils sent més elevada en el centre que en les altres seccions estudiades, encara que la proporció dels compostos volàtils es modificà amb el temps de processament.

Al mateix temps, l'interacció existent entre les proteïnes de la matriu amb determinants compostos volàtils s'estudià utilitzant la microextracció en fase sòlida (SPME) i la cromatografia de gasos. En aquest sentit, la capacitat d'interacció de les proteïnes sarcoplàsmiques de múscul de porcí fou més elevada que la de les proteïnes de pernil de 7 i 12 mesos. Més aviat, es posà de manifest una menor capacitat d'interacció de les proteïnes miofibrilars.

D'altra banda, l'actomiosina i l'actina de múscul de porcí en estat de post-rigor es purificaren seguint un procés simultani que va permetre mantenir les seues propietats i obtenir quantitat suficient per estudiar la seua capacitat d'interacció amb el compostos volàtils. En aquest sentit, es demostrà que l'efecte de la concentració i la conformació de l'actomiosina i l'actina pures afectà la seua capacitat d'interacció amb el compostos volàtils encara que aquest efecte depén del compost volàtil estudiat.

Aquests resultats demostren l'existència d'interaccions entre la matriu proteica i els compostos volàtils responsables de l'aroma a més de demostrar l'efecte de la concentració i la conformació proteica en aquesta interacció. Tot açó suposa un augment del coneixement dels processos d'interacció i de la seua possible repercusió en l'aroma del pernil.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer en primer lugar al Dr. Fidel Toldrá Vilardell y a la Dra. Mónica Flores Lovera, directores de esta tesis, su orientación y apoyo en el desarrollo de la misma, ya que sin su dedicación, consejos, ayuda y trabajo no hubiera sido posible su realización. Asimismo, me gustaría agradecerles sus valiosos consejos para el desarrollo de mi carrera investigadora.

Agradezco al Ministerio de Educación y Ciencia la beca FPI que ha hecho posible mi formación predoctoral así como los proyectos AGL-2001-1141 y AGL-2004-05064-CO2-01 en los cuales se ha desarrollado esta tesis.

Al Dr. José Flores sus constantes ánimos ya que es un ejemplo a seguir para aquellos que quieren dedicarse al mundo de la investigación.

Quisiera agradecer a Marga sus valiosos consejos y ayuda en el campo de la cromatografía líquida.

A M^a Pilar, Maribel y Pablo por su valiosa ayuda y consejos en las prácticas de laboratorio. Y a M^a Angeles por su saber hacer.

A Natalia y María, por el tiempo y esfuerzo que han dedicado conmigo a la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros de laboratorio que durante estos cuatro años han compartido conmigo su amistad y me han brindado su apoyo. Gracias Leticia, Laura, Lorena, M^a Carmen, Manolo, Mónica, Maijo, Lilliana, María, Aurora, Miguel Ángel, Natalia, Milagro, Jose Ma, Sergio, Merche, Asun y Pía.

A Alicia, Laura, Araceli, Susana y Fabiola por seguir ahí a pesar de que nuestros caminos han tomado distintas direcciones. Gracias por vuestra amistad. Alicia, gracias por estar ahí.

A Arturo, por mirarme con tan buenos ojos y hacerme sentir alguien muy especial. Gracias por tu paciencia, tu apoyo y por compartir conmigo este viaje.

A mi familia, gracias por vuestro apoyo y cariño en todo momento. Papa y mama, gracias por darme la oportunidad de conseguir todo aquello con lo que he soñado y por vuestro incondicional apoyo. Quique y Ángela, "mis compis de piso", gracias por vuestro cariño y por aguantar los malos momentos. Finalmente, a mis abuelos gracias por creer siempre en mi.

ÍNDICES Y ABREVIATURAS

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	XVIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XXII
ABREVIATURAS.....	XXIII
1 INTRODUCCIÓN.....	27
1.1 MATRIZ PROTEICA DE LA CARNE.....	27
1.1.1 COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	27
1.1.2 CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MUSCULARES.....	29
1.1.2.1 Proteínas sarcoplásmicas.....	29
1.1.2.2 Proteínas miofibrilares.....	30
1.1.2.2.1 Miosina.....	34
1.1.2.2.2 Actina.....	35
1.1.2.2.3 Actomiosina.....	35
1.1.2.3 Proteínas del estroma.....	36
1.1.3 PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES MAYORITARIAS.....	36
1.1.3.1 Purificación de la miosina.....	36
1.1.3.2 Purificación de la actina.....	37
1.2 GENERACIÓN DEL AROMA Y SABOR DEL JAMÓN CURADO.....	41
1.2.1 DEGRADACIÓN PROTEICA EN EL CURADO.....	41
1.2.2 DEGRADACIÓN LIPÍDICA EN EL CURADO.....	43
1.2.3 COMPUESTOS RESPONSABLES DEL AROMA DEL JAMÓN CURADO.....	44
1.3 INTERACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS CON LOS COMPUESTOS VOLÁTILES.....	48
1.3.1 INTERACCIÓN.....	48
1.3.2 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN PROTEÍNA-VOLÁTIL.....	48
1.3.3 FACTORES QUE AFECTAN A LA INTERACCIÓN PROTEÍNA-VOLÁTIL.....	52
1.3.4 EFECTO DE LA INTERACCIÓN EN LA PERCEPCIÓN DEL AROMA Y SABOR.....	53
2 OBJETIVOS.....	59
3 CAPÍTULO I: EFECTO DE LAS DISTINTAS SECCIONES DEL JAMÓN CURADO EN LA GENERACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES AROMÁTICOS.....	63
3.1 INTRODUCCIÓN.....	63

3.2 MATERIAL Y MÉTODOS	64
3.2.1 MATERIAL.....	64
3.2.2 ANÁLISIS QUÍMICOS.....	65
3.2.3 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	66
3.2.4 ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS LIBRES.....	67
3.2.5 ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES	67
3.2.6 ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES	68
3.2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	68
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69
4 CAPÍTULO II: EFECTO DE LAS PROTEÍNAS SARCOPLÁSMICAS Y MIOFIBRILARES DEL MÚSCULO PORCINO Y DEL JAMÓN CURADO EN LA INTERACCIÓN CON COMPUESTOS VOLÁTILES	89
4.1 INTRODUCCIÓN	89
4.2 MATERIAL Y MÉTODOS	91
4.2.1 MATERIALES.....	91
4.2.2 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE PROTEÍNAS SARCOPLÁSMICAS Y MIOFIBRILARES.....	92
4.2.3 DIÁLISIS DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS.....	92
4.2.4 PREPARACIÓN DE LA DISOLUCIÓN DE COMPUESTOS VOLATILES.....	93
4.2.5 INTERACCIÓN PROTEÍNA-VOLÁTIL	93
4.2.5.1 Análisis por cromatografía de gases	94
4.2.5.2 Cálculo de la cantidad de compuesto volátil unido por g de extracto proteico	95
4.2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	96
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	96
4.3.1 INTERACCIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES CON EXTRACTOS DE PROTEÍNAS SARCOPLÁSMICAS	96
4.3.2 INTERACCIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES CON EXTRACTOS DE PROTEÍNAS MIOFIBRILARES	100
4.3.3 EFECTO DE LA FUERZA IÓNICA EN LA CAPACIDAD DE INTERACCIÓN DE EXTRACTOS DE PROTEÍNAS SARCOPLÁSMICAS Y MIOFIBRILARES	103
5 CAPÍTULO III: PROCESO DE PURIFICACIÓN SIMULTÁNEO DE ACTOMIOSINA Y ACTINA DE MÚSCULO ESQUELÉTICO POST-RIGOR DE PORCINO.....	111
5.1 INTRODUCCIÓN	111
5.2 MATERIAL Y MÉTODOS	113

5.2.1	MATERIALES.....	113
5.2.2	MUESTRA.....	114
5.2.3	PROCESOS DE PURIFICACIÓN DE PROTEINAS.....	114
5.2.3.1	Proceso simultáneo de purificación.....	114
5.2.3.2	Proceso de purificación de Dudziak.....	116
5.2.3.3	Proceso de purificación de Pardee and Spudich.....	117
5.2.4	MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA.....	119
5.2.5	ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO.....	119
5.2.6	POLIMERIZACIÓN DE LA ACTINA.....	119
5.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	120
5.3.1	EXTRACCIÓN DE ACTOMIOSINA.....	120
5.3.2	EXTRACCIÓN DE ACTINA.....	124
6	CAPÍTULO IV: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN Y CONFORMACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES PURIFICADAS DE MÚSCULO PORCINO EN LA INTERACCIÓN CON COMPUESTOS VOLÁTILES.....	129
6.1	INTRODUCCIÓN.....	129
6.2	MATERIAL Y MÉTODOS.....	132
6.2.1	MATERIALES.....	132
6.2.2	PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	132
6.2.3	PREPARACIÓN DE LA DISOLUCIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES.....	133
6.2.4	INTERACCIÓN PROTEÍNA-VOLÁTIL.....	133
6.2.4.1	Análisis por cromatografía de gases.....	134
6.2.4.2	Cálculo de la cantidad de compuesto volátil unido por g de extracto proteico.....	134
6.2.5	EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA.....	135
6.2.6	EFECTO DE LA CONFORMACIÓN PROTEICA.....	135
6.2.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	136
6.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	136
6.3.1	EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA.....	136
6.3.2	EFECTO DE LA CONFORMACIÓN PROTEICA.....	139
7	DISCUSIÓN GENERAL.....	147
8	CONCLUSIONES.....	155
9	BIBLIOGRAFÍA.....	159
10	APÉNDICE.....	175

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estructura muscular: a) Músculo b) detalle de 3 miofibrillas; c) una fibrilla; d) detalle de una miofibrilla e) sarcómero f) vista al microscopio y esquema de la distribución de un sarcómero. Fuente (Whitaker, 1977).	28
Figura 1.2. Clasificación de los métodos de equilibrio para el estudio de la interacción.	49
Figura 1.3. Efecto de la interacción de los componentes de la matriz de los alimentos en la percepción del aroma y sabor.	55
Figura 3.1. Localización de las muestras en las diferentes secciones del jamón curado.	65
Figura 3.2. Geles SDS-PAGE (10 %) de las proteínas miofibrilares en las diferentes secciones del jamón curado después de 7 y 12 m de curado. (Std) Patrones (B) Punta, (C) Centro y (S) Codillo.	71
Figura 3.3. Principales grupos químicos de los compuestos volátiles extraídos de las diferentes secciones de jamón curado de 7 m (a) y 12 m (b). Las barras con diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las diferentes secciones del jamón curado para un grupo químico dado	83
Figura 4.1. Efecto del tipo de extracto de proteínas sarcoplásmicas utilizado (músculo porcino, jamón de 7 y 12 m) en la interacción con los compuestos volátiles. Los resultados se expresan como porcentaje de compuesto volátil libre en el espacio de cabeza de la disolución respecto del encontrado sin proteína.	97
Figura 4.2. Moles de compuesto volátil unidos por el extracto de proteínas sarcoplásmicas de músculo porcino (-●-), jamón curado de 7 m (-○-) y jamón curado de 12 m (-▼-) vs a la concentración de volátil libre en la fase acuosa. A) 3-metil-butanal, B) 2-metil-butanal, C) hexanal y D) metional	99
Figura 4.3. Efecto del tipo de extracto de proteínas miofibrilares utilizado (músculo porcino, jamón de 7 y 12 m) en la interacción con los compuestos volátiles. Los resultados se expresan como porcentaje de compuesto volátil libre en el espacio de cabeza de la disolución respecto del encontrado sin proteína.	100

- Figura 4.4.** Moles de compuesto volátil unidos por el extracto de proteínas miofibrilares de músculo porcino (-●-), jamón curado de 7 m (-○-) y jamón curado de 12 m (-▼-) vs a la concentración de volátil libre en la fase acuosa. A) 3-metil-butanal, B) 2-metil-butanal, C) hexanal y D) octanal. 102
- Figura 4.5.** Efecto de la fuerza iónica en la capacidad de interacción de extractos de proteínas sarcoplásmicas con compuestos volátiles. Los resultados se expresan como porcentaje de compuesto volátil libre en el espacio de cabeza de la disolución respecto del encontrado sin proteína en cada disolución tampón. A) 3-metil-butanal, B) 2-metil-butanal, C) 2-pentanona, D) hexanal, E) metional y F) octanal. 104
- Figura 4.6.** Efecto de la fuerza iónica en la capacidad de interacción de extractos de proteínas miofibrilares con compuestos volátiles. Los resultados se expresan como porcentaje de compuesto volátil libre en el espacio de cabeza de la disolución respecto del encontrado sin proteína en cada disolución tampón. A) 3-metil-butanal, B) 2-metil-butanal, C) 2-pentanona, D) hexanal, E) metional y F) octanal. 106
- Figura 5.1.** Proceso simultáneo de purificación de actomiosina y actina de músculo porcino en estado post-rigor. El tampón de lavado, el tampón Hasselbach Schneider y el tampón A, se describen en Material y Métodos (apartado 5.2.3.1)... 115
- Figura 5.2.** Proceso de purificación Dudziak de actomiosina a partir de músculo porcino en estado post-rigor. El tampón de lavado, el tampón Hasselbach Schneider y los tampones D1 y D2, se describen en Material y Métodos (apartado 5.2.3.2). 117
- Figura 5.3.** Proceso de purificación de Pardee y Spudich de actina a partir de músculo porcino en estado post-rigor. El tampón A se describe en Material y Métodos (apartado 5.2.3.1). 118
- Figura 5.4.** Geles de SDS-PAGE (10%) del proceso de purificación de actomiosina teñidos con plata. Proceso simultaneo de purificación (A) y proceso de purificación de Dudziak (B). El nombre de las fracciones en los carriles corresponden a las fracciones obtenidas en los procesos descritos en las figuras 5.1 y 5.2, respectivamente. St: patrones de peso molecular (miosina 200 kDa, β-galactosidasa 116

kDa, fosforilasa-b 97,4 kDa, albúmina de suero bovino 66,2 kDa, ovoalbúmina 45 kDa y anhidrasa carbónica 31 kDa).	120
Figura 5.5. Purificación de actomiosina por cromatografía de filtración en gel usando Sephacryl S-300. Previamente, la columna se calibró con diferentes proteínas incluyendo miosina (450 kDa), albúmina de suero bovino (66,2 kDa) y anhidrasa carbónica (31 kDa) que eluyeron en las fracciones 12, 30 y 39, respectivamente (resultados no incluidos).	123
Figura 5.6. Geles de SDS-PAGE al 10 % de las fracciones eluidas de la columna de Sephacryl S-300 teñidos con plata. Los números en los carriles corresponden a las fracciones eluidas de la columna (figura 5.5). St: patrones de peso molecular (miosina 200 kDa, β -galactosidasa 116 kDa, fosforilasa-b 97,4 kDa, albúmina de suero bovino 66,2 kDa, ovoalbúmina 45 kDa y anhidrasa carbónica 31 kDa).	124
Figura 5.7. Geles SDS-PAGE (12 %) de los procesos de purificación de la actina teñidos con plata. Proceso simultáneo de purificación (A) y proceso de purificación de Pardee y Spudich (B). El nombre de las fracciones en los carriles corresponden a las fracciones obtenidas por el proceso descrito en la figura 5.1 y 5.3, respectivamente. St: patrones de peso molecular (miosina 200 kDa, β -galactosidasa 116 kDa, fosforilasa-b 97,4 kDa, albúmina de suero bovino 66,2 kDa, ovoalbúmina 45 kDa y anhidrasa carbónica 31 kDa).	125
Figura 6.1. Efecto de la concentración proteica en la interacción con los compuestos volátiles. A) actomiosina (0,8 a 8,2 mg/mL) y B) actina-G (0,01 a 0,8 mg/mL). Los resultados se expresan como porcentaje de compuesto volátil libre en la disolución respecto del encontrado sin proteína.	137
Figura 6.2. Efecto de la conformación de actomiosina modificada por congelación en la interacción con compuestos volátiles. La concentración de actomiosina fue de 8 mg/mL. Los resultados se expresan como porcentaje de compuesto volátil libre en el espacio de cabeza de la disolución respecto del encontrado sin proteína.	139

- Figura 6.3.** Efecto de la conformación de la actina (globular o actina-G y fibrosa o actina-F, ambas a 0,8 mg/mL) en la interacción de los compuestos volátiles. Los resultados se expresan como porcentaje de compuesto volátil libre en el espacio de cabeza de la disolución respecto del encontrado sin proteína..... 142
- Figura 6.4.** Moles de compuesto volátil unidos por la actomiosina (-▼-), actina-G (-●-) y actina-F (-⊙-) del músculo porcino vs a la concentración de volátil libre en la fase acuosa. A) 3-metil-butanal, B) 2-metil-butanal, C) 2-pentanona, D) hexanal E) metional y F) octanal. Las concentraciones de actina (-G y -F) y de actomiosina utilizadas fueron 0,8 y 5 mg/mL, respectivamente..... 143

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Composición proteica de las miofibrillas musculares (Pearson y Young, 1989).....	31
Tabla 1.2. Métodos de extracción de la actina.	39
Tabla 1.3. Factores que afectan a la interacción proteína-volátil	53
Tabla 3.1. pH, humedad y contenido en cloruro sódico y grasa intramuscular (IMF) en las diferentes secciones del jamón después de 7 y 12 m de curado.	70
Tabla 3.2. Contenido en aminoácidos libres (expresados en mg/100 g m.s.) de las diferentes secciones de jamón curado de 7 y 12 m.	74
Tabla 3.3. Contenido en ácidos grasos libres (expresados como mg/100 g m.s) en las diferentes secciones de jamón curado de 7 y 12 m.	76
Tabla 3.4. Compuestos volátiles identificados y cuantificados en el espacio de cabeza de diferentes secciones de jamón curado de 7 y 12 m usando SPME (fibra Car/PDMS stb). Resultados expresados como media de 4 repeticiones de la corriente total de iones (TIC x 10 ⁻⁶) por 100 g de jamón m.s.	78
Tabla 5.1 Concentración de proteína obtenida y tiempos totales de purificación empleados en los procesos de purificación de actomiosina y actina-G. La concentración de proteína se expresa como valor medio ± error estándar.	121

ABREVIATURAS

ATPNa₂: sal disódica de adenosina 5'-trifosfato.

CAR/PDMS: carboxen/poli(dimetilsiloxano).

CG-FID: cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama.

d.i.: diámetro interior.

DTT: ditioneitol.

EDTA: ácido etilendiamino tetraacético.

EGTA: ácido etilen glicol-bis (2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético.

HCR: Hidrocarburo de cadena ramificada.

HSD: diferencia honestamente significativa.

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución.

IMF: grasa intramuscular.

IR: Fiabilidad de la identificación.

KI: Índice de Kovats.

LSD: diferencia mínima significativa de Fischer's.

MS: espectrómetro de masas

m.s.: materia seca.

MUFA: Ácidos grasos monoinsaturados.

PDMS/DVB: polidimetilsiloxano / divinilbenzeno.

PTFE: politetrafluoretileno (Teflón).

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados.

SDS: dodecil sulfato sódico.

SDS-PAGE electroforesis desnaturizante con dodecil-sulfato sódico en geles de poliacrilamida.

SPME: microextracción en fase sólida.

SFA: Ácidos grasos saturados.

TIC: corriente total de iones.

Tris: Tris (hidroximetil) aminometano.

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 MATRIZ PROTEICA DE LA CARNE

1.1.1 COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO

El músculo contiene aproximadamente un 72 % de su peso en agua, un 21 % de proteínas, un 5 % de lípidos, 1 % de cenizas y 1 % de carbohidratos (Kauffman, 2001). Además, el músculo es un tejido especializado formado por células alargadas o fibras que se encuentran agrupadas formando las miofibrillas (figura 1.1 a,b,c) y en las que se pueden distinguir las siguientes partes:

- Sarcolema o membrana celular.
- Fibrillas o elementos estructurales para la contracción, cuyas proteínas se llaman miofibrilares.
- Mitocondrias musculares, que suministran la energía necesaria para la contracción.
- Sarcoplasma que contiene diversas proteínas, llamadas sarcoplásmicas.

Cuando se observan dichas miofibrillas al microscopio, éstas poseen una apariencia estriada debido a la alternancia entre bandas claras y oscuras (Figura 1.1 f). La unidad estructural del músculo, llamada sarcómero, se encuentra entre dos líneas Z consecutivas. La banda I o isotrópica se encuentra a cada lado de la línea Z y esta compuesta por los filamentos delgados constituidos mayoritariamente por una proteína llamada actina. La banda A o anisotrópica tiene dos zonas: una más clara que contiene únicamente los filamentos gruesos y otra zona más oscura que contiene los filamentos gruesos superpuestos con los extremos de los filamentos delgados (Pearson y Youg, 1989).

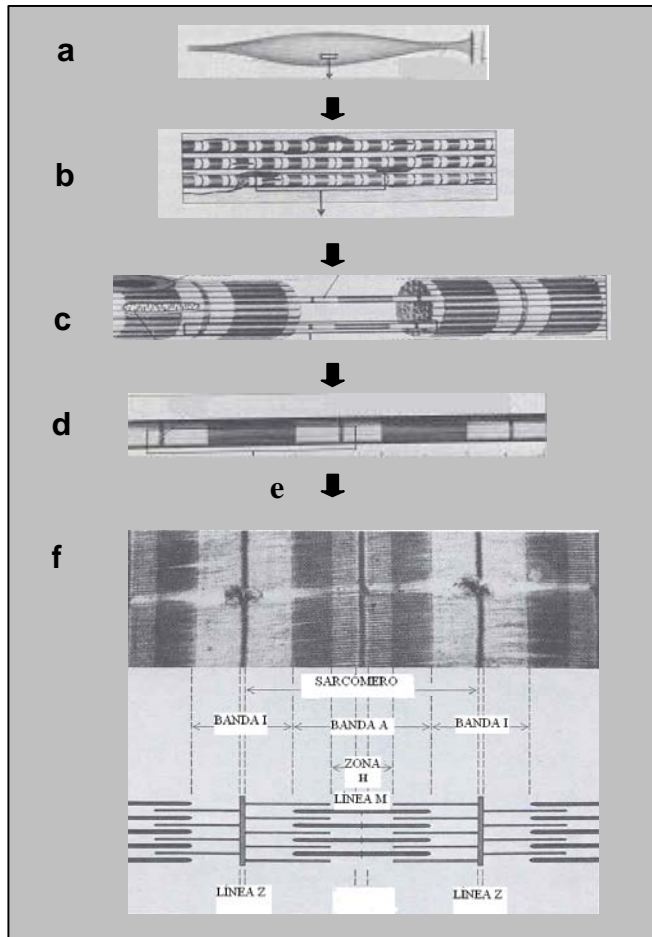


Figura 1.1. Estructura muscular: a) Músculo b) detalle de 3 miofibrillas; c) una fibrilla; d) detalle de una miofibrilla e) sarcómero f) vista al microscopio y esquema de la distribución de un sarcómero. Fuente (Whitaker, 1977).

1.1.2 CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MUSCULARES

Las proteínas musculares pueden dividirse en tres grandes grupos: proteínas sarcoplásmicas, proteínas contráctiles o miofibrilares, y proteínas del estroma.

1.1.2.1 Proteínas sarcoplásmicas

Las proteínas sarcoplásmicas constituyen alrededor del 29 % del total de las proteínas del músculo esquelético (Kauffman, 2001) y corresponden a la fracción soluble a baja fuerza iónica (0,1 o inferior) a pH neutro (Pearson y Young, 1989). Dependiendo de las condiciones usadas para su extracción, esta fracción puede contener entre 100 y 200 proteínas diferentes. Su composición variará según la velocidad y el grado de homogeneización del tejido antes de la extracción, el pH, la naturaleza del solvente utilizado para la extracción y la fuerza centrífuga seleccionada para separar las proteínas sarcoplásmicas (solubles) de la fracción insoluble. La fracción de proteínas sarcoplásmicas contiene las mismas proteínas que se extraen de otras células, es decir, enzimas asociados con la glucólisis y síntesis de carbohidratos y proteínas, junto con otras proteínas exclusivas de la célula muscular, tales como precursores para la síntesis de la miosina y la mioglobina (Whitaker, 1977).

La mioglobina es la proteína más abundante de esta fracción y está formada por una porción proteica, la globina, y una porfirina o grupo hemo que es responsable de su color. Dentro del anillo de porfirina, y en posición central, existe un átomo de hierro que mantiene unido el complejo formado por la globina y el grupo hemo.

El color de la carne dependerá del estado de oxidación de la mioglobina, el tipo de ligando unido al grupo hemo y el estado de la globina. El hierro del anillo de porfirina puede existir en dos formas: como hierro ferroso reducido (+2) o férrico oxidado (+3). Cuando el hierro del grupo hemo está en estado +2 (ferroso) se denomina mioglobina, de color púrpura y es la forma que se

encuentra mayoritariamente en el músculo. Cuando se produce la oxidación de la mioglobina, el átomo de hierro ferroso se convierte en férrico, formándose metamioglobina que es de color marrón. La unión al oxígeno por oxigenación produce oximioglobina dando un color rojo brillante al músculo. La interconversión de las tres formas ocurre fácilmente, dependiendo de las condiciones del medio como la presión parcial de oxígeno, temperatura y pH, produciendo los cambios de color de la carne (Young y West, 2001).

1.1.2.2 Proteínas miofibrilares

Las proteínas miofibrilares constituyen alrededor del 60 % del total del músculo esquelético (Kauffman, 2001). Son las proteínas estructurales que forman las miofibrillas y poseen una solubilidad intermedia entre las proteínas sarcoplásmicas y las del estroma (Pearson y Young, 1989).

Las proteínas miofibrilares, cuya unidad estructural se denomina sarcómero son las responsables de la contracción muscular aunque no todas las proteínas de esta fracción se encuentran directamente relacionadas con la contracción. Por tanto, según su función las podemos dividir en 3 grupos (Pearson y Young, 1989):

- Proteínas contráctiles mayoritarias, incluyen actina y miosina.
- Proteínas reguladoras, juegan un importante papel en la iniciación y control de la contracción y relajación muscular.
- Proteínas del citoesqueleto o estroma, aportan soporte estructural y mantienen las miofibrillas alineadas

En la Tabla 1.1 se muestran las diversas proteínas miofibrilares según los 3 grupos indicados anteriormente, las proporciones relativas de cada proteína en la miofibrilla, su localización en el sarcómero y su función principal.

La miosina y la actina combinadas constituyen el 70 % del total de las proteínas miofibrilares siendo la miosina un 50 % y la actina un 20 % del total.

Tabla 1.1. Composición proteica de las miofibrillas musculares (Pearson and Young, 1989).

Proteína	% del total de proteínas miofibrilares	Localización en el sarcómero	Función principal
PROTEÍNAS CONTRÁCTILES MAYORITARIAS			
Miosina	50	Banda-A filamentos gruesos	Dar soporte a las miofibrillas y ser responsables de la contracción relajación del músculo
Actina	20	Filamentos delgados	
PROTEÍNAS REGULADORAS			
Tropomiosina	3	Filamentos delgados	Regular la contracción Regular la contracción
Troponinas T, C e I	4,5		
α -actinina	1	Disco-Z	Cementa el filamento delgado al filamento-Z en el disco-Z
β -actinina	<0,01	Banda-A final del filamento	Regula la longitud de los filamentos delgados
γ -actinina	<0,01	Filamentos delgado	Inhibe la G-actina
Eu-actinina	0,3	Disco-Z	Polymerización, interacciona con actina y α -actinina para contribuir a la densidad del disco-Z

Tabla 1.1. (Cont)

Proteína	% del total de proteínas miofibrilares	Localización en el sarcómero	Función principal
PROTEÍNAS DEL CITOESQUELETO			
Titina	5-8	Por todo el sarcómero	Mantiene los filamentos gruesos y delgados alineados
Nebulina	3	Banda-I	Une y mantiene los filamentos gruesos y delgados alineados
Proteína-C	1,5	Filamento grueso	Une las moléculas de miosina en los filamentos gruesos
Miomesina o Proteína-M	0,5	Linea-M en el centro de la banda-A	
Desmina	<0,2	Disco-Z	Conecta transversalmente las miofibrillas en el disco-Z
Filamina	0,1	Disco-Z	Transversalmente conecta las miofibrillas en el disco-Z
Vimentina	0,1	Disco-Z	Conecta los discos-Z a la periferia
Sinemina	0,1	Disco-Z	Asociada con la desmina y vimentina
Proteína-X	0,2	Disco-Z	Une los filamentos del disco-Z
Proteína-I	0,1	Filamentos grueso (excepto el centro)	Inhibe la actividad Mg^{2+} -ATPasa de la actomiosina en ausencia de Ca^{2+}
Proteína-F	0,1	Filamento grueso	Une los filamentos gruesos pero su acción es inhibida por la proteína-C
Creatinquinasa	0,1	Linea- M	Une a la proteína-M

Las proteínas reguladoras, aunque no participan directamente en el proceso de la contracción muscular, juegan un papel importante en la modulación de la contracción e inician el movimiento en el músculo esquelético. En este grupo se incluyen la tropomiosina, las troponinas y las actininas. La tropomiosina supone un 3 % del total de proteínas miofibrilares. En el músculo, la tropomiosina se encuentra siempre asociada con la actina y con el complejo de las troponinas.

Por otra parte, las troponinas constituyen el 4,5 % del total de las proteínas miofibrilares (Tabla 1.1). La troponina consiste en 3 subunidades llamadas troponina C, troponina I y troponina T (1,15 %, 1,35 % y 1,95 % respectivamente, del total de las proteínas miofibrilares). La troponina C se llama así porque tiene alta afinidad por el Ca^{2+} libre. La troponina I debe su nombre al hecho de inhibir la interacción de la miosina y la actina en la relajación muscular junto con la tropomiosina, la troponina C y la troponina T. La troponina T recibe este nombre porque se une a la tropomiosina y conecta el complejo troponina C-troponina I a la actina-F. Las subunidades de la troponina juegan un papel importante en el ciclo contracción-relajación.

Las actininas actúan en la regulación de la contracción, aunque menos directamente que la tropomiosina y el complejo de troponinas. La α -actinina es probablemente la más importante del grupo de actininas y comprende el 1 % del total de proteínas miofibrilares. Es el componente mayoritario de la línea-Z y ancla los filamentos delgados de los sarcómeros adyacentes. Las otras actininas presentes en el músculo incluyen las β -actinina, γ -actinina y la Eu-actinina que comprenden menos del 0,01 %, 0,01 % y 0,3 % de las proteínas miofibrilares, respectivamente. La β -actinina se encuentra al final de la banda A de los filamentos delgados y regula su longitud, la γ -actinina se localiza en los filamentos delgados e inhibe la polimerización de la G-actina. La Eu-actinina se encuentra en el disco Z y probablemente no tiene función en la regulación de la contracción pero contribuye a la densidad del disco Z por interacción con la actina y la α -actinina.

Las proteínas del citoesqueleto, el tercer grupo de proteínas miofibrilares aislado e identificado en el músculo, son proteínas estructurales y sirven de soporte a las proteínas contráctiles mayoritarias y a las reguladoras. Este grupo incluye la conectina, proteína-C, miomesina, nebulina, desmina, filamina, vimentina, sinemina, proteína-X, proteína-H, proteína-I, proteína-F y creatinquinasa. La conectina, es un componente de alto peso molecular que constituye el 8 % del total de las proteínas de la miofibrilla. Se encuentra localizada entre los sarcómeros y parece mantener los filamentos gruesos en posición lateral en medio de la banda-A. La proteína-C constituye el 1,5 % de las proteínas miofibrilares y une las moléculas de miosina en los filamentos gruesos, aunque está situada en los filamentos delgados. El resto de proteínas constituyen menos del 1 % de las proteínas miofibrilares. Sus funciones y localización se recogen en la Tabla 1.1.

1.1.2.2.1 Miosina

La miosina es el principal constituyente de los filamentos gruesos y está constituida por una cabeza globular con un peso molecular de alrededor de 480 kDa y una longitud de unos 1600 Å. Está formada por dos cadenas idénticas de polipéptidos de unos 225 kDa que pueden separarse tratando la miosina con disoluciones concentradas de urea o guanidina (Pearson y Young, 1989). Cada una de las cadenas posee una estructura de α -hélice y, a su vez, se enrollan formando una doble hélice. Al final de la molécula de miosina, ambas cadenas se pliegan en una estructura globular formada por dichas cadenas mas dos cadenas de polipéptidos más pequeñas (Pearson y Young, 1989).

A partir de los estudios de fragmentación enzimática se ha obtenido información muy importante sobre la estructura de la miosina y su actividad ATPasa. La exposición de la miosina a tripsina o quimotripsina da lugar a dos fragmentos llamados meromiosina pesada y meromiosina ligera (HMM y LMM). La meromiosina ligera no tiene actividad ATPasa ni capacidad de

unión a la actina. La meromiosina pesada tiene actividad ATPasa y capacidad de unión a la actina pero no forma filamentos. El tratamiento con tripsina de la meromiosina pesada da lugar a dos subfragmentos llamados HMM-S1 y HMM-S2. El subfragmento 1 tiene actividad ATPasa y capacidad de unión a la actina mientras que el fragmento 2 no tiene estas características, lo cual indica que dicha actividad reside enteramente en su cabeza y que hay dos sitios catalíticos por molécula de miosina (Whitaker, 1977).

1.1.2.2.2 Actina

La actina es el mayor constituyente de los filamentos delgados y supone el 20 % de las proteínas miofibrilares (Asghar, 1985). La actina puede encontrarse en dos formas, actina-G (actina globular) y actina-F (actina filamentosa) que se obtiene por la polimerización de la actina-G. La forma monomérica (actina-G) es estable en agua destilada, pero bajo ciertas condiciones polimeriza formando actina-F (Whitaker 1977).

1.1.2.2.3 Actomiosina

Durante la contracción muscular se produce la unión de los filamentos de actina y de miosina formando el complejo actomiosina. También, en procesos *in vitro* en los que se ponen juntos miosina y actina se forma dicho complejo. Su formación va acompañada de un aumento de la viscosidad de la solución (Morrissey, 1987).

La composición y el peso molecular de la actomiosina dependen mucho de las condiciones experimentales, tales como el pH y las concentraciones de KCl, MgCl₂ y proteína (Morrissey, 1987). Los complejos de actomiosina pueden ser extraídos del músculo por exposición prolongada a 0,6 M de KCl. Una propiedad de los complejos de actomiosina es que se disocian en presencia de ATP y Mg²⁺ y, cuando esto ocurre, la disociación va acompañada por una disminución rápida y elevada de la viscosidad de la

solución y por la hidrólisis del ATP. Cuando la hidrólisis se completa, la actina y la miosina se reagregan por la interacción de los grupos sulfhidrilos que parecen ser los responsables tanto de la actividad ATPasa de la miosina como de su capacidad de unión a la actina (Lehninger, 1970).

1.1.2.3 Proteínas del estroma

Las proteínas del estroma suponen el 10-15 % del total de proteínas en el músculo esquelético (Morissey et al., 1987) y constituyen la fracción insoluble (en solventes acuosos neutros y disoluciones diluidas de sal) de las proteínas de la célula muscular. La mayoría de las proteínas del tejido conectivo se clasifican como fibrosas y consisten en cadenas de polipéptidos dispuestos paralelamente unas a otras formando láminas o fibras. Son las encargadas de aportar dureza, dar forma y proteger el músculo esquelético (Pearson y Young, 1989).

Las principales proteínas del tejido conectivo son el colágeno, la elastina y la queratina. Junto con estas proteínas existen otras, que se encuentran unidas covalentemente a los carbohidratos y se denominan glicoproteínas. Aunque el porcentaje de la composición puede variar ampliamente dependiendo de la fuente del músculo, el colágeno frecuentemente supone el 95 % del total de las proteínas del estroma y la elastina supone el 5 % de la proteína total del estroma (Kauffman, 2001).

1.1.3 PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES MAYORITARIAS

1.1.3.1 Purificación de la miosina

En la mayoría de los casos, la extracción de miosina se realiza a partir de músculo en pre-rigor aunque algunos autores realizan la extracción a partir de músculo post-rigor (Dudziak y Foegeding, 1988).

Aunque el método utilizado para la purificación depende de la cantidad de tejido muscular disponible y del grado de pureza deseado, se suele iniciar con la eliminación de las proteínas sarcoplásmicas (solubles a baja fuerza iónica) mediante un lavado con tampón a pH neutro de fosfato diluido. Posteriormente, se realiza la extracción de la miosina basada en la solubilidad de ésta a alta fuerza iónica. Las disoluciones más utilizadas para extraer miosina son modificaciones de la disolución de Guba–Straub (KCl 0,3M, KH_2PO_4 0,1M, K_2HPO_4 0,05 M, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 4 mM, EDTA 1 mM pH= 6,5) (Hermansson, 1986) y Hasselback-Schneider (KCl 0,6M, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ 10 mM, MgCl_2 1 mM, EGTA 20 mM, KH_2PO_4 0,1 M a pH= 6,4) (Dudziak y Foegeding, 1988). La adición de EDTA o EGTA se realiza para eliminar los metales pesados y proteger así la actividad enzimática de la miosina (Syrový, 1984). En algunas modificaciones se han añadido DTT 1mM o β -mercaptoetanol 2 mM debido a la susceptibilidad de la miosina a la oxidación. Asimismo, para obtener una mayor purificación de la miosina se puede realizar un fraccionamiento con sulfato amónico y posterior separación cromatográfica (Syrový, 1984).

Macfarlane et al, (1976) ensaya el uso de altas presiones para aumentar la solubilidad de las proteínas miofibrilares y concluye que la desnaturalización que sufren las proteínas depende del tiempo que se aplica la presión y la temperatura que se utiliza. También observan que en la extracción influyen otros factores como el tipo de sal usado, la concentración de la disolución y el pH. En 1992, Murch utiliza la técnica de HPLC para extraer miosina y otras proteínas solubles a alta concentración de sal a partir de músculo de cerdo para lo cual utiliza, como fase móvil, disoluciones con alta fuerza iónica y una bomba resistente a altas concentraciones de sal.

1.1.3.2 Purificación de la actina

El método clásico para aislar actina consiste, primero, en la eliminación de la miosina y otras proteínas musculares mediante una extracción con

una disolución a alta fuerza iónica. Posteriormente, se rompen los enlaces intermoleculares de la actina-F y finalmente, se extrae la actina-G. Por tanto, la purificación de la actina se puede dividir en dos: primero, la preparación del polvo de acetona y segundo, la extracción de la actina-G. Para la obtención del polvo de acetona, el músculo picado se extrae primero con una solución de alta fuerza iónica. Después de lavar el residuo obtenido con agua, se trata varias veces con acetona y posteriormente se seca, obteniéndose el polvo de acetona que es estable almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Pardee y Spudich, 1982). No obstante, se puede utilizar acetona o yoduro potásico para romper los enlaces sin desnaturalizar la actina (Syrový, 1984).

La extracción de la actina-G se realiza por extracciones sucesivas con el tampón A (Pardee y Spudich, 1982): tampón Tris-HCl 2 mM a pH 8,0 con ATPNA₂ 0,2 mM, 2-mercaptoetanol 0,5 mM, CaCl₂ 0,2 mM y NaN₃ al 0,005 % (p/v).

Mediante la técnica de electroforesis se demuestra que durante la purificación de la actina se obtiene un extracto contaminado con algunas proteínas asociadas a las proteínas del músculo como la tropomiosina y la α -actinina por lo que el proceso de purificación continúa con ciclos de polimerización y despolimerización para eliminar las contaminaciones de tropomiosina (Pardee y Spudich, 1982). El producto final puede guardarse como solución de actina-F o como pellets de actina-F.

A partir de este método se han desarrollado distintos protocolos de extracción de actina, dependiendo del grado de pureza que se quiera conseguir y el uso que se le vaya a dar a la proteína. Las variaciones introducidas se centran fundamentalmente en las disoluciones de extracción, en las velocidades de centrifugación utilizadas y en el proceso utilizado para conseguir una mayor purificación (Tabla 1.2).

TABLA 1.2. Métodos de extracción de la actina.

ORIGEN	MÉTODO	TAMPÓN DE EXTRACCIÓN	TÉCNICAS POSTERIORES PARA UNA MAYOR PURIFICACIÓN	REFERENCIA
Pescado	"Polvo de acetona": Carsten y Mommaerts (1963) G-actina: Aldstein y Knehl's, 1970	ATP 0,5 mM, CaCl ₂ 0,1 mM y 2-mercaptoetanol 0,75 mM pH 7,5	Polimerización y despolimerización mas cromatografía en Sephadex G-200	Soliman et al., (1975)
Conejo	Straub (1942) modificado	G-actina del polvo de acetona con ATP 0,2 mM, ascorbato 0,2 mM a pH 8,3		Taniguchi, (1976)
Conejo	Spudich y Watt, (1971)	Tampón A: Tris-HCl 2 mM, ATPNa ₂ 0,2 mM, 2-mercaptoetanol 0,5 mM CaCl ₂ 0,2 mM, Na ₂ S 0,005%, pH 8 a 25 °C	-Cromatografía de intercambio iónico (DE-52 Whatman) -Ciclos de polimerización-despolimerización (basado en le diferente velocidad de despolimerización de la actina unida a contaminantes o libre) -Cromatografía en gel (Sephadex G-150)	Pardee y Spudich, (1982)
Conejo	Spudich y Watt, (1971)	Tampón A: DTT 0,5 mM en lugar de β-mercaptoetanol	Cromatografía en gel	Janmey et al (1986)
Pescado Conejo	Modificación de Ebasi (1976)	Solución D: KCl 0,8 M, β-mercaptoetanol 5 mM, Mg(CH ₃ COO) ₂ 0,2 mM pH 8,1		Martone (1986)
Conejo	Pardee y Spudich (1982) Newman (1985)	Tampón A (En función del uso de la actina se añaden otros reactivos)	Cromatografía en gel con Sephadex G-150 Cromatografía en gel con Sephacryl S-300	Zaner (1988)
Conejo	Spudich y Watt, (1971)	Tampón A con DTT	Sephadex G-150	Janmey et al (1988)
Cerdo	Spudich y Watt, (1971)		3 ciclos de polimerización – despolimerización Cromatografía en gel con Sephacryl S-200	Zarkadas, (1988)

TABLA 1.2. (Cont)

ORIGEN	MÉTODO	TAMPÓN DE EXTRACCIÓN DE ACTINA	TÉCNICAS POSTERIORES PARA UNA MAYOR PURIFICACIÓN	REFERENCIA
Pescado	Spudlich y Watt. 1971	Tampón A con DTT	Cromatografía en gel con Sephadex G-200 y DEAE-Sephadex A-50	Jiang, (1989)
Conejo	"Polvo de acetona": Szent-Gyorgyi (1951) G-actina: Spudlich y Watt (1971)		Cromatografía en gel con Sephadex G-150	Newman, (1993)
Pollo	"Polvo de acetona": Feuer (1948) G-actina: Spudlich y Watt (1971)	Tampón A	Polimerización de la actina-G	Wang y Smith (1994)
Conejo	"Polvo de acetona": Straub (1943) con la modificación de Aisdein (1963) y Eichinger et al. G-actina: Mc Lean-Fletcher y Pollard (1980) (modificación de Spudlich y Watt (1971)	G1: ATP 0,2 mM, DTT 0,5 mM, CaCl ₂ 0,1 mM, NaN ₃ 1 mM, Tris-HCl 2 mM pH 8,0 a 25 °C G2: ATP 0,5 mM, DTT 0,5 mM, CaCl ₂ 0,2 mM, Tris-HCl 2 mM pH 8,0 a 25 °C	Cromatografía en gel Sephacryl S-300 en vez de Sephadex G-150.	Xu et al, (1989)
Conejo	Spudlich y Watt. (1971)	Tampón A con DTT 0,5 mM	Cromatografía en gel Sephacryl S-200 o Superose 6B	Jamney et al (1994)
Conejo	Spudlich y Watt. (1971)	Tampón A con DTT 0,5 mM	Cromatografía en gel con Sephacryl S-300	Adriamontobandiro, (2001)

1.2 GENERACIÓN DEL AROMA Y SABOR DEL JAMÓN CURADO

El jamón curado es un producto cuyo proceso de fabricación consiste en diversas etapas, iniciándose con el salado, donde la sal y otros agentes de curado comienzan a difundir lentamente hacia el interior de la carne, seguido del posterior post-salado y finalmente, se realiza el secado, etapa esencial para el desarrollo del aroma y sabor típico de estos productos cárnicos. Esta etapa del proceso varía en tiempo y temperatura según el tipo de jamón. Así por ejemplo, los Ibéricos necesitan entre 18 y 24 meses mientras que el jamón Serrano se obtiene en unos 9-12 meses (Toldrá y Flores, 1998). Dentro de este último tipo de jamón, la duración total del proceso permite distinguir entre dos tipos: los procesos de corta duración, en los que la etapa de secado dura menos de 6 meses y los procesos de larga duración, en los que dicha etapa es superior a 9 meses (Arnau, 1987).

1.2.1 DEGRADACIÓN PROTEICA EN EL CURADO

Durante el curado tienen lugar numerosas y complejas reacciones en la estructura muscular, entre ellas se observa una intensa proteólisis, debido a que las enzimas proteolíticas del músculo permanecen activas durante el proceso (Rodríguez-Nuñez et al., 1995; Hansen-Moller et al., 1997; Toldrá et al., 1997). Dicha proteólisis muscular implica la degradación de las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares del músculo por la acción de las enzimas musculares: catepsinas B, D, H y L, que se encuentran localizadas en los lisosomas y, por otra parte, las calpaínas que son activas sólo en la fase inicial del curado (Toldrá y Flores, 1998). El último paso de la proteólisis consiste en la generación de aminoácidos libres por la acción de las aminopeptidasas que también son estables durante el proceso (Toldrá y Flores, 1998). En los procesos de corta duración, los fenómenos de proteólisis son más rápidos que en los de larga duración, debido a que la

actividad catepsínica se ve favorecida por el incremento de la temperatura del proceso (Arnau et al., 1987).

Este proceso de proteólisis se ha estudiado ampliamente (Toldrá et al., 1993; Rodríguez-Nuñez et al., 1995; Flores et al., 1997a,b) utilizando diferentes técnicas como la electroforesis capilar o la cromatografía de filtración en gel, en las que se separan los péptidos obtenidos. En 1993, Toldrá et al., comparan los patrones electroforéticos de diferentes etapas del proceso de curado del jamón. Estos autores observan la desaparición de la cadena pesada de miosina así como las cadenas ligeras I y II, las troponinas C e I y la aparición de fragmentos con pesos moleculares de 150, 95 y 16 kDa junto con numerosos fragmentos en las regiones de 50 a 100 kDa y de 20 a 45 kDa lo que indica que se produce una intensa proteólisis. Posteriormente, Rodríguez-Nuñez et al. (1995), mediante cromatografía de filtración en gel obtienen los mapas peptídicos de las diferentes etapas del proceso, separando distintas fracciones de péptidos: 4,5-2,7 kDa (I), 2,7-1,2 kDa (II), 1,2-0,5 kDa (III), 0,5-0,375 kDa (IV) y 0,375-0,160 kDa (V). Estos autores observan un aumento general de las fracciones de bajo peso molecular III-V y un descenso para las de alto peso molecular (I) a partir de los 3 meses y medio de curado. Por otra parte, otros autores han estudiado la generación de aminoácidos durante el proceso de curado observando un incremento de los mismos (Toldrá et al., 1993; Flores et al., 1997a; Sentandreu et al., 2001). Los aminoácidos que experimentan un mayor incremento son el Glu, Asp, Ala, Leu, Lys y Val (Toldrá et al., 1993) aunque (Flores et al., 1997a) también encuentran una disminución en Tau, Asn y Gln. Asimismo, estos aminoácidos generados en la proteólisis se correlacionan con sabores específicos del jamón, como el sabor salado del Glu, el sabor a añejo de la Tyr y Lys o el sabor ácido de la Leu (Careri et al., 1993). En 2003, Sentandreu et al., separan 6 fracciones peptídicas cuya composición de aminoácidos es mayoritariamente Gly, Ser y Met y cuyo análisis sensorial revela que poseen aroma y sabor típico a jamón curado.

1.2.2 DEGRADACIÓN LIPÍDICA EN EL CURADO

La oxidación lipídica es un proceso complejo donde, en primer lugar, se forman los compuestos peróxido por el mecanismo de radicales libres y posteriormente se producen las reacciones secundarias que dan lugar a un gran número de compuestos volátiles, como los hidrocarburos aromáticos, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos y ésteres (Frankel, 1972). Los compuestos específicos que se forman dependen de la estructura del ácido graso precursor, la posición del grupo hidroperóxido en la molécula, así como del lugar donde ocurre la escisión y de las reacciones posteriores sufridas por el radical. Además, se cree que el aroma y sabor característicos de la carne de las diferentes especies animales es debida a la diferente composición lipídica, siendo los aldehídos, como productos mayoritarios de la degradación de los lípidos, los que están probablemente implicados en las características organolépticas de ciertas especies. Así, la alta proporción de ácidos grasos insaturados en los triglicéridos de cerdo y pollo, comparados con los de cordero y ternera, dan lugar a una proporción más elevada de aldehídos volátiles insaturados en las primeras que en las segundas especies animales, siendo importante en las características aromáticas de cada una de estas especies (Mottram, 1998). Los aldehídos saturados e insaturados con 6-10 átomos de carbono son los mayores componentes de las carnes cocinadas y además, juegan un papel importante en el aroma de la carne, que en el caso de estos compuestos se describe como “verde” y “graso” (Mottram, 1998).

Por otra parte, el umbral de percepción de estos compuestos volátiles generados en la oxidación lipídica, en general, es mucho más alto que el de los compuestos azufrados y los compuestos heterocíclicos con nitrógeno que proceden de la degradación de precursores presentes en la carne y que además son hidrosolubles (Mottram, 1998; Forss, 1972).

1.2.3 COMPUESTOS RESPONSABLES DEL AROMA DEL JAMÓN CURADO

La generación de los compuestos volátiles típicos del jamón curado se ha correlacionado con la iniciación de la oxidación lipídica y la degradación que sufren los aminoácidos procedentes de la intensa proteólisis que se produce en el músculo especialmente en procesos largos de curado (Toldrá et al, 1997; Toldrá y Flores, 1998; Dirinck et al.,1998). Dentro de los compuestos responsables del aroma se han identificado decenas de compuestos siendo los grupos más abundantes los hidrocarburos, aldehídos y alcoholes, aunque también existen otros compuestos como cetonas, ácidos grasos libres, γ -lactonas y ésteres (Möhler, 1982) . En particular, el aroma del curado ha sido relacionado con la presencia de aldehídos ramificados con grupos metilo, alcoholes secundarios, metil-cetonas, etil ésteres y el dimetil trisulfuro (Hansen-Moller et al, 1997; Carrapiso et al., 2002a,b).

Dentro del grupo de los hidrocarburos se han identificado más de 60 compuestos procedentes preferentemente del desdoblamiento oxidativo de ácidos grasos (Möhler, 1982). En general, los alcanos no poseen ningún poder aromático (Shahidi et al, 1986) por lo que no contribuyen significativamente al aroma y sabor de la carne. Sin embargo, en el jamón Serrano los hidrocarburos aromáticos como el m- y p- xileno poseen un aroma descrito como “ahumado fenólico”, mientras que el o-xileno se describe como aroma a “caramelo-frutal” (Flores et al., 1997c) .

Los alcoholes son en su mayor parte productos de oxidación de los lípidos (Shahidi et al, 1986). Dentro de este grupo se identifican más de 16 de ellos como, por ejemplo, 1-propanol y 1-butanol que podrían derivar del ácido miristoleico, el 1-pentanol del ácido linoleico, el 1-hexanol se podría formar a partir de los ácidos palmitoleico y oleico y el 1-octanol de la oxidación del oleico (Forrs, 1972). En cambio, los alcoholes ramificados, como el 2-metil-propanol, 2-metil-butanol y 3-metil-butanol derivan de los aminoácidos (Ruiz et al., 1999). En cuanto a su influencia en el aroma, ésta

es menor que la de otros compuestos carbonilo como los aldehídos debido a que el umbral de percepción de los alcoholes es más elevado (Drum y Spanier, 1991). Sin embargo, en carne de cerdo se considera que los alcoholes de cadena lineal producen ciertas notas “verdes”, “a madera” y a “grasa-floral” y tienen una contribución importante en el aroma de jamón (Barbieri et al., 1992). En este sentido, en jamón Ibérico, Serrano, Parma y Bayona se encuentran alcoholes insaturados como 1-penten-3-ol y 1-octen-3-ol, de alta potencia aromática.

Los aldehídos constituyen una de las familias más importantes en el análisis cuantitativo de compuestos volátiles presentes en el jamón curado (Sabio et al, 1998; García et al 1991; López et al., 1992) debido a su bajo umbral de percepción (Shahidi et al, 1986). En cuanto a su origen, los aldehídos lineales como el hexanal, heptanal, octanal y nonanal provienen principalmente de la degradación oxidativa de los ácidos grasos oleico, linoleico, linolénico y araquidónico, respectivamente (Lopez et al., 1992). Por otra parte, los aldehídos ramificados y aromáticos como 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, 4-metil-2-pentenal y fenilacetaldehído, podrían provenir de la degradación de Strecker de los aminoácidos (García et al, 1991; López et al, 1992). En cuanto a su contribución al aroma, los aldehídos con un bajo número de átomos de carbono (C_3 - C_4) poseen un aroma fuerte e irritante; los aldehídos intermedios (C_5 - C_9) dan un olor descrito como “verde”, “aceite”, “grasa” y por último, los aldehídos de cadena larga (C_{10} - C_{12}) tienen un olor a “cítrico” o “cáscara de naranja” (Forss, 1972). Los compuestos derivados de aminoácidos como 2-metil-butanal, 3-metil-butanal y 2-metil-propanal, realizan una importante contribución al aroma de jamón curado (Hirinchsen y Pedersen, 1995) y, concretamente en el jamón Serrano, el aroma de 3-metil-butanal se ha descrito como a “queso-verde” (Ruiz et al, 1999).

Las cetonas se forman por oxidación lipídica (Shahidi et al., 1986). En el jamón Serrano, la 3-hidroxi-2-butanona ha sido identificada como responsable del olor a “fresa” y la 2,3-butanodiona como responsable de notas a “mantequilla” (Flores et al, 1997c). En otros jamones, como en el

francés, la presencia de 2-butanona, 2-pentanona y 2-hexanona, ha sido correlacionada con el aroma a jamón curado y la presencia de 2-hexanona y 2-heptanona con el aroma a carne curada (Buscaillon et al, 1994).

Los ácidos carboxílicos provienen de la hidrólisis de triglicéridos y fosfolípidos y las enzimas responsables de estos procesos permanecen activas durante el proceso de curado (Motilva et al, 1993). El perfil de ácidos encontrado depende mucho del método de extracción utilizado. Así, Timón et al. (1998) extraen 15 ácidos carboxílicos del jamón Ibérico con dióxido de carbono supercrítico, mientras que cuando la extracción se realiza con SPME (microextracción en fase sólida) se identifican entre 4 y 10 compuestos dependiendo de la fibra utilizada (Ruiz et al., 1998a) y con purga y trampa se extraen 7 ácidos carboxílicos (López et al., 1992).

Las lactonas resultan de la degradación de lípidos por la formación de compuestos cíclicos a partir de los correspondientes hidroxiácidos que son sub-productos del metabolismo de los ácidos grasos (Forrs, 1972). En el jamón se identifican la presencia de algunas lactonas, entre ellas, las γ -lactonas con un bajo umbral de percepción (Ruiz et al., 2002) y asociada con el aroma a "carne" (Shahidi et al., 1986).

Los ésteres se forman a partir de la interacción de los ácidos grasos libres y los alcoholes generados durante la oxidación lipídica en el tejido intramuscular (Shahidi et al, 1986). En el espacio de cabeza de jamón Serrano se encuentran ésteres de ácidos entre 1 y 10 átomos de carbono que contribuyen con ciertos aromas "frutales" como el metil-2-metil propanoato, el etil butanoato, etil 2-metilbutanoato y se describen con aroma a "caramelo-dulce". Por otra parte, el metil hexanoato es el único éster encontrado en jamón Serrano con aroma a "carne cocida" (Flores et al., 1997c).

Los furanos se forman a partir de la oxidación de ácidos grasos y contribuyen al olor a carne cocinada (Shahidi et al., 1986). El 2-pentil-furano, es un producto de la oxidación del ácido linoleico (Ruiz et al., 2002), se identifica, entre otros, en jamón Serrano donde se describe con aroma a "jamón" (Flores et al, 1997c).

La potencia aromática de los compuestos cíclicos nitrogenados es muy importante en la percepción total, ya que la mayoría de ellos tienen un bajo umbral de percepción (Ruiz et al., 2002). Los compuestos de esta clase sólo aparecen en parte preformados en la carne y la mayoría se forman generalmente al calentar. En carne se han hallado más de 50 (Möhler, 1982) siendo los grupos fundamentales el pirrol, pirazol y pirazina. Las pirazinas son consideradas como componentes clave en los alimentos por impartir ciertas notas de aroma a “frutos secos” y “tostado” (Barbieri et al., 1992). En los estudios realizados para identificar compuestos volátiles en jamón curado, las pirazinas identificadas en jamón Serrano son la metilpirazina asociada a aroma a “frutos secos” y la 2,6-dimetilpirazina con aroma a “frutos secos tostados” (Flores et al., 1997c).

Los compuestos volátiles con azufre se forman a partir de aminoácidos azufrados como la cisteína, la cistina y la metionina por la reacción de degradación de Strecker (Shahidi et al., 1986). Estos compuestos son los más sobresalientes del aroma de la carne (Möhler, 1982) porque poseen un bajo umbral de percepción (Chang y Petersen, 1977; Drumm y Spanier, 1991). Algunos compuestos de este grupo, encontrados en jamón curado, son el metional (3-metil-tio-propanal) con aroma a “patata cocida” (Ruiz et al., 2002) y el dimetil-disulfuro descrito como “aroma a pies”, el cual disminuye en el proceso de curado (Flores et al., 1997c).

Finalmente, en el jamón Serrano sólo se detectan tres compuestos clorados: 2-cloronaftaleno, 2-diclorometano, triclorometano (Flores et al., 1997c; Dirinck et al., 1997) aunque el origen de estos compuestos podría ser los residuos de pesticidas ingeridos por los cerdos (Buscailhon et al., 1993).

1.3 INTERACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS CON LOS COMPUESTOS VOLÁTILES

1.3.1 INTERACCIÓN

La interacción se define como la unión molecular existente entre un compuesto aromático y una proteína. A escala macroscópica se expresa como una modificación del equilibrio termodinámico que contribuye a las propiedades físico-químicas como la volatilidad o la solubilidad de estos compuestos aromáticos (Lubbers et al., 1998).

Dicha unión puede ser de dos tipos: adsorción física reversible, vía interacción de Van der Waals, donde las fuerzas de interacción son relativamente débiles y reacción química, vía unión covalente o hidrostática, donde se forman fuertes uniones químicas, incluyendo sales, amidas, ésteres con grupos amino o tiol (Fischer et al., 1997; Leland, 1997). Así, en el caso de los aldehídos y cetonas unidos a los grupos amino de las proteínas, la interacción se produce por uniones covalentes y son irreversibles; los puentes de hidrógeno sirven de unión entre los compuestos volátiles polares como los alcoholes y las proteínas, mientras que los compuestos no polares interaccionan mediante uniones hidrofóbicas. Además, otro mecanismo de interacción es la formación de complejos de inclusión con los compuestos volátiles (Le Thanh et al., 1992).

1.3.2 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN PROTEÍNA-VOLÁTIL

El estudio de la interacción entre las proteínas y los compuestos volátiles se ha realizado con proteínas vegetales de soja (Damodaran y Kinsella, 1981 a,b; Chung y Villota, 1989) y de guisante (Heng et al., 2004), así como con proteínas animales como la β -lactoglobulina (Jounne y Crouzet, 2000a,b; Guichard, 2002; O'Neill y Kinsella, 1987), albúmina de suero bovino (Damodaran y Kinsella, 1980) y actomiosina de pescado (Damodaran y Kinsella, 1983). Asimismo, se ha estudiado la interacción entre compuestos volátiles y pequeños componentes del tejido muscular

como los dipéptidos carnosina y anserina (Zou y Decker, 1999; Gianelli et al., 2003).

Para el estudio de la interacción proteína-volátil se han empleado distintos métodos siendo los más utilizados los que se basan en el equilibrio (Jouenne y Crouzet, 2001). Sin embargo, algunos autores han utilizado la espectroscopía de fluorescencia para medir la interacción (Dufour et al., 1990) basándose en los cambios conformacionales que la unión de los compuestos volátiles originan en las proteínas provocando un cambio en la emisión de fluorescencia.

Dentro de los métodos basados en el equilibrio se pueden distinguir, según la manera en que se alcanza dicho equilibrio, los dinámicos y los estáticos (Figura 1.2).

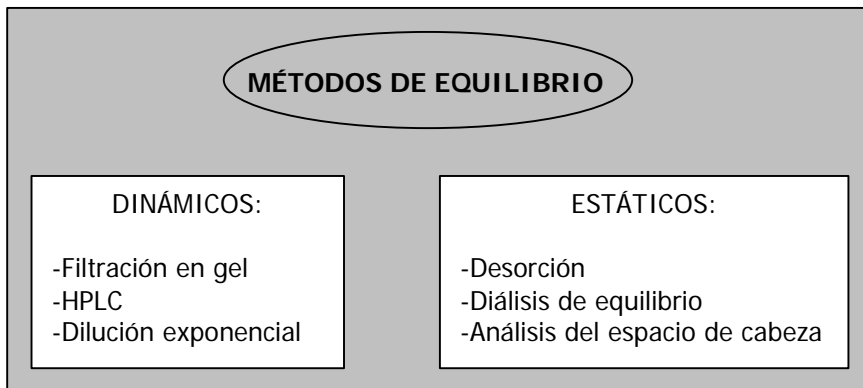


Figura 1.2. Clasificación de los métodos de equilibrio para el estudio de la interacción.

Dentro de los dinámicos se encuentran: la filtración en gel, la cromatografía líquida y la dilución exponencial (Jouenne y Crouzet, 2001). La técnica de HPLC ha sido utilizada para el estudio de la interacción de la "vainillina" con proteínas vegetales (NG et al., 1989) y con proteínas lácteas (Mcneill et al., 1993). Pelletier et al. (1998), utiliza dos técnicas cromatográficas (cromatografía de filtración en gel y cromatografía de afinidad) para el estudio de la interacción entre la β -lactoglobulina y los

compuestos volátiles. Por otra parte, la dilución exponencial ha sido utilizada para el estudio de la interacción de diferentes compuestos volátiles con el caseinato de sodio (Landy et al., 1997) y la β -lactoglobulina (Jouenne y Crouzet, 2000a).

Por otra parte, dentro de aquellos métodos en los que el equilibrio se alcanza de manera estática se encuentran la desorción, la diálisis de equilibrio y el análisis del espacio de cabeza. Así, Le Thanh et al. (1992), combina la técnica de desorción y de espacio de cabeza para estudiar la interacción entre compuestos volátiles y distintos compuestos no volátiles (carbohidratos y caseinato de sodio). Por otra parte, Damodaran y Kinsella, (1981a,b) utilizan el método de la diálisis de equilibrio para el estudio de la interacción proteína-volátil. En este método, el equilibrio se alcanza entre dos celdas separadas por una membrana que separa una disolución que contiene la proteína y otra disolución que contiene el compuesto volátil.

Asimismo, las técnicas de análisis del espacio de cabeza se dividen en dos grandes categorías: espacio de cabeza estático y espacio de cabeza dinámico (Wampler, 1997). En cada caso, sin embargo, el principio fundamental es el mismo. Los analitos volátiles, que forman parte de un material sólido o líquido, se muestrean de la atmósfera adyacente a la muestra, dejando la muestra intacta. Dentro de estas técnicas, la microextracción en fase sólida (SPME) es una técnica relativamente nueva y se utiliza para el estudio de la interacción entre diversas proteínas y compuestos volátiles (Adams et al., 1999; Elmore et al., 1997 y Gianelli et al., 2003).

La concentración del analito en la fibra de SPME depende del equilibrio entre tres fases: el recubrimiento líquido polimérico de la fibra, el espacio de cabeza y la matriz (Zhang et al., 1993). En esta técnica, la selección de la fibra de SPME dependerá del compuesto a analizar, de su polaridad y su peso molecular (Gianelli et al., 2002b). Los compuestos volátiles o de bajo peso molecular generalmente requieren una fibra cubierta con 100 μm de polidimetilsiloxano (PDMS). Los compuestos semivolátiles de mayor peso molecular, se extraen mejor con la PDMS 7 μm (Gianelli et

al., 2002b). Para extraer analitos polares en muestras polares es mejor usar una fibra recubierta con poliacrilato de 85 μm (Zhang et al., 1993). Otras fibras son bi-polares como la polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB) y la carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS). El recubrimiento de CAR/PDMS extrae en mayor medida compuestos de bajo peso molecular, aunque las moléculas pequeñas se analizan mejor usando recubrimientos porosos como los de las fibras Carboxen o DVB. Los mejores resultados para analitos de masa molecular media y alta se obtienen con la PDMS/DVB (Dufour et al., 2001).

Por otra parte, la cuantificación del grado de interacción entre la proteína y el compuesto volátil tras la utilización de los métodos basados en el análisis del espacio de cabeza se consigue analizando la señal que se obtiene con un detector cromatográfico (FID, MS) ya que su respuesta es proporcional a la cantidad de analito en la muestra. Con estas cantidades (áreas) se calcula la proporción relativa respecto a un control (que no contiene proteína) o se aplica una ecuación matemática para la medida de interacción (Gianelli et al., 2003).

En este sentido, la ecuación de Scatchard (1949) representa la unión no covalente y reversible de los compuestos volátiles responsables del aroma de los alimentos con las proteínas y se expresa como:

$$v/[L] = nK - vK$$

donde “v” es el número de moles unidos por mol de proteína, [L] es la concentración molar de ligando libre, “n” es el número total de sitios de unión en la proteína y “K” es la constante intrínseca de unión. De acuerdo con esta ecuación, al representar [L] vs v se obtiene una línea recta cuya pendiente es (-K) y el corte con el “eje y” (nK) de donde es posible calcular n y K. Basándose en esta ecuación diversos autores han representado la interacción entre los compuestos volátiles y las proteínas utilizando diversas aproximaciones matemáticas (Kinsella, 1990; Landy et al., 1995; Okeefe et al., 1991).

1.3.3 FACTORES QUE AFECTAN A LA INTERACCIÓN PROTEÍNA-VOLÁTIL

Las proteínas están plegadas en una estructura tridimensional mediante uniones covalentes y no covalentes como puentes disulfuro, puentes de hidrógeno, o interacciones dipolo-dipolo. Los aminoácidos hidrofóbicos se encuentran localizados principalmente en el interior de la molécula, mientras que los aminoácidos polares se encuentran en la superficie de la proteína (Lubbers et al., 1998). La región interna de la proteína, aún siendo hidrofóbica, puede constituir el principal sitio de unión para los ligandos no-polares (Lubbers et al., 1998).

La distribución específica de las regiones hidrofóbicas e hidrofílicas en la proteína determina su conformación, estructura superficial y características físicas. En los alimentos, aquellos factores que modifican la conformación de las proteínas tienen una influencia considerable en la interacción con los compuestos volátiles y por tanto, los principales factores que afectan a la interacción proteína-volátil son (Fisher et al., 1997):

- Naturaleza proteica.
- Naturaleza del compuesto volátil.
- Fuerza iónica del medio.
- Concentración de otros componentes del alimento.
- Temperatura.
- pH.

Todos estos factores han sido estudiados utilizando tanto sistemas modelo como distintas proteínas como las de soja, la ovoalbúmina, la β -lactoglobulina y distintos componentes del músculo esquelético (Tabla 1.3).

Tabla 1.3 .Factores que afectan a la interacción proteína-volátil

FACTOR	PROTEÍNA	FUENTE
Naturaleza proteica (conformación)	Soja	Damodaran y Kinsella, 1981a
	Ovoalbúmina	Adams et al., 2001
	β -lactoglobulina	Jouenne y Crouzet, 2000b
Naturaleza del compuesto volátil	Soja	Damodaran y Kinsella, 1981b
	Actomiosina de pescado	Damodaran y Kinsella, 1983
	Músculo esquelético	Zhou y Decker, 1999
Fuerza iónica del medio	β -lactoglobulina	Guichard et al., 2002
	Soja	O'Keefe et al., 1991
	Actomiosina de pescado	Damodaran y Kinsella, 1983
Temperatura	Soja	Damodaran y Kinsella, 1981b
	Varias proteínas	Fischer y Widder, 1997
	Varias proteínas	Leland, 1997
pH	Soja	Damodaran y Kinsella, 1981a
	β -lactoglobulina	Oneill y Kinsella, 1987
	Varias proteínas	Lubbers et al., 1998
	Ovoalbúmina	Adams et al., 2001
	β -lactoglobulina	Jouenne y Crouzet, 2000b

1.3.4 EFECTO DE LA INTERACCIÓN EN LA PERCEPCIÓN DEL AROMA Y SABOR

La percepción del aroma y sabor esta provocada por una respuesta neurológica a los componentes de los alimentos, lípidos, proteínas y carbohidratos y es uno de los parámetros más importantes en la aceptación de un producto por parte de los consumidores (Salles et al., 2003).

Por otra parte, cuando los alimentos son ingeridos se producen muchos cambios tales como, la hidratación y dilución con la saliva y el aumento de la superficie por la disgregación producida por la masticación. Todo esto afecta a la liberación de los compuestos volátiles del alimento y por tanto, al perfil de los compuestos percibidos durante el consumo (Taylor,

1996). Generalmente, los compuestos volátiles liberados durante la ingestión se han estudiado mediante análisis sensorial, utilizando los ensayos de tiempo-intensidad (Brossard et al., 2006; Guillard et al., 1997; Pionnier et al., 2003; Weel et al., 2002) aunque recientemente se han desarrollado métodos para el análisis de dichos compuestos mientras el alimento es ingerido. Estos análisis se denominan *in vivo*, “*breath-by-breath*” o “*nosespace*” y en ellos se analiza el aire exhalado por la nariz durante el consumo del alimento (Taylor, 1996; Lethuaut et al., 2004; Schober y Peterson, 2004; Yeretizian et al., 2004).

La combinación de los métodos sensoriales, que aportan datos globales de la medida de la percepción del aroma y sabor, y los métodos instrumentales, que pueden seguir potencialmente la liberación de todos y cada uno de los compuestos volátiles, permite obtener un cuadro completo de los perfiles aromáticos generados durante el consumo del alimento (Taylor, 1996). Además, los estudios combinados de ambas técnicas han permitido demostrar, que la medida de un perfil de volátiles durante el consumo difiere del perfil del espacio de cabeza del alimento. En segundo lugar, que los perfiles de compuestos volátiles en la boca durante la ingestión cambian dependiendo del tiempo durante el cual el alimento es masticado y tercero, que la liberación de los volátiles de los alimentos con un bajo contenido en agua se ve afectado por la hidratación que se produce en la boca (Taylor, 1996). La medida combinada del aroma antes, durante y después de la ingestión de los alimentos, permite entender los enlaces entre la liberación del aroma, la interacción de los volátiles con los sensores olfativos situados en la nariz y la percepción total del aroma y sabor del alimento (Taylor, 1996).

Sin embargo, para percibir el aroma los compuestos volátiles deben llegar a los receptores situados en la nariz y la boca (Taylor, 1998). En este sentido, los componentes de la matriz tales como las proteínas, lípidos y carbohidratos pueden interaccionar con los compuestos responsables del aroma y sabor (Guichard, 2002) del alimento, además de modificar su distribución según la volatilidad y la solubilidad de dichos compuestos

volátiles. Todo ello hace que la percepción esté relacionada con la composición de la matriz del alimento (Figura 1.3).

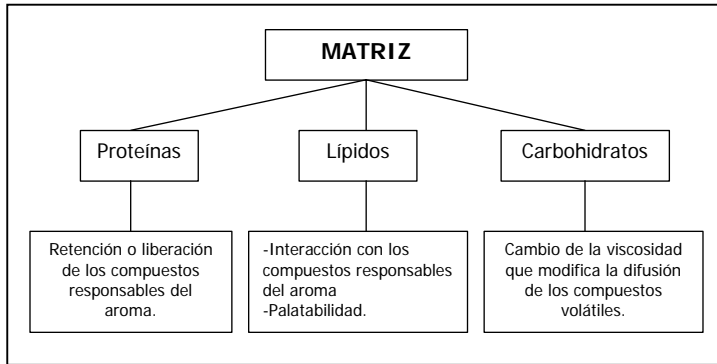


Figura 1.3. Efecto de la interacción de los componentes de la matriz de los alimentos en la percepción del aroma y sabor.

En particular, los lípidos afectan la percepción del aroma y sabor por su efecto en el aroma, gusto y palatabilidad (deRoos, 2006; Le Thanh et al., 1998). Los resultados *in vivo* indican que el efecto de los lípidos en el aroma y el sabor, se debe a la partición y transporte de los compuestos volátiles entre las fases (Guichard, 2002; Chevance and Farmer; 1998), mientras que la palatabilidad está afectada por el efecto de los lípidos en la textura (deRoos, 2006).

En cuanto, a los carbohidratos, estos componentes de los alimentos también pueden interactuar con los compuestos volátiles afectando a su percepción aunque el mayor efecto que producen es el cambio de viscosidad de la disolución que afecta a la difusión de los compuestos volátiles (Guichard, 2002).

Por último, las proteínas tienen poco aroma en sí mismas pero influyen en la percepción debido a la interacción y/o reducción del impacto percibido de ciertos aromas deseables (O'Neill, 1996). En general, la interacción de las proteínas con los compuestos volátiles es mucho menor que con los lípidos. Sin embargo, al estudiar emulsiones, la presencia de

proteínas en la interfase aceite/agua induce un efecto significativo en la liberación y percepción de los compuestos aromáticos hidrofóbicos (Guichard, 2002). Se han realizado diversos estudios de interacción entre las proteínas y los compuestos volátiles responsables tanto de aromas deseables como no deseables (Jounne y Crouzet, 2000a,b; Guichard, 2002; O'Neill y Kinsella, 1987; Damodaran y Kinsella, 1980; Damodaran y Kinsella, 1983) para estudiar su correlación con la percepción del aroma y sabor. Datos procedentes de estudios modelo ilustran que diversos factores determinan la extensión de la interacción entre las proteínas y compuestos responsables del aroma incluyendo, la naturaleza química del compuesto aromático, la temperatura, las condiciones iónicas, y la estructura y procesado que sufre la proteína del alimento (O'Neill, 1996).

Finalmente, se han realizado estudios en carne sobre la generación de los compuestos volátiles durante la cocción (Elmore et al., 2001; Mottram, 1998; Mottram et al., 1982) y en los distintos procesos de obtención de los productos cárnicos (Martín et al., 2000; Flores et al., 1997c). Además, en el caso de productos cárnicos curados existen numerosos estudios sobre el perfil de compuestos volátiles responsables del aroma aislados del espacio de cabeza, así como la descripción de estos compuestos en términos sensoriales olfatométricos (Flores et al., 1997c; Dirink and Van Opstaele, 1998; Carrapiso et al., 2002a,b).

Sin embargo, apenas existen estudios sobre el efecto de la matriz proteica de la carne y productos cárnicos en la liberación de los compuestos responsables del aroma. Por tanto, es necesario profundizar en el estudio de la interacción proteína-volátil con el objetivo de llegar a conocer mejor su efecto en la percepción del aroma y sabor de la carne y los productos cárnicos.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Se plantean los siguientes objetivos de investigación:

- 2.1 Determinar el efecto de la estructura bioquímica (lípidos y proteínas) y sus productos de degradación en el contenido de compuestos volátiles de las diferentes secciones del jamón curado para estudiar su contribución a la generación del aroma y sabor.
- 2.2 Estudiar el efecto de las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares del músculo porcino y del jamón curado en la interacción con los compuestos aromáticos clave al objeto de determinar el impacto relativo de los componentes del músculo en la liberación de los compuestos responsables del aroma.
- 2.3 Purificar actomiosina y actina, en un único proceso de extracción, a partir de músculo post-rigor de porcino para obtener fracciones proteicas que puedan usarse en los estudios de interacción.
- 2.4 Dilucidar el efecto de la concentración y conformación de la actomiosina y actina en la interacción con los compuestos aromáticos clave.

CAPÍTULO I

EFFECTO DE LAS DISTINTAS
SECCIONES DEL JAMÓN CURADO EN
LA GENERACIÓN DE COMPUESTOS
VOLÁTILES AROMÁTICOS

3 EFECTO DE LAS DISTINTAS SECCIONES DEL JAMÓN CURADO EN LA GENERACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES AROMÁTICOS.

3.1 INTRODUCCIÓN

La alta calidad del jamón curado depende, en gran medida, del aroma y sabor que se origina a lo largo de las etapas de curado y secado. Sin embargo, para percibir dicho aroma y sabor, los compuestos volátiles deben liberarse de la matriz del alimento y llegar hasta los receptores situados en la nariz y en la boca (Taylor, 1998). En este sentido, al aroma que se percibe depende de la concentración y umbral de detección de los compuestos volátiles generados en el jamón curado así como a su interacción con otros componentes del alimento que alterará la concentración en la fase vapor.

El jamón curado es un producto heterogéneo en el que se pueden apreciar diferentes secciones debido a las variaciones intra e inter musculares que existen en los tejidos animales (Segars et al., 1974). Además, el jamón curado se somete a un proceso de salado y deshidratación que influye en la migración del agua, cloruro de sodio, nitrato y nitrito (Arnau et al., 1995). Asimismo, la difusión de la humedad está relacionada con las características de la carne incluyendo la temperatura, el pH, la estructura y la composición (Gou et al., 2004).

Muchos estudios del aroma del jamón curado se han realizado considerando distintas localizaciones anatómicas, generalmente, en la parte central del jamón como en el caso de los músculos *Biceps femoris Semimembranosus* y *Semitendinosus* (Bolzoni et al., 1996; Careri et al., 1993; Flores et al., 1997c; Gianelli et al., 2002a), en el *Biceps femoris* (Berdagué et al., 1993; Buscailhon et al., 1993; Buscailhon et al., 1994) o en los músculos *Semimembranosus* (Ruiz et al., 1998b), debido principalmente a que dichos músculos son representativos de la parte interna y externa del jamón, respectivamente. Del mismo modo, el efecto de la localización se ha

estudiado en las propiedades sensoriales en las que se demuestra su importancia en la textura y la apariencia mientras que apenas se observan diferencias en el aroma y el sabor (Ruiz et al., 1998b). Sin embargo, ninguno de estos estudios considera las diferentes secciones dentro de un mismo jamón. En cada sección, se producen reacciones bioquímicas durante el proceso de curado y secado que afectan a la proteólisis y lipólisis y contribuyen al desarrollo de una textura adecuada y del sabor y aroma característico (Toldrá y Flores., 1998). Por otra parte, las diferencias en el contenido de cloruro sódico y de humedad en cada sección afectan a la actividad enzimática responsable de las diferentes cantidades de precursores del aroma y sabor y finalmente, esta actividad enzimática afecta a la degradación de la matriz.

Por tanto, el objetivo que se plantea en este capítulo es determinar como la estructura bioquímica (lípidos y proteínas) y sus productos de degradación afectan al contenido en compuestos volátiles de las diferentes secciones del jamón curado para estudiar su contribución a la generación del aroma y sabor.

3.2 MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1 MATERIAL

Dos jamones se seleccionaron de una industria local y se procesaron según la metodología tradicional curándose durante 7 m (proceso corto) y 12 m (proceso largo). El procesado consistió en las siguientes etapas: salado (12 días a 3 °C), post-salado (50 días a 4-6 °C) y curado-secado (1^a fase 60 días a 12 °C; 2^a fase 60 días a 18 °C; 3^a fase 30 días a 30° C, donde termina el curado de 7 meses y 4^a fase 150 días a 15 °C, final de los 12 meses).

Las muestras se tomaron seccionando los jamones a nivel de la parte del codillo (S), del centro (C) y de la punta (B) como se muestra en la figura 3.1. Cada sección contenía principalmente los músculos siguientes: la

sección del codillo (S) contenía el *Biceps femoris*, *Flexor digitorum superficialis* y *Gastrocnemius*; la sección del centro (C) contenía el *Biceps femoris*, *Semitendinosus* y *Semimembranosus* y la sección de la punta (B) contenía *Biceps femoris* y *Gluteous accesorius, medius y profundus*. De todas las secciones se envasaron al vacío 4 porciones de unos 100 g, sin la grasa subcutánea y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

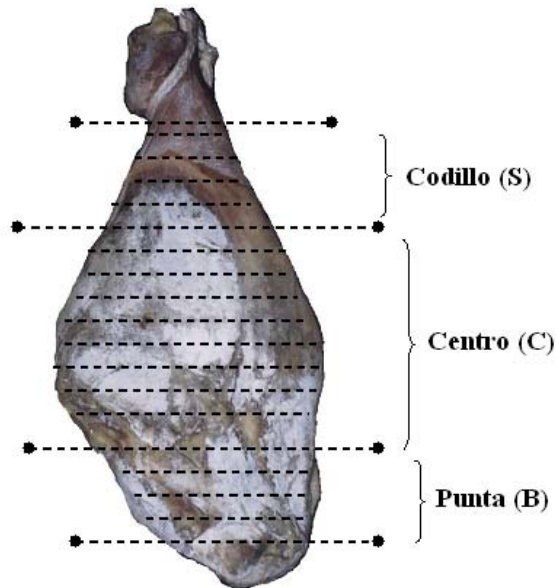


Figura 3.1. Localización de las muestras en las diferentes secciones del jamón curado.

3.2.2 ANÁLISIS QUÍMICOS

El contenido en humedad de los jamones curados se determinó tras la deshidratación a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta peso constante (ISO, 1973) mientras que el contenido en cloruros se determinó por el método de Volhard (ISO 1841-

1:1996). El pH se midió en una mezcla de jamón curado en agua (1:1) usando un pH-metro EA 920 (Orion Research, Boston, USA).

3.2.3 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

La extracción de las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares se realizó por el proceso descrito por Molina y Toldrá (1992). El jamón curado se homogenizó (dilución 1:10, p/v) en un homogeneizador de palas Lab-blender 400 (Seward Medical, London, UK) con tampón fosfato 30 mM a pH 7,4 durante 4 min. La mezcla se centrifugo a 10.000 g durante 20 min a 4 °C en una Sorvall RC-5B y el sobrenadante se usó para el análisis de las proteínas sarcoplásmicas. El proceso se repitió dos veces y el precipitado se suspendió finalmente en 9 vol de tampón fosfato 100 mM a pH 7,4 con 0,7 M de yoduro potásico. La mezcla se homogeneizó en un homogeneizador de palas (IUL Instruments GmbH) durante 8 min y se centrifugo posteriormente a 10.000 g durante 20 min a 4 °C en una Sorvall RC-5B. La concentración de proteína de ambos sobrenadantes que contienen las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares se calculó por el método de Smith et al., (1985) usando el ácido bicinconfínico como reactivo y la albúmina de suero bovino como patrón.

El análisis de las proteínas se realizó por electroforesis desnaturante con dodecil-sulfato sódico en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) usando el método descrito por Toldrá et al. (1992). Los extractos de proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares se mezclaron en proporción 1:1 con tampón Tris-HCl 50 mM a pH 6,8 con urea 8 M, tiourea 2 M, ditiotreitól (DTT) 75 mM, SDS al 3 % (p/v) y azul de bromofenol al 0,05 %. La mezcla se calentó a 100 °C durante 4 min y se usó posteriormente para la electroforesis. La cantidad de proteína inyectada en cada carril fue de 12 µg. Los geles de SDS-PAGE se prepararon al 10 % y se tiñeron con Azul de Coomassie R-250 (Laemli., 1970). Los patrones proteicos utilizados fueron miosina 200 KDa, β-galactosidasa 116,3 kDa, fosforilasa b 97,4 kDa, albúmina de suero 66,2 kDa, ovoalbúmina 45 kDa, anhidrasa carbónica 31

kDa todos ellos adquiridos de BioRad (Hercules, CA, USA). Estos patrones se analizan junto a las muestras para permitir la identificación de las masas moleculares.

3.2.4 ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS LIBRES

Las muestras para el análisis de aminoácidos libres fueron manipuladas para su extracción y desproteinizaron siguiendo el método descrito por Aristoy y Toldrá (1991). Las muestras de jamón curado se homogeneizaron con HCl 0,01 M (dilución 1:5) en un homogeneizador de palas durante 8 min a 4 °C y se centrifugaron en frío a 10.000 g durante 20 min. Los sobrenadantes se filtraron a través de lana de vidrio y se almacenaron a -20 °C hasta su utilización. Las muestras descongeladas (100 µL) junto con 50 µL del patrón interno (10 mM nor-leucina) se desproteinizaron con 2,5 vol de acetonitrilo. El sobrenadante, que contenía los aminoácidos libres, se derivatizó para obtener los derivados feniltiocarbámílicos según el método de Bidlingmeyer et al. (1987). Las muestras derivatizadas se analizaron en un sistema de HPLC 1050 Hewlett Packard (Palo Alto, CA, USA) con un detector variable de UV a 254 nm en una columna Nova-Pack C-18 (3.9 x 300 mm) (Waters Co, MA, USA). La separación se realizó en 65 min a 52 °C usando un gradiente entre dos disolventes: acetato de sodio 70 mM a pH 6,55 con 2,5 % de acetonitrilo (solvente A) y acetonitrilo: agua: metanol (45:40:15, v/v, solvente B) (Flores et al., 1997b).

3.2.5 ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES

Los lípidos se extrajeron a partir de 5 g de jamón con una mezcla de diclorometano/metanol (2:1) según el método de Folch et al. (1957) y se expresaron como contenido de grasa intramuscular (IMF). La composición en ácidos grasos libres se determinó como describe Needs et al. (1983) mediante cromatografía de gases de los correspondientes ésteres metílicos.

Los derivados se obtuvieron según el método de Berry et al (1965). El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases Fisons 816 equipado con inyector split, detector de ionización de llama y una columna capilar DB-225 (J & W Scientific, Barcelona, España), de 30 m de longitud, con un d.i. de 0.25 mm y con un espesor de fase interna de 0.25 μm . La temperatura del horno se mantuvo a 160 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 min, se aumentó a 190 $^{\circ}\text{C}$ a razón de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y se mantuvo 5 min, posteriormente se aumentó a 210 $^{\circ}\text{C}$ a 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y se mantuvo 10 min, finalmente se elevó hasta 220 $^{\circ}\text{C}$ a razón de 7 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y se mantuvo 5 min. La presión de cabeza del gas portador (He) fue de 140 kPa, el flujo se mantuvo a 0,9 mL/min y el ratio del split fue 1:50. La temperatura del detector y del inyector se mantuvo a 240 $^{\circ}\text{C}$. Los ácidos grasos se identificaron individualmente por comparación de sus tiempos de retención con los de sus respectivos patrones. El patrón interno utilizado fue C20:0.

3.2.6 ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES

Los compuestos volátiles se extrajeron del espacio de cabeza de 3 g de jamón curado cortado en cubos de 2 mm, usando la técnica de SPME (microextracción en fase sólida) con la fibra de 85 μm carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/ PDMS) stableflex (Supelco, Bellefonte, PA) (Gianelli et al., 2002a). Los compuestos se separaron en un cromatógrafo de gases (GC HP 5890 series II, Hewlett Packard, Palo Alto, CA) y se identificaron con un espectrómetro de masas HP 5972 (Hewlett Packard, Palo Alto, CA), siguiendo el proceso descrito por Gianelli et al. (2002a). Los resultados se expresaron como el cromatograma de iones totales o individuales en escala arbitraria (eV).

3.2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El efecto de las diferentes secciones del jamón curado en las variables estudiadas (composición química, aminoácidos libres, ácidos

grasos libres y compuestos volátiles) se realizó mediante análisis de la varianza usando el software estadístico SPSS para windows (v 11.5) (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). En aquellos casos en los que el efecto fue significativo, las medias se compararon usando el análisis de la diferencia honestamente significativa de tukey (HSD).

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La conservación del jamón curado se debe a la reducción de la actividad de agua como consecuencia esencialmente de la penetración de la sal y la reducción del contenido de agua de la carne (Arnau et al., 1995). En este trabajo, se compararon diferentes secciones del jamón para determinar el efecto de la estructura en el desarrollo del aroma y sabor.

Los resultados de los análisis químicos en las diferentes secciones se muestran en la tabla 3.1. Las diferentes secciones, codillo (S), centro (C) y punta (B), mostraron diferencias significativas en el contenido en humedad y en la concentración de NaCl en el jamón curado durante 7 m mientras que, en el jamón curado 12 m sólo se observó diferencia significativa en el contenido de grasa intramuscular (IMF). Estos resultados eran de esperar debido a que después de 7 m de curado la humedad del jamón disminuye por deshidratación aunque su contenido depende del área del jamón (Arnau et al., 1995). Estos autores mostraron que el contenido de humedad disminuye más rápidamente en la punta y en los músculos externos que no se encuentran cubiertos por la piel y la grasa mientras el codillo es la zona más aislada donde la penetración de sal tiene lugar principalmente a través de la piel y la grasa, que absorben la sal durante el periodo de salado, difundiendo después hacia el músculo. En este sentido, se obtuvo una concentración de NaCl significativamente menor en el codillo que en el centro después de 7 m de curado, sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas después de 12 m de curado.

Tabla 3.1. pH, humedad y contenido en cloruro sódico y grasa intramuscular (IMF) en las diferentes secciones del jamón después de 7 y 12 m de curado.

	pH			Humedad (%)						NaCl m.s.			IMF g/100 g m.s.		
	S ¹	C	B	S	C	B	S	C	B	S	C	B			
7m	6,1	5,9	6,1	60,5 ^b	66,4 ^a	59,3 ^b	9,3 ^b	12,2 ^a	11,2 ^{ab}	11,7	13,1	10,5			
12m	6,2	6,3	6,3	58,6	61,6	56,9	9,1	11,7	10,6	13,5 ^a	10,7 ^b	12,2 ^{ab}			

^a Diferentes letras dentro de un mismo parámetro indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las secciones del jamón curado.

¹ Secciones del jamón: S: codillo; C: centro; B: punta.

Las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares se extrajeron de las diferentes secciones del jamón y su composición se analizó por electroforesis (ver figura 3.2). La diferencia más relevante se observó en las proteínas miofibrilares debido a la hidrólisis de estas, mientras que el perfil de las proteínas sarcoplásmicas fue muy similar en las tres secciones de los jamones de 7 y 12 m de curado.

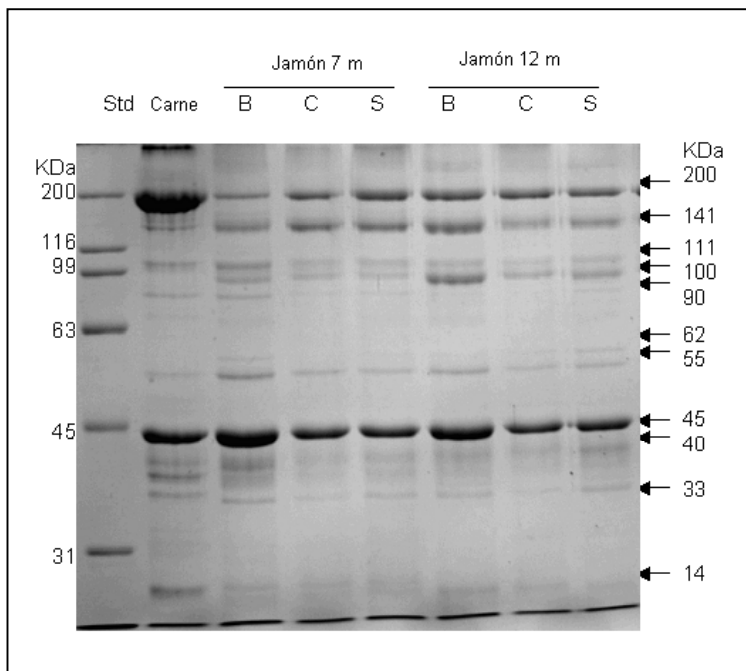


Figura 3.2. Geles SDS-PAGE (10 %) de las proteínas miofibrilares en las diferentes secciones del jamón curado después de 7 y 12 m de curado. (Std) Patrones (B) Punta, (C) Centro y (S) Codillo.

Las principales diferencias en las proteínas miofibrilares se observaron en la sección de la punta en ambos jamones (7 y 12 m). En el jamón curado de 7 m, las bandas de 111, 100, 55, 31 y 25 kDa fueron más intensas en la punta que en las secciones del centro y del codillo. También la banda de la actina (45 kDa) fue más intensa en la punta, lo que indica que existió una menor degradación de esta proteína miofibrilar. Resultados similares se observaron en el jamón con 12 m de curado, donde se apreciaron bandas más intensas en la punta que en otras secciones. Estos resultados están en concordancia con Toldrá et al. (1993) quien indicó que los principales cambios proteolíticos que se producen durante el proceso de curado se observan en las proteínas más abundantes, especialmente en la cadena pesada de miosina que experimenta una importante degradación en casi 7 meses de curado mientras que la banda de actina aparece poco degradada después de los 12 meses de curado.

La generación de pequeños péptidos y aminoácidos libres durante la proteólisis en el curado de los jamones se produce principalmente por enzimas endógenos, exopeptidasas, que todavía continúan activas durante el largo proceso de curado (Toldrá y Flores, 1998). Estos compuestos son muy importantes para el aroma y sabor del jamón curado ya que pueden experimentar nuevas reacciones que generen posteriormente compuestos aromáticos. Los resultados de la concentración de aminoácidos libres en las diferentes secciones del jamón curado se presentan en la tabla 3.2. En los jamones con 7 m de curado, la concentración de todos los aminoácidos fue significativamente diferente en todas las secciones excepto para la OH-Pro y la β -Ala. La concentración de Val, Met, Ile, Leu, Phe, Asn y Tyr fue significativamente mayor en el centro que en la punta y el codillo mientras que His, Thr, Trp, Lys, Asp, Ser, Gly, Gln, Ala, Arg, Pro y Tau fueron significativamente mayores en el codillo y en el centro que en la punta. Sin embargo, en el jamón curado de 12 m, se observaron pocas diferencias entre las secciones. Solo Thr, Gly, Pro y Tau fueron significativamente menores en la punta que en el centro y el codillo mientras que Val, Leu, Ala, Arg y Tyr fueron menores en la punta que en el centro. En cuanto al

contenido de dipéptidos naturales, no existieron diferencias significativas en los jamones de 7 m mientras que en el jamón de 12 m de curado el contenido de balenina fue más bajo en la punta que en el codillo. Los aminoácidos se representan por grupos (esenciales y no esenciales), dipéptidos y compuestos totales en cada sección y para cada tiempo de curado (tabla 3.2). En los jamones curados durante 7 m la punta fue la sección que presentó un menor contenido en aminoácidos esenciales y no esenciales; sin embargo, después de 12 m de curado la punta seguía conteniendo una menor concentración aunque las diferencias fueron menores.

La elevada humedad en la parte central del jamón puede favorecer la actividad de las enzimas proteolíticas endógenas del músculo, especialmente aminopeptidasas (Toldrá y Flores, 1998), que son responsables de la generación de aminoácidos y, por tanto, de la mayor concentración de aminoácidos observada en el centro respecto a las otras secciones. Por el contrario, la mayor concentración de aminoácidos obtenida en el codillo estaría favorecida por la menor concentración de sal hallada en esta sección (tabla 3.1). Probablemente estos resultados se deban a la actividad de la principal aminopeptidasa del músculo porcino, alanilaminopeptidasa, no solo por su abundancia en el músculo sino también por su amplio espectro de actividad, ya que esta enzima es capaz de hidrolizar la mayoría de los aminoácidos que se presentan en el extremo amino (Flores et al., 1996). Asimismo, esta enzima es inhibida en presencia de cloruro de sodio (Flores et al., 1997c).

Los ácidos grasos libres se analizaron en las diferentes secciones como indicadores del proceso de lipólisis producida en el músculo (Tabla 3.3). En 1994, Motilva et al. indicaron que la lipólisis en la grasa intramuscular durante el procesado del jamón curado era más intensa durante los primeros 5 meses del proceso. En el presente estudio, se detectaron pocas diferencias significativas entre las secciones. Tras 7 meses de curado sólo el ácido poliinsaturado C20:3 fue significativamente menor en el centro que en otras secciones.

Tabla 3.2 Contenido en aminoácidos libres y dipéptidos (expresados en mg / 100 g m.s.) de las diferentes secciones de jamón curado de 7 y 12 m.

	Jamón curado (7 m)			Jamón curado (12 m)				
	Codillo	Centro	Punta	P	Codillo	Centro	Punta	P
Aminoácidos Esenciales								
His	217,4 ^a	226,2 ^a	117,3 ^b	***	186,0	189,1	166,8	
Thr	352,4 ^a	395,0 ^a	217,6 ^b	***	346,7 ^a	371,8 ^a	302,0 ^b	**
Val	398,3 ^b	432,1 ^a	268,4 ^c	***	408,7 ^{ab}	442,8 ^a	372,7 ^b	**
Met	180,9 ^b	232,6 ^a	139,5 ^c	***	190,9	179,5	170,6	
Ile	301,4 ^b	365,0 ^a	241,8 ^c	***	326,7	340,1	297,6	
Leu	519,9 ^b	655,0 ^a	399,9 ^c	***	534,6 ^{ab}	585,9 ^a	487,6 ^b	*
Phe	345,0 ^b	449,4 ^a	274,2 ^c	***	372,1	388,4	338,3	
Trp	105,6 ^a	114,2 ^a	63,9 ^b	*	130,3	117,9	92,1	
Lys	701,9 ^a	699,9 ^a	408,6 ^b	**	595,0	602,5	536,8	
Total Esenciales	3122,9	3569,6	2131,2		3091,1	3218,1	2764,5	

^a Diferentes letras en las medias de una misma fila en cada jamón curado son significativamente diferentes a valores de P: (*) < 0,05. (**) < 0,01. (***) < 0,001.

Tabla 3.2. (Cont)

	Jamón curado (7 m)				Jamón curado (12 m)			
	Codillo	Centro	Punta	P	Codillo	Centro	Punta	P
Aminoácidos								
No-esenciales								
Asp	214,9 ^a	218,2 ^a	20,0 ^b	***	217,4	267,1	226,6	
Glu	657,2 ^a	455,9 ^b	256,8 ^c	***	550,7	595,1	481,9	
Ser	368,2 ^a	399,1 ^a	236,9 ^b	***	335,4	348,3	282,3	
Asn	147,5 ^b	204,5 ^a	101,7 ^c	***	79,1	79,4	66,9	
Gly	321,9 ^a	347,6 ^a	187,2 ^b	***	289,0 ^a	303,6 ^a	242,7 ^b	**
Gln	229,5 ^a	251,6 ^a	126,1 ^b	***	72,7	71,4	53,2	
Ala	516,8 ^a	578,3 ^a	429,2 ^b	**	535,5 ^{ab}	557,2 ^a	487,6 ^b	*
Arg	423,8 ^a	429,6 ^a	266,4 ^b	**	364,7 ^{ab}	377,6 ^a	309,8 ^b	*
Pro	367,2 ^a	364,7 ^a	232,3 ^b	***	388,4 ^a	427,4 ^a	336,1 ^b	**
Tyr	270,2 ^b	327,7 ^a	194,3 ^c	***	273,0 ^{ab}	300,9 ^a	251,5 ^b	*
OH-pro	4,8	4,4	3,9		3,2	3,8	2,9	
Tau	222,0 ^a	205,0 ^a	147,2 ^b	**	174,7 ^a	160,1 ^a	123,5 ^b	***
β-Ala	6,8	7,3	6,2		8,0	9,6	8,7	
Total No-esenciales	3750,9	3794,1	2208,1		3291,7	3501,4	2873,7	
Dipéptidos								
Carnosina	1078,5	1143,2	990,1		934,4	936,8	975,3	
Anserina	45,5	41,9	35,3		38,0	32,9	30,7	
Balenina	59,7	52,6	45,5		88,5 ^a	78,7 ^{ab}	63,0 ^b	*
Total dipéptidos	1183,8	1237,7	1070,9		1060,9	1048,3	1069,0	
TOTAL	6106,1 ^a	5885,1 ^{ab}	3686,2 ^b	*	5882,9	5425,20	4727,15	

^a Diferentes letras en las medias de una misma fila en cada jamón curado son significativamente diferentes a valores de P: (*) < 0,05. (***) < 0,01. (****) < 0,001.

Tabla 3.3. Contenido en ácidos grasos libres (expresados como mg / 100 g m.s) en las diferentes secciones de jamón curado de 7 y 12 m.

Ácidos grasos	Jamón curado (7 m)				Jamón curado (12 m)			
	Codillo	Centro	Punta	P	Codillo	Centro	Punta	P
C14:0	5,6	5,1	4,1		5,7 ^a	3,9 ^b	5,0 ^a	**
C16:0	259,5	261,9	237,9		327,4	293,7	293,0	
C18:0	168,4	164,2	140,7		180,9	156,5	174,5	
SFA	433,8	431,3	382,7		514,0	454,2	472,6	
C16:1	28,0	28,4	24,6		29,1	24,0	25,1	
C18:1	320,3	300,4	255,9		340,6 ^a	251,9 ^b	304,7 ^{ab}	*
C20:1	7,1	8,9	4,6		5,9	6,6	9,4	
MUFA	355,4	337,7	285,1		375,6	282,5	339,1	
C18:2	384,9	408,7	352,6		429,5	401,4	483,6	
C18:3	9,4	9,0	8,7		9,7	7,9	9,9	
C20:2	1,9	1,9	1,5		4,2	2,9	3,3	
C20:3	12,4 ^a	8,0 ^b	12,9 ^a	*	14,1	8,5	13,7	
C20:4	116,9	159,9	134,7		179,6	138,7	161,5	
C22:4	11,0	13,9	11,5		12,6	12,3	13,8	
PUFA	536,5	601,6	521,9		649,6	571,6	685,9	

^a Diferentes letras en las medias de una misma fila en cada jamón curado son significativamente diferentes a valores de P: (*) < 0,05, (**) < 0,01, (***) < 0,001.

Por otra parte, en el jamón curado de 12 m, el ácido C14:0 fue menor en el centro que en otras secciones y el C18:1 fue menor en el centro que en el codillo. Existen otros factores, tales como las condiciones de proceso y la materia prima, que producen muchas de las variaciones en la composición de ácidos grasos libres (Martín et al., 1999).

El análisis de los compuestos volátiles en el espacio de cabeza de las diferentes secciones podría ser indicador del aroma percibido. Los compuestos volátiles presentes en cada sección del jamón se extrajeron mediante microextracción en fase sólida (SPME) utilizando el proceso optimizado por Gianelli et al. (2002a). Un total de 82 compuestos se identificaron siendo 21 de ellos alcoholes, 11 aldehídos, 12 cetonas, 10 ésteres, 7 ácidos, 5 hidrocarburos alifáticos, 3 azufrados, 3 compuestos nitrogenados y 10 otros compuestos (Tabla 3.4).

En general, los compuestos identificados en el espacio de cabeza se han detectado previamente en el espacio de cabeza de diferentes tipos de jamón curado usando diferentes técnicas de extracción (Flores et al., 1997c; Berdagué et al., 1993; Ruiz et al., 1999). Además, estos compuestos se extrajeron previamente mediante la técnica de SPME y la fibra CAR/PDMS por Gianelli et al (2002a) aunque en el presente estudio se detectó una proporción mayor de ésteres.

La concentración de estos compuestos volátiles en las diferentes secciones se presenta en la figura 3.3. El espacio de cabeza de los jamones curados de 7 y 12 m contenía esencialmente los mismos compuestos. En el jamón curado de 7 m, la concentración de alcoholes fue la más abundante en las secciones del centro, codillo y punta mientras que después de 12 meses de curado, el contenido de alcoholes fue también el más abundante en las secciones del centro y la punta. Sin embargo, el contenido de ácidos fue más elevado en el codillo que los demás compuestos volátiles.

Tabla 3.4. Compuestos volátiles identificados y cuantificados en el espacio de cabeza de diferentes secciones de jamón curado de 7 y 12 m usando SPME (fibra Car/PDMS stb). Resultados expresados como media de 4 repeticiones de la corriente total de iones (TIC x 10⁻⁶) por 100 g de jamón m.s.

Compuestos	IK ^f	IR ^g	Jamón curado (7 m)			Jamón curado (12 m)					
			Codillo	Centro	Punta	P	Codillo	Centro	Punta	P	
Alcoholes											
etanol	508	a	16589,2 ^b	33680,4 ^a	6237,1 ^c	***	3177,3 ^b	6659,8 ^a	2589,4 ^b	***	
isopropanol	537	a	11116,2 ^b	2894,0 ^a	295,5 ^b	***	6257,1 ^b	9315,1 ^a	1334,2 ^c	***	
1-propanol	610	a	58,8 ^b	134,9 ^a	69,2 ^c	ns	311,1 ^a	255,5 ^a	62,1 ^b	***	
2-butanol	641	a	149,0 ^b	540,9 ^a	24,5 ^b	***	98,9 ^b	179,6 ^a	21,9 ^c	***	
2-metil-3-buten-2-ol	651	a	7,4	187,6	0,0	***	24,5 ^b	311,7 ^a	19,7 ^b	***	
2-metil-1-propanol	678	a	89,3 ^b	351,8 ^a	86,7 ^b	***	121,5 ^b	206,8 ^a	19,8 ^c	***	
1-butanol (56) ^h	721	a	0,0	78,6	0,0	ns	42,2	104,9	0,0	***	
1-penten-3-ol	734	a	340,2	442,3	338,5	ns	667,0 ^{ab}	903,5 ^a	191,7 ^b	***	
2-pentanol	749	a	310,6 ^b	1552,6 ^a	222,4 ^b	***	180,7 ^b	737,6 ^a	270,6 ^b	***	
3-metil-1-butanol	792	a	644,8 ^b	3121,6 ^a	1626,5 ^{ab}	**	1049,3 ^b	1933,3 ^a	328,9 ^c	***	
2-metil-1-butanol	795	a	393,5 ^b	1248,3 ^a	458,8 ^b	**	607,3 ^b	1052,3 ^a	112,1 ^c	***	
1-pentanol	825	a	315,4	967,9	893,0	ns	339,6 ^c	2470,4 ^a	1383,6 ^b	***	
2,2-dimetil-1-butanol	844	c	0,0	107,7	0,0	ns	0,0	0,0	0,0	***	
4-metil-2-pentanol	850	c	0,0	62,4	0,0	ns	0,0	51,5	0,0	***	
2-hexanol	851	a	0,0	0,0	28,8	ns	0,0	0,0	30,7	***	
2,3-butanodiol	890	a	33,3	0,0	7,9	ns	171,9 ^{ab}	226,7 ^a	24,1 ^b	***	
1-hexanol	924	a	60,7 ^b	339,4 ^a	113,1 ^b	**	57,1 ^c	550,9 ^b	1763,7 ^a	***	
ciclohexanol	937	a	0,0	60,1	0,0	ns	95,0	114,5	78,6	ns	
2-heptanol	948	a	0,0	0,0	0,0	ns	0,0	0,0	210,3	***	
1-octen-3-ol	1024	a	90,4	131,0	65,6	ns	77,4 ^b	148,5 ^a	51,0 ^b	***	
4-metil-2-heptanol	1042	c	0,0	0,0	0,0	ns	0,0	0,0	11,7	***	

Tabla 3.4. (Cont)

Compuestos	IK ¹	IR ⁹	Jamón curado (7 m)			Jamón curado (12 m)		
			Codillo	Centro	Punta	Codillo	Centro	Punta
Aldehídos								
acetaldehído		c	1528,4 ^b	2663,4 ^a	1848,5 ^{ab}	474,0 ^b	1924,5 ^a	401,6 ^b
2-metil-propanal	590	a	41,7	47,9	51,8	91,9 ^a	107,5 ^a	16,1 ^b
butanal	620	a	10,0	0,0	0,0	19,2 ^a	15,4 ^a	4,1 ^b
3-metil-butanal	686	a	811,1 ^b	2020,5 ^{ab}	2834,8 ^a	4401,2 ^b	8455,0 ^a	3666,4 ^b
2-metil-butanal	697	a	545,9	587,6	513,6	1167,7 ^a	1550,3 ^a	309,7 ^b
hexanal	837	a	3145,6 ^a	982,8 ^b	1426,4 ^b	2790,3 ^{ab}	4500,4 ^a	1087,5 ^b
heptanal	939	a	159,7	131,5	235,4	137,5 ^b	257,7 ^a	107,8 ^b
benzaldehído	1009	a	24,3	21,3	30,4	0,0	54,6	2,0
benzeno acetaldehído	1100	a	39,0	57,2	40,9	52,2 ^a	76,9 ^a	0,0 ^b
nonanal	1149	a	62,3 ^b	92,5 ^b	166,0 ^a	56,9	100,7	76,3
Cetonas								
acetona	526	a	1643,2 ^b	2845,5 ^a	1017,5 ^c	4239,2 ^b	6169,9 ^a	1133,9 ^c
2,3-butanodiona	624	a	49,9	63,9	59,5	126,4 ^a	171,9 ^a	22,6 ^b
2-butanona	628	a	308,9	316,9	222,5	919,7 ^a	949,7 ^a	194,5 ^b
2-pentanona (86)	727	a	24,2	199,1	187,2	303,4 ^{ab}	491,0 ^a	150,4 ^b
1-hidroxi-2-propanona (44)	731	a	119,2 ^a	23,7 ^b	35,8 ^b	127,0 ^{ab}	199,0 ^a	31,2 ^b
3-hidroxi-2-butanona	776	a	799,5	303,9	850,3	2446,4 ^b	3281,1 ^a	402,7 ^c
2-hexanona	831	a	0,0	507,6	231,3	127,8 ^c	432,7 ^a	277,2 ^b
2-heptanona	933	a	67,7 ^b	347,0 ^a	190,5 ^{ab}	47,5 ^b	313,2 ^a	478,7 ^a
2-pentil-furano	1006	c	13,8	28,0	0,0	13,8	0,0	11,2
butirolactona	1011	a	124,5 ^{ab}	162,6 ^a	64,7 ^b	124,6	159,9	37,4
2-nonanona	1140	a	0,0	20,9	7,9	5,6	21,1	17,8
5-etilidihidro 2 (3H)-furanona	1158	a	0,0	27,3	20,6	9,5 ^b	43,7 ^a	19,3 ^{ab}

Tabla 3.4. (Cont)

Compuestos	IK ^f	IR ^g	Jamón curado (7 m)			Jamón curado (12 m)		
			Codillo	Centro	Punta	Codillo	Centro	Punta
Ácidos								
Ac acético	711	a	3622,4 ^b	9161,9 ^a	2023,4 ^b	25901,7 ^a	4305,5 ^{ab}	1116,5 ^b *
Ac propanoico	817	a	0,0	0,0	0,0	7,3	0,0	0,0
Ac 2-metil-propanoico	874	a	0,0	218,0	29,1	0,0	124,9	29,3
Ac butanoico	896	a	1224,2 ^b	1974,9 ^a	890,4 ^b	1056,4 ^a	1181,7 ^a	200,8 ^b **
Ac 3-metil-butanoico	949	a	53,9	1114,5	1023,5	0,0	570,1	123,4
Ac 2-metil-butanoico	953	a	0,0	308,1	127,7	137,8 ^{ab}	244,9 ^a	65,2 ^b **
Ac hexanoico	1074	a	78,2	220,4	198,0	19,2 ^b	189,6 ^a	106,8 ^{ab} **
Esteres								
metil acetato	548	a	216,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
etil acetate	633	a	1077,2 ^b	3203,4 ^a	342,1 ^c	225,2 ^b	459,7 ^a	98,9 ^c ***
etil propanoato	738	a	0,0	219,9	0,0	0,0	0,0	0,0
etil 2-metil-propanoato (71)	785	a	0,0	59,2	0,0	0,0	0,0	0,0
etil butanoato	829	a	705,9 ^b	1607,5 ^a	279,8 ^b	162,9	0,0	0,0
etil 2-hidroxi-propanoato	863	a	87,5 ^b	248,7 ^a	25,6 ^c	30,0	53,3	0,0
etil 2-metil-butanoato	876	a	56,4 ^b	276,6 ^a	71,4 ^b	29,5 ^b	61,0 ^a	14,2 ^b **
etil 3-metil-butanoato	880	a	112,8 ^b	785,1 ^a	238,8 ^b	1153,4 ^a	1851,7 ^a	333,6 ^b **
etil hexanoato	1023	a	131,5 ^b	318,4 ^a	104,8 ^b	40,7 ^b	116,1 ^a	43,1 ^b **
etil octanoato	1225	a	10,6	28,3	0,0	0,0	6,3	0,0
Compuestos azufrados								
dimetil disulfuro	767	a	64,2 ^a	35,3 ^{ab}	19,9 ^b	112,9	487,1	12,9 ^{ns}
3-metil-tiopropanal (metional)	964	a	0,0	46,9	32,4	41,1 ^a	27,8 ^{ab}	7,6 ^b *
dimetil trisulfuro	995	a	0,0	0,0	0,0	0,0	30,7	0,0
Alcanos								
pentano	500	a	471,7 ^a	387,3 ^{ab}	23,1 ^b	452,2 ^a	384,7 ^{ab}	136,2 ^b *
hexano	600	a	54,8	79,5	0,0	41,6 ^a	61,0 ^a	14,6 ^b **
octano	800	a	109,6	135,9	127,2 ^{ns}	107,7	99,5	93,8 ^{ns}
decano	1000	a	53,4 ^{ab}	107,8 ^a	35,1 ^b *	50,6	78,3	35,8 ^{ns}
dodecano	1200	a	12,4	0,0	0,0	12,4	0,0	0,0

Tabla 3.4. (Cont)

Compuestos	IK ^f	IR ^g	Jamón curado (7 m)			Jamón curado (12 m)		
			Codillo	Centro	Punta	P	Codillo	Centro
Compuestos nitrogenados								
piridina	781	c	0,0	58,9	0,0	0,0	0,0	0,0
2,5-dimetil pirazina	942	a	0,0	74,8	0,0	41,5 ^b	107,9 ^a	0,0 ^c
3,4-dimetil-piridina	1194	c	0,0	16,0	0,0	14,2 ^a	24,1 ^a	0,0 ^b
Miscelaneos								
tolueno (91)	785	a	50,9 ^{ab}	116,2 ^a	30,2 ^b	0,0	70,4	0,0
p-xileno	888	a	32,1	186,0	53,8	0,0	97,8	0,0
estireno	915	a	0,0	54,3	55,5	0,0	53,8	219,8
HCR 1 ⁱ	993	c	3385,1	4145,7	3144,3	1761,2	4616,4	799,0
HCR 2	1012	c	0,0	84,7	38,5	0,0	0,0	0,0
HCR 3	1028	c	320,8	382,0	350,7	183,6	465,9	104,1
HCR 4	1036	c	0,0	349,6	361,4	220,1 ^b	663,5 ^a	103,1 ^b
HCR 5	1038	c	0,0	236,6	109,2	153,2	203,4	48,0
HCR 6	1046	c	71,3	108,5	87,9	46,4	108,3	21,4
HCR 7	1050	c	198,3	255,8	214,6	125,6	283,5	60,1
Área total			42390,1	84347,0	30564,5	63540,2	71912,1	20876,7

^a Medias con diferentes letras en la misma fila en cada jamón son significativamente diferentes a valores de P: (*) < 0.05. (**) < 0.01. (***) < 0.001.

^f KI: Índice de Kovats calculado para la columna capilar DB-624 (J&W Scientific; 30 m; 0.25 mm d.i.; 1,4 µm de espesor del film) instalada en un cromatógrafo de gases equipado con un detector selectivo de masas.

^g IR: Fiabilidad de la identificación: a. espectro de masas y tiempo de retención idéntico a una muestra real; c. identificación tentativa con el espectro de masas.

^h Ratio masa/carga del ion seleccionado para la cuantificación entre paréntesis.

ⁱ HCR: Hidrocarburo de cadena ramificada.

Los compuestos extraídos en mayor proporción en ambos jamones fueron el 3-me-butanal, hexanal, etanol, isopropanol, 3-metil-butanol, acetona, 3-hidroxi-2-butanona, etil acetato, etil 3-metil-butanoato y los ácidos acético y butanoico. Además, se observaron diferencias significativas entre las diferentes secciones estudiadas (Tabla 3.4).

La abundancia de estos compuestos volátiles concuerda con un estudio previo donde se utilizó la fibra Car/PDMS y se obtuvieron elevadas proporciones de 3-metil-butanal, hexanal y ácido acético en el espacio de cabeza de jamón Serrano curado durante 12 m (Gianelli et al., 2002a). Por el contrario, estos compuestos no se han encontrado en porcentajes elevados en otros jamones curados analizados por espacio de cabeza dinámico (Flores et al., 1997c; Berdagué et al., 1993; Bidlingmeyer et al., 1987) debido probablemente a la baja afinidad del Tenax por los compuestos de bajo punto de ebullición, mientras que las fibras utilizadas presentan una alta afinidad por estos compuestos.

En el jamón curado de 7 m, el contenido de la mayoría de los alcoholes, cetonas, ácidos y esterés fue significativamente más elevado en la sección del centro que en la del codillo y de la punta (figura 3.3), mientras que entre los aldehídos sólo el acetaldehído fue mayor en el centro y en el caso del butanal y hexanal su contenido fue más elevado en el codillo que en el centro y la punta (Tabla 3.4). Además, los compuestos nitrogenados se detectaron sólo en el centro mientras que el dimetil disulfuro estuvo presente en mayor proporción en el codillo y el metional lo estuvo en las secciones del centro y la punta.

En el jamón curado de 12 m, la sección del centro fue la única con una concentración estimada significativamente más elevada en la mayoría de los alcoholes, cetonas, ácidos y esterés pero también presentó una concentración estimada más elevada de todos los aldehídos excepto en el caso del nonanal (Tabla 3.4 y figura 3.3). Los compuestos azufrados fueron significativamente diferentes en las secciones estudiadas, especialmente el metional cuya concentración estimada fue menor en la punta que en el codillo y el dimetil trisulfuro que sólo se encontró en la sección del centro del

jamón curado de 12 m. También, los compuestos nitrogenados fueron más elevados en el centro que en la punta.

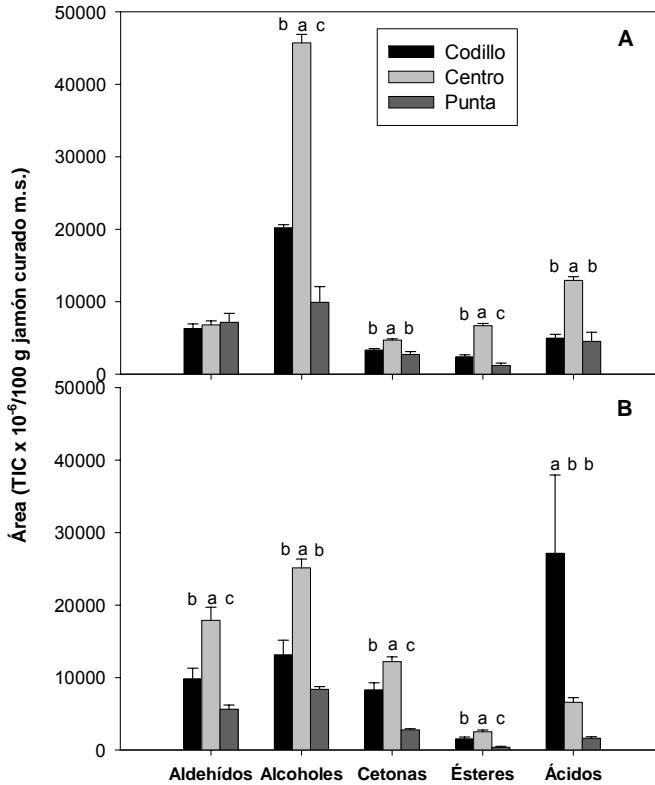


Figura 3.3. Principales grupos químicos de los compuestos volátiles extraídos de las diferentes secciones de jamón curado de 7 m (a) y 12 m (b). Las barras con diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las diferentes secciones del jamón curado para un químico dado.

Por otra parte, muchos compuestos volátiles formados a partir de la oxidación de los ácidos grasos insaturados, aldehídos y alcoholes, fueron también significativamente más elevados en la sección del centro del jamón curado de 12 m a pesar de que se detectaron pocas diferencias entre las secciones en cuanto al contenido de ácidos grasos libres. Probablemente, la

oxidación de los ácidos grasos insaturados a compuestos carbonilo volátiles se vio favorecida en el centro del jamón donde la mayor cantidad de sal encontrada actúa como prooxidante.

Es de destacar la alta proporción encontrada de los compuestos 2- y 3- metil-butanal aunque estos compuestos también han sido detectados en jamón ibérico (Ruiz et al., 1999). Estos compuestos volátiles son importantes en jamones de Parma por su contribución al aroma y sabor dando notas aromáticas a “nuez”, “queso” y “salado” (Hinrichsen et al., 1995). Estos compuestos se originan a través de reacciones de degradación de Strecker de los aminoácidos Ile y Leu, respectivamente (Forss, 1972). El 2-metil-propanal que también se detectó, proviene de la degradación de la Val. El análisis de los compuestos volátiles en el jamón curado de 12 m dio como resultado que los metil aldehídos, 2-metil-propanal y 2-metil-butanal, se hallaban en mayor proporción en el centro y el codillo que en la punta, mientras que el 3-metil-butanal fue más elevado en el centro que en las otras dos secciones. Estos resultados concuerdan con el contenido de Val, Leu e Ile que se encontró significativamente más elevado en la sección del centro del jamón curado de 7 m mientras que en el jamón curado de 12 m, el contenido en la punta fue siempre de menor proporción. Resumiendo, la mayor concentración de aminoácidos libres de la sección del centro actúa como reservorio para la generación de los compuestos volátiles que son de gran importancia para el sabor y aroma del jamón curado.

Otros compuestos como los alcoholes y ácidos ramificados pueden derivar de los aminoácidos a través de la degradación de Strecker. Estos compuestos se encontraron también significativamente en mayor proporción en el centro que en las secciones del codillo y la punta en ambos jamones. Finalmente, los compuestos éster derivados de los ácidos ramificados fueron también significativamente más elevados en el centro pero esta diferencia se vio de manera más pronunciada en el jamón curado de 7 m que en el de 12 m. Los compuestos ésteres son importantes para el aroma y sabor ya que son los responsables de las notas dulces afrutadas que se detectan en la carne de porcino (Baines et al., 1984).

Debido al número reducido de jamones analizados en este estudio, las diferencias observadas entre las secciones del jamón podrían ser diferentes debido a la amplia variabilidad que existe entre los jamones curados (Toldrá et al., 1996), sin embargo, estos resultados pueden ser de gran utilidad para dilucidar la diferente percepción que describen los consumidores en las distintas secciones existentes en el jamón curado.

En conclusión, la parte central del jamón curado de 7 m presentó una mayor proporción de compuestos volátiles que la sección del codillo y la punta esencialmente debido al mayor contenido de aminoácidos libres. Por otra parte, cuando el proceso de curado continua, como ocurre en el jamón de 12 m, existieron cambios en la proporción de los compuestos volátiles siendo la sección del centro la que presentó una mayor proporción de compuestos volátiles debido no sólo a la mayor proporción de aminoácidos libres sino también a la oxidación de los ácidos grasos insaturados.

CAPÍTULO II

EFECTO DE LAS PROTEÍNAS
SARCOPLÁSMICAS Y MIOFIBRILARES
DEL MÚSCULO PORCINO Y DEL
JAMÓN CURADO EN LA INTERACCIÓN
CON COMPUESTOS VOLÁTILES

4 EFECTO DE LAS PROTEÍNAS SARCOPLÁSMICAS Y MIOFIBRILARES DEL MÚSCULO PORCINO Y DEL JAMÓN CURADO EN LA INTERACCIÓN CON COMPUESTOS VOLÁTILES.

4.1 INTRODUCCIÓN

La concentración existente de los compuestos volátiles en la fase gaseosa depende de diversos factores como son sus propiedades fisicoquímicas y la presencia de interacciones con otros constituyentes de los alimentos (Landy et al., 1996). Además, es de gran importancia conocer el comportamiento de los compuestos responsables del aroma y sabor en las diversas fases (Kinsella, 1990) y existe un interés creciente en poder dilucidar las interacciones que se dan entre los compuestos del aroma y sabor con los componentes no volátiles de los alimentos. En este sentido, la interacción de las proteínas con los compuestos volátiles modifica significativamente la concentración de éstos en el espacio de cabeza, y esta interacción ha sido estudiada en proteínas vegetales como la proteína de soja (Damodaran et al., 1981a; Damodaran et al., 1981b; Chung y Villota, 1989) y de guisante (Heng et al., 2004) así como en proteínas animales como la β -lactoglobulina (Jouenne y Crouzet, 2000b; Guichard, 2002; O'Neill et al., 1987), la albúmina de suero bovino (Damodaran et al., 1980) y la actomiosina de pescado (Damodaran y Kinsella, 1983). Así mismo, existen estudios de interacción en los cuales se han empleado pequeños componentes del tejido muscular como los dipéptidos carnosina y anserina (Zhou y Decker., 1999; Gianelli et al., 2000).

Por otra parte, el jamón curado es uno de los productos cárnicos más típicos del área Mediterránea y su aroma y sabor han sido ampliamente estudiados (Carrapiso et al 2002b; Flores et al., 1997c; González et al., 2000; Toldrá y Flores, 1998). Sus componentes principales (lípidos y proteínas) sufren una intensa lipólisis y proteólisis durante el curado y también han sido objeto de numerosos estudios (Toldrá y Flores., 1998;

Toldrá et al., 2000; Gandemer, 2002; Vestergaard et al., 2000). Las principales proteínas presentes en el músculo esquelético son las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares que representan el 30-40 % del peso vivo del animal (Pearson y Young, 1989). Las proteínas sarcoplásmicas, que son solubles en agua o en disoluciones diluidas de sal, forman una mezcla de proteínas similares a aquellas presentes en otros tipos de células y incluyen principalmente enzimas glicolíticas, mioglobina, mioalbúmina y otras (Syrový, 1984). Esta fracción también contiene dipéptidos como la carnosina, que es el dipéptido más abundante en el músculo esquelético porcino, y la anserina, los cuales son importantes debido a su actividad tamponante y antioxidante (Chan y Decker, 1994). Además, los principales constituyentes de las proteínas miofibrilares, miosina y actina, no sólo son importantes en el músculo debido a su función en la contracción y relajación (Pearson y Young, 1989), sino también por su contribución a las propiedades funcionales de los productos cárnicos como la capacidad de retención de agua, de emulsión, de unión y gelificación (Asghar et al., 1985).

En general, durante el proceso de curado del jamón, la fracción de proteínas miofibrilares experimenta una proteólisis más intensa que la fracción de las proteínas sarcoplásmicas, dando lugar a un gran número de péptidos de bajo peso molecular (Toldrá y Flores, 1998). La última etapa de la proteólisis consiste en la generación de aminoácidos libres (Toldrá y Flores, 1998) que contribuyen al sabor y también a la generación de compuestos volátiles como resultado de la degradación de Strecker que da lugar a compuestos azufrados, aldehídos ramificados, alcoholes y pirazinas. Estos compuestos, junto con los compuestos volátiles formados durante la oxidación lipídica y los compuestos no volátiles generados por la proteólisis, tienen un gran impacto en el aroma y el sabor del jamón curado (Toldrá y Flores, 1998). Sin embargo, existen pocos estudios que demuestren la interacción de los compuestos solubles con los compuestos aromáticos a excepción de aquellos realizados en queso (Pionnier et al., 2002). Estudios recientes en productos cárnicos (Gianelli et al., 2003; Gianelli et al., 2005)

han mostrado la interacción de los compuestos volátiles con los péptidos y proteínas sarcoplásmicas extraídas del músculo esquelético.

Sin embargo, el efecto de la estructura de la carne en la interacción con los compuestos volátiles no ha sido todavía dilucidada. Por tanto, el objetivo de este capítulo es esclarecer el papel de las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares del músculo porcino y del jamón curado en la interacción con compuestos aromáticos seleccionados, para establecer el impacto relativo de los componentes del músculo en la liberación de los compuestos responsables del aroma.

4.2 MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1 MATERIALES

Los compuestos aromáticos, 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, 2-pentanona, hexanal, metional y octanal se adquirieron de Fluka Chemie (Buchs, Switzerland).

El músculo porcino post-rigor (*Longissimus dorsi*) se adquirió de un supermercado local. La grasa y el tejido conectivo se eliminaron y la carne se cortó en porciones de 100 g, se envasó al vacío y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Dos jamones seleccionados de una industria local, se procesaron según el método tradicional y se curaron durante 7 meses (proceso corto) y 12 meses (proceso largo). El procesado consistió en las siguientes etapas: salado (12 días a $3\text{ }^{\circ}\text{C}$), post-salado (50 días a $4\text{-}6\text{ }^{\circ}\text{C}$) y curado-secado (1^a fase 60 días a $12\text{ }^{\circ}\text{C}$; 2^a fase 60 días a $18\text{ }^{\circ}\text{C}$; 3^a fase 30 días a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, donde termina el curado de 7 meses y 4^a fase 150 días a $15\text{ }^{\circ}\text{C}$, final de los 12 meses). Se utilizó la sección final del jamón que contenía los músculos *Biceps femoris* y *Gluteous accesorios, medius* y *profundus*. Cuatro porciones de esta sección (aproximadamente 100 g cada una) se envasaron a vacío sin la grasa subcutánea y se almacenaron congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

4.2.2 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE PROTEINAS SARCOPLÁMICAS Y MIOFIBRILARES

Las proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas se obtuvieron según el proceso descrito por Molina y Toldrá (1992). Tanto el músculo de cerdo como el jamón curado procesado durante 7 y 12 m se homogeneizaron (dilución 1:10, p/v) con tampón fosfato 30 mM a pH 7,4 con 0,02% de azida sódica durante 4 min en un homogenizador de palas (IUL Instruments GMBH). El homogeneizado se centrifugó a 10.000 g durante 20 min a 4 °C en una centrifuga Sorvall RC-5B (Dupont Instruments, France). El sobrenadante contenía las proteínas sarcoplásmicas. El proceso se repitió dos veces y finalmente, el precipitado se resuspendió en 9 vol de tampón fosfato sódico 100 mM a pH 7,4 conteniendo yoduro potásico 0,7 M y azida sódica al 0,02 %. La mezcla se homogeneizó en un homogenizador de palas (IUL Instruments GMBH) durante 8 min y posteriormente se centrifugó a 10.000 g durante 20 min a 4 °C en una Sorvall RC-5B. El sobrenadante contenía las proteínas miofibrilares. La concentración proteica de todos los sobrenadantes se calculó por el método de Smith et al. (1985) usando como reactivo el ácido bicinconínico y como patrón la albúmina de suero bovino.

4.2.3 DIÁLISIS DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS

Para estudiar el efecto de la fuerza iónica en la interacción, los extractos de proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas de los músculos de porcino y jamón curado de 7 y 12 meses se dializaron utilizando una membrana de diálisis de tamaño 6 con un tamaño molecular de corte de 12000-14000 Da (Medicell International Ltd, London). La diálisis de los extractos de proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares se realizó durante 24 h. Los extractos de proteínas sarcoplásmicas se dializaron frente a dos tampones: tampón fosfato sódico 30 mM a pH 7,4 con azida sódica al 0,02 % y cloruro sódico 0,3 M y el mismo tampón pero sin cloruro sódico. La diálisis de los extractos de proteínas miofibrilares se realizó frente a dos

tampones: tampón fosfato sódico 100 mM a pH 7,4 con azida sódica al 0,02 % y cloruro sódico 0,3 M y el mismo tampón pero sin cloruro sódico.

4.2.4 PREPARACIÓN DE LA DISOLUCIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES

Se preparó una disolución stock con 50.000 mg kg⁻¹ de cada compuesto volátil. Los compuestos volátiles aromáticos se añadieron por triplicado a los extractos proteicos y a la disolución control a una concentración final de 2 mg kg⁻¹ en el caso del 2-metil-butanal y del 3-metil-butanal; 1 mg kg⁻¹ para la 2-pentanona, el hexanal y el octanal y 5 mg kg⁻¹ para el metional. Todos los compuestos volátiles estuvieron presentes simultáneamente en la disolución empleada en las experiencias.

La selección de los seis compuestos aromáticos se fundamentó en su presencia en el espacio de cabeza y su contribución al aroma y sabor típico de los productos cárnicos curados españoles. El hexanal, 2-metil-butanal, 3-metil-butanal y la 2-pentanona fueron seleccionados por encontrarse en alta proporción en el espacio de cabeza del jamón Serrano (Flores et al., 1997c; Gianelli et al., 2002b), mientras que el octanal y metional fueron seleccionados debido a su potencia aromática en el jamón Ibérico (Carrapiso et al., 2002b).

4.2.5 INTERACCIÓN PROTEÍNA-VOLÁTIL

Los compuestos aromáticos se adicionaron a la concentración adecuada (apartado 4.2.4) a la disolución de proteína. Los extractos de proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas de carne y jamón curado de 7 y 12 m se utilizaron en la disolución proteica. También los extractos proteicos dializados se emplearon en la disolución proteica para el estudio del efecto de la fuerza iónica en la interacción. En los estudios de interacción se prepararon viales control y de proteína. Los viales de proteína contenían 5 mL del extracto proteico en un vial de espacio de cabeza de 10 mL y se

sellaron con un septo de PTFE silicona (Supelco, Bellefonte, PA, USA). El vial control contenía el mismo tampón que el extracto proteico utilizado (para la extracción o para el proceso de diálisis) pero sin proteína. Los viales control y de proteína se almacenaron durante 16 h a 30 °C para equilibrar el espacio de cabeza.

La cantidad de compuesto aromático presente en el espacio de cabeza de los viales de proteína y control se determinó utilizando condiciones optimizadas por Gianelli et al. (2005) con la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) y cromatografía de gases. Para adsorber los compuestos aromáticos, se expuso al espacio de cabeza una fibra carboxen/poli(dimetilsiloxano) (CAR/PDMS) de 75 μm (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Después de 30 min de adsorción, los compuestos aromáticos se desorbieron insertando la fibra en el puerto de inyección mantenido a 220 °C de un cromatógrafo de gases durante 5 min en modo splitless. La válvula de split se abrió 1 min después de la inyección. La fibra se mantuvo 5 min en el puerto de inyección para evitar la contaminación entre las muestras. La linealidad de la detección de cada compuesto aromático bajo estas condiciones se confirmó en un rango de concentración entre 0,02-5 mg kg^{-1} .

4.2.5.1 Análisis por cromatografía de gases

Para el análisis cromatográfico se utilizó un cromatógrafo de gases 8000 CE instruments (Rodano, Milan, Italia) equipado con detector de ionización de llama (FID). Los compuestos aromáticos se separaron en una columna capilar DB-624 (J&W Scientific, 60 m, 0,32 mm d.i. y 1,8 μm de espesor de la fase interna). Se utilizó helio como gas portador con una velocidad lineal de 20,4 cm s^{-1} . La fibra se situó en el inyector y la temperatura del horno del cromatógrafo de gases se mantuvo 6 min a 38 °C, a continuación se incrementó hasta 105 °C a razón de 6 °C min^{-1} , posteriormente se incrementó hasta 220 °C a razón de 15 °C min^{-1} y se

mantuvo 5 min. La temperatura del detector se mantuvo a 240 °C durante todo el análisis.

Los resultados se expresaron como porcentaje de compuesto volátil libre en el espacio de cabeza respecto del hallado en la disolución sin proteína. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los valores se representaron como media y coeficiente de varianza.

4.2.5.2 Cálculo de la cantidad de compuesto volátil unido por g de extracto proteico.

Los compuestos volátiles se añadieron a los viales control y con proteína a la misma concentración mencionada en el apartado 4.2.4 y también se adicionaron diluidos 1/100 y 1/500. La cantidad de compuesto volátil se determinó por cromatografía de gases previa extracción con SPME utilizando las condiciones optimizadas. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

La concentración en el espacio de cabeza ([HS]) se calculó empleando la ecuación 1

$$[HS] = \frac{A_F}{m \times V_F \times K} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde A_F es el área (CG-FID) de los compuestos volátiles adsorbidos por la fibra de SPME, m es la pendiente de la recta patrón obtenida al inyectar cantidades conocidas de cada compuesto aromático, V_F es el volumen de la fibra ($5,3 \times 10^{-7}$ L) y K es el coeficiente de partición fibra-aire de cada compuesto volátil para la fibra CAR/PDMS 75 μm obtenido de Gianelli et al (2003).

La concentración de volátil libre en la fase acuosa (μM) y el volátil unido/ proteína ($\mu\text{mol/g}$) se calcularon utilizando la concentración en el espacio de cabeza de los viales con y sin proteína (ecuaciones 2 y 3, respectivamente).

$$\text{Concentración de volátil en la fase acuosa} = \frac{[HS]_p}{[HS]_c} \times O \quad \text{Ecuación 2}$$

$$\text{Volátil unido / proteína} = \frac{([HS]_c - [HS]_p) \times O}{[HS]_c \times C_p} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde $[HS]_c$ (mol/L) es la concentración de compuesto volátil en el espacio de cabeza en los viales control, $[HS]_p$ (mol/L) es la concentración de compuesto volátil en los viales con proteína, O (mol/L) es la concentración inicial añadida a las disoluciones y C_p (g/L) es la concentración de proteína presente en los viales.

4.2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El efecto de la proteína en la disolución, el tipo de extracto utilizado (músculo porcino, jamón curado de 7 m y 12 m) y el efecto de la fuerza iónica en la interacción con los compuestos volátiles se estudió por análisis de la varianza (ANOVA) con el programa estadístico Statgraphics plus v.5.1. Las medias se compararon mediante el proceso de diferencia mínima significativa de Fischer's (LSD) ($p < 0,05$).

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 INTERACCIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES CON EXTRACTOS DE PROTEÍNAS SARCOPLÁSMICAS

Todos los cambios ocurridos en las proteínas cárnicas durante el procesado son muy importantes ya que estos afectarán no solo a la textura sino también a la interacción entre los compuestos responsables del aroma y sabor y las proteínas y péptidos, y por tanto, estas interacciones serán las responsables de las diferentes percepciones sensoriales (Toldrá y Flores, 1998). En la figura 4.1 se muestra el porcentaje libre de cada compuesto

volátil en el espacio de cabeza en presencia de los extractos de proteínas sarcoplásmicas de: músculo porcino y jamón de 7 y 12 m de curado.

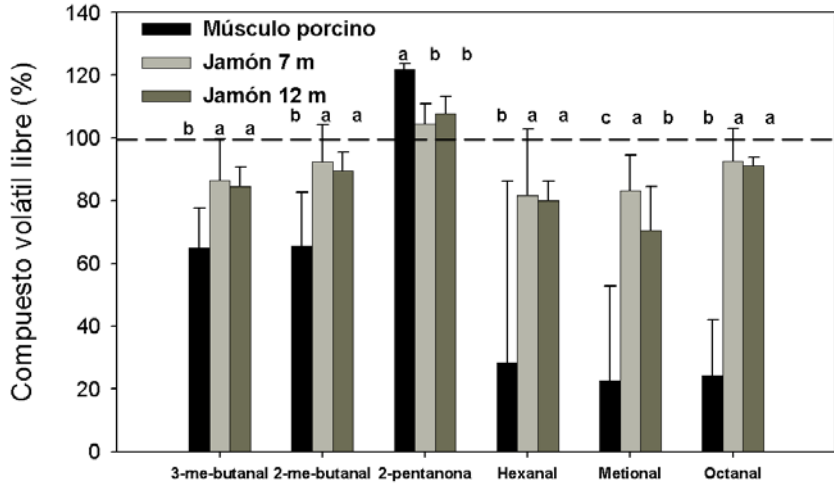


Figura 4.1. Efecto del tipo de extracto de proteínas sarcoplásmicas utilizado (músculo porcino, jamón de 7 y 12 m) en la interacción con los compuestos volátiles. Los resultados se expresan como porcentaje de compuesto volátil libre en el espacio de cabeza de la disolución respecto del encontrado sin proteína.

La presencia de las proteínas sarcoplásmicas produce una disminución ($p < 0,05$) en el espacio de cabeza del porcentaje libre de los compuestos volátiles en el caso del 3-metil-butanol, 2-metil-butanol, hexanal, metional y octanal. Esta disminución significó que los extractos de proteínas sarcoplásmicas presentes unieron estos compuestos volátiles. Sin embargo, el efecto opuesto se observó para la 2-pentanona donde se detectó un aumento ($p < 0,05$) del porcentaje libre en presencia de estos extractos proteicos. Por otra parte, el efecto de los extractos proteicos no siempre fue el mismo y dependió del tipo de extracto (músculo porcino o jamón curado). La presencia del extracto de proteínas sarcoplásmicas de músculo porcino en la disolución produjo una reducción del porcentaje libre

del 3-metil-butanal, 2-metil-butanal, hexanal, metional y octanal y un aumento del porcentaje libre de 2-pentanona, mientras que este efecto resultó significativamente diferente al producido por los extractos proteicos de jamón curado de 7 y 12 m.

Los extractos proteicos obtenidos en este estudio son una mezcla compleja de proteínas sarcoplásmicas que incluyen enzimas glicolíticas, mioglobina y también pequeños péptidos, aminoácidos y sales como previamente indicaron Pérez-Juan et al. (2006b). En este sentido, Gianelli et al. (2003) estudió la interacción de los péptidos solubles y proteínas del músculo esquelético en la liberación de los compuestos volátiles. Estos autores mostraron que la carnosina era capaz de unir los mismos compuestos volátiles excepto la 2-pentanona mientras que la anserina y la mioglobina unían significativamente hexanal y 2-metil-butanal. La mioglobina, como componente de la fracción sarcoplásmica, está presente en los extractos de proteínas sarcoplásmicas de músculo porcino y jamón de 7 y 12 meses. Los dipéptidos, carnosina y anserina, que no se degradan durante el proceso de curado también están presentes en estos extractos (Toldrá et al., 2000). Por tanto, estos compuestos podrían ser los responsables de la interacción observada en el figura 4.1 junto con otros compuestos presentes en los extractos proteicos. En este sentido, las diferencias observadas en la interacción con los extractos de jamón de 7 y 12 meses en comparación con los de músculo porcino podría deberse a la degradación de las proteínas sarcoplásmicas o también a la presencia de una elevada concentración de sales. Asimismo, la presencia de sales minerales en queso produjo un efecto de liberación de compuestos aromáticos (Pionnier et al., 2002).

Los moles de 3-metil-butanal, 2-metil-butanal, hexanal y metional unidos por los extractos de proteínas sarcoplásmicas de músculo porcino y jamones de 7 y 12 m se muestran en la figura 4.2. El aumento de la concentración de compuesto volátil añadido a la disolución proteica produjo un aumento en la cantidad de compuesto unido por el extracto proteico (figura 4.2). Los extractos de proteínas sarcoplásmicas de músculo porcino

unieron una mayor cantidad de 3-metil-butanal (figure 4.2 A), 2-metil-butanal (figure 4.2 B), hexanal (figure 4.2 C) y metional (figure 4.2 D) que los extractos de jamón de 7 y 12 meses. Este hecho concuerda con los resultados mostrados en la figura 4.1. Gianelli et al. (2003) uso un modelo termodinámico para evaluar los parámetros de unión (número de sitios de unión, n , la constante de afinidad, K y la energía libre de Gibb's, ΔG) de la carnosina con el 3-metil-butanal, 2-metil-butanal, 2-pentanona, hexanal, metional y octanal mostrando una ausencia de fenómenos de competición. Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro estudio no pueden compararse con modelos termodinámicos porque la unión observada se debe probablemente a la presencia de diversos componentes en los extractos de proteínas sarcoplásmicas.

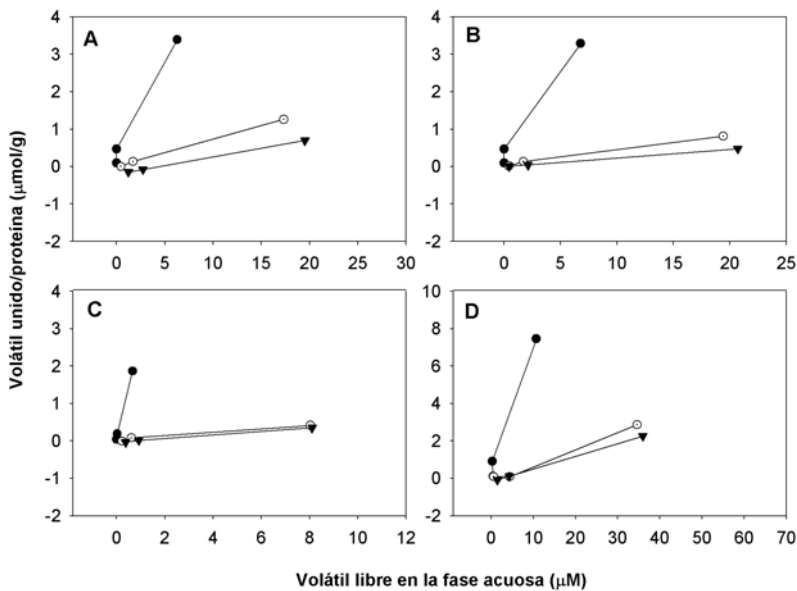


Figura 4.2. Moles de compuesto volátil unidos por el extracto de proteínas sarcoplásmicas de músculo porcino (-●-), jamón curado de 7 m (-○-) y jamón curado de 12 m (-▼-) vs a la concentración de volátil libre en la fase acuosa. A) 3-metil-butanal, B) 2-metil-butanal, C) hexanal y D) metional.

4.3.2 INTERACCIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES CON EXTRACTOS DE PROTEÍNAS MIOFIBRILARES

Las proteínas de la fracción miofibrilar sufren una proteólisis más intensa que la fracción sarcoplásmica, dando lugar a un gran número de péptidos de bajo peso molecular que contribuyen al aroma y sabor del jamón curado (Toldrá y Flores, 1998). En cuanto a la interacción, el porcentaje libre de los compuestos volátiles en el espacio de cabeza en presencia de los extractos de proteínas miofibrilares de músculo porcino y jamones de 7 y 12 meses se muestra en la figura 4.3.

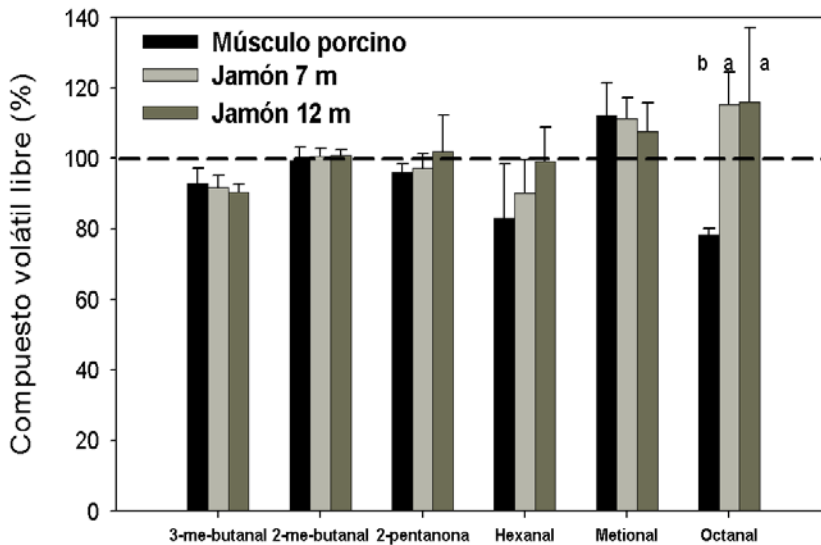


Figura 4.3. Efecto del tipo de extracto de proteínas miofibrilares utilizado (músculo porcino, jamón de 7 y 12 m) en la interacción con los compuestos volátiles. Los resultados se expresan como porcentaje de compuesto volátil libre en el espacio de cabeza de la disolución respecto del encontrado sin proteína.

La presencia del extracto de proteínas miofibrilares produjo un descenso ($p < 0,05$) del porcentaje libre de 3-metil-butanol, hexanal y octanal. Esto significa que las proteínas miofibrilares interaccionan con estos compuestos. Sin embargo, únicamente la interacción del octanal se vio afectada por el tipo de extracto miofibrilar empleado. La presencia de

extractos miofibrilares de músculo porcino produjo una disminución significativa del porcentaje libre de octanal mientras que se observó una liberación significativa de octanal en presencia de extractos miofibrilares de jamón de 7 y 12 meses. Sin embargo, el tipo de extracto miofibrilar (músculo porcino o jamón de 7 y 12 meses) no produjo una diferencia significativa en el porcentaje libre de 3-metil-butanal, 2-metil-butanal, 2-pentanona, hexanal y metional en el espacio de cabeza. Aunque existen pocos trabajos sobre la interacción de las proteínas miofibrilares, Goodridge et al. (2003) encontraron que las miofibrillas congeladas de pollo actuaban como reservorio de hexanal. Asimismo, al utilizar bajas concentraciones de hexanal (0,01 mg/mL), estos autores observaron una diferencia de un 20 % entre el área del pico del hexanal solo comparado con el área obtenida en presencia de miofibrillas de pollo. Esto indicaba que el hexanal era retenido por las miofibrillas. En nuestro estudio, observamos una disminución de un 20 % de hexanal en presencia de las proteínas miofibrilares de porcino sin embargo, esta disminución fue menor en presencia de los extractos miofibrilares de jamón de 7 y 12 meses.

Para estudiar la interacción entre 3-metil-butanal, 2-metil-butanal, hexanal y octanal con los extractos de proteínas miofibrilares de músculo porcino y jamones de 7 y 12 meses, se calcularon los moles unidos por gramo de extracto proteico. Los resultados se muestran en la figura 4.4. Las diferentes cantidades de compuesto volátil adicionado a los extractos miofibrilares aumentaron la concentración de compuesto volátil libre en la fase acuosa pero sólo en el caso de los extractos miofibrilares de músculo porcino se observó un aumento en los moles unidos por g de extracto proteico de 3-metil-butanal (figura 4.4 A), 2-metil-butanal (figura 4.4 B) y hexanal (figura 4.4 C). Sin embargo, la adición de diferentes cantidades de compuesto volátil a los extractos de proteínas miofibrilares de 7 y 12 m no incrementó los moles unidos de los compuestos volátiles excepto en el caso del hexanal (figura 4.4 C). Comparando con los moles unidos por los extractos de proteínas sarcoplásmicas (figura 4.2), los extractos de proteínas miofibrilares unen menos moles de 3-metil-butanal, 2-metil-

butanal y hexanal como se observa en la figura 4.4. Sin embargo, Goodridge et al. (2003) encontraron que el porcentaje de hexanal que se extraía del sistema en presencia de las miofibrillas de pollo era menor a altas concentraciones de hexanal. Esto podría ser debido a la saturación de un número limitado de los sitios de unión del hexanal. En nuestro estudio, la saturación de los sitios de unión no se alcanzó debido a la baja concentración de compuesto volátil.

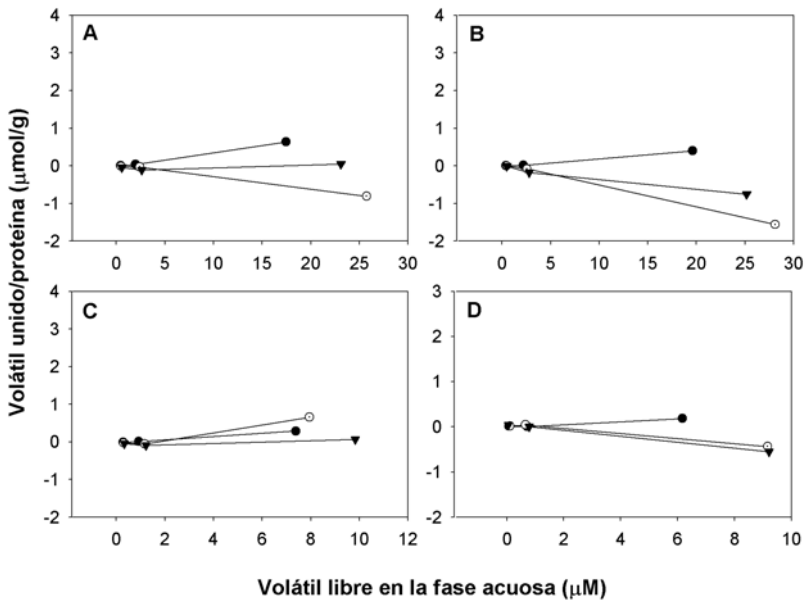


Figura 4.4. Moles de compuesto volátil unidos por el extracto de proteínas miofibrilares de músculo porcino (-●-), jamón curado de 7 m (-○-) y jamón curado de 12 m (-▼-) vs a la concentración de volátil libre en la fase acuosa. A) 3-metil-butanal, B) 2-metil-butanal, C) hexanal y D) octanal.

4.3.3 EFECTO DE LA FUERZA IÓNICA EN LA CAPACIDAD DE INTERACCIÓN DE EXTRACTOS DE PROTEÍNAS SARCOPLÁSMICAS Y MIOFIBRILARES

La sal (NaCl) es uno de los ingredientes más importantes usados durante el proceso de curado y por tanto, estará presente en los extractos de proteínas sarcoplásmicas de jamón curado de 7 y 12 m pudiendo afectar a su interacción con los compuestos volátiles. El efecto de la sal en la volatilidad de los compuestos aromáticos se ha estudiado en disolución (Nawar, 1971) y en sistemas modelo (Guichard, 2002) debido a su efecto de “salting-out” (Kinsella, 1990). Por este motivo, las proteínas sarcoplásmicas extraídas de músculo porcino y de jamones de 7 y 12 meses se dializaron frente a diferentes tampones, con y sin NaCl. El porcentaje libre de cada compuesto volátil respecto del control en presencia de los extractos de proteínas sarcoplásmicas y de los extractos dializados se muestra en la figura 4.5.

En presencia de las proteínas sarcoplásmicas extraídas de músculo porcino, se observó que cuando las proteínas se dializaron frente a los dos tampones, con y sin sal, se produjo un aumento significativo del porcentaje libre de 3-metil-butanal (figura 4.5 A), 2-metil-butanal (figura 4.5 B), hexanal (figura 4.5 D), metional (figura 4.5 E) y octanal (figura 4.5 F), y una disminución significativa del porcentaje libre de 2-pentanona (figura 4.5 C). Este efecto fue debido probablemente a la pérdida de pequeños péptidos y aminoácidos durante el proceso de diálisis que podrían ser los responsables de la interacción con los compuestos ensayados (Zhou y Decker, 1999; Gianelli et al., 2003). Asimismo, se observó un aumento significativo para el octanal (figura 4.5 F) entre las proteínas dializadas frente al tampón sin sal y dializadas en presencia de sal.

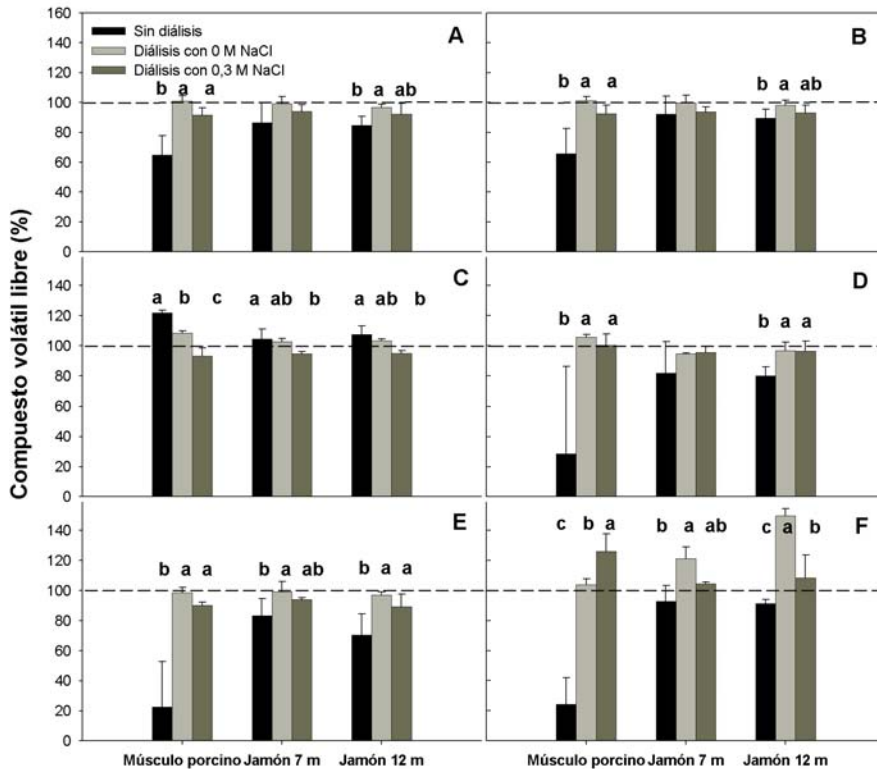


Figura 4.5. Efecto de la fuerza iónica en la capacidad de interacción de extractos de proteínas sarcoplásmicas con compuestos volátiles. Los resultados se expresan como porcentaje de compuesto volátil libre en el espacio de cabeza de la disolución respecto del encontrado sin proteína en cada disolución tampón. A) 3-metil-butanol, B) 2-metil-butanol, C) 2-pentanona, D) hexanal, E) metional y F) octanal.

Por otra parte, los extractos de proteínas sarcoplásmicas extraídas de jamón curado de 7 m sólo mostraron un aumento significativo del porcentaje libre de metional (figura 4.5 E) y octanal (figura 4.5 F) cuando se dializaron sin NaCl. Sin embargo, se apreció una disminución del porcentaje libre de 2-pentanona (figura 4.5 C) cuando la diálisis se realizó frente al tampón con 0,3 M de NaCl. Finalmente, con los extractos de proteínas sarcoplásmicas de jamón curado de 12 m después de la diálisis se observó un aumento significativo del porcentaje libre de 3-metil-butanol (figura 4.5 A), 2-metil-

butanal (figura 4.5 B), hexanal (figura 4.5 D), metional (figura 4.5 E) y octanal (figura 4.5 F). Sin embargo, se observó una disminución significativa en el porcentaje libre de 2-pentanona (figura 4.5 C) después de la diálisis frente al tampón con sal. Resumiendo, la diálisis de las proteínas sarcoplásmicas extraídas de músculo porcino y de jamón curado produjo una pérdida de compuestos responsables de la interacción con los compuestos volátiles estudiados (Zhou y Decker, 1999; Gianelli et al., 2005) como se observó por el incremento del porcentaje libre de los compuestos volátiles después de los procesos de la diálisis excepto en el caso de la 2-pentanona. Aunque, no existen estudios sobre el efecto de la fuerza iónica en la capacidad de interacción de los extractos de proteínas sarcoplásmicas, Guichard et al. (2002) estudió el efecto de la composición de la disolución en la conformación proteica y su capacidad para interaccionar con los compuestos volátiles. Estos autores encontraron que la disminución en la retención de benzaldehído por la β -lactoglobulina en presencia de NaCl se debía al efecto de "salting-out".

En el caso de las proteínas miofibrilares, se debe tener en cuenta que dichas proteínas se extrajeron en presencia de yoduro potásico 0,7 M. A esta elevada fuerza iónica, las proteínas se solubilizan y su conformación se ve, por tanto, afectada (Pearson y Young, 1989). Por este motivo, los extractos de proteínas miofibrilares de músculo porcino y de jamones curados de 7 y 12 m fueron dializados frente a dos tampones diferentes, con presencia o ausencia de NaCl, con el objeto de estudiar cómo el cambio en la conformación proteica afecta a la capacidad de interacción proteína-volátil. En la figura 4.6 se muestra el porcentaje de cada volátil libre respecto del control en presencia de los extractos de proteínas miofibrilares y de estos extractos tras el proceso de diálisis.

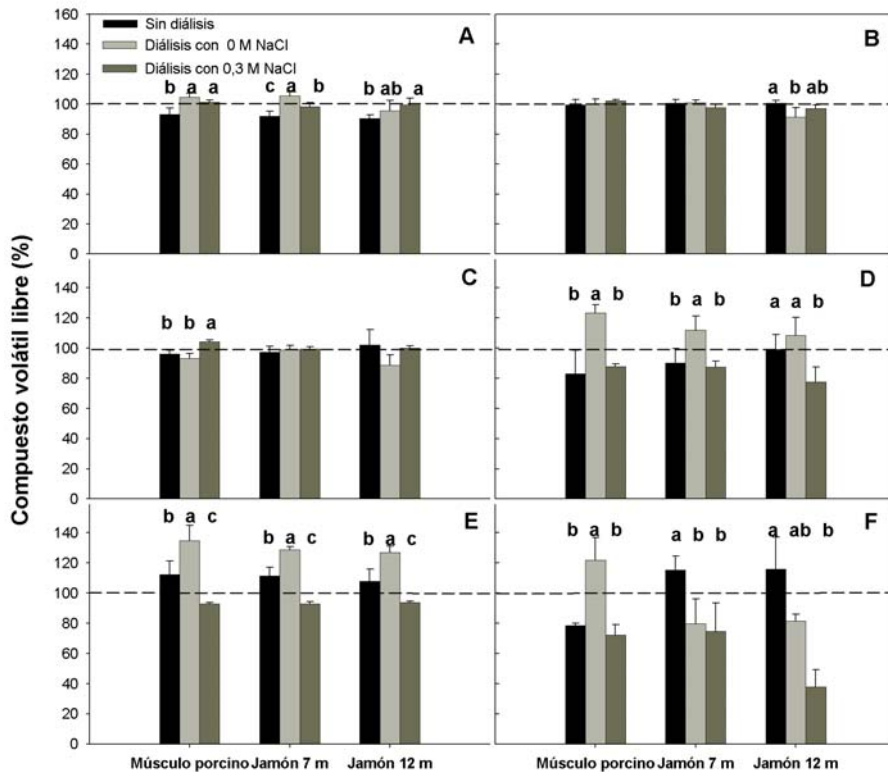


Figura 4.6. Efecto de la fuerza iónica en la capacidad de interacción de extractos de proteínas miofibrilares con compuestos volátiles. Los resultados se expresan como porcentaje de compuesto volátil libre en el espacio de cabeza de la disolución respecto del encontrado sin proteína en cada disolución tampón. A) 3-metil-butanal, B) 2-metil-butanal, C) 2-pentanona, D) hexanal, E) metional y F) octanal.

En presencia de las proteínas miofibrilares extraídas de músculo porcino, se observó que cuando los extractos se dializaron frente al tampón que no contenía NaCl, se produjo un aumento significativo del porcentaje libre de 3-metil-butanal (figura 4.6 A), hexanal (figura 4.6 D), metional (figura 4.6 E) y octanal (figura 4.6 F). Sin embargo, cuando el tampón de diálisis contenía NaCl 0,3 M solo el porcentaje libre de 2-pentanona (figura 4.6 C) se incrementó significativamente y el porcentaje libre de metional (figura 4.6 E) disminuyó significativamente. Estas diferencias podrían explicarse por el

cambio en la fuerza iónica que afecta a su vez a la conformación de las proteínas miofibrilares (Pearson y Young, 1989) y también a su capacidad de interacción. Este hecho se observó en el caso del hexanal, metional y octanal donde la capacidad de interacción de las proteínas miofibrilares se perdió en ausencia de sal mientras que se mantuvo en presencia de NaCl 0,3 M. El mismo efecto se observó en el caso de los extractos de proteínas miofibrilares de jamón de 7 meses para el hexanal (figura 4.6 D) y metional (figura 4.6 E) y en el caso de los extractos de proteínas miofibrilares de jamón de 12 m sólo para el metional (figura 4.6 E). Sin embargo, se observó una disminución significativa del porcentaje libre de octanal (figura 4.6 F) cuando los extractos de jamón de 7 y 12 m se dializaron con y sin sal.

Las diferencias observadas en el octanal entre los extractos de jamón curado y de músculo porcino podrían deberse a la proteólisis ocurrida durante el proceso de curado que modifica la composición proteica de estos extractos (Pérez-Juan et al., 2006b) y, por tanto, afectará a su capacidad de interacción. Damodaran y Kinsella (1983) estudiaron el efecto de la fuerza iónica en la capacidad de interacción de la actomiosina con diversos compuestos carbonilo. Estos autores encontraron que la afinidad y la capacidad de interacción fueron más elevadas en presencia de NaCl 0,15 M, condiciones similares a las del músculo, que a NaCl 0,6 M donde la actomiosina está totalmente soluble. Aunque los compuestos volátiles estudiados por estos autores fueron diferentes, sus resultados confirmarían lo observado en el presente estudio, es decir, el hecho de que la conformación de las proteínas miofibrilares es importante para su capacidad de interacción aunque ésta depende del tipo de volátil estudiado. O'Keefe et al (1991) estudió el efecto de la concentración de NaCl en la capacidad de interacción de las proteínas de soja (glicina y β -conglucina). Estos autores mostraron que la presencia de NaCl 0,5 M incrementa la presencia de hexanal en el espacio de cabeza y reduce su afinidad por la β -conglucina, mientras que no tiene efecto para la glicina. Como se vio con las proteínas miofibrilares, la fuerza iónica del medio afecta a la conformación de estas dos proteínas de soja.

Finalmente, la comparación de los resultados obtenidos con los de otros autores resulta difícil debido a las diferentes condiciones experimentales utilizadas. Sin embargo, el efecto de la estructura de la carne en la interacción con los compuestos volátiles no ha sido elucidado todavía, por lo que se requiere profundizar en la investigación sobre el efecto de las proteínas del músculo esquelético en la unión de compuestos responsables del aroma para determinar el impacto relativo de los componentes musculares en la liberación del aroma.

En conclusión, la capacidad de interacción de la fracción de proteínas sarcoplásmicas fue más elevada que la de la fracción miofibrilar para los compuestos volátiles estudiados. Todos los compuestos estudiados fueron retenidos por los extractos de proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares excepto la 2-pentanona que fue liberada. Esto se confirmó por una mayor unión por parte de las proteínas sarcoplásmicas que por las miofibrilares en el caso del 3-metil-butanal, 2-metil-butanal, hexanal y metional. Además, se determinó el efecto de la fuerza iónica en la capacidad de las proteínas para interaccionar con los compuestos volátiles. El efecto de la fuerza iónica fue mayor en el caso de las proteínas miofibrilares debido a su capacidad de producir cambios en la conformación proteica que afectaron a la capacidad de interacción de estas proteínas. Sin embargo, la capacidad de interacción de las proteínas sarcoplásmicas parece estar más relacionada con los componentes de pequeño tamaño contenidos en estos extractos que con la fuerza iónica.

CAPÍTULO III

PROCESO DE PURIFICACIÓN
SIMULTÁNEO DE ACTOMIOSINA Y
ACTINA DE MÚSCULO ESQUELÉTICO
POST-RIGOR DE PORCINO

5 PROCESO DE PURIFICACIÓN SIMULTÁNEO DE ACTOMIOSINA Y ACTINA DE MÚSCULO ESQUELÉTICO POST-RIGOR DE PORCINO

5.1 INTRODUCCIÓN

La purificación de los constituyentes del músculo es de gran utilidad para diversos estudios tanto fisiológicos como bioquímicos. En este sentido, la purificación de los componentes del músculo permite que puedan ser caracterizados y, por tanto, se puedan utilizar para relacionarlos con la calidad de la carne (Bowker, et al., 2004; Hidalgo et al., 2001), el conocimiento de los cambios post-mortem (Toldrá, 2005), la identificación de proteínas contaminantes que son añadidas a los productos cárnicos (Toorop et al., 1997) e incluso con el estudio de fenómenos de interacción con otros componentes de la matriz (Gianelli et al., 2003). La miosina y la actina, como componentes principales de las proteínas miofibrilares, no son sólo importantes en la fisiología del músculo, sino también se cree que son responsables de propiedades funcionales importantes en los alimentos tales como la capacidad de retención agua, de emulsión, de unión y gelificación tanto en la carne como en los productos cárnicos (Asghar et al., 1985). Dependiendo del propósito de la investigación, se han desarrollado un gran número de métodos con el fin de purificar estas proteínas, aunque la mayoría de ellos resultan muy tediosos ya que incluyen numerosos pasos de extracción (Syrový, 1984). Sin embargo, también se han desarrollado diversos métodos rápidos de purificación para su aplicación industrial (Toorop et al., 1997; Murch et al., 1992).

Por lo general, la mayoría de las proteínas miofibrilares se extraen en procesos separados (Syrový, 1984). Concretamente, la purificación de la miosina suele iniciarse con la eliminación de las proteínas sarcoplásmicas mediante varios lavados con tampón fosfato diluido. Posteriormente, la purificación de miosina se realiza usando los tampones de Guba–Straub

(Hermansson et al., 1986) y Hasselback-Schneider (Dudziak y Foegeding, 1988) con diversas modificaciones (apartado 1.1.3.1). Por lo general, estos tampones suelen contener EDTA o EGTA para eliminar los metales pesados y proteger la actividad enzimática de las proteínas (Syrový, 1984). En otras modificaciones, el DTT o el β -mercaptoetanol se añaden a bajas concentraciones para evitar la oxidación de la miosina. Además, la eliminación de los contaminantes se realiza por precipitación con sulfato amónico y diversos métodos cromatográficos (Syrový, 1984). Por otra parte, se han aplicado altas presiones para incrementar la solubilidad de las proteínas miofibrilares (Macfarlane y Mckenzie, 1976) y algunos autores incluso han utilizado la técnica de HPLC para separar miosina del extracto utilizando como fase móvil disoluciones con alta fuerza iónica (Murch et al., 1992).

Por otro lado, el método clásico de purificación de la actina se inicia con la eliminación de la miosina y otras proteínas miofibrilares usando técnicas de extracción que emplean disoluciones con alta fuerza iónica. Posteriormente, la ruptura de las uniones intermoleculares en la actina-F se realiza utilizando acetona o yoduro potásico (Syrový, 1984) que finalmente conlleva a la extracción de la actina-G. En consecuencia, el protocolo de purificación de la actina puede dividirse en dos partes: primero, se prepara el polvo de acetona y seguidamente se realiza la purificación de la actina-G. En este último paso, se añade ATP al tampón de extracción para mantener la integridad funcional de la actina (Pardee y Spudich, 1982). Tras la extracción, el proceso de purificación continua durante varios días con ciclos sucesivos de polimerización y despolimerización para eliminar los contaminantes (Pardee y Spudich, 1982). Las variaciones existentes en este método se centran fundamentalmente en la disolución de extracción utilizada, en la velocidad de centrifugación y en el proceso utilizado para obtener un mayor grado de purificación dependiendo de la pureza deseada y del uso que se vaya a dar a la proteína.

Además, la mayoría de los procesos de purificación parten de músculo en estado pre-rigor (Syrový, 1984), pero en la fabricación de

productos cárnicos la mayoría de los músculos se encuentran en estado post-rigor. Asimismo, los constituyentes extraídos del músculo post-rigor pueden tener características diferentes a los de los músculos en estado pre-rigor (Fukazawa et al., 1970). Por tanto, resulta de gran interés determinar, por ejemplo, las propiedades funcionales de las proteínas a nivel molecular en los productos procesados (Dudziak y Foegeding, 1988).

Los métodos utilizados para purificar proteínas miofibrilares resultan largos y tediosos. Por tanto, el objetivo de este estudio es la purificación de actomiosina y actina, en un único proceso de extracción, a partir de músculo en estado post-rigor de porcino, mediante solubilidad diferencial, cromatografía de filtración en gel y diversos pasos de purificación para llegar a la obtención de fracciones proteicas que puedan utilizarse en estudios posteriores.

5.2 MATERIAL Y MÉTODOS

5.2.1 MATERIALES

Las sales, $MgCl_2$, KCl , $NaCl$, NaN_3 , NaH_2PO_4 se adquirieron de Panreac (Barcelona, España), $CaCl_2$ de Sharlau (Barcelona, España) y $Na_4P_2O_7 \cdot 10 H_2O$ de Riedel-de Haën (Seelze), EGTA (ácido Etilen glicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético), β -mercaptoetanol y $ATPNa_2$ (sal disódica de adenosina 5'-trifosfato) de Sigma (St.Louis, MO, USA) y EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) de Panreac (Barcelona, España). Tris (Tris(hidroximetil)-aminometano) y KH_2PO_4/K_2HPO_4 de Panreac (Barcelona, España). Todos los reactivos fueron de grado de pureza >98%.

Los patrones de peso molecular de amplio rango para SDS-PAGE (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) fueron: miosina (200 kDa), β -galactosidasa (116 kDa), fosforilasa-b (97,4 kDa), albúmina de suero bovino (66,2 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y anhidrasa carbónica (31 kDa). Los patrones de peso molecular para la cromatografía de filtración en gel fueron:

miosina (450 kDa) y anhidrasa carbónica (31 kDa) de Sigma (St.Louis, MO, USA) y albúmina de suero bovino (66,2 kDa) de Roche (Mannheim, Alemania).

5.2.2 MUESTRA

Se adquirió el músculo porcino (*Longissimus dorsi*) a los 2 días *post-mortem*, de una carnicería local. La grasa y el tejido conectivo fueron eliminadas y se cortó la carne en porciones, que se envasaron a vacío y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2.3 PROCESO DE PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

5.2.3.1 Proceso simultáneo de purificación

El proceso de purificación simultáneo (figura 5.1) empezó con el lavado por triplicado de 50 g de músculo de porcino post-rigor con Tris-HCl 0,1 M a pH 7,0 con EDTA 20 mM (tampón de lavado) para eliminar las proteínas sarcoplásmicas. Posteriormente, las proteínas miofibrilares se extrajeron con el tampón Hasselbach-Schneider que consiste en $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,1 M a pH 6,4 con KCl 0,6 M, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ 10 mM, MgCl_2 1 mM y EGTA 20 mM (Dudziak y Foegeding, 1988) y posteriormente se precipitaron diluyendo con agua destilada en proporción 1/20. El último precipitado (M4p, figura 5.1) se sometió a una purificación posterior empleando cromatografía de filtración en gel en una columna XK (\varnothing 2,6 cm x 66,5 cm. Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) rellena con Sephacryl S-300 que posee un rango de fraccionamiento de 10-1500 kDa.

MÚSCULO DE PORCINO

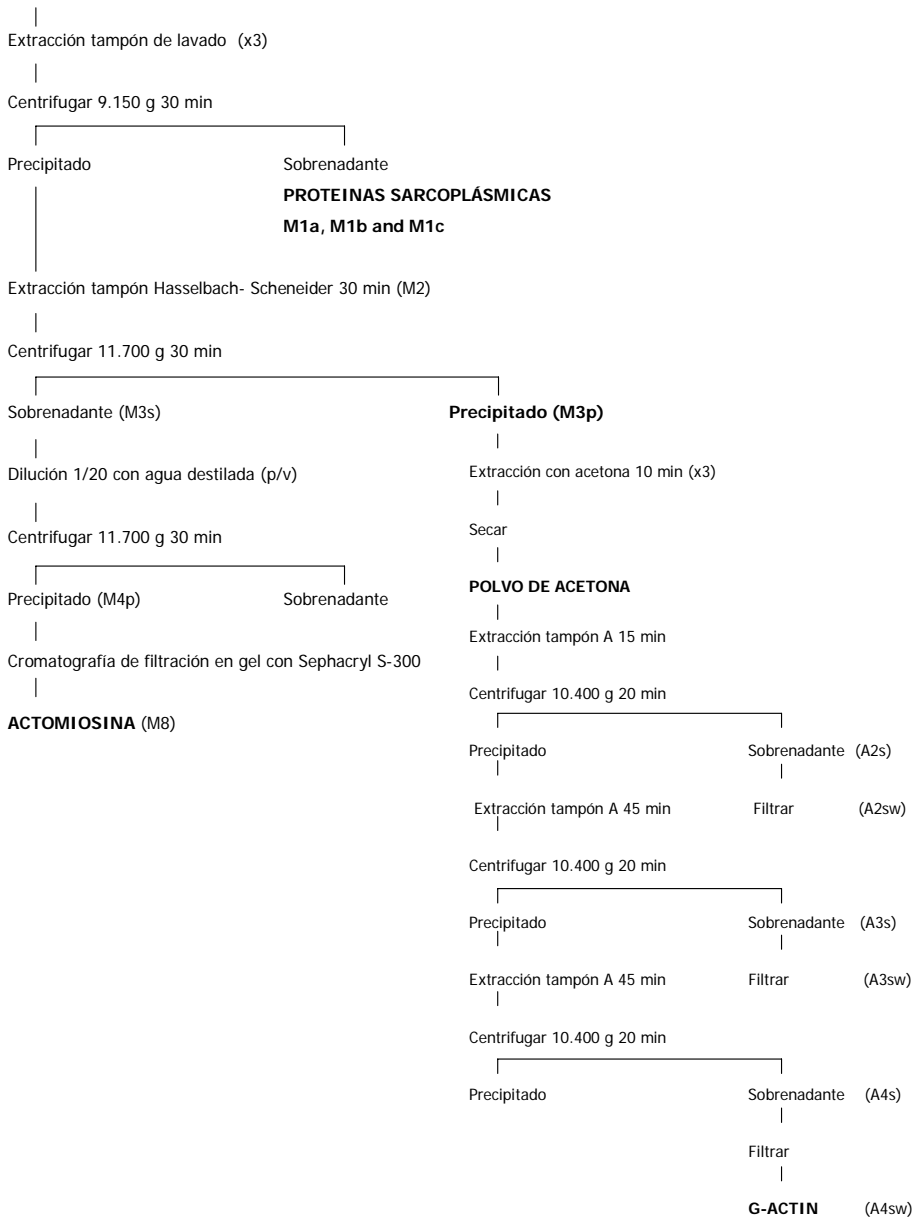


Figura 5.1. Proceso simultáneo de purificación de actomiosina y actina de músculo porcino en estado post-rigor. El tampón de lavado, el tampón Hasselbach Schneider y el tampón A se describen en Material y Métodos (apartado 5.2.3.1)

La muestra se eluyó con $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 20 mM a pH 7,0 con 0,5 M NaCl. La elución se realizó a un flujo de 18 mL/h y se recogieron 80 fracciones. El perfil de elución se siguió por la medida de la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech, England). La fracción M8 quedó constituida por la combinación de las 6 fracciones que dieron el máximo de absorbancia. Previamente, la columna se calibró usando 1 mg/mL de miosina (450 kDa), albúmina de suero bovino (66,2 kDa) y anhidrasa carbónica (31 kDa) que eluyeron en las fracciones 12, 30 y 39 respectivamente (resultados no incluidos).

En la segunda parte del proceso, el precipitado obtenido después de la extracción con el tampón Hasselbach-Schneider (M3p, figura 5.1) se usó para preparar el polvo de acetona, mediante tres extracciones sucesivas con acetona (20 vol/g precipitado) durante 10 min y posteriormente se filtró a través de papel Whatman. Mas tarde, el polvo de acetona se utilizó para la purificación de actina-G con tampón A (20 mL/g polvo de acetona) constituido por Tris-HCl 2 mM a pH 8,0 y ATPNa_2 0,2 mM, β -mercaptoetanol 0,5 mM, CaCl_2 0,2 mM y NaN_3 al 0,005 % utilizando distintos tiempos de extracción. Las fracciones obtenidas en cada paso se filtraron con papel Whatman dando lugar a las fracciones A2sw, A3sw y A4sw.

5.2.3.2 Proceso de purificación de Dudziak

Al mismo tiempo, se ensayó también el proceso descrito por Dudziak y Foegeding (1988) para purificar miosina y actomiosina de músculo porcino en estado post-rigor (figura 5.2).

En este proceso se siguieron los mismos pasos que el proceso de purificación simultáneo (figura 5.1) hasta obtener la fracción M4p. Posteriormente, se realizaron dos lavados usando el tampón D1 (Tris-HCl 0,5 M a pH 7,0 con 1,5 M KCl) y el tampón D2 (NaH_2PO_4 20mM a pH 7,0 con 3,0 M KCl y 0,5 M NaCl) que dieron lugar a las fracciones M5p y M6s, respectivamente.

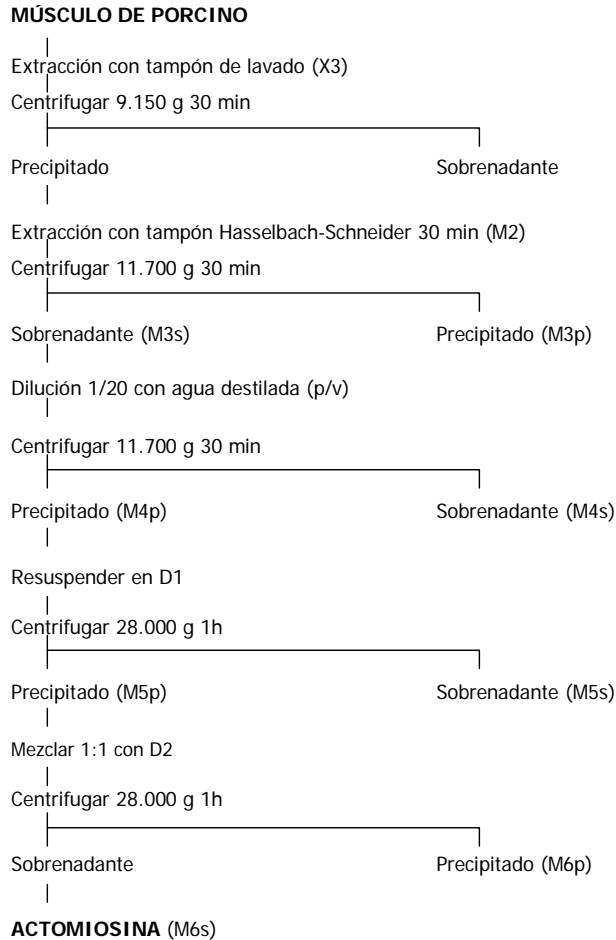


Figura 5.2. Proceso de purificación Dudziak de actomiosina a partir de músculo porcino en estado post-rigor. El tampón de lavado, el tampón Hasselbach-Schneider y los tampones D1 y D2 se describen en Material y Métodos (apartado 5.2.3.2).

5.2.3.3 Proceso de purificación de Pardee y Spudich.

Asimismo, el proceso descrito por Pardee y Spudich (1982) se ensayó para la purificación de actina (figura 5.3). Sin embargo, como material de

partida se utilizó el precipitado (M3p) obtenido en el proceso de purificación simultáneo (figura 5.1) en lugar de comenzar con músculo porcino en estado post-rigor. Este proceso incluyó, la obtención del polvo de acetona y la purificación de la actina-G. El polvo de acetona se obtuvo de la extracción por quintuplicado de la fracción M3p con acetona durante 20 min (figura 5.3). Posteriormente, la purificación de la actina del polvo de acetona se realizó repitiendo dos veces la extracción con el tampón A (descrito en el apartado 5.2.3.1) y agitando durante 30 min. Los sobrenadantes obtenidos (A2s y A3s) se combinaron para obtener la fracción A4s que se centrifugó y dio lugar a la fracción A5 constituida por actina-G.

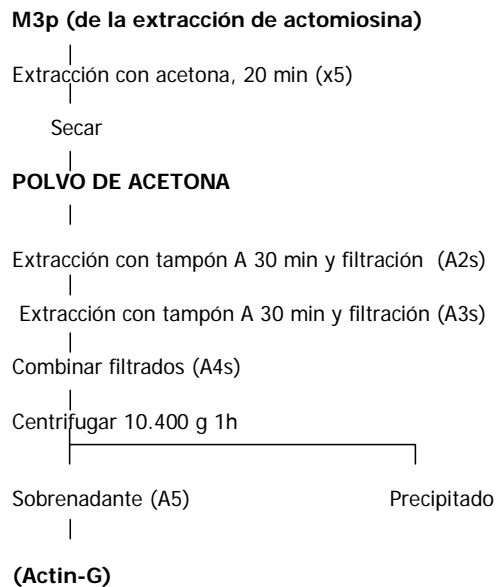


Figura 5.3. Proceso de purificación de Pardee y Spudich de actina a partir de músculo porcino en estado post-rigor. El tampón A se describe en Material y Métodos (apartado 5.2.3.1).

5.2.4 MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

La concentración proteica en cada fracción se determinó según el método del ácido bicinónico (Smith et al., 1985) usando albúmina de suero bovino como patrón. Los valores son la media de cuatro repeticiones.

5.2.5 ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO

La pureza de las fracciones extraídas se verificó por electroforesis desnaturante con dodecil-sulfato sódico en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10 % y 12 % teñidos con plata (Merril et al., 1981). La identificación de las bandas se realizó por comparación con los patrones de peso molecular miosina (200 kDa), β -galactosidasa (116 kDa), fosforilasa-b (97,4 kDa), albúmina de suero bovino (66,2 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y anhidrasa carbónica (31 kDa) de Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA). La cantidad de proteína añadida a cada carril fue de 5 μ g y 12 μ g para los patrones y las muestras, respectivamente.

5.2.6 POLIMERIZACIÓN DE LA ACTINA

La actina-F o forma polimerizada de la proteína se obtuvo añadiendo KCl, $MgCl_2$ y $ATPNa_2$ a la fracción de actina-G a una concentración final de 50 mM, 2 mM y 1 mM, respectivamente. La mezcla se mantuvo durante 12 h a 5 °C y la actina-F se separó por centrifugación a 3500 rpm durante 2 min (MSE Mistral 2000, England). El porcentaje de polimerización se calculó midiendo la cantidad de proteína en el sobrenadante antes y después de la centrifugación (Wang y Smith, 1994).

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1 PURIFICACIÓN DE ACTOMIOSINA

Se han propuesto un gran número de métodos para purificar las proteínas miofibrilares aunque estas proteínas, normalmente se han aislado en procesos separados (Syrový,1984). En este trabajo, la actomiosina se aisló de músculo porcino post-rigor usando el proceso simultáneo propuesto y también, el método propuesto por Dudziak y Foegeding (1988) como se muestra en las figuras 5.1 y 5.2, respectivamente.

En el primer paso del proceso simultáneo de purificación, se extrajeron principalmente las proteínas sarcoplásmicas (M1a, M1b y M1c, figura 5.4 A) como se observó por la elevada concentración de proteína extraída (tabla 5.1).

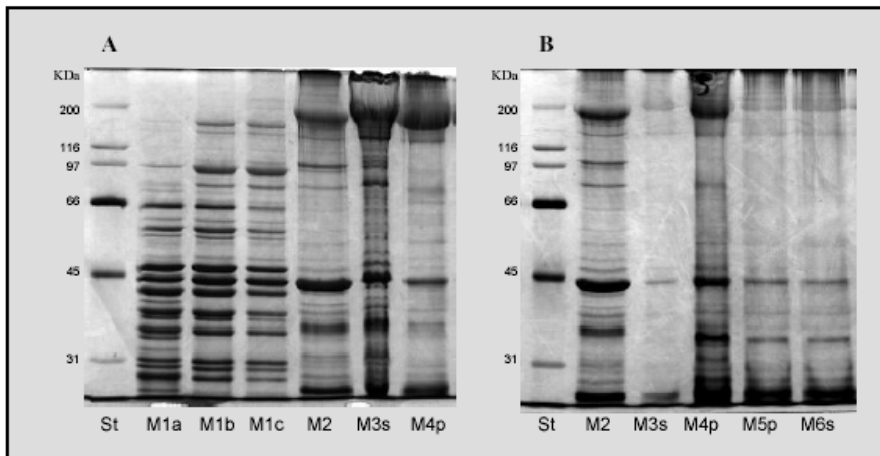


Figura 5.4. Geles de SDS-PAGE (10%) del proceso de purificación de actomiosina teñidos con plata. Proceso simultáneo de purificación (A) y proceso de purificación de Dudziak (B). El nombre de las fracciones en los carriles corresponden a las fracciones obtenidas en los procesos descritos en las figuras 5.1 y 5.2, respectivamente. St: patrones de peso molecular (miosina 200 kDa, β -galactosidasa 116 kDa, fosforilasa-b 97,4 kDa, albúmina de suero bovino 66,2 kDa, ovoalbúmina 45 kDa y anhidrasa carbónica 31 kDa).

Tabla 5.1 Concentración de proteína obtenida y tiempos totales de purificación empleados en los procesos de purificación de actomiosina y actina-G. La concentración de proteína se expresa como valor medio \pm error estándar.

PROCESO	CONCENTRACIÓN PROTEÍCA (mg/mL)								TIEMPO (h) ^a
	M1a	M1b	M1c	M2	M3s	M4p	M8		
Simultáneo ^b	18.4 \pm 1.6	8.7 \pm 0.3	2.8 \pm 0.2	7.3 \pm 0.2	6.5 \pm 0.4	7.1 \pm 0.4	0.31 \pm 0.01		8
Dudziak ^c	18.3 \pm 2.3					4.1 \pm 0.1			10
ACTINA	A2s	A2sw	A3s	A3sw	A4s	A4sw			
Simultáneo	0.73 \pm 0.08	0.86 \pm 0.05	0.45 \pm 0.00	0.42 \pm 0.00	0.86 \pm 0.02	0.86 \pm 0.09			3
Pardee and Spudich ^d	0.75 \pm 0.03				0.62 \pm 0.04				4

^a: tiempos totales aproximados de purificación empleados.

^b: Proceso simultáneo de purificación como se indica en material y métodos (apartado 5.2.3.1).

^c: Proceso Dudziak de purificación como se indica en material y métodos (apartado 5.2.3.2).

^d: Proceso Pardee y Spudich de purificación como se indica en material y métodos (apartado 5.2.3.3).

Después de la extracción usando el tampón Hasselbach-Schneider, las fracciones se enriquecieron en proteínas miofibrilares (M2 a M4p, figura 5.4 A). Esto se observó por la presencia de bandas de mayor intensidad a 200 kDa, 25 kDa y 45 kDa que correspondieron a la cadena pesada de la miosina, a una de las cadenas ligeras de miosina y a la actina, respectivamente (M2 a M4p, figura 5.4 A). Además, estas fracciones mostraron otras bandas contaminantes como troponinas y tropomiosina a 37 y 34 kDa, respectivamente, y la proteína-C a 140 kDa (Wang y Smith, 1984). Asimismo, los geles de SDS-PAGE mostraron fracciones más purificadas a medida que avanzaba el proceso de purificación (M2-M4p, figura 5.4 A) y las fracciones extraídas utilizando alta fuerza iónica (M3s y M4p, figura 5.4 A) presentaron una concentración proteica similar alrededor de 7 mg/mL (tabla 5.1).

Por otra parte, los resultados del proceso de purificación de Dudziak (figura 5.2) en la que se utilizó músculo porcino en estado post-rigor, se muestran en la figura 5.4 (B). El gel de SDS-PAGE mostró que la fracción más enriquecida en actomiosina fue la M4p en la que se observaron bandas más intensas a 200, 25 y 45 kDa que corresponden a las cadenas ligeras y pesadas de la miosina y a la actina, respectivamente. Se observó una reducción de varios contaminantes en los pasos posteriores de la purificación (M5p, figura 5.4 B) aunque, al mismo tiempo se redujo la cantidad de actomiosina, ya que se vio una disminución en la intensidad de las bandas que correspondían a la cadena pesada de la miosina y a la actina.

Además, la fracción M4p se cromatografió usando Sephacryl S-300 con el propósito de separar la miosina de la actomiosina. El perfil cromatográfico mostró un único pico (figura 5.5). Las diferentes fracciones de este pico contenían una banda que corresponde a 45 kDa junto con la cadena pesada de la miosina (200 kDa) y la cadena ligera (25 kDa) como se muestra en la figura 5.6. La ausencia de un pico separado en la fracción 12 indicó que no se consiguió la separación entre la miosina y la actomiosina. Asimismo, la ausencia de un pico entre las fracciones 30 y 39 indicó que la

fracción M4p obtenida por el proceso simultáneo no contenía actina (figura 5.5).

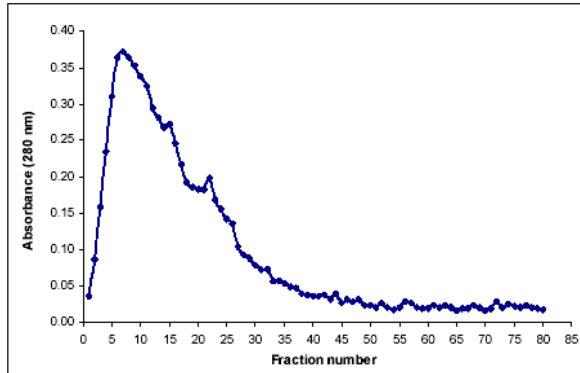


Figura 5.5. Purificación de actomiosina por cromatografía de filtración en gel usando Sephacryl S-300. Previamente, la columna se calibró con diferentes proteínas incluyendo miosina (450 kDa), albúmina de suero bovino (66,2 kDa) y anhidrasa carbónica (31 kDa) que eluyeron en las fracciones 12, 30 y 39, respectivamente (resultados no incluidos).

Por último, se obtuvo una fracción de actomiosina altamente purificada al final del proceso de purificación incluyendo el paso cromatográfico. Esta fracción (M8, tabla 5.1) contenía 0,306 mg /mL de proteína que supone un rendimiento de 0,14 mg de actomiosina por g de músculo, similar al obtenido por Dudziak y Foegeding (1988) aunque obtenido en un proceso más corto ya que se eliminaron los dos lavados que utilizaban los tampones D1 y D2 (M5p y M6, figura 5.4 B). Por otra parte, los resultados obtenidos no se pueden comparar con los obtenidos por otros autores debido a los diferentes procesos usados para la purificación de estas proteínas, el tipo de músculo y la especie animal utilizada así como el uso de músculo en estado pre-rigor o post-rigor. Sin embargo, para reducir los tiempos de purificación, Hidalgo et al. (2001) y Murch et al. (1992) desarrollaron métodos para purificar proteínas miofibrilares que resultaron rápidos y satisfactorios para su uso en la industria pero éstos no resultan

adecuados para obtener elevadas cantidades de proteína con las que realizar estudios posteriores.

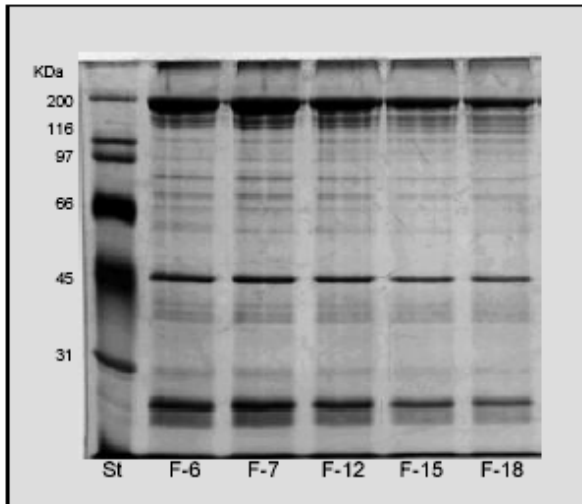


Figura 5.6. Geles de SDS-PAGE al 10 % de las fracciones eluidas de la columna de Sephacryl S-300 teñidos con plata. Los números en los carriles corresponden a las fracciones eluidas de la columna (figura 5.5). St: patrones de peso molecular (miosina 200 kDa, β -galactosidasa 116 kDa, fosforilasa-b 97,4 kDa, albúmina de suero bovino 66,2 kDa, ovoalbúmina 45 kDa y anhidrasa carbónica 31 kDa).

5.3.2 PURIFICACIÓN DE ACTINA

Desde que la actina fue aislada por primera vez por Straub (Pardee y Spudich, 1982) se han desarrollado un gran número de métodos para su purificación, la mayoría de los cuales utilizaron músculo de conejo en estado pre-rigor (Syrový, 1984). En este estudio, el proceso simultáneo y el proceso de Pardee y Spudich (figura 5.1 y figura 5.3) se aplicaron para la obtención de la actina desde el precipitado (M3p, figura 5.1) proveniente de la purificación de la actomiosina. En ambos procesos, se obtuvo, primero, el polvo de acetona y posteriormente, se extrajo la proteína.

El gel de SDS-PAGE de las fracciones obtenidas usando el proceso simultáneo de purificación (figura 5.7 A) mostró que la banda de mayor intensidad, correspondiente a la actina (45 kDa), se obtuvo en los últimos pasos (A4s y A4sw) y su intensidad aumentó a medida que el proceso de purificación avanzaba. Por otro lado, el perfil electroforético (figura 5.7 B) de la purificación de actina-G usando el proceso de Pardee y Spudich mostró que el paso en el que se combinan los sobrenadantes A3s y A2s (figura 5.7 B) sólo incrementa los contaminantes en la fracción resultantes (A4s) y ninguno de estos contaminantes se eliminan en el paso posterior de ultracentrifugación (A5, figura 5.7 B). Sin embargo, el proceso simultáneo sustituye estos dos últimos pasos por dos extracciones más largas, sin combinar los sobrenadantes (A3s y A4s, figura 5.1), obteniendo una fracción enriquecida en actina (figura 5.7). Además, la filtración de las fracciones a través del papel Whatman no redujo las bandas contaminantes (A2sw, A3sw y A4sw, figura 5.7 A).

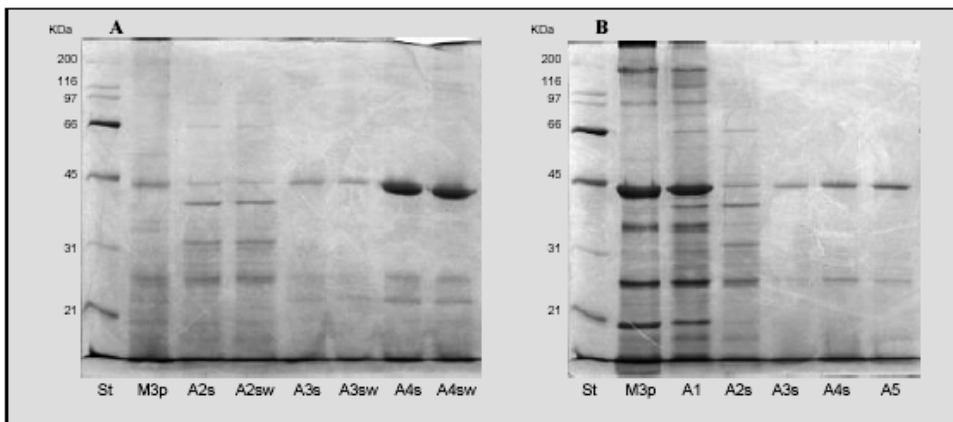


Figura 5.7. Geles SDS-PAGE (12 %) de los procesos de purificación de la actina teñidos con plata. Proceso simultáneo de purificación (A) y Proceso de purificación de Pardee y Spudich (B). El nombre de las fracciones en los carriles corresponden a las fracciones obtenidas por el proceso descrito en la figura 5.1 y 5.3, respectivamente. St: patrones de peso molecular (miosina 200 kDa, β -galactosidasa 116 kDa, fosforilasa-b 97,4 kDa, albúmina de suero bovino 66,2 kDa, ovoalbúmina 45 kDa y anhidrasa carbónica 31 kDa).

Asimismo, la tabla 5.1 muestra que la fracción final (A4sw), enriquecida en actina, tenía una concentración de proteína de 0,86 mg/mL. Esto supuso una recuperación de 18,6 mg de actina-G por g de polvo de acetona ó 2,5 mg por g de carne (músculo porcino post-rigor) mientras que Pardee y Spudich (1982) obtuvieron un rendimiento de 10 mg por g de polvo de acetona aunque sugirieron que se podía conseguir un mayor rendimiento (incluso 30 mg).

Por otra parte, Kuroda et al. (1982) obtuvieron actina-G a partir de miofibrillas tratándolas con acetona pero estas proteínas perdían su capacidad de polimerización después de extracciones prolongadas. Para comprobar la funcionalidad de la actina aislada en el presente trabajo, se polimerizó la fracción A4sw. La proteína conservó la capacidad de polimerización aunque el porcentaje obtenido (64 %) fue menor que el obtenido por Wang y Smith, (1994) probablemente debido al uso de una fracción menos purificada y de una especie animal diferente.

Resumiendo, la actomiosina fue purificada usando un protocolo modificado de Dudziak y Foegeding (1988) donde se utilizó músculo porcino en estado post-rigor en lugar de en estado pre-rigor pero obteniendo una recuperación similar. En el mismo proceso de purificación, la actina-G se extrajo de la misma muestra de músculo siguiendo una modificación del proceso de Pardee y Spudich (1982). En este caso, sin embargo la recuperación fue mayor a la obtenida por estos autores probablemente debido a la obtención de una fracción menos purificada aunque mantuvo su capacidad de polimerización, lo que la hace adecuada para estudios posteriores. No obstante, comparando con los protocolos iniciales de purificación que también se han empleado, el desarrollo del proceso simultáneo requirió menos tiempo siendo ésto de gran utilidad para la purificación de proteínas miofibrilares que posteriormente se usarán en otros estudios.

CAPÍTULO IV

**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN Y
CONFORMACIÓN DE LAS PROTEÍNAS
MIOFIBRILARES PURIFICADAS DE
MÚSCULO PORCINO EN LA
INTERACCIÓN CON COMPUESTOS
VOLÁTILES**

6 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN Y CONFORMACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES PURIFICADAS DE MÚSCULO PORCINO EN LA INTERACCIÓN CON COMPUESTOS VOLÁTILES.

6.1 INTRODUCCIÓN

La actina y la miosina son las proteínas miofibrilares principales del músculo esquelético, no sólo por su abundancia sino también por su participación en el mecanismo de contracción (Pearson y Young, 1989). En primer lugar, la miosina (50 % del total de las proteínas miofibrilares del músculo) es el constituyente principal de los filamentos gruesos que contienen unas 300 moléculas de miosina por filamento. Cada molécula, con un peso de 480 kDa, está compuesta por dos cadenas largas de polipéptidos, llamadas cadenas pesadas, y cuatro pequeñas cadenas denominadas cadenas ligeras (Pearson y Young, 1989). En segundo lugar, la actina es la segunda proteína miofibrilar más abundante en las miofibrillas musculares (20 % del total) y se puede encontrar de dos formas: actina-G o globular y actina-F o fibrosa. Además, cada molécula de actina contiene 5 grupos sulfhidrilo y su polimerización (actina-F) le confiere una mayor protección frente a la proteólisis (Pearson y Young, 1989). Finalmente, la unión de los filamentos de miosina y actina tiene lugar durante la contracción muscular formando el complejo actomiosina, aunque, este complejo se puede formar también en procesos "in vitro" cuando estas dos proteínas se combinan. La formación del complejo actomiosina produce un aumento en la viscosidad de la disolución (Morrissey, 1987) y su composición y peso molecular dependerá mucho de las condiciones experimentales como el pH, la presencia de sales (KCl, MgCl₂) y la concentración proteica (Morrissey, 1987).

Por otra parte, Pearson et al. (1983) revisó la posible contribución de las proteínas purificadas a la generación del aroma y sabor en función de su composición en aminoácidos, prestando especial atención a los aminoácidos que contienen azufre y a ciertos aminoácidos que se

encuentran implicados en el desarrollo del aroma y sabor de la carne. Además, las proteínas pueden contribuir a la liberación del aroma debido a su habilidad para interactuar con los compuestos volátiles. La interacción puede definirse como una unión molecular existente entre el compuesto aromático y la proteína. Esta capacidad de las proteínas ha sido ampliamente estudiada (Damodaran y Kinsella, 1980; Jouenne y Crouzet, 2001; Gianelli et al., 2003) y varios autores han desarrollado modelos matemáticos para describir el fenómeno de interacción proteína- volátil mediante el empleo de sistemas modelo (Kinsella, 1990; Okeefe et al., 1991; Landy et al., 1995).

Asimismo, se han estudiado diversos factores que pueden afectar a la interacción proteína-volátil, incluyendo la naturaleza del compuesto volátil (Damodaran y Kinsella 1981b; 1983; Zhou y Decker 1999), la fuerza iónica de la disolución (Damodaran y Kinsella, 1983), la temperatura (Damodaran y Kinsella 1981b; Fischer y Widder 1997; Leland 1997) y el pH (O'Neill y Kinsella, 1987; Lubbers et al., 1998; Jouenne y Crouzet 2000b). En este sentido, Damodaran y Kinsella (1981a) estudiaron la relación entre la estructura de la proteína de soja y la interacción con un ligando mediante el método de diálisis en equilibrio. Estos autores observaron que la interacción de la proteína de soja y los compuestos volátiles se debió a la orientación de las subunidades dentro de la estructura cuaternaria y no a la estructura terciaria individual de estas proteínas. Además, Adams et al., (2001) estudiaron el efecto de la conformación proteica (nativa o desnaturalizada) de la ovoalbúmina en la unión irreversible a una selección de compuestos aromáticos azufrados. Este estudio se realizó en disoluciones acuosas que contenían una mezcla de disulfuros utilizando la técnica de micro extracción en fase sólida. Estos autores observaron que la proteína desnaturalizada tenía más grupos disulfuro disponibles para la interacción que la proteína nativa. Asimismo, Jouenne y Crouzet, (2000b), estudiaron el efecto del pH en la conformación de la β -lactoglobulina y como los cambios de pH afectaban a la retención de los compuestos volátiles. Estos autores observaron que un cambio de pH de 3,0 a 9,0, en el que se producía la

transición de monómero a dímero, no tenía ningún efecto en la retención de los compuestos volátiles.

En cuanto a las proteínas musculares, Damodaran y Kinsella (1983) estudiaron la interacción de ciertos alcanos con la actomiosina de pescado, con el objetivo de proporcionar datos relevantes para la eliminación de aromas no deseados en los concentrados proteicos de pescado. Recientemente, Gianelli et al. (2003) estudiaron la capacidad de los dipéptidos musculares (carnosina y anserina) y de una proteína sarcoplásmica (mioglobina) para interaccionar con compuestos clave del aroma. Estos autores estudiaron el efecto del pH en la interacción y calcularon los parámetros de interacción termodinámicos (n , número de sitios de unión; K , constante de afinidad) para dichos dipéptidos y la proteína anteriormente mencionada.

En el capítulo II se estudió la capacidad de interacción de los compuestos volátiles con los extractos de proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares obtenidas a partir de músculo porcino fresco y de jamón curado. Las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares obtenidas de músculo fresco presentaron una mayor capacidad de interacción con ciertos compuestos volátiles que aquellas obtenidas a partir de jamón curado. Asimismo, la fuerza iónica afectó a la capacidad de interacción de las proteínas miofibrilares. Sin embargo, el efecto individual de las proteínas aisladas de músculo esquelético en la interacción con los compuestos volátiles responsables del aroma de los productos curados todavía resulta desconocido.

Por estos motivos, el objetivo de este trabajo es dilucidar la contribución de las proteínas miofibrilares al aroma de la carne mediante el estudio del efecto de la conformación y concentración de proteínas miofibrilares purificadas en la interacción con una selección de compuestos volátiles aromáticos.

6.2 MATERIAL Y MÉTODOS

6.2.1 MATERIALES

Los compuestos volátiles aromáticos, 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, 2-pentanona, hexanal, metional y octanal se adquirieron de Fluka Chemie (Buchs, Switzerland).

El músculo porcino post-rigor (*Longissimus dorsi*) se adquirió de un supermercado local. La grasa y el tejido conectivo se eliminaron y la carne se cortó en porciones de 100 g, se envasó al vacío y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.2.2 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Las proteínas, actomiosina y actina, se purificaron usando el proceso simultáneo de Pérez-Juan et al. (2006a) que aparece en la Figura 5.1. La actomiosina se purificó lavando tres veces el músculo porcino en estado post-rigor con Tris-HCl 0,1 M a pH 7,0 con EDTA 20 mM para eliminar las proteínas sarcoplásmicas. Después, las proteínas miofibrilares se extrajeron con el tampón Hasselbach-Schneider: $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,1 M a pH 6,4 con KCl 0,6 M, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ 10 mM, MgCl_2 1 mM y EGTA 20 mM y se precipitaron diluyendo (1/20, p/v) con agua destilada. El precipitado, que contiene la actomiosina, se diluyó (1:1, p:v) con tampón fosfato potásico 20 mM a pH 7,0 con NaCl 0,5 M que contenía glicerol al 50 % y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para los estudios de interacción, la muestra se centrifugó a 11.700 g durante 30 min en una centrífuga Sorvall RC-5B (Dupont Instruments) para eliminar el glicerol (Doerscher et al., 2004). El precipitado obtenido se diluyó usando tampón fosfato potásico 20 mM a pH 7,0 con NaCl 0,5 M y esta fracción se usó para los estudios de interacción de la actomiosina.

La actina se purificó del precipitado obtenido después de la extracción con el tampón Hasselbach-Schneider que se utilizó para preparar el polvo de acetona mediante tres extracciones sucesivas con acetona durante 10 min y filtración a través de papel Whatman. Posteriormente, el polvo de

acetona se usó para la extracción de actina-G utilizando el tampón A que contenía Tris-HCl 2 mM a pH 8,0, ATPNa₂ 0,2 mM, β-mercaptoetanol 0,5 mM, CaCl₂ 0,2 mM y NaN₃ al 0,005 %, usando diferentes tiempos de extracción. Finalmente, la última fracción enriquecida en actina-G, se filtró a través de papel Whatman y se usó para los estudios de interacción de la actina.

La concentración de proteína de cada fracción, actina y actomiosina, se determinó por el método del ácido bicinconínico (Smith et al., 1985) usando albúmina de suero bovino como patrón.

6.2.3 PREPARACIÓN DE LA DISOLUCIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES

Se preparó una disolución stock con 50.000 mg kg⁻¹ de cada compuesto volátil. Los compuestos aromáticos se añadieron por triplicado a los extractos proteicos y a la disolución control a una concentración final de 2 mg kg⁻¹ para el 2-metil-butanal y el 3-metil-butanal; 1 mg kg⁻¹ para la 2-pentanona, el hexanal y el octanal y 5 mg kg⁻¹ para el metional. Todos los compuestos volátiles están presentes simultáneamente en la disolución usada en las experiencias.

La selección de los seis compuestos aromáticos se fundamentó en su presencia en el espacio de cabeza y su contribución al aroma y sabor típico de los productos cárnicos curados españoles (capítulo II, apartado 4.2.4).

6.2.4 INTERACCIÓN PROTEÍNA-VOLÁTIL

Los compuestos aromáticos se adicionaron en las concentraciones adecuadas (apartado 6.2.3) a la disolución de proteína y al control. Los viales de proteína contenían 5 mL de la proteína (actomiosina o actina) en un vial de espacio de cabeza de 10 mL sellado con un septo de PTFE-silicona (Supelco, Bellefonte, PA, USA). El vial control contenía el mismo tampón que los viales de actomiosina y actina pero sin la proteína. Los

viales control y de proteína se almacenaron durante 16 h a 30 °C para permitir que se alcanzara el equilibrio.

La cantidad de aroma presente en el espacio de cabeza de los viales de proteína y control se determinó con la técnica de microextracción en fase sólida y cromatografía de gases utilizando las condiciones previamente optimizadas (capítulo II, apartado 4.2.5).

6.2.4.1 Análisis por cromatografía de gases

Para el análisis cromatográfico se utilizó un cromatógrafo de gases 8000 CE instruments (Rodano, Milan, Italia) equipado con detector de ionización de llama (FID). Los compuestos aromáticos se analizaron tal como se describe en el apartado 4.2.5.1.

Los resultados se expresaron como porcentaje de compuesto volátil libre en el espacio de cabeza respecto del hallado en la disolución sin proteína. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los valores se representaron como media y coeficiente de varianza.

6.2.4.2 Cálculo del compuesto volátil unido por g de extracto proteico.

El compuesto volátil fue añadido a los viales control y con proteína a la misma concentración mencionada en el apartado 6.2.3 y también diluidos 1/100 y 1/500. La actina (G y F) y la actomiosina se usaron a una concentración de 0,8 y 5 mg/mL, respectivamente. La cantidad de compuesto volátil se determinó por cromatografía de gases previa extracción usando SPME bajo condiciones optimizadas. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

La concentración del volátil en el espacio de cabeza ([HS]), la concentración de volátil en la fase acuosa y el volátil unido por g de proteína se calcularon utilizando las ecuaciones 1, 2 y 3, respectivamente, como se describe en el capítulo II (apartado 4.2.5.2).

6.2.5 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA

La actomiosina purificada como se describe en el apartado 6.2.2. se diluyó a las siguientes concentraciones: 0,8, 1,6, 3,3, 4,9, y 8,2 mg/mL utilizando tampón fosfato potásico 20 mM a pH 7,0 con NaCl 0,5 M.

La actina-G purificada como se describe en el apartado 6.2.2 se diluyó a 0,01, 0,1, 0,3, 0,5 y 0,8 mg/mL utilizando el tampón A sin ATPNa₂.

Con estas concentraciones de proteína se prepararon los viales para los estudios de interacción tal como se describe en el apartado 6.2.4.

6.2.6 EFECTO DE LA CONFORMACIÓN PROTEICA

En el caso de la actomiosina, se estudió el efecto del cambio en la conformación producido por la congelación. Para ello, dos muestras de actomiosina se obtuvieron usando el proceso simultáneo descrito en el apartado 6.2.2 . Ambas muestras se almacenaron a -20 °C con y sin glicerol al 50 % durante una semana. También se utilizó otra muestra obtenida mediante el mismo proceso pero sin el almacenamiento previo en congelación a -20 °C. La concentración proteica de todas las muestras se fijó en 8 mg/mL. Para los estudios de interacción, las muestras congeladas se usaron después de eliminar el glicerol por centrifugación como se describe en el apartado 6.2.2.

Para el estudio del efecto de la conformación de la actina en la interacción se utilizaron actina-G y actina-F. La actina-G o forma globular se obtuvo como se describe en el apartado 6.2.2. La actina-F o forma filamentosa se preparó adicionando a la fracción de actina-G, KCl, MgCl₂ y ATPNa₂ a una concentración final de 50 mM, 2 mM y 1 mM, respectivamente. Los viales de proteína para los estudios de interacción se prepararon como se describe en el apartado 6.2.4. utilizando una concentración proteica de 0,8 mg/mL tanto para la actina-G como para la actina-F.

6.2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El efecto de la presencia de proteína en la disolución y el efecto de la concentración y conformación proteica en la interacción con los compuestos volátiles se estudió por análisis de la varianza (ANOVA) usando el programa estadístico Statgraphics plus v.5.1. Las medias se compararon mediante el proceso de diferencia mínima significativa de Fischer's (LSD) ($p < 0,05$).

6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La actina y la actomiosina utilizadas en este estudio fueron purificadas de músculo esquelético porcino en estado post-rigor (Perez-Juan et al., 2006a, ver capítulo III). El grado de purificación obtenido en ambas preparaciones fue muy elevado como se observó en los geles de SDS-PAGE teñidos con plata (Pérez-Juan et al., 2006a, ver capítulo III). En concreto, para los ensayos de interacción se utilizaron las fracciones de actomiosina M4p y la fracción de actina A4s del proceso simultáneo con un grado de pureza del 80 % y 90 %, respectivamente.

6.3.1 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA

Para estudiar el efecto de la concentración de proteína en la interacción, el porcentaje libre en el espacio de cabeza de cada compuesto volátil en presencia de diferentes concentraciones de actomiosina (0,8 a 8,2 mg/mL) y actina-G (0,01 a 0,8 mg/mL) se muestra en la figura 6.1 A y 6.1 B, respectivamente.

La presencia de actomiosina (figura 6.1 A) produce una reducción significativa del porcentaje libre de hexanal y octanal en el espacio de cabeza. Esto significa que la actomiosina es capaz de unir estos dos compuestos volátiles. Además, la diferente concentración de actomiosina estudiada no afectó al porcentaje libre de hexanal presente en el espacio de cabeza excepto a 4,6 mg/mL. Sin embargo, el aumento en la concentración

proteica produjo un aumento significativo del porcentaje de octanal libre en el espacio de cabeza. También, se observó que al aumentar la concentración de actomiosina se produjo un leve aumento significativo del porcentaje libre de 2-pentanona y una leve disminución significativa del porcentaje libre de metional. Sin embargo, el rango de concentraciones de actomiosina estudiadas no produjo diferencias significativas en el porcentaje libre del 3-metil-butanal y 2-metil-butanal.

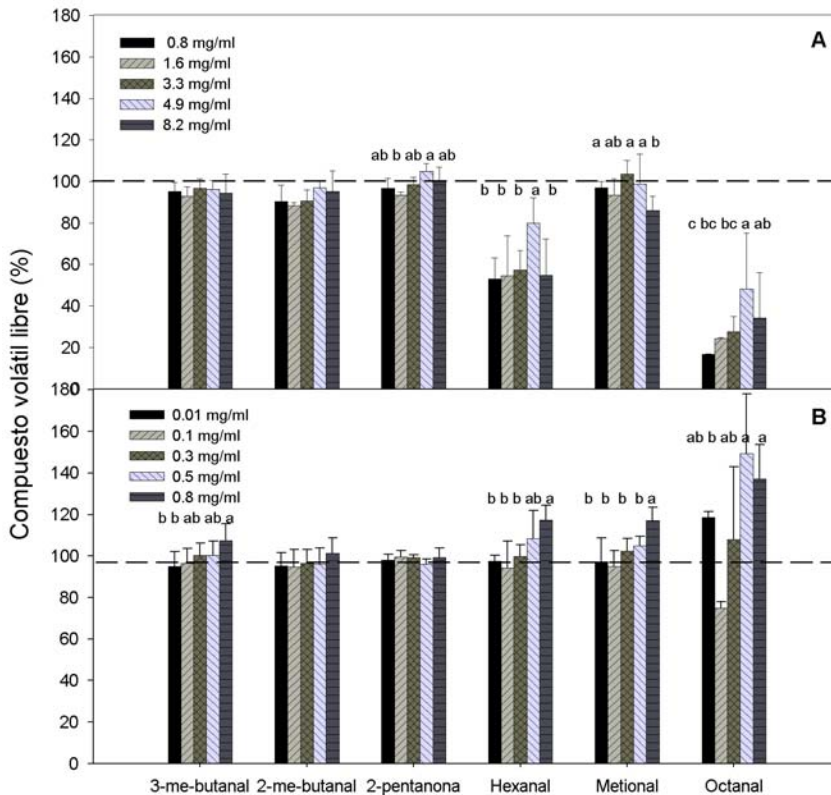


Figura 6.1. Efecto de la concentración proteica en la interacción con los compuestos volátiles. A) actomiosina (0,8 a 8,2 mg/mL) y B) actina-G (0,01 a 0,8 mg/mL). Los resultados se expresan como porcentaje de compuesto volátil libre en el espacio de cabeza de la disolución respecto del encontrado sin proteína.

Por otra parte, la actina-G no interaccionó de manera significativa con los compuestos volátiles ensayados e incluso el aumento de la concentración de la actina-G produjo un aumento significativo del porcentaje libre de 3-metil-butanal, hexanal y metional, que significa que estos compuestos volátiles son liberados al espacio de cabeza (figura 6.1 B). Por otro lado, la concentración de proteína estudiada no produce diferencias significativas en el porcentaje libre de 2-metil-butanal y de 2-pentanona. En cambio, el porcentaje libre de octanal aumentó significativamente para las concentraciones más altas de actina-G ensayadas (0,8 y 0,5 mg/mL) mientras que disminuyó significativamente cuando la actina-G se encontraba a baja concentración (0,1 mg/mL).

En 1995, Landy et al., estudiaron la retención de los compuestos aromáticos (ésteres) por el caseinato de sodio en disolución acuosa. Estos autores observaron que la interacción con los compuestos aromáticos dependía no solo de la naturaleza de los volátiles sino también del contenido de proteína en la disolución. Asimismo encontraron que la retención aumentó con el contenido en caseinato de sodio aunque esta retención variaba dependiendo del compuesto volátil. Por el contrario, Damodaran y Kinsella (1980) estudiaron los efectos termodinámicos y conformacionales en la interacción de los compuestos carbonilo con la albúmina de suero bovino. Estos autores sugirieron que la afinidad era mucho mayor a bajas concentraciones de proteína, probablemente debido a la interacción proteína-proteína que ocurría a altas concentraciones y que representaba una disminución aparente de la interacción proteína-ligando. Por ello, en el presente estudio la liberación de varios compuestos al espacio de cabeza (hexanal y octanal en la figura 6.1 A y el 3-me-butanal, hexanal, metional y octanal en la figura 6.1 B) en presencia de altas concentraciones de actomiosina y actina-G podrían deberse a la presencia de interacciones proteína-proteína que disminuyen su capacidad de interacción.

6.3.2 EFECTO DE LA CONFORMACIÓN PROTEICA

Diversos autores han estudiado el efecto que tiene la congelación en las proteínas miofibrilares (Careche et al., 1998; Cofrades et al., 1996) debido al impacto que este tratamiento produce en la conformación proteica afectando a sus propiedades. En este estudio, el efecto de la congelación en la estructura de la actomiosina se estudió en relación con su capacidad de interacción. El porcentaje libre en el espacio de cabeza de cada compuesto volátil en presencia de actomiosina almacenada bajo diferentes condiciones (almacenamiento sin congelación y congeladas en presencia o ausencia de glicerol como crioprotector) se muestra en la figura 6.2.

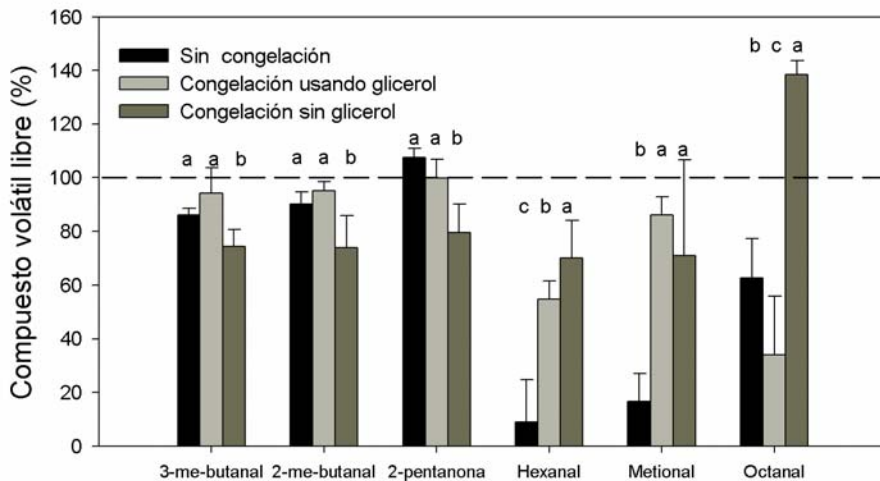


Figura 6.2. Efecto de la conformación de actomiosina modificada por congelación en la interacción con compuestos volátiles. La concentración de actomiosina fue de 8 mg/mL. Los resultados se expresan como porcentaje de compuesto volátil libre en el espacio de cabeza en la disolución respecto del encontrado sin proteína.

La presencia de actomiosina almacenada sin congelación produce una reducción significativa del porcentaje libre de hexanal, metional y

octanal en el espacio de cabeza lo que indicó que la actomiosina fue capaz de interactuar con estos compuestos volátiles. Sin embargo, la interacción de la actomiosina con los compuestos volátiles estudiados se vio afectada de diferente forma según el tipo de almacenamiento de la proteína (figura 6.2).

Por una parte, el porcentaje libre de 3-metil-butanal, 2-metil-butanal y 2-pentanona en el espacio de cabeza no se vio afectado por la congelación cuando se utilizó glicerol como crioprotector aunque disminuyó significativamente cuando no se utilizó glicerol. Por otra parte, cuando la actomiosina se congeló (con y sin glicerol) el porcentaje libre de hexanal y metional en el espacio de cabeza aumentó significativamente. Sin embargo, el porcentaje libre de octanal en el espacio de cabeza disminuyó significativamente cuando la actomiosina se congeló utilizando glicerol y aumentó significativamente cuando la actomiosina se congeló sin glicerol.

Diversos autores han descrito cómo el cambio en la conformación proteica afecta a la interacción entre los compuestos volátiles y las proteínas debido a la modificación que producen en la disponibilidad de los sitios de unión de las proteínas (Damodaran y Kinsella, 1981a; Jounne y Crouzet, 2000b; Adams, 2001). Damodaran y Kinsella, (1983) estudiaron el efecto de la conformación en la capacidad de interacción de las proteínas miofibrilares de pescado con compuestos volátiles a diferente fuerza iónica, debido al efecto que produce en la solubilidad de las proteínas lo que a su vez implica cambios conformacionales. Los resultados mostraron que la afinidad de la actomiosina de pescado fue significativamente mayor cuando la proteína estaba insoluble (a baja fuerza iónica) que con la proteína solubilizada (a alta fuerza iónica). Además, en el apartado 4.3.3., se muestra que la capacidad de interacción de extractos de proteínas miofibrilares se ve afectada por la fuerza iónica.

Asimismo, está establecido que las proteínas son capaces de unir compuestos responsables del aroma y sabor, tales como aldehídos y cetonas fundamentalmente mediante interacciones hidrofóbicas (O'Neill y Kinsella, 1987). Las alteraciones en la hidrofobicidad de las proteínas tienen

lugar durante los procesos de desnaturalización y agregación que se producen durante el calentamiento y la congelación (Lichan et al, 1985). En este sentido, Careche et al. (1998) analizaron el efecto del almacenamiento en congelación en la hidrofobicidad y en las propiedades de los extractos miofibrilares de pollo, cerdo y merluza. Estos autores hallaron que la hidrofobicidad, el índice de actividad emulsionante, y la fuerza de los geles de la actomiosina natural dependían generalmente de la especie, la congelación y el proceso de conservación. En cuanto a las proteínas miofibrilares de porcino encontraron que la hidrofobicidad aumentó durante la primera semana de almacenamiento en congelación, pero posteriormente no experimentó cambios. El aumento de la hidrofobicidad debido al almacenamiento en congelación (Careche et al., 1998) podría explicar la disminución del porcentaje libre del 3-me-butanol, 2-me-butanol y 2-pentanona cuando la actomiosina se congeló sin glicerol como crioprotector, que significa que esta proteína fue capaz de retener grandes cantidades de estos compuestos. Sin embargo, el aumento del porcentaje libre de hexanal, metional y octanal cuando la actomiosina se congeló sin glicerol como crioprotector, significa la liberación de estos compuestos, lo que indica probablemente que la interacción de la actomiosina con estos compuestos no es de naturaleza hidrofóbica y además, que el glicerol no fue capaz de proteger los sitios de interacción para estos compuestos.

Por otra parte, la actina existe en dos formas: la actina-G o globular y la actina-F o filamentosa (Pearson y Young, 1989). El cambio entre estas dos formas supone un cambio conformacional antes de completar el proceso de polimerización (Pearson y Young, 1989) probablemente relacionado con sus grupos sulfhidrilo (Jiang et al., 1989). Para el estudio del efecto de la conformación de la actina (globular o filamentosa) en su capacidad de interacción, el porcentaje libre en el espacio de cabeza de cada volátil en presencia de actina-F y actina-G se muestra en la figura 6.3. La forma fibrosa (actina-F) produjo una disminución significativa del porcentaje libre de todos los volátiles estudiados lo que significa un aumento en los compuestos volátiles unidos a la actina-F.

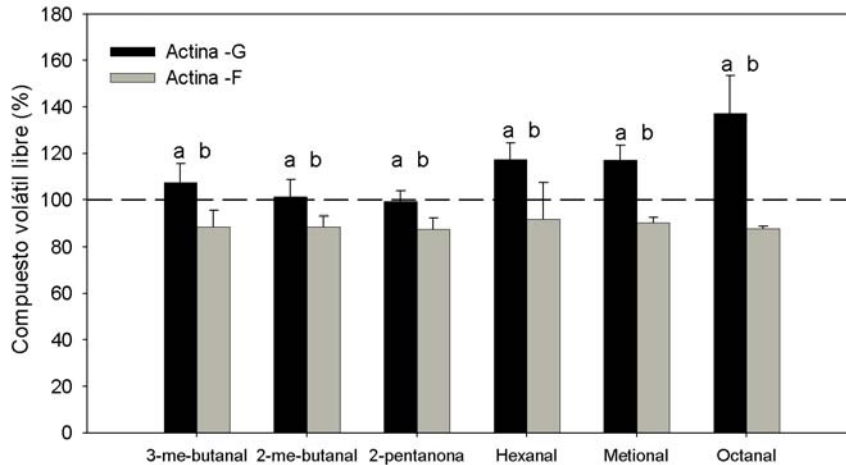


Figura 6.3. Efecto de la conformación de la actina (globular o actina-G y fibrosa o actina-F, ambas a 0,8 mg/mL) en la interacción de los compuestos volátiles. Los resultados se expresan como porcentaje de compuesto volátil libre en el espacio de cabeza de la disolución respecto del encontrado sin proteína.

Al mismo tiempo, para confirmar la interacción entre los compuestos volátiles y las proteínas estudiadas (actomiosina, actina-G y actina-F) se calcularon los moles unidos por dichas proteínas y se muestran en la figura 6.4. La actina-F interaccionó con una mayor cantidad de 3-metil-butanol (figura 6.4. A), 2-metil-butanol (figura 6.4. B), metional (figura 6.4. C), hexanal (figura 6.4. D) y 2-pentanona (figura 6.4. E) que la actina-G y la actomiosina. La disminución en los moles unidos por la actina-G de hexanal (figura 6.4. D), metional (figura 6.4. C) y octanal (figura 6.4. F) significan que estos compuestos fueron liberados al espacio de cabeza. Este hecho concuerda con los resultados observados en las figuras 6.2 y 6.3.

Además, el aumento de la concentración de compuesto volátil añadida a la disolución proteica produjo un aumento del compuesto volátil unido por la actina-F (figura 6.4). El efecto de la conformación de la actina en relación con su capacidad de interacción no había sido descrito

anteriormente. En este estudio se estableció que el efecto de la conformación producido por la polimerización de la actina-G afectó a su capacidad de interacción aunque depende del tipo de compuesto volátil.

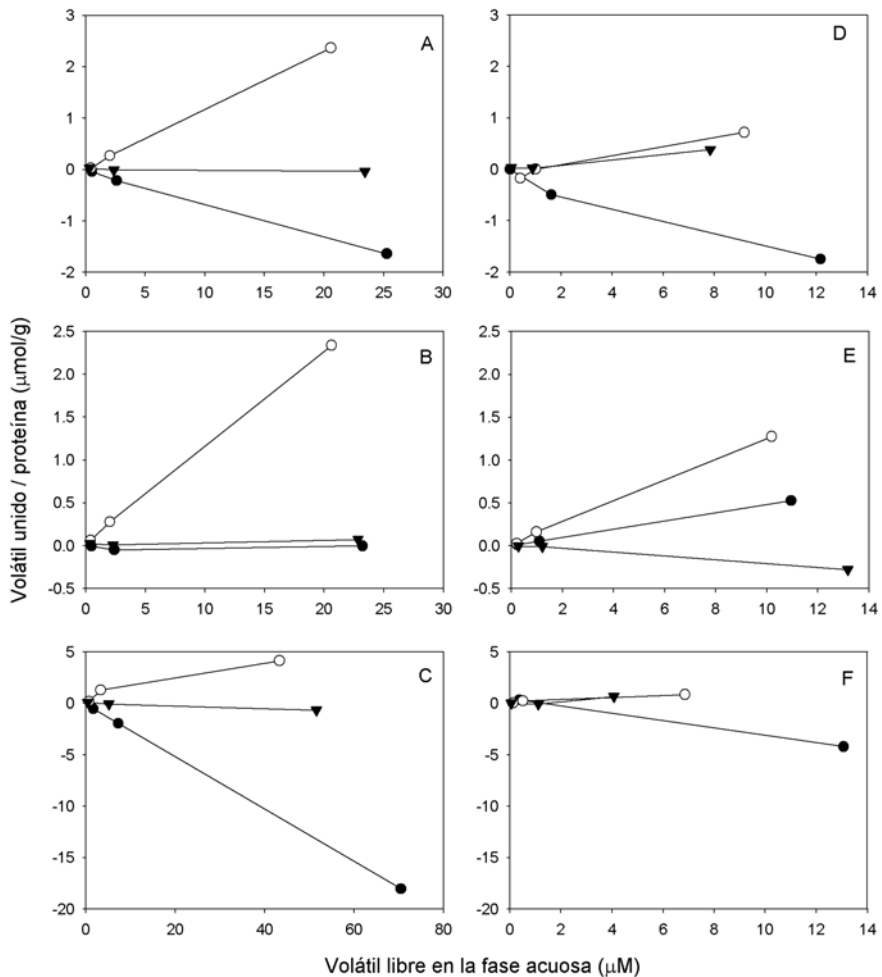


Figura 6.4. Moles de compuesto volátil unidos por la actomiosina (-▼-), actina-G (-●-) y actina-F (-○-) del músculo porcino vs a la concentración de volátil libre en la fase acuosa. A) 3-metil-butanol, B) 2-metil-butanol, C) 2-pentanona, D) hexanal E) metional y F) octanal. Las concentraciones de actina (-G y -F) y de actomiosina utilizadas fueron 0,8 y 5 mg/mL, respectivamente.

En resumen, la capacidad de interacción de las proteínas miofibrilares mayoritarias de la carne, actomiosina y actina, se vio afectada por su concentración y conformación. La actomiosina fue capaz de unir hexanal, metional y octanal mientras que la actina-G no fue capaz de interaccionar con ninguno de los compuestos volátiles analizados e incluso liberó 3-metil-butanal, hexanal, metional y octanal. Además, el aumento en la concentración de actomiosina produjo un aumento significativo del porcentaje libre de octanal. También, en el caso de la actina-G, un aumento de la concentración de proteína aumentó significativamente el porcentaje libre de 3-metil-butanal, hexanal y metional. Sin embargo, el cambio conformacional de la actomiosina producido por el almacenamiento en congelación aumentó su capacidad de interacción con 3-metil-butanal y 2-metil-butanal y redujo la interacción con hexanal, metional y octanal. Por otra parte, la polimerización de la actina aumentó su capacidad de interacción con todos los volátiles estudiados.

DISCUSIÓN GENERAL

7 DISCUSIÓN GENERAL

La alta calidad del jamón curado depende en gran medida, del aroma y sabor generados durante las etapas de curado y secado, pero en cada sección se producen unas reacciones bioquímicas durante estas etapas que afectan a la proteólisis y lipólisis y contribuyen al desarrollo de una textura adecuada y un sabor y aroma característicos (Toldrá y Flores, 1998). En este sentido, se han realizado numerosos estudios teniendo en cuenta la localización anatómica, generalmente en la parte central del jamón (Bolzoni et al., 1996; Careri et al., 1993; Flores et al., 1997c; Gianelli et al., 2002a; Berdagué et al., 1993; Buscailhon et al., 1993; Buscailhon et al., 1994; Ruiz et al., 1998b). Sin embargo, ninguno de estos estudios describen la diferente percepción descrita por los consumidores entre las distintas secciones dentro de un mismo jamón curado.

En este estudio se han analizado las diferentes secciones de los jamones curados de 7 y 12 m (humedad, pH, contenido en NaCl, grasa intramuscular, aminoácidos, ácidos grasos libres así como el perfil de compuesto volátiles presentes en el espacio de cabeza) con el objetivo de estudiar el efecto de la matriz en la generación del aroma y sabor. Las principales diferencias entre las secciones estudiadas (punta, centro y codillo) se obtuvieron en cuanto al contenido en aminoácidos y a la concentración estimada de compuestos volátiles. La parte central del jamón contiene una mayor proporción de compuestos volátiles después de 7 meses de curado que la sección del codillo y la punta esencialmente debido a un mayor contenido de aminoácidos libres. Por otra parte, cuando el proceso de curado continúa, como ocurre en el jamón de 12 meses de curado, existen cambios en la proporción de los compuestos volátiles y sigue siendo la sección del centro la que presenta una mayor proporción de compuestos volátiles debido no sólo a la mayor proporción de aminoácidos libres sino también a la oxidación de los ácidos grasos insaturados.

Por otra parte, los compuestos volátiles generados en las distintas secciones durante el curado deben llegar a los receptores situados en la

nariz y en la boca para que el aroma de este producto sea percibido (Taylor, 1998). En este sentido, es bien conocido que la interacción de las proteínas con los compuestos volátiles modifica significativamente la concentración de éstos en el espacio de cabeza pudiendo afectar por tanto a la percepción del aroma y sabor. Por ello, el fenómeno de interacción proteína-volátil ha sido ampliamente estudiado para diversas proteínas (Damodaran et al., 1981a,b; Chung y Villota, 1989; Heng et al., 2004; Jouenne y Crouzet., 2000a,b; Guichard, 2002; O'Neill et al., 1987; Damodaran y Kinsella, 1980; Damodaran y Kinsella, 1983) e incluso para pequeños componentes del músculo (Zhou et al., 1999; Gianelli et al., 2003). Sin embargo, el efecto de la estructura de la carne en la interacción con los compuestos volátiles no ha sido todavía esclarecida.

Las principales proteínas presentes en el músculo esquelético son las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares que representan el 30-40 % del peso vivo del animal (Pearson y Young, 1989). Por tanto, con el objetivo de determinar el impacto relativo de los componentes del músculo en la liberación de los compuestos responsables del aroma, se estudió el papel de las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares del músculo porcino y del jamón curado en la interacción con los compuestos aromáticos seleccionados (3-metil-butanal, 2-metil-butanal, 2-pentanona, hexanal, metional y octanal). La capacidad de interacción de las proteínas sarcoplásmicas de músculo porcino fue más elevada que la capacidad que mostraron las proteínas sarcoplásmicas de jamón e incluso más alta que la capacidad de interacción de las proteínas miofibrilares.

Aunque los extractos de proteínas sarcoplásmicas son una mezcla compleja, la presencia de mioglobina, carnosina y anserina (Toldrá et al., 2000) junto con otros compuestos presentes en dichos extractos, fueron los responsables de la interacción observada (Gianelli et al., 2003). Cabe señalar que la sal, principal agente de curado utilizado en el jamón, afecta a la volatilidad de los compuestos aromáticos (Nawar, 1971; Guichard, 2002) debido a su efecto de "salting-out" (Kinsella, 1990) y está presente en los extractos de proteínas sarcoplásmicas de jamón. Sin embargo, se observó

que la capacidad de interacción de las proteínas sarcoplásmicas estuvo más relacionada con pequeños componentes presentes en estos extractos que con la fuerza iónica de la fase acuosa.

Por otro lado, la fuerza iónica ha demostrado tener efecto significativo en la capacidad de interacción de las proteínas miofibrilares ya que afecta a la conformación de las proteínas miofibrilares (Pearson y Young, 1989; Damodaran y Kinsella, 1983), aunque depende del volátil estudiado.

Con el objetivo de seguir profundizando en el estudio de la matriz proteica en relación con la interacción con los compuestos volátiles responsables del aroma, resultó necesaria la purificación de las proteínas miofibrilares mayoritarias (actomiosina y actina). Para la purificación de las proteínas miofibrilares se han propuesto un gran número de métodos y, normalmente, estas proteínas se purifican por separado (Syrový, 1984). En este estudio se desarrolló un proceso simultáneo para extraer la actomiosina y la actina a partir de músculo porcino en estado post-rigor que requirió menos tiempo y, a su vez, permitió obtener fracciones útiles para estudios posteriores de interacción, ya que mantuvieron sus propiedades.

Por último, con las fracciones obtenidas según el método de purificación propuesto, que contenían actomiosina y actina, se estudió su capacidad de interacción con los compuestos volátiles responsables del aroma así como el efecto de la concentración y la conformación. Dicha capacidad de interacción dependió de la proteína estudiada así como del compuesto volátil, produciéndose en algunos casos interacción (actomiosina con hexanal, metional y octanal) mientras que en otros se produjo liberación al espacio de cabeza (actina-G con 3-metil-butanal, hexanal, metional y octanal).

Además, el incremento de la concentración de las proteínas purificadas también afectó a esta interacción, aunque dependía del compuesto volátil estudiado. En este sentido, la liberación de varios compuestos al espacio de cabeza en presencia de altas concentraciones de actomiosina y actina-G podría deberse a la presencia de interacciones proteína-proteína que disminuiría su capacidad de interacción con los

compuestos volátiles estudiados (Landy et al., 1995; Damodaran y Kinsella, 1980).

Existen numerosas referencias acerca del efecto que los cambios en la conformación proteica tienen sobre la interacción entre los compuestos volátiles y las proteínas debido a la modificación de la disponibilidad de sus sitios de unión (Damodaran y Kinsella, 1981a; Jounne y Crouzet, 2000b; Adams, 2001). El aumento de la hidrofobicidad debido al almacenamiento en congelación de la actomiosina (Careche et al., 1998) podría explicar la disminución del porcentaje libre del 3-me-butanal, 2-me-butanal y la 2-pentanona cuando esta proteína se congeló sin glicerol como crioprotector. Sin embargo, la liberación al espacio de cabeza del hexanal, metional y octanal cuando la actomiosina se congeló sin glicerol como crioprotector probablemente sugiere que la interacción de la actomiosina con estos compuestos no es de naturaleza hidrofóbica y además, el glicerol no es capaz de proteger los sitios de unión para estos compuestos.

Por otra parte, la actina existe en dos formas: actina-G o globular y actina-F o filamentosa (Pearson y Young, 1989) y la transformación entre ambas supone un cambio conformacional (Pearson y Young, 1989) probablemente relacionado con sus grupos sulfhidrilo (Jiang et al., 1989). En este estudio se ha observado que, la polimerización de la actina-G a actina-F aumenta su capacidad de unión con todos los volátiles estudiados y por tanto, su conformación influye en su capacidad de retención de los compuestos volátiles.

Todos estos resultados nos indicarían que probablemente los tratamientos que reciba el músculo y que puedan alterar la conformación de los componentes de la matriz proteica, sobre todo en lo que se refiere a las proteínas miofibrilares mayoritarias, podrían afectar no solo a ciertas propiedades funcionales de estas proteínas (Careche et al., 1998) sino también a la percepción del aroma ya que pueden modificar la concentración de ciertos compuestos volátiles en el espacio de cabeza, como ocurre en el caso de la congelación de las proteínas miofibrilares o en la polimerización de la actina-G.

En resumen, teniendo en cuenta que tanto el producto estudiado como el fenómeno de percepción del aroma son muy complejos, los resultados obtenidos amplían el conocimiento sobre el efecto de la matriz proteica en la percepción del aroma y sabor del jamón curado, aportando nuevos datos a los numerosos estudios realizados en este campo desde diferentes perspectivas (Carrapiso et al., 2002b; Flores et al, 1997c; González et al., 2000; Toldrá y Flores, 1998).

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

- Los extractos de proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares de músculo porcino interactúan con los compuestos volátiles estudiados pero el grado de interacción es menor cuando los extractos se obtienen de jamones curados de 7 y 12 meses. Asimismo, se demuestra que la capacidad de interacción de las proteínas sarcoplásmicas está más relacionada con los pequeños componentes presentes en estos extractos que con la fuerza iónica de la fase acuosa. En el caso de las proteínas miofibrilares, la interacción está relacionada con la fuerza iónica de la fase acuosa debido al efecto que produce en la conformación proteica.
- El proceso simultáneo desarrollado para la extracción de actomiosina y actina a partir de músculo porcino post-rigor permite extraer ambas proteínas conservando sus propiedades, lo cual permite su utilización en los estudios posteriores de interacción. Así, la actomiosina interactúa con los compuestos volátiles, hexanal, metional y octanal, mientras que la actina-G aislada no interactúa con ninguno de los compuestos volátiles ensayados e incluso produce la liberación del 3-metil-butanal, hexanal, metional y octanal al espacio de cabeza.
- La conformación de las proteínas aisladas de músculo porcino afecta a la interacción con los compuestos volátiles estudiados. El cambio en la conformación por congelación de la actomiosina tiene un efecto diferente según el compuesto volátil estudiado, aumentando la interacción con el 3-metil-butanal y 2-metil-butanal y reduciéndola en el caso del hexanal, metional y octanal. Sin embargo, el cambio conformacional que experimenta la actina durante la polimerización aumenta la interacción con todos los compuestos volátiles estudiados.

- El aumento de la concentración proteica afecta a la interacción de las proteínas aisladas de músculo porcino con los compuestos volátiles estudiados produciendo un aumento de la concentración en el espacio de cabeza de octanal en presencia de actomiosina y de 3-metil-butanal, hexanal y metional en presencia de actina-G. Esto es debido a la presencia de interacciones proteína-proteína que disminuye su capacidad de interacción.
- Los resultados obtenidos demuestran la existencia de interacciones entre los compuestos volátiles responsables del aroma y la matriz proteica de la carne y del jamón curado así como el efecto de la concentración y conformación proteica en dicha interacción. Estas interacciones podrían afectar a la percepción sensorial del jamón curado debido a la modificación en la proporción relativa de los compuestos responsables del aroma en el espacio de cabeza.

BIBLIOGRAFÍA

9 BIBLIOGRAFÍA

- Adams, R. L., Mottram, D. S., Parker, J. K. **1999**. Use of SPME in the determination of the binding of sulfur-containing flavor compounds to proteins. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 218, U36-U36 42-AGFD part 1.
- Adams, R. L., Mottram, D. S., Parker, J. K., & Brown, H. M. **2001**. Flavor-protein binding: Disulfide interchange reactions between ovalbumin and volatile disulfides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 4333-4336
- Andrianantoandro, E.; Blanchoin, L.; Sept, D., McCammon, J.A., Pollard T.D. **2001**. Kinetic Mechanism of end-to-end annealing of actin filaments. *Journal of Molecular Biology* 312, 721-730.
- Aristoy, M.C., Toldrá, F. **1991**. Deproteinization techniques for amino acid analysis in fresh pork muscle and dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39, 792-795.
- Arnau, J., Hugas, M., and Monfort, J.M. **1987**. El jamón curado: aspectos técnicos. Grafis-Sant S.A. Girona. Pp 35-36.
- Arnau, J., Guerrero, L., Casademont, G., Gou, P. **1995**. Physical and chemical changes in adifferent zones of normal and PSE dry cured ham during processing. *Food Chemistry* 52, 63-69.
- Asghar, A., Samejima, K., Yasui, T. **1985**. Functionality of muscle proteins in gelation mechanisms of structured meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 22, 27-101.
- Baines, D.A., Mlotkiewicz, J.A. **1984**. The chemistry of meat flavor. En *Recent advances in the chemistry of meat*; Bailey, A.J. Ed. The Royal Society of Chemistry, Burlington House, London. Pp 119-164.
- Barbieri, G., Bolzoni, L., Parolari, G., Virgili, R., Buttini, R., Careri, M., Mangia, A. **1992**. Flavour compounds of dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, 2389-2394.
- Berdagué, J.L., Bonnaud, N., Rousset, S., Touraille, C. **1993**. Influence of Pig Crossbreed on the Composition, Volatile Compound Content and Flavor of Dry Cured Ham. *Meat Science* 34, 119-129.
- Berry, J.F., Cevallos, W.H., Wade, R.R. **1965**. Lipid class and fatty acids composition of intact peripheral nerve and during wallerian degeneration. *Journal of the American Oil Chemists Society* 42, 492-495.

- Bidlingmeyer, B.A., Cohen, S.A., Tarvin, T.L., Frost, B.A. **1987**. New rapid high sensitivity analysis of amino acids in food type samples. *Journal of the Association of Analytical Chemistry* 70, 241-247.
- Bolzoni, L., Barbieri, G., Virgili, R. **1996**. Changes in volatile compounds of Parma ham during maturation. *Meat Science* 43,301-310.
- Bowker, B.C., Grant, A.L., Swartz, D.R., Gerrard, D.E. **2004**. Myosin heavy chain isoforms influence myofibrillar ATPase activity under simulated post-mortem pH, calcium and temperature conditions. *Meat Science* 67, 139-147.
- Brossard, C. D., Lethuaut, L., Boelrijk, A. E. M., Mariette, F., Genot, C. **2006**. Sweetness and aroma perceptions in model dairy desserts: an overview. *Flavour and Fragrance Journal* 21, 48-52.
- Buscailhon, S., Berdague, J.L., Bousset, J., Cornet, M., Gandemer, G., Touraille, C., Monin, G. **1994**. Relations Between Compositional Traits and Sensory Qualities of French Dry-Cured Ham. *Meat Science* 37, 229-243.
- Buscailhon, S., Berdague, J.L., Monin, G. **1993**. Time related changes in volatile compounds of lean tissue during processing of French dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, 69-75.
- Buscailhon, S., Berdague, J.L., Bousset, J., Cornet, M., Gandemer, G., Touraille, C., Monin, G. **1994**. Relations between compositional traits and sensory qualities of French dry-cured ham. *Meat Science* 37, 229-243.
- Careche, M., Cofrades, S., Carballo, J., Colmenero, F. J. **1998**. Emulsifying and gelation properties during freezing and frozen storage of hake, pork, and chicken actomyosins as affected by addition of formaldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 813-819.
- Careri, M., Mangia, A., Barbieri, G., Bolzoni, L., Virgili, R., Parolari G. **1993**. Sensory property relationships to chemical data of Italian-type dry-cured ham. *Journal of Food Science* 58, 968-972.
- Carrapiso, A. I., Jurado, A., Timon, M. L., Garcia, C. **2002a**. Odor-active compounds of Iberian hams with different aroma characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 6453-6458.
- Carrapiso, A. I., Ventanas, J., Garcia, C. **2002b**. Characterization of the most odor-active compounds of Iberian ham headspace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 1996-2000.

-
- Chan, K. M., Decker, E. A. **1994**. Endogenous Skeletal-Muscle Antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 34, 403-426.
- Chang S.S., Petersen, R.J. **1977**. Recent developments in the flavour meat. *Journal of Food Science* 42, 298-305.
- Chevance, F. F. V., Farmer, L. J. **1998**. Influence of fat on the flavour of an emulsified meat product. En Food flavours: Formation, analysis and packaging influences. Ed. Contis E.T., Ho C.-T, Mussinan C.J., Parliment t.H., Shahidi, F. and Spanier A.M. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. Pp. 255-270
- Chung, S., Villota, R. **1989**. Binding of Alcohols by Soy Protein in Aqueous-Solutions. *Journal of Food Science* 54, 1604-1606.
- Cofrades, S., Careche, M., Carballo, J., Colmenero, F. J. **1996**. Freezing and frozen storage of actomyosin from different species. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung* 203, 316-319.
- Damodaran, S., Kinsella, J. E. **1980**. Flavor Protein Interactions - Binding of Carbonyls to Bovine Serum-Albumin - Thermodynamic and Conformational Effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 28, 567-571.
- Damodaran, S., Kinsella, J. E. **1981a**. Interaction of Carbonyls with Soy Protein - Conformational Effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 29, 1253-1257.
- Damodaran, S., Kinsella, J. E. **1981b**. Interaction of Carbonyls with Soy Protein - Thermodynamic Effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 29, 1249-1253.
- Damodaran, S., Kinsella, J. E. **1983**. Binding of carbonyls to fish actomyosin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 31, 856-859.
- deRoos, K. B. **2006**. How lipids influence flavor perception. *Food Lipids: Chemistry, Flavor, and Texture* 920, 145-158.
- Dirinck, P., Van Opstaele, F., Vandendriessche, F. **1997**. Flavour differences between northern and southern European cured hams. *Food Chemistry*, 59, 511-521.
- Dirinck, P., Van Opstaele, F. **1998**. Volatile composition of southern European dry-cured hams. En Food flavours: Formation, analysis and packaging influences. Ed. Contis E.T., Ho C.-T, Mussinan C.J.,

- Parliment t.H., Shahidi, F. and Spanier A.M. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. Pp 233-243.
- Doerscher, D. R., Briggs, J. L., Lonergan, S. M. **2004**. Effects of pork collagen on thermal and viscoelastic properties of purified porcine myofibrillar protein gels. *Meat Science* 66, 181-188.
- Drumm, T.D., Spanier, A.M. **1991**. Changes in the content of lipid autoxidation and sulphur-containing compounds in cooked beef storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39, 336-343.
- Dudziak, J.A., Foegeding, E.A. **1988**. Isolation of actomyosin and myosin from post-rigor turkey breast and thigh. *Journal of Food Science* 53, 1287-1290.
- Dufour, E., Haertlé, T. **1990**. Binding affinities of β -ionone and related flavor compounds to lactoglobulin: Effects of chemical modifications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38, 1691-1695.
- Dufour, J.P., Delbecq, P., Perez Albela, L. **2001**. Solid-phase microextraction combined with gas chromatography-olfactometry for analysis of cheese aroma. En Gas chromatography- olfactometry. The state of the Art. J.V. Leland, P. Schierberle, A. Buettner, T.E. Acree Eds., ACS Symposium Series 782. American Chemical Society. Washington DC. pp 123-137
- Elmore, J. S., Erbahadir, M. A., Mottram, D. S. **1997**. Comparison of dynamic headspace concentration on Tenax with solid phase microextraction for the analysis of aroma volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 2638-2641.
- Elmore, J. S., Mottram, D. S., Hierro, E. **2001**. Two-fibre solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of volatile aroma compounds in cooked pork. *Journal of Chromatography A* 905, 233-240.
- Fischer, N., Widder, S. **1997**. How proteins influence food flavor. *Food Technology* 51, 68-70.
- Flores, M., Aristoy, M.C., Toldrá, F. **1996**. HPLC purification and characterization of soluble alanyl aminopeptidase from porcine skeletal muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 2578-2583.
- Flores, M., Aristoy, M.C., Spanier, A.M., Toldrá, F. **1997a**. Non-volatile components effects on quality of Serrano dry-cured ham as related to processing time. *Journal of Food Science* 62, 1235-1239.

- Flores, M., Aristoy, M.C., Toldrá, F. **1997b**. Curing agents affect aminopeptidase activity from porcine skeletal muscle. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung* 205, 343-346.
- Flores, M., Grimm, C.C., Toldrá, F., Spanier, A.M. **1997c**. Correlations of sensory and volatile compounds of Spanish "Serrano" dry-cured ham as a function of two processing times. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 2178-2186.
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H.S. **1957**. A simple method of isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226, 497-509.
- Forss, D.A. **1972**. Odor and flavor compounds from lipids. *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids*, 13, 181-258.
- Frankel, E.N. **1972**. Review. Recent advances in lipid oxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 54, 495-511.
- Fukazawa, T., Nakai, H., Yasui, T. **1970**. Some properties of myofibrillar proteins obtained from low ionic strength extracts of washed myofibrils from pre-and post-rigor chicken pectoral muscle. *Journal of Food Science* 35, 464-468.
- Gandemer, G. **2002**. Lipids in muscles and adipose tissues, changes during processing and sensory properties of meat products. *Meat Science* 62, 309-321.
- García, C., Berdagué, J.L., Antequera, T., López-Bote, C., Cordoba J.J., Ventanas, J. **1991**. Volatile components of dry cured Iberian ham. *Food Chemistry* 41, 23-32.
- Gianelli, P., Flores, M., Moya, V. J., Aristoy, M. C., Toldrá, F. **2000**. Effect of carnosine, anserine and other endogenous skeletal peptides on the activity of porcine muscle alanyl and arginyl amino peptidases. *Journal of Food Biochemistry*. 24, 69-78.
- Gianelli, M.P., Flores, M., Toldrá, F. **2002a**. Optimisation of solid phase microextraction (SPME) for the analysis of volatile compounds in dry-cured ham. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 1703-1709.
- Gianelli, M.P., Flores, M., Toldrá, F. **2002b**. Importance of meat proteins on flavour release. En *Research Advances in the Quality of Meat and Meat products*. Ed Fidel Toldrá. Research Signpost, Fort P.O. Trivandrum, Kerala, India. Pp 2-16.

- Gianelli, M. P., Flores, M., Toldrá, F. **2003**. Interactions of soluble peptides and proteins from skeletal muscle on the release of volatile compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 6828-6834.
- Gianelli, M. P., Flores, M., Toldra, F. **2005**. Interaction of soluble peptides and proteins from skeletal muscle with volatile compounds in model systems as affected by curing agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 1670-1677.
- Gonzalez, 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.
- Goodridge, C. F., Beaudry, R. M., Pestka, J. J., Smith, D. M. **2003**. Solid phase microextraction-gas chromatography for quantifying headspace hexanal above freeze-dried chicken myofibrils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 4185-4190.
- Gou, P., Comaposada, J., Arnau, J. **2004**. Moisture diffusivity in the lean tissue of dry-cured ham at different process times. *Meat Science* 67, 203-209.
- Guichard, E. **2002**. Interactions between flavour compounds and food ingredients and their influence on flavour perception. *Food Reviews International* 18, 49-70.
- Guillard, A. S., LeQuere, J. L., Vendeuvre, J. L. **1997** Emerging research approaches benefit to the study of cooked cured ham flavour. *Food Chemistry* 59, 567-572.
- Hansen-Moller, J. **1997**. Evaluation of peptides generated in Italian-style dry-cured ham during processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 3123-3128.
- Heng, L., van Koningsveld, G. A., Gruppen, H., van Boekel, M. A. J. S., Vincken, J. P., Roozen, J. P., Voragen, A. G. J. **2004**. Protein-flavour interactions in relation to development of novel protein foods. *Trends of Food Science and Technology* 15, 217-224.
- Hermansson, A. M., Harbitz, O., Langton, M. **1986**. Formation of two types of gels from bovine myosin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 37, 69-84.
- Hidalgo, C., Padrón, R., Horowitz, R., Zhao, F.Q., Craig, R. **2001**. Purification of native myosin filaments from muscles. *Biophysical Journal* 81, 2817-2826.

- Hinrichsen, L.L., Pedersen, S.B. **1995**. Relationship Among Flavor, Volatile Compounds, Chemical-Changes, and Microflora in Italian-Type Dry-Cured Ham During Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 2932-2940.
- Janmey, P. A., Hvidt, S., Kas, J., Lerche, D., Maggs, A., Sackmann, E., Schliwa, M., Stossel, T. P. **1994**. The Mechanical-Properties of Actin Gels - Elastic-Modulus and Filament Motions. *Journal of Biological Chemistry* 269, 32503-32513.
- Janmey, P. A., Hvidt, S., Peetermans, J., Lamb, J., Ferry, J. D., Stossel, T. P. **1988**. Viscoelasticity of F-Actin and F-Actin Gelsolin Complexes. *Biochemistry* 27, 8218-8227.
- Janmey, P. A., Peetermans, J., Zaner, K. S., Stossel, T. P., Tanaka, T. **1986**. Structure and Mobility of Actin-Filaments As Measured by Quasi-Elastic Light-Scattering, Viscometry, and Electron-Microscopy. *Journal of Biological Chemistry* 261, 8357-8362.
- Jiang, S. T., Wang, F. J., Chen, C. S. **1989**. Properties of Actin and Stability of the Actomyosin Reconstituted from Milkfish (*Chanos-Chanos*) Actin and Myosin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37, 1232-1235.
- Jouenne, E., Crouzet, J. **2000a**. Determination of apparent binding constants for aroma compounds with beta-lactoglobulin by dynamic coupled column liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 5396-5400.
- Jouenne, E., Crouzet, J. **2000b**. Effect of pH on retention of aroma compounds by beta-lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 1273-1277.
- Jouenne, E., Crouzet, J. **2001**. Aroma compounds-proteins interaction using headspace techniques. En "Advances in experimental medicine and biology vol 488. Headspace analysis of foods and flavours. Theory and practice". Ed Rouseff and Cadwallader. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. Pp 33-41.
- Kauffman, R.G. **2001**. Meat composition. In Meat Science and applications. Ed HuiY.H., Nip W.I., Rogers, R.W., Young O.A. Ed Marcel Dekker, Inc New York. Pp 1-19.
- Kinsella, J.E. **1990**. Flavor perception and Binding. *Inform* 1, 215-226.
- Kuroda, M. **1982**. Direct extraction of G-actin from the myosin-removed myofibrils under the conditions of Low ionic strength. *Journal of Biochemistry* 92, 1863-1872.

- Laemmli, U.K. **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Landy, P., Druaux, C., Voilley, A. **1995**. Retention of Aroma Compounds by Proteins in Aqueous-Solution. *Food Chemistry* 54, 387-392.
- Landy, P., Courthaudon, J. L., Dubois, C., Voilley, A. **1996**. Effect of interface in model food emulsions on the volatility of aroma compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 526-530.
- Landy, P., Farès, K., Lorient, D., Voilley, A. **1997**. Effect of Chemical modification of sodium caseinate on diffusivity of aroma compounds in aqueous solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 2649-2653.
- Lehninger, A.L. **1970**. Biochemistry. Worth Publishers. Inc. Pp 583-603.
- Le Thanh, M., Goubet, I., Le Quere, J. L., Voilley, A. **1998**. Interactions between volatiles and lipids in complex systems. *Journal of the American Oil Chemists Society* 75, 441-445.
- Le Thanh, M., Thibeaudeau, P., Thibaut, M. A., Voilley, A. **1992**. Interactions Between Volatile and Nonvolatile Compounds in the Presence of Water. *Food Chemistry* 43, 129-135.
- Lethuaut, L., Weel, K. G. C., Boelrijk, A. E. M., Brossard, C. D. **2004**. Flavor perception and aroma release from model dairy desserts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 3478-3485.
- Leland, J. V. **1997**. Flavor interactions: The greater whole. *Food Technology* 51, 75-76, 78-80.
- Lichan, E., Nakai, S., Wood, D. F. **1985**. Relationship Between Functional (Fat Binding, Emulsifying) and Physicochemical Properties of Muscle Proteins - Effects of Heating, Freezing, Ph and Species. *Journal of Food Science* 50, 1034-1040.
- López, M.O., de la Hoz, L., Cambrero M.I., Gallardo, E., Reglero, G., Ordóñez, J.A. **1992**. Volatile compounds of dry hams from Iberian pigs. *Meat Science* 31, 267-277.
- Lubbers, S., Landy, P., Voilley, A. **1998**. Retention and release of aroma compounds in foods containing proteins. *Food Technology* 52, 68-74, 208-214.

- Macfarlane, J.J., Mckenzie, I.J. **1976**. Pressure-induced solubilization of myofibrillar proteins. *Journal of Food Science* 41, 1442-1446.
- Martín, L., Córdoba, J.J., Ventanas, J., Antequera, T. **1999**. Changes in intramuscular lipids during ripening of Iberian dry-cured ham. *Meat Science* 51, 129-134.
- Martin, L., Timon, M. L., Petron, M. J., Ventanas, J., Antequera, T. **2000**. Evolution of volatile aldehydes in Iberian ham matured under different processing conditions. *Meat Science* 54, 333-337.
- Martone, C. B., Busconi, L., Folco, E. J., Trucco, R. E., Sanchez, J. J. **1986**. A simplified myosin preparation from marine fish species. *Journal of Food Science* 51, 1554-1555.
- Mcneill, V.L., Schmidt, K.A. **1993**. Vanillin interaction with milk proteins isolates in sweetened drinks. *Journal of Food Science* 58, 1142-1144.
- Merril, C.R., Goldman, D., Sedman, S.A., Ebert, M.H. **1981**. Ultra sensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid. *Science* 211, 1437-1438.
- Möhler, K. **1982**. Ciencia y tecnología de la carne. Teoría y práctica. El curado. Editorial Acribia. Zaragoza. pp 67-81.
- Molina, I., Toldrá, F. **1992**. Detection of Proteolytic Activity in Microorganisms Isolated from Dry-Cured Ham. *Journal of Food Science* 57, 1308-1310.
- Morrissey, P.A., Mulvihill, D.M., O'Neill, E.M. **1987**. Functional properties of muscle proteins. En *Developments in food proteins-vol 5*. Ed Hudson, B.J.F. Elsevier Applied Science. London and New York. Pp 195-256.
- Motilva, M.J., Toldrá, F., Nadal, M.I., Flores, J. **1994**. Pre-Freezing Hams Affects Lipolysis During Dry-Curing. *Journal of Food Science* 59, 303-305.
- Motilva, M.J., Toldra, F., Nieto, P., Flores, J. **1993**. Muscle lipólisis phenomena in the processing of dry-cured ham. *Food Chemistry* 48, 121-125.
- Mottram, D. S., Edwards, R. A., Macfie, H. J. H. **1982**. A Comparison of the Flavor Volatiles from Cooked Beef and Pork Meat Systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 33, 934-944.
- Mottram, D. S. **1998**. Flavour formation in meat and meat products: a review. *Food Chemistry* 62, 415-424.

- Murch, S. J., Bruce, H. L., Ball, R. O. **1992**. Rapid separation and quantification of myofibrillar proteins by high performance gel permeation chromatography. *Food Research International* 25, 109-115.
- Nawar, W. W. **1971**. Some Variables Affecting Composition of Headspace Aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 19, 1057-1059.
- Needs, E.C., Ford, G.D., Owen, A.J., Tuckley, B. **1983**. A method for the quantitative determination of individual free fatty acids in milk by ion exchange resin adsorption and gas-liquid chromatography. *Journal of Dairy Research* 50, 321-329.
- Newman, J.K., Zaner, K.S., Schick, K.L., Gershman, L.C., Selden, L.A., Kinosian, H.J., Travis, J.L., Estes, J.E. **1993**. Nucleotide exchange and rheometric studies with F-actin prepared from ATP-monomeric or ADP-monomeric actin. *Biophysical Journal* 64, 1559-1566.
- NG, P.K.W., Hoehn, E., Bushuk, W. **1989**. Binding of Vanillin by fababean proteins. *Journal of Food Science* 54, 105-107.
- Okeefe, S. F., Wilson, L. A., Resurrección, A. P., Murphy, P. A. **1991**. Determination of the Binding of Hexanal to Soy Glycinin and Beta-Conglycinin in An Aqueous Model System Using A Headspace Technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39, 1022-1028.
- O'Neill, T. E., Kinsella, J. E. **1987**. Binding of Alkanone Flavors to Beta-Lactoglobulin - Effects of Conformational and Chemical Modification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35, 770-774.
- O'Neill, T. E. **1996**. Flavor binding by food proteins: An overview. *Flavor-Food Interactions* 633, 59-74.
- Pardee, J.D., Spudich, A. **1982**. Purification of muscle actin. *Methods in enzymology* 85, 164-179.
- Pearson, A. M., Wolzak, A. M., Gray, J. I. **1983**. Possible Role of Muscle Proteins in Flavor and Tenderness of Meat. *Journal of Food Biochemistry* 7, 189-210.
- Pearson, A.M., Young R.B. **1989**. Muscle and meat biochemistry. En *Food Science and Technology. A series of monographs*. Schweigert B.S and Taylor S.L Ed; Academic Press, Inc, Oval Road, London. Pp 1-29; 66-94 and 98-127.
- Pelletier, E., Sotmann, K., Guichard, E. **1998**. Measurement of interactions between β -lactoglobulin and flavor compounds (Esters, acids and pirazines) by affinity and exclusion size chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 1506-1509.

- Pérez-Juan, M., Flores, M., Toldrá, F. **2006a**. Simultaneous process to isolate actomyosin and actin from post-rigor porcine skeletal muscle. *Food Chemistry* (aceptado).
- Pérez-Juan, M., Flores, M., Fidel Toldrá, F. **2006b**. Generation of volatile flavour compounds as affected by the chemical composition of different dry-cured ham sections. *European Food Research and Technology* 222, 658-666.
- Pionnier, E., Engel, E., Salles, C., Le Quere, J. L. **2002**. Interactions between non-volatile water-soluble molecules and aroma compounds in Camembert cheese. *Food Chemistry* 76, 13-20.
- Pionnier, E., Nicklaus, S., Chabanet, C., Taylor, A. J., Le Quere, J. L., Salles, C. **2003**. Physiological and physico-chemical factors determining flavor perception of cheese. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 226, U71-U71 127-AGFD Part 1.
- Rodríguez-Núñez, E., Aristoy, M.C., Toldrá, F. **1995**. Peptide generation in the processing of dry-cured ham. *Food Chemistry* 53, 187-190.
- Ruiz, J., Cava, R., Ventanas, J., Jensen, M.T. **1998a**. Headspace solid phase microextraction for the analysis of volatiles in a meat product: Dry-cured Iberian ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 4688-4694.
- Ruiz, J., Ventanas, J., Cava, R., Timón, M.L., García, C. **1998b**. Sensory characteristics of Iberian ham: influence of processing time and slice location. *Food Research International* 31, 53-58.
- Ruiz, J., Ventanas, J., Cava, R., Andrés, A., García, C. **1999**. Volatile compounds of dry-cured Iberian ham as affected by the length of the curing process. *Meat Science* 52, 19-27.
- Ruiz, J., Muriel, E., Ventanas, J., **2002**. The flavour of Iberian ham. En *Research advances in the quality of meat and meat products*. Ed. F.Toldrá. Research Signpost, Trivandrum, India. Pp 289-309.
- Sabio, E., Vidal-Aragón, M.C. **1998**. Volatile compounds present in six types of dry-cured ham south European countries. *Food Chemistry* 51, 660-672.
- Salles, C., Engel, E., Nicklaus, S., Taylor, A. J., Le Quere, J. L. **2003**. Release of taste and aroma compounds from dairy products: Relation with perception. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 226, 068-U62 068-AGFD Part 1.

- Scatchard, G. **1949**. The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 51, 660-672.
- Schober, A. L., Peterson, D. G. **2004** Flavor release and perception in hard candy: Influence of flavor compound-compound interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 2623-2627.
- Segars, R.A., Nordstrom, H.A., Kapsalai, J.G. **1974**. Textural characteristics of beef muscles. *Journal of texture studies* 5, 283-297.
- Sentandreu, M. A., Toldrá, F. **2001**. Dipeptidyl peptidase activities along the processing of Serrano dry-cured ham. *European Food Research and Technology* 213, 83-87.
- Sentandreu, M. A., Stoeva, S., Aristoy, M. C., Laib, K., Voelter, W., Toldrá, F. **2003**. Identification of small peptides generated in Spanish dry-cured ham. *Journal of Food Science* 68, 64-69.
- Shahidi, F. Rubin, L.J., D'Souza, L.A. **1986**. Meat flavor volatiles: a review of the composition techniques of analysis, and sensory evaluation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 24, 141-243.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. **1985**. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150, 76-85.
- Soliman, Y.K.S., Piggot, G.M. **1975**. Lipid-protein interaction during aqueous extraction of fish protein: fish actin preparation and purification. *Journal of Food Science* 40, 520-522.
- Syrový, I. **1984**. Separation of muscle proteins. *Journal of chromatography* 300, 225-247.
- Taniguchi, M. **1976**. Diphasic transformations of F-actin. Effects of urea and MgCl₂ on F-actin. *Biochimica et Biophysica Acta* 427, 126-140.
- Taylor, A. J. **1996**. Volatile flavor release from foods during eating. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 36, 765-784.
- Taylor, A.J. **1998**. Physical chemistry of flavor. *International Journal of Food Science and Technology* 33, 53-62.
- Timón, M.L., Ventanas, L., Martín, L., Tejada, J.F., Garcia, C. **1998**. Volatile compounds in supercritical carbon dioxide extracts of Iberian ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 5143-5150.

- Toldrá, F., Miralles, M.C., Flores, J. **1992**. Protein extractability in dry-cured ham. *Food Chemistry* 44, 391-399.
- Toldrá, F., Rico, E., Flores, J. **1993**. Cathepsin B, D, H and L activity in the processing of dry-cured-ham. *Journal of the Science of Food and Agricultural* 62, 157-161.
- Toldrá, F., Flores, M., Aristoy, M.C., Virgili, R., Parolari, G. **1996**. Pattern of muscle proteolytic and lipolytic enzymes from light and heavy pigs. *Journal of the Science of Food and Agricultural* 71, 124-124.
- Toldrá, F., Flores, M., Sanz, Y. **1997**. Dry-cared ham flavour: Enzymatic generation and process influence. *Food Chemistry* 59, 523-530.
- Toldrá, F., Flores, M. **1998**. The role of muscle proteases and lipases in flavour development during the processing of dry-cured ham. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38, 331-352.
- Toldrá, F., Aristoy, M. C., Flores, M. **2000**. Contribution of muscle aminopeptidases to flavor development in dry-cured ham. *Food Research International* 33, 181-185.
- Toldrá, F. **2005**. Meat: Chemistry and biochemistry. En Handbook of Food Science, Technology and Engineering, vol. 1. Ed. Hui Y.H., Culbertson J.D., Duncan S., Guerrero-Legarreta I., Li-Chan E.C.Y., Ma C.Y., Manley C.H., McMeekin T.A., Nip W.K, Nollet L.M.L., Rahman M.S., Toldrá F., Xiong Y.L. CRC Press. Boca Raton, FL. Pp. 1-18.
- Toorop, R.M., Murch, S., Ball, R.O. **1997**. Development of a rapid and accurate method for separation and quantification of myofibrillar proteins in meat. *Food Research International* 30, 619-627.
- Vestergaard, C. S., Schivazappa, C., Virgili, R. **2000**. Lipolysis in dry-cured ham maturation. *Meat Science* 55, 1-5.
- Wampler, T.P. **1997**. Analysis of Food Volatiles using Headspace-Gas chromatographic techniques. En Techniques for analyzing food aroma. Ed. Ray Marsili. Marcel Dekker, Inc. New York. Pp 27-58.
- Wang, S.F., Smith, D.M. **1994**. Heat-Induced denaturation and rheological properties of chicken breast myosin and F-actin in the presence and absence of pyrophosphate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42, 2665-2670.
- Weel, K. G. C., Boelrijk, A. E. M., Alting, A. C., Van Mil, P. J. J. M., Burger, J. J., Gruppen, H., Voragen, A. G. J., Smit, G. **2002**. Flavor release and perception of flavored whey protein gels: Perception is determined by

- texture rather than by release. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 5149-5155.
- Whitaker, J., Tannenbaum, S. R. **1977**. Food Proteins. Ed Avi Publishing company Westport, Connecticut. Pp 121-174.
- Xu, J., Schwarz, W. H., Kas, J. A., Stossel, T. P., Janmey, P. A., Pollard, T. D. **1998**. Mechanical properties of actin filament networks depend on preparation, polymerization conditions, and storage of actin monomers. *Biophysical Journal* 74, 2731-2740.
- Yeretzian, C., Pollien, P., Lindinger, C., Ali, S. **2004**. Individualization of flavor preferences: Toward a consumer-centric and individualized aroma science. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 3, 152-159.
- Young, O.A., West J. **2001**. Meat color. En Meat Science and applications. Ed Hui Y.H., Nip W.I., Rogers, R.W., Young O.A. Ed Marcel Dekker, Inc New York. Pp 39-69.
- Zaner, K. S., King, R. G., Newman, J., Schick, K. L., Furukawa, R., Ware, B. R. **1988**. Rheology of G-Actin Solutions. *Journal of Biological Chemistry* 263, 7186-7189.
- Zarkadas, C. G., Karatzas, C. N., Khalili, A. D., Khanizadeh, S., Morin, G. **1988**. Quantitative determination of the myofibrillar proteins and connective tissue content in selected porcine skeletal muscles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36, 1131-1146.
- Zhang, Z. Y., Pawliszyn, J. **1993**. Headspace Solid-Phase Microextraction. *Analytical Chemistry* 65, 1843-1852.
- Zhou, S. Y.; Decker, E. A. **1999**. Ability of carnosine and other skeletal muscle components to quench unsaturated aldehydic lipid oxidation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 51-55.

APÉNDICE

APÉNDICE I

“Generation of volatile flavour compounds as affected by the chemical composition of different dry-cured ham sections”

Pérez-Juan, M., Flores, M., Toldrá, F.

European Food Research and Technology 2006,
222: 658-666

María Pérez-Juan · Mónica Flores · Fidel Toldrá

Generation of volatile flavour compounds as affected by the chemical composition of different dry-cured ham sections

Received: 19 July 2005 / Revised: 3 November 2005 / Accepted: 6 November 2005 / Published online: 16 December 2005
© Springer-Verlag 2005

Abstract The composition of different dry-cured ham sections has been determined in order to study their contribution to flavour generation. The proteins, free amino acids, free fatty acids and volatile compounds were analysed in different sections of dry-cured hams with 7 and 12 months of processing. The main differences among sections were detected in free amino acids and volatile compounds. To sum up, there was a higher concentration of free amino acids in the centre section than in the butt and shank sections. However, after 12 m of ripening the difference among sections was lower and only the butt was the one with the lowest concentration. Similar results were obtained in the content of volatile compounds, the centre part of the hams contained a higher proportion of volatile compounds after 7 m of ripening than the shank and butt sections. Nevertheless, in 12 months dry-cured hams there are changes in the proportions of volatile compounds being the centre section the one with the highest proportion of volatile compounds due not only to the higher concentration of free amino acids but also to the oxidation of unsaturated fatty acids.

Keywords Protein · Free amino acids · Free fatty acids · Volatile compounds · Dry-cured ham · Flavour

Introduction

The high quality of dry-cured ham depends on its unique flavour developed through the long ripening–drying stage. However, in order to perceive the flavour, volatile compounds must be released from the food matrix and transported to the flavours receptors in the mouth and nose [1].

In this sense, the volatile compounds generated in dry-cured ham will contribute to the aroma depending on its concentration, odour threshold and on the interaction with other food components that will affect its gas phase concentration and therefore, the perceived aroma.

Dry-cured ham is a heterogeneous product where different sections can be appreciated because of the intra- and inter-muscle variations that exists in animal tissues [2]. Also, dry-cured ham undergoes a salting and dehydration process that influences the dynamics of water, sodium chloride and nitrate, nitrite migration [3]. Moreover, moisture diffusion is related to meat characteristics including temperature, pH, structure and composition [4].

Many studies of dry-cured ham flavour have been done taking into account the anatomical localisation, generally in the centre part of the ham including *Biceps femoris*, *Semimembranosus* and *Semitendinosus* muscles [5–8] or in *Biceps femoris* [9–11] or in *Semimembranosus* muscles [12], because these latest muscles are representative of the inner and outer parts of the ham, respectively. Also, the effect of slice location on sensory characteristics has been study showing an important effect on the texture and appearance while small differences were obtained in aroma and flavour [13]. However, none of these studies have considered the different sections in a ham. In every section, there are biochemical reactions during the drying–curing process that affect proteolysis and lipolysis and contribute to the development of an adequate texture and a characteristic flavour [14]. On the other hand, the different sodium chloride content and moisture in the sections affect the enzyme activity responsible for different amounts of flavour precursors and finally, this enzyme activity will affect the degradation of the matrix. Therefore, the aim of this study was to determine how the biochemical structure (proteins and lipids) and their degradation products affects the content of volatile compounds in different sections of the ham in order to study their contribution to flavour generation.

M. Pérez-Juan · M. Flores (✉) · F. Toldrá
Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC),
P.O. Box 73, 46100 Burjassot (Valencia), Spain
e-mail: mlflores@iata.csic.es
Tel.: +34-96-3900022
Fax: +34-96-3636301

Materials and methods

Samples

Two dry-cured hams were selected from a local industry and processed according to a traditional methodology and ripened for 7 (short process) and 12 (long process) months. The processing consisted of a salting (12 days at 3 °C), postsalting (50 days at 4–6 °C) and ripening–drying (first phase 60 days at 12 °C; second phase 60 days at 18 °C; third phase 30 days at 30 °C and fourth phase 150 days at 15 °C) stages.

Samples were taken by sectioning the hams at the level of the shank (S), the centre (C) and the butt (B) parts as shown in Fig. 1. The following muscles were mainly included in each section. Shank contained muscles *Biceps femoris*, *Flexor digitorum superficialis* and *Gastrocnemius*, the Centre section contained *Biceps femoris*, *Semitendinosus* and *Seminembranosus* and the Butt contained *Biceps femoris* and *Gluteus accesorius*, *medius* and *profundus*. In all the sections, four portions of approximately 100 g without the subcutaneous fat were vacuum packaged and stored frozen at –80 °C until analysis.

Chemical analyses

Moisture content of dry-cured hams was determined after dehydration at 100 °C to a constant mass (ISO, 1973) while chloride content was determined by the Volhard method (ISO 1841.1: 1996). The pH was measured in a mixture of dry-cured ham water (1:1) using a pH meter EA 920 (Orion Research, Boston, USA).

Protein analysis

The extraction of sarcoplasmic and myofibrillar proteins was performed by the procedure described by Molina and Toldrà [15]. Dry-cured ham was homogenised (dilution 1:10, w/v) in a stomacher Lab-blender 400 (Seward Medical, London, UK) with 30 mM phosphate buffer, pH 7.4 during 4 min. The mixture was centrifuged at 10,000×g during 20 min at 4 °C and the supernatant used for sarcoplasmic proteins analysis. The procedure was repeated twice and the pellet was finally suspended in 9 vol of 100 mM phosphate buffer, pH 7.4 containing 0.7 M potassium iodide. The mixture was homogenised in a stomacher for 8 min and then centrifuged at 10,000×g for 20 min at 4 °C. The protein concentration of both supernatants containing sarcoplasmic and myofibrillar proteins was calculated by the method of Smith et al. [16] using bicinchoninic acid as reagent and bovine serum albumin as standard.

The analysis of proteins was done by SDS-PAGE using the method described by Toldrà et al. [17]. The sarcoplasmic and myofibrillar extracts were mixed in a ratio 1:1 with 50 mM Tris buffer, pH 6.8, containing 8 M urea, 2 M thiourea, 75 mM dithiothreitol, 3% (w/v) SDS and 0.05% bromophenol blue. The mixture was heated at 100 °C for 4 min and used for electrophoresis. The amount

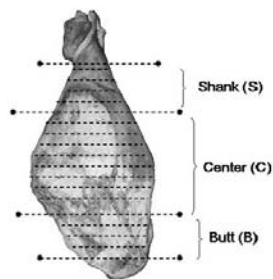


Fig. 1 Muscle sample location of the different sections of dry-cured hams

of protein injected into the gels was 12 µg in each lane. Ten percent SDS-PAGE gels were prepared and stained with coomassie brilliant blue R-250 [18]. Standard proteins, myosin 200 kDa, β-galactosidase 116.3 kDa, phosphorilase b 97.4 kDa, serum albumin 66.2 kDa, ovalbumin 45 kDa and carbonic anhydrase 31 kDa, from BioRad (Hercules, CA, USA) were run simultaneously for molecular mass identification.

Analysis of free amino acids

Samples for free amino acid analysis were extracted and deproteinized following the method described by Aristoy and Toldrà [19]. Dry-cured ham samples were homogenised with 0.01 M HCl (dilution 1:5) in a Stomacher for 8 min at 4 °C and centrifuged in cold at 10,000×g for 20 min. Supernatant was filtered through glass wool and stored at –20 °C until use. Thawed samples (100 µl) plus 50 µl of an internal standard (10 mM norleucine) were deproteinized with 2.5 vol of acetonitrile. The supernatant was derivatised to its phenylthiocarbonyl derivatives according to the method of Bidlingmeyer et al. [20]. Derivatised samples were analysed in a 1050 Hewlett Packard (Palo Alto, CA, USA) HPLC system with a variable UV detector at 254 nm in a Nova-Pack C-18 column (3.9×300 mm) (Waters Co, MA, USA). The separation was achieved in 65 min at 52 °C, using a gradient between two solvents: 70 mM sodium acetate pH 6.55 containing 2.5% acetonitrile (solvent A) and acetonitrile:water:methanol, 45:40:15, v/v (solvent B) [21].

Free fatty acid analysis

Lipids were extracted from 5 g ham sample with methylene chloride/methanol (2:1) according to the method of Folch et al. [22] and expressed as intramuscular fat content (IMF). The free fatty acid composition was determined as described by Needs et al. [23] by means of gas chromatography of the corresponding methyl esters. Free fatty acids were purified from the total lipids using an anion exchange resin (Amberlyst A26) as described Coutron-Gambotti and Gandemer [24]. The derivatives were obtained in

660

Table 1 pH, moisture and sodium chloride content in the different zones of dry-cured hams after 7 and 12 months of ripening

	pH			Moisture (%)			NaCl (dm)			IMF (g/100 g dm)		
	S	C	B	S	C	B	S	C	B	S	C	B
7 months	6.1	5.9	6.1	60.5 ^b	66.4 ^a	59.3 ^b	9.3 ^b	12.2 ^a	11.2 ^{ab}	11.7	13.1	10.5
12 months	6.2	6.3	6.3	58.6	61.6	56.9	9.1	11.7	10.6	13.5 ^a	10.7 ^b	12.2 ^{ab}

Means with different letters are significantly different among section in the hams ($p < 0.05$)

accordance with the method of Berry et al. [25]. The analysis was carried out in a Fisons 816 gas chromatograph equipped with a split injector, a flame ionisation detector and a DB 225 capillary column (J & W Scientific, Barcelona, Spain), 30 m in length, with an internal diameter of 0.25 mm and 0.25 µm film thickness. The oven temperature was held at 160 °C for 2 min, increased to 190 °C at 10 °C/min and kept for 5 min, then increased to 210 °C at 10 °C/min and kept for 10 min, then increased to 220 °C at 7 °C/min and kept for 5 min. The head pressure of helium carrier gas was 140 kPa, the flow rate was set at 0.9 ml/min and the split ratio was 1:50. Detector and injector temperatures were set at 240 °C. The individual fatty acids were identified by comparing their retention times with those of standard fatty acids. The internal standard used was C20:0.

Analysis of volatile compounds

The volatile compounds were extracted from the headspace of 3 g of dry-cured ham cut in 2 mm cubes using SPME technique with the fibre 85 µm carboxen/polydimethylsiloxane (Car/PDMS) stableflex (Supelco, Bellefonte, PA) [8]. The compounds were separated in a gas chromatograph (GC HP 5890 series II, Hewlett Packard, Palo Alto, CA), and identified and estimated with a HP 5972 mass selective detector (Hewlett Packard, Palo Alto, CA), following the procedure described by Gianelli et al. [8]. Results were expressed on either a total or single ion chromatogram in an arbitrary scale (eV).

Statistical analysis

The effect of different sections of dry-cured ham on the variables studied (chemical composition, free amino acids, free fatty acids and volatile compounds) was done by analysis of variance using the statistics software SPSS for Windows (v 11.5) (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). In those cases where the effect was significant, the means were compared using Tukey Honestly Significantly Different (HSD) procedure.

Results and discussion

The preservation of dry-cured hams is due to a reduction in water activity essentially as a consequence of the penetration of salt and removal of water from the meat [3]. In the present study, different sections of the hams were

compared in order to determine the effect of structure on flavour formation.

The results of the chemical analyses in the different sections are shown in Table 1. The different sections, shank, centre and butt, showed significant differences in moisture and NaCl concentration in dry-cured hams ripened for 7 months while the IMF content was significantly different in dry-cured hams ripened for 12 months. These results were expected because after 7 m of ripening the moisture in the ham diminished by dehydration although it depends on the area of the ham [3]. These authors showed that moisture content diminished more quickly in the butt and external muscles that are not covered by skin and fat while the shank is the most isolated zone and salt penetration takes place mainly through the skin and fat, which absorbs salt during the salting period and deliver it to the muscle. In this sense, we obtained a lower significant NaCl concentration in the shank than in the centre after 7 m of ripening; however no significant differences were detected after 12 months of ripening.

Sarcoplasmic and myofibrillar proteins were extracted from the different sections of the hams and analysed by electrophoresis (see Fig. 2). The most relevant differences were observed in the myofibrillar proteins because the hydrolysis of sarcoplasmic proteins was very similar in the three sections of the hams at 7 and 12 months of ripening. The main differences in myofibrillar proteins were observed in the butt section in both hams (7 m and 12 m).

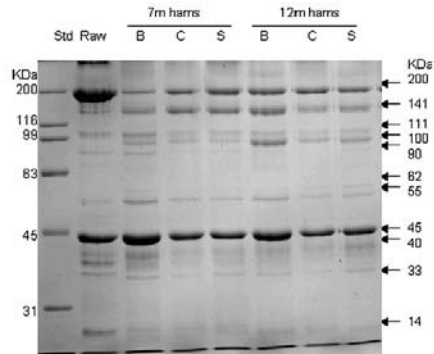


Fig. 2 Ten percent SDS-PAGE gel of myofibrillar proteins in the different sections of dry-cured hams after 7 and 12 months of ripening. (Std) BioRad molecular weight standards, (Raw) fresh ham, (B) butt, (C) centre and (S) shank

Table 2 Free amino acid content (expressed as mg/100 g dm) in different sections of dry-cured hams ripened for 7 and 12 months

	Dry-cured ham (7 months)				Dry-cured ham (12 months)			
	Shank	Centre	Butt	P	Shank	Centre	Butt	P
Essential								
His	217.4 ^a	226.2 ^a	117.3 ^b	***	186.0	189.1	166.8	
Thr	352.4 ^a	395.0 ^a	217.6 ^b	***	346.7 ^a	371.8 ^a	302.0 ^b	**
Val	398.3 ^b	432.1 ^a	268.4 ^c	***	408.7 ^{a,b}	442.8 ^a	372.7 ^b	**
Met	180.9 ^b	232.6 ^a	139.5 ^c	***	190.9	179.5	170.6	
Ile	301.4 ^b	365.0 ^a	241.8 ^c	***	326.7	340.1	297.6	
Leu	519.9 ^b	655.0 ^a	399.9 ^c	***	534.6 ^{a,b}	585.9	487.6 ^b	*
Phe	345.0 ^b	449.4 ^a	274.2 ^c	***	372.1	388.4	338.3	
Trp	105.6 ^a	114.2 ^a	63.9 ^b	*	130.3	117.9	92.1	
Lys	701.9 ^a	699.9 ^a	408.6 ^b	**	595.0	602.5	536.8	
Total Essential	3122.9	3569.6	2131.2		3091.1	3218.1	2764.5	
Non-essential								
Asp	214.9 ^a	218.2 ^a	20.0 ^b	***	217.4	267.1	226.6	
Glu	657.2 ^a	455.9 ^b	256.8 ^c	***	550.7	595.1	481.9	
Ser	368.2 ^a	399.1 ^a	236.9 ^b	***	335.4	348.3	282.3	
Asn	147.5 ^b	204.5 ^a	101.7 ^c	***	79.1	79.4	66.9	
Gly	321.9 ^a	347.6 ^a	187.2 ^b	***	289.0 ^a	303.6 ^a	242.7 ^b	**
Gln	229.5 ^a	251.6 ^a	126.1 ^b	***	72.7	71.4	53.2	
Ala	516.8 ^a	578.3 ^a	429.2 ^b	**	535.5 ^{a,b}	557.2 ^a	487.6 ^b	*
Arg	423.8 ^a	429.6 ^a	266.4 ^b	**	364.7 ^{a,b}	377.6 ^a	309.8 ^b	*
Pro	367.2 ^a	364.7 ^a	232.3 ^b	***	388.4 ^a	427.4 ^a	336.1 ^b	**
Tyr	270.2 ^b	327.7 ^a	194.3 ^c	***	273.0 ^{a,b}	300.9 ^a	251.5 ^b	*
OH-pro	4.8	4.4	3.9		3.2	3.8	2.9	
Tau	222.0 ^a	205.0 ^a	147.2 ^b	**	174.7 ^a	160.1 ^a	123.5 ^b	***
β-ala	6.8	7.3	6.2		8.0	9.6	8.7	
Total non-essential	3750.9	3794.1	2208.1		3291.7	3501.4	2873.7	
Dipeptides								
Carnosine	1078.5	1143.2	990.1		934.4	936.8	975.3	
Anserine	45.5	41.9	35.3		38.0	32.9	30.7	
Balanine	59.7	52.6	45.5		88.5 ^a	78.7 ^b	63.0 ^b	*
Total dipeptides	1183.8	1237.7	1070.9		1060.9	1048.3	1069.0	
Total	6106.1 ^a	5885.1 ^{a,b}	3686.2 ^b	*	5882.9	5425.20	4727.15	

Means with different letters in the same row in each dry-cured ham are significantly different at P value

*P<0.05;**P<0.01;***P<0.001

In 7 m ripened dry-cured hams, the bands at 111, 100, 55, 31 and 25 kDa were more intense than in the centre and shank sections of the hams. Also the actin band (45 kDa) was more intense in the butt meaning a lower degradation of this myofibrillar protein. Similar results were observed in 12 m ripened dry-cured hams, where more intense bands were observed in the butt than in the other sections.

These results are in accordance with Toldrá et al. [26] who indicated that the main proteolytic changes during the dry-curing process are observed in the most abundant proteins, especially by a complete degradation of myosin heavy chain in almost 7 months of dry-curing while the actin band is less degraded being well detected after 12 months of curing. In this case, the myosin heavy chain band was not completely degraded and could be observed although in a very low proportion.

The generation of small peptides and free amino acids during the proteolysis in dry-cured hams is mainly pro-

duced by endogenous enzymes, exopeptidases, which are still active during the long curing process [14]. These compounds are very important for dry-cured ham flavour as they can be further degraded to aromatic compounds. Results of free amino acids concentrations in the different sections of the hams are presented in Table 2. In 7 m ripened hams, the concentration of all the amino acids was significantly different in the sections except for hydroxyproline and β-alanine. The concentrations of val, met, ile, leu, phe, asn and tyr were significantly higher in the centre than in the butt and shank while his, thr, trp, lys, asp, ser, gly, gln, ala, arg, pro and tau were significantly higher in the shank and centre than in the butt. However, in 12 m ripened dry-cured hams, few differences were observed among sections. Only, thr, gly, pro and tau were significantly lower in the butt than in the centre and shank while val, leu, ala, arg and tyr were lower in the butt than in the centre. In respect to the content of natural dipeptides, there

were no significant differences in 7 m ripened hams while in 12 m ripened hams the content of balenine was lower in the butt than in the shank. The amino acids are represented by groups (essential and non-essential), dipeptides and total compounds in each section and time of ripening (Table 2). In hams ripened for 7 months the butt is the section with the lowest content in essential and non-essential amino acids; however, after 12 m of ripening the butt contains the lowest concentration although the differences are shorter.

The higher moisture in the centre part of the hams can favour the activity of the endogenous muscle proteolytic enzymes, aminopeptidases [14], responsible for the higher concentration of amino acids in the centre than in the other sections. In contrast, the higher concentration of amino acids in the shank will be also favoured by a lower salt concentration in this section (Table 1). Probably this could be due to the activity of the main aminopeptidase, alanylaminopeptidase, not only for its abundance, but also for its broad activity being able to hydrolyse most of the amino acids in the N-terminus [27] and also because it is inhibited by the presence of sodium chloride [28].

Free fatty acids (FFA) were analysed in the different sections as indicators of the lipolysis process in muscle tissue (Table 3). In 1994, Motilva et al. [29] reported that the lipolysis in intramuscular fat during processing of Serrano dry-cured ham was more intense during the earlier stages of processing, from 0 to 5 months. In the present study, few significant differences were detected among sections. After 7 m of ripening only the polyunsaturated acid C20:3 was significantly lower in the centre than in the other sections. On the other hand, in dry-cured hams ripened for 12 m, the C14:0 acid was lower in the centre than in the other sections and C18:1 was lower in the centre than in the shank. Probably, there are other factors such as processing conditions and raw materials that produced many changes in the fatty acids composition [30].

The analysis of volatile compounds in the headspace of the different sections would be an indication of the aroma

perceived. The volatile compounds present in each section of the ham were extracted using SPME with the optimised process described by Gianelli et al. [8]. A total of 82 compounds were identified and estimated being 21 alcohols, 11 aldehydes, 12 ketones, 10 esters, 7 acids, 5 aliphatic hydrocarbons, 3 sulphur and 3 nitrogen compounds and 10 other compounds (Table 4).

In general, the compounds identified in the headspace have been previously detected in the headspace of different types of dry-cured hams using different extraction techniques [7, 9, 31]. Moreover, these compounds were previously extracted using SPME and Car/PDMS fibre by Gianelli et al. [8] although in the present study a higher proportion of ester compounds was detected.

The estimated concentrations of these compounds in the different sections are represented in Fig. 3. The headspace of the hams ripened for 7 and 12 m contained essentially the same components. In dry-cured hams ripened for 7 months, the concentration of alcohols was the most abundant in the centre, shank and butt sections while after 12 m of ripening, the alcohol content was also the most abundant in the centre and butt sections. However, the content of acids was the highest in the shank.

The major compounds extracted in both dry-cured hams were 3-methyl butanal, hexanal, ethanol, isopropanol, 3-methyl butanol, acetone, 3-hydroxy-2-butanone, ethyl acetate, ethyl 3-methyl butanoate, acetic and butanoic acids. Moreover, significant differences among sections were observed (Table 4). The abundance of these volatile compounds is in accordance with a previous study where the use of Car/PDMS fibre resulted in a high proportion of 3-methyl-butanal, hexanal and acetic acid in the headspace of Serrano dry-cured ham ripened for 12 m [8]. In contrast, these compounds have not been recovered in high percentages by dynamic headspace analysis [7, 9, 31] due to the low affinity of Tenax for low-boiling compounds and the high affinity of the fibre for these compounds.

In dry-cured hams ripened for 7 m, most of the alcohol, ketones, acids and ester compounds were significantly

Table 3 Free fatty acid contents (expressed as mg/100 g dm) in different sections of dry-cured hams ripened for 7 and 12 months

Fatty acid	Dry-cured ham (7 months)				Dry-cured ham (12 months)			
	Shank	Centre	Butt	P	Shank	Centre	Butt	P
C14:0	5.6	5.1	4.1		5.7 ^a	3.9 ^b	5.0 ^b	**
C16:0	259.5	261.9	237.9		327.4	293.7	293.0	
C18:0	168.4	164.2	140.7		180.9	156.5	174.5	
SFA	433.8	431.3	382.7		514.0	454.2	472.6	
C16:1	28.0	28.4	24.6		29.1	24.0	25.1	
C18:1	320.3	300.4	255.9		340.6 ^a	251.9 ^b	304.7 ^{a,b}	*
C20:1	7.1	8.9	4.6		5.9	6.6	9.4	
MUFA	355.4	337.7	285.1		375.6	282.5	339.1	
C18:2	384.9	408.7	352.6		429.5	401.4	483.6	
C18:3	9.4	9.0	8.7		9.7	7.9	9.9	
C20:2	1.9	1.9	1.5		4.2	2.9	3.3	
C20:3	12.4 ^a	8.0 ^b	12.9 ^a	*	14.1	8.5	13.7	
C20:4	116.9	159.9	134.7		179.6	138.7	161.5	
C22:4	11.0	13.9	11.5		12.6	12.3	13.8	
PUFA	536.5	601.6	521.9		649.6	571.6	685.9	

Means with different letters in the same row in each dry-cured ham are significantly different at P value

*P<0.05; **P<0.01.

Table 4 Volatile compounds identified and quantified in the headspace of different sections of dry-cured hams ripened for 7 and 12 months using SPME (Car/PDMS stb fibre). Results are expressed as means of four replicates of total ion current (TIC) area units ($\times 10^{-3}$) per 100 g of ham in dry matter

Compound	KI ^a	RI ^b	Dry-cured ham (7 months)			P	Dry-cured ham (12 months)			P
			Shank	Centre	Butt		Shank	Centre	Butt	
Alcohols										
Ethanol	508	a	16589.2 ^b	33680.4 ^a	6237.1 ^c	***	3177.3 ^b	6659.8 ^a	2589.4 ^b	***
Isopropanol	537	a	1116.2 ^b	2894.0 ^a	295.5 ^b	***	6257.1 ^b	9315.1 ^a	1334.2 ^c	***
1-Propanol	610	a	58.8 ^b	134.9 ^a	69.2 ^c	ns	311.1 ^a	255.5 ^a	62.1 ^b	***
2-Butanol	641	a	149.0 ^b	540.9 ^a	24.5 ^b	***	98.9 ^b	179.6 ^a	21.9 ^c	**
2-Methyl-3-buten-2-ol	651	a	7.4	187.6	0.0		24.5 ^b	311.7 ^a	19.7 ^b	***
2-Methyl-1-propanol	678	a	89.3 ^b	351.8 ^a	86.7 ^b	***	121.5 ^b	206.8 ^a	19.8 ^c	***
1-Butanol (56) ^c	721	a	0.0	78.6	0.0		42.2	104.9	0.0	
1-Penten-3-ol	734	a	340.2	442.3	338.5	ns	667.0 ^{a,b}	903.5 ^a	191.7 ^b	**
2-Pentanol	749	a	310.6 ^b	1552.6 ^a	222.4 ^b	***	180.7 ^b	737.6 ^a	270.6 ^b	***
3-Methyl-1-butanol	792	a	644.8 ^b	3121.6 ^a	1626.5 ^{a,b}	**	1049.3 ^b	1933.3 ^a	328.9 ^c	***
2-Methyl-1-butanol	795	a	393.5 ^b	1248.3 ^a	458.8 ^b	**	607.3 ^b	1052.3 ^a	112.1 ^c	***
1-Pentanol	825	a	315.4	967.9	893.0	ns	339.6 ^c	2470.4 ^a	1383.6 ^b	***
2,2-Dimethyl-1-butanol	844	c	0.0	107.7	0.0		0.0	0.0	0.0	
4-Methyl-2-pentanol	850	c	0.0	62.4	0.0		0.0	51.5	0.0	
2-Hexanol	851	a	0.0	0.0	28.8		0.0	0.0	30.7	
2,3-Butanediol	890	a	33.3	0.0	7.9		171.9 ^{a,b}	226.7 ^a	24.1 ^b	*
1-Hexanol	924	a	60.7 ^b	339.4 ^a	113.1 ^b	**	57.1 ^c	550.9 ^b	1763.7 ^a	***
Ciclohexanol	937	a	0.0	60.1	0.0		95.0	114.5	78.6	ns
2-Heptanol	948	a	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	210.3	
1-Octen-3-ol	1024	a	90.4	131.0	65.6	ns	77.4 ^b	148.5 ^a	51.0 ^b	**
4-Methyl-2-heptanol	1042	c	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	11.7	
Aldehydes										
Acetaldehyde		c	1528.4 ^b	2663.4 ^a	1848.5 ^{a,b}	*	474.0 ^b	1924.5 ^a	401.6 ^b	***
2-Methyl-propanal	590	a	41.7	47.9	51.8	ns	91.9 ^a	107.5 ^a	16.1 ^b	***
Butanal	620	a	10.0	0.0	0.0		19.2 ^a	15.4 ^a	4.1 ^b	**
3-Methyl-butanal	686	a	811.1 ^b	2020.5 ^{a,b}	2834.8 ^a	*	4401.2 ^b	8455.0 ^a	3666.4 ^b	**
2-Methyl-butanal	697	a	545.9	587.6	513.6	ns	1167.7 ^a	1550.3 ^a	309.7 ^b	**
Hexanal	837	a	3145.6 ^a	982.8 ^b	1426.4 ^b	**	2790.3 ^{a,b}	4500.4 ^a	1087.5 ^b	**
Heptanal	939	a	159.7	131.5	235.4	ns	137.5 ^b	257.7 ^a	107.8 ^b	*
Benzaldehyde	1009	a	24.3	21.3	30.4	ns	0.0	54.6	2.0	
Benzene acetaldehyde	1100	a	39.0	57.2	40.9	ns	52.2 ^a	76.9 ^a	0.0 ^b	**
Nonanal	1149	a	62.3 ^b	92.5 ^b	166.0 ^a	**	56.9	100.7	76.3	ns
Ketones										
Acetone	526	a	1643.2 ^b	2845.5 ^a	1017.5 ^c	***	4239.2 ^b	6169.9 ^a	1133.9 ^c	***
2,3-Butanodione	624	a	49.9	63.9	59.5	ns	126.4 ^a	171.9 ^a	22.6 ^b	**
2-Butanone	628	a	308.9	316.9	222.5	ns	919.7 ^a	949.7 ^a	194.5 ^b	**
2-Pentanone (86)	727	a	24.2	199.1	187.2	ns	303.4 ^{a,b}	491.0 ^a	150.4 ^b	**
1-Hydroxy-2-propanone (44)	731	a	119.2 ^a	23.7 ^b	35.8 ^b	*	127.0 ^{a,b}	199.0 ^a	31.2 ^b	**
3-Hydroxy-2-butanone	776	a	799.5	303.9	850.3	ns	2446.4 ^b	3281.1 ^a	402.7 ^c	***
2-Hexanone	831	a	0.0	507.6	231.3	ns	127.8 ^c	432.7 ^a	277.2 ^b	***
2-Heptanone	933	a	67.7 ^b	347.0 ^a	190.5 ^{a,b}	*	47.5 ^b	313.2 ^a	478.7 ^a	**
2-Pentyl-furan	1006	c	13.8	28.0	0.0		13.8	0.0	11.2	
Butyrolactone	1011	a	124.5 ^{a,b}	162.6 ^a	64.7 ^b	*	124.6	159.9	37.4	ns
2-Nonanone	1140	a	0.0	20.9	7.9		5.6	21.1	17.8	ns
5-Ethylidihydro 2 (3H)-furanone	1158	a	0.0	27.3	20.6		9.5 ^b	43.7 ^a	19.3 ^{a,b}	*
Acids										
Acetic acid	711	a	3622.4 ^b	9161.9 ^a	2023.4 ^b	***	25901.7 ^a	4305.5 ^{a,b}	1116.5 ^b	*
Propanoic acid	817	a	0.0	0.0	0.0	ns	7.3	0.0	0.0	
2-Methyl-propanoic acid	874	a	0.0	218.0	29.1		0.0	124.9	29.3	

Table 4 Continued.

Compound	KI ^a	RI ^b	Dry-cured ham (7 months)			P	Dry-cured ham (12 months)			P
			Shank	Centre	Butt		Shank	Centre	Butt	
Butanoic acid	896	a	1224.2 ^b	1974.9 ^a	890.4 ^b	**	1056.4 ^a	1181.7 ^a	200.8 ^b	**
3-Methyl-butanoic acid	949	a	53.9	1114.5	1023.5	ns	0.0	570.1	123.4	
2-Methyl-butanoic acid	953	a	0.0	308.1	127.7		137.8 ^{a,b}	244.9 ^a	65.2 ^b	**
Hexanoic acid	1074	a	78.2	220.4	198.0	ns	19.2 ^b	189.6 ^a	106.8 ^{a,b}	**
Esters										
Methyl acetate	548	a	216.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	
Ethyl acetate	633	a	1077.2 ^b	3203.4 ^a	342.1 ^c	***	225.2 ^b	459.7 ^a	98.9 ^c	***
Ethyl propanoate	738	a	0.0	219.9	0.0		0.0	0.0	0.0	
Ethyl 2-methyl-propanoate (71)	785	a	0.0	59.2	0.0		0.0	0.0	0.0	
Ethyl butanoate	829	a	705.9 ^b	1607.5 ^a	279.8 ^b	***	162.9	0.0	0.0	
Ethyl 2-hydroxy-propanoate	863	a	87.5 ^b	248.7 ^a	25.6 ^c	***	30.0	53.3	0.0	
Ethyl 2-methyl-butanoate	876	a	56.4 ^b	276.6 ^a	71.4 ^b	***	29.5 ^b	61.0 ^a	14.2 ^b	**
Ethyl 3-methyl-butanoate	880	a	112.8 ^b	785.1 ^a	238.8 ^b	**	1153.4 ^a	1851.7 ^a	333.6 ^b	**
Ethyl hexanoate	1023	a	131.5 ^b	318.4 ^a	104.8 ^b	**	40.7 ^b	116.1 ^a	43.1 ^b	**
Ethyl octanoate	1225	a	10.6	28.3	0.0		0.0	6.3	0.0	
Sulphide compounds										
Dimethyl disulfide	767	a	64.2 ^a	35.3 ^{a,b}	19.9 ^b	*	112.9	487.1	12.9	ns
3-Methyl-thiopropanal	964	a	0.0	46.9	32.4		41.1 ^a	27.8 ^{a,b}	7.6 ^b	*
Dimethyl trisulfide	995	a	0.0	0.0	0.0		0.0	30.7	0.0	
Alkanes										
Pentane	500	a	471.7 ^a	387.3 ^{a,b}	23.1 ^b	*	452.2 ^a	384.7 ^{a,b}	136.2 ^b	*
Hexane	600	a	54.8	79.5	0.0		41.6 ^a	61.0 ^a	14.6 ^b	**
Octane	800	a	109.6	135.9	127.2	ns	107.7	99.5	93.8	ns
Decane	1000	a	53.4 ^{a,b}	107.8 ^a	35.1 ^b	*	50.6	78.3	35.8	ns
Dodecane	1200	a	12.4	0.0	0.0		12.4	0.0	0.0	
Nitrogen compounds										
Pyridine	781	c	0.0	58.9	0.0		0.0	0.0	0.0	
2,5-Dimethyl pyrazine	942	a	0.0	74.8	0.0		41.5 ^b	107.9 ^a	0.0 ^c	***
3,4-Dimethyl-pyridine	1194	c	0.0	16.0	0.0		14.2 ^a	24.1 ^a	0.0 ^b	**
Miscellaneous										
Toluene (91)	785	a	50.9 ^{a,b}	116.2 ^a	30.2 ^b	*	0.0	70.4	0.0	
p-Xylene	888	a	32.1	186.0	53.8	ns	0.0	97.8	0.0	
Styrene	915	a	0.0	54.3	55.5		0.0	53.8	219.8	
BCH 1 ^d	993	c	3385.1	4145.7	3144.3	ns	1761.2	4616.4	799.0	ns
BCH 2	1012	c	0.0	84.7	38.5		0.0	0.0	0.0	
BCH 3	1028	c	320.8	382.0	350.7	ns	183.6	465.9	104.1	ns
BCH 4	1036	c	0.0	349.6	361.4		220.1 ^b	663.5 ^a	103.1 ^b	**
BCH 5	1038	c	0.0	236.6	109.2		153.2	203.4	48.0	ns
BCH 6	1046	c	71.3	108.5	87.9	ns	46.4	108.3	21.4	ns
BCH 7	1050	c	198.3	255.8	214.6	ns	125.6	283.5	60.1	ns
Total area			42390.1	84347.0	30564.5		63540.2	71912.1	20876.7	

Means with different letters in the same row in each dry-cured ham are significantly different at P value

*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001

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

^bRI: Reliability of identification: a, mass spectrum and retention time identical with an authentic sample; b, mass spectrum and kovats index from literature in accordance; c, tentative identification by mass spectrum

^cMass/charge ratio of ion selected for quantification in parentheses

^dBCH: Branched chain hydrocarbon

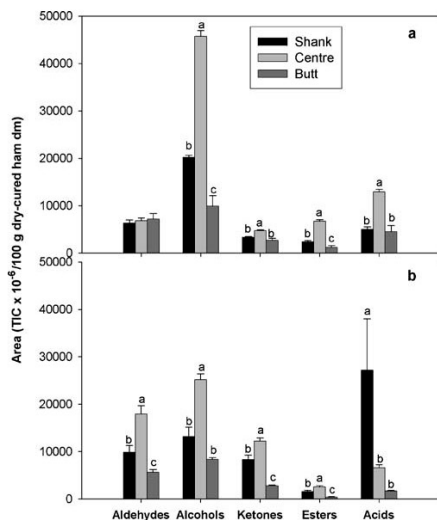


Fig. 3 Main chemical groups of volatile compounds in the different sections of dry-cured hams ripened for 7 m (a) and 12 m (b). Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$) among ham sections for a given chemical group

higher in the centre than in the shank and butt sections (Fig. 3) while in aldehydes only acetaldehyde was higher in the centre being butanal and hexanal higher in the shank than in centre and butt sections (Table 4). Also the nitrogen compounds were only detected in the centre while dimethyl-disulphide was higher in the shank and methional was higher in the centre and butt sections.

In dry-cured hams ripened for 12 m, the centre section of the ham was the one with the significant higher estimated concentration in most of the alcohols, ketones, acids and esters but it also presented a higher estimated concentration of all the aldehydes except for nonanal (Table 4 and Fig. 3). Sulphide compounds were also significantly different among sections specially methional that was lower in the butt than in the shank and dimethyl trisulfide that was present only in the centre section of the 12 m ripened hams. Also, nitrogen compounds were higher in the centre than in the butt.

On the other hand, many volatile compounds formed through the oxidation of unsaturated fatty acids, aldehydes and alcohols, were also significantly higher in the centre section of hams ripened for 12 m while very few differences were detected among sections in the content of free fatty acids. Probably, the oxidation of unsaturated fatty acids to volatile carbonile compounds is favoured in the centre of the ham where the higher salt content act as prooxidant.

The high proportions of 2- and 3-methyl-butanal are remarkable and have been also found in dry-cured Iberian

ham [31]. These compounds are important for their flavour contribution giving nutty, cheesy and salty notes in Parma hams [32]. They are originated through Strecker degradations of the amino acids isoleucine and leucine, respectively [33]. 2-Methyl propanal, which was also detected, comes from the degradation of valine. The analysis of volatile compounds in 12 m hams showed that the methyl branched aldehydes, 2-methyl-propanal and 2-methyl-butanal, were higher in the centre and shank than in the butt, while 3-methyl-butanal was higher in the centre than in the other two sections. This is in accordance with the significant higher content of val, leu and ile in the centre section of 7 m ripened hams while in 12 m hams, the content in the butt was always the lowest. In summary, the higher concentration in free amino acids of the centre section act as a reservoir for the generation of volatile compounds important for dry-cured ham flavour.

Other compounds such as branched alcohols and acids may derive from amino acids through Strecker degradations. These compounds were also significantly higher in the centre than in shank and butt sections in both dry-cured hams. Finally, the ester compounds derived from branched acids were also significantly higher in the centre but this difference was higher in 7 m dry-cured ham. This could be due to the content of ethanol that was higher in the centre of 7 m dry-cured hams. The ester compounds are important for the flavour as they can impart fruity sweet notes to pork meat [34].

Because of the low number of ham samples used in this study, all differences observed in the ham sections during ripening can be different due to the wide variability among dry-cured hams [35], however, these results can be useful for the understanding of the different flavour perception described by consumers in the sections of dry-cured ham.

In conclusion, the centre part of the hams contained a higher proportion of volatile compounds after 7 m of ripening than the shank and butt section essentially due to the higher content of free amino acids. On the other hand, when the ripening process continues such as in 12 m ripened hams, there are changes in the proportions of volatile compounds being the centre section the one with the higher proportion of volatile compounds due not only to the higher concentration of free amino acids but also to the oxidation of unsaturated fatty acids.

Acknowledgements This work was supported by grants AGL2004-05064-CO2-01 (MEC, Spain) and Group S03/006 (AVCIT, Generalitat Valenciana, Spain). The FPI/MEC scholarship to M. Pérez-Juan is also fully acknowledged

References

1. Taylor AJ (1998) Physical chemistry of flavor. *Int J Food Sci Technol* 33:53–62
2. Segars RA, Nordstrom HA, Kapsalai JG (1974) Textural characteristics of beef muscles. *J Texture Stud* 5:283–297
3. Arnau J, Guerrero L, Casademont G, Gou P (1995) Physical and chemical changes in different zones of normal and PSE dry cured ham during processing. *Food Chem* 52:63–69

4. Gou P, Comaposada J, Armau J (2004) Moisture diffusivity in the lean tissue of dry-cured ham at different process times. *Meat Sci* 67:203–209
5. Bolzoni L, Barbieri G, Virgili R (1996) Changes in volatile compounds of Parma ham during maturation. *Meat Sci* 43:301–310
6. Careri M, Mangia A, Barbieri G, Bolzoni L, Virgili R, Parolari G (1993) Sensory property relationships to chemical-data of Italian-type dry-cured ham. *J Food Sci* 58:968–972
7. Flores M, Grimm CC, Toldrá F, Spanier AM (1997) Correlations of sensory and volatile compounds of Spanish “Serrano” dry-cured ham as a function of two processing times. *J Agric Food Chem* 45:2178–2186
8. Gianelli MP, Flores M, Toldrá F (2002) Optimisation of solid phase microextraction (SPME) for the analysis of volatile compounds in dry-cured ham. *J Sci Food Agric* 82:1703–1709
9. Berdagué JL, Bonnaud N, Rousset S, Touraille C (1993) Influence of pig crossbreed on the composition, volatile compound content and flavor of dry cured ham. *Meat Sci* 34:119–129
10. Buscaillon S, Berdagué JL, Monin G (1993) Time related changes in volatile compounds of lean tissue during processing of French dry-cured ham. *J Sci Food Agric* 63:69–75
11. Buscaillon S, Berdagué JL, Bousset J, Corret M, Gandemer G, Touraille C, Monin G (1994) Relations between compositional traits and sensory qualities of French dry-cured ham. *Meat Sci* 37:229–243
12. Ruiz J, Cava R, Ventanas J, Jensen MT (1998) Headspace solid phase microextraction for the analysis of volatiles in a meat product: Dry-cured Iberian ham. *J Agric Food Chem* 46:4688–4694
13. Ruiz J, Ventanas J, Cava R, Timón ML, García C (1998) Sensory characteristics of Iberian ham: Influence of processing time and slice location. *Food Res Int* 31:53–58
14. Toldrá F, Flores M (1998) The role of muscle proteases and lipases in flavor development during the processing of dry-cured ham. *CRC Food Sci Nutr* 38:331–352
15. Molina I, Toldrá F (1992) Detection of proteolytic activity in microorganisms isolated from dry-cured ham. *J Food Sci* 57:1308–1310
16. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goetze NM, Olson BJ, Klensk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76–85
17. Toldrá F, Miralles MC, Flores J (1992) Protein extractability in dry-cured ham. *Food Chem* 44:391–399
18. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
19. Aristoy MC, Toldrá F (1991) Deproteinization techniques for amino acid analysis in fresh pork muscle and dry-cured ham. *J Agric Food Chem* 39:1792–1795
20. Bidlingmeyer BA, Cohen SA, Tarvin TL, Frost BA (1987) New rapid high sensitivity analysis of amino acids in food type samples. *J Assoc Anal Chem* 70:241–247
21. Flores M, Aristoy MC, Spanier AM, Toldrá F (1997) Non-volatile components effects on quality of Serrano dry-cured ham as related to processing time. *J Food Sci* 62:1235–1239
22. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GHS (1957) A simple method of isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 26:497–507
23. Needs EC, Ford GD, Owen AJ, Tuckley B (1983) A method for the quantitative determination of individual free fatty acids in milk by ion exchange resin adsorption and gas-liquid chromatography. *J Dairy Res* 50:321–329
24. Coutron-Gambotti C, Gandemer G (1999) Lipolysis and oxidation in subcutaneous adipose tissue during dry-cured ham processing. *Food Chem* 64:95–101
25. Berry JF, Cevallos WH, Wade RR (1965) Lipid class and fatty acids composition of intact peripheral nerve and during wallerian degeneration. *J Am Oil Chem Soc* 42:492–495
26. Toldrá F, Rico E, Flores J (1993) Cathepsin B, D, H and L activity in the processing of dry-cured-ham. *J Sci Food Agric* 62:157–161
27. Flores M, Aristoy MC, Toldrá F (1996) HPLC purification and characterization of soluble alanyl aminopeptidase from porcine skeletal muscle. *J Agric Food Chem* 44:2578–2583
28. Flores M, Aristoy MC, Toldrá F (1997) Curing agents affect aminopeptidase activity from porcine skeletal muscle. *Z Lebensm Unters Forsch* 205:343–346
29. Motilva MJ, Toldrá F, Nadal MI, Flores J (1994) Pre-freezing hams affects lipolysis during dry-curing. *J Food Sci* 59:303–305
30. Martín L, Córdoba JJ, Ventanas J, Antequera T (1999) Changes in intramuscular lipids during ripening of Iberian dry-cured ham. *Meat Sci* 51:129–134
31. Ruiz J, Ventanas J, Cava R, Andrés A, García C (1999) Volatile compounds of dry-cured Iberian ham as affected by the length of the curing process. *Meat Sci* 52:19–27
32. Hinrichsen LL, Pedersen SB (1995) Relationship among flavor, volatile compounds, chemical-changes, and microflora in Italian-type dry-cured ham during processing. *J Agric Food Chem* 43:2932–2940
33. Forss DA (1972) Odor and flavor compounds from lipids. *Prog Chem Fats Other Lipids* 13:181–258
34. Baines DA, Mlotkiewicz JA (1984) The chemistry of meat flavor. In: Bailey AJ (Ed.) Recent advances in the chemistry of meat; The Royal Society of Chemistry, Burlington House, London pp 119–164
35. Toldrá F, Flores M, Aristoy MC, Virgili R, Parolari G (1996) Pattern of muscle proteolytic and lipolytic enzymes from light and heavy pigs. *J Sci Food Agric* 71:124–128

APÉNDICE II

“Model studies on the efficacy of protein homogenates from raw pork muscle and dry-cured ham in binding selected flavor compounds”

Pérez-Juan, M.; Flores, M. and Toldrá, F.

Journal of Agricultural and Food Chemistry 2006
(en prensa)

JOURNAL OF
**AGRICULTURAL AND
 FOOD CHEMISTRY**

**Model Studies on the Efficacy of Protein Homogenates from
 Raw Pork Muscle and Dry-Cured Ham in Binding Selected
 Flavor Compounds**

MARÍA PÉREZ-JUAN, MÓNICA FLORES, AND FIDEL TOLDRA*

Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Apartado 73, 46100 Burjassot,
 Valencia, Spain

The binding of sarcoplasmic and myofibrillar proteins extracted from postrigor pork muscle and from 7 and 12 months dry-cured hams with volatile compounds such as 3-methyl-butanol, 2-methyl-butanol, 2-pentanone, hexanal, methional, and octanal was studied using solid phase microextraction and gas chromatography analysis. The binding ability of sarcoplasmic proteins from pork muscle was higher than the ability shown by 7 and 12 months dry-cured ham sarcoplasmic homogenates and also higher than the binding ability of myofibrillar homogenates. The effect of the ionic strength on the binding was also studied. This effect was more important on myofibrillar proteins due to its ability to produce changes on the protein conformation that affect their binding ability. However, the sarcoplasmic protein binding ability was more related to the small compounds present in this homogenate than with the aqueous phase ionic strength.

KEYWORDS: Solid phase micro extraction; SPME; myofibrillar; sarcoplasmic; binding; interaction; dry-cured ham; pork meat

INTRODUCTION

The concentration of free volatile compounds in the gas phase depends on several factors such as their physicochemical properties and their interactions with other food constituents (1). Furthermore, the knowledge of the binding behavior of flavor components on different phases has a great practical importance (2) and there is an increasing interest on a better comprehension of the interactions between flavor compounds and nonvolatile food ingredients. In this sense, the interaction of proteins with volatile compounds significantly changes their headspace (HS) concentration and this interaction has been studied for vegetable proteins such as soy proteins (3–5) and pea proteins (6) as well as for animal proteins such as β -lactoglobulin (7–9), bovine serum albumin (10), and fish actomyosin (11). Furthermore, small components from muscle tissues such as dipeptides carnosine and anserine have been used in interaction studies (12, 13).

On the other hand, dry-cured ham is one of the most typical meat products from the Mediterranean area and its flavor has been extensively studied (14–17). Its main components (lipids and proteins) experience intense proteolysis and lipolysis during the ripening and drying, which have been extensively studied (17–20). Sarcoplasmic and myofibrillar proteins constitute the main protein groups present in the skeletal muscle representing about 30–40% of the living animal weight (21). The sarcoplasmic proteins, which are soluble in water or in dilute salt solutions, form a mixture of proteins, which are similar to those

present in other cell types and mainly include glycolytic enzymes, myoglobin, myoalbumin, and others (22). Moreover, using low ionic strength buffers, dipeptides such as carnosine, which is the most abundant dipeptide in pork skeletal muscle, and anserine are also extracted, both of which are important due to their buffering and antioxidant activities (23). Moreover, the major constituents of myofibrillar proteins, myosin and actin, are not only important in muscle due to their role on contraction (21) but also for their importance on the functional properties in meat products such as water holding, emulsifying capacity, binding ability, and gelation (24). In general, the myofibrillar protein fraction undergoes a more intense proteolysis than the sarcoplasmic protein fraction during the ripening process of dry-cured ham, giving rise to a larger number of low molecular weight peptides (17). The last step of proteolysis consists of the generation of free amino acids (17) that contribute to taste and also to the generation of flavor volatile compounds as a result of Strecker degradations including sulfide compounds, methyl branched aldehydes, alcohols, and pyrazines. These compounds, in combination with the volatile compounds formed by lipid oxidation and nonvolatile compounds generated by proteolysis, have a large impact on the final flavor of the dry-cured ham product (17). However, there are few studies about the interaction of soluble molecules with aroma compounds; these studies were mainly done in cheese (25). Recent studies in meat products (26, 27) showed the interaction between volatile compounds and peptides and sarcoplasmic proteins from skeletal muscle. However, the effect of the meat structure on the binding of volatile compounds has not yet been elucidated. Therefore, the aim of the present work was to study the role of

* To whom correspondence should be addressed. Tel: 34 96 3900022. Fax: 34 96 3636301. E-mail: ftoldra@iata.csic.es.

B

78 sarcoplasmic and myofibrillar proteins from pork muscle and
79 dry-cured ham in the binding of selected key aromatic com-
80 pounds to determine the relative impact of these muscle proteins
81 on the release of aroma compounds.

MATERIAL AND METHODS

83 **Materials.** 2-Methyl-butanol, 3-methyl-butanol, 2-pentanone, hexa-
84 nal, methional, and octanal were obtained from Fluka Chemie (Buchs,
85 Switzerland). Postrigor pork muscle (*Longissimus dorsi*) was acquired
86 from a local supermarket. Fat and connective tissues were removed,
87 and the meat was cut in 100 g portions, packaged in vacuum bags, and
88 stored at -20 °C.

89 Two dry-cured hams were selected from a local industry and
90 processed according to a traditional methodology and ripened for 7
91 (short process) and 12 (long process) months. The processing consisted
92 of salting (12 days at 3 °C), postsalting (50 days at 4-6 °C), and
93 ripening—drying (1st phase, 60 days at 12 °C, 2nd phase, 60 days at
94 18 °C, 3rd phase, 30 days at 30 °C, which is the end of the 7 months
95 of processing; and 4th phase, 150 days at 15 °C, the end of 12 months)
96 stages. The final section of the ham, containing mainly *Biceps femoris*
97 and *Glioteus accersorius, medius, and profundus* muscles, was used.
98 Four portions of this section (approximately 100 g each) without the
99 subcutaneous fat were vacuum packaged and frozen stored at -20 °C
100 until analysis.

101 **Preparation of Sarcoplasmic and Myofibrillar Proteins Homo-**
102 **genates.** Sarcoplasmic and myofibrillar proteins were obtained accord-
103 ing to the procedure described by Molina and Toldrà (25). Pork muscle
104 and dry-cured ham processed for 7 and 12 months were homogenized
105 (dilution 1:10, w/v) with 30 mM sodium phosphate buffer at pH 7.4
106 with 0.02% NaN₃ during 4 min in a stomacher Lab blender 400 (Seward
107 Medical, London, United Kingdom). The mixture was centrifuged at
108 10000g for 20 min at 4 °C in a Sorvall RC-5B (Dupont Instruments,
109 France). The supernatant contained the sarcoplasmic proteins. The
110 procedure was repeated twice, and the pellet was finally suspended in
111 9 vol of 100 mM sodium phosphate buffer at pH 7.4 containing 0.7 M
112 potassium iodide and 0.02% NaN₃. The mixture was homogenized in
113 a stomacher for 8 min and then centrifuged at 10000g for 20 min at 4
114 °C in a Sorvall RC-5B. The supernatant contained the myofibrillar
115 proteins. The protein concentration of all supernatants was calculated
116 by the method of Smith et al. (29), using the bicinchoninic acid as a
117 reagent and the bovine serum albumin as a standard.

118 **Dialysis of Protein Homogenates.** To study the effect of aqueous
119 ionic strength on the binding, the sarcoplasmic and myofibrillar protein
120 homogenates from pork muscle and 7 and 12 months dry-cured ham
121 were dialyzed using dialysis tubing size 6 with 12000-14000 Da
122 molecular mass cutoff (Medicell international Ltd., London). The
123 dialysis of sarcoplasmic and myofibrillar protein homogenates was
124 performed for 24 h. The sarcoplasmic homogenates were dialyzed
125 against two different buffers: 30 mM sodium phosphate buffer at pH
126 7.4 with 0.02% sodium azide and containing 0.3 M NaCl and the same
127 buffer without NaCl. The dialysis of myofibrillar proteins was
128 performed against two different buffers: 100 mM sodium phosphate
129 buffer at pH 7.4 with 0.02% sodium azide and 0.3 M NaCl and the
130 same buffer without addition of NaCl.

131 **Preparation of Volatile Compound Solution.** A stock solution
132 containing 50000 mg kg⁻¹ of each volatile compound was prepared in
133 ethanol. The aroma compounds were added in triplicate to the protein
134 homogenates and to control solutions resulting in a final concentration
135 of 2 mg kg⁻¹ for 2-methyl-butanol and 3-methyl-butanol; 1 mg kg⁻¹
136 for 2-pentanone, hexanal, and octanal, and 5 mg kg⁻¹ for methional.
137 All of the volatile compounds were simultaneously present in the
138 solution used for the experiments.

139 The selection of the six flavor compounds was based on their
140 presence in the HS and the contribution to the flavor of typical Spanish
141 dry-cured meat products. Hexanal, 2-methyl-butanol, 3-methyl-butanol,
142 and 2-pentanone were selected because of their high proportion in the
143 HS of dry-cured ham (30, 37), whereas octanal and methional were
144 selected due to their odor activity in the aroma of dry-cured ham (14).

145 **Volatile-Protein Binding.** The flavor compounds were added in
146 appropriate concentrations, as mentioned above, to the protein solution.

Pérez-Juan et al.

The sarcoplasmic and myofibrillar homogenates from raw pork meat
147 and 7 and 12 months dry-cured hams were used as protein solutions.
148 Also, the dialyzed protein homogenates were used as protein solutions
149 for the study of the effect of ionic strength on the binding. Protein and
150 control vials were prepared for the binding studies. The protein vials
151 contained 5 mL of the homogenate placed in a 10 mL HS vial and
152 sealed with a PTFE-faced silicone septum (Supelco, Bellefonte, PA).
153 The control vial contained the same buffer as the homogenate (including
154 the same NaCl concentration of the protein vial) but without protein.
155 Control and protein vials were stored for 16 h at 30 °C to allow the
156 equilibration.

157 The quantity of aroma compound present on the HS of the protein
158 and control vials was determined using solid phase microextraction
159 (SPME) and gas chromatography (GC) analysis using optimized
160 conditions (27). A 75 μm carboxen/poly(dimethylsiloxane) (CAR/
161 PDMS) fiber (Supelco) was exposed to the HS for sampling the aroma
162 compounds. After 30 min of adsorption, the aroma compounds were
163 desorbed by inserting the fiber into the GC injection port of a gas
164 chromatograph set at 220 °C for 5 min in splitless mode. The split
165 valve was opened 1 min after injection. The fiber was heated for 5
166 min on the injection port at 220 °C to avoid an analyte carry-over
167 between the samples. The linearity of detection for each aroma
168 compound under these conditions was confirmed within the range of
169 0.02-5 mg kg⁻¹.

170 **GC Analysis.** An 8000 CE instruments gas chromatograph (Rodano,
171 Milan, Italy) equipped with a flame ionization detector (FID) was used.
172 The aroma compounds were separated in a DB-624 capillary column
173 (J&W Scientific, 60 m, 0.32 mm i.d., film thickness, 1.8 μm). Helium
174 was used as the carrier gas with a linear velocity of 20.4 cm s⁻¹. The
175 fiber was placed in the injector, and the GC oven temperature was
176 started at 38 °C and held for 6 min; then, the temperature was increased
177 to 105 °C at a rate of 6 °C min⁻¹, then raised to 220 °C at the rate of
178 15 °C min⁻¹, and held for 5 min. The detector temperature was set at
179 240 °C.

180 The results are expressed as a percentage of the free volatile
181 compound found without protein in the solution. All of the experiments
182 were performed in triplicate, and the values were represented as the
183 mean and coefficient of variance.

184 **Calculation of Volatile Bound per Weight of Protein Homo-**
185 **genate.** The flavor compounds were added into the protein and control
186 vials at the same concentration as described above and also diluted
187 1/100 and 1/500. The quantity of aroma compound was determined by
188 a previous GC after extraction using SPME under the optimized
189 conditions. All of the experiments were done in triplicate.

190 The concentration in the HS ([HS]) was calculated using eq 1
191

$$[HS] = \frac{A_f}{m \times V_f \times K} \quad (1)$$

192 where A_f is the area (CG-FID) of the volatile compounds adsorbed by
193 the SPME fiber, m is the slope of a standard curve obtained by injecting
194 known quantities of each aroma compound, V_f is the fiber volume (5.3
195 $\times 10^{-7}$ L), and K is the fiber-air partition coefficient of each volatile
196 compound for CAR/PDMS 75 μm fiber obtained from Gianelli et al.
197 (26).

198 The free volatile in aqueous phase (μM) and bound volatile/protein
199 (μmol/g) were calculated using the concentration in the HS of vials
200 with and without protein (eqs 2 and 3, respectively).

$$\text{free volatile in aqueous phase} = \frac{[HS]_b}{[HS]_c} \times O \quad (2)$$

$$\text{bound volatile/protein} = \frac{([HS]_c - [HS]_b)}{C_p} \times O \quad (3)$$

201 where $[HS]_c$ (mol/L) is the volatile compound HS concentration on
202 the control vials, $[HS]_b$ (mol/L) is the volatile compound HS concentra-
203 tion on the protein vials, O (mol/L) is the initial concentration added

Binding of Flavor Compounds by Protein Meat Homogenates

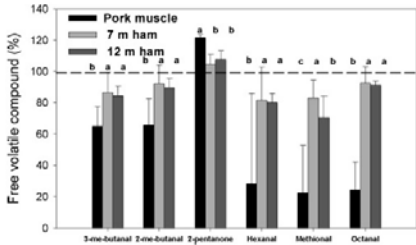


Figure 1. Effect of the sarcoplasmic homogenate type used (pork muscle and 7 and 12 months dry-cured ham) on the binding of volatile compounds. Results are expressed as the percentage of the free volatile compound found in the HS without protein in the solution.

to the solutions, and C_p (g/L) is the protein concentration present on the protein vials.

Statistical Analysis. The effects of the protein in solution, the homogenate type used (pork muscle or 7 and 12 months dry-cured ham), and the effect of ionic strength on the binding of volatile compounds were studied by analysis of variance using Statgraphics plus version 5.1. The means were compared using Fisher's least significance difference procedure ($p < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Binding of Volatile Compounds with Sarcoplasmic Proteins Homogenates. All of the changes occurring in meat proteins during processing are very important because they will affect not only the texture but also the interactions between the generated flavor compounds and the proteins and peptides; thus, these interactions will be responsible for different sensory perceptions (17). The free percentage of each volatile compound on the HS in the presence of a sarcoplasmic protein homogenate from pork muscle and 7 and 12 months dry-cured ham is shown in Figure 1. The presence of sarcoplasmic proteins produced a decrease ($p < 0.05$) in the free percentages of the volatile compounds in the HS in the case of 3-methyl-butanol, 2-methyl-butanol, hexanal, methional, and octanal. This decrease means that the sarcoplasmic protein homogenates bind these volatile compounds. However, the opposite effect was observed for 2-pentanone where an increase ($p < 0.05$) in the free percentage was detected in the presence of these protein homogenates. On the other hand, the effect was not always the same and it was different depending on the type of sarcoplasmic protein homogenate (pork or dry-cured ham). The presence of pork muscle sarcoplasmic proteins in solution produced a reduction of the free percentages of 3-methyl-butanol, 2-methyl-butanol, hexanal, methional, and octanal and an increase of 2-pentanone that was significantly different from the effect produced by 7 and 12 months dry-cured ham homogenates.

The homogenates obtained in this study contain a complex mixture of sarcoplasmic proteins including glycolytic enzymes, myoglobin, and also small peptides, amino acids, and salts as previously reported by Perez-Juan et al. (32). In this sense, Gianelli et al. (26) studied the interaction of soluble peptides and proteins from skeletal muscle on the release of volatile compounds. They showed that carnosine was able to bind the same volatile compounds except 2-pentanone while anserine and myoglobin significantly bound hexanal and 2-methyl-butanol. Myoglobin, as a major component of sarcoplasmic fraction, is present in the sarcoplasmic homogenates of pork muscle and 7 and 12 months dry-cured ham. The dipeptides, carnosine and anserine, that are not degraded during the curing

process are also present (18). Therefore, they can be responsible for the binding observed in Figure 1 together with other components present in the homogenate. In this sense, the different binding observed in the homogenates from 7 and 12 months dry-cured ham in comparison to pork muscle may be due to the degradation of sarcoplasmic proteins or also to the higher presence of mineral salts. The presence of mineral salts in cheese extracts produced a release effect of aroma compounds (25).

The moles of 3-methyl-butanol, 2-methyl-butanol, hexanal, and methional bound by the sarcoplasmic homogenates from pork muscle and 7 and 12 months dry-cured ham were calculated and shown in Figure 2. The increase in volatile compound concentration added to the protein solution produced and increment in the volatile compound bound (Figure 2). The pork muscle sarcoplasmic homogenates bound higher quantities of 3-methyl-butanol (Figure 2A), 2-methyl-butanol (Figure 2B), hexanal (Figure 2C), and methional (Figure 2D) than 7 and 12 months dry-cured ham homogenates. This fact is in accordance with the results shown in Figure 1.

Binding of Volatile Compounds with Myofibrillar Proteins Homogenates. The myofibrillar proteins fraction undergoes a more intense proteolysis than the sarcoplasmic proteins fraction, giving rise to a large number of low molecular mass peptides that contribute to the final flavor of dry-cured ham (17). With reference to the interaction, the free percentage of volatile compounds in the HS in the presence of myofibrillar proteins extracted from pork muscle and 7 and 12 months dry-cured ham is shown in Figure 3. The presence of myofibrillar protein homogenates produces a decrease ($p < 0.05$) of the free percentage of 3-methyl-butanol, hexanal, and octanal. This means that the myofibrillar proteins bind these volatile compounds. However, the binding of octanal was the only one that depends on the type of myofibrillar homogenate. The presence of the pork muscle myofibrillar protein homogenate produced a significant decrease of the free percentage of octanal while a significant release of octanal was observed in the presence of 7 and 12 months dry-cured ham myofibrillar homogenates. However, the type of myofibrillar homogenate (pork muscle and 7 or 12 months dry-cured ham) did not produce a significant difference on the free percentage in the HS of 3-methyl-butanol, 2-methyl-butanol, 2-pentanone, hexanal, and methional. Although there are few reports about the interaction of myofibrillar proteins, Goodridge et al. (33) found that freeze-dried chicken myofibrils act as a significant reservoir for hexanal and they observed a difference of about 20% between the peak area of hexanal alone as compared to the peak area of hexanal with chicken myofibrils at low concentrations of hexanal (0.01 mg/L). This indicated that more hexanal was being retained by the myofibrils in comparison to the standard alone. In our study, we observed a decrease of around 20% of hexanal in the presence of pork myofibrillar proteins; however, the decrease was smaller in the presence of myofibrillar homogenates from 7 and 12 months.

To study the interaction between 3-methyl-butanol, 2-methyl-butanol, hexanal, and octanal, the moles bound by the myofibrillar homogenates from pork muscle and 7 and 12 months dry-cured ham were calculated and are shown in Figure 4. The different quantities of volatile compounds added to the myofibrillar homogenates increase the free volatile compounds in the aqueous phase, but only in the case of pork muscle myofibrillar homogenate, a small increase was observed in the bound moles of 3-methyl-butanol (Figure 4A), 2-methyl-butanol (Figure 4B), and hexanal (Figure 4C). However, the addition of different quantities of volatile compounds to the myofibrillar homogenates from 7 and 12 months dry-cured ham did not

D

Pérez-Juan et al.

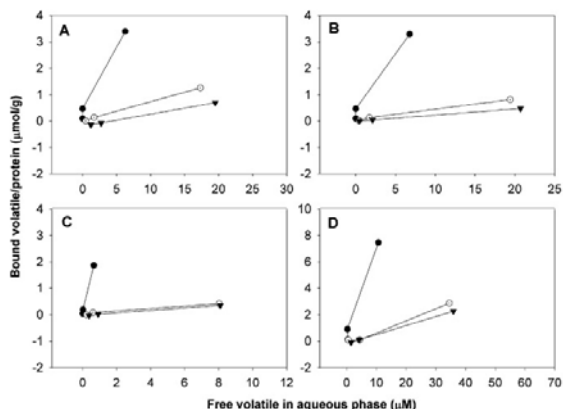


Figure 2. Moles bound by the sarcoplasmic homogenates from pork muscle (●), 7 months dry-cured ham (---), and 12 months dry-cured ham (▼) vs the concentration of free volatile compound in the aqueous phase. Binding of (A) 3-methyl-butanol, (B) 2-methyl-butanol, (C) hexanal, and (D) methional.

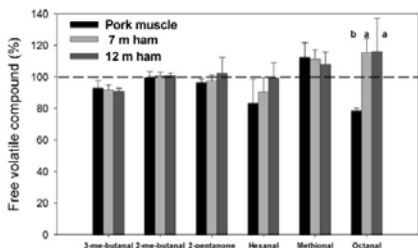


Figure 3. Effect of the myofibrillar homogenate type used (pork muscle and 7 and 12 months dry-cured ham) on the binding of volatile compounds. Results are expressed as a percentage of the free volatile compound found in the HS without protein in the solution.

increase the bound moles of the volatile compounds except in hexanal (Figure 4 C). In comparison to the bound moles by the sarcoplasmic proteins (Figure 2), the myofibrillar homogenates bound less moles of 3-methyl-butanol, 2-methyl-butanol, and hexanal (Figure 4). However, Goodridge et al. (33) found that the percentage of hexanal removed from the system in the presence of chicken myofibrils was lower at higher hexanal concentrations. This may be due to the saturation of the limited number of hexanal binding sites. In our study, the saturation of binding sites was not reached due to the low concentration of volatile compound used.

Effect of Aqueous Phase Ionic Strength on the Binding Ability of Sarcoplasmic and Myofibrillar Proteins Homogenates. Salt is one of the most important ingredients used during the dry-curing process; thus, it is present in the sarcoplasmic homogenates of 7 and 12 months dry-cured ham and it can affect its interaction with volatile compounds. The effect of salt on the volatility of flavor compounds has been studied in solution (34) and in model systems (8) due to its "salting out" effect (2). For that reason, the sarcoplasmic proteins extracted from pork muscle and 7 and 12 months dry-cured ham were dialyzed against different buffers, with and without NaCl.

The free percentage of each volatile compound in the presence of the sarcoplasmic protein homogenates and after the dialysis process is shown in Figure 5.

In the presence of the sarcoplasmic proteins extracted from pork muscle, a significant increase on the free percentages of 3-methyl-butanol (Figure 5A), 2-methyl-butanol (Figure 5B), hexanal (Figure 5D), methional (Figure 5E), and octanal (Figure 5F) and a significant decrease in the free percentage of 2-pentanone (Figure 5C) were observed when the proteins were dialyzed in both cases, against salt without salt. This effect could probably be due to the loss of small peptides and free amino acids during the dialysis process, which could bind the assayed volatile compounds (12, 26). Furthermore, a significant increase was observed for octanal (Figure 5F) between proteins dialyzed against buffer without salt and dialyzed in the presence of salt probably due to the same reason as described above. On the other hand, the sarcoplasmic proteins homogenates extracted from 7 months dry-cured ham only showed a significant increase on the free percentages of methional (Figure 5E) and octanal (Figure 5F) when they were dialyzed without NaCl. However, a significant decrease of the free percentage of 2-pentanone (Figure 5C) was shown when the dialysis was made against 0.3 M NaCl. Finally, a significant increase of the free percentages of 3-methyl-butanol (Figure 5A), 2-methyl-butanol (Figure 5B), hexanal (Figure 5D), methional (Figure 5E), and octanal (Figure 5F) was observed in 12 months dry-cured ham sarcoplasmic protein homogenates after the dialysis. However, a significant decrease of the free percentage of 2-pentanone (Figure 5C) was observed after dialysis against buffer with salt. In summary, the dialysis of sarcoplasmic proteins from pork and dry-cured ham produced a loss of the compounds responsible for the binding of the studied volatile compounds (12, 26), as observed by the increase in the free percentages of all volatile compounds except 2-pentanone after dialysis. Although there are no studies about the effect of ionic strength on sarcoplasmic homogenates binding ability, Guichard et al. (8) studied the effect of the solution composition on protein conformation and its ability to bind flavor compounds. They found that the decrease in the retention

BATCH: jt7a10 USER: ckt69 DIV: @xyv04\data1\CLS_pj\GRP_jf\JOB_i14\DIV_jf060374x DATE: May 26, 2006

Binding of Flavor Compounds by Protein Meat Homogenates

E

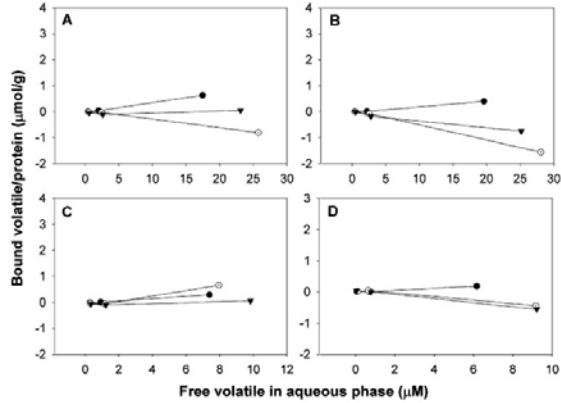


Figure 4. Moles bound by the myofibrillar homogenates from pork muscle (●), 7 months dry-cured ham (---), and 12 months dry-cured ham (▼) vs the concentration of the free volatile compound in the aqueous phase. Binding of (A) 3-methyl-butanol, (B) 2-methyl-butanol, (C) hexanal, and (D) octanal.

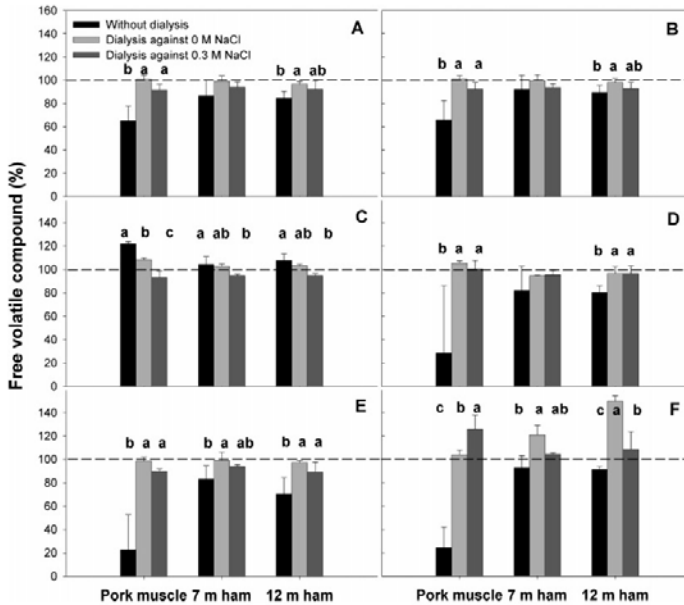


Figure 5. Effect of ionic strength on the binding of sarcoplasmic protein homogenates with volatile compounds. Results are expressed as a percentage of the free volatile compound found in the HS without protein in each buffer solution. (A) 3-methyl-butanol, (B) 2-methyl-butanol, (C) 2-pentanone, (D) hexanal, (E) methional, and (F) octanal.

378 of benzaldehyde by β -lactoglobulin in the presence of NaCl
 379 was due to a salting out effect.
 380 In the case of myofibrillar proteins, it should be taken into
 381 account that they were extracted in the presence of 0.7 M

potassium iodide. At this high ionic strength, the proteins are
 382 solubilized and their conformation is affected (21). For that
 383 reason, the myofibrillar proteins extracted from pork muscle
 384 and 7 and 12 months dry-cured ham were dialyzed against
 385

F

Pérez-Juan et al.

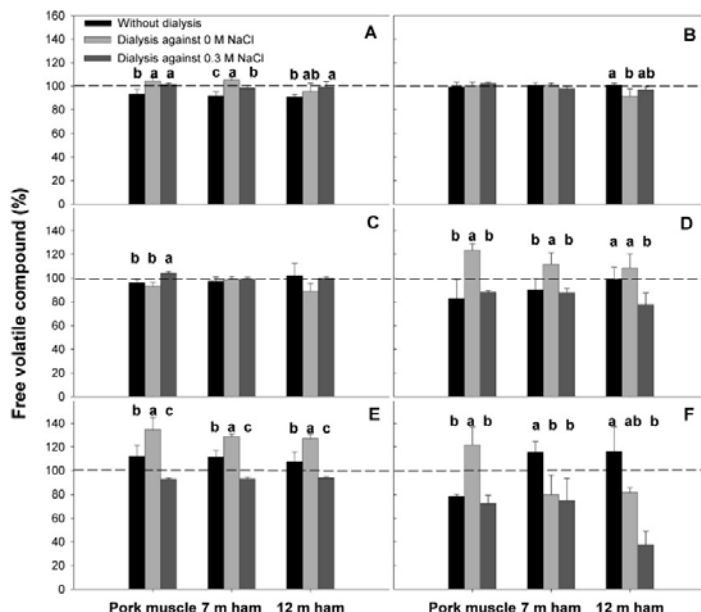


Figure 6. Effect of ionic strength on the binding of myofibrillar protein homogenates with volatile compounds. Results are expressed as a percentage of the free volatile compound found in the HS without protein in each buffer solution. (A) 3-Methyl-butanol, (B) 2-methyl-butanol, (C) 2-pentanone, (D) hexanal, (E) methional, and (F) octanal.

different buffers, with and without NaCl, to study how the change in protein conformation affects the protein-volatile binding ability. The free percentage of each volatile compound in the presence of myofibrillar protein homogenates and after dialysis process is shown in Figure 6.

In the presence of the myofibrillar proteins extracted from pork muscle, significant increases in the free percentages of 3-methyl-butanol (Figure 6A), hexanal (Figure 6D), methional (Figure 6E), and octanal (Figure 6F) were observed when the dialysis buffer did not contain NaCl. However, when the dialysis buffer contained 0.3 M NaCl, only the free percentage of 2-pentanone (Figure 6C) was significantly increased and the free percentage of methional (Figure 6E) was significantly decreased. These differences could be explained by the ionic strength change that affects the conformation of myofibrillar proteins (21) and also their binding ability. This fact was observed in the case of hexanal, methional, and octanal where the binding ability of myofibrillar proteins was lost in the absence of salt while it was kept in the presence of 0.3 M NaCl. The same effect was observed in the case of the myofibrillar 7 months dry-cured ham homogenates for hexanal (Figure 6D) and methional (Figure 6E) and in the case of the myofibrillar 12 months dry-cured ham homogenates only for methional (Figure 6E). However, a significant decrease of the free percentage of octanal (Figure 6F) was observed when 7 and 12 months dry-cured ham were dialyzed with and without salt. The observed differences in octanal between the homogenates from dry-cured ham and pork muscle could be due to the proteolysis occurring during the ripening process that changed

the protein composition of these homogenates (32) and affected the binding properties. The effect of ionic strength on the binding ability of actomyosin to several carbonyl compounds was studied by Damodaran and Kinsella (11). They found that binding affinity and binding capacity were greater in the presence of 0.15 M NaCl, approaching the conditions found in muscle, which are near 0.6 M NaCl, where actomyosin is fully solubilized. Although the studied volatile compounds were different, this result confirms that the conformation of myofibrillar proteins is important for their binding ability although it depends on the type of the volatile compound. O'Keefe et al. (35) studied the effect of NaCl concentration on the soy proteins (glycinin and β -conglycinin) binding ability. These authors showed that the presence of 0.5 M NaCl increased the presence of hexanal in the HS and reduced the affinity of hexanal for β -conglycinin while it had no effect for glycinin. As happens with myofibrillar proteins, the ionic strength of the medium affects the conformation of these two soy proteins.

Finally, it is difficult to compare our results with those obtained by other authors because of the different experimental conditions used. However, the effect of meat structure on the binding of volatile compounds has not yet been elucidated, so more research is still required to study the effect of isolated skeletal proteins on the binding of flavor compounds in order to determine the relative impact of muscle components on flavor release.

In summary, the binding ability of the sarcoplasmic fraction was higher than the myofibrillar fraction for the studied volatile compounds. All of the studied volatile compounds were retained

Binding of Flavor Compounds by Protein Meat Homogenates

PAGE EST: 7

G

- 444 by the sarcoplasmic and myofibrillar protein homogenates except
445 2-pentanone, which was released. This was confirmed for
446 3-methyl-butanol, 2-methyl-butanol, hexanal, and methional,
447 which were more bound by the sarcoplasmic proteins than by
448 the myofibrillar ones. Furthermore, the effect of the aqueous
449 phase ionic strength on the protein ability to bind flavor
450 compounds was discussed. The effect of aqueous ionic strength
451 was more important on myofibrillar proteins due to its ability
452 to produce changes on the protein conformation that affect the
453 binding ability of these proteins. However, the sarcoplasmic
454 protein binding ability seems to be more related to the small
455 compounds present in this homogenate than with the aqueous
456 phase ionic strength.
- 457 **ABBREVIATIONS USED**
- 458 SPME, solid phase microextraction; GC, gas chromatography;
459 FID, flame ionization detector; CAR/PDMS, carboxen/poly-
460 (dimethylsiloxane); HS, headspace.
- 461 **LITERATURE CITED**
- 462 (1) Landy, P.; Courthaudon, J. L.; Dubois, C.; Voilley, A. Effect of
463 interface in model food emulsions on the volatility of aroma
464 compounds. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 526–530.
- 465 (2) Kinsella, J. E. Flavor perception and binding. *Inform* **1990**, *1*,
466 215–226.
- 467 (3) Damodaran, S.; Kinsella, J. E. Interaction of carbonyls with soy
468 protein—Conformational effects. *J. Agric. Food Chem.* **1981**, *29*,
469 1253–1257.
- 470 (4) Damodaran, S.; Kinsella, J. E. Interaction of carbonyls with soy
471 protein—Thermodynamic effects. *J. Agric. Food Chem.* **1981**,
472 *29*, 1249–1253.
- 473 (5) Chung, S.; Villota, R. Binding of alcohols by soy protein in
474 aqueous-solutions. *J. Food Sci.* **1989**, *54*, 1604–1606.
- 475 (6) Heng, L.; van Koningsveld, G. A.; Gruppen, H.; van Boekel,
476 M. A. J. S.; Vincken, J. P.; Roozen, J. P.; Voragen, A. G. J.
477 Protein-flavour interactions in relation to development of novel
478 protein foods. *Trends Food Sci. Technol.* **2004**, *15*, 217–224.
- 479 (7) Jouenne, E.; Crouzet, J. Effect of pH on retention of aroma
480 compounds by β -lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*,
481 1273–1277.
- 482 (8) Guichard, E. Interactions between flavour compounds and food
483 ingredients and their influence on flavour perception. *Food Rev.*
484 *Int.* **2002**, *18*, 49–70.
- 485 (9) O'Neill, T. E.; Kinsella, J. E. Binding of alkanone flavors to
486 β -lactoglobulin—Effects of conformational and chemical modifi-
487 cation. *J. Agric. Food Chem.* **1987**, *35*, 770–774.
- 488 (10) Damodaran, S.; Kinsella, J. E. Flavor protein interactions—
489 Binding of carbonyls to bovine serum albumin—Thermodynamic
490 and conformational effects. *J. Agric. Food Chem.* **1980**, *28*, 567–
491 571.
- 492 (11) Damodaran, S.; Kinsella, J. E. Binding of carbonyls to fish
493 actomyosin. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *31*, 856–859.
- 494 (12) Zhou, S. Y.; Decker, E. A. Ability of carnosine and other skeletal
495 muscle components to quench unsaturated aldehyde lipid
496 oxidation products. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 51–55.
- 497 (13) Gianelli, P.; Flores, M.; Moya, V. J.; Aristoy, M. C.; Toldrà, F.
498 Effect of carnosine, asenine and other endogenous skeletal
499 peptides on the activity of porcine muscle alanyl and arginyl
500 amino peptidases. *J. Food Biochem.* **2000**, *24*, 69–78.
- 501 (14) Carrapiso, A. L.; Ventanas, J.; García, C. Characterization of the
502 most odor-active compounds of Iberian ham headspace. *J. Agric.*
503 *Food Chem.* **2002**, *50*, 1996–2000.
- 504 (15) Flores, M.; Grimm, C. C.; Toldrà, F.; Spanier, A. M. Correlations
505 of sensory and volatile compounds of Spanish “Serrano” dry-
506 cured ham as a function of two processing times. *J. Agric. Food*
507 *Chem.* **1997**, *45*, 2178–2186.
- 508 (16) Gonzalez, C. B.; Ockerman, H. W. Dry-cured Mediterranean
509 hams: Long process, slow changes and high quality: A review.
510 *J. Muscle Foods* **2000**, *11*, 1–17.
- (17) Toldrà, F.; Flores, M. The role of muscle proteases and lipases
511 in flavour development during the processing of dry-cured ham.
512 *CRC Food Sci. Nutr.* **1998**, *35*, 331–352.
- (18) Toldrà, F.; Aristoy, M. C.; Flores, M. Contribution of muscle
514 aminopeptidases to flavor development in dry-cured ham. *Food*
515 *Res. Int.* **2000**, *33*, 181–185.
- (19) Gandemer, G. Lipids in muscles and adipose tissues, changes
517 during processing and sensory properties of meat products. *Meat*
518 *Sci.* **2002**, *62*, 309–321.
- (20) Vestergaard, C. S.; Schivazappa, C.; Virgili, R. Lipolysis in dry-
520 cured ham maturation. *Meat Sci.* **2000**, *55*, 1–5.
- (21) Pearson, A. M.; Young, R. B. Muscle and meat biochemistry.
522 In *Food Science and Technology. A Series of Monographs*;
523 Schweigert, B. S., Taylor, S. L., Eds.; Academic Press.: London,
524 1989; pp 1–29, 66–94, and 98–127.
- (22) Syrovy, I. Separation of muscle proteins. *J. Chromatogr.* **1984**,
526 *300*, 225–247.
- (23) Chan, K. M.; Decker, E. A. Endogenous skeletal-muscle anti-
528 oxidants. *CRC Food Sci. Nutr.* **1994**, *34*, 403–426.
- (24) Asghar, A.; Samejima, K.; Yasui, T. Functionality of muscle
530 proteins in gelation mechanisms of structured meat products.
531 *CRC Food Sci. Nutr.* **1985**, *22*, 27–101.
- (25) Pionnier, E.; Engel, E.; Salles, C.; Le Quere, J. L. Interactions
533 between nonvolatile water-soluble molecules and aroma com-
534 pounds in Camembert cheese. *Food Chem.* **2002**, *76*, 13–20.
- (26) Gianelli, M. P.; Flores, M.; Toldrà, F. Interactions of soluble
536 peptides and proteins from skeletal muscle on the release of
537 volatile compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6828–6834.
- (27) Gianelli, M. P.; Flores, M.; Toldrà, F. Interaction of soluble
539 peptides and proteins from skeletal muscle with volatile com-
540 pounds in model systems as affected by curing agents. *J. Agric.*
541 *Food Chem.* **2005**, *53*, 1670–1677.
- (28) Molina, I.; Toldrà, F. Detection of proteolytic activity in
543 microorganisms isolated from dry-cured ham. *J. Food Sci.* **1992**,
544 *57*, 1308–1310.
- (29) Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.;
546 Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N.
547 M.; Olson, B. J.; Klensk, D. C. Measurement of protein using
548 bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76–85.
- (30) Flores, M.; Aristoy, M. C.; Spanier, A. M.; Toldrà, F. Nonvolatile
550 components effects on quality of “Serrano” dry-cured ham as
551 related to processing time. *J. Food Sci.* **1997**, *62*, 1235–1239.
- (31) Gianelli, M. P.; Flores, M.; Toldrà, F. Importance of meat
553 proteins on flavour release. In *Research Advances in the Quality*
554 *of Meat and Meat Products*; Toldrà, F., Ed.; Research Sign-
555 post: Trivandrum, India, 2002; pp 79–94.
- (32) Pérez-Juan, M.; Flores, M.; Toldrà, F. Generation of volatile
557 flavour compounds as affected by the chemical composition of
558 different dry-cured ham sections. *Eur. Food Res. Technol.* **2005**,
559 in press. DOI: 10.1007/s00217-005-0196-6.
- (33) Goodridge, C. F.; Beaudry, R. M.; Pestka, J. J.; Smith, D. M.
561 Solid-phase microextraction-gas chromatography for quantifying
562 headspace hexanal above freeze-dried chicken myofibrils. *J.*
563 *Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4185–4190.
- (34) Nawar, W. W. Some variables affecting composition of head-
565 space aroma. *J. Agric. Food Chem.* **1971**, *19*, 1057–1059.
- (35) O’Keefe, S. F.; Wilson, L. A.; Resurreccion, A. P.; Murphy, P.
567 A. Determination of the binding of hexanal to soy glycinin and
568 β -conglycinin in an aqueous model system using headspace
569 technique. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 1022–1028.

Received for review February 8, 2006. Revised manuscript received
May 5, 2006. Accepted May 8, 2006. This work was supported by
Grants AGL2004-05064-CO2-01 (MEC, Spain) and Group S03/006
(AVCIT, Generalitat Valenciana, Spain). The FPI/MEC scholarship to
M.P.-J. is also fully acknowledged.

JF060374X

571
572
573
574
575
576
577

APÉNDICE III

“Simultaneous process to isolate actomyosin and actin from post-rigor porcine skeletal muscle”

Pérez-Juan, M.; Flores, M. and Toldrá, F.

Food Chemistry 2006 (en prensa)



Simultaneous process to isolate actomyosin and actin from post-rigor porcine skeletal muscle

María Pérez-Juan, Mónica Flores, Fidel Toldrá *

Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), P.O. Box 73, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

Received 10 October 2005; received in revised form 23 February 2006; accepted 23 February 2006

Abstract

A simultaneous actomyosin and actin isolation procedure from post-rigor porcine muscle was developed, based on differential solubility, gel filtration chromatography and extraction steps. The isolation process was evaluated by SDS-PAGE analysis and silver staining. Actomyosin and actin were isolated in a simultaneous process yielding 0.14 mg and 2.5 mg/g of meat, respectively, using a shorter purification process than others reported in the literature but with similar recoveries. Furthermore, actin preserves its polymerisation ability and both proteins, actomyosin and actin, could be used in further studies.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Myofibrillar proteins; Myosin; Actin; Actomyosin; Purification processes; Polymerisation; Post-rigor porcine muscle

1. Introduction

The separation of the muscle constituents is necessary for various physiological and biochemical studies. In this sense, the isolation of muscle constituents allows their characterisation in order to relate them to meat quality (Bowker, Grant, Swartz, & Gerrard, 2004; Hidalgo, Padrón, Horowitz, Zhao, & Craig, 2001; Toldrá & Flores, 2004), to understand post-mortem changes (Toldrá, 2005), to the identification of contaminating proteins added to meat products (Toorop, Murch, & Ball, 1997) and to the study of the interaction phenomenon with other matrix components (Gianelli, Flores, & Toldrá, 2003). Myosin and actin, which are the major constituents of myofibrillar proteins, are not only important in muscle physiology, but they are also believed to be mainly responsible for important functional properties in food systems, such as water-holding, emulsifying capacity, binding ability and gelation, in various structured meat and meat products (Asghar, Samejima, & Yasui, 1985).

Specifically, numerous methods for the isolation of these proteins have been developed, depending on the objective of the investigation, but many of them are very tedious as they include many extractions processes (Syrový, 1984); nevertheless several rapid methods have been developed for application in the industry (Murch, Bruce, & Ball, 1992; Toorop et al., 1997).

Generally, the major myofibrillar proteins are isolated in separated processes (Syrový, 1984). In particular, the extraction of myosin is usually initiated by the removal of the sarcoplasmic proteins through washes with diluted phosphate buffer. Subsequently, the extraction of myosin is carried out using modifications of Guba–Straub (Hermansson, Harbitz, & Langton, 1986) and Hasselback–Schneider (Dudzziak & Foegeding, 1988) solutions. These buffers usually contain EDTA or EGTA to eliminate the heavy metals and to protect the enzymatic activity of the protein (Syrový, 1984). In several modifications, DTT or β -mercaptoethanol are added at low concentrations, in order to avoid the oxidation of myosin. Furthermore, the elimination of contaminants was achieved by fractionation with ammonium sulphate and diverse chromatographic methods (Syrový, 1984). The application of high pressure

* Corresponding author. Tel.: +34 96 390 0022; fax: +34 96 363 6301.
E-mail address: ftoldra@iata.csic.es (F. Toldrá).

to enlarge the solubility of the myofibrillar proteins has been attempted (Macfarlane & McKenzie, 1976) and some authors have even used HPLC to separate myosin from muscle extracts using high ionic strength solutions as mobile phase (Murch et al., 1992). On the other hand, the classical method to isolate actin is initiated with the elimination of the myosin and other myofibrillar proteins, using an extraction with a high ionic strength solution. Subsequently, the break of the intermolecular links in the F-actin is carried out using acetone or potassium iodide (Srovy, 1984) and, finally, the G-actin is extracted. Subsequently, the protocol for actin purification could be divided into two steps: first, the preparation of the acetone powder and second, the extraction of the G-actin, where the ATP is added to the extraction buffer in order to maintain the actin functional integrity (Pardee & Spudich, 1982). After the extraction, the purification process is continued for several days with polymerisation and depolymerisation cycles to eliminate the contaminants (Pardee & Spudich, 1982). The following variations of this method were mainly focussed on the extraction solution, in the centrifugation speed and in the process utilised to obtain a greater purification degree, depending on the desired purity and the use required for the protein.

Moreover, most of these purification processes used pre-rigor muscle (Srovy, 1984) but, in processed meat products, the majority of muscles used are in the post-rigor state. Furthermore, the separated constituents of post-rigor muscle would have characteristics different from those extracted from pre-rigor (Fukazawa, Nakai, & Yasui, 1970). It is important to evaluate, for example, the functional properties of proteins at the molecular level in processed products (Dudziak & Foegeding, 1988).

Summing up, the methods for isolating myofibrillar proteins are long and tedious. Therefore, the aim of this investigation was the isolation of actomyosin and actin, in a unique extraction process, from post-rigor porcine muscle, based on differential solubility, gel filtration chromatography and extraction steps, in order to obtain fractions that could be used for further studies.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Salts, (MgCl_2 , KCl , NaCl , NaN_3 and NaH_2PO_4) were purchased from Panreac (Barcelona, Spain), except CaCl_2 (Sharlau, Barcelona, Spain) and $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (Riedel-de Haën, Seelze). EGTA (ethylene glycol-bis(2-aminoethyl ether)- N,N,N',N' -tetraacetic acid), β -mercaptoethanol and ATPN_2 (adenosine 5'-triphosphate disodium salt) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt 2-hydrate) from Panreac (Barcelona, Spain). Buffers Tris (Tris(hydroxymethyl)aminoethane) and $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). All the chemicals used were reagent grade (purity >98%).

Molecular weight standards of broad range for SDS-PAGE were purchased from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA) and include: myosin (200 kDa), β -galactosidase (116 kDa), phosphorylase-b (97.4 kDa), bovine serum albumin (66.2 kDa), ovalbumin (45 kDa) and carbonic anhydrase (31 kDa). Molecular weight standards for gel-chromatography were: myosin (450 kDa) and carbonic anhydrase (31 kDa) purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and bovine serum albumin (66.2 kDa) from Roche (Mannheim, Germany).

2.2. Sample

Porcine muscle *Longissimus dorsi*, 2 d post-mortem, was acquired from local butchery. Fat and connective tissue were removed and the meat was cut in portions, packaged in vacuum bags and stored at -20°C .

2.3. Protein purification processes

2.3.1. Simultaneous purification process

The simultaneous purification process (Fig. 1) started by washing 50 g porcine of post-rigor muscle three times with 0.1 M Tris-HCl at pH 7.0 containing 20 mM EDTA (wash buffer) in order to eliminate the sarcoplasmic proteins. Afterwards, the myofibrillar proteins were extracted with Hasselbach-Schneider solution, consisting of: 0.1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ at pH 6.4 with 0.6 M KCl, 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 1 mM MgCl_2 and 20 mM EGTA (Dudziak & Foegeding, 1988) and were precipitated by diluting 1/20 with deionised water. The last pellet (M4p) was submitted to a further purification step using gel chromatography in a XK column (\varnothing 2.6 cm \times 66.5 cm. Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) filled with Sephacryl S-300 with a 10–1500 kDa fractionation range. The sample was eluted with 20 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ at pH 7.0 and 0.5 M NaCl as elution buffer and 80 fractions were recovered with a flow of 18 ml/h. The elution pattern was monitored by measuring the absorbance at 280 nm in a spectrophotometer Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech, England). The combination of the six fractions that gave the maximum absorbance constituted the fraction M8. Previously, the column was calibrated using 1 mg/ml of myosin (450 kDa), bovine serum albumin (66.2 kDa) and carbonic anhydrase (31 kDa) that were eluted in fractions 12, 30 and 39, respectively (data not shown).

In the second part of the process, the pellet obtained after the extraction with Hasselbach-Schneider solution (M3p, Fig. 1) was used to prepare the acetone powder by three successive extractions with acetone (20 vol/g pellet) for 20 min and further filtration through Whatman paper. Afterwards, the acetone powder was used for the extraction of G-actin with buffer A (20 ml/g acetone powder) containing 2 mM Tris-HCl at pH 8.0 and 0.2 mM ATPN_2 , 0.5 mM β -mercaptoethanol, 0.2 mM CaCl_2 and 0.005% NaN_3 at different extraction times. Then the fractions were

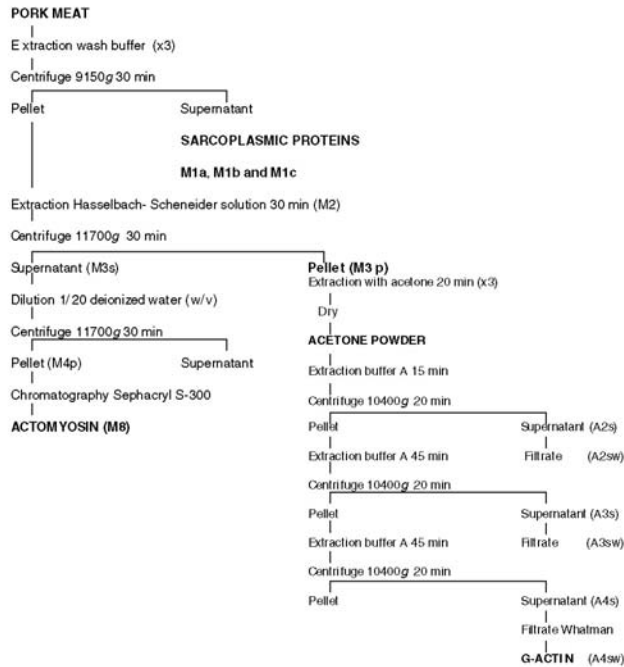


Fig. 1. Simultaneous purification process for actomyosin and actin from post-rigor porcine muscle. Wash buffer, Hasselbach Schneider solution and buffer A are described in Section 2.

filtered through Whatman paper, yielding fractions A2sw, A3sw and A4sw.

2.3.2. Dudziak purification process

The process described by Dudziak and Foegeding (1988) was assayed to isolate myosin and actomyosin from post-rigor porcine muscle (Fig. 2). This process was carried out using the same steps as the simultaneous purification process (Fig. 1) until the M4p fraction was obtained. Later, two washing steps, using buffer D1 (0.5 M Tris-HCl at pH 7.0 with 1.5 M KCl) and buffer D2 (20 mM NaH₂PO₄ at pH 7.0 with 3.0 M KCl and 0.5 M NaCl) were performed obtaining the fractions M5p and M6s, respectively.

2.3.3. Pardee and Spudich purification process

The process described by Pardee and Spudich (1982) was assayed for the isolation of actin (Fig. 3). However, the starting material was the pellet (M3p) obtained in the simultaneous purification process (Fig. 1) instead of beginning from post-rigor porcine muscle. This process included two parts, the production of the acetone powder and the

G-actin isolation. The acetone powder was obtained by extracting the M3p fraction with acetone during 20 min and repeated for five times (Fig. 3). Then, the extraction of actin from the acetone powder was performed using buffer A (described above), stirring for 30 min (and repeated twice). The supernatants obtained (A2s and A3s) were combined, yielding the fraction A4s and later it was centrifuged for obtaining the fraction A5 constituted of G-actin.

2.4. Protein concentration

The protein concentration in each fraction was determined by the bicinchoninic acid method (Smith et al., 1985) using bovine serum albumin as standard. The values are the means of four measurements.

2.5. Electrophoretic analysis

The isolated fraction purities were monitored by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), using 10% and 12% gels and stained with silver

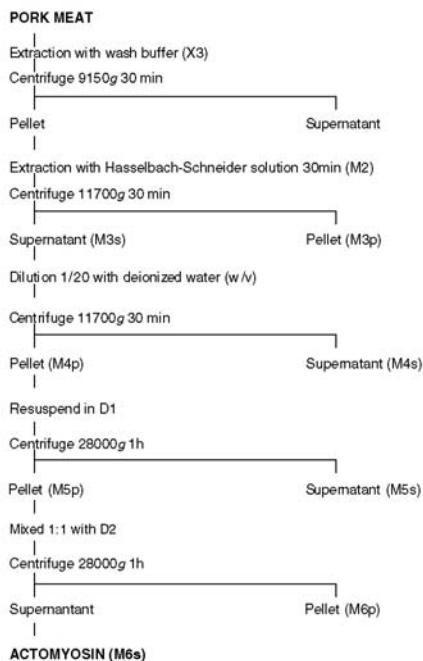


Fig. 2. Dudziak purification process for actomyosin from post-rigor porcine muscle. Wash buffer, Hasselbach Schneider solution, D1 and D2 are described in Section 2.

(Merril, Goldman, Sedman, & Ebert, 1981). The band identification was done by comparison with molecular weight standards: myosin (200 kDa), β -galactosidase (116 kDa), phosphorylase-b (97.4 kDa), bovine serum albumin (66.2 kDa), ovalbumin (45 kDa) and carbonic anhydrase (31 kDa) (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). Each lane was loaded with 5 μ g and 12 μ g of protein for standards and samples, respectively.

2.6. Actin polymerisation

F-actin or the polymerised form of the protein was obtained adding KCl, $MgCl_2$ and $ATPN_2$ to the G-actin fraction to a final concentration of 50 mM, 2 mM and 1 mM, respectively. Then the mixture was kept for 12 h at 5 °C and the F-actin was separated by centrifugation at 3500 rpm for 2 min (MSE Mistral 2000, England). The polymerisation percentage was calculated by measuring the quantity of protein in the supernatant before and after centrifugation (Wang & Smith, 1994).

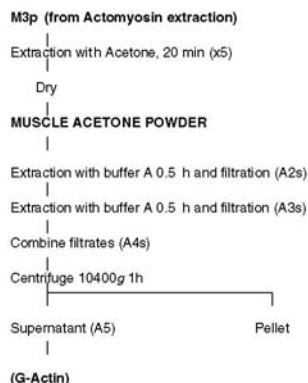


Fig. 3. Pardee and Spudich purification process for actin from post-rigor porcine muscle. Buffer A is described in Section 2.

3. Results and discussion

3.1. Actomyosin isolation

Numerous methods to isolate major myofibrillar proteins have been proposed, although these proteins have been isolated separately (Syrový, 1984). In the present work, actomyosin has been isolated from post-rigor porcine muscle using the proposed simultaneous process and also the method proposed by Dudziak and Foegeding (1988), as shown in Figs. 1 and 2, respectively.

In the first step of the simultaneous purification process, the sarcoplasmic proteins were mainly extracted (M1a, M1b and M1c, Fig. 4A). Most of these sarcoplasmic proteins were eliminated in the first wash (M1a), as shown by the high concentration of extracted protein (Table 1). After the extraction using the Hasselbach-Schneider solution, the fractions were enriched in myofibrillar proteins (M2–M4p, Fig. 4A). This was shown by the presence of higher intensity bands at 200 kDa that correspond to the myosin heavy chain, 25 kDa that corresponded to one of the myosin light chains and 45 kDa that corresponded to actin (M2–M4p, Fig. 4A). In addition, these fractions showed other contaminant bands, such as troponins and tropomyosin at 37 and 34 kDa, respectively, and C-protein at 140 kDa (Wang & Smith, 1994). Furthermore, the SDS-PAGE gel showed a further purified fraction as the process progressed (M2–M4p, Fig. 4A) and the fractions extracted with high ionic strength (M3s and M4p, Fig. 4A) had similar protein concentrations which were around 7 mg/ml (Table 1).

On the other hand, the results from the Dudziak purification process (Fig. 2) using post-rigor porcine muscle, are shown in Fig. 4B. The SDS-PAGE gel showed that the most enriched fraction in actomyosin was M4p, as

ARTICLE IN PRESS

M. Pérez-Juan et al. / Food Chemistry xxx (2006) xxx xxx

5

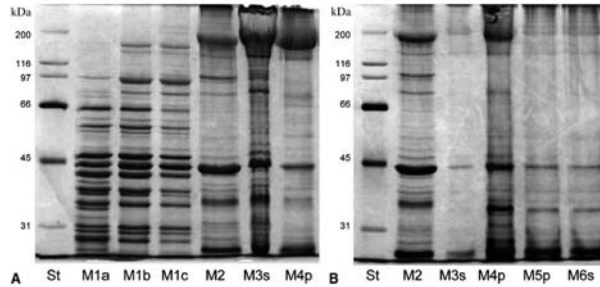


Fig. 4. Ten per cent SDS-PAGE gels of the purification processes of actomyosin stained with silver. Simultaneous purification process (A) and Dudziak purification process (B). Names of fractions in the lanes correspond to the fractions obtained by the process described in Figs. 1 and 2, respectively. St: molecular weight standards (myosin (200 kDa), β -galactosidase (116 kDa), phosphorylase-b (97.4 kDa), bovine serum albumin (66.2 kDa), ovalbumin (45 kDa) and carbonic anhydrase (31 kDa)).

Table 1

Protein concentration obtained and total extraction times employed in the purification processes of actomyosin and G-actin isolation

Process	Protein concentration (mg/ml)							Time (h) ^a
Actomyosin	M1a	M1b	M1c	M2	M3s	M4p	M8	
Simultaneous ^b	18.4 ± 1.6	8.7 ± 0.3	2.8 ± 0.2	7.3 ± 0.2	6.5 ± 0.4	7.1 ± 0.4	0.31 ± 0.01	8
Dudziak ^c	18.3 ± 2.3					4.1 ± 0.1		10
Actin	A2s	A2sw	A3s	A3sw	A4s	A4sw		
Simultaneous	0.73 ± 0.08	0.86 ± 0.05	0.45 ± 0.00	0.42 ± 0.00	0.86 ± 0.02	0.86 ± 0.09		3
Pardee and Spudich ^d	0.75 ± 0.03				0.62 ± 0.04			4

Protein concentration is expressed as the mean value ± standard error.

^a Approximate total extraction time employed.

^b Simultaneous purification process, as indicated in Section 2.

^c Dudziak purification process, as indicated in Section 2.

^d Pardee and Spudich purification process, as indicated in Section 2.

observed by the more intense bands at 200, 25 and 45 kDa that correspond to heavy and light chains of myosin and actin, respectively. A reduction of several contaminants could be observed in the later extraction steps (M5p, Fig. 4B) but, at the same time, a reduction in the quantity of actomyosin was observed by the decrease in intensity of the bands that corresponded to myosin heavy chain and actin.

Moreover, the M4p fraction was chromatographed using Sephacryl S-300 with the aim of separating myosin from actomyosin. The chromatographic profile showed an unique peak (see Fig. 5). Different fractions of this peak contained a band that corresponded to actin at 45 kDa together with the myosin heavy chain band (200 kDa) and light chain (25 kDa) as it is shown in Fig. 6. The absence of a separated peak in fraction 12 showed that the isolation of myosin and actomyosin was not achieved and the absence of peak between fractions 30 and 39 indicated that M4p, obtained by the simultaneous process, did not contain actin (Fig. 5).

Finally, a fraction composed of highly purified actomyosin was obtained at the end of the purification process including the chromatographic step. This fraction (M8,

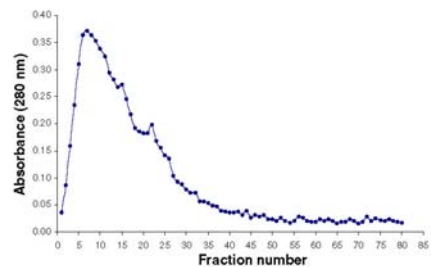


Fig. 5. Chromatographic purification of actomyosin by gel filtration using Sephacryl S-300. Previously, the column was calibrated with different proteins, including myosin (450 kDa), bovine serum albumin (66.2 kDa) and carbonic anhydrase (31 kDa) that were eluted in fractions 12, 30 and 39, respectively (data not shown).

Table 1) contained 0.306 mg/ml of protein; that means a recovery of 0.14 mg of actomyosin per gram of meat, similar to the result obtained by Dudziak and Foegeding (1988), although it was obtained in a shorter process

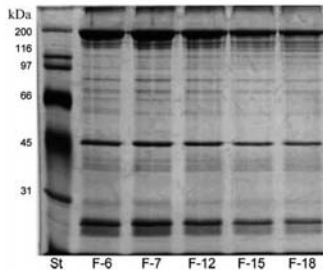


Fig. 6. Ten per cent SDS-PAGE silver stained gel of the fractions eluted from the Sephacryl S-300 column. Numbers in the lanes correspond to the fractions eluted from the column (Fig. 5). St: molecular weight standards (myosin (200 kDa), β -galactosidase (116 kDa), phosphorylase-b (97.4 kDa), bovine serum albumin (66.2), ovalbumin (45 kDa) and carbonic anhydrase (31 kDa)).

because two washing steps with buffers D1 and D2 were eliminated (M5p and M6, Fig. 4B). On the other hand, our results could not be compared with those of other authors due to the different processes used for the extraction of these proteins, the type of muscle and animal species utilised and the use of post-rigor or pre-rigor muscle. However, in order to reduce the extraction times, Hidalgo et al. (2001) and Murch et al. (1992) developed methods for purifying myofibrillar proteins that were fast and successful for use in the industry but unsuitable for obtaining high quantity protein for further studies.

3.2. Actin isolation

Since actin was first isolated by Straub (Pardee & Spudich, 1982), several methods have been developed for its purification and most have used pre-rigor rabbit muscle (Syrový, 1984). In this study, the simultaneous and Pardee

and Spudich purification processes (Figs. 1 and 3) were applied to obtain actin from the pellet (M3p, Fig. 1) obtained in the actomyosin purification. In both processes, the acetone powder was first obtained and later the protein was extracted.

The SDS-PAGE gel of different fractions obtained using the simultaneous purification process (Fig. 7A) showed that the most intense band, corresponding to actin (45 kDa) was observed in the latest step (A4s and A4sw) and its intensity increased as the purification process progressed. On the other hand, the electrophoretic profile (Fig. 7B) for the extraction of G-actin using the Pardee and Spudich process showed that the step consisting of the combination of the supernatants A3s and A2s (Fig. 7B) only increased the contaminants in the resulting fraction (A4s) and none of these contaminants were eliminated in the later ultracentrifugation step (A5, Fig. 7B). However, the simultaneous purification process substitutes these two last steps with two longer extraction steps without combining the supernatants (A3s and A4s, Fig. 1) yielding an enriched actin fraction (Fig. 7). In addition, the filtration of fractions through Whatman paper did not reduce contaminant bands (A2sw, A3sw and A4sw, Fig. 7A).

Table 1 shows that the final fraction (A4sw), enriched with actin, had a protein concentration of 0.86 mg/ml. This means a recovery of 18.6 mg of G-actin per gram of acetone powder or 2.5 mg/g of meat (post-rigor porcine muscle) while Pardee and Spudich (1982) obtained a yield of 10 mg of actin per gram of acetone powder, although they suggested that a greater amount (even 30 mg) could be achieved.

On the other hand, Kuroda (1982) obtained G-actin from myofibrillars without acetone treatment but these proteins lost polymerisation ability after prolonged extraction. In order to check the functionality of the isolated actin, the polymerisation of A4sw fraction was carried out. The protein conserved the polymerisation ability but the obtained percentage (64%) was lower than that

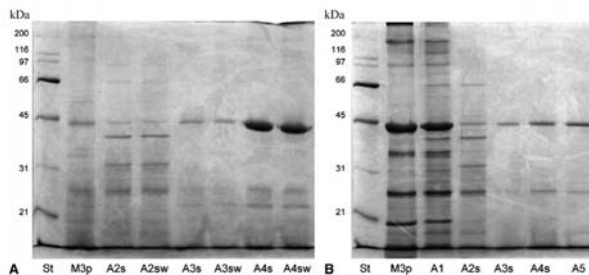


Fig. 7. Twelve per cent SDS-PAGE gels of the purification processes of actin stained with silver. Simultaneous purification process (A) and Pardee and Spudich purification process (B). Name of fractions in the lanes correspond to the fractions obtained by the process described in Figs. 1 and 3, respectively. St: molecular weight standards [myosin (200 kDa), β -galactosidase (116 kDa), phosphorylase-b (97.4 kDa), bovine serum albumin (66.2 kDa), ovalbumin (45 kDa) and carbonic anhydrase (31 kDa)].

ARTICLE IN PRESS

M. Pérez-Juan et al. / Food Chemistry xxx (2006) xxx xxx

7

achieved by Wang and Smith (1994), probably due to the use of a less purified fraction and different animal species.

Summing up, actomyosin was purified using a modified protocol from Dudziak and Foegeding (1988) where post-rigor porcine muscle was used instead of pre-rigor muscle but obtaining a similar recovery. In the same purification process, G-actin was isolated from the same original sample and following a modification of the Pardee and Spudich (1982) process. However, the recovery was higher than that obtained by these authors, probably due to a less purified fraction, although its polymerisation ability was conserved, which made it appropriate for further studies. Nevertheless, in comparison to the initial purification protocols, the developed simultaneous purification process was shorter which is an advantage for obtaining purified myofibrillar proteins for later studies.

Acknowledgements

Financial support from Grants AGL2004-05064-CO2-01 (Spain) and Group S03/006 (Generalitat Valenciana, Spain) are fully acknowledged. The scholarship FPI/MEC (Spain) to M. Pérez-Juan is also fully acknowledged.

References

- Asghar, A., Samejima, K., & Yasui, T. (1985). Functionality of muscle proteins in gelation mechanisms of structured meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 22, 27-105.
- Bowker, B. C., Grant, A. L., Swartz, D. R., & Gerrard, D. E. (2004). Myosin heavy chain isoforms influence myofibrillar ATPase activity under simulated post-mortem pH, calcium and temperature conditions. *Meat Science*, 67, 139-147.
- Dudziak, J. A., & Foegeding, E. A. (1988). Isolation of actomyosin and myosin from post-rigor turkey breast and thigh. *Journal of Food Science*, 53(5), 1287-1290.
- Fukazawa, T., Nakai, H., & Yasui, T. (1970). Some properties of myofibrillar proteins obtained from low ionic strength extracts of washed myofibrils from pre- and post-rigor chicken pectoral muscle. *Journal of Food Science*, 35, 464-468.
- Gianelli, M. P., Flores, M., & Toldrá, F. (2003). Interactions of soluble peptides and proteins from skeletal muscle on the release of volatile compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6828-6834.
- Hermansson, A. M., Harbitz, O., & Langton, M. (1986). Formation of two types of gels from bovine myosin. *Journal of Science Food Agricultural*, 37, 69-84.
- Hidalgo, C., Padrón, R., Horowitz, R., Zhao, F. Q., & Craig, R. (2001). Purification of native myosin filaments from muscles. *Biophysical Journal*, 81, 2817-2826.
- Kuroda, M. (1982). Direct extraction of G-actin from the myosin-removed myofibrils under the conditions of low ionic strength. *Journal of Biochemistry*, 92(6), 1863-1872.
- Maclarlane, J. J., & McKenzie, I. J. (1976). Pressure-induced solubilization of myofibrillar proteins. *Journal of Food Science*, 41, 1442-1446.
- Merril, C. R., Goldman, D., Sedman, S. A., & Ebert, M. H. (1981). Ultra sensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid. *Science*, 211, 1437-1438.
- Murch, S. J., Bruce, H. L., & Ball, R. O. (1992). Rapid separation and quantification of myofibrillar proteins by high performance gel permeation chromatography. *Food Research International*, 25, 109-115.
- Pardee, J. D., & Spudich, A. (1982). Purification of muscle actin. *Methods in Enzymology*, 85, 164-179.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., et al. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150, 76-85.
- Syrovy, I. (1984). Separation of muscle proteins. *Journal of Chromatography*, 300, 225-247.
- Toldrá, F., & Flores, M. (2004). Analysis of meat quality. In L. M. L. Nollet (Ed.), *Handbook of food analysis* (2nd ed., pp. 1961-1977). New York: Marcel-Dekker Inc.
- Toldrá, F. (2005). Meat: Chemistry and biochemistry. In Y. H. Hui, J. D. Culbertson, S. Duncanson, I. Guerrero-Legarreta, E. C. Y. Li-Chan, C. Y. Ma, C. H. Manley, T. A. McMeekin, W. K. Nip, L. M. L. Nollet, M. S. Rahman, F. Toldrá, & Y. L. Xiong (Eds.), *Handbook of food science, technology and engineering* (Vol. 1). Boca Raton, FL: CRC Press (pp. 28, 1-18).
- Toorop, R. M., Murch, S., & Ball, R. O. (1997). Development of a rapid and accurate method for separation and quantification of myofibrillar proteins in meat. *Food Research International*, 30(8), 619-627.
- Wang, S. F., & Smith, D. M. (1994). Heat-induced denaturation and rheological properties of chicken breast myosin and F-actin in the presence and absence of pyrophosphate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2665-2670.

APÉNDICE IV

“Binding of aroma compounds by isolated myofibrillar proteins: effect of protein concentration and conformation”

Pérez-Juan, M.; Flores, M. and Toldrá, F.

Journal of Agricultural and Food Chemistry 2006
(enviado)
