

**DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS BIOQUÍMICOS PARA EL
CONTROL DE CALIDAD EN LA ELABORACIÓN DE JAMÓN
COCIDO Y JAMÓN CURADO**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:
Leticia Mora Soler

Dirigida por:
Prof. Dr. Fidel Toldrá Vilardell
Dr. Miguel Ángel Sentandreu Vicente

Valencia, febrero de 2010

D. Fidel Toldrá Vilardell, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), y D. Miguel Ángel Sentandreu Vicente, Científico Titular en el mismo Instituto, hacen constar:

Que la memoria titulada “Determinación de compuestos bioquímicos para el control de calidad en la elaboración de jamón cocido y jamón curado” presentada por Dña. Leticia Mora Soler para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia, ha sido realizada bajo su dirección y supervisión, reuniendo las condiciones necesarias para ser defendida por su autora.

Valencia, febrero 2010

Fdo. Fidel Toldrá Vilardell

Fdo. Miguel Ángel Sentandreu Vicente

Resumen

Durante la última década se ha puesto de manifiesto la importancia de desarrollar nuevos métodos rápidos de análisis con el fin de controlar el proceso de elaboración de los productos cárnicos de una forma segura y eficiente. Debido a este interés, parte de esta Tesis Doctoral se ha centrado en el desarrollo y la aplicación de nuevos métodos no destructivos y rápidos para controlar el proceso de producción, tanto del jamón cocido como del tradicional jamón curado. La participación de compuestos como la creatina y creatinina en el conjunto de las reacciones químicas y enzimáticas que tienen lugar en el músculo postmortem los convierten en buenos marcadores para conocer el tiempo de curado y/o cocción de productos cárnicos. En la presente Tesis Doctoral se ha desarrollado un nuevo método de análisis por HPLC sencillo y fiable basado en la cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) para la determinación simultánea de creatina y creatinina, así como de los dipéptidos carnosina, anserina y balenina, siendo una alternativa muy interesante a los métodos ya existentes para el análisis de este tipo de compuestos. Dado que la conversión de creatina en creatinina se ve influenciada por la temperatura, el tiempo, y por los cambios de pH, se ha empleado la ratio creatinina/creatina como índice para determinar el alcance del tratamiento térmico aplicado durante el procesado de jamón cocido, y también como valor para estimar el tiempo mínimo de curado del jamón.

Además de los cambios en compuestos relacionados con el metabolismo energético del músculo, durante el proceso de curado de jamón tienen lugar una serie de reacciones bioquímicas entre las que destaca la intensa proteólisis de las proteínas musculares. A pesar de tener la evidencia de la presencia de oligopéptidos al final del proceso de curado, se sabe muy poco acerca de la secuencia específica de los mismos. A este respecto, en esta Tesis Doctoral se presenta por primera vez la identificación de fragmentos peptídicos generados a partir de la hidrólisis de proteínas miofibrilares como la cadena ligera de miosina I, la titina, y la troponina T, y sarcoplásmicas como la creatina quinasa, para lo cual se ha recurrido al uso de modernas técnicas de proteómica basadas en la espectrometría de masas.

Resum

Al llarg de l'última dècada s'ha posat de manifest la importància de desenvolupar nous mètodes ràpids d'anàlisi amb la finalitat de controlar el procés d'elaboració dels productes càrnics d'una forma segura i eficient. A conseqüència d'aquest interès, part d'aquesta Tesi Doctoral s'ha centrat al desenvolupament i l'aplicació de nous mètodes no destructius i ràpids per controlar el procés de producció, tant del pernil cuït com del tradicional pernil curat. La participació de compostos com la creatina i creatinina al conjunt de les reaccions químiques i enzimàtiques que tenen lloc al múscul postmortem els converteixen en bons marcadors per a conèixer el temps de curat i/o cocció dels productes càrnics. En la present Tesi Doctoral s'ha desenvolupat un nou mètode d'anàlisi per HPLC senzill i fiable basat en la cromatografia d'interacció hidrofílica (HILIC) per a la determinació simultània de creatina i creatinina, així com dels dipèptids carnosina, anserina i balenina, sent una alternativa molt interessant als mètodes ja existents per a l'anàlisi d'aquest tipus de compostos. Atès que la conversió de creatina en creatinina es veu influenciada per la temperatura, el temps, i per els canvis del pH, un dels objectius d'aquest treball ha estat emprar la ràtio creatinina/creatina com a índex per determinar l'abast del tractament tèrmic aplicat durant el processat de pernil cuït, i també com a valor per estimar el temps mínim de curat en pernills.

A més dels canvis que ocorren als compostos relacionats amb el metabolisme energètic muscular, durant el procés de curat tenen lloc una sèrie de reaccions bioquímiques entre les quals destaca la intensa proteolisis de les fibres musculars. En relació a aquesta temàtica cal ressaltar que a pesar de ser evident la presència d'oligopèptids al final del procés de curat, es sap molt poc de la seqüència específica d'aquests pèptids. En aquesta Tesi Doctoral es presenta per primera vegada la identificació de fragments peptídics generats a partir de la hidròlisi de les proteïnes miofibrilars i sarcoplàsmiques com la cadena lleugera de miosina I, la titina, la creatina quinasa i la troponina T. Per tal de dur a terme aquest objectiu s'han utilitzat modernes tècniques de proteòmica basades a l'espectrometria de masses.

Abstract

During the last decade it has been shown the importance of developing new rapid methods of analysis with the aim to control the elaboration process of meat products in a safety and efficient way. Due to this interest, part of this Thesis has been focused on the development and the application of new and fast nondestructive methods to control the processing of both cooked and dry-cured ham. The role of creatine and creatinine in the chemical and enzymatic reactions that take place during the postmortem period of skeletal muscle makes these compounds to be potential good markers in the cooked and dry-cured ham processes. In the present Thesis, a new, simple and reliable HPLC method based on hydrophilic interaction chromatography (HILIC) has been developed for the simultaneous determination of creatine and creatinine, together with the dipeptides carnosine, anserine and balenine. This method constitutes an interesting alternative to methods currently in use for the analysis of this type of compounds. Due to the fact that creatine conversion to creatinine is influenced by temperature, time, and pH changes, one of the main objectives of this work has been to use the creatinine/creatine ratio as an indicator to assess the effectiveness of the heat treatment in cooked ham processes and the minimum time of ripening of dry-cured hams.

In addition to the changes occurred in compounds related to muscle metabolism, during the processing of dry-cured ham numerous physico-chemical and biochemical reactions, such as the intense proteolysis of the muscular proteins, take place. In relation to this, although there is evidence of the presence of oligopeptides at the end of dry-curing, the identity of these peptides still remained elusive. The present Thesis shows the identification for the first time of a large number of fragments generated from the hydrolysis of myofibrillar proteins like myosin light chain I, titin, and troponin T, and sarcoplasmic proteins like creatine kinase. Modern mass spectrometry-based proteomic approaches have been carried out to reach this objective.

Usun Yoon: *A mi me gustaría ser una intelectual prestigiosa como usted, ¿me podría dar un consejo?*

José Saramago: *¿Intelectual en qué área?, ¿en qué territorio?, ¿quieres ser qué?,...*

Usun Yoon: *Un poco de todo, en general.*

José Saramago: *Lo primero es aprender, aprender mucho... pero el consejo que yo daría tiene dos partes: la primera parte es no tener prisa, y la segunda es no perder tiempo.*

Entrevista de la presentadora Usun Yoon al Premio Nobel de Literatura José Saramago en 'EL INTERMEDIO'. Emisión del 2 de noviembre del 2009.

No puedo creer que ya hayan pasado cuatro años. Al final resultará cierto eso de que el tiempo pasa cada vez más deprisa... Durante estos cuatro años en el IATA puedo decir que he conseguido tres de las cosas más valorables en cualquier trabajo: aprender, emocionarme, y disfrutar. Por ello me gustaría agradecer a todas las personas que han compartido conmigo este tiempo su contribución a que el balance haya sido, finalmente, tan positivo:

Al Dr. Fidel Toldrá y al Dr. Miguel Ángel Sentandreu por todo el esfuerzo y tiempo dedicado. Gracias por la ayuda y apoyo que siempre me habéis dado.

Al Ministerio de Educación del Gobierno de España, por la beca FPU que ha hecho posible mi formación predoctoral, a los proyectos AGL-2004-05064-C02-01 y AGL-2007-65379-C02-01 del Ministerio de Ciencia e Innovación, así como al proyecto Agroalimed de la Consellería de Agricultura, Pesca, y Alimentación.

A los Drs. Marga Aristoy, Mónica Flores, y Jose Luís Navarro por estar ahí, siempre dispuestos a echar una mano.

Al personal técnico del Laboratorio de Carnes, M^a Pilar, M^a Angeles, y Maribel, y a todos los estudiantes de prácticas o proyectos fin de carrera, por su ayuda y buena relación durante estos años.

A mis compañeras y amigas Aleida, Eli, Alicia, Susana, Mónica, Aurora, Liliana, Milagro, y Natalia, por todo lo que he compartido con vosotras y espero continuar compartiendo.

A los Drs. Peter Bramley y Paul Fraser, por permitirme realizar mis estancias en su laboratorio de la Royal Holloway University of London (RHUL). Gracias por confiar en mí.

A Chris Gerrish y a todos mis compañeros, tanto de dentro como de fuera del laboratorio de la RHUL, por haberme acogido y tratado tan bien durante los ocho meses que compartimos.

A la Dra. Luz Valero, del Centro de Investigación Príncipe Felipe, por sus valiosos consejos, y por estar siempre dispuesta a ayudar y colaborar.

A mi familia, mis padres y mi hermana, por enseñarme a valorar lo que es realmente importante en la vida.

A mis amigos María, David, Sonso, Pablo, Paula, Nacho, Alicia, y Alberto, no solo por los momentos que hemos vivido, sino por escucharme, comprenderme, y estar siempre a mi lado.

A Lorena, Álvaro, María, Mari Carmen, Laurita, Juanan, y Quique, por nuestras quedadas que espero continúen por muchos años.

Y por último, y muy especialmente, a Pau, por su paciencia, cariño, y apoyo en esta última parte del recorrido. Mil gracias por este año que por poco no cabe en un libro, y por darme ese amor mochilero que tanto me gusta.

Por todo esto, muchas gracias a todos.

Leticia

ÍNDICE

I. Introducción.....	3
1. La carne de cerdo y sus principales productos.....	3
1.1. Relevancia socio- económica: Producción y consumo.....	3
1.2. Jamón curado.....	6
1.2.1. Tipos de productos.....	6
1.2.2. Importancia del proceso de elaboración.....	8
1.2.3. Características de calidad.....	10
1.2.3.1. Color.....	10
1.2.3.2. Textura.....	10
1.2.3.3. Aroma y sabor.....	10
1.3. Jamón cocido.....	11
1.3.1. Tipos de productos.....	11
1.3.2. Importancia del proceso de elaboración.....	12
1.3.3. Características de calidad.....	15
1.3.3.1. Color.....	15
1.3.3.2. Textura.....	15
1.3.3.3. Aroma y sabor.....	15
1.4. Principales cambios bioquímicos en los procesos de elaboración del jamón.....	16
1.4.1. Proteolisis.....	16
1.4.1.1. Principales enzimas implicadas.....	16
1.4.1.2. Proteolisis en la carne de cerdo.....	20
1.4.1.3. Proteolisis en jamón curado y jamón cocido.....	22
1.4.2. Lipólisis.....	26
1.4.3. Glucólisis.....	28
1.4.4. Transformación de nucleótidos.....	30
1.4.5. Otros cambios debidos a reacciones químicas.....	32

1.4.5.1. Degradación y oxidación de lípidos.....	32
1.4.5.2. Reacciones de Maillard.....	33
1.4.5.3. Reacciones de Strecker.....	34
2. Compuestos bioquímicos marcadores de calidad en carne y productos cárnicos.....	34
2.1. Nucleótidos y nucleósidos.....	34
2.2. Creatina y creatinina.....	36
2.2.1. Participación de la creatina en el metabolismo energético muscular.....	36
2.2.2. Generación de creatinina por tratamientos de calor.....	39
2.3. Dipéptidos naturales de la carne.....	40
2.4. Péptidos generados durante la proteólisis e influencia en el aroma y sabor.....	41
3. Métodos analíticos para la determinación de compuestos bioquímicos marcadores de calidad en carne y productos cárnicos.....	44
3.1. Compuestos derivados del metabolismo muscular.....	44
3.2. Péptidos en carne y productos cárnicos.....	45
3.2.1. Extracción.....	45
3.2.2. Separación.....	46
3.2.2.1. Ultrafiltración.....	46
3.2.2.2. Cromatografía de exclusión molecular.....	46
3.2.2.3. Electroforesis en gel.....	47
3.2.2.4. Electroforesis capilar.....	50
3.2.2.5. Cromatografía de fase reversa.....	50
3.2.2.6. Cromatografía de intercambio iónico.....	51
3.2.2.7. Cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC).....	52
3.2.3. Identificación y secuenciación.....	53
3.2.3.1. Secuenciación por degradación de Edman.....	54
3.2.3.2. Identificación por espectrometría de masas.....	55
3.2.3.2.1. Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	58

3.2.3.2.2. Espectrometría de masas MALDI- TOF/TOF..	59
3.2.3.2.3. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.....	61
4. Bibliografía.....	68
II. Objetivos.....	89
III. Resultados.....	93
Parte 1.- Determinación de creatina y creatinina como marcadores de calidad de los procesos de elaboración de jamón cocido y curado.....	93
Capítulo 1.- Determinación por cromatografía hidrofílica de carnosina, anserina, balenina, creatina y creatinina.....	101
Capítulo 2.- Contenido en creatina, creatinina y carnosina en músculos de cerdo de distinto tipo metabólico.....	121
Capítulo 3.- Efecto de las condiciones de cocción sobre la formación de creatinina en jamón cocido.....	139
Capítulo 4.- Evolución de creatina y creatinina durante el procesado de jamón curado.....	159
Parte 2.- Identificación de los péptidos generados durante el curado del jamón.....	177
Capítulo 5.- Péptidos pequeños generados de forma natural a partir de proteínas miofibrilares en jamón Serrano.....	183
Capítulo 6.- Oligopéptidos derivados de la degradación de la creatina quinasa en jamón curado.....	205
Capítulo 7.- Identificación de péptidos pequeños derivados de la troponina T en jamón curado.....	229
IV. Discusión general.....	251
V. Conclusiones.....	263

I. Introducción

I. Introducción

1. La carne de cerdo y sus principales productos

1.1. Relevancia socio-económica: producción y consumo

La carne y los productos cárnicos constituyen uno de los sectores con mayor participación en el patrón alimentario de los españoles. La industria cárnica, el cuarto sector industrial en España, alcanzó en el año 2008 una cifra de negocio de 18830 millones de euros, lo cual equivale a un 21% de todo el sector alimentario. Esta cifra supone prácticamente el 2% del producto interior bruto (PIB) total español y el 14% del PIB de la rama industrial (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, MAMR, 2009).

En cuanto al consumo de carne, en 1987 se consumían en torno a 67 kg de carne por persona, mientras que en 2008 el consumo rondaba los 64 kg (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, MAMR, 2009). A este respecto, el consumo de carne de cerdo es el que ha experimentado un mayor incremento en la última década, mientras que el consumo de pollo se ha reducido durante este periodo. La **Figura 1** muestra la importancia de los distintos tipos de carne, incluyendo las carnes frescas, congeladas y los elaborados cárnicos.

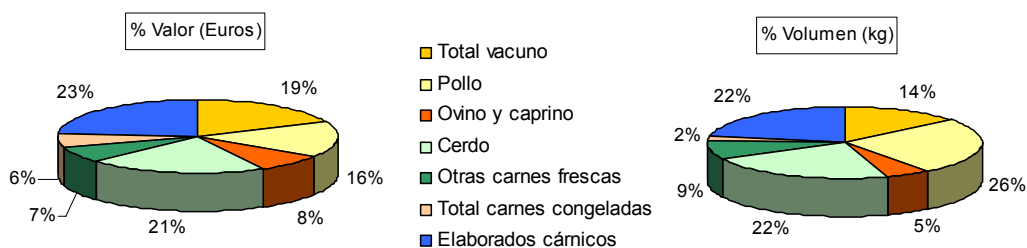


Figura 1. Importancia de la carne fresca, congelada, y de los elaborados cárnicos en el año 2008. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Gobierno de España, 2009.

Por lo que respecta a la Unión Europea (UE), se producen 22,8 millones de toneladas de carne de porcino al año, siendo el tercer productor de todo el mundo, por detrás de China y Rusia. Los principales países productores en 2007 fueron:

Alemania (16,9% de la producción), España (16,3%), Polonia (11%), Francia (9,4%) y Dinamarca (8,2%). Durante 2008, los precios de la carne de cerdo reflejaron de forma visible los altos precios de producción debido al aumento en el precio del pienso; sin embargo, en otoño del 2008 se produjo una notable bajada del precio influenciada por el impacto de la “crisis económica y financiera” sobre la demanda.

La población de la UE consume cada año unos 35 millones de toneladas de los diversos tipos de carne, lo que supone una media de aproximadamente 92 kg per cápita al año. De ellos, la carne de porcino aporta 44 kg, la de vacuno 20 kg y la de aves de corral 23 kg per cápita (Comisión Europea, Desarrollo Rural y Agricultura, 2009).

El consumo de carne de porcino y de aves de corral se benefició en cierta manera de la caída en la demanda de carne de vacuno debida a la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) a partir de 1996, pero también ha presentado un incremento continuo debido a su mayor competitividad con respecto a otras carnes, en parte como resultado de las reformas de la política agrícola común (PAC), que redujeron en esos años el precio de los cereales utilizados en los piensos.

Dentro del sector cárnico español, la producción y elaboración de productos curados ocupa una gran parte de la actividad empresarial, estando especialmente ligada a aquellas áreas donde cuenta con una gran tradición, que en muchos casos ha dado lugar a una Denominación de Origen Protegida (DOP) o una Indicación Geográfica Protegida (IGP). La DOP Guijuelo es la marca de calidad de jamón que tiene unas mayores cifras de producción y comercialización dentro de los de Ibérico y que, además, lleva a cabo una amplia campaña de promoción de su producto. Esta marca de calidad destina el 90% de su producción al mercado nacional, el 7% a países de la Unión Europea, y el 3% restante a otros mercados (ver **Figura 2**).

En general, desde el año 2000, la producción de piezas curadas en España ha estado en constante crecimiento, estancándose en los últimos años. Este crecimiento fue posible debido al fomento en las exportaciones, cristalizado en la apertura de nuevos mercados como el de Estados Unidos en 2005, que animaron al sector productor ante la esperanza de poder llegar con sus productos a nuevos consumidores. Lamentablemente, con el paso de los años se ha visto que el impulso

inicial no se ha correspondido con la rápida apertura de estos nuevos mercados. Finalmente, cabe destacar que cerca del 88% de la producción de jamones en España está ligada a la producción de jamones y paletas de cerdo blanco, aunque poco a poco van siendo más las piezas que se producen de jamón Ibérico.

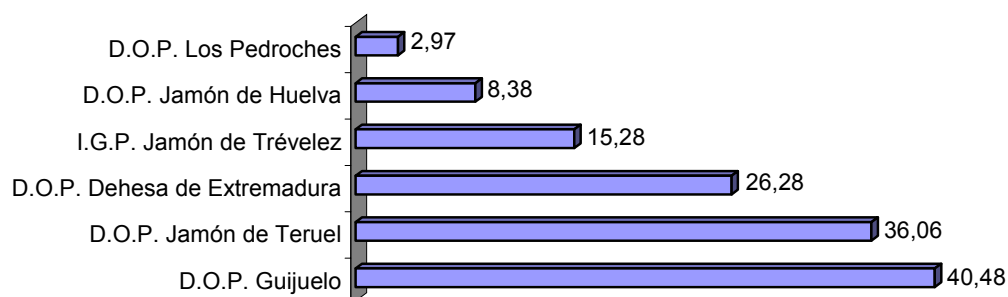


Figura 2. Valor económico de las marcas de calidad de jamones en 2007 (millones de euros). Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.

El consumo de elaborados cárnicos, como el jamón curado o cocido, se ha visto especialmente incrementado en España durante los últimos años debido a cambios en la actitud de los consumidores, los cuales dan prioridad a factores como la calidad, salud, e imagen. De hecho, el consumo de Ibéricos en 2008 alcanzó los 38 millones de kilos, siendo el consumo en el último trimestre del año el triple con respecto a los meses precedentes. Como puede observarse en la **Figura 3**, cinco de cada diez kilos consumidos de productos cárnicos Ibéricos corresponden a jamón curado.

La carne lleva mucho tiempo formando parte importante de la dieta europea y constituye una fuente de proteínas de alta calidad para satisfacer las necesidades de los consumidores europeos. Además de las características nutricionales, las apetecibles y únicas características de aroma y sabor especialmente en el caso de los productos cárnicos curados o cocidos, constituyen un valor añadido importante para su consumo. Tanto los péptidos y aminoácidos libres de la carne como aquellos que se generan durante el procesado de los productos cárnicos, están directamente relacionados con la generación del aroma y sabor de estos alimentos; sobre este

tema se ha realizado una labor de investigación muy intensa durante las últimas décadas (Toldrá, 2002; Sentandreu et al., 2003).

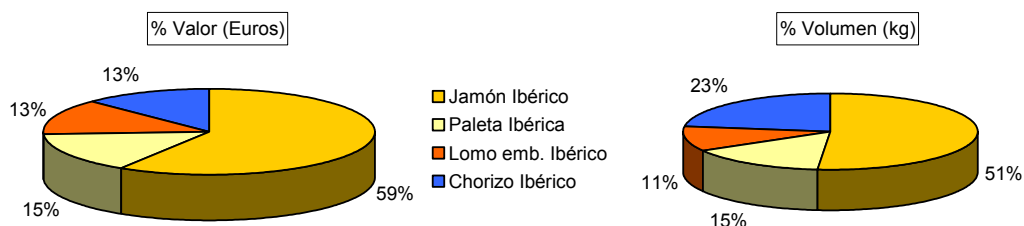


Figura 3. Importancia de los productos Ibéricos en el año 2008. (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Gobierno de España, 2009).

1.2. Jamón curado

1.2.1. Tipos de productos

Existen numerosas variedades de jamón curado, dependiendo de la genética, el tipo de alimentación, las condiciones de la cría, el tipo de procesado, y la región o país de origen. En el mundo se producen muchos tipos diferentes de jamón curado, pudiéndolos agrupar en cuatro grandes regiones: el área mediterránea, el norte de Europa, América y China.

Jamones curados del área mediterránea: Estos jamones se caracterizan principalmente por periodos de curado muy largos y por la ausencia del ahumado y la cocción en su proceso de elaboración. Es importante destacar cuatro Denominaciones de Origen principales de jamón Ibérico: Dehesa de Extremadura, Guijuelo, los Pedroches, y Jabugo. El *Real Decreto 1469/2007, del 2 de noviembre del 2007, por el que se aprueba la Norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo Ibéricos* (BOE, 2007), establece tres designaciones obligatorias: el tipo de producto, la designación racial (Ibérico puro e Ibérico), y el tipo de alimentación (de bellota, de recebo, de cebo de campo, y de cebo, ver **Tabla 1**).

El jamón Serrano, por el contrario, se produce en toda España bajo control de la Fundación Jamón Serrano, existiendo tres tipos principales dependiendo del tiempo de curado: reserva, gran reserva, y bodega. También existe una Denominación de Origen (Teruel) y una Especialidad Tradicional Garantizada (Trévez) para el jamón

blanco. En Francia destaca el jamón de Corsica y el de Bayonne, aunque su producción es muy escasa. Los jamones de Parma se producen en el noroeste de Italia, mientras que los San Danielle son característicos del noreste de Italia. En ambos casos el tiempo de curado mínimo es de doce meses.

Tabla 1. Designaciones en relación al tipo de alimentación de los productos objeto de *Real Decreto 1469/2007, del 2 de noviembre del 2007, por el que se aprueba la Norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo Ibéricos* (BOE, 2007).

	Tipo de alimentación			
	Bellota	Recebo	Cebo de campo	Cebo
Alimentación	Bellotas, hierba, y recursos naturales de la dehesa	Mínimo peso en montanera y cebo con pienso	Pienso y estancia mínima de 60 días en campo	Pienso
Peso medio entrada montanera	92 - 115 kg	92 - 115 kg	92 - 115 kg	—
Entrada montanera	01 - Oct. / 15 - Dic.	01 - Oct. / 15 - Dic.	—	—
Reposición en montanera	Mínimo 46 kg Mínimo 60 días	Mínimo 29 kg Mínimo 60 días	—	—
Sacrificio	15 - Dic. / 15 - Abril	15 - Dic. / 15 - Mayo	—	—
Edad sacrificio	14 meses	14 meses	12 meses	10 meses
Peso sacrificio	117 kg peso medio 108 kg peso mínimo individual			
Carga ganadera	2 cerdos / hectárea	2 cerdos / hectárea	15 cerdos / hectárea	—

Jamones del norte de Europa: Los tiempos de procesado de estos jamones son mucho más cortos que los del área mediterránea, siendo ahumados y cocidos antes de su consumo. Algunos ejemplos son el jamón Fenalår y el Spekeskinke de Noruega y los alemanes Westphalian y Katenschinken.

Jamones de América: Estos jamones pasan por un salado, postsalado durante un mes, y ahumado en su proceso de elaboración. Normalmente se consumen tras cocinarlos (fritos, en el horno, etc.). Los más conocidos, tipo Country-style, se producen en Kentucky y Virginia.

Jamones de China: La producción de jamones en China ha aumentado considerablemente en los últimos años. Buenos ejemplos son los jamones Yinghua, tradicionales del distrito de Jinhua, una región muy montañosa; los jamones Xuanwei, de la provincia de Yunnan, característica por su altitud; y los jamones Rugao, de la provincia de Jiangsu.

1.2.2. Importancia del proceso de elaboración

La elaboración de jamón curado ha constituido desde tiempos inmemoriales una forma de conservación de los jamones mediante el salado y posterior secado. Actualmente, se busca obtener un producto con un alto valor añadido, seguro, sin defectos y apreciado por sus características sensoriales típicas. El producto que se obtiene al final del proceso viene condicionado por la materia prima utilizada y por el proceso tecnológico aplicado. Existen distintas tecnologías de fabricación de jamón curado pero básicamente todas ellas pretenden, por una parte, estabilizar el producto para que pueda mantenerse a temperatura ambiente sin peligro para la salud ni riesgo de alteración y, por otra, facilitar el desarrollo de sus características sensoriales.

El proceso de elaboración del jamón curado se resume en la **Figura 4**. El efecto de la materia prima sobre la calidad del producto final es muy importante, influyendo factores como la edad de los cerdos en el momento del sacrificio, el pH, la cantidad de grasa, y el peso del jamón. La edad de los cerdos puede afectar a la actividad enzimática, al color, a la cantidad de grasa, y a la resistencia de los músculos a las tensiones del secado (Whipple y Koohmaraie, 1992; Huff-Lonergan et al., 1995). El pH de la carne constituye otro parámetro importante que afecta a la maduración del jamón (Watanabe y Devine, 1996; Beltrán et al., 1997), recomendándose evitar aquellos jamones con $\text{pH} > 6,2$ por razones de seguridad microbiológica, con el fin de mejorar la salazón y evitar problemas de aspecto y de textura blanda. La eliminación de la sangre residual de las venas y arterias es recomendable para disminuir posibles problemas microbiológicos y de aspecto al corte. Así pues, para facilitar la penetración de las sales de curado y eliminar los residuos de sangre todavía presente en venas y arterias se efectúa un masaje con una mezcla que suele contener sal, nitrato y nitrito. La sal contribuye a la disminución de la actividad de agua, a la solubilización parcial de las proteínas miofibrilares, y al sabor característico de este tipo de productos. El nitrato está presente a niveles muy bajos de forma natural en carne y ha sido un agente nitrificante muy utilizado en productos de larga maduración, ya que se va transformando en nitrito por acción bacteriana. El

nitrito actúa como agente conservante y contribuye a la formación y estabilización del característico color rojo del jamón gracias a la formación de la nitrosomioglobina.

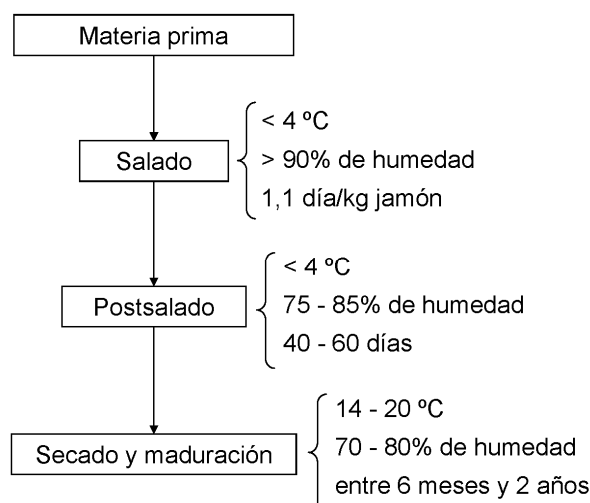


Figura 4. Diagrama de flujo de la elaboración del jamón curado con las condiciones ambientales óptimas de cada etapa del proceso.

El recubrimiento con sal debe realizarse tan pronto como la temperatura alcance un valor entre 1 y 3 $^{\circ}\text{C}$, ya que con ello se logra inhibir el crecimiento de bacterias indeseables. En los países mediterráneos se utiliza el salado por vía seca, mientras que en el norte de Europa es común también el salado en salmuera. El salado por vía seca se puede realizar utilizando dos metodologías distintas: salando los jamones por recubrimiento de sal, lo que se hace durante un tiempo aproximado de 1,1 día/kg para los jamones refrigerados y de algunos días menos para los congelados, y el salado mediante una cantidad de sal proporcional al peso de jamón, donde permanece horizontalmente durante un periodo de 3 - 4 semanas, favoreciéndose la penetración de la sal y la salida de agua del interior.

La finalidad de la etapa de postsalado es conseguir un reparto homogéneo de la sal por todo el jamón al tiempo que se logra una ligera deshidratación. Para obtener un secado regular, la cantidad de agua que se evapora debe estar compensada por la difusión de agua del interior al exterior del jamón. Las condiciones óptimas de

temperatura y humedad para cada etapa se encuentran descritas en la **Figura 4**. Durante el proceso de elaboración del jamón curado, las etapas de secado y maduración tienen gran importancia. En esta fase del proceso se intenta conseguir la total estabilización del jamón mediante la exposición progresiva a temperaturas más elevadas y humedades relativas más bajas. Durante esta etapa el jamón sigue deshidratándose y, además, con la elevación de la temperatura se pretende favorecer las reacciones de formación de compuestos responsables del sabor y aroma típico del jamón como son la proteólisis e hidrólisis en general y la autooxidación de lípidos, de las que se hablará más adelante.

1.2.3. Características de calidad

1.2.3.1. Color

El característico color rojo brillante del jamón curado es debido a la formación de nitrosomioglobina, que se genera tras la reacción del óxido nítrico con la mioglobina. La intensidad del color rojo aumenta tanto con la concentración de mioglobina, la cual es mayor en músculos de metabolismo oxidativo (Aristoy y Toldrá, 1998), como con la edad del animal (Rosell y Toldrá, 1996). Sin embargo, durante la última década, numerosos estudios se han centrado en desvelar el mecanismo por el que los jamones de Parma desarrollaban su característico color rojo sin haber añadido otra cosa que sal (Parolari, 1996). El pigmento rojo Zn-protoporfirina IX parece ser el responsable, ya que se trata del pigmento mayoritario encontrado en este tipo de jamones y actúa reemplazando el hierro por zinc en la molécula de hemoglobina (Parolari et al., 2009).

1.2.3.2. Textura

La textura en el jamón curado depende del grado de secado (la pérdida de humedad que haya sufrido), el alcance de la proteólisis (grado de hidrólisis de las proteínas miofibrilares), y del contenido en tejido conectivo (Tabilo et al., 1999). De hecho, se ha observado que las principales proteínas estructurales (titina, nebulina o troponina T) se degradan totalmente durante el curado, mientras que la cadena pesada de miosina y la α -actinina son hidrolizadas en menor grado (Toldrá y Etherington, 1988;

Monin et al., 1997). El contenido en grasa intramuscular también influye positivamente en la textura y apariencia del jamón (Fernández et al., 2000).

1.2.3.3. Aroma y sabor

El sabor en el jamón curado se asocia principalmente con los compuestos no volátiles como los aminoácidos libres y los péptidos pequeños que se acumulan al final del proceso de curado, mientras que el aroma se asocia con la generación de compuestos volátiles.

La hidrólisis de las proteínas y de los lípidos, conocida como proteólisis y lipólisis respectivamente, representan dos de los más importantes fenómenos enzimáticos que ocurren durante el curado, siendo responsables de la generación de compuestos que influyen directamente sobre el sabor y aroma del producto final (Flores et al., 1998a; Toldrá y Flores, 2007). La influencia de ambas reacciones sobre las características finales del jamón curado se describe más adelante.

1.3. Jamón cocido

1.3.1. Tipos de productos

El jamón cocido se produce a partir del despiece total o parcial de los miembros posteriores de los cerdos, separados de la semicanal en un punto no anterior al externo del hueso de la cadera, excluyéndose expresamente la carne triturada o picada, y con un tratamiento térmico suficiente para lograr la coagulación de las proteínas cárnicas y asegurar que se mantenga inalterado en condiciones de almacenamiento y conservación.

Se trata de uno de los pocos productos cárnicos que goza de Norma Específica de Calidad, a pesar de lo cual existe en el mercado una gran diversidad de productos con calidades y precios muy dispares.

Los jamones cocidos pueden ser clasificados en función de la carne utilizada para su procesado, la composición de la salmuera (uso de fosfatos, almidones, o carragenatos), el rendimiento tecnológico (desde el 85% al 110%), y su forma de presentación (con hueso, sin hueso, a piezas, entero, etc.). Por otro lado, según la *Orden del 29 de junio de 1983, por la que se aprueban las Normas de calidad para el*

jamón cocido, los jamones cocidos pueden clasificarse en distintas categorías en función de sus características de composición y de calidad: jamón cocido extra, jamón cocido I, o fiambre de jamón II. La **Tabla 2** muestra una comparativa entre la categoría extra, primera y segunda en jamón cocido.

Tabla 2. Categorización comercial de los productos objeto de la *Norma de calidad para jamón cocido y fiambre de jamón* (BOE, 1983).

Parámetros analíticos	Tipo de producto		
	Categoría extra Jamón cocido extra	Categoría primera Jamón cocido I	Categoría segunda Fiambre de jamón II
Proteína cárnica sobre la total	—	—	Mínimo 14% (15% con proteína añadida)
Relación humedad/proteína	4.13	4.68	—
Azúcares (expresados como glucosa)	Máximo 1,5%	Máximo 2%	Máximo 3%
Proteínas añadidas	Ausencia	Ausencia	máximo 1%
Agar-agar, alginatos y carragenatos	Máximo 0,2%	Máximo 0,5%	Según lista positiva de aditivos
Reacción del almidón	Negativa	Negativa	Máximo 2,5%
Fosfatos totales	Máximo 7500 ppm	Máximo 7500 ppm	Máximo 7500 ppm

1.3.2. Importancia del proceso de elaboración

En los últimos cuarenta años la tecnología de producción del jamón cocido ha estado sometida a numerosas investigaciones que han dado lugar a notables modificaciones en los procesos de producción. Para conseguir productos de calidad se hace necesario que las mejoras en las instalaciones y equipos vayan acompañadas de una adecuación de los métodos de elaboración y control de calidad.

En la elaboración de jamón cocido, la adecuada elección de la materia prima es fundamental para la obtención de un producto óptimo. En este sentido hay dos factores a tener en cuenta: las características microbiológicas de la materia prima, y la aptitud tecnológica de la carne para el tratamiento al que va a ser sometida. El valor de pH resulta de esencial importancia en la evaluación de esta aptitud, ya que este dato permite predecir la capacidad de retención de agua de la carne (CRA), de la que dependerán las pérdidas por cocción y la jugosidad final del jamón. Así pues, para la elaboración de productos cocidos sólo deben seleccionarse piezas con pH entre 5,8 y 6,2. Los jamones con estos valores de pH cuentan con una buena CRA, proporcionando una textura blanda y jugosa y un buen rendimiento en la fabricación.

El diagrama de flujo del proceso de elaboración de jamón cocido se muestra en la **Figura 5**. Durante el recorte, además de dar forma al jamón cocido, se corta el tejido conjuntivo que se encuentra alrededor de los distintos músculos, facilitando la salida al exterior de las proteínas con el fin de proporcionar una mejor adherencia de las porciones. Los componentes de la salmuera que se van a introducir en las piezas de jamón variarán en función del tipo de jamón que vayamos a realizar y del peso y las características de éste (según la *Norma de calidad para el jamón cocido*, ver **Tabla 2**).

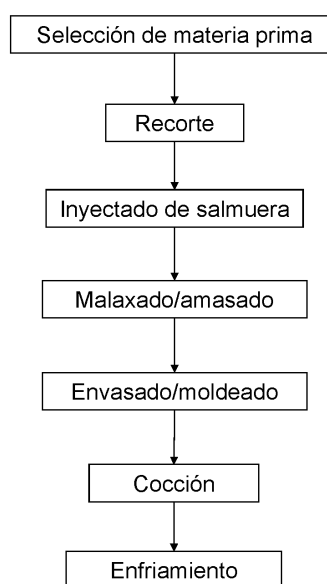


Figura 5. Diagrama de flujo de la elaboración de jamón cocido.

La sal, que puede ir acompañada de azúcares como la glucosa o sacarosa, es el principal ingrediente de la salmuera, siendo la cantidad a añadir en torno al 2%. El nitrito es añadido como principal agente conservante. La generación de óxido nítrico a partir del nitrito, además de asegurar la conservación, contribuye a la formación del típico color rosado de estos productos a través de la formación del nitrosohemocromo (Chasco et al., 1996; Arneth, 1998). El ascorbato sódico puede ser añadido con el fin de asegurar la desaparición rápida de los nitritos y así evitar la

generación de nitrosaminas. Finalmente, también pueden añadirse fosfatos, polifosfatos o pirofosfatos con el objetivo de aumentar la CRA, aunque las cantidades de estos compuestos están reguladas y controladas. Los fosfatos aumentan el pH del jamón y su fuerza iónica, aumentando también la capacidad captadora y fijadora de agua, influenciando favorablemente en el rendimiento y jugosidad de las piezas (Sun, 2009). La salmuera puede ser inyectada en la pieza de carne mediante diversos métodos (inmersión en salmuera, inyección, etc.), siendo el más empleado el de inyección, que consiste en inyectar la salmuera directamente mediante un sistema de agujas huecas. La etapa de malaxado/amasado permite aumentar la blandura, jugosidad y cohesión del jamón cocido, así como el rendimiento del producto, ya que tanto el amasado como el malaxado inducen la extracción de las proteínas solubles en sales (actina y miosina), que coagulan durante el calentamiento e influyen positivamente sobre la consistencia. En el proceso de elaboración de jamón cocido, la etapa de cocción es fundamental y tiene como finalidad alcanzar cuatro grandes objetivos (Toldrá et al., 2010):

- la coagulación de las proteínas, para lo que es necesaria una temperatura de calentamiento en el centro del producto de al menos 72 °C,
- la inactivación de enzimas, que tiene lugar generalmente entre 60 y 75 °C,
- el desarrollo de las características organolépticas deseadas,
- la reducción del número de microorganismos.

Todo esto hace indispensable un adecuado control de calidad en esta fase del proceso de manera que se pueda asegurar la calidad tanto sensorial como microbiológica del producto. La importancia del desarrollo de métodos rápidos, eficientes y no destructivos de control de calidad en las etapas clave del procesado de jamones, tanto curados como cocidos, es trascendental para poder asegurar la calidad final del producto.

1.3.3. Características de calidad

1.3.3.1. Color

Al igual que ocurre con el jamón curado, el jamón cocido destaca por tener un color rosáceo como consecuencia de la adición de nitritos. El nitrito es reducido a óxido

nítrico, el cual reacciona con la mioglobina formando nitrosomioglobina, que es la que da el color rojizo. Este color cambia de rojo a rosa durante el proceso de cocción, especialmente a temperaturas superiores a 65 °C, debido a la formación de nitrosohemocromo, que da una coloración rosa claro (Chasco et al., 1996; Arneth, 1998).

1.3.3.2. Textura

La textura de los jamones cocidos depende de factores como el contenido en humedad, la presencia de tejido conectivo, el tratamiento térmico y el grado de hidrólisis al que hayan llegado las proteínas miofibrilares. Por otro lado, algunos factores del proceso como la etapa de enfriamiento, pueden afectar a la jugosidad, la textura global, la aceptabilidad y el color (Desmond et al., 2000). Finalmente, también se ha estudiado la influencia del genotipo del cerdo sobre la calidad final del jamón cocido, obteniéndose jamones mucho más secos, duros y correosos a partir de cerdos nn que los producidos a partir de cerdos NN o Nn (Fernández et al., 2002).

1.3.3.3. Aroma y sabor

El jamón cocido experimenta numerosos cambios bioquímicos durante su elaboración como consecuencia de reacciones enzimáticas como la proteólisis y la lipólisis aunque, en este tipo de productos, las enzimas responsables tienen un tiempo de acción muy corto.

La elevada actividad de agua y el bajo contenido en sales del jamón cocido hace que las condiciones sean muy favorables para la proteólisis, aunque también es cierto que las enzimas musculares son sensibles a temperaturas mayores de 50 °C, lo que provoca su rápida inactivación durante la cocción (Toldrá et al., 1992a). La lipólisis también se ve favorecida por las condiciones existentes en este producto antes de la etapa de cocción, especialmente por la proximidad de su valor de pH a la neutralidad. Un mayor tiempo de reposo permite una acción enzimática más prolongada, liberándose una mayor cantidad de aminoácidos y ácidos grasos, los cuales actuarán como sustratos de reacciones químicas como las reacciones de Strecker, de las que se hablará más adelante en el apartado 1.4.5.3. Como ocurre en el caso de las

peptidasas, las lipasas también se inactivan durante la etapa de cocción. Otras reacciones químicas, como las reacciones de Maillard, más detalladas en el apartado 1.4.5.2., se ven aceleradas durante la cocción, y también contribuyen a la generación de compuestos volátiles aromáticos. En este sentido, el alcance y las características del aroma y sabor generados dependerán del tiempo y la intensidad del calentamiento (Toldrá y Flores, 2007).

1.4. Principales cambios bioquímicos en los procesos de elaboración del jamón

Las principales reacciones bioquímicas que tienen lugar en el jamón durante su procesado son fundamentalmente de tipo enzimático, destacando la hidrólisis de las proteínas musculares (conocida como “proteolisis”), la hidrólisis de triglicéridos y fosfolípidos (conocida como “lipólisis”), y, en menor medida, la hidrólisis de glúcidos (“glucólisis”) y la transformación de nucleótidos. También tienen lugar reacciones químicas como son las reacciones de Maillard, las degradaciones de Strecker o las oxidaciones. Estos tipos de reacciones contribuyen al desarrollo del sabor y aroma del producto final y ocurren de forma simultánea y con mayor o menor intensidad dependiendo de las características del proceso (Flores et al., 1998b).

1.4.1. Proteolisis

1.4.1.1. Principales enzimas implicadas

La proteolisis es un proceso en el que están implicadas fundamentalmente las propias enzimas musculares, afectando tanto a las proteínas sarcoplásmicas como miofibrilares. El músculo esquelético contiene una gran variedad de enzimas que son responsables de la mayoría de los cambios bioquímicos observados durante el procesado de la carne y de los productos cárnicos. Algunas de las principales enzimas musculares se asocian con la hidrólisis de las proteínas (endopeptidasas) y con la generación de péptidos pequeños y aminoácidos libres (exopeptidasas) (Toldrá y Aristoy, 2010).

Las enzimas proteolíticas más estudiadas en relación con la hidrólisis de proteínas son la μ -calpaína (EC 3.4.22.52) y m-calpaína, (EC 3.4.22.53), las catepsinas B (EC

3.4.22.1), H (EC 3.4.22.16), L (EC 3.4.22.15) y D (EC 3.4.23.5), el proteasoma (EC 3.4.99.46), y, más recientemente, las caspasas.

Las catepsinas B, H, y L son cisteín peptidasas, mientras que la catepsina D es una aspartil peptidasa. Estas enzimas son de pequeño tamaño, en el intervalo de 20 a 40 kDa, de manera que una vez liberadas penetran fácilmente en la estructura miofibrilar. Son activas a pH ácido (pH 3 – 5 para la catepsina D), ligeramente ácido (alrededor de 6 para las catepsinas B y L), e incluso neutro (6.8 para la catepsina H) a 30 – 40 °C (Rico et al., 1991a y 1991b; Matsuishi et al., 2003; Godiksen et al., 2009). La presencia de estas enzimas en el músculo esquelético se ha demostrado mediante técnicas citoquímicas, inmunocitoquímicas, o por inmunofluorescencia (Okitani et al., 1981; Okitani et al., 1988; Al-Jassabi, 2000; Matsuishi et al., 2003). Las cisteín peptidasas necesitan un ambiente reductor para expresar su máximo de actividad. La glicólisis anaeróbica en el músculo postmortem sería, por tanto, un ambiente adecuado para la actividad de las catepsinas (O'Halloran et al., 1997).

Las calpaínas son un grupo de cisteín endopeptidasas que se encuentran en el citosol y, muy especialmente, en la región del disco Z. La μ -calpaína y la m-calpaína requieren 50 – 70 μ M de Ca^{2+} y 1 – 5 mM de Ca^{2+} respectivamente para su activación, y muestran su actividad máxima a pH neutro (alrededor de 7,5), mientras que son inefectivas a pH 5,5 – 6,0 (Etherington, 1984). La existencia de calpastatina, un inhibidor específico de estas enzimas, regula la actividad de las calpaínas en el músculo postmortem. Comparado con otras especies, el músculo de cerdo es el que presenta los niveles más bajos de calpastatina (Ouali y Talmant, 1990). Este inhibidor se inactiva por autólisis a los pocos días tras el sacrificio (Koochmaraie et al., 1987)

El proteasoma (EC 3.4.99.46) es un complejo enzimático de numerosas subunidades, con una masa molecular en torno a los 700 kDa. Se trata de una proteína muy abundante que puede llegar a representar hasta el 1% de la proteína soluble en la célula (Rivett y Sweeney, 1991). Tiene un intervalo de pH óptimo entre 7 y 9, dependiendo de la reacción que catalice (Djaballah y Rivett, 1992). Su función en el músculo está relacionada con la regulación del recambio de las proteínas

musculares, aunque ciertos resultados indican que el proteasoma no degrada miofibrillas intactas (Goll et al., 1991).

Las caspasas son un grupo de enzimas perteneciente al grupo de las cisteín-peptidasas con una especificidad de sustrato limitada a la hidrólisis de aquellos enlaces peptídicos que contienen un ácido aspártico en posición P1. La familia de las caspasas está compuesta por catorce proteínas de las que once se han encontrado en la especie humana. Esta familia de peptidasas está involucrada en el desarrollo de la apoptosis o muerte celular, y en la activación de citoquinas proinflamatorias (Earnshaw et al., 1999). El interés por el estudio de este grupo de enzimas ha surgido a partir de un nuevo modelo propuesto recientemente donde se postula la acción de estas enzimas durante la proteólisis postmortem, contribuyendo su acción enzimática al desarrollo de la ternura de la carne (Ouali et al., 2006).

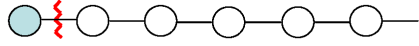
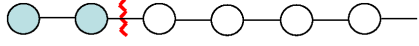
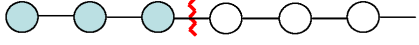
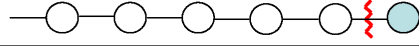

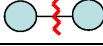

Los péptidos resultantes de la acción de las endopeptidasas anteriormente descritas son degradados posteriormente por la acción de las exopeptidasas, que hidrolizan las cadenas peptídicas a partir de sus extremos. En la **Tabla 3** se recogen las principales exopeptidasas.

De entre los principales grupos de exopeptidasas se distinguen:

- Las peptidasas (EC 3.4.14), responsables de la generación de di y tripéptidos según se trate de dipeptidilpeptidasas (DPP) o de tripeptidilpeptidasas (TPP), respectivamente. En ambos casos actúan a partir del extremo amino terminal de proteínas y polipéptidos, habiéndose descrito su acción durante el proceso de curado del jamón. Las enzimas TPP I, DPP I y DPP II se encuentran localizadas en el lisosoma y presentan su actividad óptima a pH ácidos (Sentandreu y Toldrá, 2000 y 2001a). Las TPP II y DPP III se encuentran en el citosol (Smyth y O'Cuinn, 1994; Sentandreu y Toldrá, 1998), y la DPP IV está unida a membrana (Sentandreu y Toldrá, 2001b). Estas enzimas presentan un pH de actuación óptimo cerca de la neutralidad y son muy estables, manteniendo su actividad incluso tras 15 meses de procesado, con excepción de la DPP II cuya actividad cesa después de los 8 meses (Sentandreu y Toldrá, 2001c).
- Las aminopeptidasas (EC 3.4.11) degradan la cadena peptídica a partir del extremo amino terminal liberando un aminoácido. Las arginil (RAP), leucil (LAP),

alanil (AAP), metionil (MAP) y piroglutamil (PGAP) aminopeptidasas se encuentran en el citosol y actúan a pH neutros (RAP y AAP) o básicos (LAP y PGAP), tal y como se muestra en la **Tabla 4** (Toldrá et al., 1992b; Toldrá et al., 1993a; Flores et al., 1996a; Flores et al., 1997a).

Tabla 3. Clasificación de las exopeptidasas en función de la reacción que catalizan. Las barras rojas indican el enlace peptídico susceptible de hidrólisis en cada caso. Los círculos azules indican los residuos que se liberan debido a la acción enzimática.

ENZIMAS	PÉPTIDOS
Aminopeptidasas	
Dipeptidilpeptidasas	
Tripeptidilpeptidasas	
Carboxipeptidasas	
Peptidildipeptidasas	
Dipeptidasas	
Tripeptidasas	

- Las carboxipeptidasas (EC 3.4.16-18) se encuentran localizadas en el lisosoma y presentan su actividad óptima a pH ácidos (ver **Tabla 4**) (Bodwell y Meyer, 1981). Estas enzimas actúan a partir del extremo carboxi terminal, siendo también responsables de la generación de aminoácidos libres, aunque han sido menos estudiadas en carne y productos cárnicos.
- Otras enzimas comunes pero menos estudiadas en carne y productos cárnicos son las peptidildipeptidasas (EC 3.4.15), que hidrolizan dipéptidos a partir del extremo carboxi terminal de polipéptidos, las dipeptidasas (EC 3.4.13), que actúan hidrolizando dipéptidos, y las tripeptidasas (EC 3.4.11), que lo hacen sobre el extremo amino o carboxi terminal de tripéptidos (Toldrá et al., 1997).

Tabla 4. Principales características de las amino y carboxipeptidasas en músculo de cerdo.

Enzima	Número EC	Clasificación	pH	Temperatura (°C)
Alanil aminopeptidasa	3.4.11.14	Cisteín/Metalo	6,5	37
Arginil aminopeptidasa	3.4.11.6	Cisteín/Metalo	6,5	37
Metionil aminopetidasa	3.4.11.18	Cisteín	7,5	40
Leucil aminopeptidasa	3.4.11.1	Metalo	9,0	45
Piroglutamil aminopeptidasa	3.4.19.3	Cisteín	8,5	37
Carboxipeptidasa A	3.4.16.1	Serín	5,2 - 5,5	37
Carboxipeptidasa B	3.4.18.1	Cisteín	5,0	37

1.4.1.2. Proteolisis en la carne de cerdo

Después del sacrificio, el músculo es objeto de numerosos cambios bioquímicos debido, entre otras razones, a que los sistemas enzimáticos continúan siendo activos. Estos cambios postmortem de las proteínas musculares se han estudiado principalmente durante el periodo de maduración de la carne con el fin de mejorar su calidad (Huff-Lonergan et al., 1995; Hwang et al., 2005; Koohmaraie y Geesink, 2006), ya que durante esta etapa las principales proteínas estructurales del músculo como la titina, nebulina, actina, y miosina, sufren una importante degradación, dando lugar a un aumento en la ternura de la carne (Lametsch et al., 2003). Este aumento en la ternura es el resultado de la pérdida de tensión y la rotura de las miofibrillas principalmente a nivel del disco Z (Taylor et al., 1995).

La maduración de la carne es un proceso muy variable que dependerá de factores biológicos tales como la edad, el sexo, o el tipo de músculo, y de las condiciones de procesado. De hecho, el manejo del animal antes del sacrificio y de la canal después del mismo, puede tener un efecto muy importante en la actividad de las enzimas musculares.

La acción de las catepsinas sobre el ablandamiento postmortem ha sido ampliamente estudiada, sugiriéndose que las catepsinas B, D, H y L podrían estar involucradas en la proteolisis del músculo. El lisosoma cuenta con una membrana lipoproteica que se mantiene intacta a los niveles de pH *in vivo* pero que se rompe al descender el pH durante el período postmortem o cuando el tejido sufre una lesión grave, quedando liberadas las enzimas. Las actividades de las catepsinas B y L

durante las primeras 8 horas postmortem se han relacionado positivamente con el ablandamiento de la carne de bovino (O'Halloran et al., 1997). La catepsina L hidroliza numerosas proteínas miofibrilares, incluyendo la troponina T, I y C, la nebulina, la titina y la tropomiosina, las cuales son degradadas durante el periodo de acondicionamiento postmortem junto con la miosina y actina en carne de conejo, pollo y vaca (Mikami et al., 1987).

Actualmente existen muchas evidencias que relacionan la actividad de las calpaínas con el ablandamiento de la carne de vaca, cordero y cerdo (Cena et al., 1992). Estudios de correlación en diferentes especies indican que las diferentes velocidades de ablandamiento de la carne (vaca < cordero < cerdo) están inversamente relacionadas con la ratio calpastatina/calpaína (vaca > cordero > cerdo) (Koochmaraie et al., 1991). Estudios *in vitro* en los que se han incubado proteínas miofibrilares con calpaínas, muestran patrones de degradación similares a los observados en músculo postmortem para las proteínas nebulina, titina, troponina T y desmina (Huff-Lonergan et al., 1996). La m-calpaína se activa en las primeras etapas postmortem (dentro de los primeros 3 días tras el sacrificio), momento en el que se produce la rotura de las proteínas miofibrilares clave (Taylor et al., 1995). La m-calpaína persiste durante más tiempo, ya que es más estable que la μ -calpaína en el músculo de todas las especies estudiadas (Sensky et al., 1996). Recientemente, la importancia de la μ -calpaína en la proteólisis postmortem ha sido puesta en evidencia a partir de observaciones en ratones knock-out, sugiriéndose que la μ -calpaína es la enzima más importante del sistema calpaína que participa en la proteólisis postmortem y el ablandamiento de la carne (Geesink et al., 2006). Hay suficientes evidencias experimentales que sugieren por un lado que las calpaínas son las principales responsables de la proteólisis postmortem que da lugar al ablandamiento de la carne, y por otro que el calcio provoca el debilitamiento de la línea Z al activar las calpaínas, ya que el aumento de la concentración de calcio produce una aceleración de la proteólisis (Koochmaraie, 1990).

Las caspasas pueden activarse inmediatamente después del sacrificio en condiciones de hipoxia e isquemia. Por ello, en los últimos años se ha planteado la hipótesis de que tras el sacrificio y desangrado del animal se podría iniciar la

activación de las caspasas y que, por tanto, estas enzimas podrían contribuir a la proteólisis postmortem y al consecuente ablandamiento de la carne (Ouali et al., 2006). En este sentido, se ha comprobado que las caspasas se expresan y permanecen activas en el músculo esquelético del cerdo vivo (Kemp et al., 2006a) y postmortem (Kemp et al., 2006b), pudiendo influir en la calidad de la carne como consecuencia de la hidrólisis de la calpastatina. Esto provocaría una mayor actividad de las calpaínas, lo que influiría en la tenderización disminuyendo la dureza de la carne. Por otro lado, también existen evidencias recientes de la hidrólisis de las proteínas musculares por acción directa de las caspasas (Huang et al., 2009).

1.4.1.3. Proteólisis en jamón curado y jamón cocido

La proteólisis constituye uno de los grupos de reacciones bioquímicas más importantes en la generación del aroma y sabor durante el procesado del jamón curado. La proteólisis tiene un gran impacto sobre la calidad del jamón curado ya que influye directamente sobre la textura por ser responsable de la hidrólisis de las proteínas miofibrilares y, además, contribuye en la generación de péptidos y aminoácidos libres que influyen directamente en el aroma y sabor del producto final, actuando también como sustratos en reacciones posteriores (Toldrá y Flores, 1998; Toldrá et al., 2000).

La evolución de la proteólisis depende del tipo de producto, la cantidad de enzimas musculares endógenas y las condiciones específicas del proceso. La primera etapa de la proteólisis consiste en la hidrólisis de las proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas por la acción de las endopeptidasas musculares (catepsinas, calpaínas, proteasoma y caspasas) para generar grandes polipéptidos, los cuales son posteriormente degradados en péptidos más pequeños y aminoácidos libres por la acción de exopeptidasas como las dipeptidasas, aminopeptidasas, y carboxipeptidasas (Toldrá y Aristoy, 2010), (Ver **Figura 6**).

En los productos cárnicos curados, el tiempo de maduración y procesado es mucho más largo que el de maduración de la carne, llegando hasta los 12 meses e incluso hasta los 24 meses en algunos casos. Esto hace que la rotura de la estructura miofibrilar sea mucho más intensa y completa, produciéndose cambios estructurales

muy importantes como la degradación de las cadenas pesadas y ligeras de la miosina, las troponinas C e I, etc., dando lugar a la aparición de una gran cantidad de aminoácidos libres y péptidos pequeños, menores de 1200 Da, que se relacionan con el aroma y sabor típicos de estos productos (Aristoy y Toldrá, 1995).

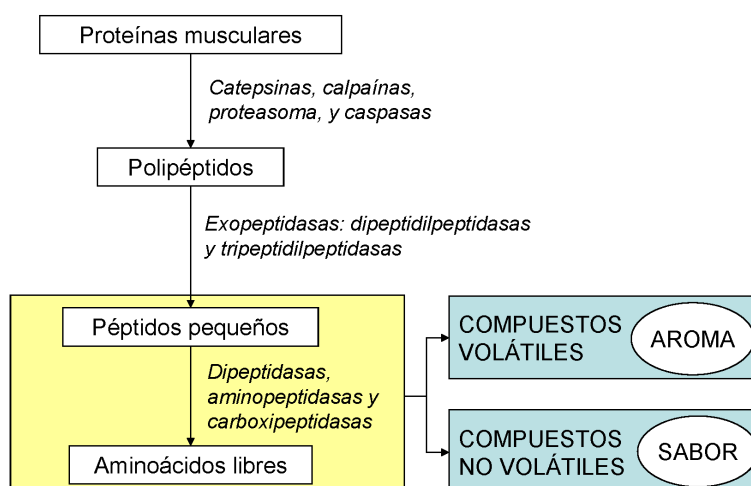


Figura 6. Esquema general de las principales etapas de la proteólisis con las enzimas más importantes que participan en el proceso de curado de jamón.

Las calpaínas tienen un pH de actuación próximo a la neutralidad. Durante el procesado del jamón sólo se detecta actividad de calpaínas en el jamón fresco y, en menor medida, durante la etapa de postsalado (Toldrá et al., 1993b). Estas enzimas son muy inestables, perdiendo su actividad a los 10 -14 días de postsalado (Rosell y Toldrá, 1996). Como se ha comentado en el apartado anterior, las calpaínas son capaces de hidrolizar la titina, la nebulina, las troponinas T e I, la tropomiosina y la desmina (Koochmaraie, 1994). Sin embargo, no son capaces de degradar la miosina, la actina, la troponina C ni la α -actinina (Goll et al., 1992).

Las catepsinas son enzimas lisosomales con un pH óptimo de actuación ácido (pH de 5,0 a 6,0). Están localizadas en el lisosoma y son de tamaño pequeño (20 – 50 kDa) (Sentandreu et al., 2002). Algunas catepsinas son particularmente relevantes

en el músculo esquelético, presentando especificidades de sustrato marcadamente diferentes entre ellas. En estudios realizados en jamón curado se ha observado que las catepsinas B, H y L permanecen activas durante todo el proceso de curado, mostrando una buena estabilidad incluso después de 15 meses de procesado, momento en el que todavía se detecta una actividad residual del 5 - 10% de la actividad inicial (Toldrá y Etherington, 1988). La catepsina D se inhibe en gran medida por el NaCl durante la maduración, aunque permanece activa hasta los 6 meses de procesado (Rico et al., 1990); sin embargo la actividad de las catepsinas B y L se afecta menos por la presencia de sal, obteniendo actividades del 70 - 80% de la actividad inicial a concentraciones del 4 - 5% de cloruro sódico (Rico et al., 1991b). Como se ha comentado más extensamente en el apartado anterior, ensayos *in vitro* han demostrado la habilidad de las catepsinas D y L para degradar proteínas miofibrilares como la titina, la cadena pesada de miosina, la actina, la tropomiosina, y las troponinas T e I, así como la degradación de la miosina y la actina por acción de la catepsina B (Goll et al., 1992). El proteasoma actúa a pH ligeramente alcalino, desconociéndose su estabilidad durante el procesado del jamón.

La acción combinada de calpaínas y catepsinas sobre las principales proteínas integrantes de la estructura del músculo, resulta en la rotura de las proteínas, lo que provoca un aumento de la terneza de la carne y la generación de grandes polipéptidos (Sentandreu et al., 2002; Lametsch et al., 2003; Nagaraj et al., 2005), tal y como se ha comentado en el apartado anterior.

La mayor parte de los aminoácidos libres que se generan durante el procesado del jamón curado son resultado de la acción de las aminopeptidasas (Toldrá et al., 1997). Se ha observado que la actividad de las aminopeptidasas musculares, incluyendo la alanil, arginil, leucil, tirosil y piroglutamil aminopeptidasas, presenta una estabilidad muy buena durante los primeros 8 meses de curado, aunque ésta se reduce considerablemente al final del proceso debido al efecto inhibitorio de la sal, la desecación, y la propia actividad proteolítica (Toldrá et al., 1992b). También se ha observado que la actividad de las aminopeptidasas se ve inhibida por la presencia de aminoácidos libres (Flores et al., 1998a), lo que explicaría las diferencias obtenidas en la concentración de aminoácidos libres dependiendo del tipo de proceso y de

producto. La alanil aminopeptidasa (EC 3.4.11.14) es responsable de más del 80% de la actividad total de las aminopeptidasas y actúa de forma específica sobre una amplia variedad de sustratos con enlaces aromáticos, alifáticos, y aminoácil básicos (Flores et al., 1996b). Se puede considerar que esta aminopeptidasa es la que desempeña el papel más relevante en la generación de aminoácidos libres durante el procesado del jamón curado. La metionil aminopeptidasa (EC 3.4.11.18) muestra también una amplia especificidad de sustrato, mientras que la arginil aminopeptidasa (EC 3.4.11.6) hidroliza principalmente aminoácidos básicos (Flores et al., 1996b). Otras aminopeptidasas presentes en el músculo esquelético de cerdo son la LAP (EC 3.4.11.1) y la PGAP (EC 3.4.19.3). La LAP cataliza la liberación de los aminoácidos leucina y metionina, así como otros aminoácidos hidrofóbicos, mientras que la PGAP muestra una elevada especificidad por el ácido piroglutámico en posición N-terminal (Toldrá et al., 1992a y 1992b; Toldrá et al., 2000).

Respecto a la generación de aminoácidos libres durante el procesado del jamón, los mayores incrementos se observan en los ácidos glutámico y aspártico, la alanina, la valina, la leucina, la arginina, y la lisina. La AAP podría ser la responsable de estos incrementos debido a su amplia especificidad de sustrato aunque la RAP contribuiría en la liberación de los aminoácidos básicos. La contribución de la leucil y la piroglutamil aminopeptidasa, a pesar de ser enzimas muy estables durante el proceso de curado, quedaría bastante restringida debido a que están presentes en el músculo de cerdo a niveles muy bajos y a que su pH básico de actuación queda alejado de los valores de pH del músculo postmortem (Toldrá et al., 2000). Las mayores concentraciones de aminoácidos libres se han detectado en jamones Ibéricos debido a sus largos tiempos de curado (más de 24 meses), mientras que las concentraciones más bajas se encuentran en jamones con tiempos de curado cortos (Toldrá y Flores, 1998).

Como se ha comentado anteriormente, en el jamón cocido la proteólisis no tiene tanta influencia sobre el sabor y aroma del producto final como en el caso del jamón curado. Durante el proceso de producción del jamón cocido se produce un importante aumento en el contenido de aminoácidos libres en general, aunque algunos de ellos se degradan durante el proceso (Toldrá et al., 2010). En este

sentido, la cocción puede afectar significativamente a las concentraciones de lisina, metionina, y, especialmente, el triptófano, que desaparece totalmente al final de la cocción. La glutamina también desaparece pero solo parcialmente. Tanto la alanil aminopeptidasa como la arginil aminopeptidasa pueden ser muy activas durante el tratamiento térmico, participando en la generación de aminoácidos libres, aunque la actividad de la alanil aminopeptidasa al final del proceso de cocción es muy baja, y la del resto de las aminopeptidasas es prácticamente indetectable (Toldrá et al., 1995). Los aminoácidos libres y péptidos pequeños generados durante esta intensa proteólisis son responsables en gran medida, junto a otros compuestos, del característico aroma y sabor tanto del jamón curado como del jamón cocido. Además, los aminoácidos constituyen el sustrato de nuevas reacciones químicas como las reacciones de Maillard y/o la degradación de Strecker (Flores et al., 1998b), que se describirán más adelante.

1.4.2. Lipólisis

La fracción lipídica muscular está constituida fundamentalmente por triglicéridos y fosfolípidos. La lipólisis consiste en la hidrólisis enzimática de los lípidos musculares o del tejido adiposo y se traduce en la generación de ácidos grasos libres. Estos ácidos grasos liberados van a servir de sustratos para una sucesión de reacciones oxidativas que en último lugar darán origen a una serie de compuestos aromáticos de gran importancia para el desarrollo del aroma y sabor característico del jamón curado. Pueden distinguirse dos tipos de lipólisis según los lípidos estén presentes en el interior del músculo o se encuentren en el tejido adiposo o capa externa de grasa visible. Los lípidos intramusculares constan esencialmente de triglicéridos y fosfolípidos. Ambos grupos de compuestos son los sustratos naturales de las lipasas (ácida lisosomal y neutra) y fosfolipasas musculares (A1, A2, C y D) (Motilva et al., 1993a), que van a ejercer su efecto hidrolítico liberando los ácidos grasos de las moléculas de triglicéridos y de fosfolípidos, respectivamente (ver **Figuras 7 y 8**).

El resultado final de la acción de ambos grupos de enzimas es la generación de numerosos ácidos grasos libres, tanto saturados como monoinsaturados y poliinsaturados (Motilva et al., 1993a), que en una segunda etapa generarán

compuestos volátiles como resultado de la oxidación química y/o enzimática, contribuyendo al aroma del producto. Las lipasas musculares muestran una gran estabilidad durante el curado, manteniendo su actividad incluso a los 15 meses de proceso, aunque la liberación de ácidos grasos se produce especialmente durante los primeros seis meses de proceso (Motilva y Toldrá, 1993).

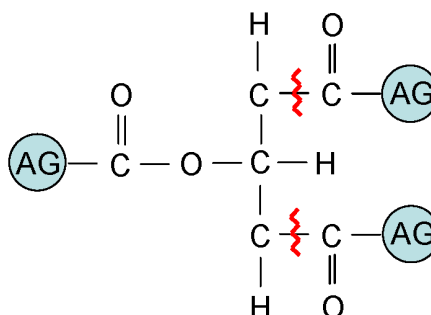


Figura 7. Mecanismo de actuación de las lipasas musculares.

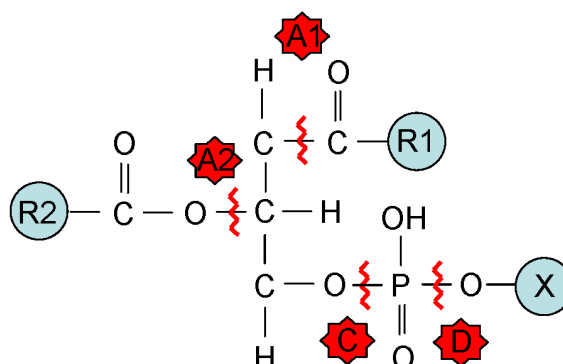


Figura 8. Mecanismo de actuación de las fosfolipasas musculares A1, A2, C y D.

Respecto de la lipólisis en el tejido adiposo, la lipasa sensible a hormona es la principal enzima responsable. Los lípidos que constituyen este tejido son en un 99%, triglicéridos y, derivado de la acción de esta enzima, se generan mono y diglicéridos y una gran cantidad de ácidos grasos libres. La principal actividad de estas enzimas

tiene lugar durante los primeros 8 - 10 meses de curado, coincidiendo con la máxima liberación de ácidos grasos como el esteárico y el oleico (Motilva et al., 1993b).

1.4.3. Glucólisis

La glucólisis es la secuencia de reacciones que transforman la glucosa en piruvato. Esta vía metabólica se encarga de oxidar o fermentar la glucosa para obtener energía de la célula. Además, la glucólisis también tiene su papel en la función anabólica formando precursores (moléculas de tres átomos de carbono) para la síntesis de ácidos grasos y aminoácidos. El piruvato formado en la glucólisis puede seguir varias rutas catabólicas distintas (ver **Figura 10**) (Lehninger, 2000).

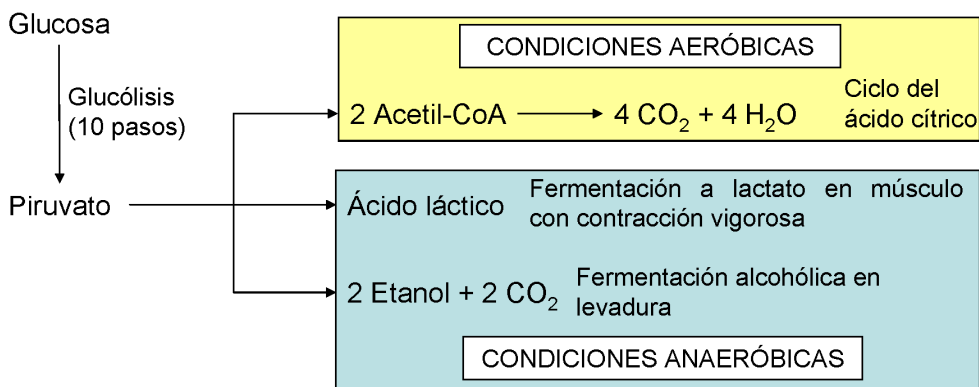


Figura 10. Los tres posibles destinos catabólicos del piruvato producido en la glucólisis. Adaptación del libro *Lehninger Principles of Biochemistry* (Lehninger, 2000).

En los organismos aeróbicos, la glucólisis sirve de preámbulo al ciclo del ácido cítrico y a la cadena de transporte electrónico, obteniendo la mayor parte de la energía de la glucosa. En estas condiciones, el piruvato es oxidado hasta CO₂ y H₂O mediante reacciones acopladas, generando 36 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa (Greaser, 1986).

Durante el periodo postmortem y en ausencia de oxígeno, la glucólisis anaeróbica es la única fuente de energía de las células del músculo para mantener la homeostasis (Gutiérrez, 1991). En estas condiciones de hipoxia, el NADH no puede ser reoxidado a NAD⁺, siendo este último el aceptor de electrones imprescindible para la oxidación

del piruvato. En esta situación, el piruvato se reduce a lactato, aceptando los electrones del NADH y regenerando así el NAD⁺ necesario para la continuación de la glucólisis. En esta vía se generan 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa. Por último, el piruvato puede convertirse en etanol y CO₂ por medio de la fermentación alcohólica (ver **Figura 10**) (Lehninger, 2000).

La glucólisis consiste en 11 pasos bien diferenciados descritos en la **Figura 11**. Las enzimas que participan en la glucólisis están presentes en el sarcoplasma, el cual contiene gránulos de glucógeno (se trata del almacén de glucosa en músculo) localizados cerca de la banda I. La liberación de glucosa a partir del glucógeno depende de la enzima glucógeno fosforilasa específica, la cual es activada por Ca²⁺, adrenalina y AMP. Una vez liberada la glucosa, las siguientes fases del metabolismo glucolítico son comunes independientemente del estado redox del tejido. Sin embargo, como ya hemos adelantado, prevalecen las reacciones anaeróbicas en la última vía, en la que el piruvato es reducido a lactato por el NADH por medio de la enzima lactato dehidrogenasa mientras que en condiciones aeróbicas el piruvato es descarboxilado a acetil-Co-A en las mitocondrias y luego oxidado hasta CO₂ en el ciclo del ácido cítrico. Los iones H⁺ generados son capturados y participan en la cadena de fosforilación oxidativa (Greaser, 1986).

El ácido láctico generado al final del ciclo de la glucólisis en condiciones anaerobias es el principal responsable de la bajada de pH de la carne postmortem. Cabe destacar que el perfil de dicha bajada está íntimamente relacionado con la incidencia de carnes pálidas, blandas y exudativas (PSE, del inglés 'pale, soft and exudative') y oscuras, firmes y secas (DFD, del inglés 'dark, firm and dry'). Así, una rápida acidificación causada por un metabolismo muscular acelerado en cerdos susceptibles a estrés, daría lugar a carnes PSE, mientras que una ausencia de azúcares/glucógeno mantendría el pH cercano a la neutralidad, dando lugar a carnes DFD (Battle et al., 2000; Scheffler y Gerrard, 2007).

1.4.4. Transformación de nucleótidos

El adenosín trifosfato (ATP) es la principal fuente de energía del músculo empleada en las reacciones bioquímicas. Inmediatamente después del sacrificio del animal, hay

un periodo de aparente estabilidad del ATP debido a su regeneración a partir de la fosfocreatina y de la glucólisis anaeróbica (Greaser, 1986).

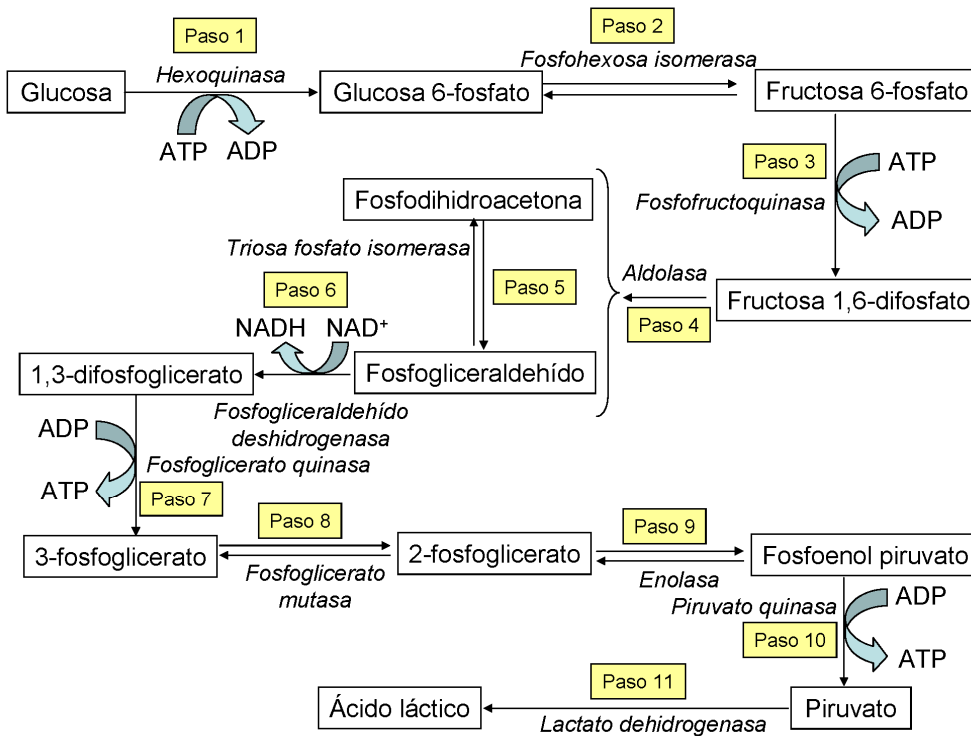


Figura 11. Principales pasos de la glucólisis y enzimas glucosidrolasas envueltas en la degradación de la glucosa. El paso 11 del esquema representa la fermentación a lactato del piruvato, propia de músculos con contracción vigorosa, eritrocitos y algunas células y microorganismos. Adaptación del libro *Lehninger Principles of Biochemistry* (Lehninger, 2000).

Una vez se agotan las reservas de fosfocreatina y glucógeno, o se inactivan las enzimas responsables de la formación del ATP, la concentración de ATP se reduce en pocas horas, pasando a formarse, mediante hidrólisis enzimática, adenosín difosfato (ADP) y adenosín monofosfato (AMP). A su vez, el AMP es desaminado enzimáticamente a inosín monofosfato (IMP), el cual se descompone de forma lenta en inosina (Ino) y, finalmente, en la base hipoxantina (Hx). También se forman por acción enzimática aunque en menor cantidad guanósín monofosfato (GMP), que

puede degradarse en guanosina y guanina. La xantina (X) es un producto final común de estas reacciones que puede ser posteriormente oxidada a ácido úrico (AU), lo que normalmente se asocia a la presencia de flora microbiana (Aristoy et al., 2009). La **Figura 12** muestra las enzimas responsables de la degradación del ATP.

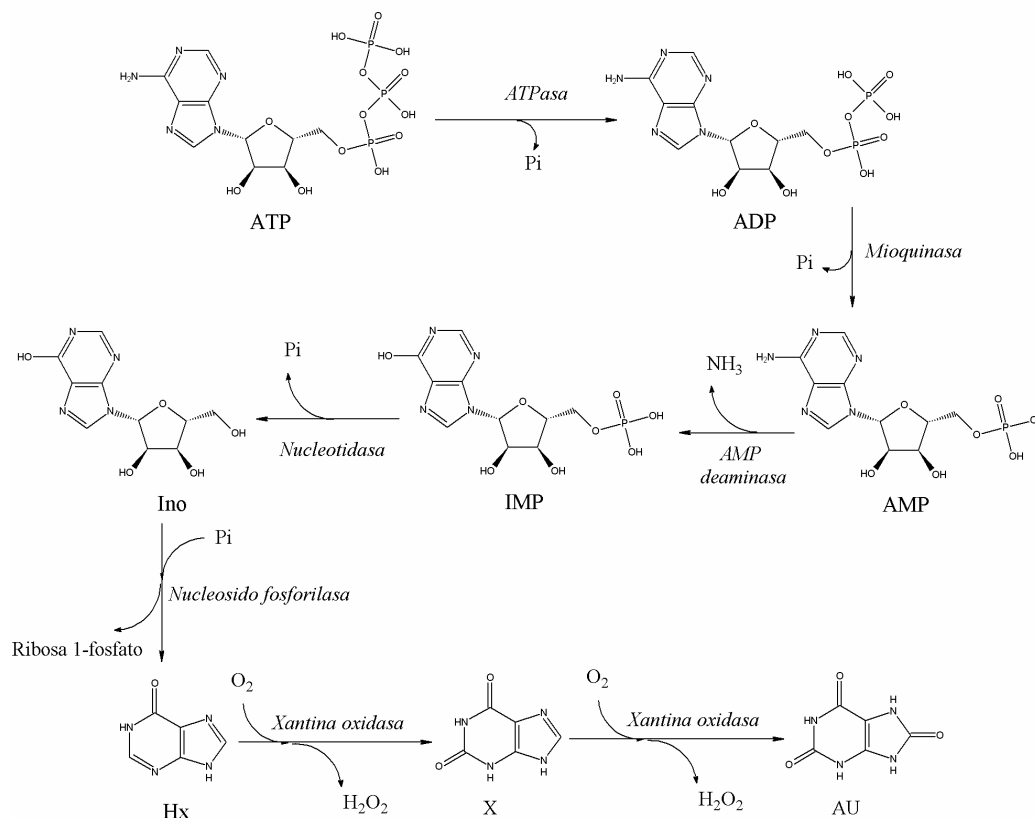


Figura 12. Esquema de la participación de las nucleasas en la degradación del ATP. Adaptación del libro *Handbook of Seafood and Seafood Products Analysis* (Aristoy et al., 2009).

La velocidad de estas reacciones dependerá del estado del animal antes del sacrificio y de las condiciones postmortem, especialmente el pH y la temperatura de la carne.

1.4.5. Otros cambios debidos a reacciones químicas

De forma simultánea a las reacciones enzimáticas, en el músculo postmortem se dan un conjunto de reacciones químicas tanto primarias (formación de más precursores y/o componentes del aroma y sabor como los peróxidos lipídicos), como secundarias (formación de compuestos volátiles aromáticos). Reacciones químicas como la pirólisis de los péptidos y aminoácidos, la caramelización de los carbohidratos o la degradación térmica de la tiamina ocurren en la carne al calentar a temperaturas muy altas y por ello no son trascendentes en el procesado del jamón curado o cocido.

Sin embargo, la degradación y oxidación de los lípidos, las reacciones de Maillard y las reacciones de degradación de Strecker sí que son las reacciones químicas fundamentales en el procesado del jamón.

1.4.5.1. Degradación y oxidación de lípidos

Las reacciones oxidativas de los lípidos se inician en la fracción de fosfolípidos debido a su elevado contenido en ácidos grasos poliinsaturados y a su localización en las membranas. Estas reacciones van a generar una serie de compuestos capaces de modificar el aroma de los productos en los que se desarrollan (Toldrá y Aristoy, 2010).

La degradación de los lípidos presenta una etapa inicial consistente en la hidrólisis enzimática descrita en el apartado anterior en la que se generan ácidos grasos libres. Estos ácidos grasos libres son susceptibles de oxidación, la cual consta de tres fases características (Estévez et al., 2009):

- Iniciación de la oxidación en la que se forman radicales libres, bien por acción de catalizadores como la luz, iones metálicos o calor, o de enzimas como la cicloxigenasa o la lipoxigenasa.
- Propagación, en la que se forman los hidroperóxidos, muy inestables y reactivos. Este tipo de compuestos carecen de olor por lo que su repercusión sobre el aroma de los alimentos no es apreciable, pero van a ser el origen de los productos secundarios de oxidación.
- Terminación, en la que los hidroperóxidos se rompen en moléculas volátiles de bajo peso molecular de los cuales los más característicos e importantes son los

aldehídos, aunque también se forman cetonas, alcoholes, hidrocarburos y ácidos. Los hidroperóxidos también pueden reaccionar con proteínas, péptidos o aminoácidos y polimerizarse (Buscailhon et al., 1993). Estos compuestos tienen una repercusión muy importante sobre el aroma del producto final en los elaborados cárnicos.

1.4.5.2. Reacciones de Maillard

Se trata de una de las principales rutas de generación de compuestos responsables del aroma de la carne y productos cárnicos. Esta reacción se produce entre aminoácidos y grupos reductores como los de los azúcares y otros compuestos carbonílicos. Las reacciones de Maillard, también reconocidas como de pardeamiento no enzimático, requieren cierto aporte de calor o almacenamientos prolongados a temperatura ambiente. Las condiciones ambientales durante las fases finales de la maduración del jamón curado son favorables para la formación de este tipo de compuestos según disminuye la actividad de agua del jamón (Ventanas et al., 1992).

El conjunto de reacciones de oxidación y de Maillard generan un gran número de compuestos volátiles que se pueden agrupar en carbonilos (aldehídos y cetonas), furanos, ácidos grasos, pirazinas y compuestos azufrados (sulfuros, tiazoles, tioles y tiofenos) y contribuyen a la formación de compuestos del aroma y sabor en muchos alimentos (Shahidi et al., 1986). La importancia de estas reacciones durante el curado dependerá de las condiciones del proceso, existiendo una correlación entre el aumento en los productos derivados de las reacciones de Maillard y la temperatura y el tiempo de almacenamiento (Ventanas et al., 1992).

En el jamón cocido, la generación de los productos derivados de las reacciones de Maillard dependerán también del pH y de la disponibilidad de oxígeno (Leroy et al., 2009).

1.4.5.3. Reacciones de Strecker

La degradación de Strecker es una de las vías de las reacciones de Maillard (Cremer y Eichner, 2000) consistente en la desaminación oxidativa y posterior descarboxilación de un aminoácido en presencia de determinados compuestos como

pueden ser azúcares reductores o productos de oxidación lipídica (Arnoldi et al., 1987). Los compuestos generados a partir de la degradación de Strecker poseen características aromáticas intensas y pueden contribuir al desarrollo del aroma final característico del jamón curado. Se trata de una ruta de formación de compuestos volátiles tales como el 2-metil propanal, 2-metil butanal y 3-metil butanal procedentes de los aminoácidos valina, isoleucina y leucina, respectivamente. También se forman compuestos volátiles azufrados a partir de aminoácidos ricos en azufre como la metionina, cisteína y cistina.

Algunos autores han establecido que los aldehídos con grupo metilo como el 3-metil butanal también pueden generarse a partir del metabolismo secundario de microorganismos, y ponen en duda que las reacciones de Maillard o Strecker puedan tener lugar a las bajas temperaturas del proceso del jamón curado (Hinrichsen y Andersen, 1994). Sin embargo, la detección de compuestos volátiles derivados de la degradación de Strecker en estudios con sistemas modelo apoya el hecho de que estas reacciones puedan ocurrir bajo condiciones similares a las del proceso de jamón curado (Pripis-Nicolau et al., 2000; Hidalgo y Zamora, 2004; Ventanas et al., 2007).

2. Compuestos bioquímicos marcadores de calidad en carne y productos cárnicos

2.1. Nucleótidos y nucleósidos

La alta incidencia de carnes tipo PSE se traduce en una menor calidad del producto final, altas pérdidas por exudado, y la contracción de las carnes durante el almacenamiento, resultando todo esto en carnes muy poco atractivas para los consumidores (Flores et al., 1999). La disponibilidad de métodos rápidos de análisis para la detección de este tipo de carnes durante los primeros momentos postmortem es muy importante para la industria cárnica, ya que evitaría las consecuentes pérdidas económicas que conlleva la disminución de la calidad sensorial de la carne. El agotamiento del ATP es la principal causa del inicio del rigor mortis (Greaser, 1986). Tras el sacrificio, el ATP se degrada rápidamente a ADP y, seguidamente, a AMP y IMP, el cual pasa a inosina e hipoxantina. La caída en la concentración de

ATP y la formación de IMP e inosina ocurre más rápidamente en músculos PSE y mucho más lenta en DFD que en músculos normales. Esto implica que las carnes PSE contienen niveles muy bajos de ATP y niveles altos de IMP tras las primeras horas postmortem, mientras que las carnes normales contienen concentraciones relativamente altas de ATP y concentraciones bajas de IMP (Tsai et al., 1972; Lundström et al., 1989). Esta observación ha constituido la base del desarrollo de distintos métodos para la detección postmortem de carnes PSE y DFD. En este sentido, la medida del valor R, que es la ratio de absorción a 250 y 260 nm, solo necesita entre 3 y 4 minutos para su determinación por lo que puede ser muy interesante para el control de calidad en matadero (Honikel y Fischer, 1977). Por otro lado, el valor R' es una variación del valor R, consistente en la ratio de los compuestos derivados de la inosina y los derivados de la adenosina. También está basado en la ratio de las absorbancias a 250 y 260 nm y se utilizó para distinguir entre carnes PSE, normales y DFD a los 45 minutos postmortem. Este valor ha demostrado ser útil para discriminar entre tipos de carnes también a las 2 horas postmortem e incluso a las 8 horas, pero deja de ser útil tras las 24 horas del sacrificio (Batlle et al., 2000). Otra medida sencilla de determinar es la ratio IMP/ATP, que también se ha usado para la detección de carnes exudativas. Este índice es útil en la discriminación entre carnes con un periodo postmortem de hasta 2 horas, pero deja de serlo en carnes de mayor tiempo debido a la alta desviación estándar que presentan (Batlle et al., 2000; Batlle et al., 2001).

El valor K_0 , $((\text{Ino}+\text{Hx}+\text{X})/(\text{ATP}+\text{ADP}+\text{AMP}+\text{IMP}+\text{adenosina}+\text{Ino}+\text{Hx}+\text{X}))\cdot 100$, se ha utilizado como indicador de frescura en pescado (Saito et al., 1959), y también en carne de cerdo, pollo (Fujita et al., 1988), conejo y vaca (Nakatani et al., 1986). Este valor puede simplificarse debido a que el ATP, ADP, y AMP se degradan rápidamente en las primeras horas postmortem. Sin embargo, este indicador no sería válido para la detección rápida de carnes exudativas, por lo que se sugirió el valor K, eliminando de la ecuación la xantina ya que su velocidad de formación durante el tiempo postmortem es muy lenta (Okuma y Abe, 1992). Por otro lado, el ATP, ADP y AMP desaparecen generalmente tras un día de almacenamiento en hielo (Jones et al., 1964; Jones, 1969) afectando a este valor, por ello el valor K se simplificó a K',

que se define como la ratio entre Ino y Hx frente a la suma de IMP, Ino y Hx expresada como porcentaje (Karube et al., 1984). Los nucleótidos y nucleósidos también se han relacionado con atributos sensoriales de la carne. A este respecto, un elevado contenido en hipoxantina se relaciona con el sabor amargo del pescado estropeado, mientras que el IMP recuerda al sabor de carne fresca (Veciana-Nogués et al., 1997; Kuda et al., 2007). El conocido sabor umami es el resultado de la presencia de los compuestos IMP y GMP, los cuales también resultan ser importantes potenciadores del sabor. Así pues, el contenido en nucleótidos se ha estudiado en diferentes carnes para evaluar su contribución al aroma y sabor (Calkins et al., 1982; Fish, 1991; Aliani y Farmer, 2005; Liu et al., 2007).

2.2. Creatina y creatinina

La creatina (Cr) es un ácido orgánico nitrogenado que se sintetiza de forma natural en el hígado, el páncreas y los riñones a partir de aminoácidos como la arginina, la glicina y la metionina a razón de un gramo de creatina por día (ver **Figura 13**), aunque también puede obtenerse a través de complementos dietéticos o de alimentos como la carne o el pescado.

2.2.1. Participación de la creatina en el metabolismo energético muscular

En mamíferos, la Cr se encuentra principalmente presente en el músculo esquelético y es un componente fundamental en el metabolismo energético del músculo. La Cr proporciona al músculo la energía necesaria para su mecanismo de contracción-relajación y se ha demostrado que mejora el rendimiento en ejercicios de alta intensidad (Wyss y Kaddurah-Daouk, 2000). En el músculo esquelético, la Cr coexiste en equilibrio con la fosfocreatina; la conversión de creatina en fosfocreatina es catalizada por la enzima creatina quinasa y consiste en la transferencia del grupo γ -fosfato de la adenosina trifosfato (ATP) al grupo guanidino de la Cr (ver **Figura 14**). La reacción inversa, por tanto, proporciona un camino alternativo a la glucólisis para la regeneración del ATP. La existencia de este almacén de reserva mantiene los niveles de ATP/ADP lo suficientemente altos para actuar en caso de demanda de energía muscular anaeróbica urgente.

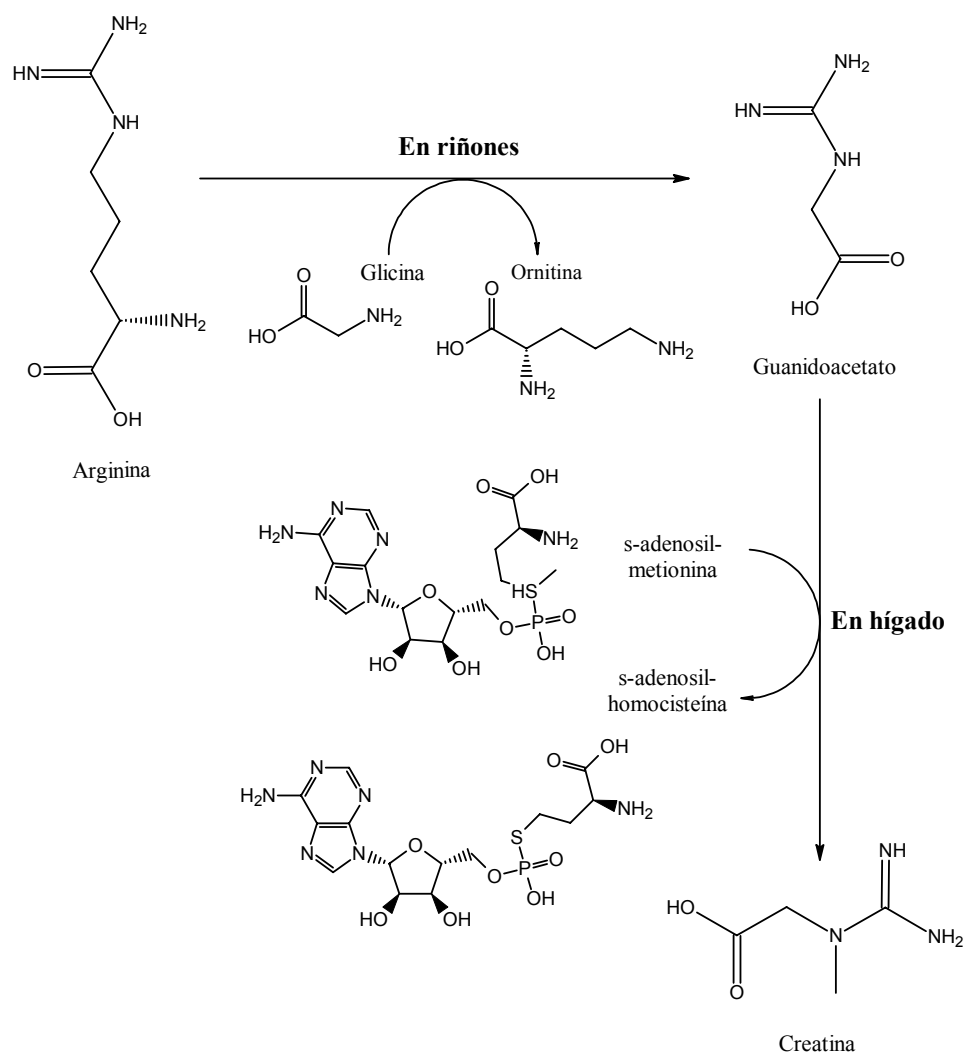


Figura 13. Reacciones de síntesis de creatina en riñones e hígado a partir de aminoácidos. Adaptación de una figura contenida en el artículo *Creatine and creatinine metabolism* (Wyss y Kaddurah-Daouk, 2000).

La Cr aumenta la capacidad anaeróbica, la recuperación aeróbica, y la síntesis de proteínas. Por esta razón, se ha usado terapéuticamente para el tratamiento de la atrofia ocular (disfunción ocular que provoca la pérdida progresiva de visión) (Heinänen et al., 1999) y la distrofia muscular (Pearlman y Fielding, 2006; Kley et al., 2007). Estudios en animales también muestran a la Cr como prometedora en el

tratamiento del daño cerebral traumático (Sullivan et al., 2000; Hergenroeder et al., 2008) y la esclerosis lateral amiotrófica, conocida especialmente por ser la enfermedad padecida por el físico Stephen Hawking (Zhang et al., 2003). Por otro lado, aunque existen estudios enfrentados sobre el beneficio de los suplementos de Cr en el rendimiento muscular, son numerosos los atletas que la consumen con este fin, principalmente en forma de creatina monofosfato (Balsom et al., 1994; Casey et al., 1996; Vandenberghe et al., 1997; Mc Kenna et al., 1999; Kreider, 2003). Hasta el momento, no está prohibida por el Comité Olímpico Internacional. De hecho, prestigiosos velocistas y vallistas ingleses admitieron haberla consumido a principios de los noventa (Williams y Branch, 1998).

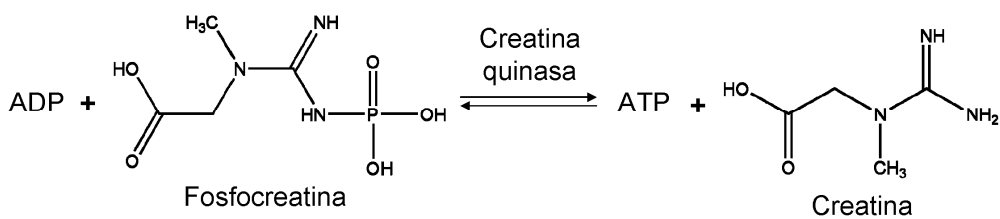


Figura 14. Reacción de la enzima creatina quinasa.

Aunque la mayor parte de las investigaciones se han realizado en humanos, también existen algunos estudios sobre el efecto de los suplementos de creatina monohidrato en el rendimiento del crecimiento de los cerdos y las características y calidad final de su carne. Los cerdos alimentados con estos suplementos inmediatamente antes del sacrificio, presentan una bajada de pH postmortem mucho más suave, ya que se ve aumentada la cantidad de energía disponible para la producción de ATP, pasando a segundo plano el metabolismo glucolítico y la consecuente producción de ácido láctico. Esto hace disminuir la incidencia de carnes pálidas, blandas y exudativas (PSE), aumentando la capacidad de retención de agua como consecuencia de la presencia de fosfatos intramusculares unidos a la Cr dentro de la célula muscular (James et al., 2002; Maddock et al., 2002; Rosenvold et al., 2007).

Una gran parte de la creatina generada por el organismo es transportada a través de la sangre hacia los diferentes tejidos tales como cerebro, hígado, testículos, riñones

y, muy especialmente, hacia la masa muscular, que suele absorber y almacenar entre un 95% y un 98% del total de la creatina en dos tipos de compuestos: creatina libre (es aproximadamente un 40% del total de la Cr muscular) y fosfocreatina (cerca de un 60%). Las fibras musculares de contracción rápida (fibras Tipo II) son las que más cantidad de Cr absorben (Kraemer y Volek, 1999; Persky y Brazeau, 2001).

2.2.2. Generación de creatinina por tratamientos de calor

La creatinina (Cn) es un compuesto orgánico generado a partir de la degradación de la creatina. Se ha estudiado que la formación de creatinina a partir de creatina o fosfocreatina ocurre por vía no enzimática (**Figura 15**), influyendo sólo factores físicos como son el pH, la temperatura, el tiempo, y la concentración inicial de los precursores (Fuller y Elia, 1988; Mora et al., 2008).

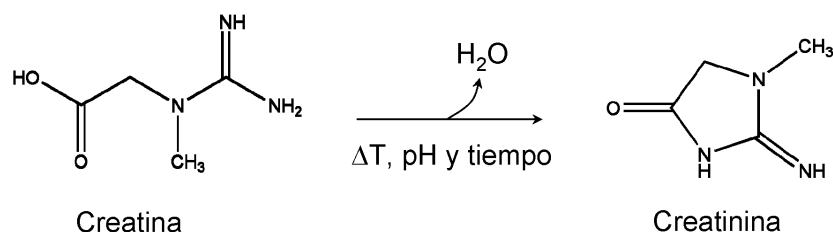


Figura 15. Reacción de conversión de la creatina en creatinina. Se trata de una reacción no enzimática.

La creatinina es un producto de desecho del metabolismo normal de los músculos que normalmente se produce en una tasa muy constante (dependiendo de la masa muscular). La creatinina es filtrada por los riñones y, si el filtrado del riñón es deficiente, los niveles en sangre se elevan; por ello su medida en suero se usa como indicador de la función renal. Por otro lado, la velocidad de excreción de creatinina también ha sido utilizada para calcular la masa muscular en humanos (Gábor et al., 1984) y como índice del estado nutricional (Bistran et al., 1975), basándose en el hecho de que la velocidad de producción de creatinina diaria es constante por la presencia constante de una reserva de los precursores creatina y fosfocreatina en el músculo esquelético.

2.3. Dipéptidos naturales de la carne

Los péptidos en los alimentos se pueden encontrar de forma natural o pueden generarse tras el acondicionamiento o procesado de los alimentos debido a la acción de enzimas proteolíticas presentes en los propios alimentos o bien adicionadas a éstos. Los procesos que van a ser causa de una mayor generación de péptidos son los procesos de fermentación y/o maduración tal como ocurre en el queso, el vino y los elaborados cárnicos. El estudio de los péptidos que se generan durante estos procesos es una vía para conocer los cambios físicos y bioquímicos que ocurren durante la elaboración.

Entre los péptidos que se encuentran de forma natural y cuyo origen no es proteico destacan la carnosina (β -alanil-L-histidina), la anserina (β -alanil-L-1-metil-histidina) y la balenina (β -alanil-3-metil-histidina), que se encuentran en el músculo esquelético de la mayoría de los animales vertebrados. Estos péptidos poseen propiedades tamponantes (Abe et al., 1985) y antioxidantes (Zhou y Decker, 1999; Djenane et al., 2004). Además, se han utilizado para identificar las especies animales utilizadas como ingredientes en la elaboración de productos cárnicos, ya que los cocientes entre ellos son específicos de cada tipo de carne (Huang y Kuo, 2000; Aristoy y Toldrá, 2004; Aristoy et al., 2004). El contenido de estos péptidos es especialmente elevado en músculos con metabolismo glucolítico, aunque éste también va a depender de la especie animal, la edad y la dieta (Aristoy y Toldrá, 1998; Cornet y Bousset, 1998; Aristoy et al., 2004). Las carnes de vaca y de cerdo contienen niveles elevados de carnosina y bajos de anserina, la de cordero presenta cantidades similares de ambos compuestos, mientras que las carnes de caballo y pollo se caracterizan por ser muy ricas en anserina. El dipéptido balenina, uno de los abundantes en ballena, se encuentra presente en cantidades similares a las de anserina en carne de cerdo (Aristoy y Toldrá, 2004).

2.4. Péptidos generados durante la proteólisis e influencia en el aroma y sabor.

El interés en el estudio de los péptidos de la carne se relaciona generalmente con la proteólisis postmortem por ser la responsable del desarrollo de la ternura y de las

características organolépticas propias del producto y, por tanto, de la calidad final del mismo.

Durante los últimos años numerosos péptidos se han relacionado con la terneza y la maduración de la carne. A este respecto cabe destacar la aparición de un péptido de 30 kDa proveniente de la acción de las calpaínas sobre la troponina T (Olson et al., 1977) y, más recientemente, la de otro péptido de 32 kDa proveniente de la misma proteína (Okumura et al., 2003). Ambos péptidos aparecen durante el almacenamiento postmortem y están relacionados con el aumento de la terneza en la carne de bovino (Mc Bride y Parrish, 1977; Negishi et al., 1996; Stoeva et al., 2000) y de cerdo (Okumura et al., 2003). También se ha identificado un fragmento de 110 kDa procedente de la degradación de la proteína C (Mc Bride y Parrish, 1977; Stoeva et al., 2000), así como péptidos mucho más pequeños como tres fragmentos de 1,2, 1,7 y 5,7 kDa, provenientes de las proteínas gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (Stoeva et al., 2000; Okumura et al., 2003), troponina T y creatina quinasa (Stoeva et al., 2000) respectivamente, todos ellos relacionados con el acondicionamiento de la carne. La secuencia APPPPAEVPEVHEEV, también proveniente de la troponina T, fue identificada en carne de bovino tras 10 días de almacenaje a 4 °C (Nakai et al., 1995).

En los productos cárnicos se produce una hidrólisis muy intensa de las proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas durante su procesado. Sin embargo, a pesar de haberse documentado la presencia de fragmentos generados durante todo el proceso de elaboración (Rodríguez-Nuñez et al., 1995; Hansen-Möller et al., 1997; Martín et al., 2001; Sentandreu et al., 2003), se sabe muy poco sobre la identidad de los péptidos generados. A este respecto, varios péptidos provenientes de la degradación de proteínas miofibrilares en salchichón fueron secuenciados en parte por su extremo N-terminal mediante degradación de Edman (Hughes et al., 2002). Como se ha mencionado anteriormente, la intensa proteólisis que se produce durante el curado del jamón se traduce en la generación de una gran cantidad de péptidos de pequeño tamaño, especialmente entre 2,7 y 4,5 kDa, e incluso por debajo de 2,7 kDa. En el jamón de Parma se ha purificado un péptido de 2,6 kDa proveniente del extremo N-terminal de la enzima piruvato quinasa porcina, que

mostró una correlación positiva con el grado de proteolisis ($p < 0,01$), asociándolo a la actividad endopeptidásica (Sforza et al., 2003). Secuencias completas de oligopéptidos procedentes de proteínas miofibrilares como la actina (Sentandreu et al., 2007) han sido recientemente identificadas en el jamón Serrano.

Durante la proteolisis se generan muchos péptidos relacionados con el aroma y sabor, tanto en la carne de cerdo como en el jamón curado. En este sentido, tras separar por cromatografía de filtración en gel extractos de estos productos, se obtuvieron fracciones que contenían péptidos de pequeño tamaño (< 3000 Da), los cuales se correlacionaban claramente con algunos atributos de aroma y sabor característicos de la carne y el jamón curado. Las primeras fracciones, con una masa molecular de unos 1800 Da, tenían un sabor amargo, mientras que en las fracciones de menos de 1000 Da se detectó un sabor ligeramente ácido. Los rangos moleculares de 1500 a 1700 Da, se relacionaron con sabores agradables en el caso de los extractos de jamón curado y con el atributo umami en el caso de la carne fresca (Aristoy y Toldrá, 1995). El análisis sensorial en muestras de jamón con periodos de curado de 7 y 12 meses, resultó en la detección de diferencias significativas en los atributos de olor sexual, fermentado, agrio y salado, siendo éstos mucho mayores en el proceso de curado largo, posiblemente debido a que la intensidad de la proteolisis es mucho mayor (Flores et al., 1997b).

Por otro lado, di y tripéptidos generados por acción de las dipeptidil y tripeptidilpeptidasas han sido aislados del jamón curado y secuenciados (Sentandreu et al., 2003). Algunos de estos péptidos contribuyen al aroma y sabor característico del jamón, dependiendo de su composición en aminoácidos. La generación de aminoácidos libres como productos finales de la proteolisis debido a la acción de las aminopeptidasas es muy intensa, pudiendo llegar a varios cientos de miligramos por 100 g de jamón (Toldrá et al., 1997; Toldrá et al., 2000). Estos aminoácidos libres pueden contribuir al sabor final cuando se encuentran en concentraciones superiores al valor umbral de detección (Nishimura et al., 1988). A este respecto, los ácidos glutámico y aspártico se generan en grandes cantidades y podrían ser responsables en parte del sabor ácido, aunque sus sales sódicas contribuyen a la mejora del sabor. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina también se generan en grandes

cantidades durante el curado y pueden contribuir a la formación de sabores amargos si no se controlan. Por otro lado, aminoácidos como la alanina, serina, prolina, glicina e hidroxiprolina pueden compensar el sabor aportando dulzor. El sabor final del jamón curado va a depender de las cantidades y proporciones en que esté presente cada aminoácido. El sabor a viejo, característico del jamón de Parma, se ha correlacionado con el contenido en los aminoácidos lisina y tirosina (Careri et al., 1993), mientras que en jamones de tipo francés apenas se ha observado efecto alguno (Buscailhon et al., 1994). La concentración de los dipéptidos carnosina y anserina también aumenta a lo largo del proceso de curado. La acción tamponante de estos dipéptidos a $\text{pH} < 6,0$, hace que su contribución en el desarrollo del sabor sea muy importante, ya que el efecto sobre el sabor de los componentes iónicos de los alimentos en general, son fuertemente dependientes del pH (Nishimura et al., 1988). Una excesiva proteólisis puede dar lugar a la generación de componentes indeseables con sabores amargos o con un trasfondo metálico (Careri et al., 1993; Parolari et al., 1994). Finalmente, algunos aminoácidos libres pueden convertirse en una fuente de compuestos volátiles durante el curado o el calentamiento de productos cárnicos (Mc Cain et al., 1968). La metionina y la cisteína pueden dar lugar a compuestos volátiles azufrados, mientras que la leucina, valina e isoleucina podrían generar aldehídos por medio de la degradación de Strecker (Toldrá et al., 2000).

Parte de la importancia de la identificación de los péptidos generados durante el curado del jamón radica en su potencial uso como marcadores de calidad de este producto. Además de aportar información sobre el procesado del producto y de contribuir a aumentar el conocimiento del conjunto de reacciones bioquímicas que ocurren durante el curado, estudios más profundos permitirían elucidar las propiedades funcionales de estos péptidos y su influencia sobre nuestro organismo.

3. Métodos analíticos para la determinación de compuestos bioquímicos marcadores de calidad en carne y productos cárnicos

3.1. Compuestos derivados del metabolismo muscular

Para el correcto análisis de los compuestos derivados del ATP debe tenerse en cuenta que el músculo en sus primeros momentos postmortem es muy sensible a la temperatura. La degradación de la cadena de ATP ocurre de forma muy rápida incluso a temperaturas de refrigeración. Por ello, es importante detener esta degradación en el momento de la toma de muestra, para lo cual se congela el músculo mediante inmersión en nitrógeno líquido.

En el procedimiento de extracción del ATP y los compuestos relacionados se utiliza principalmente como agente de extracción el ácido perclórico, el cual es posteriormente neutralizado añadiendo carbonato potásico. El ácido tricloroacético, que posteriormente se neutraliza con hidróxido sódico, también da muy buenos resultados en la extracción este tipo de compuestos.

Como ya se ha adelantado en el párrafo anterior, para el análisis de nucleótidos se han utilizado una gran variedad de métodos. Entre ellos podemos destacar la espectroscopía por resonancia magnética nuclear (Van den Thillart et al., 1990), la electroforesis capilar de alta resolución (Nguyen et al., 1990; Luong et al., 1992), radioinmunoensayos (Roberts et al., 1991), cromatografía de capa fina (Dingle et al., 1968), HPLC en fase reversa (RP-HPLC) con o sin par iónico (Meynial et al., 1995; Veciana-Nogués et al., 1997; Kuda et al., 2007), HPLC de intercambio iónico (Borgese et al., 1978) y ensayos enzimáticos con la enzima en solución (Fujita et al., 1988) o inmovilizada, constituyendo en este último caso los llamados biosensores (Luong y Male, 1992; Yano et al., 1995; Volpe y Mascini, 1996). Aunque la técnica más empleada en el análisis de nucleótidos y nucleósidos haya sido con diferencia la RP-HPLC, estudios recientes sitúan a la cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) en un nivel similar en lo que a linealidad, repetibilidad, reproducibilidad y recuperación se refiere para este tipo de compuestos.

En lo que respecta a la determinación de la creatina y creatinina, la temperatura es también un parámetro importante a controlar debido a la influencia de la misma en la velocidad de conversión de la creatina en creatinina. Por ello, desde la toma de

muestra e incluyendo el proceso de extracción, todo el tratamiento se hace en condiciones de refrigeración (5 °C). La creatina y creatinina se determinan comúnmente utilizando el método de Folin, que está basado en la reacción de Jaffé, base de los métodos oficiales. La reacción de la creatina con el 1-naftol y el biacetilo, siempre a través de metodologías de inyección en flujo, se ha utilizado para la determinación simultánea de creatina y creatinina en carne y productos cárnicos (Dvorak, 1988; del Campo et al., 1995). Otras técnicas incluyen la cromatografía en fase reversa con par iónico (Dunnett et al., 1991; Tranberg et al., 2005), un método isotacoforético capilar (Kvasnicka y Voldrich, 2000), y ensayos espectrofotométricos utilizando sistemas enzimáticos (Purchas et al., 2004).

3.2. Péptidos en carne y productos cárnicos

3.2.1. Extracción

Para el análisis de péptidos presentes en carne y productos cárnicos la extracción es una etapa fundamental. Tras eliminar la grasa y el tejido conectivo del tejido muscular, se tritura la muestra por métodos mecánicos y se toma una muestra representativa para el análisis, la cual se homogeneiza con el tampón de extracción. Los agentes más empleados suelen ser el agua bidestilada, soluciones salinas diluidas, soluciones acuosas ácidas (acético, clorhídrico o perclórico), tampón fosfato neutro e incluso mezclas de agua con disolventes orgánicos. Sin embargo, en carne y productos derivados se suelen emplear soluciones ácidas como el ácido clorhídrico 0,01N (Rodríguez-Nuñez et al., 1995; Mora et al., 2008). Tras la extracción, el sobrenadante se recoge y desproteiniza añadiendo 3 volúmenes de acetonitrilo, metanol o etanol. En ocasiones, la extracción y la desproteinización se realizan en un solo paso extrayendo la muestra con un solvente desproteinizante como el ácido perclórico 0,6 N (Dunnett y Harris, 1997; Martín et al., 2001; Liu et al., 2007) o el ácido tricloroacético (Hughes et al., 2002).

3.2.2. Separación

En la mayoría de los casos el análisis de péptidos requiere un fraccionamiento previo con el fin de simplificar la muestra y eliminar las sustancias interferentes presentes

en la solución. Los métodos de separación pueden basarse en diferentes principios como el fraccionamiento por tamaño (ultrafiltración, cromatografía de exclusión molecular), la carga (electroforesis o cromatografía de intercambio iónico) o la polaridad (electroforesis micelar o cromatografía de fase reversa).

3.2.2.1. Ultrafiltración

Se trata de una técnica preparativa. Con esta técnica es posible aislar la fracción peptídica de interés según su tamaño molecular, aunque también se puede usar como medio para concentrar extractos de péptidos. Existe una gran variedad de filtros con numerosos tamaños de corte molecular.

3.2.2.2. Cromatografía de exclusión molecular

También se la denomina cromatografía de filtración en gel y se utiliza para separar proteínas, péptidos u otras macromoléculas biológicas en función de su tamaño molecular. En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria es un gel donde las moléculas más pequeñas penetran en los poros del relleno mientras que las que tienen un mayor tamaño que el diámetro del poro son excluidas y eluyen más rápidamente. Como puede verse en la **Figura 16**, el resultado es una separación en la cual los péptidos eluyen ordenados de mayor a menor tamaño molecular.

El intervalo de tamaños a fraccionar va a depender del tamaño del poro del gel. Por ejemplo, un gel Sephadex G-25 (GE Healthcare) es adecuado para separar péptidos de un tamaño entre 500 y 5000 Da (Spanier et al., 1988; Rodríguez-Núñez et al., 1995; Hughes et al., 2002; Mora et al., 2009), mientras que un gel Sephadex G-10 sería adecuado para separar péptidos menores de 700 Da (Cambero et al., 1992; Hughes et al., 2002).

La elución normalmente se lleva a cabo con ácido clorhídrico 0.01N o tampones fosfato diluidos a velocidades de flujo muy bajas (por ejemplo, 15 mL/h). El eluyente se monitoriza por absorción ultravioleta a 214, 254 o 280 nm con el fin de controlar la elución de los compuestos de interés.

Un cromatograma típico de un extracto de jamón curado se muestra en la **Figura 17**. Tras la elución, se pueden recoger las fracciones con el fin de utilizarlas en posteriores etapas de análisis.

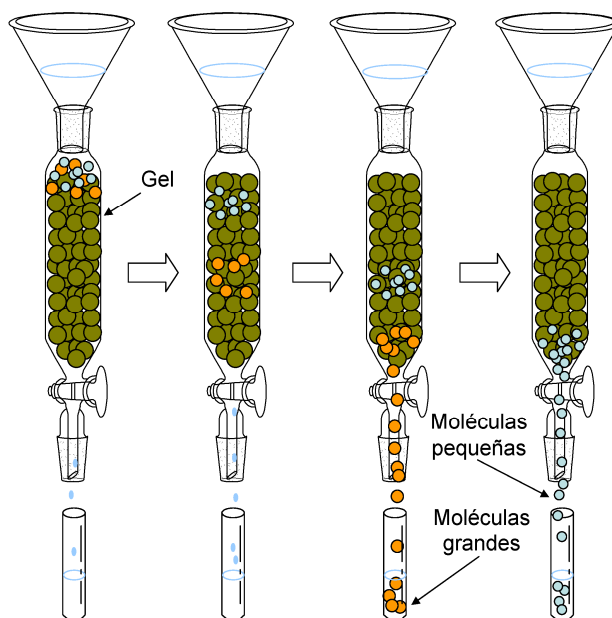


Figura 16. Esquema básico del funcionamiento de la cromatografía de filtración en gel. Los compuestos de menor tamaño quedan retenidos en las partículas del gel mientras que los más grandes eluyen más rápido.

3.2.2.3. Electroforesis en gel

La tecnología más utilizada para la separación de proteínas y péptidos es la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), tanto de una dimensión, donde la separación se realiza en función de la masa molecular en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS), como bidimensional, que está basada en una primera separación en función del punto isoeléctrico utilizando un gradiente de pH, seguida de una segunda separación en función de la masa molecular (ver **Figura 18**).

Esta técnica se ha utilizado mucho en el estudio de los cambios postmortem del músculo esquelético, lo que ha contribuido a conocer mejor los mecanismos bioquímicos que tienen lugar durante este periodo. Así pues, la electroforesis

bidimensional se ha utilizado para estudiar los cambios postmortem ocurridos durante el periodo de almacenamiento de la carne de cerdo (Lametsch y Bendixen, 2001), oveja (Jia et al., 2006a), ródalo (Verrez-Bagnis et al., 2001) y bacalao (Kjaersgard y Jessen, 2003). Otros autores también han empleado la electroforesis bidimensional para relacionar los cambios postmortem que se producen en el proteoma con la terneza de la carne de cerdo (Lametsch et al., 2003; Hwang et al., 2005) y también con cambios en el color de la misma (Sayd et al., 2006).

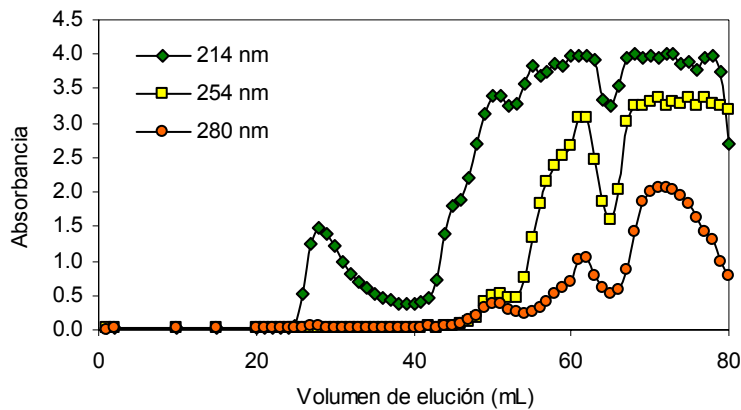


Figura 17. Cromatografía de filtración en gel con una columna Sephadex G-25 de un extracto de jamón curado desproteinizado.

Aunque el uso más común de la electroforesis en geles de poliacrilamida ha sido para la separación de proteínas, también se ha utilizado para la separación de péptidos entre 1 - 30 kDa presentes en carne. Para ello es necesario tener en cuenta una serie de medidas, entre las que se incluye la tricina como componente fundamental del tampón (Schägger, 2006). La separación ocurre según los valores de pK de los grupos funcionales de la tricina, que definen la movilidad electroforética de los péptidos. Este sistema es también útil para la separación de péptidos extremadamente hidrofóbicos que posteriormente van a ser identificados por espectrometría de masas.

La electroforesis de flujo libre es una alternativa a la separación por electroforesis bidimensional. Se trata de una metodología basada en la separación en medio líquido y sin límites de pH o de tamaño molecular. Se desarrolló para la separación en continuo de compuestos moleculares, desde péptidos y proteínas a partículas subcelulares y células, y está basado en la separación por electromigración de los compuestos cargados gracias al flujo hidrodinámico continuo de una corriente de electrones que se aplica perpendicularmente a la dirección del flujo de la muestra (Weber y Bocek, 1998). La ausencia de matriz permite recuperaciones de muestra de más del 95% y velocidades de fraccionamiento de menos de 20 minutos.

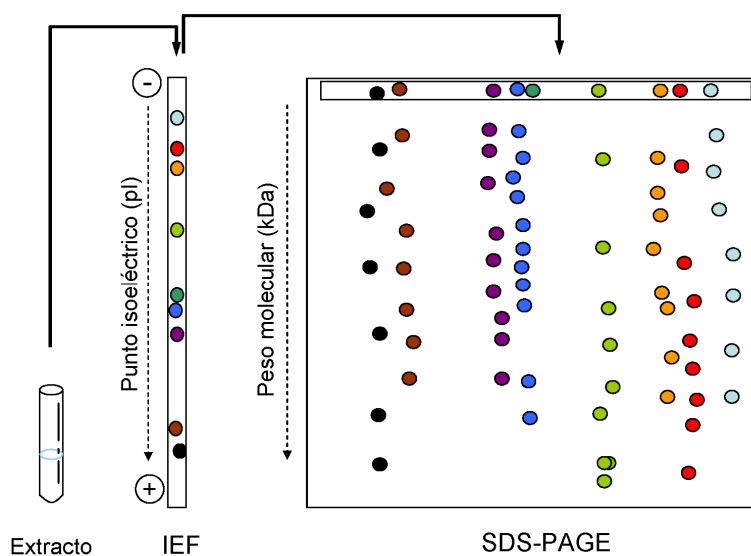


Figura 18. Esquema de funcionamiento de la electroforesis bidimensional. El extracto se separa en un primer gel según su punto isoeléctrico (IEF) y, posteriormente, a partir de ese mismo gel, se realiza una separación por SDS-PAGE según la masa molecular.

Recientemente se ha desarrollado un fraccionador basado en esta metodología. El tradicional gel de acrilamida ha sido sustituido por una fase líquida, la cual permite la recogida de las distintas fracciones para posteriores análisis sin necesidad de la tediosa fase de extracción en gel que era necesaria en la electroforesis SDS-PAGE.

Esta electroforesis denominada Offgel permite la separación de proteínas y péptidos según su punto isoeléctrico (Hörth et al., 2006; Fraterman et al., 2007).

3.2.2.4. Electroforesis capilar

Esta técnica consiste en la separación por electroósmosis, cuyo principio se basa en colocar un capilar de sílice fundida relleno de una solución tampón entre dos electrodos, aplicándose una diferencia de potencial que produce una corriente que atraviesa el capilar y hace que la solución fluya en su interior en dirección al cátodo. De este modo, la introducción de una disolución de péptidos por el ánodo hace que éstos migren al cátodo en función de su carga y tamaño, eluyendo primero los de menor electronegatividad y tamaño. Los analitos en su camino al cátodo son detectados cuando el capilar pasa a través de un detector ultravioleta o de fluorescencia, resultando un electroferograma equivalente a un cromatograma. Esta técnica se ha aplicado a la caracterización de proteínas por medio de mapas peptídicos (Saz y Marina, 2007). Estos mapas peptídicos constituyen la huella peptídica de una determinada proteína, que es el conjunto de péptidos generados mediante la digestión con una peptidasa específica. Más adelante se comentará cómo, mediante técnicas de espectrometría de masas y comparación de las masas experimentales generadas con masas peptídicas teóricas presentes en bases de datos, es posible la caracterización de la proteína de interés.

La aplicación de esta técnica al análisis de péptidos presentes en extractos de carne o productos cárnicos resulta complicada en parte debido a la complejidad de estas matrices, la presencia de sustancias interferentes como aminoácidos y nucleótidos, y la dificultad del fraccionamiento, lo que complica la posterior purificación y caracterización de los péptidos por separado.

3.2.2.5. Cromatografía de fase reversa

La cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) es la técnica más utilizada para analizar extractos peptídicos, ya que permite separarlos en base a diferencias de hidrofobicidad, lo que está directamente relacionado con la composición en aminoácidos de los péptidos. En este tipo de cromatografía, la fase

estacionaria es apolar mientras que la fase móvil es polar. Existen muchos tipos de columnas de fase reversa; las más utilizadas consisten en un soporte de sílice con cadenas n-alkil octadecil (C18) y octil (C8) enlazadas. En el interior de la columna se produce un reparto de los péptidos entre la fase móvil y la estacionaria. Las típicas fases móviles que se emplean en este tipo de separaciones son el acetonitrilo como fase orgánica y una fase acuosa compuesta generalmente de un 0.1% de ácido trifluoroacético o ácido fórmico en agua (Sforza et al., 2006). Para conseguir una separación óptima de los péptidos se suele realizar una elución en gradiente. Los péptidos más polares eluyen en primer lugar mientras que los hidrofóbicos quedan retenidos en la columna y tardan más tiempo en eluir. La detección de los péptidos puede realizarse a diferentes longitudes de onda, 214, 254 o 280 nm, aunque si el sistema cuenta con un detector de diodos es posible obtener el espectro completo de absorción para cada péptido.

La gran eficacia de esta técnica permite la obtención de los denominados mapas peptídicos (Colilla et al., 1991) a partir de digestiones proteicas o de extractos de péptidos en general. Así mismo, se puede hacer un seguimiento de los procesos en los que existe proteólisis tal como ocurre en el caso del jamón curado o el queso (Rodríguez-Nuñez et al., 1995; Michaelidou et al., 2003). Además, los péptidos separados se pueden aislar para su estudio o identificación posterior (Recio et al., 2000; Fogaça et al., 2004).

3.2.2.6. Cromatografía de intercambio iónico

Este tipo de cromatografía también permite una buena separación de péptidos, siendo complementaria de la anteriormente descrita. En la cromatografía de intercambio iónico, la fase estacionaria muestra en la superficie grupos funcionales iónicos que interactúan con iones de carga opuesta del analito. La cromatografía de intercambio catiónico retiene cationes debido a que la fase estacionaria posee grupos funcionales cargados negativamente como el ácido sulfónico o carboxílico, mientras que la cromatografía de intercambio de aniones retiene aniones usando grupos funcionales cargados positivamente, como un catión de amonio cuaternario. Así pues, los péptidos de carácter ácido se separan mejor en columnas de

intercambio aniónico (Pizzano et al., 1998), mientras que para el análisis de péptidos con carácter básico se suelen emplear columnas de intercambio catiónico (Recio et al., 2000; Sentandreu et al., 2003).

Los mejores resultados se suelen obtener utilizando sales no volátiles como el cloruro sódico, lo que presenta un gran inconveniente cuando se requieren posteriores identificaciones por espectrometría de masas. Para superar este problema, la separación de intercambio iónico suele ir seguida de una cromatografía en fase reversa o de interacción hidrofílica con el fin de eliminar la sal de los péptidos de interés.

La naturaleza catiónica de los dipéptidos naturales de la carne (carnosina, anserina y balenina), permite su análisis por cromatografía de intercambio catiónico. Normalmente, es suficiente su detección por ultravioleta a 214 nm, pero cuando se precisa una mayor sensibilidad, es posible aumentar el límite de detección en muestras complejas mediante la derivatización postcolumna con *o*-ftalaldehído (OPA) (Aristoy y Toldrá, 2004; Aristoy et al., 2004). En estos casos la detección suele hacerse por fluorescencia.

3.2.2.7. Cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC)

Como se ha comentado anteriormente, tanto la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa como de intercambio iónico han sido durante décadas los métodos elegidos para el análisis de péptidos. Sin embargo, la cromatografía de fase reversa presenta algunas limitaciones en el análisis de compuestos polares debido a la baja retención de los mismos. En este sentido, la cromatografía de interacción hidrofílica constituye una alternativa interesante a estos tipos de cromatografía por muchas razones. Esta técnica utiliza fases móviles similares a las empleadas en fase reversa, con la consecuente ventaja sobre la solubilidad del analito, sin embargo, no precisa del uso de agentes derivatizantes o pares iónicos para aumentar la retención, generalmente necesarios en RP-HPLC. Por otro lado, se trata de una cromatografía líquida perfectamente compatible con espectrometría de masas, eliminando el paso de desalado que es necesario cuando se utiliza la cromatografía líquida de intercambio iónico.

La cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) es complementaria a la cromatografía de fase reversa. Compuestos que presentan poca o ninguna retención en fase reversa suelen presentar una fuerte retención en columnas HILIC, las cuales requieren fases móviles con un alto contenido en componente orgánico con el fin de promover las interacciones hidrofílicas entre el analito y la fase estacionaria. El tiempo de retención en este tipo de cromatografía aumenta con la polaridad del péptido, la polaridad de la fase estacionaria, y con la concentración en disolvente orgánico de la fase móvil utilizada para la elución, al contrario de lo que ocurre en fase reversa.

Aunque sí se han descrito estudios sobre el uso de este tipo de cromatografía en la separación de péptidos (Alpert, 1990; Yoshida et al., 1995; Dunnett y Harris, 1997; Yoshida, 2004), no existen prácticamente registros sobre su aplicación en el análisis de alimentos.

3.2.3. Identificación y secuenciación

Tradicionalmente para la identificación de proteínas se han desarrollado dos estrategias claramente diferenciadas, la identificación mediante huella peptídica y la identificación mediante fragmentación de péptidos obteniendo la secuencia total o parcial de los aminoácidos. La huella peptídica de una determinada proteína es un conjunto de péptidos generados mediante digestión de la proteína con una enzima conocida como es la tripsina. Las masas peptídicas experimentales obtenidas son comparadas con las masas peptídicas teóricas de proteínas presentes en bases de datos de forma que, para la identificación correcta de la proteína, se requiere que las masas de un gran número de péptidos coincidan con las masas teóricas de los péptidos y que cubran parte de la secuencia de la proteína de la base de datos.

Últimamente aparecen trabajos en los que la investigación se centra en la identificación de péptidos presentes en matrices complejas, los cuales se han generado a partir de procesos proteolíticos muy poco conocidos. En la identificación de péptidos endógenos presentes en matrices complejas no es necesario generar péptidos ya que éstos se encuentran presentes en la muestra de forma natural, como es el caso de las leches fermentadas o los productos curados (Sentandreu et al.,

2007; Jauhiainen y Korpela, 2007). Esto plantea un importante inconveniente en la identificación de la secuencia de estos péptidos al no haber sido generados por digestión con una enzima conocida (tripsina mayoritariamente), no siendo posible obtener su huella peptídica ni contrastarla con las masas teóricas presentes en las bases de datos. En estos casos, los péptidos se deben identificar por elucidación de su secuencia de aminoácidos mediante espectometría de masas en tándem, técnica que se explicará más adelante.

3.2.3.1. Secuenciación por degradación de Edman

La degradación de Edman se ha utilizado durante décadas en la secuenciación de péptidos y consiste en la liberación progresiva de los aminoácidos situados en el extremo N-terminal del péptido y su posterior identificación, lo que permite conocer la secuencia de los aminoácidos que componen el péptido (Aldanova et al., 1970). Esta técnica se basa en la reacción del fenilisotiocianato con el grupo amino libre terminal del péptido. Tras una hidrólisis suave en medio ácido se libera el derivado feniltiohidantoína del aminoácido mientras el resto del péptido permanece intacto y el ciclo vuelve a comenzar (ver **Figura 19**) (Bermodso et al., 1970).

A pesar de que esta técnica de secuenciación ha sido de gran utilidad durante décadas, presenta importantes limitaciones como son la necesidad de tener libre el extremo N-terminal del péptido para permitir la reacción con el fenilisotiocianato, así como la exigencia de tener un elevado grado de pureza del péptido a secuenciar, ya que la secuenciación de una mezcla de dos o más péptidos dificulta mucho la tarea y puede conducir fácilmente a error.

Los equipos de secuenciación basados en este principio se denominan secuenciadores automáticos y constan de una unidad que realiza la degradación de Edman de forma continua y automática, la cual está conectada a un cromatógrafo líquido de fase reversa, donde se realiza la identificación del derivado de feniltiohidantoína (PTH-aminoácido) (Laursen, 1971; Laursen et al., 1972; Kulbe, 1974).

Los secuenciadores de proteínas se han utilizado para identificar péptidos en carne (Stoeva et al., 2000; Okumura et al., 2003) y productos cárnicos (Hughes et al., 2002; Sentandreu et al., 2003).

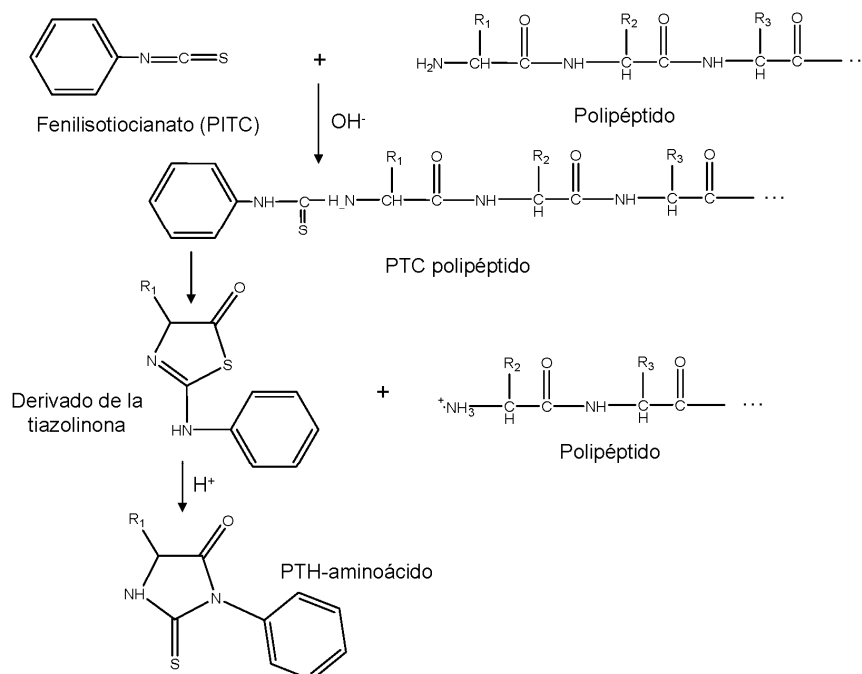


Figura 19. Diagrama esquemático de la degradación de Edman.

3.2.3.2. Identificación por espectrometría de masas

Las aplicaciones de la espectrometría de masas experimentaron grandes cambios a finales de la década de los 80 como consecuencia del desarrollo de los métodos de producción de iones de moléculas no volátiles o termolábiles, muchas de ellas estudiadas con frecuencia por bioquímicos y biólogos. Es el caso de los nuevos métodos de ionización por electrospray (ESI) (Fenn et al., 1989; Fenn, 2003) y por desorción/ionización por láser asistida por una matriz (MALDI) (Karas et al., 1989; Tanaka, 2003). Estos métodos de ionización 'suave' permiten convertir biomoléculas grandes, polares y no volátiles (proteínas) en iones en fase gaseosa tras una

fragmentación mínima. Aunque se han desarrollado diversas combinaciones de fuentes de ionización y de analizadores de masas, la fuente de ionización MALDI se suele acoplar a un analizador tipo tiempo de vuelo (TOF) o TOF/TOF mientras que la ionización ESI normalmente se combina con un cuadrupolo, una trampa iónica o instrumentos híbridos cuadrupolo-trampa iónica, cuadrupolo-tiempo de vuelo, y triple cuadrupolo.

Un espectrómetro de masas es un instrumento capaz de separar los iones que componen una muestra según su relación masa/carga (m/z). Antes de pasar al espectrómetro de masas, la muestra es vaporizada e ionizada y, una vez allí, se genera una lista de masas (m/z) de forma que pueden seleccionarse aquellas correspondientes a péptidos específicos para una posterior fragmentación por MS/MS. La espectrometría de masas en tándem implica el acoplamiento de un espectrómetro de masas a otro. En este montaje, el primer espectrómetro sirve para aislar los iones moleculares de los diferentes componentes de la mezcla. Estos iones se introducen en un segundo espectrómetro de masas donde son fragmentados para dar una serie de espectros de masas, uno por cada uno de los iones moleculares obtenidos en el primer espectrómetro. Como los péptidos se pueden fragmentar por múltiples sitios se ha creado una nomenclatura para indicar el tipo de fragmentos generados. Tras la fragmentación a nivel de enlace peptídico se generan principalmente dos tipos de iones cargados positivamente, los de tipo *b* y los de tipo *y*. Los iones tipo *b* son aquellos que contienen el extremo amino del péptido, mientras que el ión tipo *y* contiene el extremo carboxilo (Roepstorff y Fohlman, 1984). Los espectros de fragmentación MS/MS proporcionan información de las diferencias de masas entre dos iones consecutivos del mismo tipo (por ejemplo iones de la serie *y* o *b*) y que corresponden a la pérdida de un aminoácido en el péptido (ver **Figura 20**). Estos espectros proporcionan información sobre la identidad y posición de los aminoácidos en el péptido. Por tanto es posible determinar la secuencia completa del péptido si éste genera una fragmentación de buena calidad. Otras veces sólo se obtiene una secuenciación parcial del péptido. La información sobre la secuencia parcial y la masa del péptido, puede permitir la identificación de la proteína mediante las bases de datos (Henzel et al., 1993; Mann et al., 1993).

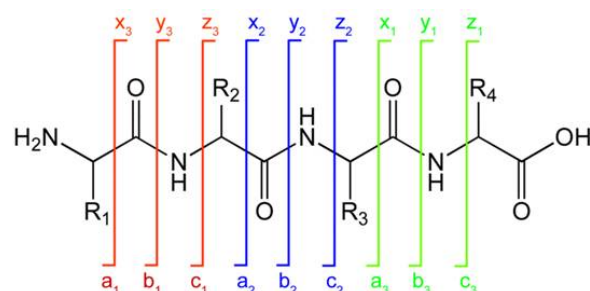


Figura 20. Ejemplo de un péptido fraccionado por distintos enlaces (marcados con distintas letras).

En un experimento típico, un espectrómetro de masas sencillo puede generar cientos de espectros por hora y su interpretación de forma manual no sería una opción viable, por ello se han desarrollado un gran número de aproximaciones y herramientas bioinformáticas que permiten la interpretación de estos espectros de MS/MS. Podemos clasificar estas metodologías de trabajo en tres categorías:

- En la primera aproximación se obtienen las secuencias de los péptidos directamente a partir de la información del espectro de fragmentación sin recurrir a las bases de datos (aproximación por secuenciación *de novo*). Esta metodología presenta la ventaja de que permite la identificación de péptidos cuya secuencia exacta no está disponible en las bases de datos.
- La siguiente aproximación sería por búsqueda en bases de datos, en la que la identificación de los péptidos se lleva a cabo correlacionando los espectros de fragmentación (MS/MS) experimentales con los teóricos contenidos en las bases de datos (Pappin et al., 1993; James et al., 1993; Yates et al., 1993).
- Finalmente, existe una aproximación híbrida basada en la identificación de un fragmento corto de la secuencia, entre tres y cinco residuos, seguido de una búsqueda en bases de datos.

Existen diversas herramientas bioinformáticas que pueden utilizarse para la interpretación de los espectros de fragmentación de un péptido: SEQUEST, MASCOT, PARAGON, etc., las cuales trabajan con distintas bases de datos como son la SwissProt o el NCBIInr.

3.2.3.2.1. Espectrometría de masas MALDI-TOF

MALDI-TOF es una técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas. En esta técnica, la mezcla de péptidos se coloca sobre una placa metálica a la que se le añade una matriz, normalmente un ácido aromático de bajo peso molecular como el ácido α -ciano-hidroxicinámico o el ácido 2,5-dihidroxibenzoico, que absorbe la radiación del láser de nitrógeno, ayudando en la ionización sin que se produzca la rotura del péptido. Una de las principales ventajas de esta técnica es que el proceso de ionización genera principalmente iones con una sola carga ($M + H$)⁺ (ver **Figura 21**).

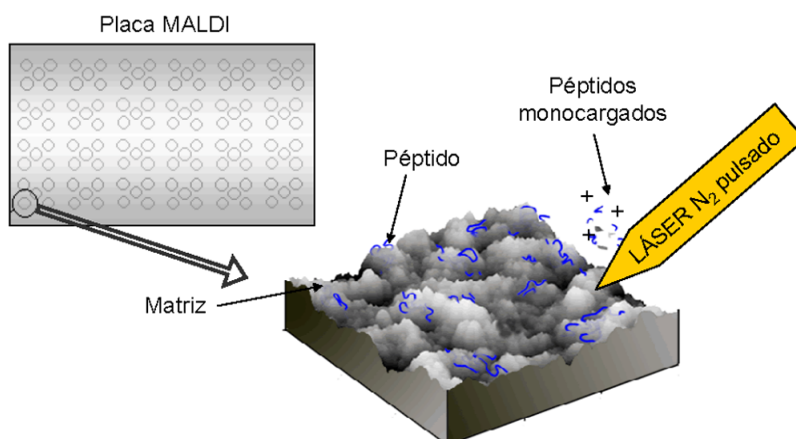


Figura 21. Esquema de la ionización por MALDI.

A la salida de la fuente de ionización los iones son acelerados en un campo eléctrico (10^3 a 10^4 V) y conducidos a una zona libre de campos. Este voltaje de aceleración proporciona a todos los iones la misma energía cinética y, por lo tanto, distintas velocidades en función de sus relaciones masa/carga. Los iones más ligeros viajarán a mayor velocidad y llegarán antes al detector, el cual registra los “tiempos de vuelo” de los distintos iones.

A partir de los tiempos de vuelo pueden derivarse las relaciones masa/carga de los iones (ver **Figura 22**). El resultado es un espectro de masas en el que quedan representadas las masas moleculares (m/z) de los péptidos presentes en la muestra.

Durante la última década se han llevado a cabo varios estudios sobre los cambios postmortem que se dan en el músculo porcino utilizando esta técnica. De este modo, se han podido observar cambios en la abundancia de algunas enzimas del metabolismo energético muscular (Lametsch et al., 2004), y, por otro lado, se han detectado proteínas que pueden ser sustratos de la μ -calpaína (Lametsch et al., 2002). Esta técnica también ha servido para la identificación de una nueva forma de actina en el jamón curado (Di Luccia et al., 2005).

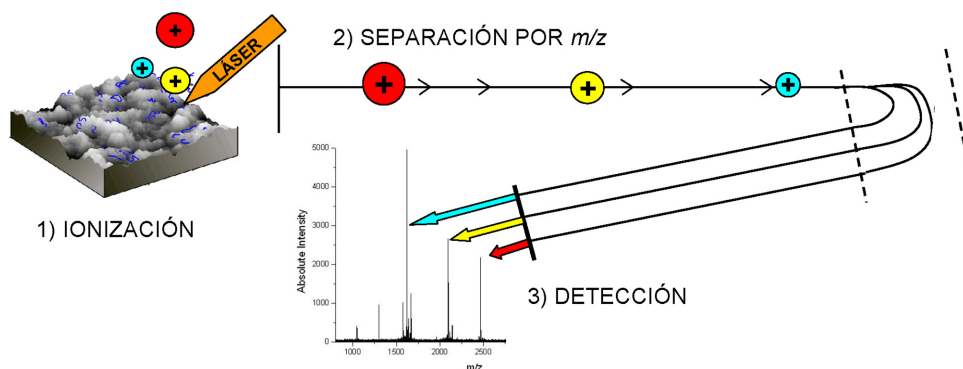


Figura 22. Esquema de funcionamiento del analizador de tiempo de vuelo. Tras la ionización, los iones se aceleran en función de su relación masa/carga y llegan al detector.

3.2.3.2.2. Espectrometría de masas MALDI- TOF/TOF

Los analizadores TOF/TOF proporcionan un mejor enfoque de los iones y, por tanto, mayor resolución y precisión másicas. Este tipo de analizadores consisten principalmente de tres secciones: un TOF lineal (TOF 1), una región de colisión que sirve como fuente de iones, y un TOF reflector (TOF 2) (ver **Figura 23**). Los iones precursores se generan en el TOF 1, donde son acelerados y dirigidos al centro de un dispositivo selector de iones (TIS). Con el ajuste adecuado de los voltajes a unos tiempos predeterminados, el TIS evita la entrada en la celda de colisión de todos los valores de m/z que son menores y mayores que el valor m/z del ion precursor. Los iones seleccionados son decelerados antes de su entrada en la celda de colisión. Tras su fragmentación en la celda de colisión, los iones son reacelerados en la región TOF 2 (Yergey et al., 2002).

Este diseño se ha modificado recientemente para incorporar un reflectrón de campo curvilíneo como TOF 2. Con esta modificación no hay necesidad de decelerar los iones antes de la disociación inducida por colisión (CID) ni de reacelerar los productos de la CID, ya que el reflectrón de campo curvilíneo puede aceptar iones de amplio rango de energía.

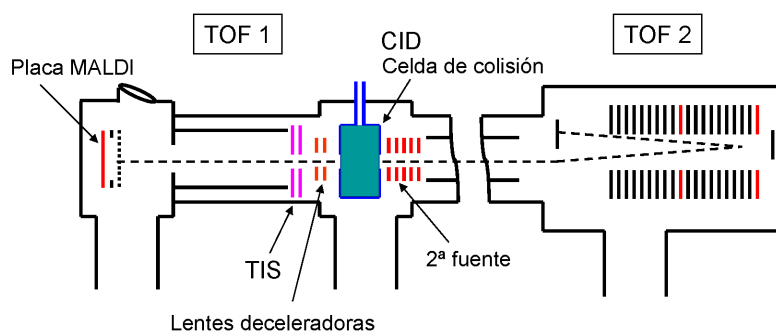


Figura 23. Esquema de un instrumento MALDI-TOF/TOF. Adaptación de una figura contenida en el artículo *De novo sequencing of peptides using MALDI/TOF-TOF* (Yergey et al., 2002), de la *American Society for Mass Spectrometry*.

Otro diseño del TOF/TOF en tandem utiliza una celda LIFT para la postaceleración a mayores energías. Además de la celda de colisión, contiene un sistema TIS que actúa como barrera selectiva de iones, una celda LIFT para elevar la energía potencial, y un dispositivo de supresión metaestable para eliminar los precursores no fragmentados (Suckau et al., 2003). Como se puede ver en la **Figura 24**, constan de un solo tubo de tiempo de vuelo con un acelerador de iones intermedio, mientras que los TOF/TOF tradicionales constan de dos TOF separados por una cámara de colisión para generar fragmentación por CID. Los TOF/TOF tipo LIFT no generan fragmentación sino que aprovechan los iones metaestables generados durante la ionización y aceleración de los iones.

Este tipo de instrumentos también pueden ir acoplados a un sistema de cromatografía líquida (LC-MALDI-TOF/TOF), de manera que tras la separación, las sucesivas fracciones peptídicas que eluyen en la columna, se van depositando de forma automática en la placa MALDI.

El MALDI-TOF/TOF se ha utilizado en el estudio de los primeros cambios postmortem en músculo de becerro (Jia et al., 2006b), identificándose un total de cinco proteínas en los músculos *Longissimus dorsi* y *Semitendinosus*.

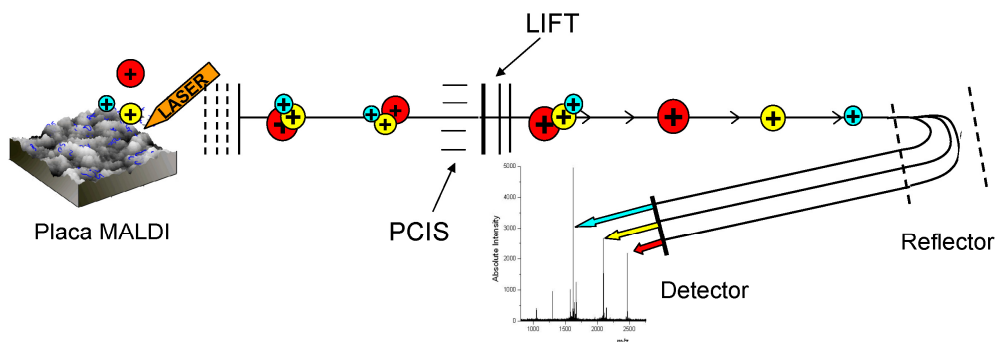


Figura 24. Esquema de un analizador de tipo MALDI-TOF/TOF con celda LIFT.

3.2.3.2.3. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

Una técnica alternativa para separar e identificar péptidos es la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas (Watson y Sparkman, 2007a). Cuando se emplean técnicas de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, el método de ionización más comúnmente empleado es la ionización por electrospray (ESI) (Fenn et al., 1990; Dass, 2007a; Watson y Sparkman, 2007b).

La ionización por electrospray se puede aplicar a una gran variedad de muestras líquidas y consiste en hacer pasar la muestra a través de una aguja hueca sometida a un campo eléctrico (5-10 kV/cm), de forma que se forman pequeñas gotas cargadas eléctricamente. Las gotas son de 1 μm de diámetro y tienen una carga neta que hace que sean atraídas a un electrodo a través de una corriente de gas inerte. Las gotas se mueven a contracorriente en el gas, el cual evapora parte del disolvente en un proceso llamado desolvatación. Como consecuencia de esto, las gotas se encojen y los iones que se encuentran en la superficie se ven forzados a aproximarse entre sí hasta que, en cierto momento, la fuerza de repulsión entre ellos se hace más fuerte que la tensión superficial que los mantenía unidos, provocando

que las gotas se rompan en otras más pequeñas. Éstas continuarán perdiendo disolvente hasta que los iones quedan en fase gaseosa y pasan al analizador (ver **Figura 25**).

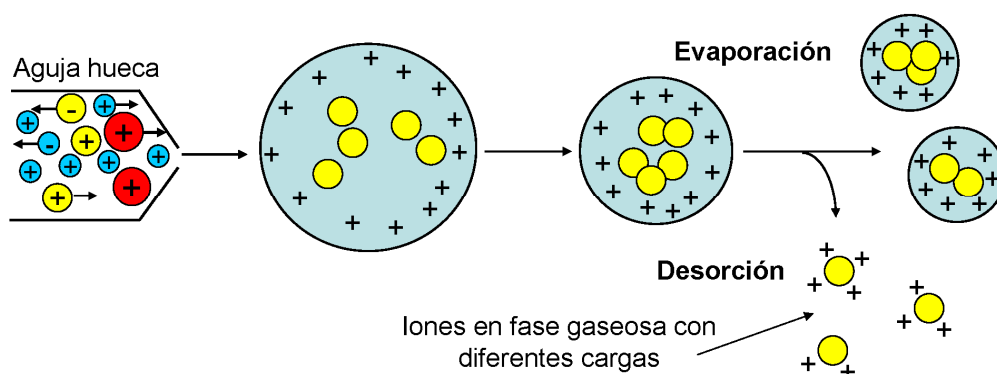


Figura 25. Representación esquemática de la ionización por electrospray.

El último avance de este tipo de ionización ha sido la introducción de microcapilares de borosilicato recubiertos de oro para la inyección de la muestra en el espectrómetro. A esta técnica se la ha denominado nanoelectrospray y permite analizar volúmenes de muestra de 1 - 2 μL consiguiendo una sensibilidad del orden de femtomoles (Wood et al., 2003).

La principal diferencia entre la ionización por ESI o por MALDI es que la ionización por ESI suele generar iones con varias cargas $(M + nH)^{n+}$ a diferencia de los iones monocargados que se obtienen con la ionización MALDI. El espectro de masas que se obtiene puede por tanto mostrar varios picos correspondientes a la misma secuencia peptídica pero con diferentes cargas. Gracias a esto es posible analizar muestras de alto peso molecular por espectrometría de masas dentro de un estudio de intervalo de masas moderado.

Como se ha comentado anteriormente, los analizadores de masas más comunes que suelen combinarse con la fuente de ionización por electrospray son los cuadrupolos, las trampas iónicas o los instrumentos híbridos cuadrupolo-trampa iónica, los cuadrupolo-tiempo de vuelo, y los triple cuadrupolo.

ESPECTRÓMETRO DE MASAS CUADRUPOLO

El espectrómetro de masas cuadrupolar es uno de los analizadores de masas más utilizados, ya que se trata de un instrumento compacto y robusto y, además, presenta la ventaja de su elevada velocidad de barrido. Este analizador consta de cuatro barras cilíndricas paralelas que actúan como electrodos. Las barras opuestas se conectan eléctricamente, un par al polo positivo y el otro al negativo, y se le aplican potenciales variables de corriente continua (DC) y de radiofrecuencia (AC) (ver **Figura 26**).

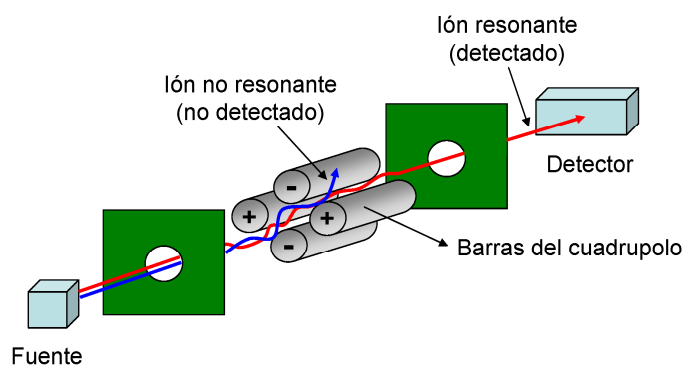


Figura 26. Esquema de un analizador de tipo cuadrupolo.

Para obtener un espectro de masas con este dispositivo, los iones se aceleran en el espacio entre las barras mediante un potencial de 5 a 10 V. Entre tanto, las tensiones de corriente continua y alterna se incrementan simultáneamente manteniendo constante su relación. Esto induce un movimiento ondulatorio en los iones sincronizado en cada momento con el voltaje aplicado. Solo los iones de una determinada relación m/z que oscilan de una manera moderada serán capaces de atravesar completamente el canal central del analizador y llegar al detector.

En función de los potenciales DC y AC aplicados, seleccionamos aquellos iones que nos interesan, por tanto este analizador actúa como un filtro y se puede usar en dos modos de trabajo: (i) SIM, (single ion monitoring), donde se selecciona tan solo la m/z del analito de interés, y (ii) barrido de iones, donde se recogen sucesivamente todos los iones de un determinado rango de m/z (Gross, 2004; Dass, 2007a).

ESPECTRÓMETRO DE MASAS DE TRAMPA IÓNICA

Una trampa de iones es un dispositivo en el que los cationes o aniones en estado gaseoso pueden formarse y quedar retenidos durante largos periodos de tiempo por la acción de campos eléctricos y/o magnéticos (ver **Figura 27**).

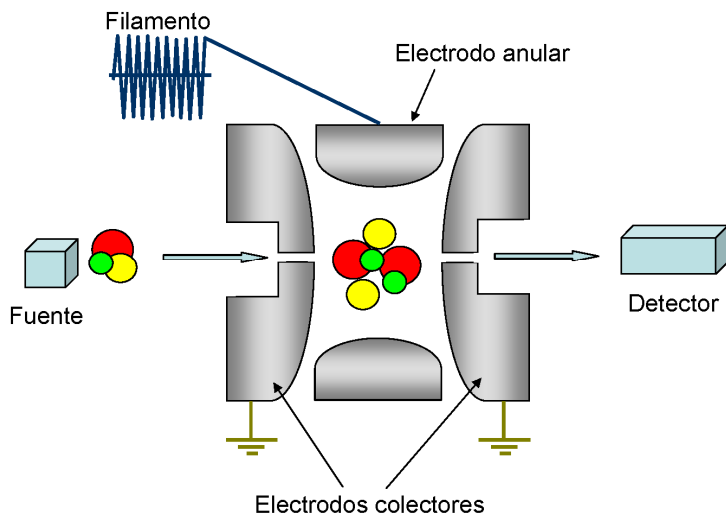


Figura 27. Diagrama esquemático de un analizador del tipo trampa iónica.

Este tipo de analizadores consta de un electrodo anular y un par de electrodos colectores. Al electrodo anular se le aplica un potencial de AC variable mientras que los dos electrodos colectores están conectados a tierra. Los iones con un valor de m/z adecuado circulan en una órbita estable dentro de la cavidad que está rodeada por el anillo. Cuando se incrementa el potencial de AC, las órbitas de los iones más pesados llegan a estabilizarse, mientras que las de los más ligeros se desestabilizan y atraviesan la salida hacia el exterior. Normalmente los iones son expulsados en orden de m/z creciente mediante cambios graduales en los potenciales (Dass, 2007a).

Este tipo de analizadores se ha aplicado al estudio de los cambios postmortem en músculo de trucha (Bauchart et al., 2007a), así como en la caracterización e identificación de péptidos pequeños generados por digestión de pescado y carne

(Bauchart et al., 2007b). En ambos casos, el uso de la trampa iónica se combinó con la espectrometría de masas MALDI-TOF.

ESPECTRÓMETRO DE TRANSFORMADA DE FOURIER

La parte esencial de un instrumento de transformada de Fourier es una trampa de iones en la que éstos circulan en órbitas bien definidas durante largos periodos. Este analizador está basado en la acción que un campo magnético ejerce sobre una partícula cargada (ión) que gira en un campo de radiofrecuencia. Por medio del campo magnético, los iones son dirigidos al interior de una celda donde giran describiendo una órbita de diámetro reducido y mínima frecuencia. Por aplicación de una señal de radiofrecuencia, los iones son excitados a describir órbitas espirales de amplitud creciente. Llega un momento en que la órbita descrita es tal que alcanza el diámetro igual a la distancia de separación de dos electrodos detectores, momento en el que los iones son detectados originando una imagen de corriente función directa de su relación masa/carga. Esta imagen de corriente es integrada mediante una transformada de Fourier y convertida en una señal proporcional a su intensidad. La principal ventaja de este tipo de instrumentos está en la altísima precisión en la medida de masas ($> 0.001\%$) y en su poder de resolución casi ilimitado (superior a 10^6). Por el contrario, el nivel de vacío es un parámetro crítico y su coste es muy elevado (Gross, 2004; Dass, 2007a).

ESPECTRÓMETRO DE MASAS ORBITRAP

Recientemente se ha introducido un nuevo tipo de espectrómetro de masas denominado orbitrap (Hu et al., 2005). Este sistema se basa en una trampa en la que los iones orbitan alrededor de un electrodo central axial con un campo electrostático equilibrado con fuerzas centrífugas. La **Figura 28**, que representa un orbitrap, muestra el electrodo central axial en forma de huso, situado dentro de un electrodo exterior coaxial en forma de barril.

Los iones 'atrapados' experimentan una rotación alrededor del electrodo central combinada con oscilaciones a lo largo de dicho eje. La frecuencia de esta oscilación harmónica depende de la velocidad a la que se mueve el ión y es inversamente

proporcional a la raíz cuadrada de la ratio masa/carga (m/z). Tanto los modos de ionización MALDI como ESI se han combinado con el orbitrap en numerosas aplicaciones. Una incorporación reciente al mundo de los espectrómetros de masas en tándem es una trampa iónica lineal (LTQ) combinada con un orbitrap (Yates et al., 2006). La principal característica de este instrumento es una trampa lineal curvilínea que colecta los iones del LTQ y los inyecta ortogonalmente en el orbitrap.

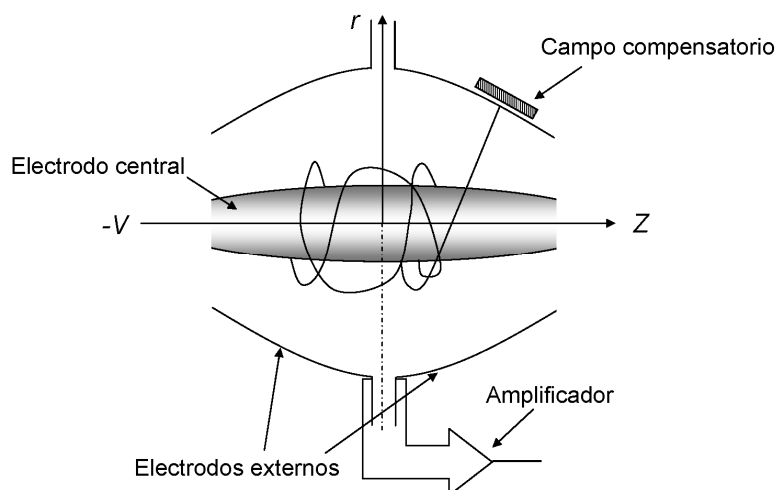


Figura 28. Esquema básico de un orbitrap. Adaptación de una figura contenida en el artículo *The orbitrap: A new mass spectrometer* (Hu et al., 2005).

ESPECTRÓMETRO DE MASAS TRIPLE CUADRUPOLO (QQQ)

Se trata de uno de los espectrómetros de masas en tándem más utilizados. En este caso, la muestra se introduce en una fuente de ionización blanda y, seguidamente, los iones son acelerados en la primera etapa, o separados de los iones progenitores mediante un filtro de cuadrupolo ordinario. Los iones separados más rápidos pasan entonces a un segundo cuadrupolo, que es una cámara de colisiones donde tiene lugar la posterior ionización de los iones progenitores producida en el primer cuadrupolo. El segundo cuadrupolo opera en modo de radiofrecuencia única, esto es, no se aplica ningún potencial de corriente continua a las barras. Este sistema proporciona un procedimiento muy eficaz para enfocar los iones dispersados pero no

actúa como un filtro de masas. Se bombea helio a esa cámara, dando una presión de 10^{-3} a 10^{-4} torr. Aquí tiene lugar una posterior ionización como consecuencia de las colisiones entre los iones progenitores, que se mueven rápidamente, con los átomos de helio de la cámara. Los iones hijos resultantes, pasan al tercer cuadrupolo, donde son sometidos a un barrido y registrados de la manera habitual (Dass, 2007b).

ESPECTRÓMETRO DE MASAS CUADRUPOLO Y TRAMPA IÓNICA EN TÁNDEM

Este tipo de espectrómetro de masas se caracteriza porque todos los pasos de MS/MS se llevan a cabo en el mismo espacio pero siguiendo una secuencia temporal. Un experimento típico de MS/MS en este tipo de instrumentos implica tres etapas consecutivas: el aislamiento del ión, la excitación/disociación del ión y el análisis de las masas de los iones producidos (Gross, 2004; Dass, 2007a). Esta técnica se ha utilizado en la identificación de péptidos indicadores de adulteración en carne con proteínas de soja (Leitner et al., 2006).

ESPECTRÓMETRO DE MASAS CUADRUPOLO Y TIEMPO DE VUELO EN TÁNDEM

La forma más fácil de describir este tipo de instrumentos sería decir que se trata de un triple cuadrupolo al cual se le ha sustituido la última sección del cuadrupolo por un analizador de tiempo de vuelo. Muchas veces encontramos un cuadrupolo adicional (Q0) con el fin de aportar humedad (no representado en la **Figura 29**) así que este espectrómetro de masas consiste en tres cuadrupolos, Q0, Q1 y Q2, seguidos de un analizador tipo TOF con una inyección de iones ortogonal. En el Q1 se consigue aislar un determinado ión (ión precursor). Este ión se fragmenta en una celda de colisión (Q2) aplicando una determinada energía por medio del gas de colisión (normalmente helio) (ver **Figura 29**).

Los fragmentos generados característicos de nuestro analito se analizan en el analizador de tiempo de vuelo tal y como se ha descrito anteriormente. En algunos instrumentos comerciales, los cuadrupolos Q0 y Q2 se reemplazan por hexapolos, pero su principio de funcionamiento es el mismo (Dass, 2007b).

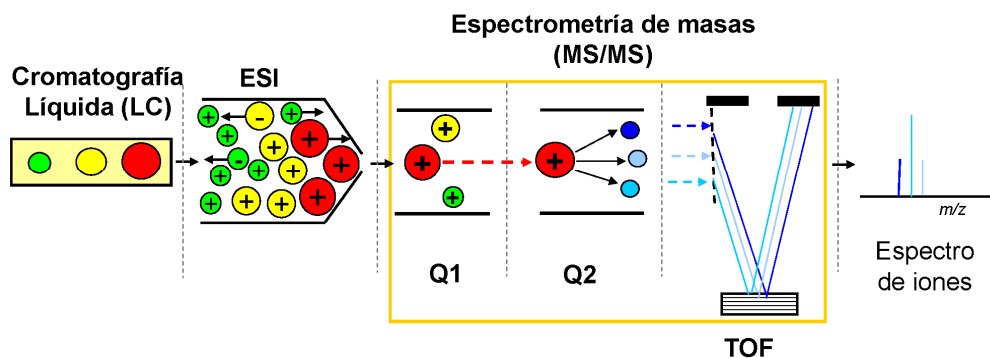


Figura 29. Esquema del funcionamiento de un espectrómetro de masas cuadrupolo tiempo de vuelo en tándem.

4. Bibliografía

- Abe, H., Dobson, G. P., Hoeger, U., & Parkhouse, W. S. (1985). Role of histidine-related compounds to intracellular buffering in fish skeletal-muscle. *American Journal of Physiology* **249**(4), R449-R454.
- Al-Jassabi, S. (2000). Purification and characterization of cathepsin L from skeletal muscle of the lizard *Agama stellio stellio*. *Biochemistry-Moscow* **65**(8), 959-962.
- Aldanova, N. A., Vinograd, E. I., Kazaryan, S. A., Rozynov, B. V., & Shemyaki, M. M. (1970). Determination of amino acid sequence in peptides by a combination of mass spectrometry and Edman degradation. *Biokhimiya* **35**(5), 854.
- Aliani, M. & Farmer, L. J. (2005). Precursors of chicken flavor. I. Determination of some flavor precursors in chicken muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**(15), 6067-6072.
- Alpert, A. J. (1990). Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic-acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography* **499**, 177-196.
- Aristoy, M. C., Mora, L., Hernández-Cázares, A. S., & Toldrá, F. (2009). Nucleotides and nucleosides. In *Handbook of seafood and seafood products analysis* (Eds L. M. L. Nollet & F. Toldrá), pp. 57-68. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press.
- Aristoy, M. C., Soler, C., & Toldrá, F. (2004). A simple, fast and reliable methodology for the analysis of histidine dipeptides as markers of the presence of animal origin proteins in feeds for ruminants. *Food Chemistry* **84**(3), 485-491.

- Aristoy, M. C. & Toldrá, F. (2004). Histidine dipeptides HPLC-based test for the detection of mammalian origin proteins in feeds for ruminants. *Meat Science* **67**(2), 211-217.
- Aristoy, M. C. & Toldrá, F. (1998). Concentration of free amino acids and dipeptides in porcine skeletal muscles with different oxidative patterns. *Meat Science* **50**(3), 327-332.
- Aristoy, M. C. & Toldrá, F. (1995). Isolation of flavor peptides from raw pork meat and dry-cured ham. In *Food flavors: Generation, analysis and process influence* (Ed G. Charalambous), pp. 1323-1344. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science.
- Arneth, W. (1998). The chemical bases of reddening. *Fleischwirtschaft* **78**(8), 868.
- Arnoldi, A., Arnoldi, C., Baldi, O., & , Griffini, A. (1987). Strecker degradation of leucine and valine in a lipidic model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **35**(6), 1035-1038.
- Balsom, P. D., Soderlund, K., & , Ekblom, B. (1994). Creatine in humans with special reference to creatine supplementation. *Sports Medicine* **18**(4), 268-280.
- Battle, N., Aristoy, M. C., & , Toldrá, F. (2000). Early postmortem detection of exudative pork meat based on nucleotide content. *Journal of Food Science* **65**(3), 413-416.
- Battle, N., Aristoy, M. C., & , Toldrá, F. (2001). ATP metabolites during aging of exudative and nonexudative pork meats. *Journal of Food Science* **66**(1), 68-71.
- Bauchart, C., Chambon, C., Mirand, P. P., Savary-Auzeloux, I., Remond, D., & , Morzel, M. (2007a). Peptides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle subjected to ice storage and cooking. *Food Chemistry* **100**(4), 1566-1572.
- Bauchart, C., Morzel, M., Chambon, C., Mirand, P. P., Reynes, C., Buffiere, C., & , Redmond, D. (2007b). Peptides reproducibly released by in vivo digestion of beef meat and trout flesh in pigs. *British Journal of Nutrition* **98**(6), 1187-1195.
- Beltrán, J. A., Jaime, I., Santolaria, P., Sanudo, C., Alberti, P., & , Roncalés, P. (1997). Effect of stress-induced high post-mortem pH on protease activity and tenderness of beef. *Meat Science* **45**(2), 201-207.
- Bermodso, M. A., Ericsson, L. H., & , Walsh, K. A. (1970). Improved phenylthiohydantoin-amino acid (PTH) yields during automatic Edman degradation. *Federation Proceedings* **29**(2), A728.
- Bistran, B. R., Blackburn, G. L., Sherman, M., & , Scrimshaw, N. S. (1975). Therapeutic index of nutritional depletion in hospitalized patients. *Surgery Gynecology & Obstetrics* **141**(4), 512-516.
- Bodwell, J. E. & Meyer, W. L. (1981). Purification and characterization of carboxypeptidase-A from rat skeletal-muscle. *Biochemistry* **20**(10), 2767-2777.

- BOE (2007). *Real Decreto 1469/2007, del 2 de noviembre del 2007, por el que se aprueba la Norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo Ibéricos*. Boletín Oficial del Estado. Núm. **159**, 18679-18687.
- BOE (1983). *Orden del 29 de junio de 1983, por la que se aprueban las normas de calidad para el jamón cocido y fiambre de jamón, paeta cocida y fiambre de paleta, y magro de cerdo cocido y fiambre de magro de cerdo*. Boletín Oficial del Estado. Núm. **264**, 45087-45104.
- Borgese, T. A., Nagel, R. L., Roth, E., Murphy, D., & , Harrington, J. (1978). Guanosine triphosphate (GTP) - Major organic phosphate in erythrocytes of *Elasmobranch mustelus-canis* (smooth dogfish). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **60**(3), 317-321.
- 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 the Science of Food and Agriculture* **63**(1), 69-75.
- Buscailhon, S., Gandemer, G., & , Monin, G. (1994). Time-related changes in intramuscular lipids of French dry-cured ham. *Meat Science* **37**(2), 245-255.
- Calkins, C. R., Dutson, T. R., Smith, G. C., & , Carpenter, Z. L. (1982). Concentration of creatine-phosphate, adenine-nucleotides and their derivatives in electrically stimulated and non-stimulated beef muscle. *Journal of Food Science* **47**(4), 1350-1353.
- Cambero, M. I., Seuss, I., & , Honikel, K. O. (1992). Flavor compounds of beef broth as affected by cooking temperature. *Journal of Food Science* **57**(6), 1285-1290.
- 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**(5), 968-972.
- Casey, A., ConstantinTeodosiu, D., Howell, S., Hultman, E., & , Greenhaff, P. L. (1996). Creatine ingestion favorably affects performance and muscle metabolism during maximal exercise in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **34**(1), E31-E37.
- Cena, P., Jaime, I., Beltrán, J. A., & , Roncalés, P. (1992). Proteolytic activity of isolated lamb calpains on myofibrils under the conditions of pH, Ca²⁺ concentration and temperature existing in postmortem muscle. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung* **194**(3), 248-251.
- Chasco, J., Lizaso, G., & , Beriain, M. J. (1996). Cured colour development during sausage processing. *Meat Science* **44**(3), 203-211.
- Colilla, F. J., Yadav, S. P., Brew, K., & , Mendez, E. (1991). Peptide maps at picomolar levels obtained by reversed-phase high-performance liquid-chromatography and precolumn derivatization with phenyl isothiocyanate - Microsequencing of phenylthiocarbamyl peptides. *Journal of Chromatography* **548**(1-2), 303-310.

-
- Comisión Europea, Desarrollo Rural y Agricultura (2009). Acceso a http://ec.europa.eu/agriculture/agrista/index_en.htm y a <http://ec.europa.eu/agriculture/publi/fact/> con fecha de diciembre de 2009.
- Cornet, M. & Bousset, J. (1998). Free amino acids and dipeptides in porcine muscles: differences between 'red' and 'white' muscles. *Meat Science* **51**(3), 215-219.
- Cremer, D. R. & Eichner, K. (2000). The reaction kinetics for the formation of Strecker aldehydes in low moisture model systems and in plant powders. *Food Chemistry* **71**(1), 37-43.
- Dass, C. (2007a). Mass analysis and ion detection. In *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*, pp. 67-118: Wiley-Interscience.
- Dass, C. (2007b). Tandem mass spectrometry. In *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*, pp. 119-150: Wiley-Interscience.
- Del Campo, G., Irastorza, A., & Casado, J. A. (1995). Spectrophotometric simultaneous determination of creatinine and creatine by flow-injection with reagent injection. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **352**(6), 557-561.
- Desmond, E. M., Kenny, T. A., Ward, P., & Sun, D. W. (2000). Effect of rapid and conventional cooling methods on the quality of cooked ham joints. *Meat Science* **56**(3), 271-277.
- Di Luccia, A., Picariello, G., Cacace, G., Scaloni, A., Faccia, M., Liuzzi, V., Alvitì, G., & Musso, S. S. (2005). Proteomic analysis of water soluble and myofibrillar protein changes occurring in dry-cured hams. *Meat Science* **69**(3), 479-491.
- Dingle, J. R., Hines, J. A., & Fraser, D. I. (1968). Post-mortem degradation of adenine nucleotides in muscle of *Lobster homarus americanus*. *Journal of Food Science* **33**(1), 100-&.
- Djaballah, H. & Rivett, A. J. (1992). Peptidylglutamyl peptide-hydrolase activity of the multicatalytic proteinase complex - Evidence for a new high-affinity site, analysis of cooperative kinetics, and the effect of manganese ions. *Biochemistry* **31**(16), 4133-4141.
- Djenane, D., Martínez, L., Sánchez-Escalante, A., Beltrán, J. A., & Roncalés, P. (2004). Antioxidant effect of carnosine and carnitine in fresh beef steaks stored under modified atmosphere. *Food Chemistry* **85**(3), 453-459.
- Dunnett, M. & Harris, R. C. (1997). High-performance liquid chromatographic determination of imidazole dipeptides, histidine, 1-methylhistidine and 3-methylhistidine in equine and camel muscle and individual muscle fibres. *Journal of Chromatography B* **688**(1), 47-55.
- Dunnett, M., Harris, R. C., & Orme, C. E. (1991). Reverse-phase ion-pairing high-performance liquid-chromatography of phosphocreatine, creatine and creatinine in equine muscle. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation* **51**(2), 137-141.

- Dvorak, Z. (1988). Flow-injection determination of creatine in animal-tissues. *Analytica Chimica Acta* **208**(1-2), 307-312.
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M., & Kaufmann, S. H. (1999). Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry* **68**, 383-424.
- Estévez, M., Morcuende, D., & Ventanas, S. (2009). Determination of oxidation. In *Handbook of processed meats and poultry analysis* (Eds L. M. L. Nollet & F. Toldrá), pp. 141-162. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Etherington, D. J. (1984). The contribution of proteolytic-enzymes to postmortem changes in muscle. *Journal of Animal Science* **59**(6), 1644-1650.
- Fenn, J. B. (2003). Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture). *Angewandte Chemie-International Edition* **42**(33), 3871-3894.
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., & Whitehouse, C. M. (1989). Electrospray ionization for mass-spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**(4926), 64-71.
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., & Whitehouse, C. M. (1990). Electrospray ionization-Principles and practice. *Mass Spectrometry Reviews* **9**(1), 37-70.
- Fernández, X., Gilbert, S., & Vendevre, J. L. (2002). Effects of halothane genotype and pre-slaughter treatment on pig meat quality. Part 2. Physico-chemical traits of cured-cooked ham and sensory traits of cured-cooked and dry-cured hams. *Meat Science* **62**(4), 439-446.
- Fernández, X., Mourot, J., Lebret, B., Gilbert, S., & Monin, G. (2000). Influence of intramuscular fat content on lipid composition, sensory qualities and consumer acceptability of cured cooked ham. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**(6), 705-710.
- Fish, W. W. (1991). A method for the quantitation of 5'-mononucleotides in foods and food ingredients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **39**(6), 1098-1101.
- Flores, M., Alasnier, C., Aristoy, M. C., Navarro, J. L., Gandemer, G., & Toldrá, F. (1996a). Activity of aminopeptidase and lipolytic enzymes in five skeletal muscles with various oxidative patterns. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **70**(1), 127-130.
- Flores, M., Aristoy, M. C., & Toldrá, F. (1996b). HPLC purification and characterization of soluble alanyl aminopeptidase from porcine skeletal muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**(9), 2578-2583.
- Flores, M., Aristoy, M. C., & Toldrá, F. (1997a). Curing agents affect aminopeptidase activity from porcine skeletal muscle. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung A-Food Research and Technology* **205**(5), 343-346.

- Flores, M., Aristoy, M. C., Spanier, A. M., & , Toldra, F. (1997b). Non-volatile components effects on quality of "Serrano" dry-cured ham as related to processing time. *Journal of Food Science* **62**(6), 1235-1239.
- Flores, M., Aristoy, M. C., & , Toldrá, F. (1998a). Feedback inhibition of porcine muscle alanyl and arginyl aminopeptidases in cured meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**(12), 4982-4986.
- Flores, M., Spanier, A. M., & Toldrá, F. (1998b). Flavour analysis of dry-cured ham. In *Flavor of meat, products and seafood* (Ed F. Shahidi), pp. 320-341. London, UK: Blackie A&P, Chapman & Hall.
- Flores, M., Armero, E., Aristoy, M. C., & , Toldra, F. (1999). Sensory characteristics of cooked pork loin as affected by nucleotide content and post-mortem meat quality. *Meat Science* **51**(1), 53-59.
- Fogaça, A. C., Lorenzini, D. M., Kaku, L. M., Esteves, E., Bulet, P., & , Daffre, S. (2004). Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Developmental and Comparative Immunology* **28**(3), 191-200.
- Fraterman, S., Zeiger, U., Khurana, T. S., Rubinstein, N. A., & , Wilm, M. (2007). Combination of peptide OFFGEL fractionation and label-free quantitation facilitated proteomics profiling of extraocular muscle. *Proteomics* **7**(18), 3404-3416.
- Fujita, T., Hori, Y., Otani, T., Kunita, Y., Sawa, S., Sakai, S., Tanaka, Y., Takagahara, I., & , Nakatani, Y. (1988). Applicability of the K_0 value as an index of freshness for porcine and chicken muscles. *Agricultural and Biological Chemistry* **52**(1), 107-112.
- Fuller, N. J. & Elia, M. (1988). Factors influencing the production of creatinine - Implications for the determination and interpretation of urinary creatinine and creatine in man. *Clinica Chimica Acta* **175**(3), 199-210.
- Gábor, E., Gaspar, O., & , Vamos, E. (1984). Quantitative-determination of muscle protein in meat-products by measuring creatine content. *Acta Alimentaria* **13**(1), 13-22.
- Geesink, G. H., Kuchay, S., Chishti, A. H., & , Koohmaraie, M. (2006). Micro-calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. *Journal of Animal Science* **84**(10), 2834-2840.
- Godiksen, H., Morzel, M., Hyldig, G., & , Jessen, F. (2009). Contribution of cathepsins B, L and D to muscle protein profiles correlated with texture in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Chemistry* **113**(4), 889-896.
- Goll, D. E., Dayton, W. R., Singh, I., & , Robson, R. M. (1991). Studies of the Alpha-Actinin Actin Interaction in the Z-Disk by Using Calpain. *Journal of Biological Chemistry* **266**(13), 8501-8510.

- Goll, D. E., Thompson, V. F., Taylor, R. G., & , Christiansen, J. A. (1992). Role of the calpain system in muscle growth. *Biochimie* **74**(3), 225-237.
- Greaser, M. L. (1986). Conversion of muscle to meat. In *Muscle as food* (Ed P. J. Bechtel), pp. 37-101. Orlando: Academic Press.
- Gross, J. H. (2004). Instrumentation. In *Mass spectrometry* , pp. 145-173. Berlin: Springer-Verlag.
- Gutiérrez, G. (1991). Cellular-energy metabolism during hypoxia. *Critical Care Medicine* **19**(5), 619-626.
- Hansen-Möller, J., Hinrichsen, L., & , Jacobsen, T. (1997). Evaluation of peptides generated in Italian-style dry-cured ham during processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**(8), 3123-3128.
- Heinonen, K., Nanto-Salonen, K., Komu, M., Erkintalo, M., Alanen, A., Heinonen, O. J., Pulkki, K., Nikoskelainen, E., Sipila, I., & , Simell, O. (1999). Creatine corrects muscle P-31 spectrum in gyrate atrophy with hyperornithinaemia. *European Journal of Clinical Investigation* **29**(12), 1060-1065.
- Henzel, W. J., Billeci, T. M., Stults, J. T., Wong, S. C., Grimley, C., & , Watanabe, C. (1993). Identifying proteins from 2-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein-sequence databases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**(11), 5011-5015.
- Hergenroeder, G. W., Redell, J. B., Moore, A. N., & , Dash, P. K. (2008). Biomarkers in the clinical diagnosis and management of traumatic brain injury. *Molecular Diagnosis & Therapy* **12**(6), 345-358.
- Hidalgo, F. J. & Zamora, R. (2004). Strecker-type degradation produced by the lipid oxidation products 4,5-epoxy-2-alkenals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**(23), 7126-7131.
- Hinrichsen, L. L. & Andersen, H. J. (1994). Volatile compounds and chemical-changes in cured pork - Role of 3 halotolerant bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **42**(7), 1537-1542.
- Honikel, K. O. & Fischer, C. (1977). Rapid method for detection of PSE and DFD porcine muscles. *Journal of Food Science* **42**(6), 1633-1636.
- Hörth, P., Miller, C. A., Preckel, T., & , Wenz, C. (2006). Efficient fractionation and improved protein identification by peptide OFFGEL electrophoresis. *Molecular & Cellular Proteomics* **5**(10), 1968-1974.
- Hu, Q. Z., Noll, R. J., Li, H. Y., Makarov, A., Hardman, M., & , Cooks, R. G. (2005). The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry* **40**(4), 430-443.

-
- Huang, M., Huang, F., Xu, X. L., & Zhou, G. H. (2009). Influence of caspase3 selective inhibitor on proteolysis of chicken skeletal muscle proteins during post mortem aging. *Food Chemistry* **115**(1), 181-186.
- Huang, S. C. & Kuo, J. C. (2000). Concentrations and antioxidative activity of anserine and carnosine in poultry meat extracts treated with demineralization and papain. *Proc.Natl.Sci.Counc.Repub.China B* **24**(4), 193-201.
- Huff-Lonergan, E., Mitsuhashi, T., Beekman, D. D., Parrish, F. C., Olson, D. G., & Robson, R. M. (1996). Proteolysis of specific muscle structural proteins by mu-calpain at low pH and temperature is similar to degradation in postmortem bovine muscle. *Journal of Animal Science* **74**(5), 993-1008.
- Huff-Lonergan, E., Parrish, F. C., & Robson, R. M. (1995). Effects of postmortem aging time, animal age, and sex on degradation of titin and nebulin in bovine *Longissimus* muscle. *Journal of Animal Science* **73**(4), 1064-1073.
- Hughes, M. C., Kerry, J. P., Arendt, E. K., Kenneally, P. M., McSweeney, P. L. H., & O'Neill, E. E. (2002). Characterization of proteolysis during the ripening of semi-dry fermented sausages. *Meat Science* **62**(2), 205-216.
- Hwang, I. H., Park, B. Y., Kim, J. H., Cho, S. H., & Lee, J. M. (2005). Assessment of postmortem proteolysis by gel-based proteome analysis and its relationship to meat quality traits in pig longissimus. *Meat Science* **69**(1), 79-91.
- James, B. W., Goodband, R. D., Unruh, J. A., Tokach, M. D., Nelssen, J. L., & Dritz, S. S. (2002). A review of creatine supplementation and its potential to improve pork quality. *Journal of Applied Animal Research* **21**(1), 1-16.
- James, P., Quadroni, M., Carafoli, E., & Gonnet, G. (1993). Protein identification by mass profile fingerprinting. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **195**(1), 58-64.
- Jauhainen, T. & Korpela, R. (2007). Milk peptides and blood pressure. *Journal of Nutrition* **137**(3), 825S-829S.
- Jia, X. H., Hildrum, K. I., Westad, F., Kummen, E., Aass, L., & Hollung, K. (2006a). Changes in enzymes associated with energy metabolism during the early post mortem period in Longissimus thoracis bovine muscle analyzed by proteomics. *Journal of Proteome Research* **5**(7), 1763-1769.
- Jia, X. H., Hollung, K., Therkildsen, M., Hildrum, K. I., & Bendixen, E. (2006b). Proteome analysis of early post-mortem changes in two bovine muscle types: M-longissimus dorsi and M-semi-tendinosus. *Proteomics* **6**(3), 936-944.
- Jones, N. R. (1969). Meat and Fish Flavors - Significance of Ribomononucleotides and Their Metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **17**(4), 712.

- Jones, N. R., Murray, C. K., & , Murray, J. (1964). Rapid estimations of hypoxanthine concentrations as indices of freshness of chill-stored fish. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **15**(11), 763.
- Karas, M., Bahr, U., Ingendoh, A., & , Hillenkamp, F. (1989). Laser desorption ionization mass-spectrometry of proteins of mass 100 000 to 250 000 Dalton. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **28**(6), 760-761.
- Karube, I., Matsuoka, H., Suzuki, S., Watanabe, E., & , Toyama, K. (1984). Determination of fish freshness with an enzyme sensor system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **32**(2), 314-319.
- Kemp, C. M., Parr, T., Bardsley, R. G., & , Buttery, P. J. (2006a). Comparison of the relative expression of caspase isoforms in different porcine skeletal muscles. *Meat Science* **73**(3), 426-431.
- Kemp, C. M., Bardsley, R. G., & , Parr, T. (2006b). Changes in caspase activity during the postmortem conditioning period and its relationship to shear force in porcine longissimus muscle. *Journal of Animal Science* **84**(10), 2841-2846.
- Kjaersgard, I. V. H. & Jessen, F. (2003). Proteome analysis elucidating post-mortem changes in cod (*Gadus morhua*) muscle proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**(14), 3985-3991.
- Kley, R. A., Vorgerd, M., & , Tarnopolsky, M. A. (2007). Creatine for treating muscle disorders. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (1).
- Koohmaraie, M. (1994). Muscle proteinases and meat aging. *Meat Science* **36**(1-2), 93-104.
- Koohmaraie, M. (1990). Quantification of Ca²⁺-dependent protease activities by hydrophobic and ion-exchange chromatography. *Journal of Animal Science* **68**(3), 659-665.
- Koohmaraie, M. & Geesink, G. H. (2006). Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Science* **74**(1), 34-43.
- Koohmaraie, M., Seideman, S. C., Schollmeyer, J. E., Dutson, T. R., & , Crouse, J. D. (1987). Effect of postmortem storage on Ca⁺⁺-dependent proteases, their inhibitor and myofibril fragmentation. *Meat Science* **19**(3), 187-196.
- Koohmaraie, M., Whipple, G., Kretchmar, D. H., Crouse, J. D., & , Mersmann, H. J. (1991). Postmortem proteolysis in *Longissimus* muscle from beef, lamb and pork carcasses. *Journal of Animal Science* **69**(2), 617-624.
- Kraemer, W. J. & Volek, J. S. (1999). Creatine supplementation - Its role in human performance. *Clinics in Sports Medicine* **18**(3), 651.
- Kreider, R. B. (2003). Effects of creatine supplementation on performance and training adaptations. *Molecular and Cellular Biochemistry* **244**(1), 89-94.

-
- Kuda, T., Fujita, M., Goto, H., & , Yano, T. (2007). Effects of freshness on ATP-related compounds in retorted chub mackerel *Scomber japonicus*. *Lwt-Food Science and Technology* **40**(7), 1186-1190.
- Kulbe, K. D. (1974). Micropolyamide thin-layer chromatography of phenylthiohydantoin amino-acids (PTH) at subnanomolar level - Rapid microtechnique for simultaneous multisample identification after automated Edman degradations. *Analytical Biochemistry* **59**(2), 564-573.
- Kvasnicka, F. & Voldrich, M. (2000). Isotachophoretic determination of creatinine in meat and meat products. *Electrophoresis* **21**(14), 2848-2850.
- Lametsch, R. & Bendixen, E. (2001). Proteome analysis applied to meat science: Characterizing post mortem changes in porcine muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**(10), 4531-4537.
- Lametsch, R., Karlsson, A., Rosenvold, K., Andersen, H. J., Roepstorff, P., & , Bendixen, E. (2003). Postmortem proteome changes of porcine muscle related to tenderness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**(24), 6992-6997.
- Lametsch, R., Roepstorff, P., & , Bendixen, E. (2002). Identification of protein degradation during post-mortem storage of pig meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**(20), 5508-5512.
- Lametsch, R., Roepstorff, P., Moller, H. S., & , Bendixen, E. (2004). Identification of myofibrillar substrates for mu-calpain. *Meat Science* **68**(4), 515-521.
- Laursen, R. A. (1971). Solid-phase Edman degradation - Automatic peptide sequencer. *European Journal of Biochemistry* **20**(1), 89.
- Laursen, R. A., Bonner, A. G., & , Horn, M. J. (1972). Automatic solid-phase Edman degradation - Attachment of lysine and arginine peptides to solid supports. *Federation Proceedings* **31**(2), A445.
- Lehninger (2000). Glycolysis, gluconeogenesis, and the pentose phosphate pathway. In *Lehninger Principles of Biochemistry* (Eds D. L. Nelson & M. M. Cox), pp. 521-559. New York and Basingstoke: W.H. Freeman and Company.
- Leitner, A., Castro-Rubio, F., Marina, M. L., & , Lindner, W. (2006). Identification of marker proteins for the adulteration of meat products with soybean proteins by multidimensional liquid chromatography - Tandem mass spectrometry. *Journal of Proteome Research* **5**(9), 2424-2430.
- Leroy, F., Vasilopoulos, C., Van Hemelryck, S., Falony, G., & , De Vuyst, L. (2009). Volatile analysis of spoiled, artisan-type, modified-atmosphere-packaged cooked ham stored under different temperatures. *Food Microbiology* **26**(1), 94-102.
- Liu, Y., Xu, X. L., & , Zhou, G. H. (2007). Changes in taste compounds of duck during processing. *Food Chemistry* **102**(1), 22-26.

- Lundström, K., Essén-Gustavsson, B., Rundgren, M., Edfors-Lilja, I., & Malmfors, G. (1989). Effect of halothane genotype on muscle metabolism at slaughter and its relationship with meat quality - A within-litter comparison. *Meat Science* **25**(4), 251-263.
- Luong, J. H. T. & Male, K. B. (1992). Development of a new biosensor system for the determination of the hypoxanthine ratio, an indicator of fish freshness. *Enzyme and Microbial Technology* **14**(2), 125-130.
- Luong, J. H. T., Male, K. B., Masson, C., & Nguyen, A. L. (1992). Hypoxanthine ratio determination in fish extract using capillary electrophoresis and immobilized enzymes. *Journal of Food Science* **57**(1), 77-81.
- Maddock, R. J., Bidner, B. S., Carr, S. N., McKeith, F. K., Berg, E. P., & Savell, J. W. (2002). Creatine monohydrate supplementation and the quality of fresh pork in normal and halothane carrier pigs. *Journal of Animal Science* **80**(4), 997-1004.
- Mann, M., Hojrup, P., & Roepstorff, P. (1993). Use of mass-spectrometric molecular-weight information to identify proteins in sequence databases. *Biological Mass Spectrometry* **22**(6), 338-345.
- MARM (2009). Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Gobierno de España. Acceso a <http://www.mapa.es/es/alimentacion/alimentacion.htm> y a <http://www.mapa.es/es/ganaderia/ganaderia.htm> con fecha 15 de octubre del 2009.
- Martín, L., Antequera, T., Ventanas, J., Iteiz-Donoso, R., & Córdoba, J. J. (2001). Free amino acids and other non-volatile compounds formed during processing of Iberian ham. *Meat Science* **59**(4), 363-368.
- Matsuishi, M., Saito, G., Okitani, A., & Kato, H. (2003). Purification and some properties of cathepsin H from rabbit skeletal muscle. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **35**(4), 474-485.
- Mc Bride, M. A. & Parrish, F. C. (1977). The 30,000-Dalton Component of Tender Bovine Longissimus Muscle. *Journal of Food Science* **42**(6), 1627-1629.
- Mc Cain, G. R., Blumer, T. N., Craig, H. B., & Steel, R. G. (1968). Free amino acids in ham muscle during successive aging periods and their relation to flavor. *Journal of Food Science* **33**(2), 142.
- Mc Kenna, M. J., Morton, J., Selig, S. E., & Snow, R. J. (1999). Creatine supplementation increases muscle total creatine but not maximal intermittent exercise performance. *Journal of Applied Physiology* **87**(6), 2244-2252.
- Meynial, I., Paquet, V., & Combes, D. (1995). Simultaneous separation of nucleotides and nucleotide sugars using an ion-pair reversed-phase HPLC - Application for assaying glycosyltransferase activity. *Analytical Chemistry* **67**(9), 1627-1631.

- Michaelidou, A., Katsiari, M. C., Kondyli, E., Voutsinas, L. P., & , Alichanidis, E. (2003). Effect of a commercial adjunct culture on proteolysis in low-fat Feta-type cheese. *International Dairy Journal* **13**(2-3), 179-189.
- Mikami, M., Whiting, A. H., Taylor, M. A. J., Maciewicz, R. A., & , Etherington, D. J. (1987). Degradation of myofibrils from rabbit, chicken and beef by cathepsin-I and lysosomal lysates. *Meat Science* **21**(2), 81-97.
- Monin, G., Marinova, P., Talmant, A., Martin, J. F., Cornet, M., Lanore, D., & , Grasso, F. (1997). Chemical and structural changes in dry-cured hams (Bayonne hams) during processing and effects of the dehairing technique. *Meat Science* **47**(1-2), 29-47.
- Mora, L., Sentandreu, M. A., Koistinen, K. M., Fraser, P. D., Toldrá, F., & , Bramley, P. M. (2009). Naturally generated small peptides derived from myofibrillar proteins in Serrano dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**(8), 3228-3234.
- Mora, L., Sentandreu, M. A., & , Toldrá, F. (2008). Contents of creatine, creatinine and carnosine in porcine muscles of different metabolic types. *Meat Science* **79**(4), 709-715.
- Motilva, M. J. & Toldrá, F. (1993). Effect of curing agents and water activity on pork muscle and adipose subcutaneous tissue lipolytic-activity. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung* **196**(3), 228-232.
- Motilva, M. J., Toldrá, F., Nieto, P., & , Flores, J. (1993a). Muscle lipolysis phenomena in the processing of dry-cured ham. *Food Chemistry* **48**(2), 121-125.
- Motilva, M. J., Toldrá, F., Aristoy, M. C., & , Flores, J. (1993b). Subcutaneous adipose-tissue lipolysis in the processing of dry-cured ham. *Journal of Food Biochemistry* **16**(5), 323-335.
- Nagaraj, N. S., Anilakumar, K. R., & , Santhanam, K. (2005). Postmortem changes in myofibrillar proteins of goat skeletal muscles. *Journal of Food Biochemistry* **29**(2), 152-170.
- Nakai, Y., Nishimura, T., Shimizu, M., & , Arai, S. (1995). Effects of freezing on the proteolysis of beef during storage at 4 degrees C. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **59**(12), 2255-2258.
- Nakatani, Y., Fujita, T., Sawa, S., Otani, T., Hori, Y., & , Takagahara, I. (1986). Changes in ATP-related compounds of beef and rabbit muscles and a new index of freshness of muscle. *Agricultural and Biological Chemistry* **50**(7), 1751-1756.
- Negishi, H., Yamamoto, E., & , Kuwata, T. (1996). The origin of the 30 kDa component appearing during post-mortem ageing of bovine muscle. *Meat Science* **42**(3), 289-303.
- Nguyen, A. L., Luong, J. H. T., & , Masson, C. (1990). Determination of nucleotides in fish-tissues using capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry* **62**(22), 2490-2493.

- Nishimura, T., Rhue, M. R., Okitani, A., & , Kato, H. (1988). Components contributing to the improvement of meat taste during storage. *Agricultural and Biological Chemistry* **52**(9), 2323-2330.
- O'Halloran, G. R., Troy, D. J., Buckley, D. J., & , Reville, W. J. (1997). The role of endogenous proteases in the tenderisation of fast glycolysing muscle. *Meat Science* **47**(3-4), 187-210.
- Okitani, A., Matsuishi, M., Matsumoto, T., Kamoshida, E., Sato, M., Matsukura, U., Watanabe, M., Kato, H., & , Fujimaki, M. (1988). Purification and Some Properties of Cathepsin-B from Rabbit Skeletal-Muscle. *European Journal of Biochemistry* **171**(1-2), 377-381.
- Okitani, A., Matsumoto, T., Kitamura, Y., & , Kato, H. (1981). Purification of cathepsin-D from rabbit skeletal-muscle and its action towards myofibrils. *Biochimica et Biophysica Acta* **662**(2), 202-209.
- Okuma, E. & Abe, H. (1992). Major buffering constituents in animal muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology* **102**(1), 37-41.
- Okumura, T., Yamada, R., & , Nishimura, T. (2003). Survey of conditioning indicators for pork loins: changes in myofibrils, proteins and peptides during postmortem conditioning of vacuum-packed pork loins for 30 days. *Meat Science* **64**(4), 467-473.
- Olson, D. G., Parrish, F. C., Dayton, W. R., & , Goll, D. E. (1977). Effect of postmortem storage and calcium activated factor on myofibrillar proteins of bovine skeletal-muscle. *Journal of Food Science* **42**(1), 117-124.
- Ouali, A., Herrera-Méndez, C. H., Coulis, G., Becila, S., Boudjellal, A., Aubry, L., & , Sentandreu, M. A. (2006). Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science* **74**(1), 44-58.
- Ouali, A. & Talmant, A. (1990). Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal-muscles. *Meat Science* **28**(4), 331-348.
- Pappin, D. J. C., Hojrup, P., & , Bleasby, A. J. (1993). Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Current Biology* **3**(6), 327-332.
- Parolari, G. (1996). Achievements, needs and perspectives in dry-cured ham technology: The example of Parma ham. *Food Science and Technology International* **2**(2), 69-78.
- Parolari, G., Benedini, R., & , Toscani, T. (2009). Color Formation in Nitrite-Free Dried Hams as Related to Zn-Protoporphyrin IX and Zn-Chelatase Activity. *Journal of Food Science* **74**(6), C413-C418.
- Parolari, G., Virgili, R., & , Schivazappa, C. (1994). Relationship between cathepsin-B activity and compositional parameters in dry-cured hams of normal and defective texture. *Meat Science* **38**(1), 117-122.

- Pearlman, J. P. & Fielding, R. A. (2006). Creatine monohydrate as a therapeutic aid in muscular dystrophy. *Nutrition Reviews* **64**(2), 80-88.
- Persky, A. M. & Brazeau, G. A. (2001). Clinical pharmacology of the dietary supplement creatine monohydrate. *Pharmacological Reviews* **53**(2), 161-176.
- Pizzano, R., Nicolai, M. A., & , Addeo, F. (1998). Antipeptide antibodies as analytical tools to discriminate among bovine alpha(s1)-casein components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**(2), 766-771.
- Pripis-Nicolau, L., de Revel, G., Bertrand, A., & , Maujean, A. (2000). Formation of flavor components by the reaction of amino acid and carbonyl compounds in mild conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**(9), 3761-3766.
- Purchas, R. W., Rutherford, S. M., Pearce, P. D., Vather, R., & , Wilkinson, B. H. P. (2004). Concentrations in beef and lamb of taurine, carnosine, coenzyme Q(10,) and creatine. *Meat Science* **66**(3), 629-637.
- Recio, I., Floris, R., & , Visser, S. (2000). Bioactive peptides from food proteins: A new isolation method. *Agro Food Industry Hi-Tech* **11**(2), 9-11.
- Rico, E., Toldra, F., & , Flores, J. (1990). Activity of cathepsin-D as affected by chemical and physical dry-curing parameters. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung* **191**(1), 20-23.
- Rico, E., Toldrá, F., & , Flores, J. (1991a). Assay of cathepsin-D activity in fresh pork muscle and dry-cured ham. *Meat Science* **29**(4), 287-293.
- Rico, E., Toldrá, F., & , Flores, J. (1991b). Effect of dry-curing process parameters on pork muscle cathepsin-B, cathepsin-H and cathepsin-L activity. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung* **193**(6), 541-544.
- Rivett, A. J. & Sweeney, S. T. (1991). Properties of subunits of the multicatalytic proteinase complex revealed by the use of subunit-specific antibodies. *Biochemical Journal* **278**, 171-177.
- Roberts, B., Morris, B. A., & , Clifford, M. N. (1991). Comparison of radioimmunoassay and spectrophotometric analysis for the quantitation of hypoxanthine in fish muscle. *Food Chemistry* **42**(1), 1-17.
- Rodríguez-Nuñez, E., Aristoy, M. C., & , Toldrá, F. (1995). Peptide generation in the processing of dry-cured ham. *Food Chemistry* **53**(2), 187-190.
- Roepstorff, P. & Fohlman, J. (1984). Proposal for A Common Nomenclature for Sequence Ions in Mass-Spectra of Peptides. *Biomedical Mass Spectrometry* **11**(11), 601.
- Rosell, C. M. & Toldrá, F. (1996). Effect of curing agents and m-calpain activity throughout the curing process. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung* **203**(4), 320-325.

- Rosenvold, K., Bertram, H. C., & Young, J. F. (2007). Dietary creatine monohydrate has no effect on pork quality of Danish crossbred pigs. *Meat Science* **76**(1), 160-164.
- Saito, T., Araki, K., & Matsuyoshi, M. (1959). A new method for estimating the freshness of fish. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* (24), 749-750.
- Sayd, T., Morzel, M., Chambon, C., Franck, M., Figwer, P., Larzul, C., Le Roy, P., Monin, G., Cherel, P., & Laville, E. (2006). Proteome analysis of the sarcoplasmic fraction of pig Semimembranosus muscle: Implications on meat color development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**(7), 2732-2737.
- Saz, J. M. & Marina, M. L. (2007). High performance liquid chromatography and capillary electrophoresis in the analysis of soybean proteins and peptides in foodstuffs. *Journal of Separation Science* **30**(4), 431-451.
- Schägger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols* **1**(1), 16-22.
- Scheffler, T. L. & Gerrard, D. E. (2007). Mechanisms controlling pork quality development: The biochemistry controlling postmortem energy metabolism. *Meat Science* **77**(1), 7-16.
- Sensky, P. L., Parr, T., Bardsley, R. G., & Buttery, P. J. (1996). The relationship between plasma epinephrine concentration and the activity of the calpain enzyme system in porcine longissimus muscle. *Journal of Animal Science* **74**(2), 380-387.
- Sentandreu, M. A., Armenteros, M., Calvete, J. J., Ouali, A., Aristoy, M. C., & Toldrá, F. (2007). Proteomic identification of actin-derived oligopeptides in dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**(9), 3613-3619.
- Sentandreu, M. A., Coulis, G., & Ouali, A. (2002). Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science & Technology* **13**(12), 400-421.
- 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**(1), 64-69.
- Sentandreu, M. A. & Toldrá, F. (2001a). Partial purification and characterisation of dipeptidyl peptidase II from porcine skeletal muscle. *Meat Science* **57**(1), 93-103.
- Sentandreu, M. A. & Toldrá, F. (2001b). Dipeptidyl peptidase IV from porcine skeletal muscle: purification and biochemical properties. *Food Chemistry* **75**(2), 159-168.
- Sentandreu, M. A. & Toldrá, F. (2001c). Dipeptidyl peptidase activities along the processing of Serrano dry-cured ham. *European Food Research and Technology* **213**(2), 83-87.
- Sentandreu, M. A. & Toldrá, F. (2000). Purification and biochemical properties of dipeptidyl peptidase I from porcine skeletal muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**(10), 5014-5022.

- Sentandreu, M. A. & Toldrá, F. (1998). Biochemical properties of dipeptidyl peptidase III purified from porcine skeletal muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**(10), 3977-3984.
- Sforza, S., Boni, M., Ruozi, R., Virgili, R., & Marchelli, R. (2003). Identification and significance of the N-terminal part of swine pyruvate kinase in aged Parma hams. *Meat Science* **63**(1), 57-61.
- Sforza, S., Galaverna, G., Schivazappa, C., Marchelli, R., Dossena, A., & Virgili, R. (2006). Effect of extended aging of parma dry-cured ham on the content of oligopeptides and free amino acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**(25), 9422-9429.
- Shahidi, F., Rubin, L. J., & Dsouza, L. A. (1986). Meat flavor volatiles - A review of the composition, techniques of analysis, and sensory evaluation. *Crc Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **24**(2), 141-243.
- Smyth, M. & O'Cuinn, G. (1994). Dipeptidyl aminopeptidase III of guinea-pig brain: specificity for short oligopeptide sequences. *J.Neurochem.* **63**(4), 1439-1445.
- Spanier, A. M., Edwards, J. V., & Dupuy, H. P. (1988). The warmed-over flavor process in beef - A study of meat proteins and peptides. *Food Technology* **42**(6), 110.
- Stoeva, S., Byrne, C. E., Mullen, A. M., Troy, D. J., & Voelter, W. (2000). Isolation and identification of proteolytic fragments from TCA soluble extracts of bovine M-longissimus dorsi. *Food Chemistry* **69**(4), 365-370.
- Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J., & Holle, A. (2003). A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **376**(7), 952-965.
- Sullivan, P. G., Geiger, J. D., Mattson, M. P., & Scheff, S. W. (2000). Dietary supplement creatine protects against traumatic brain injury. *Annals of Neurology* **48**(5), 723-729.
- Sun, X. D. (2009). Utilization of restructuring technology in the production of meat products: a review. *Cyta-Journal of Food* **7**(2), 153-162.
- Tabilo, G., Flores, M., Fiszman, S. M., & Toldrá, F. (1999). Postmortem meat quality and sex affect textural properties and protein breakdown of dry-cured ham. *Meat Science* **51**(3), 255-260.
- Tanaka, K. (2003). The origin of macromolecule ionization by laser irradiation (Nobel lecture). *Angewandte Chemie-International Edition* **42**(33), 3860-3870.
- Taylor, R. G., Geesink, G. H., Thompson, V. F., Koohmaraie, M., & Goll, D. E. (1995). Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization. *Journal of Animal Science* **73**(5), 1351-1367.
- Toldrá, F., Mora, L., & Flores, M. (2010). Cooked ham. In *Handbook of Meat Processing* (Ed F. Toldrá), pp. 301-311. Ames, Iowa, USA: Willey-Blackwell.

- Toldrá, F. & Aristoy, M. C. (2010). Dry-cured ham. In *Handbook of Meat Processing* (Ed F. Toldrá), pp. 351-362. Ames, Iowa, USA: Willey-Blackwell.
- Toldrá, F. & Flores, M. (2007). Processed pork meat flavors. In *Handbook of food product manufacturing* (Eds Y. H. Hui, R. Chandan, S. Clark, N. Cross, J. Dobbs, W. J. Hurst, L. M. L. Nollet, E. Shimoni, N. Sinha, E. B. Smith, S. Surapat, A. Titchenal, & F. Toldrá), pp. 279-299. NY, USA: John Wiley Interscience.
- Toldrá, F. (2002). *Dry-cured meat products*. Iowa: Willey-Blackwell, AMES.
- Toldrá, F., Aristoy, M. C., & Flores, M. (2000). Contribution of muscle aminopeptidases to flavor development in dry-cured ham. *Food Research International* **33**(3-4), 181-185.
- Toldrá, F. & Flores, M. (1998). The role of muscle proteases and lipases in flavor development during the processing of dry-cured ham. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **38**(4), 331-352.
- Toldrá, F., Flores, M., & Sanz, Y. (1997). Dry-cured ham flavour: Enzymatic generation and process influence. *Food Chemistry* **59**(4), 523-530.
- Toldrá, F., Flores, M., & Aristoy, M. C. (1995). Enzyme generation of free amino acids and its nutritional significance in processed pork meats. In *Food flavors: Generation, analysis and process influence* (Ed G. Charalambous), pp. 1303-1322. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science.
- Toldrá, F., Cerveró, M. C., & Part, C. (1993a). Porcine aminopeptidase activity as affected by curing agents. *Journal of Food Science* **58**(4), 724.
- Toldrá, F., Rico, E., & Flores, J. (1993b). Cathepsin B, D, H and L activities in the processing of dry-cured ham. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **62**(2), 157-161.
- Toldrá, F., Rico, E., & Flores, J. (1992a). Activities of pork muscle proteases in model cured meat systems. *Biochimie* **74**(3), 291-296.
- Toldrá, F., Aristoy, M. C., Part, C., Cerveró, C., Rico, E., Motilva, M. J., & Flores, J. (1992b). Muscle and adipose-tissue aminopeptidase activities in raw and dry-cured ham. *Journal of Food Science* **57**(4), 816.
- Toldrá, F. & Etherington, D. J. (1988). Examination of cathepsin-B, cathepsin-D, cathepsin-H and cathepsin-L activities in dry-cured hams. *Meat Science* **23**(1), 1-7.
- Tranberg, M., Stridh, M. H., Jilderos, B., Weber, S. G., & Sandberg, M. (2005). Reversed-phase HPLC with UV detection for the determination of N-acetylaspartate and creatine. *Analytical Biochemistry* **343**(1), 179-182.
- Tsai, R., Cassens, R. G., Briskey, E. J., & Greaser, M. L. (1972). Studies on nucleotide metabolism in porcine *Longissimus* muscle postmortem. *Journal of Food Science* **37**(4), 612.

- Van den Thillart, G., Van Waarde, A., Muller, H. J., Erkelens, C., & , Lugtenburg, J. (1990). Determination of high-energy phosphate-compounds in fish muscle - P-31-NMR spectroscopy and enzymatic methods. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **95**(4), 789-795.
- Vandenberghe, K., Goris, M., Van Hecke, P., Van Leemputte, M., Vangerven, L., & , Hespel, P. (1997). Long-term creatine intake is beneficial to muscle performance during resistance training. *Journal of Applied Physiology* **83**(6), 2055-2063.
- Veciana-Nogués, M. T., Izquierdo-Pulido, M., & , Vidal-Carou, M. C. (1997). Determination of ATP related compounds in fresh and canned tuna fish by HPLC. *Food Chemistry* **59**(3), 467-472.
- Ventanas, J., Córdoba, J. J., Antequera, T., García, C., López-Bote, C., & , Asensio, M. A. (1992). Hydrolysis and maillard reactions during ripening of Iberian ham. *Journal of Food Science* **57**(4), 813-815.
- Ventanas, S., Estévez, M., Delgado, C. L., & , Ruiz, J. (2007). Phospholipid oxidation, non-enzymatic browning development and volatile compounds generation in model systems containing liposomes from porcine *Longissimus dorsi* and selected amino acids. *European Food Research and Technology* **225**(5-6), 665-675.
- Verrez-Bagnis, V., Ladrat, C., Morzel, M., Noel, J., & , Fleurence, J. (2001). Protein changes in post mortem sea bass (*Dicentrarchus labrax*) muscle monitored by one- and two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* **22**(8), 1539-1544.
- Volpe, G. & Mascini, M. (1996). Enzyme sensors for determination of fish freshness. *Talanta* **43**(2), 283-289.
- Watanabe, A. & Devine, C. (1996). Effect of meat ultimate pH on rate of titin and nebulin degradation. *Meat Science* **42**(4), 407-413.
- Watson, J. T. & Sparkman, O. D. (2007a). Liquid chromatography/Mass spectrometry. In *Introduction to mass spectrometry. Instrumentation, applications and strategies for data interpretation* , pp. 639-688. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Watson, J. T. & Sparkman, O. D. (2007b). Electrospray ionization. In *Introduction to mass spectrometry. Instrumentation, applications and strategies for data interpretation* , pp. 485-518. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Weber, G. & Bocek, P. (1998). Recent developments in preparative free flow isoelectric focusing. *Electrophoresis* **19**(10), 1649-1653.
- Whipple, G. & Koohmaraie, M. (1992). Effects of lamb age, muscle type, and 24-hour activity of endogenous proteinases on postmortem proteolysis. *Journal of Animal Science* **70**(3), 798-804.
- Williams, M. H. & Branch, J. D. (1998). Creatine supplementation and exercise performance: An update. *Journal of the American College of Nutrition* **17**(3), 216-234.

- Wood, T. D., Moy, M. A., Dolan, A. R., Bigwarfe, P. M., White, T. P., Smith, D. R., & Higbee, D. J. (2003). Miniaturization of electrospray ionization mass spectrometry. *Applied Spectroscopy Reviews* **38**(2), 187-244.
- Wyss, M. & Kaddurah-Daouk, R. (2000). Creatine and creatinine metabolism. *Physiological Reviews* **80**(3), 1107-1213.
- Yano, Y., Kataho, N., Watanabe, M., Nakamura, T., & Asano, Y. (1995). Evaluation of beef aging by determination of hypoxanthine and xanthine contents - Application of a xanthine sensor. *Food Chemistry* **52**(4), 439-445.
- Yates, J. R., Cociorva, D., Liao, L. J., & Zabrouskov, V. (2006). Performance of a linear ion trap-orbitrap hybrid for peptide analysis. *Analytical Chemistry* **78**(2), 493-500.
- Yates, J. R., Speicher, S., Griffin, P. R., & Hunkapiller, T. (1993). Peptide mass maps - A highly informative approach to protein identification. *Analytical Biochemistry* **214**(2), 397-408.
- Yergey, A. L., Coorssen, J. R., Backlund, P. S., Blank, P. S., Humphrey, G. A., Zimmerberg, J., Campbell, J. M., & Vestal, M. L. (2002). De novo sequencing of peptides using MALDI/TOF-TOF. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **13**(7), 784-791.
- Yoshida, K., Sorimachi, Y., Fujiwara, M., & Hironaka, K. (1995). Calpain is implicated in rat myocardial injury after ischemia or reperfusion. *Japanese Circulation Journal-English Edition* **59**(1), 40-48.
- Yoshida, T. (2004). Peptide separation by hydrophilic-interaction chromatography: a review. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **60**(3), 265-280.
- Zhang, W. H., Narayanan, M., & Friedlander, R. M. (2003). Additive neuroprotective effects of minocycline with creatine in a mouse model of ALS. *Annals of Neurology* **53**(2), 267-270.
- 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**(1), 51-55.

II. Objetivos

Objetivos

A la vista de todo lo expuesto, en la presente tesis doctoral se plantean dos objetivos principales:

1. Determinación de creatina y creatinina como marcadores de calidad de los procesos de elaboración de jamón cocido y curado.
2. Identificación de los péptidos que se generan debido a la proteólisis sufrida por acción de las peptidasas musculares durante el procesado de curado de jamón.

Para conseguir estos objetivos generales se han planteado los siguientes objetivos parciales:

- Desarrollo de un método cromatográfico para la determinación rápida de creatina y creatinina, así como de otros compuestos de interés como son la carnosina, anserina y balenina, como posibles marcadores de calidad de los productos cárnicos.
- Estudio de la distribución de la creatina y creatinina según el tipo de metabolismo muscular.
- Evaluación de la cocción en el proceso de fabricación de jamón cocido mediante el establecimiento de una correlación entre la ratio creatinina/creatina y la efectividad del tratamiento térmico.
- Evaluación del efecto del procesado de curado de jamón sobre las concentraciones de creatinina, creatina y su ratio, así como su posible utilidad en el control de calidad del proceso.
- Identificación de la secuencia completa de los péptidos generados en el jamón curado empleando varias técnicas de proteómica como son la cromatografía líquida acoplada a un analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo en tándem y la desorción/ionización por láser asistida por una matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo en tándem (MALDI-TOF/TOF).

III. Resultados

Parte 1

Determinación de creatina y creatinina como marcadores de calidad de los procesos de elaboración de jamón cocido y curado.

La primera parte de esta Tesis doctoral compila los capítulos del 1 al 4, los cuales describen los resultados obtenidos tras la consecución del primer objetivo, dando lugar a cuatro publicaciones.

Durante la última década se ha puesto de manifiesto la importancia de desarrollar nuevos métodos rápidos de análisis con el fin de controlar el proceso de elaboración de productos cárnicos de una forma segura y eficiente. El desarrollo de nuevos

métodos contribuye a obtener resultados con mayor rapidez y, suponiendo en la mayoría de los casos, además, un ahorro de material y horas de trabajo, lo que resulta de gran utilidad en el análisis de un gran número de muestras.

La cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa es uno de los métodos más utilizados para la separación de péptidos; sin embargo, este tipo de cromatografía presenta limitaciones importantes ya que no es adecuada para la separación de péptidos polares y de bajo peso molecular, los cuales no se retienen en ese tipo de columnas. En ese sentido, la cromatografía de interacción hidrofílica se complementa adecuadamente con la separación en fase reversa.

El método que se describe en el **capítulo 1** constituye la primera aplicación de la cromatografía de interacción hidrofílica en la separación de compuestos presentes en la carne, permitiendo la separación de carnosina, anserina, balenina, creatina y creatinina en tiempos muy cortos y con una elevada resolución gracias al pequeño tamaño de las partículas de sílica que componen la columna. Las columnas cromatográficas con tamaño de partícula pequeño (3 μm en lugar de las más utilizadas de 5 μm) permiten una buena separación de estos compuestos en tiempos cortos de elución. El principal inconveniente de trabajar con este tipo de columnas radica en que la presión que se requiere para una velocidad lineal óptima aumenta de forma inversamente proporcional al cubo del diámetro de la partícula; no obstante, los equipos habituales de HPLC, que soportan presiones de hasta 600 bar, admiten trabajar con columnas de 2,5 – 3 μm de tamaño de partícula sin tener que recurrir a los instrumentos de última generación, que soportarían presiones de hasta 900 bar.

Como se ha comentado en la Introducción (página 36), la creatina y creatinina están íntimamente relacionadas con el metabolismo energético muscular. Además, se sabe que según el tipo de metabolismo que predomine, el músculo esquelético puede ser oxidativo o glucolítico. Las interacciones entre el tipo de músculo esquelético, el metabolismo energético y los distintos factores medioambientales son determinantes para la transformación postmortem del músculo en carne.

Las propiedades metabólicas y contráctiles del músculo esquelético están directamente relacionadas con el tipo de metabolismo energético del animal vivo. Sus características fisiológicas explicarían la variabilidad en la respuesta metabólica

del tejido muscular durante el estrés antes del sacrificio, así como la velocidad y el alcance de la caída postmortem de pH. Así pues, existe una importante relación entre el metabolismo energético muscular de los animales vivos y su respuesta metabólica ante el estrés durante el sacrificio, lo que condiciona la calidad final de la carne.

A la hora de desarrollar un método rápido de control de calidad en la elaboración de jamón cocido o curado basado en el análisis de compuestos bioquímicos relacionados con el metabolismo muscular, es importante conocer el comportamiento metabólico de los distintos tipos de músculo con el fin de determinar la mejor forma de realizar la toma de muestra.

El **capítulo 2** presenta los resultados obtenidos tras estudiar el contenido de estos compuestos en los distintos músculos del cerdo incluyendo los principales músculos del jamón. Así, además de conocer las diferencias significativas en cuanto al contenido en creatina y creatinina en los distintos músculos, también se podrán determinar las diferencias en cuanto a su naturaleza metabólica. De hecho, estudios previos a éste habían relacionado el contenido de carnosina con el tipo de metabolismo energético.

Una vez desarrollado un método cromatográfico sencillo, fiable, y rápido para el análisis de creatina y creatinina, y tras conocer las concentraciones en estos compuestos de los músculos del jamón y relacionarlas con el metabolismo energético, se procedió al estudio del comportamiento de estos compuestos durante la elaboración de jamón cocido y curado con el fin de utilizarlos como marcadores de calidad de estos procesos.

En el proceso de elaboración del jamón cocido existen varias etapas críticas donde se puede ver afectada la calidad y el rendimiento del producto. Uno de los principales puntos críticos del proceso de elaboración se encuentra en la etapa de cocción, ya que ésta es en gran parte responsable de los defectos que aparecen en el producto final relacionados con la textura o la estabilidad del color. Aunque estos defectos son los más comunes, una cocción insuficiente o incorrecta puede provocar también alteraciones de sabor y olor, como pueden ser el sabor a viejo o rancio, putrefacciones, etc. La importancia de estos defectos es notable ya que su presencia

conllevaría a la no aceptabilidad del producto por parte de los consumidores. Así pues, un adecuado control de calidad de la etapa de cocción permitiría obtener un producto más seguro y de mejor calidad organoléptica.

El objetivo del **capítulo 3** ha sido establecer una relación entre la ratio creatinina/creatina y la intensidad del tratamiento térmico, con el objetivo de emplear esta ratio como marcador de calidad del proceso de cocción. Este estudio se ha basado en la reacción no enzimática de conversión de creatina en creatinina, ambos compuestos participantes en el metabolismo energético muscular. Así, sabiendo que los músculos mayoritarios que forman parte del jamón presentan un comportamiento metabólico similar de tipo glucolítico (**capítulo 2**), es posible dar los primeros pasos en el desarrollo de un método de control de calidad basado en la toma de muestra en la superficie del jamón, consiguiendo así evitar el tradicional método destructivo de toma de muestra en el centro de la pieza.

Existen muchos tipos de jamón curado en el mercado debido a la heterogeneidad de la industria de producción de jamón. Los procesos de elaboración del jamón varían según las empresas, tanto por la tecnología empleada, el tiempo de salado o contenido en sal, como por la temperatura y humedad relativas. Por otro lado, los jamones curados típicos de cada región, como el jamón de Teruel, de Serón, o de Trévez, son productos muy heterogéneos con características particulares.

Hasta hace algunos años, la elaboración del jamón curado resultaba una tarea sencilla; apenas existían controles y el proceso prácticamente se reducía a salar los perniles y colgarlos a secar. Siendo baja la producción de jamones curados, no se requería maquinaria y apenas mano de obra. Actualmente el nivel de producción ha alcanzado cifras muy elevadas, lo que ha forzado el desarrollo de nuevas formas de producción con el fin de abastecer esta demanda.

Un sistema óptimo para el control de calidad del jamón debería permitir diferenciar entre distintas calidades y ser capaz de determinar si el producto final posee los parámetros de calidad exigidos por el consumidor. Esta evaluación sería útil no sólo para asegurar al consumidor que el producto se ajusta a los criterios deseados, sino también para que la propia industria pueda tener un control sobre la calidad de las piezas que comercializa. Así pues, a medida que el jamón curado ha ido adquiriendo

relevancia en el panorama alimentario español, ha surgido la necesidad de controlar el proceso de curado con el fin de conseguir productos de mayor homogeneidad.

El **capítulo 4** describe el estudio de la conversión de creatina en creatinina durante distintos tiempos del proceso de producción de jamón curado, abriendo una vía para emplear estos compuestos como marcadores de calidad del jamón y asegurar un tiempo mínimo de curado de 7 meses.

Capítulo 1
Determinación por cromatografía hidrofílica de carnosina, anserina, balenina,
creatina y creatinina.



ACS Publications
High quality. High impact.

JOURNAL OF
AGRICULTURAL AND
FOOD CHEMISTRY

Hydrophilic chromatographic determination of carnosine, anserine, balenine, creatine, and creatinine

Leticia Mora, Miguel Angel Sentandreu and Fidel Toldrá

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

Received for review February 9, 2007. Revised manuscript received March 30, 2007. Accepted April 12, 2007.

Abstract

A new HPLC procedure based on hydrophilic interaction chromatography (HILIC) has been developed for the simultaneous determination of carnosine, anserine, balenine, creatine, and creatinine in meat. This is the first time that HILIC has been directly applied to the study of meat components, having the advantage of not requiring complex clean up and/or sample derivatization procedures. The chromatographic separation has been developed using a silica column (4.6 x 150 mm, 3 μ m), and the proposed methodology is simple, reliable, and fast (< 13 min per sample). The method has been validated in terms of linearity, repeatability, reproducibility, and recovery and represents an interesting alternative to methods currently in use for determining the mentioned compounds and other polar substances. The detection limits are 5.64, 8.23, 3.66, 3.99, and 0.06 μ g/mL for carnosine, anserine, balenine, creatine, and creatinine, respectively.

Keywords: Hydrophilic interaction chromatography; HILIC; meat; histidine dipeptides; carnosine; anserine; balenine; creatine; creatinine; peptides; polar compounds.

INTRODUCTION

The imidazole dipeptide carnosine (CAR), and its methylated analogues anserine (ANS) and balenine (BAL) are histidine-containing dipeptides (**Figure 1**) widely distributed in vertebrated animal tissues, especially in skeletal muscle, the heart and the central nervous system (1).

Creatine (Cr) (**Figure 1**) and its phosphorylated derivative phosphocreatine (PCr) are key components of the energy delivery process in several tissues, particularly those characterized by a high and/or fluctuating energy demand (2).

On the other hand, creatine turns into creatinine (Cn) (**Figure 1**) in muscle due to a non-enzymatic conversion by the removal of water and the formation of a ring structure. This non-enzymatic conversion takes place easily under heating conditions (3).

In view of the growing interest and the biological importance of biochemical compounds such as carnosine, anserine, balenine, creatine, and creatinine, attention has been focused on the development of analytical techniques to separate, characterize, and quantify these compounds.

Techniques such as thin-layer chromatography and colorimetry have been used in peptide separations for many years, but such procedures require long analysis times and have poor resolution and low sensitivity. However, the versatility, short analysis time, and high resolution of high-performance liquid chromatography (HPLC) have made this technique the method of choice for the analysis of histidine dipeptides. In fact, several HPLC methods have been described for the analysis of these compounds in tissues of different mammalian species. These methods include ion-exchange chromatography (IEC) applied to both underivatized (4) and postcolumn derivatized peptides (5, 6) with UV, fluorescence, or pulsed amperometric detection. Reverse-phase liquid chromatography (RP-HPLC) has been also employed for the analysis of histidine dipeptides (7) in their precolumn derivatized forms (8).

Creatine and creatinine are commonly determined by using the Folin method, based on the Jaffé reaction, which is the basis of some official methods (9). The reaction of creatine with 1-naphthol and biacetyl (10), both through flow injection methodologies,

have been used for the simultaneous determination of creatine and creatinine in meat and meat products (11, 12). Alternative techniques include ion-pairing applied to reverse-phase chromatography (7, 13), a capillary isotachopheric method (14) and a spectrophotometric assay using enzyme-based systems (15).

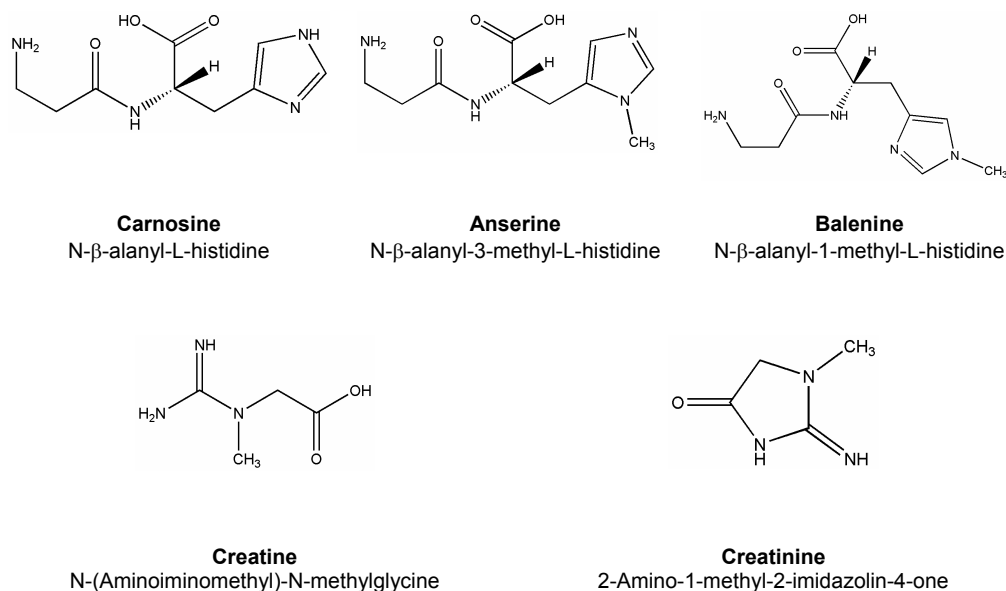


Figure 1. Chemical structures of carnosine, its methylated analogues anserine and balenine, creatine, and creatinine, the end product of creatine catabolism.

RP-HPLC has been a very useful technique for the isolation of peptide compounds, having as its main advantage, apart from its powerful resolving capacity, the use of volatile mobile phases that avoid the need for sample desalting. Although RP-HPLC is a powerful separation technique, there is a major limitation consisting of the low retention of polar molecules. In this case, normal-phase liquid chromatography (NPLC) has been traditionally used to separate polar compounds with non-aqueous mobile phases, but an important limitation is the difficulty in dissolving hydrophilic compounds, such as peptides, in these phases. Moreover, this methodology is not environmentally friendly. For these reasons, the application of NPLC to biological samples is limited and, thus, rarely used for separating peptide mixtures (16).

Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) constitutes an interesting alternative to reverse-phase, ion-exchange, and normal-phase liquid chromatography for the separation of such polar compounds for many reasons: (i) it implies the use of volatile buffers, avoiding a desalting step; (ii) it has clear advantages with regard to the solubility of biological compounds such as peptides; and (iii) there is no need of compound derivatization. These advantages facilitate an easier sample processing and compatibility with further mass spectrometry analysis, where a low amount of volatile salt is allowed.

In HILIC, an initial mobile phase with a high content of an organic solvent is used to promote hydrophilic interactions between the analyte and the polar hydrophilic stationary phase. In this context, silica and amino columns with organic solvents compatible with aqueous mobile phases offer potential use in the HILIC mode (17). This chromatographic mode is similar to normal-phase chromatography because polar compounds are retained longer than the non-polar ones and the polar component of the mobile phase (usually water) is the strong solvent used to elute the compounds. However, with regard to the solubility of analytes in the mobile phase and matrix compatibility, HILIC is superior to normal-phase chromatography, as the nature of the mobile phases that are used is comparable to reverse-phase separations (16).

The objective of the present study was to develop a new method based on HILIC for the analysis of small and highly hydrophilic relevant biochemical compounds such as carnosine, anserine, balenine, creatine, and creatinine present in meat. The results of this study demonstrate that a novel procedure based on hydrophilic chromatography directly applied to a meat extract yields a simultaneous isolation and quantification of the aforementioned compounds.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents

All chemical and chromatographic reagents used were of HPLC grade. Acetonitrile (ACN), ammonium acetate, glacial acetic acid and hydrochloric acid 37% were

purchased from Scharlau (Barcelona, Spain). Formic acid 50%, ammonium formate for mass spectrometry, trifluoroacetic acid and standards of carnosine and L-anserine were from Sigma (St Louis, MO). Creatine and creatinine were purchased from Fluka Chemie AG (Buchs, Switzerland).

Materials and instrumentation

Pork loin and chicken breast were used to develop the method. These tissues were chosen because of the differences existing between them for the analyzed compounds (**Figure 2**). As has been demonstrated, anserine is predominant in non-mammalian species such as chicken, whereas pork is one of the species with higher balenine content (18, 19).

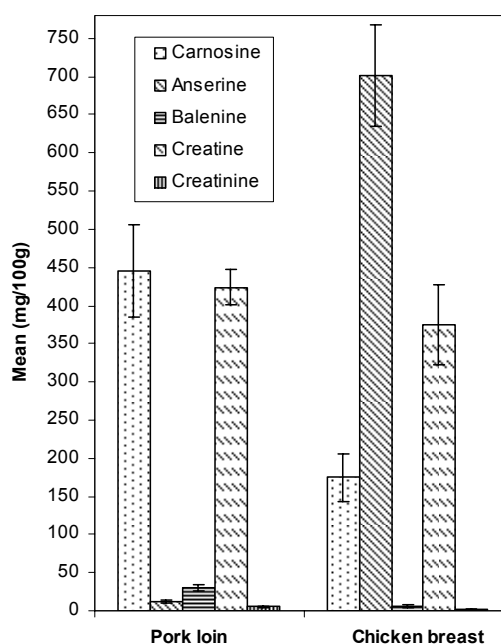


Figure 2. Levels of carnosine, anserine, balenine, creatine, and creatinine in pork loin and chicken breast determined by simultaneous separation using HILIC. Each value represents the mean of eight samples from different meat cuts, and labelled error bars indicate the standard deviation for each measurement.

Chromatography was performed in a HPLC Agilent 1100 Series system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) equipped with a quaternary pump (G1311A), an

autosampler (G1313A) and a vacuum degasser (G1379A). Ultraviolet detection was made by a G1315B diode array detector, which was used in the range 195-300 nm.

Sample and standards preparation

Samples were extracted and deproteinized following the method described by Aristoy and Toldrá (20). Briefly, 5 g of sample tissue were homogenized with 3 volumes of 0.01 N HCl in a stomacher (Seward Laboratory) for 8 min and further centrifuged in cold (4 °C) at 10000 rpm for 20 min. Supernatant was filtered through glass wool, and 250 µL of this solution were deproteinized by adding 3 volumes of ACN, standing at 4 °C for 20 min. Finally, the sample was centrifuged (10000 rpm) for 10 min at 4 °C and the supernatant directly analyzed. The rest of the meat extract was stored under vacuum at -20 °C until use.

The calibration ranges for the assayed compounds were established using a duplicate set of standards. Carnosine, anserine, and creatinine calibration standards were prepared by diluting a stock solution of 1 mg/mL. As balenine is not commercially available, pork meat was used as the source of this compound because of its high content. This standard solution was prepared according to the method of Aristoy et al. (5) and further quantified, obtaining a mean value of 0.83 mg/mL. A standard solution of creatine at 0.3 mg/mL was prepared because of the low solubility of this compound in the injection solution (0.01 N HCl in water/acetonitrile, (25:75, v/v)). Nevertheless, this concentration limit was enough to determine creatine levels normally found in muscle tissue. Working standard solutions were prepared over the appropriate concentration range by dilution of stock solutions. All stock solutions were stored at -20 °C until use.

Stability of the compounds under frozen storage

The initial quantification was done immediately after extraction and deproteinization. The remaining pork loin extracts were kept under frozen storage (-20 °C) and further analyzed after 2, 3, and 8 days. Each analysis was done in triplicate.

Statistical method: The ANOVA procedure was used to determine significant differences between initial and after 2, 3, and 8 days quantifications using the software Statgraphics Plus (v 5.1). Each statistical analysis was $n = 3$, and the normality of the data was tested before application to the ANOVA procedure.

Description of the chromatographic method

Carnosine, anserine, balenine, creatine, and creatinine were analyzed by HILIC. Twenty microliters of each sample were injected into the HPLC system. The chromatographic separation was developed using an Atlantis HILIC silica column (4.6 x 150 mm, 3 μm) from Waters (Milford, MA) at room temperature. Mobile phases consisted of solvent A, containing 0.65 mM ammonium acetate, pH 5.5, in water/acetonitrile (25:75), and solvent B, containing 4.55 mM ammonium acetate, pH 5.5, in water/acetonitrile (70:30). The solvents were filtered through a 0.22 μm membrane filter and degassed prior to the analytical run. The separation conditions were a linear gradient from 0% to 100% of solvent B in 13 min at a flow rate of 1.4 mL/min. The separation was monitored using a diode array detector at a wavelength of 214 nm for creatine, carnosine, anserine, and balenine, whereas a wavelength of 236 nm was used for creatinine detection. Peak areas were correlated to compound concentration by interpolation in the corresponding calibration curve (**Figure 3**). The column was equilibrated for 5 min under the initial conditions before each injection.

RESULTS AND DISCUSSION

Development of the chromatographic method

To establish optimal conditions for the separation of carnosine, anserine, balenine, creatine, and creatinine by hydrophilic chromatography, the effect of ion-pairing, pH and ACN gradient were examined.

Ion-pairing and pH selection

The use of a buffered mobile phase is crucial to achieve an acceptable repeatability in the chromatographic separation of charged compounds, because electrostatic

interactions between the analyte and the stationary phase are controlled by the buffer nature. Therefore, an ion-pairing reagent is necessary because silanol groups, present with functionalized silica-based materials, can interact with ionic residues of compounds and then affect recovery and cause peak-tailing. For this reason, trifluoroacetic acid (TFA), ammonium formate, ammonium acetate, acetic acid, and formic acid were investigated to determine the appropriate reagent to eliminate ionic interactions.

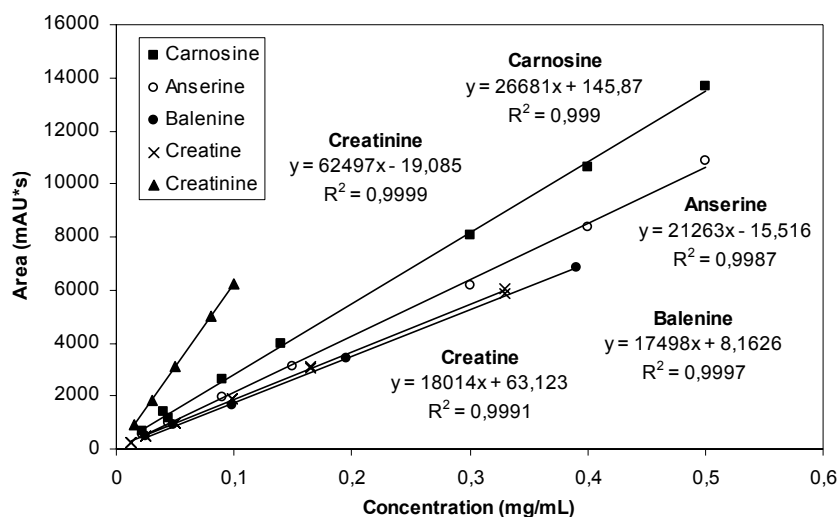


Figure 3. Linearity range and regression of carnosine, anserine, balenine, creatine, and creatinine.

TFA has been widely used as an ion-pairing reagent because of its volatility, transparency at 214 nm, and effectiveness for preventing ionic interactions. This acid not only acts as an ion-pair agent to improve peak shapes of basic compounds on silica-based column but also controls the pH of the mobile phases. In fact, a good separation of standards of carnosine, anserine, balenine, creatine, and creatinine was achieved using this reagent, but a decrease of the selectivity was observed when these compounds were separated from a meat extract, possibly due to matrix effects. Two alternative volatile salts, ammonium formate, and ammonium acetate, were evaluated in the solvent system. However, both of them are less volatile than TFA

and both also absorb at 214 nm. In order to minimize absorption effects, lower concentrations of salt were tested (< 6 mM). In the case of ammonium formate, variable retention times owing to an insufficient buffering effect of the mobile phase occurred at these low concentrations. Finally, a mobile phase containing ammonium acetate was found to provide the best results in selectivity and reproducibility and thus, this salt was selected for the development of the method. Acetic acid and formic acid were also tested at a concentration of 0.1%, but this did not improve results obtained with ammonium acetate (results not shown).

In addition to the type of salt, the effect of salt concentration on the separation profile was also investigated by varying ammonium acetate concentrations along with the chromatographic gradient. In this way, HILIC retention was inversely proportional to the concentration of mobile phase, because increases in salt concentration resulted in lower hydrophilicity. A final gradient from 0.65 to 4.55 mM ammonium acetate was selected, providing an optimum analysis time of 13 min.

The pH value of the mobile phase has a significant impact on retention and selectivity in hydrophilic chromatography by influencing solute ionization. Low-pH conditions charge only basic and phosphorylated groups of peptides and amino acids. On the other hand, at higher pH values, both acid and basic residues are charged (21, 22). Ideal pH conditions in HILIC separation were investigated by changing the pH of the mobile phase containing ammonium acetate. This pH was adjusted to 4.5, 5.0 and 5.5, using this factor to manipulate selectivity. In all cases, pH 5.0 offered the lowest retention times for carnosine, anserine and balenine while keeping a good separation of these compounds. However, a pH of 5.5 was finally selected because it provided also the best selectivity for creatine and creatinine, which are eluted during the first 5 min of the chromatogram (results not shown).

Optimization of the separation

In HILIC, peptide retention times increase with increasing the polarity of both peptides and the stationary phase, and with decreasing the aqueous content in the mobile phase (16). For these reasons, in this study, the effect of ACN concentration on peptide retention was also examined. The percentage of ACN was varied while

keeping a gradient of ammonium acetate concentration from 0.065 to 4.5 mM, which was necessary to accommodate the low solubility of this salt in the high ACN content of the initial mobile phase.

The injection solvent is also an important parameter in HILIC because, as in reverse-phase chromatography, the injection solvent can strongly influence the peak shape of the analytes. The injection solvent should be as close as possible to the initial mobile phase, which must be adequate for solubilization of the compounds to analyze. In our case, this was achieved at an initial concentration of 75% acetonitrile/25% water solution.

Absorption at 214 nm was adequate for the determination of carnosine, anserine, balenine, and creatine, but meat extracts showed interferences in the detection of creatinine at this wavelength. To avoid this, creatinine was detected at 236 nm, where this compound has another maximum of absorption (**Figure 4B,C**).

The final chromatographic conditions resulted in a good separation of the five compounds, as can be observed in **Figure 4A**. Using these conditions, creatine and creatinine eluted at 4.4 and 3.1 minutes, respectively, whereas carnosine, balenine and anserine eluted, at 9.9, 10.9 and 11.9 min, respectively.

Method evaluation

(a) Linearity and calibration

Plots and respective regressions of carnosine, anserine, balenine, creatine, and creatinine are shown in **Figure 3**. As can be observed, the linearity of the method for all compounds was as good as results obtained with other methods (5, 8, 23). However, this method has the advantage that no initial clean up and no derivatization steps are required for sample processing.

(b) Detection limits (LOD)

The LOD for the different compounds was calculated in two different ways: First, the LOD was established by analyzing 15 blank solutions without the analyte and calculating the respective signal-to-noise ratios at the time windows where the compounds are expected. For each compound, the LOD was set as 3 times the

signal-to-noise ratio. Second, increasing dilutions of pork loin and chicken breast extracts were injected, confirming by this way, the detection limits calculated previously. Finally, a comparison between the two methods was done, and similar results were obtained. LODs obtained for carnosine, anserine, balenine, creatine, and creatinine were 5.64, 8.23, 3.66, 3.99 and 0.06 $\mu\text{g/mL}$ (with relative standard deviations of 17.68, 14.94, 19.98, 19.16 and 14.88, respectively).

(c) Repeatability

A repeatability study of the developed method was done. In this study, six samples from the same pork loin and six samples from the same chicken breast were processed to estimate the mean concentration of carnosine, anserine, balenine, creatine and creatinine, together with standard deviations and coefficients of variation (**Table 1**). The different measurements were done by the same analyst on the same instrument, on the same item, and under the same conditions. The standard deviation under repeatability conditions is often used as a measure of precision, and good results have been obtained in comparison to those reported previously using other techniques (6, 8). Because of the lower mean concentration of anserine in pork loin and balenine in chicken breast, their coefficients of variation were slightly higher but always within acceptable values (**Table 1**).

(d) Reproducibility

Reproducibility of the method was tested by successive analysis of the five compounds of interest in eight samples from pork loin and eight from chicken breast within 30 days. Each analysis was taken on identical animal samples but under different conditions (different operators and apparatus, different times and interday). Data, shown in **Table 2**, demonstrated a very good reproducibility from one analysis to another. Results obtained agree with those reported by many other authors when quantification of these histidine-containing dipeptides was done using other techniques (5, 18, 19, 24) and are also comparable for those of creatine and creatinine (3, 15).

Table 1. Repeatability ($n = 6$) for the analysis of carnosine, anserine, balenine, creatine and creatinine in pork loin and chicken breast.

	Mean (mg/100g) ^a	SD ^b	CV (%) ^c
Pork loin			
Carnosine	462.33	16.86	3.65
Anserine	10.76	1.23	11.44
Balenine	33.40	1.88	5.62
Creatine	427.32	12.66	2.96
Creatinine	5.71	0.34	5.87
Chicken breast			
Carnosine	149.89	6.05	4.04
Anserine	677.49	28.61	4.22
Balenine	5.41	0.67	12.31
Creatine	336.24	12.38	3.68
Creatinine	1.78	0.13	7.31

^a Means expressed as mg/100g of muscle. Each value represents the mean of six samples from the same meat cut. ^b Standard deviation. ^c Coefficient of variation.

Table 2. Reproducibility ($n = 8$) obtained for the analysis of carnosine, anserine, balenine, creatine and creatinine in pork loin and chicken breast.

	Mean (mg/100g) ^a	SD ^b	CV (%) ^c
Pork loin			
Carnosine	398.59	22.77	5.71
Anserine	13.54	1.95	14.41
Balenine	28.49	2.23	7.83
Creatine	393.83	10.00	2.54
Creatinine	4.63	0.15	3.18
Chicken breast			
Carnosine	149.27	7.06	4.73
Anserine	675.59	33.32	4.93
Balenine	5.50	0.61	11.04
Creatine	335.73	14.58	4.34
Creatinine	1.76	0.14	7.94

^a Means expressed as mg/100g of muscle. Each value represents the mean of eight samples from the same meat cut. ^b Standard deviation. ^c Coefficient of variation.

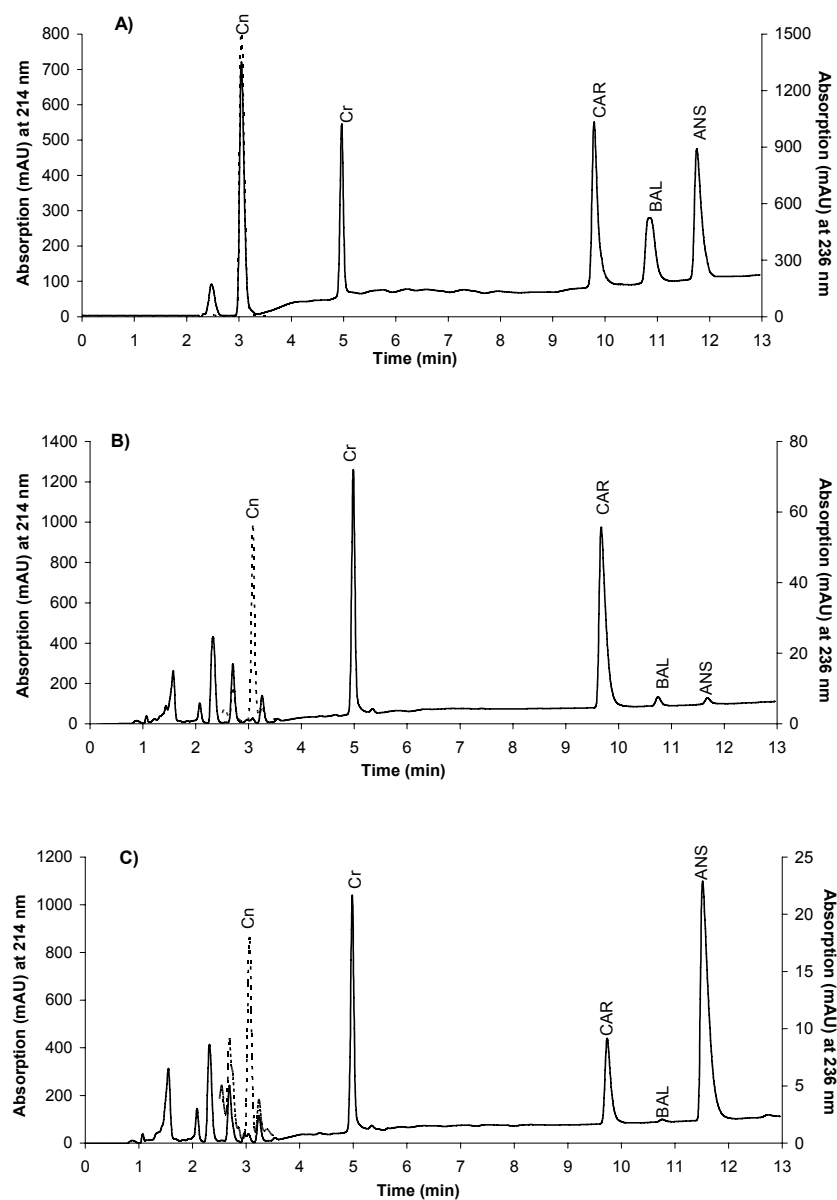


Figure 4. (A) Chromatogram corresponding to the separation of the standards of the five compounds determined with the HILIC method developed in this work. (B) Chromatogram corresponding to a pork loin sample and (C) Chromatogram corresponding to a chicken breast sample. In all cases carnosine (CAR), anserine (ANS), balenine (BAL) and creatine (Cr) were detected at 214 nm (solid line), whereas creatinine (Cn) was detected at 236 nm (dotted line).

(e) Recovery and matrix effects

Recovery was determined in five sets of pork loin and chicken breast, one set for each one of the studied compounds. Samples were enriched with standard solutions of the different compounds in order to yield concentrations equivalent to 0.5, 1, and 1.5 times the main value obtained in reproducibility studies. At each level, analysis were performed in duplicate, and recoveries were calculated by comparison with a blank meat sample. The percentage of recovery determined in each case is shown in

Table 3.

Table 3. Recovery of carnosine (CAR), anserine (ANS), balenine (BAL), creatine (Cr) and creatinine (Cn) obtained in pork loin and chicken breast.

	Pork loin (<i>n</i> = 3)				Chicken breast (<i>n</i> = 3)			
	Added*	Theoretical value*	Recovered*	Recovery (%)	Added*	Theoretical value*	Recovered*	Recovery (%)
CAR	0.1	0.309	0.308	99.67	0.05	0.162	0.160	98.89
	0.2	0.409	0.395	96.71	0.15	0.262	0.252	96.05
	0.35	0.559	0.531	95.13	0.225	0.337	0.339	100.64
ANS	0.05	0.063	0.065	103.71	0.2	0.584	0.577	98.87
	0.10	0.113	0.116	102.42	0.4	0.784	0.803	102.47
	0.20	0.213	0.203	95.49	0.8	1.184	1.165	98.42
BAL	0.0005	0.0261	0.0260	99.63	0.002	0.0066	0.0061	92.54
	0.0010	0.0266	0.0231	86.93	0.00	0.0086	0.0085	98.27
	0.0020	0.0276	0.0276	100.28	0.01	0.0126	0.0118	93.40
Cr	0.10	0.293	0.293	99.96	0.10	0.315	0.318	100.97
	0.26	0.622	0.674	108.40	0.26	0.480	0.432	90.17
	0.53	0.886	0.878	99.15	0.53	0.744	0.751	100.98
Cn	0.0015	0.0066	0.0066	100.21	0.0005	0.0021	0.0022	107.31
	0.0030	0.0081	0.0088	108.71	0.0010	0.0026	0.0028	107.81
	0.0060	0.0111	0.0106	95.42	0.0020	0.0036	0.0038	105.98

* Values expressed as mg of analyte/mL of injection solvent. Each value corresponds to three replicates at each concentration level.

In this way, the matrix effect of meat was evaluated on compound recoveries, and it was concluded that different meat matrices did not affect the quantification of the analytes, mainly because of the absence of intermediate steps in sample processing, which is a remarkable advantage with respect to previous existing methods used to quantify these compounds(8, 25).

Stability of the analyzed compounds under frozen storage

The stability of the histidine dipeptides, together with creatine and creatinine, in a pork loin extract was investigated up to 8 days. A comparison between the obtained results is showed in **Figure 5**. As can be observed, when meat was stored for 8 days under freezing conditions, no significant differences ($P < 0.05$) were observed in the levels of the five compounds along this storage time.

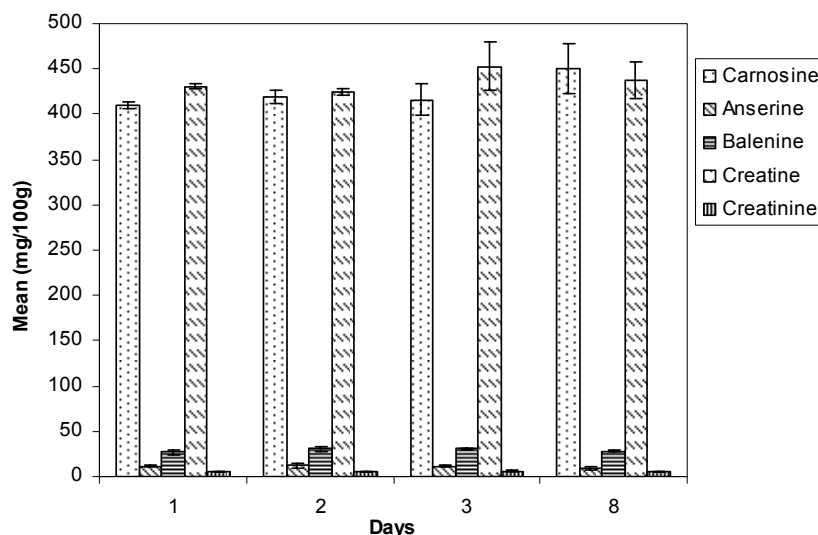


Figure 5. Stability of a pork loin sample within 8 days. Each value represents the mean of three samples from the same meat cut, and labelled error bars indicate the standard deviation for each measurement. No significant differences ($P < 0.05$) between initial and final conditions were found.

CONCLUSION

HILIC constitutes a new and simple methodology for the separation of polar compounds. It requires minimal sample manipulation, thus avoiding the need for solid-phase extraction and derivatization steps. The method developed in this work for the analysis of carnosine, anserine, balenine, creatine, and creatinine is simple, fast (< 13 min per sample), reliable, and easily applicable for any laboratory having conventional standard HPLC equipment. Furthermore, this method allows the use of

low concentrations of salt, which avoids ionization suppression in ESI (26, 27) and thus makes it suitable for further LC-MS analysis.

This is the first time that a separation using HILIC has been developed for the simultaneous determination of carnosine, anserine, balenine, creatine, and creatinine in meat samples. Adequate levels of linearity, recovery, reproducibility, and sensitivity prove that the proposed method is a good alternative for isolating and quantifying these compounds in complex matrices such as meat.

ACKNOWLEDGEMENTS

Scholarship FPU from Ministerio de Educación y Ciencia (Spain) to L.M. and an I3P-CSIC contract from the European Social Fund to M.A.S., are fully acknowledged. Work was supported by Agroalimed grant from Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación (Generalitat Valenciana, Spain).

LITERATURE CITED

1. Crush, K. G. Carnosine and related substances in animal tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* **1970**, *34* (1), 3.
2. Wyss, M.; Kaddurah-Daouk, R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol. Rev.* **2000**, *80* (3), 1107-1213.
3. Pais, P.; Salmon, C. P.; Knize, M. G.; Felton, J. S. Formation of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in dry-heated model systems, meats, and meat drippings. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47* (3), 1098-1108.
4. Carnegie, P. R.; Hee, K. P.; Bell, A. W. Ophidine (Beta-Alanyl-L-3-Methylhistidine, Balenine) and other histidine dipeptides in pig muscles and tinned hams. *J. Sci. Food Agric.* **1982**, *33* (8), 795-801.
5. Aristoy, M. C.; Soler, C.; Toldrá, F. A simple, fast and reliable methodology for the analysis of histidine dipeptides as markers of the presence of animal origin proteins in feeds for ruminants. *Food Chem.* **2004**, *84* (3), 485-491.
6. Nardiello, D.; Cataldi, T. R. I. Determination of carnosine in feed and meat by high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1035* (2), 285-289.

7. Dunnett, M.; Harris, R. C.; Orme, C. E. Reverse-phase ion-pairing high-performance liquid-chromatography of phosphocreatine, creatine and creatinine in equine muscle. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **1991**, *51* (2), 137-141.
8. Schonherr, J. Analysis of products of animal origin in feeds by determination of carnosine and related dipeptides by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50* (7), 1945-1950.
9. Association of Official Analytical Chemists. Meat and meat products. In *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th ed.; AOAC, Ed.; Arlington, VA, 1984; Vol. II, 39, pp 1-23.
10. Mussini, E.; Colombo, L.; Deponte, G.; Marcucci, F. Determination of creatine in body-fluids and muscle. *J. Chromatogr.* **1984**, *305* (2), 450-455.
11. del Campo, G.; Irastorza, A.; Casado, J. A. Spectrophotometric Simultaneous determination of creatinine and creatine by flow-injection with reagent injection. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1995**, *352* (6), 557-561.
12. Dvorak, Z. Flow-Injection Determination of creatine in animal-tissues. *Anal. Chim. Acta* **1988**, *208* (1-2), 307-312.
13. Tranberg, M.; Stridh, M. H.; Jilderos, B.; Weber, S. G.; Sandberg, M. Reversed-phase HPLC with UV detection for the determination of N-acetylaspartate and creatine. *Anal. Biochem.* **2005**, *343* (1), 179-182.
14. Kvasnicka, F.; Voldrich, M. Isotachophoretic determination of creatinine in meat and meat products. *Electrophoresis* **2000**, *21* (14), 2848-2850.
15. Purchas, R. W.; Rutherford, S. M.; Pearce, P. D.; Vather, R.; Wilkinson, B. H. P. Concentrations in beef and lamb of taurine, carnosine, coenzyme Q(10,) and creatine. *Meat Sci.* **2004**, *66* (3), 629-637.
16. Yoshida, T. Peptide separation by hydrophilic-interaction chromatography: a review. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2004**, *60* (3), 265-280.
17. Alpert, A. J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic-acids and other polar compounds. *J. Chromatogr.* **1990**, *499*, 177-196.
18. Aristoy, M. C.; Toldrá, F. Histidine dipeptides HPLC-based test for the detection of mammalian origin proteins in feeds for ruminants. *Meat Sci.* **2004**, *67* (2), 211-217.
19. Cornet, M.; Bousset, J. Free amino acids and dipeptides in porcine muscles: differences between 'red' and 'white' muscles. *Meat Sci.* **1998**, *51* (3), 215-219.

20. Aristoy, M. C.; Toldrá, F. Deproteinization techniques for HPLC amino-acid-analysis in fresh pork muscle and dry-cured ham. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39* (10), 1792-1795.
21. Mant, C. T.; Litowski, J. R.; Hodges, R. S. Hydrophilic interaction/cation-exchange chromatography for separation of amphipathic alpha-helical peptides. *J. Chromatogr. A* **1998**, *816* (1), 65-78.
22. Zhu, B. Y.; Mant, C. T.; Hodges, R. S. Mixed-mode hydrophilic and ionic interaction chromatography rivals reversed-phase liquid-chromatography for the separation of peptides. *J. Chromatogr.* **1992**, *594* (1-2), 75-86.
23. Huang, Y.; Duan, J. P.; Chen, H. Q.; Chen, M.; Chen, G. N. Separation and determination of carnosine-related peptides using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis* **2005**, *26* (3), 593-599.
24. Aristoy, M. C.; Toldrá, F. Concentration of free amino acids and dipeptides in porcine skeletal muscles with different oxidative patterns. *Meat Sci.* **1998**, *50* (3), 327-332.
25. Dunnett, M.; Harris, R. C. High-performance liquid chromatographic determination of imidazole dipeptides, histidine, 1-methylhistidine and 3-methylhistidine in equine and camel muscle and individual muscle fibres. *J. Chromatogr. B* **1997**, *688* (1), 47-55.
26. Strege, M. A. Hydrophilic interaction chromatography electrospray mass spectrometry analysis of polar compounds for natural product drug discovery. *Anal. Chem.* **1998**, *70* (13), 2439-2445.
27. Oertel, R.; Neumeister, V.; Kirch, W. Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem-mass spectrometry to determine six aminoglycosides in serum. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1058* (1-2), 197-201.

Capítulo 2

**Contenido de creatina, creatinina y carnosina en músculos de cerdo de
distinto tipo metabólico**

Available online at www.sciencedirect.com

**MEAT
SCIENCE**

www.elsevier.com/locate/meatsci

Contents of creatine, creatinine and carnosine in porcine muscles of different metabolic types

Leticia Mora, Miguel Angel Sentandreu and Fidel Toldrá

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

Received for review May 25, 2007. Revised manuscript received October 31, 2007. Accepted November 2007.

Abstract

Creatine, creatinine and carnosine have been analyzed by hydrophilic interaction chromatography (HILIC) in seven different pork muscles of different metabolic type (*Semimembranosus*, *Biceps femoris*, *Gluteus maximus*, *Longissimus dorsi*, *Gluteus medius*, *Trapezius* and *Masseter*). As reported in previous literature, carnosine contents are related with the type of metabolism, being higher in those muscles with glycolytic metabolism. Creatine and creatinine also showed significantly higher concentrations in glycolytic muscles such as *Semimembranosus*, *Biceps femoris*, *Gluteus maximus* and *Longissimus dorsi*. *Masseter*, a red oxidative muscle, was characterized by the lowest contents of creatine, creatinine and carnosine and, finally, *Gluteus medius* and *Trapezius*, both intermediate muscles, had also intermediate contents of these studied compounds. Finally, a correlation between initial content of creatine and creatinine formation after cooking has been verified using pure standards and two different metabolic type muscles, *Longissimus dorsi* and *Masseter*, obtaining slightly higher creatinine amounts in *Longissimus dorsi*, probably due to its higher initial creatine content and its lower pH.

Keywords: HILIC; Hydrophilic interaction chromatography; Muscle; Metabolic type; Carnosine; Creatine; Creatinine.

INTRODUCTION

Carnosine is an histidine-containing dipeptide widely distributed in vertebrate animal tissues, especially skeletal muscle, heart and the central nervous system (Crush, 1970).

Creatine and its phosphorylated derivative phosphocreatine are key components of the energy delivery process in several tissues, particularly those characterized by the transfer of high energy phosphate to ADP in muscle cells (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000). These compounds play an important role in the energy metabolism of skeletal muscle, taking part in the post-mortem biochemical processes occurring immediately after slaughter (Toldrá, 2006). There is also extensive evidence that, under some circumstances, creatine supplements can enhance muscle performance (Demant & Rhodes, 1999).

On the other hand, creatine turns into creatinine in muscle due to a non-enzymatic conversion by the removal of water and the formation of a ring structure. This conversion takes place easily under heating conditions such as meat cooking. The presence of creatine and creatinine in meat has also been associated to negative aspects because creatine and creatinine can constitute important precursors of heterocyclic amines (HAs), which can be formed on the surface of meat when cooked at high temperatures using dry-heat such as in roasting, frying and grilling (Pais, Salmon, Knize & Felton, 1999).

Skeletal muscles consist of various fibre types, which differ in their contractility, their metabolism and other properties. Contractile and metabolic properties of skeletal muscle may strongly affect the pattern of energy metabolism in live animal, as well as during the post-mortem conversion of muscle to meat. Therefore, the metabolic type of the muscle is one of the main factors involved in the variability of meat quality (Valin, Touraille, Vigneron & Ashmore, 1982; Karlsson, Klont & Fernández, 1999).

Several authors have used myoglobin concentration and lactate dehydrogenase activity as an approximation to the glycolytic or oxidative pattern of the muscle (Leseigneur-Meynier & Gandemer, 1991; Flores, Alasnier, Aristoy, Navarro, Gandemer & Toldrá, 1996). The myoglobin content is closely related to the oxidative

pattern of the muscles whereas lactate dehydrogenase activity is an indicator of its glycolytic potential (Flores et al., 1996). In this way, porcine *Longissimus dorsi*, *Semimembranosus* and *Biceps femoris* were classified as glycolytic muscles while *Masseter* and *Trapezius* were assigned to the oxidative metabolism group. On the other hand, Leseigneur-Meynier and Gandemer (1991) consider three types of metabolism in pork: (i) glycolytic, with *Longissimus dorsi*; (ii) oxidative, with *Masseter*; and (iii) an intermediate one including *Trapezius*.

The content of natural dipeptides is significantly lower in oxidative muscles (Aristoy & Toldrá, 1998). These results agree with those reported by Cornet and Bousset (1998), who demonstrated that the content of several amino acids in muscle are closely related to the metabolic type of fibres. Both authors established that the highest carnosine amounts were found in glycolytic muscles, so that the content of the natural dipeptide carnosine constitutes a good indicator of muscle glycolytic activity.

The main objective of the present study was to determine by means of a recently developed methodology using hydrophilic interaction chromatography (HILIC) the content of creatine, creatinine and carnosine on seven different pork muscles (*Semimembranosus*, *Biceps femoris*, *Gluteus maximus*, *Longissimus dorsi*, *Gluteus medius*, *Trapezius* and *Masseter*), chosen to represent the three main metabolic types, in order to evaluate the relation between the total content of these compounds and the type of muscle metabolism. In addition, pure standards and *Longissimus dorsi* and *Masseter* pork muscles, with glycolytic and oxidative metabolism respectively, were cooked and analysed in order to establish a relation between initial amounts of creatine and the formation of creatinine after cooking.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents

All chemical and chromatographic reagents were of HPLC grade. Acetonitrile, ammonium acetate and glacial acetic acid were purchased from Scharlau (Barcelona,

Spain). Creatine and creatinine standards were from Fluka Chemie AG (Buchs, Switzerland).

Materials

Seven muscles, *Semimembranosus*, *Biceps femoris*, *Gluteus maximus*, *Longissimus dorsi*, *Gluteus medius*, *Trapezius* and *Masseter*, obtained each from four different porcine carcasses, from 6-month old female pigs, were used to detect significant differences in creatine, creatinine and carnosine content according to the type of muscle. These muscles were chosen in order to cover a broad range of metabolic types according to the description carried out by Leseigneur-Meynier and Gandemer (1991), Cornet and Bousset (1998) and Karlsson et al., (1999).

Sample and standards preparation

Standards preparation

The calibration ranges for the assayed compounds were established using a duplicate set of standards. Carnosine and creatinine calibration standards were prepared by diluting a stock solution of 1 mg/mL. A standard solution of creatine at 0.3 mg/mL was prepared because of the low solubility of this compound in the injection solution (0.01 N HCl in water/acetonitrile, (25:75, v/v)). Working standard solutions were prepared over the appropriate concentration range by dilution of stock solutions. All stock solutions were stored at -20 °C until use.

On the other hand, in order to study the influence of initial creatine amounts in the formation of creatinine after cooking, standards of creatine were prepared at three levels, 0.25, 0.5 and 0.75 mg/mL, that correspond to 100, 200 and 300 mg/100g of muscle, respectively. These concentrations were selected because they covered the usual range of creatine concentration in pork meat and its derived products (Macy, Naumann & Bailey, 1970; Del Campo, Gallego, Berregi & Casado, 1998; Kvasnicka & Voldrich, 2000). The effect of initial creatine amounts on the creatinine formation was studied at 72 °C during 10, 16, 30 and 60 min and during 30 min at 60, 65, 72 and 80 °C. These assays were carried out in 1 mL sealed tubes, introducing the standards in a water bath (Tectron Bio, Selecta, (Barcelona, Spain)) and holding them at 72 °C for

the specified times and during 30 min at the temperatures above mentioned. After the heating treatment, the standards were cooled to 0 °C in an ice bath in order to decrease the temperature as soon as possible to stop the creatine conversion to creatinine.

Finally, in order to study the effect of cooking in the creatine conversion to creatinine under controlled conditions of pH, temperature and time, standards of creatine and creatinine were prepared at similar concentrations to those expected in raw *Longissimus dorsi*: 0.875 mg/mL of creatine and 0.02 mg/mL of creatinine. The effect of cooking on the creatinine formation was established under the same cooking conditions described in '*Longissimus dorsi* and *Masseter* pork muscles processing' section.

Pork muscles preparation for analysis

The muscles *Semimembranosus*, *Biceps femoris*, *Gluteus maximus*, *Longissimus dorsi*, *Gluteus medius*, *Trapezius* and *Masseter*, were excised from four pork carcasses at 24 h post-mortem and immediately processed for further analysis following the method described by Aristoy and Toldrá (1991) with some minor changes. Briefly, 5 g of sample tissue were homogenized with 20 mL of 0.01 N HCl in a Stomacher (Seward Laboratory) for 15 min and further centrifuged in cold (4 °C) at 10000 rpm for 20 min. Supernatant was filtered through glass wool and 250 µL of this solution were deproteinized by adding 3 volumes of acetonitrile, standing at 4 °C for 20 min. Finally, the sample was centrifuged (10000 rpm) for 10 min at 4 °C and the supernatant directly analyzed. All the process was done in a cold-storage room at 5 °C in order to avoid possible influences of higher temperatures at the laboratory.

Longissimus dorsi and Masseter pork muscles processing

Two different metabolic type muscles were chosen in order to study the conversion of creatine to creatinine under controlled conditions of pH, temperature and time. So, *Longissimus dorsi*, a white glycolytic muscle, and *Masseter*, a red oxidative one, were cut in 2 mm thick slices and the effect of cooking conditions on the creatinine formation was established holding the samples at 72 °C during 0, 3, 7, 12, 16, 30 and

60 min and during 12 min at 24, 60, 72, 80 and 90 °C, always under controlled pH conditions. In fact, the pH was determined at each point of the experiment to ensure that no change in pH had occurred as a result of creatine conversion to creatinine. These assays were carried out in a water bath (Tectron Bio, Selecta, (Barcelona, Spain)) under controlled conditions of temperature. The use of thin slices allowed us to establish an immediate heat transfer between bath water and muscle slices. At the end of the different incubation periods, the samples were cooled to 0 °C in an ice bath in order to decrease the temperature as soon as possible and stop the creatine conversion to creatinine. Samples were prepared for analysis as previously described for pork muscle samples.

Description of the chromatographic method

Carnosine, creatine and creatinine were analyzed by hydrophilic interaction chromatography (HILIC) according to Mora, Sentandreu and Toldrá (2007). Briefly, 20 µL of each sample were injected into the HPLC system. The chromatographic separation was developed using an Atlantis HILIC Silica column (4.6 x 150 mm, 3 µm) together with an Atlantis HILIC Silica guard column (4.6 x 20 mm, 3 µm) both from Waters (Massachusetts, USA). Mobile phases consisted of solvent A, containing 0.65 mM ammonium acetate, pH 5.5, in water/acetonitrile (25:75), and solvent B, containing 4.55 mM ammonium acetate, pH 5.5, in water/acetonitrile (70:30). The separation conditions were a linear gradient from 0% to 100% of solvent B in 13 min at a flow rate of 1.4 mL/min. The separation was monitored at a wavelength of 214 nm for creatine and carnosine, whereas a wavelength of 236 nm was used for creatinine detection. Peak areas were correlated to compound concentration by interpolation in the corresponding calibration curve. The column was equilibrated for 10 min under the initial conditions before each injection.

Chromatography was performed in a HPLC Agilent 1100 Series system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipped with a quaternary pump (G1311A), an autosampler (G1313A) and a vacuum degasser (G1379A). Ultraviolet detection was made by a G1315B diode array detector, which was used in the range 195-300 nm.

Statistical method

The ANOVA procedure was used to determine significant differences between type of muscle and measured compounds using the software Statgraphics Plus (v 5.1). Each statistical analysis was done using four samples for each muscle type ($n = 4$) and the normality of the data was tested before applying the ANOVA procedure.

RESULTS AND DISCUSSION

Several pork muscles having different glycolytic/oxidative metabolic patterns have been analysed for their contents in carnosine, creatine and creatinine. The results are shown in **Table 1**, where muscle types *Semimembranosus*, *Biceps femoris*, *Gluteus maximus*, *Longissimus dorsi*, *Gluteus medius*, *Trapezius* and *Masseter* have been arranged according to their content in carnosine.

Table 1. Carnosine, creatine and creatinine content in seven pork muscles having different metabolic patterns.

Muscle type	Carnosine			Creatine			Creatinine		
	Mean	SD	CV	Mean	SD	CV	Mean	SD	CV
<i>Semimembranosus</i>	419.41 ^a	46.06	10.98	373.76 ^a	10.88	2.91	9.06 ^a	0.18	1.98
<i>Biceps femoris</i>	367.53 ^b	44.03	11.98	343.03 ^b	16.16	4.71	7.84 ^b	0.39	5.04
<i>Gluteus maximus</i>	326.42 ^c	11.16	3.42	344.18 ^b	7.56	2.20	7.46 ^b	0.06	0.79
<i>Longissimus dorsi</i>	324.48 ^c	22.88	7.05	351.82 ^b	16.9	4.80	8.37 ^c	0.97	11.56
<i>Gluteus medius</i>	259.49 ^d	3.76	1.45	324.93 ^c	0.98	0.30	6.55 ^d	0.15	2.35
<i>Trapezius</i>	210.84 ^c	6.84	3.24	298.21 ^d	6.94	2.33	5.46 ^e	0.33	5.97
<i>Masseter</i>	13.55 ^f	0.75	5.50	247.45 ^e	4.72	1.91	3.34 ^f	0.28	8.36

Different letters within the same column mean significant differences ($p < 0.05$).

Results expressed as means of four muscles of each type (in mg/100 g muscle) with standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV, as %).

The results obtained agree with those reported by other authors for the quantification of this peptide (Carnegie, Hee & Bell, 1982; Aristoy & Toldrá, 1998; Cornet & Bousset, 1998). *Gluteus maximus* and *Longissimus dorsi* present a similar content of carnosine (326.42 and 324.48, respectively). Reports regarding creatine and creatinine contents in different pork muscles are scarce in literature although Harris,

Lowe, Warnes and Orme (1997), Purchas, Rutherford, Pearce, Vather and Wilkinson (2004), and Pegg, Amarowicz and Code (2006) had reported creatine and creatinine contents in other species.

The results of the analysis of variance show that muscle type has a significant effect on the content of the measured compounds carnosine, creatine and creatinine. Among these, the analysis revealed substantial differences in the content of carnosine according to the type of muscle ($p < 0.05$) as reported in the literature (Aristoy et al., 1998; Cornet & Bousset, 1998). The highest contents of carnosine were found in glycolytic muscles such as *Semimembranosus*, *Biceps femoris*, *Gluteus maximus* and *Longissimus dorsi*, and the lowest contents of carnosine appeared in oxidative muscles such as *Masseter*. Finally, muscles *Gluteus medius* and *Trapezius*, with an intermediate metabolism, also showed an intermediate content of carnosine. According to Suzuki, Ito, Mukai, Takahashi and Takamatsu (2002), higher carnosine contents in glycolytic muscles seem to be because the physicochemical buffering capacity of carnosine is more required for glycolytic muscles, where its higher dependence on anaerobic metabolism increases the lactic acid accumulation. In fact, these authors reported that carnosine concentration could be an important factor in determining the high-intensity exercise performance.

The analysis of variance also revealed significant differences in creatine and creatinine content depending on the type of muscle ($p < 0.05$). In this way, the highest contents of creatine, as also seen with carnosine, were found in glycolytic muscles *Semimembranosus*, *Longissimus dorsi*, *Gluteus maximus* and *Biceps femoris*. This could be due to the highest dependence of glycolytic muscles on anaerobic metabolism. In fact, the greater values of creatine could come from its phosphorylated form phosphocreatine, which is involved in the transfer of high energy phosphate to ADP.

In this study, it has been observed that as long as the amounts of carnosine increases with the glycolytic activities of the muscle, also creatine and creatinine contents increase in this type of metabolism. However, this tendency has not been observed in the case of oxidative muscles like *Masseter*, which presents the lowest content of carnosine and, despite this, considerable amounts of creatine. **Fig. 1**

shows the ratios of creatinine/creatine in the studied muscles. The purpose to use the ratio was to eliminate the variations in creatinine amounts that could occur because of differences in the initial content of protein in the different muscles. As can be observed, ham muscles (*Semimembranosus*, *Biceps femoris*, *Gluteus maximus* and *Gluteus medius*) together with *Longissimus dorsi*, present the highest ratios mainly due to their high content of creatinine (see **Table 1**), whereas *Masseter* presents the lowest ratio in accordance to its low creatinine content.

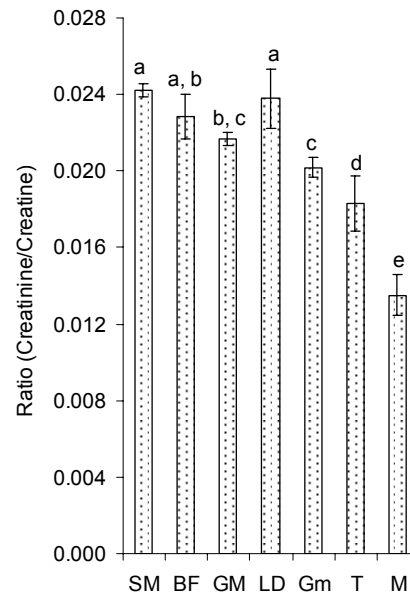


Figure 1. Creatinine/creatine ratios in seven different pork muscles. Each value represents the mean of four muscle samples from different carcasses and labelled error bars indicate the standard deviation for each measurement. Bars without a common letter indicate significant differences ($p < 0.05$). SM: *Semimembranosus*, BF: *Biceps femoris*, GM: *Gluteus maximus*, LD: *Longissimus dorsi*, Gm: *Gluteus medius*, T: *Trapezius* and M: *Masseter*.

Many authors (Edgar & Shiver, 1925; Fuller & Elia, 1988; Kvasnicka et al., 2000) reported the influence of pH, temperature and time in creatine conversion to creatinine. According to the literature, all authors agree that creatine contents decrease after cooking, while creatinine contents increase, presumably due to the heat-induced conversion of creatine to creatinine (Macy et al., 1970; Purchas,

Busboom & Wilkinson, 2006). It has also been reported that the increase in creatinine concentration with cooking was appreciably greater than the decrease in creatine (Macy et al., 1970; Pegg et al., 2006; Purchas et al., 2006).

Thus, a study with standards of creatine was done in order to relate initial amounts of creatine with creatinine formation after cooking. This study has been done under controlled conditions of temperature, time and pH. **Fig. 2A** shows the catalysis of this non-enzymatic reaction at a constant temperature of 72 °C and increasing times. **Fig. 2B** shows creatinine formation under a constant time of 30 min and at different temperatures. As can be observed, a correlation between initial content of creatine and creatinine formation after cooking has been verified in both conditions, at constant temperature (**Fig. 2A**) and at constant time (**Fig. 2B**). As can be observed in **Fig. 2A**, significant differences between time and creatinine concentration has been obtained. **Fig. 2B** also shows significant differences between temperature and creatinine concentration. This indicates that initial creatine amounts, apart from pH, temperature and time, constitute a decisive factor for the creatinine production. In this way, muscle samples with the highest contents of initial creatine amounts also should show the greatest creatinine values after cooking.

In order to verify the correlation between initial creatine amounts and creatinine formation after cooking, the ratio of creatinine/creatine was studied under controlled conditions of pH, temperature and time using pure standards and *Longissimus dorsi* and *Masseter* pork muscles.

The effect of time on the ratio of creatinine/creatine was assayed at a constant temperature of 72 °C. As can be observed in **Fig. 3A**, increasing values of creatinine were obtained with time of cooking and a linear relation between creatinine/creatine ratio and time could be established in pure standards, *Longissimus dorsi* and *Masseter*.

On the other hand, the effect of temperature on creatinine formation under constant time conditions was also studied. As can be observed, a non-linear relation between creatinine/creatine ratio and temperature was obtained (**Fig. 3B**). No significant differences in creatinine formation were observed below 72 °C, but when this temperature was reached, an inflexion followed by a high positive slope was

observed in both pure standards and muscle samples. This clearly shows an increase in creatinine formation at temperature values higher than 72 °C.

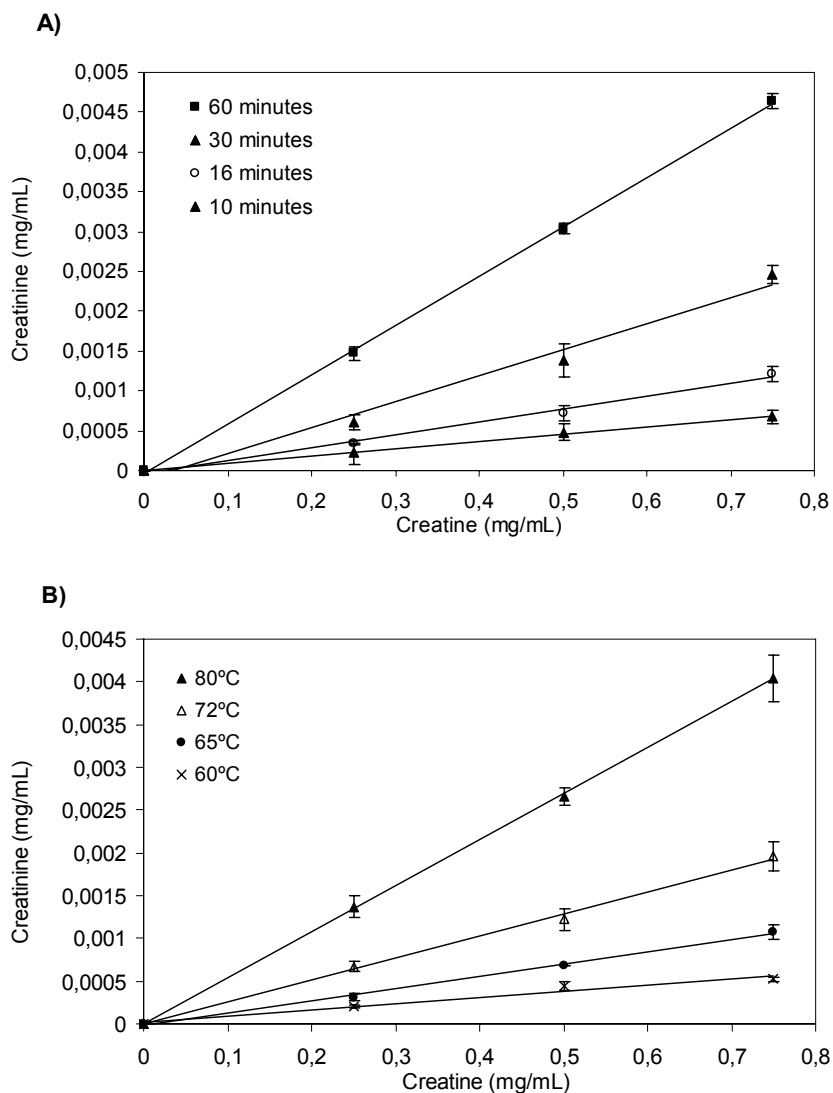


Figure 2. Effect of initial amount of creatine on the formation of creatinine in pure standard solutions of creatine (0.25, 0.50, and 0.75 mg/mL) under controlled conditions of temperature and time. (A) At a constant temperature of 72 °C along different times of incubation (10, 16, 30 and 60 min) and (B) At several temperatures (60, 65, 72, 80 °C) during 30 min. The initial creatine solutions contained no creatinine. Labelled error bars indicate the standard deviation for each measurement.

In all the performed experiments (Figs. 3A and 3B), significant differences were detected between muscle samples and standards.

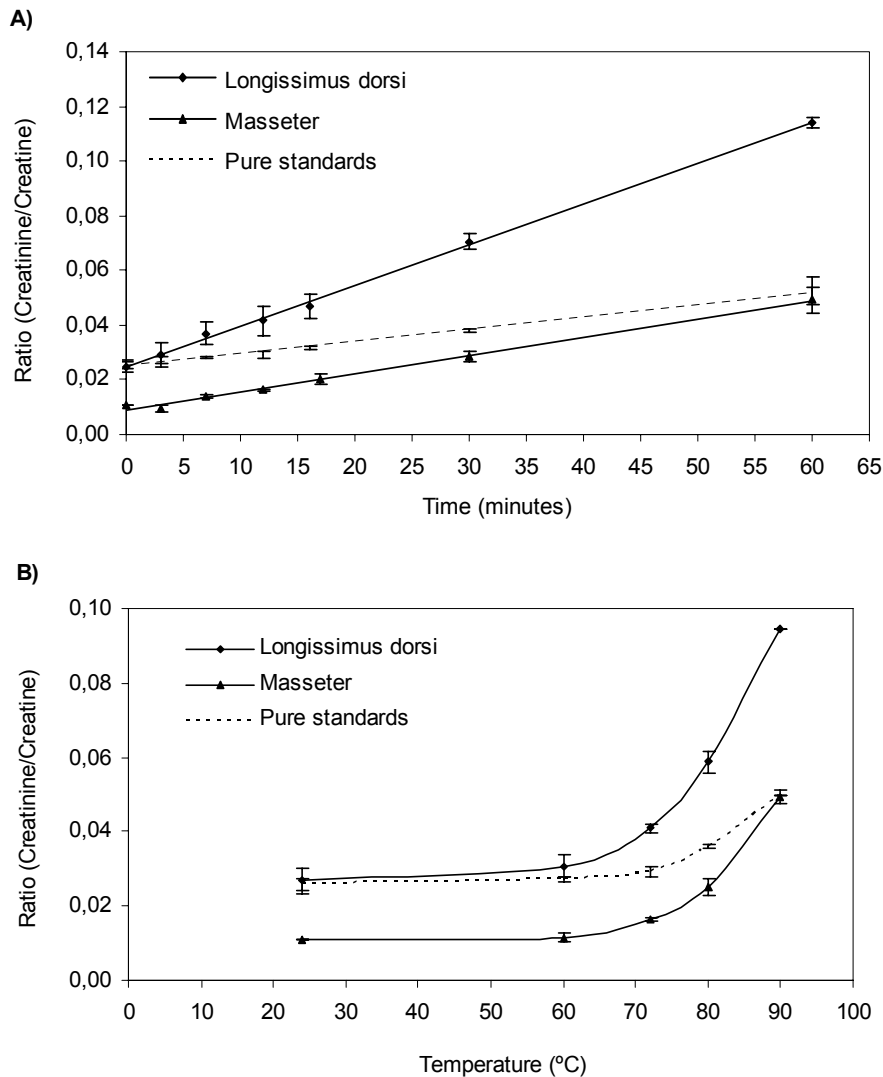


Figure 3. Effect of time and temperature on creatinine/creatine ratio in a pure standard solution (0.875 mg/mL of creatine and 0.02 mg/mL of creatinine) and *Longissimus dorsi* and *Masseter* pork muscle slices. (A) At a constant temperature of 72 °C along different incubation times (0, 3, 7, 12, 16, 30 and 60 min) and (B) At several temperatures (24, 60, 72, 80 and 90 °C) during 12 min. Labelled error bars indicate the standard deviation for each measurement.

Higher creatinine/creatine ratios were obtained in all the experiments when cooking pork *Longissimus dorsi* samples in comparison to pure standards despite the similar initial creatine and creatinine amounts present in both assays. The differences in creatine conversion could be due to the pH differences existing between *Longissimus dorsi* (5.6) and standards solution (6.3). In fact, many authors establish that acid media increases the creatine conversion to creatinine. So, according to Edgar and Shiver (1925), creatine is practically quantitatively converted to creatinine in acid solution and thus, acid media could be an explanation for the unilateral conversion of creatine to creatinine (Fuller & Elia, 1988).

On the other hand, although *Longissimus dorsi* and *Masseter* present a very similar behaviour, **Figs. 3A** and **3B** show that the creatine conversion to creatinine is slightly higher in *Longissimus dorsi* than in *Masseter*. According to these figures, significant differences have been detected between muscle samples in both cases, at a constant temperature along different times (**Fig. 3A**) and at different temperatures during a constant time (**Fig. 3B**). This difference could be due to the higher initial creatine content of *Longissimus dorsi* (351.82 mg/100g against the 247.45 mg/100g found in *Masseter*) and the differences in pH between these two muscles (5.6 in *Longissimus dorsi* and 5.7 in *Masseter*). Monin, Mejenesquijano and Talmant (1987) established that in pork muscles as *Gluteus* and *Adductor*, which contain less glycogen than *Longissimus dorsi* muscle, the glycolytic potential might play a limiting role in the extent of the pH fall. This could explain the pH differences found between *Longissimus dorsi*, a glycolytic muscle, and *Masseter*, a muscle with a low content of glycogen. So, the lower pH of the *Longissimus dorsi* together with its higher initial creatine content could be responsible for the greater creatinine formation after cooking that occurs in this muscle.

CONCLUSION

This study clearly demonstrates that muscle type has a significant effect ($p < 0.05$) on the contents of carnosine, creatine and creatinine. *Semimembranosus*, *Biceps femoris*, *Gluteus maximus* and *Longissimus dorsi*, all of them glycolytic muscles, have

the highest carnosine, creatine and creatinine contents. *Gluteus medius* and *Trapezius*, both muscles having an intermediate metabolism, present also intermediate amounts of these compounds whereas *Masseter*, a red oxidative muscle, has the lowest content of carnosine, creatine and creatinine. So, it has been concluded that, in the same way as carnosine content increases with the glycolytic activity of the muscle (Macy et al., 1970; Aristoy et al., 1998), also creatine and creatinine increase in muscles having this type of metabolism.

Finally, a study dealing with standards and cooked pork muscle samples shows a correlation between initial content of creatine and the amount of creatinine generated after cooking. Statistically significant differences were detected between muscle samples and standards possibly due to the pH differences existing between them. From this study, it has also been concluded that, apart from pH, temperature and time, the initial amount of creatine is a decisive factor for creatinine generation.

ACKNOWLEDGMENTS

FPU Scholarship from Ministerio de Educación y Ciencia (Spain) to L.M. and an I3P-CSIC contract from the European Social Fund to M.A.S. are fully acknowledged. Agroalimed grant from Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación (Generalitat Valenciana, Spain) is also acknowledged.

REFERENCES

- Aristoy, M. C. & Toldrá, F. (1998). Concentration of free amino acids and dipeptides in porcine skeletal muscles with different oxidative patterns. *Meat Science* **50**(3), 327-332.
- Aristoy, M. C. & Toldrá, F. (1991). Deproteinization techniques for HPLC amino-acid-analysis in fresh pork muscle and dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **39**(10), 1792-1795.
- Carnegie, P. R., Hee, K. P., & Bell, A. W. (1982). Ophidine (beta-alanyl-L-3-methylhistidine, balenine) and other histidine dipeptides in pig muscles and tinned hams. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **33**(8), 795-801.
- Cornet, M. & Bousset, J. (1998). Free amino acids and dipeptides in porcine muscles: differences between 'red' and 'white' muscles. *Meat Science* **51**(3), 215-219.

- Crush, K. G. (1970). Carnosine and related substances in animal tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology* **34**(1), 3.
- Del Campo, G., Gallego, B., Berregi, I., & Casado, J. A. (1998). Creatinine, creatine and protein in cooked meat products. *Food Chemistry* **63**(2), 187-190.
- Demant, T. W. & Rhodes, E. C. (1999). Effects of creatine supplementation on exercise performance. *Sports Medicine* **28**(1), 49-60.
- Edgar G. & Shiver H.E. (1925). The equilibrium between creatine and creatinine, in aqueous solution. The effect of hydrogen ion. *Journal of American Chemical Society* (47), 1179-1188.
- Flores, M., Alasnier, C., Aristoy, M. C., Navarro, J. L., Gandemer, G., & Toldrá, F. (1996). Activity of aminopeptidase and lipolytic enzymes in five skeletal muscles with various oxidative patterns. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **70**(1), 127-130.
- Fuller, N. J. & Elia, M. (1988). Factors influencing the production of creatinine - Implications for the determination and interpretation of urinary creatinine and creatine in man. *Clinica Chimica Acta* **175**(3), 199-210.
- Harris, R. C., Lowe, J. A., Warnes, K., & Orme, C. E. (1997). The concentration of creatine in meat, offal and commercial dog food. *Research in Veterinary Science* **62**(1), 58-62.
- Karlsson, A. H., Klont, R. E., & Fernández, X. (1999). Skeletal muscle fibres as factors for pork quality. *Livestock Production Science* **60**(2-3), 255-269.
- Kvasnicka, F. & Voldrich, M. (2000). Isotachophoretic determination of creatinine in meat and meat products. *Electrophoresis* **21**(14), 2848-2850.
- Leseigneur-Meynier, A. & Gandemer, G. (1991). Lipid-composition of pork muscle in relation to the metabolic type of the fibers. *Meat Science* **29**(3), 229-241.
- Macy, R. L., Naumann, H. D., & Bailey, M. E. (1970). Water-soluble flavor and odor precursors of meat .5. influence of heating on acid-extractable non-nucleotide chemical constituents of beef, lamb and pork. *Journal of Food Science* **35**(1), 83.
- Monin, G., Mejenesquijano, A., & Talmant, A. (1987). Influence of breed and muscle metabolic type on muscle glycolytic potential and meat pH in pigs. *Meat Science* **20**(2), 149-158.
- Mora, L., Sentandreu, M. A., & Toldrá, F. (2007). Hydrophilic chromatographic determination of carnosine, anserine, balenine, creatine and creatinine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 4664-4669.
- Pais, P., Salmon, C. P., Knize, M. G., & Felton, J. S. (1999). Formation of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in dry-heated model systems, meats, and meat drippings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**(3), 1098-1108.

- Pegg, R. B., Amarowicz, R., & Code, W. E. (2006). Nutritional characteristics of emu (*Dromaius novaehollandiae*) meat and its value-added products. *Food Chemistry* **97**(2), 193-202.
- Purchas, R. W., Busboom, J. R., & Wilkinson, B. H. P. (2006). Changes in the forms of iron and in concentrations of taurine, carnosine, coenzyme Q(10), and creatine in beef longissimus muscle with cooking and simulated stomach and duodenal digestion. *Meat Science* **74**(3), 443-449.
- Purchas, R. W., Rutherford, S. M., Pearce, P. D., Vather, R., & Wilkinson, B. H. P. (2004). Concentrations in beef and lamb of taurine, carnosine, coenzyme Q(10,) and creatine. *Meat Science* **66**(3), 629-637.
- Suzuki, Y., Ito, O., Mukai, N., Takahashi, H., & Takamatsu, K. (2002). High level of skeletal muscle carnosine contributes to the latter half of exercise performance during 30-s maximal cycle ergometer sprinting. *Japanese Journal of Physiology* **52**(2), 199-205.
- Toldrá, F. (2006). Meat: Chemistry and biochemistry. *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*. (volume I), 28-1-28-18. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Valin, C., Touraille, C., Vigneron, P., & Ashmore, C. R. (1982). Prediction of lamb meat quality traits based on muscle biopsy fiber typing. *Meat Science* **6**(4), 257-263.
- Wyss, M. & Kaddurah-Daouk, R. (2000). Creatine and creatinine metabolism. *Physiological Reviews* **80**(3), 1107-1213.

Capítulo 3

**Efecto de las condiciones de cocción sobre la formación de creatinina en
jamón cocido**



ACS Publications
High quality. High impact.

JOURNAL OF
AGRICULTURAL AND
FOOD CHEMISTRY

Effect of cooking conditions on creatinine formation in cooked ham

Leticia Mora, Miguel Angel Sentandreu and Fidel Toldrá

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

Received for review June 26, 2008. Revised manuscript received September 18, 2008. Accepted September 23, 2008.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of different cooking procedures on the concentrations of creatine and creatinine and the ratio of creatinine/creatine in cooked ham. Two cooking methods (constant temperature and increasing temperature, constant T and ΔT , respectively) were tested on different locations in porcine *Longissimus dorsi* muscle and ham (*Semimembranosus*, *Biceps femoris* and *Gluteus* muscles). The results showed larger creatine conversion into creatinine in the surface layer than in the core as well as higher creatinine/creatine ratio values when applying the ΔT in comparison to the constant T method. A correlation between the creatinine/creatine ratio and the heat treatment was established, and 15 samples of commercial cooked hams were analyzed to support these results. This creatinine/creatine ratio analyzed in the surface of the ham could be used as a rapid and nondestructive indicator to determine the effectiveness of the heat treatment in cooked ham processes.

Keywords: Cooked ham; cooking method; creatine; creatinine; quality marker; hydrophilic interaction chromatography; HILIC.

INTRODUCTION

Cooked ham is a well-known meat product with high consumption levels all over the world. It contains a large number of compounds of interest including creatine and creatinine. Creatine is an important component of the energy delivery process in several tissues, particularly those implicated in high energy demand. Creatine exists in equilibrium with phosphocreatine in skeletal muscle, where the reversible conversion of creatine into phosphocreatine is catalized by creatine kinase and involves the transfer of the γ -phosphate group of adenosine triphosphate (ATP) onto the guanidine group of creatine. Thus, creatine plays an important role in the energy metabolism of skeletal muscle providing the necessary energy for vigorous muscle contraction. Creatine is produced in the liver, kidneys, and pancreas but can also be obtained from dietary supplements and from foods such as meat and fish. Supplements of creatine have shown to improve muscle performance in high-intensity exercise (1-3).

Creatine turns into creatinine in muscle due to a nonenzymatic conversion by the removal of water and the formation of a ring structure. This non-enzymatic conversion takes place easily under heating conditions such as meat cooking. Some authors have established a correlation between creatinine content and flavor of cooked meat (4, 5). On the other hand, the addition of creatine to broths has also been strongly recommended because of its contribution to the full flavor of meat extracts (6, 7).

The presence of creatine and creatinine in cooked meat has also been associated with negative aspects, because creatine and creatinine can constitute important precursors of heterocyclic amines (HAs) formed on the surface of meat when it is cooked at high temperatures such as roasting, frying, and grilling (8).

It is important to consider the study of the cooking step as a critical part of the cooked ham process in relation to its safety and quality. Critical (indicator) microorganisms and acid phosphatase (ACP) activity have been used to assess the extent of heat treatment in the central area of canned hams and meat products for several decades (9-12) despite their disadvantages because they are destructive determinations.

The main objective of the present study was to evaluate the effect of cooking temperature on creatine and creatinine concentration as well as establish a correlation between this ratio and the applied heat treatment.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents

All chemical and chromatographic reagents were of HPLC grade. Acetonitrile, acetone, ammonium acetate, and glacial acetic acid were purchased from Scharlau (Barcelona, Spain). Creatine, creatinine, and carnosine standards were from Fluka Chemie AG (Buchs, Switzerland). Sodium carbonate anhydrous and sodium hydrogen carbonate used in phosphates analysis were from Panreac (Spain).

Materials

In a first set of experiments, *Longissimus dorsi* muscle, excised from four carcasses of 6-month-old female pigs at 24 h post-mortem, was used in order to detect differences in creatine and creatinine amounts by varying time and temperature conditions according to the cooking technique established. The use of just one type of muscle such as *Longissimus dorsi* allowed the evaluation of creatine conversion to creatinine according to the location and the cooking method in a homogeneous sample, avoiding the variability in the amounts of these compounds that could exist in a mixture of muscles (13).

In a second approach, *Semimembranosus*, *Biceps femoris*, and *Gluteus* muscles were chosen from four carcasses of 4-month-old female pigs at 15 h post-mortem and immediately prepared and processed to obtain cooked ham. These three muscles were selected for being the main muscles of the pork leg. Controlled muscles were needed to analyze the variability in creatine and creatinine amounts in different cooked ham muscles.

Finally, five different classes of commercial boneless cooked ham from different brands were purchased from different supermarkets. Two top-quality ('extra') cooked hams, a tinned cooked ham, a ham cooked in its juice, and a cold-cut sandwich

shoulder (14) were selected in order to obtain the highest variety of results in creatine and creatinine contents. Three samples of each quality, each from different batches, were obtained.

Sample and standards preparation

Standards preparation

The calibration ranges for the assayed compounds were established using a duplicate set of standards. Carnosine and creatinine calibration standards were prepared by diluting a stock solution of 1mg/mL, whereas creatine standards were prepared from a stock solution of 0.3 mg/mL. All dilutions were done using 0.01 N HCl/acetonitrile (25:75, v/v).

Pork loin processing

Four pieces of pork loin, weighing approximately 250 g each, were cooked in a bath until an internal temperature of 72 °C. The effect of two cooking methods on creatine and creatinine amounts was tested. Pork loin pieces were cooked using a constant one-stage cooking cycle (cooked at 85 °C to a core temperature of 72 °C) and a ΔT cycle (maintaining a constant difference of 35 °C, between water bath and core temperatures until the bath reached 85 °C, whereupon the core was allowed to come up to 72 °C). Both assays were done using a digital sensor thermometer in order to control the core temperature of the pieces. After cooking, traditional water immersion method (at 0 °C) was used to cool all samples to 4 °C at the core. Brine solution was not injected into *L.dorsi* muscle in order to avoid its possible influence in creatine conversion to creatinine.

Cooked ham preparation and processing

A study about how the creatine conversion to creatinine can be influenced by the cooking method has been carried out as a way to assess the effectiveness of the heat treatment. Two cooking methods, constant T and ΔT , were selected as representative of different cooking processes, and their effect on creatinine formation was studied in pork loin pieces and ham.

The individual muscles excised from four carcasses and weighing approximately 2 kg (*Biceps femoris* and *Semimembranosus* muscles) and 1.5 kg (*Gluteus* muscle), were injected manually to reach 120% of their green weight with a brine solution formulated to give the following concentration of ingredients in the injected meat: 2.34 % of sodium tripolyphosphate, 11.69% of NaCl, 0.03% of nitrites (NaNO₂) and finally, 1.47% of glucose and 0.13% of sodium ascorbate (15). After brine injection, the samples were tumbled manually for 24 h at 4 °C at three hours intervals. After tumbling, the muscles were formed by hand and vacuum packaged in cooking bags. Hams were cooked using the two cooking methods previously described under 'Pork loin processing'. For each cooking treatment, weights of pork loin and cooked ham before cooking and after cooling were recorded to calculate the weight losses during the process as follows:

$$\text{Process weight losses (\%)} = \frac{\text{Weight before cooking} - \text{Weight after cooling}}{\text{Weight before cooking}} \times 100$$

The weights of hams before brine injection were also recorded to calculate the yield of the complete process:

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{Weight after cooling}}{\text{Weight before brine injection}} \times 100$$

After cooking, traditional water immersion method (at 0 °C) was used to cool all samples to 4 °C at the core.

Cooking efficiency was calculated as the slope of the heating curve (time versus temperature in the core of the ham) of the cooking process.

Commercial cooked ham

A cut cross slice 15 mm thick from the geometrical middle was cut from each cooked ham, and three samples from each slice were excised in order to analyze the content of creatine, creatinine, and carnosine in different random muscles from each type of cooked ham. The identification of the different muscles was not necessary, having

proved that nonsignificant differences in creatinine/creatine ratios exist between the main ham muscles (*Semimembranosus*, *Biceps femoris* and *Gluteus*).

Creatine, creatinine, and carnosine analysis of *Longissimus dorsi* muscle and cooked ham

The temperature profile in the core of the pieces of loin and cooked ham is a factor that differs among the various cooking techniques. For this reason, after cooking and cooling, all pieces were half-cut, and three samples from each piece were taken in order to analyze differences in creatine and creatinine amounts between the core, half, and surface. All samples were immediately processed for further analysis following the method described by Aristoy and Toldrá (16) with some minor changes. Briefly, 5 g of sample tissue were homogenized with 20 mL of 0.01 N HCl in a stomacher (Seward Laboratory) for 15 min and further centrifuged in the cold (4 °C) at 10000 rpm for 20 min. Supernatant was filtered through glass wool and 250 µL of this solution was deproteinized by adding 3 volumes of acetonitrile, standing at 4 °C for 20 min. Finally, the sample was centrifuged (10000 rpm) for 10 min at 4 °C and the supernatant directly analyzed.

Chemical analysis

Measurements of pH were taken in *Semimembranosus*, *Biceps femoris* and *Gluteus* muscles before brine injection and after cooling. For this purpose, 5 g of each muscle were taken, triturated, and homogenized in 10 mL of bidistilled water using a Polytron PT2100 (Kinematica, Inc.). The pH measurement was taken directly on the homogenized solution with an electrochemical sensor (238000/09 Hamilton). Moisture content was determined by oven-drying to constant weight at 100 °C (ISO R-1442). Phosphates were analyzed using an ion analyzer with a chemical conductivity detector (Metrohm). The chromatographic separation was developed in a Metrosep A Supp 5 column (4.0 x 250 mm, 5 µm) from Metrohm. The mobile phase contained 3.2 mM of sodium carbonate anhydrous and 1 mM of sodium hydrogen carbonate in water and 30 mL of acetone were added per liter of solution. The chromatographic separation was isocratic, and it was developed at a flow rate of 0.7 mL/min.

Description of the chromatographic method

Creatine, creatinine and carnosine were analyzed by hydrophilic interaction chromatography (HILIC) under the conditions described by Mora et al. (17).

Statistical analysis

The ANOVA procedure was used to determine significant differences between *Longissimus dorsi* muscle and the different cooked ham muscles as well as between the five classes of commercial cooked ham analyzed using the software Statgraphics Plus (v 5.1). Each statistical analysis and the normality of the data were tested before the application of the ANOVA procedure.

RESULTS AND DISCUSSION

Cooking stage is a critical part of the cooked ham processing. Differences in cooking bath temperature and time of immersion influence the creatine conversion to creatinine as well as the efficiency, water loss, and yield. In this way, the constant T cooking method, which consists of cooking at 85 °C, is shorter than the ΔT method, which increases the water bath temperature in a progressive way. The effect of the cooking technique on cooking efficiency is shown in **Table 1**. As can be observed, constant T cooking shows the highest cooking efficiency (0.54 and 4.90 min/°C in *Longissimus dorsi* and cooked ham, respectively), probably due to the shorter times needed for this type of cooking.

With regard to water losses in cooked ham samples, the constant T cooking method produces higher losses (15.7%) compared with the ΔT cooking method (13.6%). These results fully agree with those reported by other authors, who established that the ΔT cooking method significantly reduced cooking losses by 2-3% in *Biceps femoris* and *Semimembranosus* pork muscles with respect to constant T cooking (18). However, process losses obtained in *Longissimus dorsi* muscle were much higher in the samples cooked using the ΔT method. This could be due to the lack of brine solution injection because phosphates clearly influence the muscle absorption

of water. On the other hand, some authors also established that cooking losses should not be extrapolated between muscles cooked under standard conditions (19). In fact, cooking losses in *Biceps femoris* were found to be independent of the cooking technique, whereas, in the case of *Longissimus dorsi*, differences in cooking losses were detected when different cooking techniques were used (20). **Table 1** also shows that cooking ham with the ΔT method could obtain the highest yield compared with the constant T cooking method. The lowest yield values obtained during *Longissimus dorsi* cooking could be due to the absence of brine solution injection, which caused higher losses of water and, thus, a decrease in the percentage of yield.

Table 1. Effect of different cooking methods on cooking efficiency, weight loss, and yield in *Longissimus dorsi* muscle and cooked ham

Cooking methods	Sample Type	Cooking efficiency (min/°C)	Process losses (%)	Yield (%)	Cooking time (min)
Constant T	<i>Longissimus dorsi</i> ^a	0.54	19.9	83.43	43
	Cooked ham	4.90	15.7	101.55	325
ΔT	<i>Longissimus dorsi</i> ^a	0.83	30.3	76.75	69
	Cooked ham	6.96	13.6	105.05	455

^a *Longissimus dorsi* muscle was not brine injected.

The amounts of creatine and creatinine and also the creatinine/creatinine ratios in the two different processes studied are shown in **Table 2**. As can be observed, cooking produces a remarkable increase in creatinine amounts, probably due to the conversion of creatine to creatinine. Creatine contents before and after cooking in both pork loin and ham are very similar, although a slight decrease is observed after cooking, especially in the case of ham. A considerable increase in creatinine/creatinine ratio values has been shown in samples after cooking (0.02 and 0.01 in noncooked *Longissimus dorsi* and ham samples, respectively, vs 0.13 and 0.39 in the constant T method, and 0.14 and 0.46 in the ΔT method, all for surface location). Our results agree with those obtained by other authors, who demonstrated that cooking brought about a decrease in the amounts of creatine and an increase of creatinine, presumably due to the heat-induced conversion of creatine to creatinine (4, 21, 22). As can be observed with creatine and creatinine values obtained after cooking,

increases in creatinine levels did not fully account for decreases in creatine levels. In fact, it has been established that as a result of thermal processing, creatine levels in pork meat preparations decreased by 22%, whereas creatinine levels increased by 390% (23).

Table 2. Levels of creatinine (Cn), creatine (Cr), and creatinine/creatine ratio in fresh and cooked pork *Longissimus dorsi* muscle and ham, according to the type of cooking and location^a.

	Cooking methods	Location	Creatinine		Creatine		Ratio (Cn/Cr)
			Mean	SD	Mean	SD	
<i>Longissimus dorsi</i>	No cooking		8.78 ^a	0.71	354.56 ^{a,b}	17.56	0.02 ^a
	Constant T	Core	22.68 ^b	0.55	387.09 ^a	6.58	0.06 ^b
		Half	23.06 ^{b,c}	0.72	354.06 ^{a,b}	11.91	0.06 ^{b,c}
		Surface	44.57 ^{c,d,e}	1.59	340.92 ^b	8.87	0.13 ^{b,c}
		Exudate	0.010 ^f	0.0003	0.025 ^c	0.0002	0.40 ^{d,e}
	ΔT	Core	22.34 ^{b,c}	0.88	338.13 ^b	13.05	0.07 ^b
		Half	23.96 ^{b,c}	0.87	328.86 ^b	7.60	0.07 ^{b,c}
		Surface	43.81 ^{b,c,d}	1.48	319.52 ^b	6.46	0.14 ^{b,c}
		Exudate	0.011 ^f	0.0003	0.027 ^c	0.0005	0.41 ^{d,e}
	Cooked ham	No cooking		4.94 ^g	0.70	351.99 ^{a,b}	7.24
Constant T		Core	35.12 ^{b,c,d}	0.47	243.70 ^{d,e}	13.44	0.14 ^{b,c}
		Half	39.50 ^{b,c}	2.75	232.44 ^{d,e}	14.36	0.17 ^{b,c}
		Surface	83.30 ^h	9.58	212.04 ^{d,f}	4.82	0.39 ^{d,e}
		Exudate	270.27 ⁱ	16.43	183.98 ^f	47.85	1.53 ^f
ΔT		Core	56.07 ^{d,e}	10.82	256.10 ^e	34.79	0.22 ^{b,c,d}
		Half	65.38 ^{e,h}	4.36	256.93 ^e	27.81	0.25 ^{c,d}
		Surface	107.88 ^j	7.18	234.15 ^{d,e}	22.54	0.46 ^c
		Exudate	230.24 ^k	31.97	99.25 ^g	21.21	2.35 ^g

^a Results expressed as means of three samples (in mg/100g of muscle) and standard deviation (SD). Different letters within the same column mean significant differences ($p < 0.05$). *Longissimus dorsi* muscle has not been brine injected.

Creatine conversion takes place more rapidly on the surface than in the core of the samples, independent of the brine solution and type of muscle as observed from results shown in **Table 2**. In fact, creatinine amounts in the surface increase up to

about 2 times the core values obtained in both *L.dorsi* and ham in both methods. These results agree with those obtained with commercial cooked ham as will be discussed later.

To determine the extent to which the differences in creatine and creatinine contents between core and surface were due to losses of these compounds in the exudate generated after cooking or conversion of creatine to creatinine, the effect of the cooking technique on exudates was also studied. In this way, creatinine and creatine amounts analyzed in the exudate of *Longissimus dorsi* are almost negligible (0.010 and 0.025 mg/100g in the constant T method and 0.011 and 0.027 mg/100g in the ΔT method for creatinine and creatine, respectively); however, their ratio values are considerable higher than those obtained in pork loin pieces (0.4 using both methods). This could be possibly due to differences in solubility of creatine and creatinine compounds and/or the greater heat transfer suffered by the exudate because of its direct contact with the hot water. Curiously, despite the higher losses values obtained in *Longissimus dorsi* muscle compared to ham (see **Table 1**), it is interesting to highlight the higher amounts of creatinine and creatine found in the exudate of ham samples. These high values could be due to the effect of brine solution and tumbling on cooked ham muscles, which would allow creatine and creatinine solubilization and, thus, an easier mobilization of these compounds to the exudate.

Different samples were also taken from the surface of the cooked hams in order to obtain creatinine and creatine amounts as well as their ratio values in *Semimembranosus*, *Biceps femoris* and *Gluteus* muscles and to compare these results with their corresponding values before cooking (**Table 3**). The lower creatinine values presented in **Table 3** for noncooked *Semimembranosus*, *Biceps femoris* and *Gluteus* muscles in comparison with those published previously by us (13) could be due to differences in post-mortem time at the moment of analysis. It has been observed that during the first hours post-mortem creatinine values increase (results not shown), important differences appearing in the amounts of this compound in samples collected between 15 and 24 hours post-mortem. Ratio values presented in **Table 3** for cooked muscles show slightly higher values in muscles corresponding to

hams cooked with the ΔT method, although all creatinine/creatinine ratio values were above 0.4 at the surface for all muscles.

Table 3. Levels of creatinine (Cn), creatine (Cr), and creatinine/creatinine ratio on the surface of the cooked ham main muscles according to the type of cooking^a.

Cooking methods	Muscle	Creatinine		Creatine		Ratio (Cn/Cr)
		Mean	SD	Mean	SD	
No cooking	<i>Semimembranosus</i>	4.32 ^a	0.28	346.77 ^a	29.23	0.012 ^a
	<i>Biceps femoris</i>	4.79 ^a	0.48	348.95 ^a	23.04	0.014 ^a
	<i>Gluteus</i>	5.70 ^a	0.38	360.27 ^a	19.68	0.016 ^a
Constant T	<i>Semimembranosus</i>	90.69 ^b	11.54	222.79 ^b	26.44	0.407 ^b
	<i>Biceps femoris</i>	82.12 ^{b,c}	8.95	193.05 ^c	3.88	0.425 ^{b,c}
	<i>Gluteus</i>	103.95 ^d	5.32	217.20 ^{b,c}	23.33	0.479 ^c
ΔT	<i>Semimembranosus</i>	95.88 ^{c,d}	14.61	215.90 ^{b,c}	20.07	0.444 ^{b,c}
	<i>Biceps femoris</i>	94.61 ^{c,d}	6.87	220.71 ^{b,c}	17.65	0.429 ^{b,c}
	<i>Gluteus</i>	125.68 ^e	23.91	233.22 ^b	28.45	0.539 ^d

^a Results expressed as means of 3 samples (in mg/100g muscle) an standard deviation (SD). Different letters within the same column mean significant differences ($p < 0.05$).

It has been shown that different cooking methods applied to pork meat can influence the amount of creatine and creatinine present at the end of the treatment, depending on time, temperature and initial amounts of creatine. To study the conversion of creatine to creatinine in hams that have been cooked under real industrial cooking conditions, the analysis of 15 samples from five different qualities of commercial cooked ham has been performed. Thus, a correlation between creatine amounts and creatinine formation after cooking has been obtained with the analysis of the cooked ham samples (13). As can be observed in **Figure 1**, hams with the highest content of creatine are also those with the greatest amounts of creatinine generated after the cooking process. Regression lines corresponding to the three different locations, core, half and surface, show higher slopes as they move away from the core of the sample. This higher slope value at the surface compared to the core confirms that the greatest conversion of creatine to creatinine occurs in this location.

Creatine and creatinine amounts obtained according to the market quality of the cooked ham and the location of the sample are shown in **Table 4**. Although very little

literature about creatine and creatinine contents in cooked hams has been found, our results are in the order of those obtained by other authors (24, 25). As can be observed, creatine, creatinine and ratio values confirm results obtained in **Table 3**. Commercial cooked ham samples also showed that the cooking treatment brought about a reduction in creatine and an increase in creatinine levels, as well as the lower ratio values obtained in the core in comparison to the surface.

Table 5 reports the average value and the standard deviations of pH, carnosine, phosphates and moisture, as well as a summary of the creatinine/creatine ratios that appear in **Tables 3** and **4** to facilitate their comparison between cooked hams.

Table 4. Levels of creatinine, creatine, and creatinine/creatine ratio in five different qualities of commercial cooked ham according to sample location^a.

Cooked ham class ^b	Location	Creatinine		Creatine		Ratio (Cn/Cr)
		Mean	SD	Mean	SD	
I	Core	75.99 ^{a,b}	9.14	189.15 ^{a,b}	13.32	0.40 ^{a,b}
	Half	74.45 ^{a,b}	7.17	181.09 ^{a,b,c}	10.58	0.41 ^{a,b}
	Surface	73.61 ^{a,b,c}	13.77	171.93 ^{a,c}	21.40	0.43 ^b
II	Core	56.94 ^d	16.77	237.36 ^d	65.92	0.25 ^{c,d,e}
	Half	55.92 ^d	14.63	204.64 ^b	34.87	0.27 ^{d,e,f,g}
	Surface	54.55 ^d	13.25	177.73 ^{a,b,c}	33.54	0.30 ^g
III	Core	66.01 ^{c,e}	8.86	254.61 ^d	31.63	0.2 ^{d,e,f}
	Half	67.67 ^{b,c,e}	2.67	240.27 ^d	7.74	0.28 ^{e,f,g}
	Surface	65.46 ^{c,e}	2.90	229.82 ^d	14.00	0.29 ^{f,g}
IV	Core	65.99 ^{d,e}	13.35	170.15 ^{c,e}	34.81	0.39 ^a
	Half	78.11 ^a	10.22	196.14 ^{a,b}	37.90	0.41 ^{a,b}
	Surface	88.45 ^f	11.42	186.80 ^{a,b,c}	40.18	0.48 ^h
V	Core	29.68 ^g	5.24	141.46 ^{e,f}	15.16	0.21 ^c
	Half	31.07 ^g	5.60	134.03 ^{e,f}	11.65	0.23 ^{c,d}
	Surface	33.22 ^g	3.31	123.02 ^f	8.24	0.27 ^{d,e,f,g}

^a Results expressed as means of three samples (in mg/100g of muscle) and standard deviation (SD). Different letters within the same column mean significant differences ($p < 0.05$). ^b I: The most expensive top-quality cooked ham, II: the cheapest top-quality cooked ham, III: Tinned cooked ham, IV: Cooked ham cooked in its juice, V: Cold-cut sandwich shoulder.

According to the literature, opposite results concerning the effect of cooking on carnosine amounts have been found. Whereas some authors have reported that

histidine dipeptides, such as carnosine, are unaffected by cooking (26), others obtain relative small differences in carnosine amounts between uncooked and cooked beef meat (22). In our case, nonsignificant differences in the amounts of carnosine have been found between uncooked and cooked hams (results not shown). Carnosine is a peptide only present in animal tissues. The amount of this compound is much higher in the skeletal muscle than in other tissues, especially in muscles with glycolytic metabolism like the main muscles of pork ham. Thus, this characteristic together with its resistance after cooking makes carnosine very useful in the knowledge of the amount of animal protein present in cooked ham samples.

Table 5. Mean ($n = 3$) and standard deviation of pH, carnosine, and phosphates amounts, moisture percentage, and creatinine/creatine ratio in the surface of cooked hams^a.

Cooked ham quality ²	pH		Carnosine		Phosphates		Moisture		Ratio (Cn/Cr) ¹	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
			(mg/100g)		(ppm)		(%)			
I	6.20 ^{a,b}	0.03	165.43 ^a	32.98	4119.92 ^a	16.36	74.99 ^{a,b}	1.35	0.43 ^a	0.08
II	6.44 ^b	0.22	227.53 ^b	8.16	5263.90 ^b	167.28	72.98 ^{b,c}	1.34	0.30 ^b	0.02
III	6.22 ^{a,b}	0.23	252.48 ^b	12.97	6159.26 ^c	630.61	76.99 ^a	1.59	0.29 ^b	0.01
IV	6.23 ^{a,b}	0.10	143.92 ^a	26.55	6071.11 ^{c,d}	43.17	71.98 ^c	1.69	0.48 ^c	0.06
V	6.26 ^{a,b}	0.25	94.52 ^c	11.13	3956.28 ^a	452.96	72.42 ^{b,c}	0.97	0.27 ^b	0.03
VI	6.07 ^a	0.05	261.48 ^b	15.68	5474.40 ^{b,d}	419.67	72.80 ^{b,c}	2.39	0.46 ^{c,3}	0.06

^a Different letters within the same column mean significant differences ($p < 0.05$). ¹ Results also shown in **Table 4**. ² I: The most expensive top-quality cooked ham, II: the cheapest top-quality cooked ham, III: Tinned cooked ham, IV: Cooked ham cooked in its juice, V: Cold-cut sandwich shoulder, VI: Cooked hams cooked under controlled conditions of temperature and time. ³ Mean of the ratio values obtained in both cooking conditions in Semimembranosus, Biceps femoris and Gluteus muscles (shown in **Table 3**).

It seems that higher creatinine/creatine ratio values could be correlated to the more intense heat treatments and, for this reason, it is possible to assume that cooked hams I and IV have experienced the highest temperature and/or longest time conditions. The lowest carnosine contents present in these hams would be an indicative of the lower animal protein amounts contained in them, so water retention would be lower and a longer cooking would be needed to reach 70 °C in their core. In

fact, higher carnosine amounts obtained in cooked ham III also corresponds to high values of moisture content and was also in coincidence with the lowest ratios amounts and, therefore, the smoothest heat treatment. The lowest ratio creatinine/creatine of ham V would be perfectly justified because cold-cut sandwich shoulder is presented at supermarkets as a rectangular bar with lower distance to the core and, thus, a minor heat treatment is necessary to reach an adequate temperature in the core.

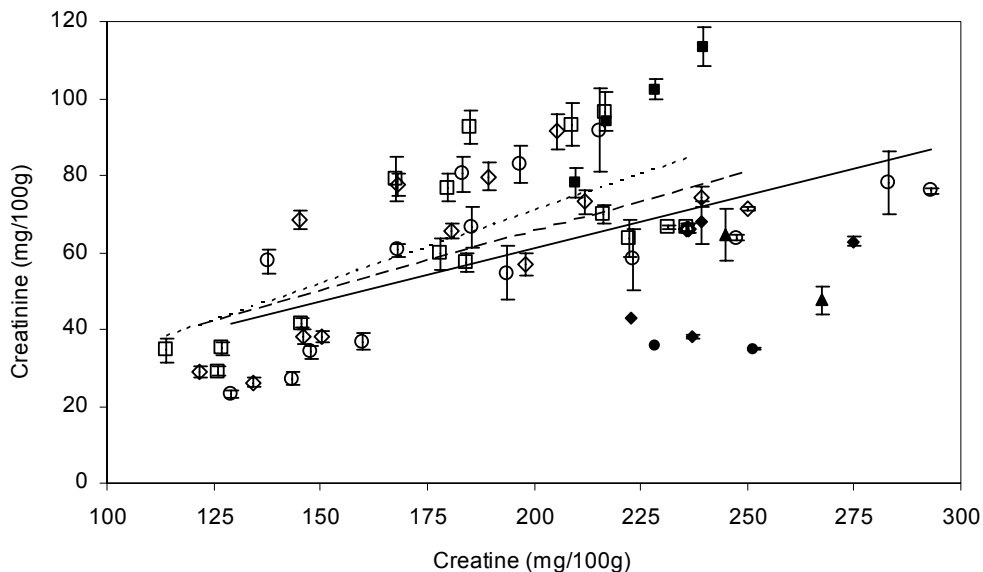


Figure 1. Relationship between creatine and creatinine amounts (mg/100g) in cooked ham samples. Regression lines represent core (—), half (- -), and surface (. . .) according to the sample location on the slice. Open symbols correspond to commercial cooked hams samples (○, ◇ and □ for core, half and surface, respectively) and solid symbols correspond to core (●), half (◆) and surface (■) of hams cooked under constant T and ΔT conditions.

On the basis of the obtained results, the creatinine/creatine ratio could be used as an index of the heating efficiency of cooked ham because it gives a good estimation of the magnitude of the heat treatment experienced by these products. Thus, according to the results shown in **Table 2**, pieces with a weight of 5.5 kg and injected with

controlled brine solution would need a ratio above 0.4 on the surface to ensure adequate heat treatment of 70 °C in the core of the ham. Therefore, these measurements could be easily assayed in a small sample of the surface of the ham, minimizing the damage to the pieces as a type of nondestructive assay.

In summary, the tested cooking processes (constant T and ΔT) brought about a decrease of creatine and an increase of creatinine contents. In this way, slightly higher creatinine/creatine ratio values were obtained when the ΔT method was applied in comparison to the constant T method. On the other hand, it has been observed that creatine conversion takes place more rapidly on the surface than in the core of the samples, probably due to the longer heating time and the higher heat transfer values corresponding to this location. Thus, after demonstrating the increase of the creatinine/creatine ratio with cooking, we can state that this ratio could be used to determine the extent of the applied heat treatment during the processing of cooked ham. When ham piece weights, brine solution composition, and cooking method conditions are taken into account in the determination of the critical ratio, this procedure would be a rapid and nondestructive technique, requiring only a small sample of the cooked ham surface to perform the assay.

ACKNOWLEDGMENTS

FPU Scholarship from Ministerio de Ciencia y Educación (Spain) to Leticia Mora and Agroalimed grant from Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación (Generalitat Valenciana, Spain) are also acknowledged. We give special thanks to Elizabeth Escudero for her valuable assistance during phosphate analysis and to Aleida Selene Hernández for helpful advice.

LITERATURE CITED

1. Balsom, P. D.; Soderlund, K.; Ekblom, B. Creatine in humans with special reference to creatine supplementation. *Sports Med.* **1994**, *18* (4), 268-280.
2. Demant, T. W.; Rhodes, E. C. Effects of creatine supplementation on exercise performance. *Sports Med.* **1999**, *28* (1), 49-60.

3. Wyss, M.; Kaddurah-Daouk, R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol. Rev.* **2000**, *80* (3), 1107-1213.
4. Macy, R. L.; Naumann, H. D.; Bailey, M. E. Water-soluble flavor and odor precursors of meat .5. influence of heating on acid-extractable non-nucleotide chemical constituents of beef, lamb and pork. *J. Food Sc.* **1970**, *35* (1), 83.
5. Snider, S.; Baldwin, R. E. Flavor intensity as related to the creatine and creatinine content of microwave and conventionally cooked beef. *J. Food Sci.* **1981**, *46* (6), 1801-1804.
6. Cambero, M. I.; Pereira-Lima, C. I.; Ordóñez, J. A.; de Fernando, G. D. G. Beef broth flavour: relation of components with the flavour developed at different cooking temperatures. *J. Sc. Food .Agric.* **2000**, *80* (10), 1519-1528.
7. Schlichtherle-Cerny, H.; Grosch, W. Evaluation of taste compounds of stewed beef juice. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A.* **1998**, *207* (5), 369-376.
8. Pais, P.; Salmon, C. P.; Knize, M. G.; Felton, J. S. Formation of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in dry-heated model systems, meats, and meat drippings. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47* (3), 1098-1108.
9. Carlier, V.; Augustin, J. C.; Rozier, J. Destruction of *Listeria monocytogenes* during a ham cooking process. *J. Food Prot.* **1996**, *59* (6), 592-595.
10. Davis, C. E. Fluorometric determination of acid phosphatase in cooked, boneless, nonbreaded broiler breast and thigh meat. *J. AOAC Int.* **1998**, *81* (4), 887-906.
11. Incze, K.; Kormendy, L.; Kormendy, I.; Zsarnoczay, G. Considerations of critical microorganisms and indicator enzymes in connection with the pasteurization of meat products. *Meat Sci.* **1999**, *51* (2), 115-121.
12. Kőrmendy, L.; Zsarnoczay, G.; Mihalyi, V. A New, Modified acid-phosphatase assay for determining the extent of heat-treatment in canned hams. *Food Chem.* **1992**, *44* (5), 367-375.
13. Mora, L.; Sentandreu, M. A.; Toldrá, F. Contents of creatine, creatinine and carnosine in porcine muscles of different metabolic types. *Meat Sci.* **2008**, *79* (4), 709-715.
14. BOE (1983) Order of 29 June 1983, published on 5 July 1983, no. 159. 2009; pp 18679-18687.
15. Cheng, Q. F.; Sun, D. W.; Scannell, A. G. M. Feasibility of water cooking for pork ham processing as compared with traditional dry and wet air cooking methods. *J. Food Eng.* **2005**, *67* (4), 427-433.

16. Aristoy, M. C.; Toldrá, F. Deproteinization techniques for HPLC amino-acid-analysis in fresh pork muscle and dry-cured ham. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39* (10), 1792-1795.
17. Mora, L.; Sentandreu, M. A.; Toldrá, F. Hydrophilic chromatographic determination of carnosine, anserine, balenine, creatine and creatinine. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4664-4669.
18. Desmond, E. M.; Kenny, T. A. Effect of pelvic suspension and cooking method on the processing and sensory properties of hams prepared from two pork muscles. *Meat Sci.* **2005**, *69* (3), 425-431.
19. Jeremiah, L. E.; Dugan, M. E. R.; Aalhus, J. L.; Gibson, L. L. Assessment of the chemical and cooking properties of the major beef muscles and muscle groups. *Meat Sci.* **2003**, *65* (3), 985-992.
20. Bejerholm, C.; Aaslyng, M. D. The influence of cooking technique and core temperature on results of a sensory analysis of pork - depending on the raw meat quality. *Food Qual. Pref.* **2004**, *15* (1), 19-30.
21. Harris, R. C.; Lowe, J. A.; Warnes, K.; Orme, C. E. The concentration of creatine in meat, offal and commercial dog food. *Res. Vet. Sci.* **1997**, *62* (1), 58-62.
22. Purchas, R. W.; Rutherford, S. M.; Pearce, P. D.; Vather, R.; Wilkinson, B. H. P. Cooking temperature effects on the forms of iron and levels of several other compounds in beef semitendinosus muscle. *Meat Sci.* **2004**, *68* (2), 201-207.
23. Pegg, R. B.; Amarowicz, R.; Code, W. E. Nutritional characteristics of emu (*Dromaius novaehollandiae*) meat and its value-added products. *Food Chem.* **2006**, *97* (2), 193-202.
24. del Campo, G.; Gallego, B.; Berregi, I.; Casado, J. A. Creatinine, creatine and protein in cooked meat products. *Food Chem.* **1998**, *63* (2), 187-190.
25. Kvasnicka, F.; Voldrich, M. Isotachophoretic determination of creatinine in meat and meat products. *Electrophoresis* **2000**, *21* (14), 2848-2850.
26. Carnegie, P. R.; Hee, K. P.; Bell, A. W. Ophidine (Beta-Alanyl-L-3-Methylhistidine, Balenine) and other histidine dipeptides in pig muscles and tinned hams. *J. Sci. Food Agric.* **1982**, *33* (8), 795-801.

Capítulo 4

Evolución de creatina y creatinina durante el procesado de jamón curado

Available online at www.sciencedirect.com

**MEAT
SCIENCE**

www.elsevier.com/locate/meatsci

Creatine and creatinine evolution during the processing of dry-cured ham

Leticia Mora, Aleida S. Hernández-Cázares, Miguel Angel Sentandreu and Fidel Toldrá

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

Received for review July 24, 2009. Revised manuscript received September 8, 2009. Accepted September 15, 2009.

Abstract

Dry-curing of ham involves many biochemical reactions that depend on the processing conditions. The aim of this study was to evaluate the effect of the dry-cured processing on the concentration of creatine, creatinine and the creatinine/creatinine ratio. Dry-cured hams under study were salted using three different salt mixtures (100% NaCl; NaCl and KCl at 50% each; and 55% NaCl, 25% KCl, 15% CaCl₂ and 5% MgCl₂) in order to observe its influence on creatinine formation but no significant differences were found between them at any time of processing. However, significant differences between different post-salting times (20, 50 and 80 days) and the ripened hams (7, 9 and 11 months of ripening) were observed. Results showed that creatine and creatinine remain stable once the ripening period is reached. These results were confirmed when analysing dry-cured ham samples submitted to extreme conditions of temperature and time (20, 30, 40 and 70 °C during 0, 20, 40 and 60 min) as well as commercial dry-cured hams with more than 12 months of processing.

Keywords: Dry-cured ham, creatine, creatinine, HILIC, Hydrophilic interaction chromatography, salt substitutes.

INTRODUCTION

Spanish dry-cured ham is a high quality, well-known meat product with an enormous economic importance in its sector. In fact, more than 40 million dry-cured hams are produced in Spain per year.

Creatine (Cr) is an amino acid derivative normally biosynthesised in the liver, kidneys and pancreas from arginine, methionine and glycine. Creatine plays a central role in the energy metabolism of skeletal muscle, providing the necessary energy for vigorous muscle contraction (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000). Although an important part of this compound can also be obtained from other sources like food, there are extensive evidences that creatine supplements can enhance muscle performance in anaerobic exercises (Balsom, Soderlund & Ekblom, 1994). In pigs, dietary supplementation with creatine monohydrate prior to slaughter may slow post-mortem pH decline by providing an immediate energy source, thus delaying glycogen metabolism and reducing the incidence of pale, soft and exudative (PSE) tissues (James et al., 2002).

Creatine turns easily into creatinine (Cn) under heating conditions such as meat cooking through a non-enzymatic conversion (del Campo, Gallego, Berregi & Casado, 1998). In fact, a correlation between the Cn/Cr ratio and the heat treatment was established in cooked ham samples concluding that this ratio could be used as a rapid and non-destructive indicator for the effectiveness of the heat treatment in cooked ham processes (Mora, Sentandreu & Toldrá, 2008a). Some authors reported the sensory properties of creatine (Cambero, Pereira-Lima, Ordóñez & de Fernando, 2000) and creatinine (Macy, Naumann & Bailey, 1970; Snider & Baldwin, 1981), recommending the addition of creatine to broth because of the contribution of this compound to the full flavour of meat extracts (Schlichtherle-Cerny & Grosch, 1998).

During the processing of dry-cured ham and due to the particular conditions of humidity, temperature and long times needed, numerous physico-chemical and biochemical reactions take place (Toldrá, 2006; Estévez, Morcuende, Ventanas & Ventanas, 2007). This phenomenon is responsible for changes in structure and functional properties of proteins and contributes to the formation of the typical dry-

cured ham texture and the development of its final flavour characteristics (Toldrá & Etherington, 1988; Toldrá & Flores, 1998). Salt content is a parameter that contributes to the typical salty taste of dry-cured ham (Andrés, Cava, Ventanas, Thovar & Ruiz, 2004) and influences the development of the intense proteolysis occurred during its processing (Toldrá, Cervero & Part, 1993). Nowadays, there is a challenge to reduce sodium intake due to health recommendations to reduce hypertension (Morgan, Aubert & Brunner, 2001). In this way, many studies have been done to reduce the global salt content in this type of products by reducing the salting time, reducing the addition of sodium salt (Andrés, Cava, Ventanas, Muriel & Ruiz, 2004) or substituting total or partially the NaCl by other salting agents (Blesa et al., 2008).

There is a lack of information regarding the evolution of creatine and creatinine during the dry-curing. The numerous biochemical changes that are involved in this process, together with the dependence of the creatine non-enzymatic conversion on time, temperature, pH and initial creatine amounts (Edgar & Shiver, 1925; Fuller & Elia, 1988; Mora, Sentandreu & Toldrá, 2008b), makes this processing very interesting for a better understanding of creatine conversion to creatinine. Thus, the main purpose of the current study was to evaluate the effect of the dry-curing process on creatine and creatinine concentrations and to establish a possible correlation between the levels of these compounds and the time of processing, as well as to evaluate the effect of different salt formulations on creatinine formation and the effect of temperature and time on the levels of creatine and creatinine in 11 months dry-cured ham samples.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents

All chemical and chromatographic reagents used were of HPLC grade. Acetonitrile (ACN), ammonium acetate, glacial acetic acid, perchloric acid and potassium carbonate were purchased from Scharlau (Barcelona, Spain). Creatine and creatinine standards were from Fluka Chemie AG (Buchs, Switzerland).

Dry-cured ham preparation

Fifty-four fresh hams with an average weight of 10 ± 1 kg from 6-months old pigs (Landrace x Large White) were selected in a local slaughterhouse, controlling the pH within the 5.5 - 6.0 range. Hams were frozen in an industrial freezer at -40 °C and stored for at least 30 days at -20 °C. Before starting with the Spanish dry-cured ham processing, frozen hams were thawed in a cold chamber at 3 °C for 5 days. Three of the hams were used to characterise the raw material. The remaining 51 hams were divided into three groups, one of 15 and two of 18 hams. Each group was salted using the following formulations: 100% of NaCl salt, formulation I; NaCl and KCl at 50% each, formulation II; and 55% NaCl, 25% KCl, 15% CaCl_2 and 5% MgCl_2 , formulation III.

Hams were pre-salted and placed in salting chambers using the respective formulations for 11 - 12 days. Nitrites and nitrates were also added as curing agents (100 ppm of NaNO_2 and 200 ppm of KNO_3). The salting chambers were set at 4 °C and 85-90% relative humidity. After salting, hams were brushed in order to remove remaining salt from their surfaces and transferred to the post-salting chamber, where a complete salt homogenisation took place. The temperature was kept below 4 °C for 50 days in hams salted with formulation I, while it was maintained for 80 days in hams salted with formulations II and III. The relative humidity in the chambers was established between 75% and 85%. Hams salted with formulation I (100% NaCl) were considered as control batch, being 50 days in the post-salting stage, the usual time employed in industry. The increase of the post-salting time up to 80 days for formulations II and III was applied because of the necessity of increasing the post-salting time when replacing sodium by other cations such as potassium, calcium and magnesium in order to reach same water activity (Blesa et al., 2008). During the last stage, corresponding to the ripening period, hams were placed in air-conditioning chambers and subjected to different time, temperature and relative humidity cycles. Higher temperatures ($14 - 20$ °C) and lower relative humidity (until 70%) were set during ripening in order to accelerate the drying process. The total length of the curing process was 11 months.

Five different commercial dry-cured hams with times of processing between 12 and 18 months were purchased from different supermarkets with the aim to analyse Cr and Cn contents.

Sampling

Samples from the *Semimembranosus* muscle were taken from the middle of the ham before processing and with 20, 50 and 80 days and 7, 9 and 11 months of processing. *Semimembranosus* muscle is an external muscle that is in direct contact with the salt mixture during the salting step.

Creatine and creatinine extraction and deproteinisation

Samples were extracted and deproteinised following the method described by (Burns & Ke, 1985) with some minor changes. Briefly, 5 g of frozen tissue were minced and homogenised with 15 mL of cold 0.6 M perchloric acid for 10 min at 4 °C in a stomacher (IUL Instrument, Barcelona, Spain). The extract was centrifuged at 24500 g for 20 min in the cold (4 °C) and the supernatant was filtered through glass wool. An aliquot of 12 mL of this solution was neutralized (pH 6.5 - 7.0) by adding solid potassium carbonate, standing in an ice bath for 20 min. An aliquot of 200 µL was deproteinised by adding three volumes of acetonitrile, standing at 4 °C for 5 min. Finally, the sample was centrifuged for 10 min at 4 °C and the supernatant directly analysed.

Analytical determinations

Measurements of pH were taken in *Semimembranosus* muscle at 20, 50 and 80 days of the post-salting step and at 7, 9 and 11 months of the ripening period. For this purpose, 2 g of each ham were taken, triturated, and homogenised in 5 mL of bidistilled water using a Polytron PT2100 (Kinematica, Inc., Switzerland). The pH measurement was taken directly on the homogenised solution with an electrochemical sensor (238000/09 Hamilton Bonaduz AG, Switzerland).

Moisture content was determined by over-drying to constant weight at 175 °C using a moisture halogen analyser (Mettler Toledo AG, Switzerland).

Standards preparation

Stock solutions of all standards were prepared employing the solvent sample solution, which is 0.6 M perchloric acid previously neutralized to pH 6.5 - 7 with potassium carbonate and acetonitrile (1:3). Working standard solutions were prepared over the appropriate concentration range by dilution of stock solutions. All stock solutions were stored at -20 °C until use.

Processing of *Semimembranosus* muscle slices

Semimembranosus muscle of 11 months dry-cured hams salted with formulation I, were cut in 4 mm slices in order to study the conversion of creatine into creatinine under controlled conditions of pH, temperature and time. The aim of this experiment was to prove that stable and constant values in creatine and creatinine concentrations were reached during the ripening. The effect of temperature and time on creatinine formation was established holding the samples at 20, 30, 40 and 70 °C during 0, 20, 40 and 60 min, always under controlled conditions of both pH and initial amount of creatine. These assays were carried out in a water bath (Tectron Bio, Selecta, Barcelona, Spain) under controlled conditions of temperature. The use of thin slices allowed to establish an immediate heat transfer between water and muscle slices. At the end of the incubation period, samples were cooled to stop creatine conversion to creatinine. Samples were prepared for analysis as previously described.

Description of the chromatographic method

The HILIC separation was performed using a ZIC[®] - pHILIC column (4.6 x 150 mm, 5µm) together with a ZIC[®] - pHILIC guard column (2.1 x 20 mm, 5µm) both from SeQuant (Sweden). Ten microliters of each sample were injected into the HPLC system. Mobile phases consisted of solvent A, containing 1 mM of ammonium acetate, pH 5.5, in water/acetonitrile (20:80), and solvent B, containing 1 mM of ammonium acetate, pH 5.5, in water/acetonitrile (70:30). The separation conditions were a linear gradient from 0% to 100% of solvent B in 30 min at a flow rate of 0.5 mL/min. The column was equilibrated for 15 min under initial conditions before each injection.

All samples were filtered through a 0.22 µm nylon membrane filter (Teknokroma, Barcelona, Spain). Solvents were also degassed prior to each analytical run. The separation was monitored using a diode array detector at a wavelength of 214 and 236 nm for creatine and creatinine, respectively.

Chromatography was performed in a HPLC Agilent 1100 series system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) equipped with a quaternary pump (G1311A), an autosampler (G13131A), a thermostated column compartment (G1316A) and a vacuum degasser (G1379A). Ultraviolet detection was made by a G1315B diode array detector, which was used in the range of 195 - 300 nm.

Statistical method

The ANOVA procedure was used to determine significant differences in creatine and creatinine content during the dry-cured processing as well as to determine the influence of the different formulations of salts on creatine conversion to creatinine. Nine dry-cured hams per time and three per formulation were analysed. This statistical procedure was also used to determine significant differences in creatine and creatinine amounts after keeping dry-cured ham samples under controlled conditions of temperature and time as well as in the analysis of commercial dry-cured hams. Each statistical analysis was done using the Statgraphics Plus (v 5.1) software. The normality of the data was tested before applying the ANOVA procedure.

RESULTS AND DISCUSSION

Semimembranosus is a glycolytic muscle that has been reported to present higher contents of creatine in comparison with muscles like *biceps femoris*, *gluteus*, *longissimus dorsi* or *trapezius*, and this fact could come from phosphocreatine, which is a phosphorylated creatine molecule anaerobically used to regenerate ATP from ADP. Creatine and creatinine concentrations obtained in this study in raw *semimembranosus* muscle (414.37 and 8.21 mg/100g of muscle, respectively) agree with those reported previously (Mora et al., 2008b).

Creatine and creatinine concentrations were evaluated during dry-cured ham processing using three different salt formulations (**Figs. 1A and B**).

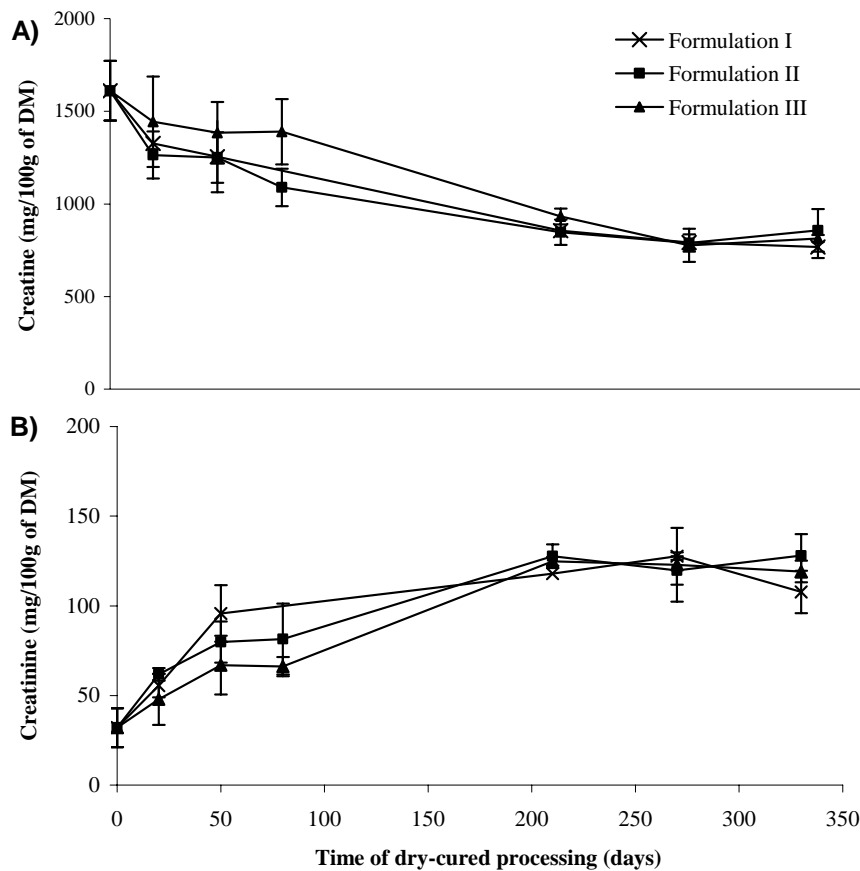


Figure 1. Creatine (A) and creatinine (B) evolution during dry-cured ham processing using three different salt formulations. Labelled error bars indicate the standard deviation for each measurement.

The dry-cured processing has a significant effect on the content of creatine and creatinine. Creatine concentration did not show significant changes ($p < 0.001$) during the post-salting period for the three formulations. The measurement taken at 80 days in hams salted with formulations II and III was done with the purpose of preventing the necessity of longer times to reach the same water activity values than those obtained in hams salted with formulation I. Finally, also no significant differences ($p <$

0.001) in creatine concentration were obtained between the 3 salt formulations and the ripening times (7, 9 and 11 months) even though they were significant in relation to the post-salting data. So, the final creatine concentration in such ripened hams was around 825.25 ± 52.72 mg/100g d.m.

The effect of dry-cured processing on creatinine concentration (**Fig. 1B**) was proportional to the creatine disappearance. So, a significant increase ($p < 0.001$) in creatinine concentration was observed between post-salting (20, 50 and 80 days) and the ripening period (7, 9 and 11 months). Creatinine content also remained constant during ripening with a mean value of 121.72 ± 6.54 mg/100g d.m.

Creatine conversion into creatinine depends on pH, temperature and time. Recently, it has also been reported the influence of creatine initial concentration on creatine conversion into creatinine. In this way, (Mora et al., 2008b) established a correlation between initial content of creatine and creatinine formation after cooking that was verified at constant temperature and constant time, obtaining significant differences in Cr formation depending on the initial creatine amounts. Thus, the highest amounts of creatine present in ham during the first days of curing could be responsible of the large increase in creatinine amounts occurred during the first 50 days of processing.

The pH is also a very important factor in creatine conversion to creatinine. Its influence has been widely studied during years and literature contains references to the conditions under which Cr is practically quantitatively converted to Crn in acid solution and only partially converted in alkaline solution (Edgar et al., 1925; Fuller et al., 1988). Post-mortem muscle pH declines as a result of the accumulation of lactic acid. However, during post-salting and initial ripening periods, an increasing of pH value from 5.6 - 5.8 to about 6.1 occurs. The pH of the hams was controlled after rigor mortis and during all processing (see **Table 1**). Hams pre-salted with formulation III presented the lowest pH values as well as no significant differences ($p < 0.001$) between them at any time of processing. On the other hand, the highest pH values were obtained in hams salted with formulation II. According to some authors, the fluctuation of pH is higher in muscles situated near the surface of the ham probably due to the salting step, the faster and intense drying that occurs, and the migration of phosphates towards the surface (Arnau, Gou & Comaposada, 2003). According to

creatine and creatinine variations observed during the processing of dry-cured ham, pH does not appear to be the responsible variable for creatine conversion to creatinine.

Table 1. Values of dry-cured ham pH at different times of processing.

Time of processing	Formulation	Mean ^A	SD ^B	CV(%) ^C
0 days		5.77 ^g	0.092	1.60
20 days	I	6.16 ^{a-g}	0.200	3.25
	II	6.39 ^{ab}	0.113	1.76
	III	5.83 ^{efg}	0.226	3.88
50 days	I	6.57 ^a	0.156	2.37
	II	6.52 ^{ab}	0.243	3.72
	III	5.77 ^g	0.025	0.44
80 days	II	6.21 ^{a-1}	0.221	3.57
	III	5.84 ^{efg}	0.038	0.65
7 months	I	6.15 ^{b-g}	0.072	1.17
	II	6.26 ^{a-d}	0.129	2.05
	III	5.97 ^{c-g}	0.086	1.44
9 months	I	5.92 ^{c-g}	0.028	0.48
	II	5.92 ^{d-g}	0.096	1.62
	III	5.83 ^{fg}	0.150	2.57
11 months	I	6.24 ^{a-e}	0.163	2.61
	II	6.30 ^{abc}	0.137	2.18
	III	5.86 ^{d-g}	0.075	1.28

^A Each value represents the mean of three samples from different dry-cured hams.

Different letters within the same column mean significant differences ($p < 0.001$).

^B Standard deviation.

^C Coefficient of variation.

Temperature during post-salting was kept at 4 °C, so that the initial amounts of creatine and the time of processing could be the only responsible for creatine conversion to creatinine during this period. During ripening, the temperature of chamber was raised up to 14 - 20 °C and creatinine formation showed an important increase but in spite of the long time of the ripening period (11 months) creatine and creatinine amounts kept constant from 7 months until the end of the ripening.

In agreement with our results, many authors have reported the decrease of creatine and increase of creatinine contents in muscle during periods of processing like

cooking (Macy et al., 1970; Purchas, Busboom & Wilkinson, 2006). Chromatograms showing creatinine increase during post-salting (0, 20 and 50 days) in hams salted with formulation I are shown in **Fig. 2**.

As can be observed, Cr decrease is not as considerable as Cn increase. In this respect, it has been reported that the increase in Cn concentration with cooking was sensibly larger than the Cr decrease (Macy et al., 1970; Pegg, Amarowicz & Code, 2006; Purchas et al., 2006). A similar behaviour with respect to correlation between creatinine amounts and ratio at different processing times has been observed. This would be logical because although creatine amounts decrease with temperature and time, its diminution is not comparable to the considerable increase that creatinine suffers under the same conditions.

Fig. 3 shows the evolution of the creatinine/creatine ratios at different processing times. The reason of using the ratio was to eliminate the variations in creatine amounts that could occur in the different hams. By this way, a no significant ($p < 0.001$) increase in Cn/Cr ratio was observed during the first 20 days post-salting in hams treated with all formulations.

However, whereas no significant differences were also detected between formulations at 50 and 80 days post-salting, significant differences in ratios between 20 and 50 days were detected. On the other hand, ratios changes occurred during the ripening times of 7, 9 and 11 months were non-significant ($p < 0.001$) for any formulations. Creatinine/creatine ratio at 7, 9 and 11 months reached the maximum value of 0.15.

In order to verify the stability of creatine and creatinine values existing after 7 months of processing (see **Figs. 1.A** and **B**), these values and their ratios were studied under controlled conditions of temperature and time using *semimembranosus* muscle of an 11 months dry-cured ham salted with formulation I (**Table 2**).

The effect of time (20, 40 and 60 min) was assayed at different temperatures (20, 30, 40 and 70 °C). These temperatures were chosen because 20, 30 or 40 °C may be used at specific stages of dry-cured processing. An extreme temperature of 70 °C was also tested in order to assure the stability of creatine and creatinine.

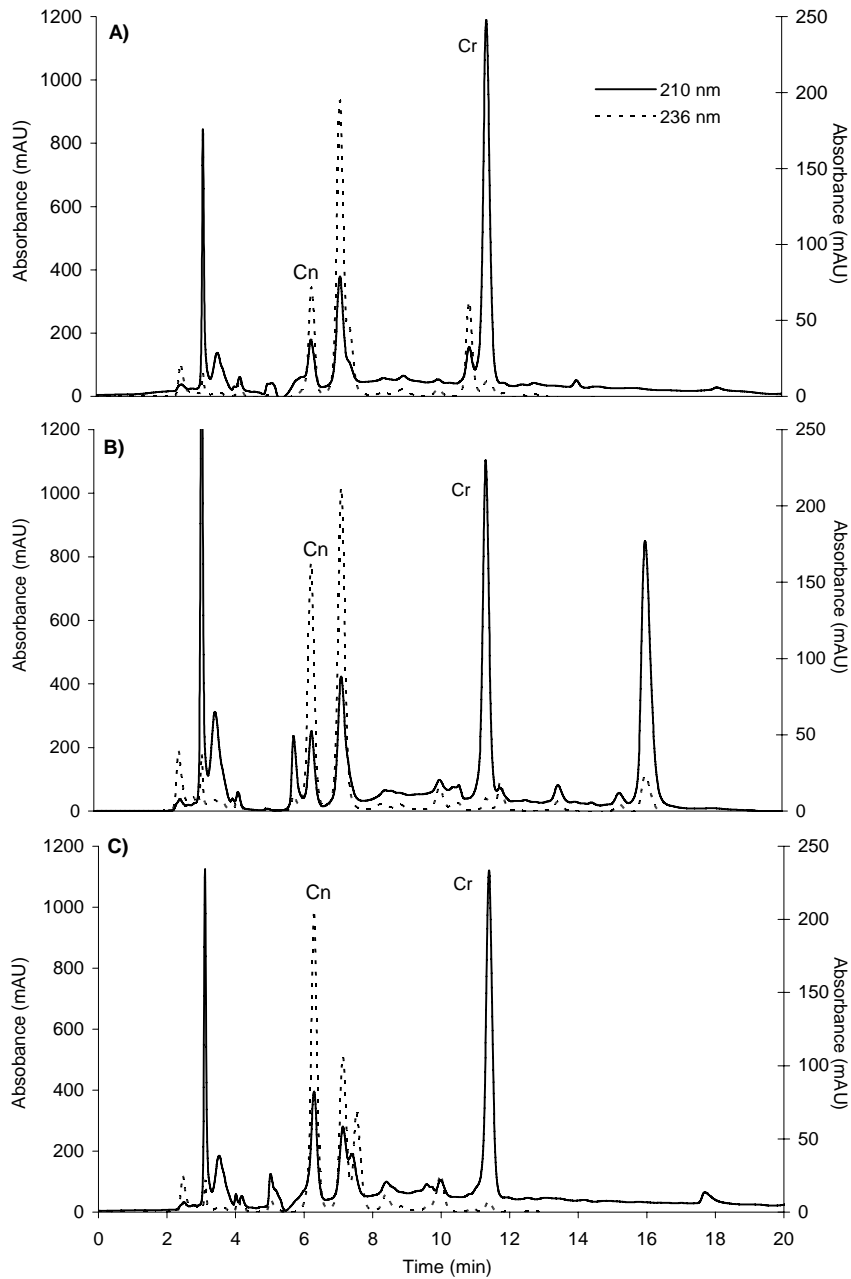


Figure 2. Chromatograms corresponding to the separation of creatine and creatinine in *semimembranosus* muscle before processing (0 days) (A) and 20 days (B) and 50 days (C) post-salting. Creatine (Cr) was detected at 214 nm (solid line and left scale), whereas creatinine (Cn) was detected at 236 nm (dotted line and right scale).

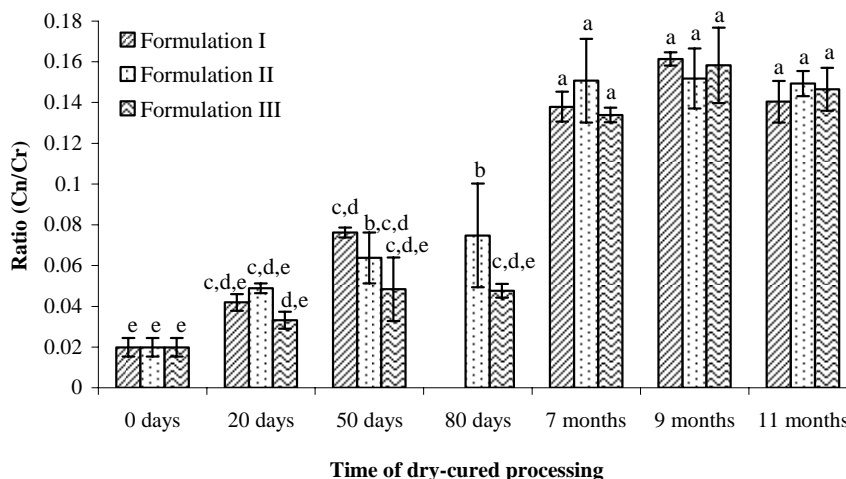


Figure 3. Creatinine/creatine ratios during the processing of dry-cured ham. Each value represents the mean of three *semimembranosus* muscle samples from different dry-cured hams. Labelled error bars indicate the standard deviation for each measurement. Different bar letters indicate significant differences in a confidence interval of 99.9% ($p < 0.001$).

Some authors have reported that increasing temperatures throughout the process of dry-curing leads to enhanced proteolytic activity, producing softer and defective textures (Rico, Toldrá & Flores, 1990; Arnau, Guerrero & Gou, 1997). No information about creatine and creatinine changes at different temperatures during dry-cured ham processing has been reported, whereas important changes in these compounds have been observed during processing of cooked ham (Mora et al., 2008a). **Table 2** shows no significant differences ($p < 0.001$) in creatine and creatinine amounts between different time and temperature conditions in 11 months dry-cured hams, confirming that no further changes can be expected in dry-curing.

Finally, the analysis of creatine and creatinine contents in commercial dry-cured hams submitted to times of processing between 12 and 18 months was done in order to assure that longer processing times do not influence the stability of creatine and creatinine values. Mean values of 755.99 mg/100 g d.m. \pm 95.89 and 127.80 mg/100 g d.m. \pm 5.49 for creatine and creatinine, respectively, were obtained. No significant differences between these values and those observed during the ripening period (7, 9 and 11 months) were obtained.

Table 2. Effect of temperature and time on the levels of creatine, creatinine and creatinine/creatinine ratio in 11 months dry-cured ham samples salted with formulation I (100% NaCl).

Temperature (°C)	Time (min)	Creatine		Creatinine		Ratio (Cn/Cr)
		Mean ^A	SD ^B	Mean ^A	SD ^B	
None	None	1028.69 ^{ab}	24.43	140.91 ^a	1.25	0.14 ^{bc}
	20	957.69 ^{ab}	27.30	134.16 ^{ab}	1.47	0.14 ^{abc}
	40	895.76 ^{ab}	126.02	124.24 ^b	3.79	0.14 ^{abc}
20	60	1035.23 ^a	46.39	137.76 ^{ab}	4.98	0.13 ^c
	20	998.44 ^{ab}	61.88	140.23 ^a	6.18	0.14 ^{abc}
	40	881.11 ^{ab}	144.13	130.46 ^{ab}	8.45	0.15 ^{ab}
30	60	1014.13 ^{ab}	61.73	142.25 ^a	6.16	0.14 ^{abc}
	20	1015.42 ^{ab}	43.45	138.36 ^a	5.21	0.14 ^{bc}
	40	1027.24 ^{ab}	127.86	140.96 ^a	10.62	0.14 ^{abc}
40	60	945.99 ^{ab}	82.37	130.8 ^{ab}	5.07	0.14 ^{abc}
	20	878.4 ^{ab}	61.02	132.64 ^{ab}	7.65	0.15 ^{ab}
	40	916.24 ^{ab}	49.32	135.6 ^{ab}	4.00	0.15 ^{abc}
70	60	872.95 ^b	50.75	132.58 ^{ab}	5.40	0.15 ^a

^A Results presented as means of three samples (in mg/100 g of ham d.m.). Different letters within the same column mean significant differences ($p < 0.001$).

^B Standard deviation.

The fact that under extreme conditions of temperature and time (70 °C during 1 h) no changes in creatine and creatinine amounts were observed, together with the non-variability detected in the amount of these compounds when analysing commercial dry-cured hams with curing times until 18 months, could suggest the potential use of these values as a way to estimate the extent of the ripening period.

CONCLUSIONS

This study clearly demonstrates that time of dry-cured processing has a significant effect ($p < 0.001$) on the contents of creatine, creatinine and their ratio, whereas no significant differences ($p < 0.001$) in these compounds were detected among different salt formulations. The main differences in creatine, creatinine and their ratio were

observed between post-salting times (20, 50 and 80 days) and the ripening period (7, 9 and 11 months), obtaining a final stable value for these compounds during ripening. A study carried out under extreme conditions of temperature and time together with the analysis of commercial hams with longer processing time support these results, indicating that creatine and creatinine contents reach a plateau at about 7 months of processing, fact that could be a good estimation of a minimum time of ripening.

ACKNOWLEDGMENTS

FPU Scholarship from Ministerio de Ciencia y Educación (Spain) to L.M. and scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) and Colegio de Postgraduados (Mexico) to A.S.H.-C. are fully acknowledged. Grant AGL2007-65379-C02-01/ALI from Ministry of Education and Science (Madrid, Spain) and FEDER funds are also acknowledged.

REFERENCES

- Andrés, A. I., Cava, R., Ventanas, J., Muriel, E., & Ruiz, J. (2004). Lipid oxidative changes throughout the ripening of dry-cured Iberian hams with different salt contents and processing conditions. *Food Chemistry* **84**(3), 375-381.
- Andrés, A. I., Cava, R., Ventanas, J., Thovar, V., & Ruiz, J. (2004). Sensory characteristics of Iberian ham: Influence of salt content and processing conditions. *Meat Science* **68**(1), 45-51.
- Arnau, J., Gou, P., & Comaposada, J. (2003). Effect of the relative humidity of drying air during the resting period on the composition and appearance of dry-cured ham surface. *Meat Science* **65**(4), 1275-1280.
- Arnau, J., Guerrero, L., & Gou, P. (1997). Effects of temperature during the last month of ageing and of salting time on dry-cured ham aged for six months. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **74**(2), 193-198.
- Balsom, P. D., Soderlund, K., & Ekblom, B. (1994). Creatine in humans with special reference to creatine supplementation. *Sports Medicine* **18**(4), 268-280.
- Blesa, E., Aliño, A., Barat, J. M., Grau, R., Toldrá, F., & Pagán, M. J. (2008). Microbiology and physico-chemical changes of dry-cured ham during the post-salting stage as affected by partial replacement of NaCl by other salts. *Meat Science* **78**(1-2), 135-142.

- Burns, B. G. & Ke, P. J. (1985). Liquid-chromatographic determination of hypoxanthine content in fish tissue. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **68**(3), 444-448.
- Cambero, M. I., Pereira-Lima, C. I., Ordóñez, J. A., & de Fernando, G. D. G. (2000). Beef broth flavour: relation of components with the flavour developed at different cooking temperatures. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**(10), 1519-1528.
- del Campo, G., Gallego, B., Berregi, I., & Casado, J. A. (1998). Creatinine, creatine and protein in cooked meat products. *Food Chemistry* **63**(2), 187-190.
- Edgar G. & Shiver H.E. (1925). The equilibrium between creatine and creatinine, in aqueous solution. The effect of hydrogen ion. *Journal of American Chemical Society* (47), 1179-1188.
- Estévez, M., Morcuende, D., Ventanas, J., & Ventanas, S. (2007). Mediterranean products. In *Handbook of fermented meat and poultry* (Ed F. Toldrá), pp. 393-406. Iowa (USA): Blackwell Publishing.
- Fuller, N. J. & Elia, M. (1988). Factors influencing the production of creatinine - Implications for the determination and interpretation of urinary creatinine and creatine in man. *Clinica Chimica Acta* **175**(3), 199-210.
- James, B. W., Goodband, R. D., Unruh, J. A., Tokach, M. D., Nelssen, J. L., & Dritz, S. S. (2002). A review of creatine supplementation and its potential to improve pork quality. *Journal of Applied Animal Research* **21**(1), 1-16.
- Macy, R. L., Naumann, H. D., & Bailey, M. E. (1970). Water-soluble flavor and odor precursors of meat .5. Influence of heating on acid-extractable non-nucleotide chemical constituents of beef, lamb and pork. *Journal of Food Science* **35**(1), 83.
- Mora, L., Sentandreu, M. A., & Toldrá, F. (2008a). Effect of cooking conditions on creatinine formation in cooked ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**(23), 11279-11284.
- Mora, L., Sentandreu, M. A., & Toldrá, F. (2008b). Contents of creatine, creatinine and carnosine in porcine muscles of different metabolic types. *Meat Science* **79**(4), 709-715.
- Morgan, T., Aubert, J. F., & Brunner, H. (2001). Interaction between sodium intake, angiotensin II, and blood pressure as a cause of cardiac hypertrophy. *American Journal of Hypertension* **14**(9), 914-920.
- Pegg, R. B., Amarowicz, R., & Code, W. E. (2006). Nutritional characteristics of emu (*Dromaius novaehollandiae*) meat and its value-added products. *Food Chemistry* **97**(2), 193-202.
- Purchas, R. W., Busboom, J. R., & Wilkinson, B. H. P. (2006). Changes in the forms of iron and in concentrations of taurine, carnosine, coenzyme Q(10), and creatine in beef

-
- longissimus* muscle with cooking and simulated stomach and duodenal digestion. *Meat Science* **74**(3), 443-449.
- Rico, E., Toldrá, F., & Flores, J. (1990). Activity of cathepsin-D as affected by chemical and physical dry-curing parameters. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung* **191**(1), 20-23.
- Schlichtherle-Cerny, H. & Grosch, W. (1998). Evaluation of taste compounds of stewed beef juice. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung A-Food Research and Technology* **207**(5), 369-376.
- Snider, S. & Baldwin, R. E. (1981). Flavor intensity as related to the creatine and creatinine content of microwave and conventionally cooked beef. *Journal of Food Science* **46**(6), 1801-1804.
- Toldrá, F. (2006). The role of muscle enzymes in dry-cured meat products with different drying conditions. *Trends in Food Science & Technology* **17**(4), 164-168.
- Toldrá, F., Cervero, M. C., & Part, C. (1993). Porcine aminopeptidase activity as affected by curing agents. *Journal of Food Science* **58**(4), 724.
- Toldrá, F. & Etherington, D. J. (1988). Examination of cathepsin-B, cathepsin-D, cathepsin-H and cathepsin-I activities in dry-cured hams. *Meat Science* **23**(1), 1-7.
- Toldrá, F. & Flores, M. (1998). The role of muscle proteases and lipases in flavor development during the processing of dry-cured ham. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **38**(4), 331-352.
- Wyss, M. & Kaddurah-Daouk, R. (2000). Creatine and creatinine metabolism. *Physiological Reviews* **80**(3), 1107-1213.

Parte 2

Identificación de los péptidos generados durante el curado del jamón.

La segunda parte de esta Tesis Doctoral compila los capítulos 5, 6, y 7, los cuales describen los resultados obtenidos tras el desarrollo del segundo objetivo, y se traducen en tres publicaciones.

Como se ha comentado en la introducción, durante el curado del jamón se producen numerosos cambios bioquímicos entre los que destaca la intensa proteólisis de las proteínas musculares. Este proceso es responsable tanto de los cambios en la

textura que se dan durante el periodo postmortem como del sabor y aroma característico desarrollado durante el curado del jamón.

La proteólisis consiste fundamentalmente en la ruptura de los enlaces peptídicos de las proteínas para dar lugar a grandes polipéptidos y, posteriormente, a péptidos de menor tamaño y aminoácidos libres. Tanto las proteínas miofibrilares como sarcoplásmicas son degradadas durante el proceso de curado. A pesar de que se sabe que las propias enzimas musculares son las responsables de esta proteólisis, actualmente se dispone de poca información sobre la estructura de los péptidos generados como consecuencia de esta hidrólisis.

La metodología más común empleada en la actualidad para la identificación de proteínas y péptidos está basada en la digestión previa con una enzima proteolítica como la tripsina, que corta de modo específico el péptido o proteína, lo que facilita la posterior identificación e interrogación en las bases de datos de proteínas. Sin embargo, para la correcta identificación de la proteína o péptido se requiere que las masas de un cierto número de fragmentos coincidan con las masas teóricas de los péptidos y que éstos cubran parte de la secuencia de la proteína existente en las bases de datos de proteínas (SwissProt, NCBI, ...). La dificultad añadida del trabajo que se presenta en esta parte de la Tesis Doctoral surge por el hecho de que los péptidos generados de forma natural durante el curado del jamón son demasiado pequeños para ser digeridos con tripsina, debiendo ser identificados directamente sin hidrolizar.

En el **capítulo 5** se presenta por primera vez la identificación de fragmentos peptídicos generados a partir de la hidrólisis de la cadena ligera de miosina I y de la titina. La miosina es la principal proteína miofibrilar del músculo esquelético, mientras que la titina, también conocida como conectina, es la tercera proteína más abundante. La identificación de estos péptidos contribuye sin duda a mejorar el conocimiento de los mecanismos responsables de la generación de la textura y del aroma y sabor característico del producto final. Para la identificación de los péptidos que se presentan se ha recurrido al uso de algunas de las técnicas de espectrometría de masas descritas en la introducción como son la desorción/ionización por láser asistida por una matriz acoplada a un analizador de

tiempo de vuelo (MALDI-TOF) y la cromatografía líquida con ionización por nanoelectrospray acoplada a un analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo.

Además de las proteínas miofibrilares, las proteínas sarcoplásmicas también se degradan de forma muy intensa durante el curado del jamón. De hecho, las proteínas sarcoplásmicas constituyen entre el 30 y el 40% del contenido total en proteínas del músculo, siendo solubles en soluciones de baja fuerza iónica. Se localizan en el sarcoplasma y de entre ellas cabe destacar la mioglobina como la proteína más relevante, así como las enzimas del metabolismo muscular. La hidrólisis de las proteínas sarcoplásmicas puede desempeñar un papel destacado en el desarrollo de la textura de la carne y de los productos cárnicos sometidos a tratamiento térmico.

La creatina quinasa (EC 2.7.3.2.) es una de las proteínas sarcoplásmicas más abundantes del músculo esquelético. Está implicada en el metabolismo energético del músculo y tiene una estrecha relación con la calidad de la carne. La desnaturalización o insolubilización de la creatina quinasa como consecuencia de las condiciones de pH y temperatura existentes en el músculo postmortem afecta negativamente al color de la carne y a su capacidad de retención de agua.

En el **capítulo 6** se presenta el aislamiento y la identificación de péptidos generados en el jamón curado a partir de la degradación de la creatina quinasa mediante el desarrollo de distintas etapas de fraccionamiento del extracto de jamón y el uso de técnicas de espectrometría de masas MALDI-TOF y de cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas cuadrupolo-tiempo de vuelo en tándem (LC-Q/TOF). Los distintos espectros de masas obtenidos fueron analizados empleando dos motores de búsqueda distintos, MASCOT y PARAGON, a través de los programas Analyst™ y ProteinPilot™, respectivamente. En ambos casos se utilizó la base de datos NCBI nr para identificar la proteína de origen de los fragmentos.

Debido a que la creatina quinasa es un sustrato de las peptidasas relacionadas con el proceso de tenderización de la carne, los fragmentos resultantes de la acción de estas enzimas podrían emplearse como marcadores de la actividad proteolítica, pudiendo ser útiles como indicadores de calidad de la carne y productos cárnicos. Así pues, en los **capítulos 5 y 6** se describe la identificación de varios fragmentos de proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas generados durante el proceso de curado del

jamón. La identificación de estos fragmentos se llevó a cabo mediante cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas con un analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo en tándem.

Los analizadores de tiempo de vuelo (TOF) se emplean tanto con la técnica de ionización por electrospray (ESI) como con la técnica MALDI, ambas comentadas en la introducción. Como allí se explica, la principal diferencia entre estos dos tipos de ionizaciones radica en que en los espectros generados mediante ionización ESI el mismo péptido puede ionizarse con distintas cargas, mientras que mediante la ionización MALDI la mayoría de los péptidos serán monocargados. Como resultado de esto, la ionización por electrospray permite la identificación de péptidos relativamente grandes en espectrómetros de masas con un intervalo de detección de masas relativamente pequeño.

En el **capítulo 7** se presenta la identificación de un total de 27 péptidos generados a partir de la degradación de la proteína troponina T durante el curado del jamón haciendo uso de la técnica MALDI-TOF/TOF. Desde el punto de vista de la resolución y de la reproducibilidad, los instrumentos que emplean analizadores de tiempo de vuelo no son tan satisfactorios como aquellos que emplean separadores cuadrupolares. Sin embargo, algunas ventajas compensan estas limitaciones; entre ellas están la sencillez de manejo, la robustez, la facilidad de acceso a la fuente de iones, la precisión de masa, un intervalo de masas virtualmente ilimitado y la rapidez en la adquisición de datos.

Estudios previos demuestran que la troponina T es una proteína miofibrilar que sufre una degradación muy intensa durante el periodo postmortem. Aunque muchos autores han determinado la secuencia N-terminal de algunos de los fragmentos generados, muy poca información acerca de la secuencia completa de estos péptidos ha sido publicada hasta la fecha.

Capítulo 5
Péptidos pequeños generados de forma natural a partir de proteínas
miofibrilares en jamón Serrano



ACS Publications
High quality. High impact.

JOURNAL OF
AGRICULTURAL AND
FOOD CHEMISTRY

Naturally generated small peptides derived from myofibrillar proteins in Serrano dry-cured ham

Leticia Mora^{1,2}, Miguel Angel Sentandreu^{1,2}, Kaisa M. Koistinen¹, Paul D. Fraser¹, Fidel Toldrá² and Peter M. Bramley¹

1. School of Biological Sciences, Royal Holloway, University of London, Egham TW20 0EX, U.K.

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

Received for review November 6, 2008. Revised manuscript received February 12, 2009. Accepted February 14, 2009.

Abstract

A proteomic approach has been carried out to investigate the extensive proteolysis occurring in the processing of Serrano ham. In this study, a total of 14 peptide fragments derived from myosin light chain I and titin have been identified for the first time. Nine of these peptides originated from myosin light chain I protein, with the loss of dipeptides at N-terminal position observed in some of them. This suggests that dipeptidyl peptidases are involved in the generation of dipeptides, which contribute to the generation of the characteristic taste associated with Serrano ham. The other five peptides came from the PEVK region of the titin protein. This region is believed to confer elasticity to the sarcomere as well as the ability to bind calpains. The hypothetical action of μ -calpain and calpain 3 enzymes over this region would make these enzymes potentially responsible for protein breakdown during the early dry-curing stage.

Keywords: Serrano ham; titin; myosin light chain I; proteomics; peptide sequencing.

INTRODUCTION

Dry-cured ham is a high-quality, processed meat product that represents an important proportion (57%) of the total production of dry-cured products in Spain. Serrano ham is protected by the European Community as a Traditional Speciality Guaranteed, controlled by the Foundation Jamón Serrano that defines and regulates specific raw materials and processing conditions. The processing of dry-cured ham is very complex and involves numerous biochemical reactions, most of them related to the muscle structure. In fact, many studies have been carried out to understand the main biochemical changes that take place during the post-mortem period in relation to the initial breakdown of myofibrils by muscle endopeptidases. This proteolysis is directly related to the development of meat tenderness (1, 2). The activity of muscle exopeptidases has been also studied due to the high increase in free amino acids and small peptides, which greatly influence the unique flavor characteristics of dry-cured ham at the end of processing (3, 4).

Despite several studies describing the presence of amino acids and peptides at the end of the curing process (5-7), the identity of these peptides has remained elusive (8, 9). The information derived from the knowledge of the protein fragments naturally generated during dry-curing would be very important for a better understanding of the texture changes and flavor development mechanisms occurring in this process.

Myosin is the major myofibrillar protein in skeletal muscle, making up more than one-third of the total protein in muscle. This protein is very large (~500 kDa) and contains two identical heavy chains, which constitute the head and tail domains, and two sets of light chains (two per head), which bind the heavy chains in the region between the head and tail. Myosin plays a key role in muscle contraction, being responsible for producing the contractile force.

Titin, also known as connectin, is the third most abundant protein of vertebrate striated muscle, after myosin and actin. The titin molecule is formed by a single polypeptide chain with a molecular weight of up to ~4 MDa, constituting the largest protein found so far in nature. The molecule is a flexible filament longer than 1 μm

(10). Interestingly, several studies have now suggested that titin degradation is concurrent with the development of meat tenderness (1, 11, 12).

In the present work, we have carried out a proteomic analysis of peptides generated in dry-cured ham in order to understand better the mechanisms leading to the development of final texture and flavor characteristics of this product.

MATERIALS AND METHODS

Extraction and deproteinization of dry-cured ham

The three Serrano dry-cured hams used in this study were produced using raw material from intensively reared industrial genotype pigs (Landrace x Large White), which were 6 month old at the moment of the slaughtering. These hams were processed in a local factory in Castellón (Spain) and were submitted to a ripening process of 9 months.

A 50 g sample of Serrano dry-cured ham (*Biceps femoris*) was minced and then homogenized in 100 mL of 0.01 N HCl using a stomacher apparatus (Seward Laboratory Systems Inc.) for 8 min. The mixture was centrifuged at 4 °C and 24500 g for 20 min. The resulting supernatant was filtered through glass wool; the solution was deproteinized by adding 3 volumes of ethanol and allowed to stand for 20 min at 4 °C. Finally, the sample was centrifuged (24500 g) for 10 min at 4 °C, and the supernatant was dried in a rotatory evaporator. The residue remaining from the extract was finally redissolved in 25 mL of 0.01 N HCl. Finally, the sample was filtered through a 0.45 µm nylon membrane filter (Millipore, Bedford, MA) and stored at -20 °C until use.

Size-exclusion chromatography

To fractionate the deproteinized cured ham extract on the basis of molecular weight, 5 mL of the extract was subjected to size-exclusion chromatography on a Sephadex G25 column (2.5 x 65 cm, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), at 5 °C. The degassed mobile phase was 0.01 N HCl, filtered through a 0.22 µm membrane filter. The separation was performed at a flow rate of 15 mL/h, and fractions of 5 mL were

collected using an automatic fraction collector (Model 2110, Bio-Rad Laboratories, U.K.). These fractions were monitored at 214, 254 and 280 nm with an UV spectrophotometer (Agilent 8453, Agilent Technologies, Palo Alto, CA). The fractions corresponding to an elution volume between 125 and 190 mL were pooled, then dried centrifuging under vacuum, and stored at -20 °C.

Reversed-phase chromatography

The dried sample was redissolved in 5 mL of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA, v/v) in water/acetonitrile (95:5, v/v) and filtered through a 0.22 µm nylon membrane filter. After filtering, 500 µL of the redissolved sample was injected into a Bio-Cad™ workstation liquid chromatograph (Perseptive Biosystems, Framingham, MA). The chromatographic separation was developed using a Nucleosil C₁₈ column (250 x 4.6 mm, 5 µm particle size) from Macherey-Nagel (Düren, Germany) at room temperature. Mobile phases comprised solvent A, containing 0.1% TFA in water (v/v) and solvent B, containing 0.08% TFA in water/acetonitrile (5:95). The degassed solvents were filtered through a 0.22 µm filter. The separation conditions consisted of solvent A isocratically for 10 min, followed by a linear gradient from 0 to 100% of solvent B over 90 min at a flow rate of 1 mL/min. The separation was monitored using a diode array detector at a wavelength of 214 nm, and 1 mL fractions were collected. Two of these fractions, containing myosin light chain I fragments and corresponding to the maximum level of absorbance, were pooled together, dried under vacuum, and stored at -20 °C. Another four fractions were selected and chromatographed again to improve the isolation of the titin fragments. To carry out this second chromatographic analysis, the same column and conditions described above were used but with 0.08% TFA in water/acetonitrile (40:60) as solvent B. Separation was monitored at 214 nm and fractions corresponding to different maximal absorbances were collected manually, subsequently dried under vacuum, and stored at -20 °C.

Molecular mass determination and peptide identification by mass spectrometry

Dried fractions were redissolved in 40 µL of 0.1% TFA in water. A sample (1 µL) of each fraction was spotted onto an AnchorChip plate (Bruker Daltonik GmbH, Bremen,

Germany) and mixed with 1 μ L of 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB, Bruker Daltonik GmbH) in 0.1% TFA/acetonitrile (2:1, v/v). After air-drying, the plate was introduced in a Bruker Reflex III matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer (MALDI-TOF MS, Bruker Daltonik GmbH). The instrument was used in positive-ion reflector mode for mass analysis with an ion acceleration voltage of 20 kV. Spectra were obtained from the average of 300 laser shots. Mass calibration was performed using a peptide calibration standard in a mass range between 1000 and 3000 Da (code 206195, Bruker Daltonik GmbH). FlexAnalysis 2.4 software (Bruker Daltonik GmbH) was employed for data analysis.

To identify the peptides by tandem mass spectrometry, they were separated using an Ultimate/Famos nano LC system (LC Packings, Amsterdam, The Netherlands). The sample was loaded onto a 0.2 x 5 mm PS-DVB monolithic trap column (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) at a flow rate of 10 μ L/min of 0.1% TFA for 30 min. After pre-concentration, the trap column was automatically switched in-line with a Dionex poly(styrene-divinylbenzene) (PS-DVB) monolithic column (0.1 x 50 mm) to elute peptides with a linear gradient starting from 95% solvent A (0.1% formic acid in water, v/v) to 40% solvent B (0.1% formic acid in CAN, v/v) for 120 min, at a flow rate of 100 nL/min. The column outlet was directly coupled to a nanoelectrospray ion source (Protana, Odense, Denmark) using a 10 μ m PicoTip (New Objective, Woburn, MA). The positive TOF mass spectra were recorded on a QSTAR Pulsar *i* hybrid quadrupole TOF instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA) using information-dependent acquisition (IDA). TOF MS survey scans were recorded over a mass range of m/z 400 - 1600, followed by MS/MS scans of the two most intense peaks. Typical ion spray voltage was in the range of 2.0 - 2.4 kV and nitrogen was used as collision gas. Other source parameters and spray position were optimized with a tryptic digest of bovine serum albumin.

Automated spectral processing, peak list generation, and database searches were performed using Mascot search v1.6b21 script for Analyst QS 1.1 (Applied Biosystems) in combination with the Mascot interface (<http://www.matrixscience.com>). Identification of the proteins from which the peptides were derived was performed by homology blasting using the NCBI nonredundant

protein database. Matches of MS/MS spectra against sequences of the database were verified manually.

To validate the results, two replicates of the technical analysis were done to confirm the myosin light chain I and titin sequences.

RESULTS

Peptide isolation and purification by reversed-phase HPLC

Fractions corresponding to an elution volume between 125 and 190 mL obtained after Sephadex G-25 size-exclusion chromatography and containing peptides between 1000 and 3000 Da, were pooled together and subjected to preparative reversed-phase chromatography. Peptides eluting at a concentration of acetonitrile (ACN) from 28% to 30%, were pooled together, dried, and subjected to mass spectrometry for the identification of myosin light chain I fragments. Additionally, titin peptides were obtained in four fractions at an ACN concentration of 31% - 35%. A second reversed-phase chromatographic step was needed for further fractionation to improve the isolation of titin fragments. Thus, after this step, a main peak eluting at 38% ACN was collected for further peptide identification.

De novo peptide sequencing using mass spectrometry

Myosin light chain I fragments

Fractions selected after the first reversed-phase chromatography were subjected to MALDI-TOF mass spectrometry to determine peptide molecular masses. Four singly charged ions ($M + H^+$) were obtained at m/z values 2046.07, 1903.99, 1735.88 and 1567.74 (spectra in 'Supporting Information'). The same fraction was subjected to quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry along with a nanoelectrospray ionisation source liquid chromatography (nanoLC-nESI-QTOF-MS) in order to elucidate the sequence of the peptides in this fraction. A total of nine peptide sequences were identified (see **Tables 1 and 2**). The molecular masses of peptides 1, 2, 4 and 5 were in accordance with the signals obtained from MALDI-TOF MS.

Figure 1 shows the MS/MS spectrum corresponding to peptide 1 (other spectra are not shown).

Table 1. Sequence of the nine myosin light chain I fragments identified by LC-MS/MS^a.

Peptide	¹⁴ A	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	P	K	E	E	K ³⁵
1	A	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	P	K	E	E	K
2			P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	P	K	E	E	K
3				A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	P	K	E	E	K
4					P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	P	K	E	E	K
5							P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	P	K	E	E	K
6									P	A	P	A	P	A	P	A	P	P	K	E	E	K
7											P	A	P	A	P	A	P	P	K	E	E	K
8													P	A	P	A	P	P	K	E	E	K
9														P	A	P	P	K	E	E	K	

^a Spectra were interpreted both manually and using the online form of the MASCOT program. Superscripts indicate the position of the fragments in the protein.

All the identified myosin light chain I peptides share the common sequence PAPPKEEK (peptide 9), which corresponds to the C-terminus of the peptides. However, as can be observed in **Table 1**, the identified peptides show remarkable differences at their N-termini. Peptide 1 contains two additional amino acids at the N-terminus compared with peptide 2, whereas peptide 2 has an additional proline than peptide 3. Finally, a consecutive loss of the dipeptide Pro-Ala is observed from peptide 4 to peptide 8. BLAST sequence similarity searches revealed 100% homology of the nine peptides to porcine myosin light chain I (accession number ABK55642 in NCBI nonredundant database), as shown in **Figure 2**.

Titin fragments

The main peak obtained after the second chromatographic step, analyzed by MALDI-TOF MS, showed the molecular ions in **Figure 3**. Among the peaks showing the highest intensities, singly charged ions ($M + H^+$) were obtained at m/z values 2130.97, 2260.02, 2358.10 and 2487.14.

Table 2. Myosin light chain (MLCI) fragments identified in the *Biceps femoris* muscle of a dry-cured ham by nanoLC-MS/MS.

Peptide	Observed ^a	Charged State	Calculated ^b	Score ^c	Position ^d	MALDI-TOF ^e	LC-MS/MS ^e
1	682.74	(3+)	2045.09	83	14-35	X	X
2	635.38	(3+)	1903.02	89	16-35	X	X
3	603.03	(3+)	1805.97	91	17-35		X
4	579.32	(3+)	1734.93	78	18-35	X	X
5	523.28	(3+)	1566.84	69	20-35	X	X
6	467.28	(3+)	1398.75	59	22-35		X
7	411.24	(3+)	1230.66	54	24-35		X
8	532.31	(2+)	1062.57	50	26-35		X
9	448.25	(2+)	894.48	27	28-35		X

^aMolecular ion mass observed in the LC-MS/MS system calculated in daltons. ^bCalculated relative molecular mass (Da) of the matched peptide. ^cScore obtained in Mascot using the NCBI nonredundant protein database. ^dPosition of the peptides inside the partial MLCI sequence identified for porcine specie (NCBI accession no. ABK55642). ^ePeptides marked with an 'X' were observed using the corresponding mass spectrometric technique.

The same fraction was also subjected to nanoLC-MS/MS in order to elucidate the sequences of the peptides in it. A total of five peptide sequences were identified (see **Tables 3** and **4**), their molecular masses being in accordance to the most intense signals obtained in MALDI-TOF MS (**Figure 3**). The MS/MS spectra of the tetra-charged ions 533.57, 565.83, 590.40 and 622.62, matched the peptide sequence PEIKPAIPLGPEPKPKPEP for peptide 10, PEIKPAIPLGPEPKPKPEPE for peptide 11, KVPEIKPAIPLGPEPKPKPEP for peptide 12 and KVPEIKPAIPLGPEPKPKPEPE for peptide 13. A fifth peptide not detected previously by MALDI-TOF-MS was also identified. The MS/MS spectrum for the doubly-charged precursor matched the sequence PGPEPKPKPEPE (peptide 14), which corresponds to the C-terminal side of peptides 11 and 13. **Figure 4** shows the MS/MS spectrum of peptide 14.

As can be observed (**Table 3**), the identified titin peptides share a common sequence but showing differences at both N- and C- termini. Thus, peptides 11 and 13 have an additional glutamic acid at the C-terminus compared to peptides 10 and 12. On the

other hand, peptides 12 and 13 contain two additional amino acids (Lys-Val) at the N-terminal position.

Peptide 1 (682.74³⁺)

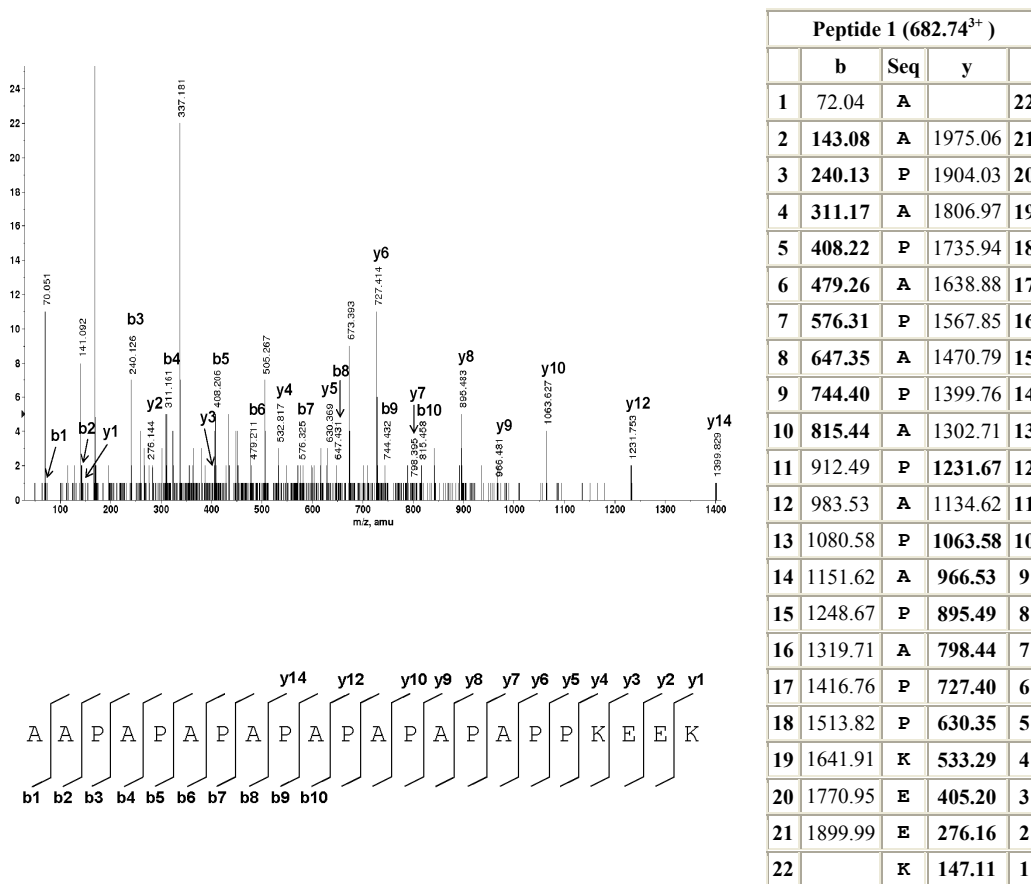


Figure 1. MS/MS spectrum of ion 682.74³⁺ (peptide 1). Peptide sequence matching the product ion spectrum is shown in capital letters, together with observed *b* and *y* ions. The spectrum is presented with its corresponding table showing the ions matched by MASCOT in bold letters.

BLAST sequence similarity searches revealed 100 % homology of the five peptides to a partial sequence of porcine muscle titin (entry name AAD00528 in NCBI nonredundant protein database), shown in **Figure 5**.

DISCUSSION

Extensive proteolysis has been reported during the processing of dry-cured ham (13, 14). This implies the degradation of both sarcoplasmic and myofibrillar proteins by muscle endopeptidases (mainly by cathepsins and calpains) and the further degradation of the generated polypeptides by the action of certain groups of exopeptidases such as dipeptidyl peptidases (15).

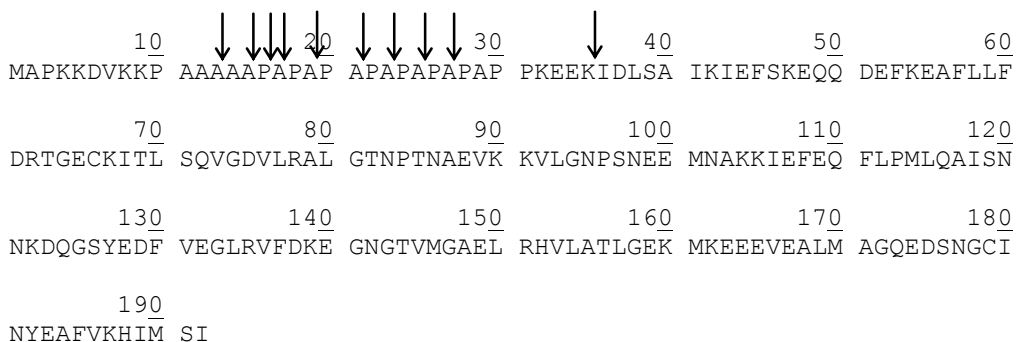


Figure 2. Sequence corresponding to porcine myosin light chain I (NCBI nonredundant database accession number ABK55642). The same sequence also corresponds to the entry A1XQT6_PIG in UniProtKB/TrEMBL protein database. Cleavage sites of the peptides identified in the present work are indicated with black arrows.

Possible role of endopeptidases

Cathepsins are lysosomal enzymes that play an important role in both the development of meat tenderness and during dry-cured ham processing (14, 16). They have been implicated in the breakdown of most myofibrillar proteins and connective tissue, playing an important role in the development of meat texture (17). Several studies have related the action of cathepsins with the progressive disappearance of myosin. For example, incubation of rabbit skeletal muscle myosin with cathepsin B proved the degradation of myosin heavy chain and one of the myosin light chains, L2, by this enzyme (18). Etherington also established that both cathepsins B and D were especially active against myosin. This author tested purified liver cathepsin L against intact myofibrils and found the enzyme degraded myosin, although to a lesser extent

than other proteins like titin (19). In contrast, other authors reported that myosin was not degraded by rabbit skeletal muscle cathepsin B, while cathepsin L, isolated from rabbit skeletal muscle, was able to hydrolyse myosin at pH 4.1 (20). In this way, a progressive disappearance of myosin light chains 1 and 2 during the dry-curing process was suggested (21). According to these authors, the disappearance of myosin light chains 1 and 2 could be due to cathepsins L and D, despite cathepsin D activity being notably reduced after 4-6 months of processing, due to its inhibition in the presence of high levels of NaCl.

Table 3. Sequences of the five titin fragments identified by LC-MS/MS. Spectra were interpreted both manually and using the online form of the MASCOT program. Superscripts indicate the position of the fragments in the protein.

Peptide	⁹⁵ K	V	P	E	I	K	P	A	I	P	L	P	G	P	E	P	K	P	K	P	E	P	E ¹¹⁷
10			P	E	I	K	P	A	I	P	L	P	G	P	E	P	K	P	K	P	E	P	
11			P	E	I	K	P	A	I	P	L	P	G	P	E	P	K	P	K	P	E	P	E
12	K	V	P	E	I	K	P	A	I	P	L	P	G	P	E	P	K	P	K	P	E	P	
13	K	V	P	E	I	K	P	A	I	P	L	P	G	P	E	P	K	P	K	P	E	P	E
14												P	G	P	E	P	K	P	K	P	E	P	E

Table 4. Titin fragments identified in the *Biceps femoris* muscle of a dry-cured ham by nanoLC-MS/MS.

Peptide	Observed ^a	Charged State	Calculated ^b	Score ^c	Position ^d	MALDI-TOF ^e	LC-MS/MS ^e
10	533.57	(4+)	2130.21	62	97-116	X	X
11	565.83	(4+)	2259.25	47	97-117	X	X
12	590.40	(4+)	2357.37	70	95-116	X	X
13	622.62	(4+)	2486.41	76	95-117	X	X
14	651.35	(2+)	1300.67	43	106-117		X

^aMolecular ion mass observed in the LC-MS/MS system calculated in Daltons. ^bCalculated relative molecular mass (Da) of the matched peptide. ^cScore obtained in Mascot using the NCBI non-redundant protein database. ^dPosition of the peptides inside the partial titin sequence identified for porcine specie (NCBI accession number AAD00528). ^ePeptides marked with an 'X' were observed using the corresponding mass spectrometric technique.

The action of cathepsin D in the degradation of myofibrillar proteins has been widely studied during meat ageing (21). Cathepsin D has been found to be specially active against myosin heavy chains, titin, proteins M and C, actin, tropomyosin, troponins I

and II and myosin light chains as well as altering the Z disk structure (22). The degradation of myosin light chains by cathepsin D has also been studied by incubating purified cathepsin D with myofibrils at pH 5.5 and 37 °C (23). According to these authors, myosin light chains were degraded at a much slower rate than myosin heavy chains. The peptide sequences corresponding to the hydrolysis products were not identified.

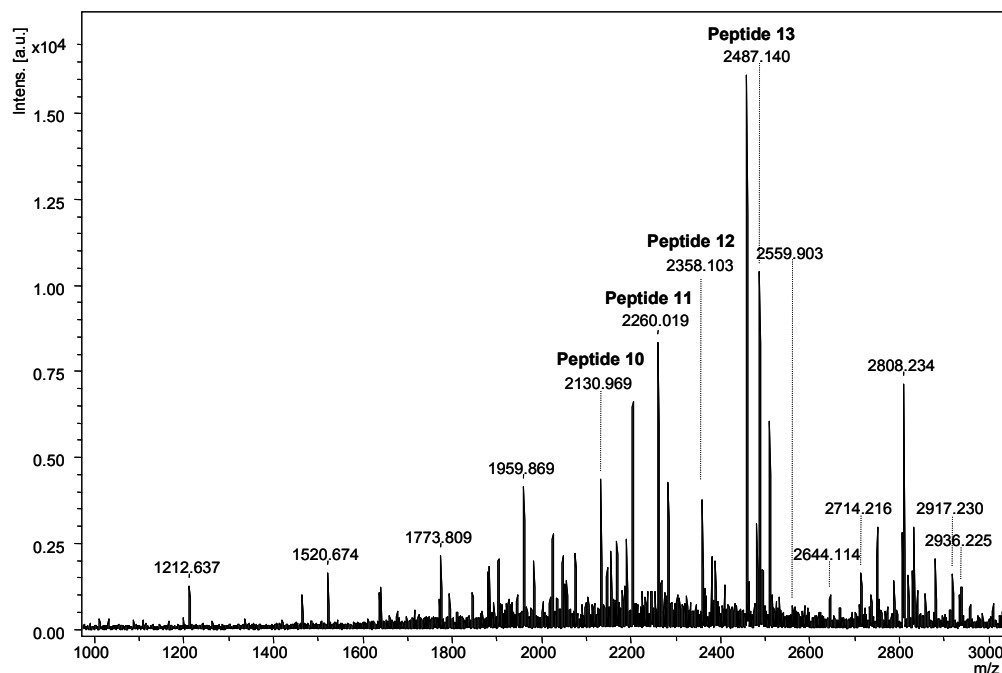


Figure 3. MALDI-TOF mass spectrum of the titin fraction collected manually after the second reversed-phase chromatography.

Calpains constitute another relevant group of endopeptidases, even though many authors have established that they do not degrade myosin and actin (24). The proteolytic activity of calpains has been reported by many authors (12, 25). In fact, binding assays using two titin regions showed that, in the presence of inhibitors, a titin fragment external to the N1 line that bears the PEVK/N₂ region, tightly bound μ -calpain enzyme, whereas in their absence, both fragments were cleaved by the enzyme (26). The titin PEVK region has been suggested to be directly involved in the

mechanism of elasticity, contributing to passive force development of relaxed skeletal muscle during stretch (27). In relation to this, it is worth noting that the five titin fragments identified in our study belong to the last part of the PEVK region, situated in the extreme C-terminal region of titin (28). This finding would suggest that both μ -calpain and calpain 3 may be responsible for the protein breakdown at this level, thus contributing to the intense protein breakdown that occurs during the early steps of dry-cured processing (29).

Figure 5. Partial sequence of porcine titin (NCBI protein accession number AAD00528). The same sequence also corresponds to the entry O97771 in UniProtKB/TrEMBL protein database. Cleavage sites of the peptides identified in the present work are indicated with black arrows.

```

      10      20      30      40      50      60
GSVSCATLT VTVPGGEKKV RKLLPEPKPE PKEEVVLKSV LRKRPEEEEEP KVEPKKLEKI

      70      80      90      100     110     120
KKPAVPEPPP KAVEEVEAPP AAVPKRERKV PEPTKVPEIK PAIPLPGPEP KPKPEPEVKV

      130     140     150     160     170     180
IKPPPVEPPP APIAAPVTVP VVGKKA EAKA PKEEAAKPKG PIKGVAKKTP SPIEAERKKL

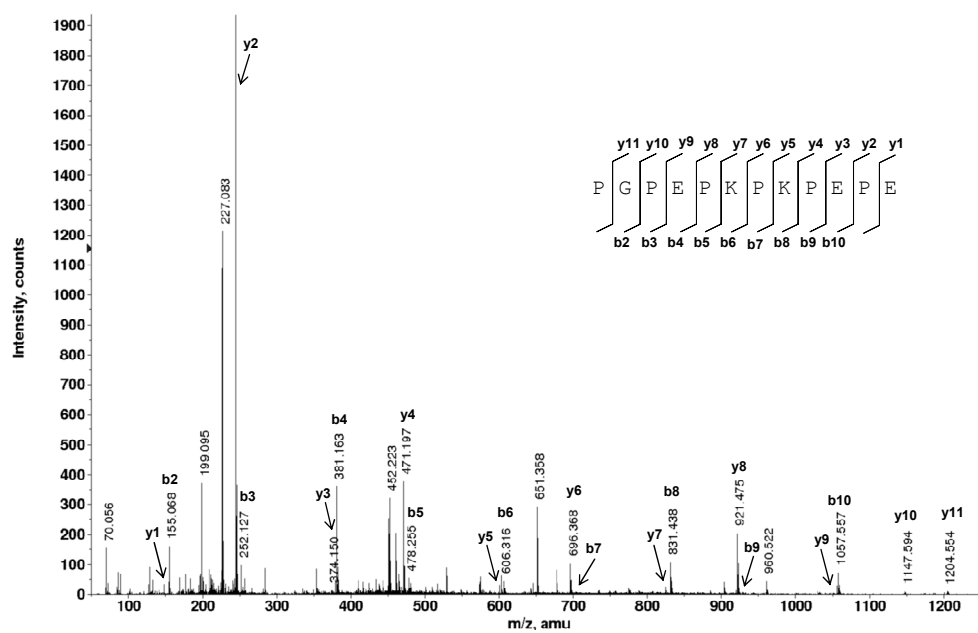
      190     200     210     220
RPGSGGEKPP DEAPFTYQLK AVPLK FVKEI QDIVL TEAES VGSSAIFE

```

Possible role of exopeptidases

Dipeptidyl peptidases (DPP I, II, III and IV) are enzymes that release different dipeptides from the N-terminus of peptides. Considering the high stability of dipeptidyl peptidases during the processing of dry-cured ham (30) and the consecutive loss of dipeptides observed in the N-terminal side of the peptides identified in this work (see **Tables 1** and **2**), these enzymes could be the responsible for the loss of N-terminal dipeptides from myosin light chain I and titin peptides. **Table 1** shows the loss of Ala-Ala in peptide 1 to obtain peptide 2, as well as the consecutive loss of Pro-Ala, giving rise to peptides 5 - 9. These dipeptides could contribute, together with amino acids and other nonvolatile compounds, to flavor development in dry-cured ham (7).

Peptide 14 (651.35²⁺)



Peptide 14 (651.35 ²⁺)				
	b	Seq.	y	
1	98.06	P		12
2	155.08	G	1204.62	11
3	252.13	P	1147.60	10
4	381.18	E	1050.55	9
5	478.23	P	921.50	8
6	606.32	K	824.45	7
7	703.38	P	696.36	6
8	831.47	K	599.30	5
9	928.52	P	471.21	4
10	1057.57	E	374.16	3
11	1154.62	P	245.11	2
12		E	148.06	1

Figure 4. MS/MS spectrum of ion 651.35²⁺ (peptide 14) of the main peak obtained after the second reversed-phase chromatography. Peptide sequence matching the product ion spectrum is shown in capital letters, together with observed *b* and *y* ions. The spectrum is presented with its corresponding table showing the ions matched by MASCOT in bold letters.

DPP I preferentially hydrolyzes N-terminal peptides with a penultimate basic residue, even though the synthetic derivative Ala-Ala-pNa was also hydrolyzed by porcine DPP. On the other hand, those peptides containing a basic amino acid in the N-terminal position are not hydrolyzed by this enzyme, as well as those containing a proline residue on either side of the peptide bond (31). Thus, it does not seem likely that DPP I could be responsible for the sequential loss of the dipeptide Pro-Ala in peptides 4 - 8, due to the presence of proline in the C-terminus of the scissile bond and at the P1 position of these peptides. On the other hand, the action of DPP I with peptide 1 and peptides 12 and 13 also seem unlikely, due to the presence of Pro in the scissile bond and the presence of Lys in N-terminal position, respectively.

DPP II from porcine skeletal muscle preferentially hydrolyzes the synthetic substrates of type X-Pro-, followed by those of type X-Ala- in both fluorescent (dipeptidyl 7-amido-4-methyl-coumarin (AMC)) and colorimetric (dipeptidyl-pNa) derivatives (32). Some authors have established that basic, neutral and acidic amino acids are accepted in the N-terminal position of peptides, decreasing their relative activities in this order (33). Thus, the presence of Ala, Pro and Lys in this position could make peptides 1, 4 - 8, 12, and 13 potential substrates for this enzyme although these authors also established that rat brain DPP II activity decreases drastically with increasing chain length of the peptides.

Arg-Arg-AMC is the most commonly used substrate to determine DPP III activity, although Ala-Ala-pNa is also hydrolyzed by the enzyme (34). No activity was detected against peptide sequences containing more than 10 amino acids or a proline residue on either side of the scissile bond using DPP III purified from guinea-pig brain (35). Therefore, it seems unlikely that DPP III is involved in the generation of any of the fragments identified in this study because of their length (more than 10 amino acids in peptides from 1 to 8 and from 10 to 14) and the presence of a Pro residue in the scissile bond.

Substrates for DPP IV are those peptides containing a proline residue in the N-penultimate position and, to a lower degree, those containing alanine in this position (36). These authors also established that peptides were hydrolyzed by DPP IV even if they contained a proline residue also in the third position from the N-terminus. Other

authors disagree, observing an inhibition of DPP IV with a number of nonsubstrate oligopeptides containing an N-terminal X-X-Pro- structure (37). The degree of inhibition by these peptides depends on their length, with the most potent inhibition shown by the longest peptides tested (peptides between 13 and 86 amino acids). A wide number of natural peptides contain this X-X-Pro- structure and thus, according to these authors, it is conceivable that the DPP IV activity is regulated by such peptides *in vivo*.

In summary, any dipeptidyl peptidase with the exceptions of DPP I and DPP III could be responsible for the loss of the dipeptide Ala-Ala in peptide A. On the other hand, and due to the lack of literature related to the DPP specificity to the substrates Pro-Ala- and Lys-Val-, it is difficult to elucidate the enzymes involved in the loss of these dipeptides, although the action of DPP II and/or DPP IV would be feasible.

In conclusion, the peptides identified in this work provide clear evidence of the extensive hydrolysis of proteins during dry-cured ham processing. The myosin light chain I fragments identified could constitute evidence of the contribution of dipeptidyl peptidases in the generation of dipeptides during dry-cured ham processing. These dipeptides could contribute, together with other nonvolatile compounds, to flavor development in dry-cured ham. Some peptide fragments belong to the PEKV region of titin, a protein that is directly implicated in the elasticity of the sarcomere. The hypothetical action of μ -calpain and calpain 3 over this region would make these enzymes potentially responsible for the protein breakdown that occurs during the early dry-curing stage. Better knowledge about the enzymatic action that takes place during dry-cured ham processing is needed to provide a thorough understanding of the main enzymes involved and how their action influences the texture changes and flavor generation during processing.

ACKNOWLEDGMENTS

Food Standards Agency project Q 01R006 (United Kingdom), FPU scholarship from Ministerio de Educación y Ciencia (Spain) to L.M., Grant AGL2007-65379-C02-01/ALI from Ministry of Education and Science (Madrid, Spain) and FEDER are fully

acknowledged. We are grateful to Dr. Ahmed Ouali (INRA, France) for his valuable assistance in the discussion of the results. Special thanks also to Raj Patel, John Halket and Chris Gerrish (Royal Holloway) for their helpful advice.

LITERATURE CITED

1. Lametsch, R.; Karlsson, A.; Rosenvold, K.; Andersen, H. J.; Roepstorff, P.; Bendixen, E. Postmortem proteome changes of porcine muscle related to tenderness. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51* (24), 6992-6997.
2. Sentandreu, M. A.; Coulis, G.; Ouali, A. Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends Food Sci. Technol.* **2002**, *13* (12), 400-421.
3. Toldrá, F.; Flores, M. The role of muscle proteases and lipases in flavor development during the processing of dry-cured ham. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1998**, *38* (4), 331-352.
4. Toldrá, F.; Aristoy, M. C.; Flores, M. Contribution of muscle aminopeptidases to flavor development in dry-cured ham. *Food Res. Int.* **2000**, *33* (3-4), 181-185.
5. Hansen-Møller, J.; Hinrichsen, L.; Jacobsen, T. Evaluation of peptides generated in Italian-style dry-cured ham during processing. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45* (8), 3123-3128.
6. Rodríguez-Nuñez, E.; Aristoy, M. C.; Toldrá, F. Peptide Generation in the Processing of Dry-Cured Ham. *Food Chem.* **1995**, *53* (2), 187-190.
7. Sentandreu, M. A.; Stoeva, S.; Aristoy, M. C.; Laib, K.; Voelter, W.; Toldrá, F. Identification of small peptides generated in Spanish dry-cured ham. *J. Food Sci.* **2003**, *68* (1), 64-69.
8. Sforza, S.; Boni, M.; Ruozi, R.; Virgili, R.; Marchelli, R. Identification and significance of the N-terminal part of swine pyruvate kinase in aged Parma hams. *Meat Sci.* **2003**, *63* (1), 57-61.
9. Sentandreu, M. A.; Armenteros, M.; Calvete, J. J.; Ouali, A.; Aristoy, M. C.; Toldrá, F. Proteomic identification of actin-derived oligopeptides in dry-cured ham. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55* (9), 3613-3619.
10. Tskhovrebova, L.; Trinick, J. Titin: Properties and family relationships. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4* (9), 679-689.
11. Fritz, J. D.; Mitchell, M. C.; Marsh, B. B.; Greaser, M. L. Titin content of beef in relation to tenderness. *Meat Sci.* **1993**, *33* (1), 41-50.

12. Koohmaraie, M.; Geesink, G. H. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Sci.* **2006**, *74* (1), 34-43.
13. Di Luccia, A.; Picariello, G.; Cacace, G.; Scalone, A.; Faccia, M.; Liuzzi, V.; Alviti, G.; Musso, S. S. Proteomic analysis of water soluble and myofibrillar protein changes occurring in dry-cured hams. *Meat Sci.* **2005**, *69* (3), 479-491.
14. Toldrá, F.; Rico, E.; Flores, J. Cathepsin B, D, H and L Activities in the processing of dry-cured ham. *J. Sci. Food Agric.* **1993**, *62* (2), 157-161.
15. Toldrá, F. The role of muscle enzymes in dry-cured meat products with different drying conditions. *Trends Food Sci. Technol.* **2006**, *17* (4), 164-168.
16. Rico, E.; Toldrá, F.; Flores, J. Effect of dry-curing process parameters on pork muscle cathepsin-B, cathepsin-H and cathepsin-L activity. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1991**, *193* (6), 541-544.
17. Larrea, V.; Perez-Munuera, I.; Hernando, I.; Quiles, A.; Llorca, E.; Lluch, M. A. Microstructural changes in Teruel dry-cured ham during processing. *Meat Sci.* **2007**, *76* (3), 574-582.
18. Hirao, T.; Hara, K.; Takahashi, K. Purification and characterization of cathepsin-B from monkey skeletal-muscle. *J. Biochem.* **1984**, *95* (3), 871-879.
19. Etherington, D. J. Conditioning of meat: Factors influencing protease activity. In *Accelerated processing of meat*, 1st edition ed.; Romita, A.; Valin, C.; Taylor, A. A., Eds.; 1987; pp 21-28.
20. Okitani, A.; Matsukura, U.; Kato, H.; Fujimaki, M. Purification and Some Properties of A Myofibrillar Protein-degrading protease, cathepsin-L, from rabbit skeletal-muscle. *Journal of Biochemistry* **1980**, *87* (4), 1133-1143.
21. Rico, E.; Toldra, F.; Flores, J. Activity of cathepsin-D as affected by chemical and physical dry-curing parameters. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1990**, *191* (1), 20-23.
22. Zeece, M. G.; Katoh, K. Cathepsin-D and its effects on myofibrillar proteins - A Review. *J. Food Biochem.* **1989**, *13* (3), 157-178.
23. Zeece, M. G.; Katoh, K.; Robson, R. M.; Parrish, F. C. Effect of cathepsin-D on bovine myofibrils under different conditions of pH and temperature. *J. Food Sci.* **1986**, *51* (3), 769.
24. Goll, D. E.; Thompson, V. F.; Taylor, R. G.; Christiansen, J. A. Role of the calpain system in muscle growth. *Biochimie* **1992**, *74* (3), 225-237.
25. Huff-Lonergan, E.; Mitsuhashi, T.; Beekman, D. D.; Parrish, F. C.; Olson, D. G.; Robson, R. M. Proteolysis of specific muscle structural proteins by mu-

calpain at low pH and temperature is similar to degradation in postmortem bovine muscle. *J. Anim. Sci.* **1996**, *74* (5), 993-1008.

26. Raynaud, F.; Fernandez, E.; Coulis, G.; Aubry, L.; Vignon, X.; Bleimling, N.; Gautel, M.; Benyamin, Y.; Ouali, A. Calpain 1-titin interactions concentrate calpain 1 in the Z-band edges and in the N2-line region within the skeletal myofibril. *FEBS J.* **2005**, *272* (10), 2578-2590.
27. Linke, W. A.; Ivemeyer, M.; Mundel, P.; Stockmeier, M. R.; Kolmerer, B. Nature of PEVK-titin elasticity in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95* (14), 8052-8057.
28. Labeit, S.; Kolmerer, B. Titins - Giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science* **1995**, *270* (5234), 293-296.
29. Virgili, R.; Parolari, G.; Schivazappa, C.; Bordini, C. S.; Borri, M. Sensory and texture quality of dry-cured ham as affected by endogenous cathepsin B activity and muscle composition. *J. Food Sci.* **1995**, *60* (6), 1183-1186.
30. Sentandreu, M. A.; Toldrá, F. Dipeptidyl peptidase activities along the processing of Serrano dry-cured ham. *Eur. Food Res. Technol.* **2001**, *213* (2), 83-87.
31. Sentandreu, M. A.; Toldrá, F. Purification and biochemical properties of dipeptidyl peptidase I from porcine skeletal muscle. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48* (10), 5014-5022.
32. Sentandreu, M. A.; Toldrá, F. Partial purification and characterisation of dipeptidyl peptidase II from porcine skeletal muscle. *Meat Sci.* **2001**, *57* (1), 93-103.
33. Mentlein, R.; Struckhoff, G. Purification of 2 dipeptidyl aminopeptidases-ii from rat-brain and their action on proline-containing neuropeptides. *J. Neurochem.* **1989**, *52* (4), 1284-1293.
34. Sentandreu, M. A.; Toldrá, F. Biochemical properties of dipeptidyl peptidase III purified from porcine skeletal muscle. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46* (10), 3977-3984.
35. Smyth, M.; O'Cuinn, G. Dipeptidyl aminopeptidase III of guinea-pig brain: specificity for short oligopeptide sequences. *J. Neurochem.* **1994**, *63* (4), 1439-1445.
36. Sentandreu, M. A.; Toldrá, F. Dipeptidyl peptidase IV from porcine skeletal muscle: purification and biochemical properties. *Food Chem.* **2001**, *75* (2), 159-168.
37. Hoffmann, T.; Reinhold, D.; Kahne, T.; Faust, J.; Neubert, K.; Frank, R.; Ansorge, S. Inhibition of dipeptidyl-peptidase-iv (Dp-iv) by anti-Dp-iv antibodies and nonsubstrate X-X-Pro- oligopeptides ascertained by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **1995**, *716* (1-2), 355-362.

Capítulo 6
Oligopéptidos derivados de la degradación de la creatina quinasa en jamón
curado



ACS Publications
High quality. High impact.

JOURNAL OF
AGRICULTURAL AND
FOOD CHEMISTRY

Oligopeptides arising from the degradation of creatine kinase in Spanish dry-cured ham

Leticia Mora^{1,2}, Miguel Angel Sentandreu², Paul D. Fraser¹, Fidel Toldrá² and Peter M. Bramley¹

1. Center for Systems and Synthetic Biology, School of Biological Sciences, Royal Holloway, University of London, Egham TW20 0EX, U.K..

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

Received for review May 11, 2009. Revised manuscript received July 16, 2009. Accepted July 24, 2009.

Abstract

During the processing of dry-cured ham many biochemical changes occur, including the degradation of muscle proteins. These changes are due to the intense action of endogenous proteolytic enzymes. In the present study, the isolation and identification of a large number of peptides derived from creatine kinase has been achieved for the first time in dry-cured ham. A total of 58 peptides coming from different regions of the protein have been identified by mass spectrometry. This study provides evidence for the extensive degradation of creatine kinase during the processing of dry-cured ham as well as the role played by endo- and exopeptidases in the generation of small peptides and free amino acids from polypeptides. These peptides are important in the development of characteristic sensory properties associated with dry-cured ham.

Keywords: Dry-cured ham; creatine kinase; proteolysis; aminopeptidases; proteomics; mass spectrometry, peptides.

INTRODUCTION

Traditional Spanish dry-cured ham is a high-quality product that requires prolonged processing. During this process many biochemical reactions responsible for the products final characteristic traits, such as texture and flavor, occur. One of the main changes arising in skeletal muscle during the dry-curing process is the degradation of protein (1, 2). Muscle endopeptidases like cathepsins and calpains degrade the muscle protein structure giving rise to large polypeptides, that are further degraded to smaller peptides and free amino acids by exopeptidases such as aminopeptidases and carboxypeptidases. The action of these enzymes during processing is of great importance because they are directly responsible for changes in postmortem muscle texture (3-5) and for the flavor development that occurs during the ripening of dry-cured meat products (2, 6-8).

Creatine kinase (CK; E.C.2.7.3.2.) is a sarcoplasmic protein and, functionally, is an enzyme involved in energetic metabolism of tissues, such as skeletal muscle, with high and fluctuating energy demands *in vivo*. In this way, adenosine triphosphate (ATP) is continuously regenerated by the action of CK, which catalyzes the transphosphorylation reaction between phosphocreatine (PCr) and adenosine diphosphate (ADP). This enzyme is used as an indicator of pre-slaughter physical stress/muscle damage in animal production by the measurement of its levels in blood (9, 10). Early postmortem, CK continues to exert important functions related to the conversion of muscle into meat. Numerous studies have related this enzyme to meat quality (11), establishing a negative correlation between the solubility of sarcoplasmic proteins (being CK the major denatured protein) and drip loss (12, 13) or pale colour (13, 14) in porcine meat. The texture of meat may also be affected somehow by the denaturation of sarcoplasmic proteins. In this way, the insolubilization of sarcoplasmic proteins, including CK, during vinegar curing of mackerel meat was hypothesized to be responsible for the texture changes caused by the curing process (15). Recently, some authors have established a positive correlation between abundance of the full-length CK and firmness of fish meat, suggesting that limited proteolysis of CK in firm fish is possibly related to minimised oxidative conditions (16).

Many authors have reported the intense proteolysis suffered by sarcoplasmic proteins during dry-cured ham processing, reporting the degradation of CK occurred along the ripening period (17, 18). Although there is evidence of the presence of creatine kinase and other protein fragments at the end of the curing period, little is known about the identity of specific peptide sequences coming from the degradation of this protein in dry-cured ham (19, 20). A CK fragment was identified after characterization of proteolysis during the ripening of semi-dry fermented sausages (21), whereas a total of three CK fragments were isolated and identified during postmortem aging in bovine *Longissimus dorsi* muscle (22).

Information derived from the knowledge of the protein fragments naturally generated during dry-curing of meat products would be very important to better understand both proteolysis and flavor development. Thus, the main objective of the present work was to elucidate some of the changes occurring in the sarcoplasmic fraction of Spanish dry-cured ham, though the identification of a large number of peptides generated from CK degradation.

MATERIALS AND METHODS

Dry-cured ham preparation

Three Spanish dry-cured hams were produced using raw material from 6-months-old pigs (Landrace x Large White). Selected hams were bled and prepared according to traditional procedures: (1) Hams were presalted using a mixture of curing ingredients (salt, nitrate and nitrite) for 30 min to avoid microbiological spoilage. (2) In the salting stage, hams were placed fat side down, entirely buried in salt, and piled up without touching each other in salting chambers for 11 - 12 days. During this stage, curing agents slowly diffuse into the hams. The salting chambers were set at 4 °C and 85-90% relative humidity. (3) After salting, hams were brushed to remove remaining salt from their surfaces and transferred to the postsalting chamber, where a complete salt equalization takes place. The temperature was kept below 4 °C for 50 days and the relative humidity in the chambers was established between 75-85%. (4) During the last stage, corresponding to the ripening period, hams were placed in air-conditioning

chambers and subjected to different time, temperature and relative humidity cycles. Higher temperatures (14 - 20 °C) and lower relative humidity (until 70%) were set during ripening to accelerate the drying process. The total length of the curing process was 9 months.

Dry-cured ham extraction and deproteinization

A total of 50 g of *Biceps femoris* muscle coming from the processed dry-cured hams and previously removed from their extramuscular fat, were minced and homogenized with 100 mL of 0.01 N HCl in a stomacher (IUL Instrument, Barcelona, Spain) for 8 min. The homogenate was centrifuged in the cold (24500 g for 20 min at 4 °C), and after filtering through glass wool, the supernatant was deproteinized by adding 3 volumes of ethanol and maintaining the sample 20 min at 4°C. After that, the sample was centrifuged again (24500 g for 20 min at 4°C), and the supernatant was dried in a rotatory evaporator. The dried deproteinized extract was redissolved in 25 mL of 0.01 N HCl, filtered through a 0.45 µm nylon membrane filter (Millipore, Bedford, MA) and stored at -20 °C until use.

Molecular mass fractionation

A 5 mL aliquot of the deproteinized dry-cured ham extract was subjected to size-exclusion chromatography to fractionate the peptides according to their molecular mass. For this purpose, a Sephadex G25 column (2.5 x 65 cm) (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), previously equilibrated with 0.01 N HCl, was employed. The separation was performed using an isocratic gradient of 0.01 N HCl at a flow rate of 15 mL/h. Fractions of 5 mL were collected using an automatic fraction collector and further monitored by ultraviolet (UV) absorption at 214 nm using an Agilent 8453 UV spectrophotometer (Agilent Technologies, California, USA). Fractions corresponding to a molecular weight between 1000 and 4000 Da were pooled together, dried under vacuum, and redissolved in 5 mL of 0.1% trifluoroacetic acid in water/acetonitrile (95:5, v/v).

Reversed-phase chromatography

A 100 μL aliquot of the redissolved mixture of peptides was injected into an HPLC Agilent 1100 Series system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipped with an autosampler and a diode array detector, which was used in the range 195 - 300 nm.

The separation of peptides was carried out using a 250 x 4.6 mm, 5 μm , Symmetry C18 column from Waters (Milford, MA) at 25 ° C. Mobile phases consisted of solvent A, containing 0.1% trifluoroacetic acid in water, and solvent B, containing 0.05% trifluoroacetic acid in water/acetonitrile (5:95). Both mobile phases A and B were filtered through a 0.45 μm filter and degassed prior to any analytical run. The chromatographic separation consisted of a 5 min isocratic gradient with solvent A, followed by a linear gradient from 0 to 40% of solvent B in 70 min at a flow rate of 1 mL/min. The separation was monitored using a diode array detector at a wavelength of 214 nm and 1 mL fractions were collected and lyophilized separately.

Molecular mass determination by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry

The molecular mass of peptides contained in the reversed-phase HPLC fractions was determined using a Reflex III MALDI-TOF mass spectrometer (MS) (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). By this way, fractions of interest were redissolved in 30 - 50 μL of 0.1% trifluoroacetic acid according to the concentration of peptides expected in each fraction. A total of 1 μL of each fraction was spotted onto an AnchorChip MALDI plate (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) and mixed with 1 μL of 2,5-dihydroxybenzoic acid (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) in 0.1% trifluoroacetic acid/acetonitrile (2:1, v/v). After air-drying, the plate was introduced in the MALDI-TOF MS. The instrument was used in positive-ion reflector mode, and ion acceleration voltage was 20 kV. Spectra were obtained from the average of 300 laser shots. Mass calibration was performed using a peptide calibration standard with code 206195 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) in a mass range between 1000 and 3000 Da. FlexAnalysis 2.4 software (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) was employed for data analysis.

Peptide identification by tandem mass spectrometry

Peptides contained in the fractions obtained after reversed-phase chromatography were further separated and identified by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using an Ultimate/Famos nano LC system (LC Packings, Amsterdam, The Netherlands) and a QSTAR Pulsar *i* hybrid quadrupole-TOF instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA) equipped with a nano-electrospray ion source (Protana, Odense, Denmark).

Fractions previously resuspended for MALDI-TOF analysis, were diluted 4 times using loading buffer (0.1% of formic acid and 2% of acetonitrile in water). A total of 10 μ L of the diluted samples was preconcentrated on a 0.3 x 5 mm, 3 μ m, C18 trap column from LC Packings (Dionex Company, Sunnyvale, CA) at a flow rate of 25 μ L/min and using the loading buffer as mobile phase. After preconcentration, the trap column was automatically switched in-line with a 0.075 x 150 mm, 3 μ m, Dionex C18 PepMap column from LC Packings. Mobile phases consisted of solvent A, containing 0.1% formic acid in water, and solvent B, containing 0.1% formic acid in acetonitrile. Chromatographic conditions were a linear gradient from 95% to 60% solvent A in 70 min at a flow rate of 0.2 μ L/min. The column outlet was directly coupled to a nano-electrospray ion source (Protana, Odense, Denmark) using a 10 μ m PicoTip EMITTER SilicaTip needle (New Objective, Woburn, MA). The positive TOF mass spectra were recorded on the QSTAR instrument using information-dependent acquisition (IDA). A TOF MS survey scan was recorded for mass range m/z 400 - 1600 followed by MS/MS scans of the two most intense peaks. A typical ion spray voltage was in the range of 1.8 - 2.0 kV, using nitrogen as collision gas. Other source parameters and spray position were optimized with a tryptic digest of bovine serum albumin.

Automated spectral processing, peak list generation and database search was performed using both Mascot search v1.6b21 script for Analyst QS 1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) in combination with the Mascot interface (Matrix Science, Inc., Boston, MA) (<http://www.matrixscience.com>) and the ProteinPilot 2.0.1. software (Applied Biosystems, Foster City, CA) with Paragon algorithm.

Identification of the protein origin of peptides was done using NCBI nonredundant protein database. Matches of MS/MS spectra against sequences of the database were verified manually.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and purification of peptides

A deproteinized dry-cured ham extract was submitted to size-exclusion chromatography to fractionate the peptide mixture according to their molecular mass. Fractions corresponding to elution volumes between 125 and 190 mL were pooled together, concentrated, and subjected to reversed-phase chromatography. During this chromatographic separation (**Figure 1**), 1mL fractions were collected and analyzed separately by mass spectrometry.

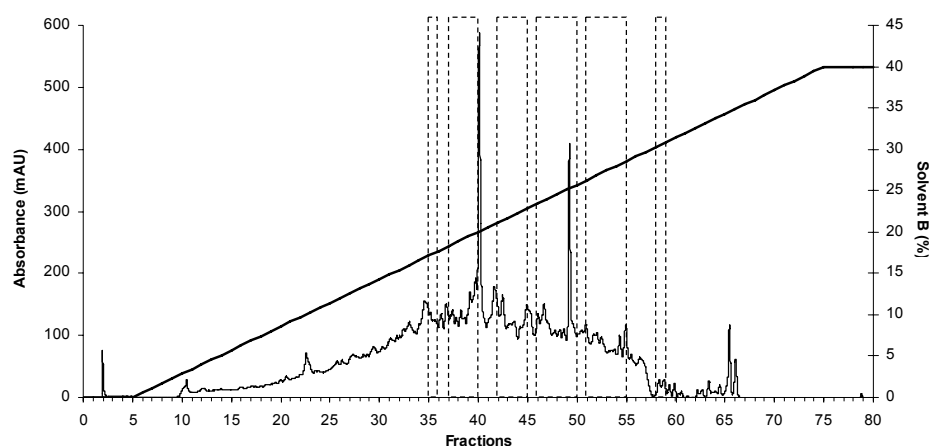


Figure 1. Reversed-phase chromatographic separation of the selected pooled fractions obtained from size-exclusion chromatography. Dotted lines indicate the fractions where CK fragments have been detected. Bold line indicates the solvent gradient of the chromatographic separation.

Peptide sequencing using mass spectrometry

Fractions obtained after reversed-phase chromatography were subjected to MALDI-TOF mass spectrometry to determine peptide molecular masses. By this way, 18

singly charged ions ($M + H^+$) corresponding to CK fragments were obtained. To elucidate the sequence of the peptides, samples were further analyzed by liquid chromatography coupled to a quadrupole time-of-flight mass spectrometer equipped with a nanoelectrospray ionization source (nanoLC-nESI-QTOF MS). The molecular masses of peptides 4-7, 13, 15, 19, 21, 42, 43, 47-49, 51, 53 and 55 were in accordance to the signals previously obtained by MALDI-TOF MS (**Table 1**).

As can be seen in **Table 2**, a total of 58 peptide sequences have been identified. Peptides have been arranged according to their position in the sequence of porcine CK. Thus, peptide 1 has its initial position in Lys¹⁵, whereas peptide 58 finishes in Lys³⁸¹. **Table 2** also shows the reversed-phase fraction (**Figure 1**) from where each peptide has been identified. BLAST sequence similarities searches revealed 100% homology of the whole peptides to the sequence of porcine M-type CK (accession number NP-001123421 in the NCBI nonredundant database), which is shown in **Figure 2**. All spectra were interpreted using the online form of the Mascot program, the Paragon algorithm, and also manually. **Figure 3** shows MS/MS spectrum corresponding to peptide 36 as example of a mass spectrometric fragmentation.

Peptides 6 to 12, share the common sequence VIQTGVDNPGHPF (peptide 12). However, at the N-terminal site, these peptides show important differences. Peptide 6 contains an additional leucine in this position with respect to peptide 7, whereas peptides 8, 9, 10 and 11 show a consecutive loss of the amino acids threonine, leucine and two aspartic acids, respectively. A similar profile is also observed in peptides 13 to 18. This group shares the common sequence DVIQTGVDNPGHP (peptide 18). With regard to the N-terminal side of this group of peptides, peptides 5, 12 and 16, and 6, 13 and 17, show the same profile.

Methionine is a common amino acid in the first and last section of the CK sequence (**Table 2**) and all the peptides identified in these sections present at least an oxidation of this amino acid. In fact, peptide 49 has been identified without modification but also with one, two and three methionine oxidations (**Table 1**). On the other hand, peptides 50, 51 and 52 show just two methionine oxidations whereas peptides 5, 53, 55, 56 and 57 present one. Peptide 58 was identified in two ways, with a methionine oxidation and also presenting an additional modification of glutamic acid to

pyroglutamic acid in its N-terminal site. Other modifications are glutamine (peptide 33) and asparagine deamidation (peptides 27, 29, 30, 31 and 45), and aspartic acid dehydration in peptides 31 and 40.

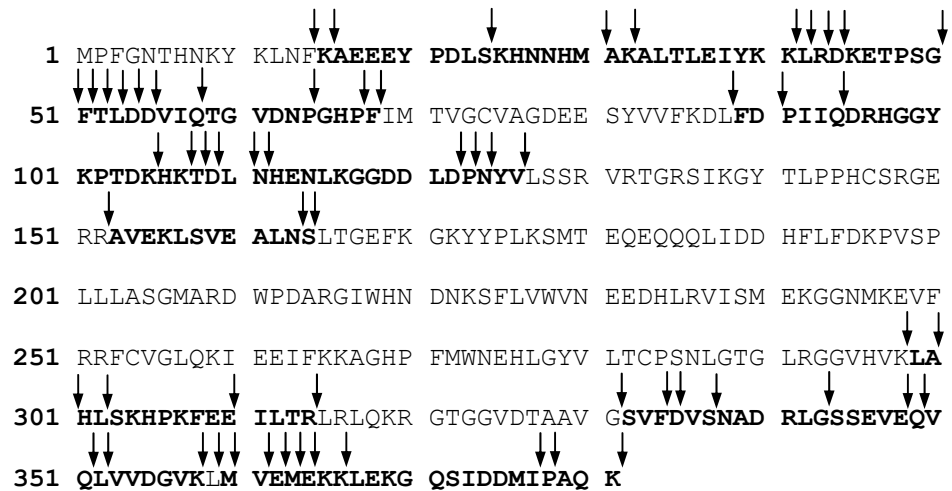


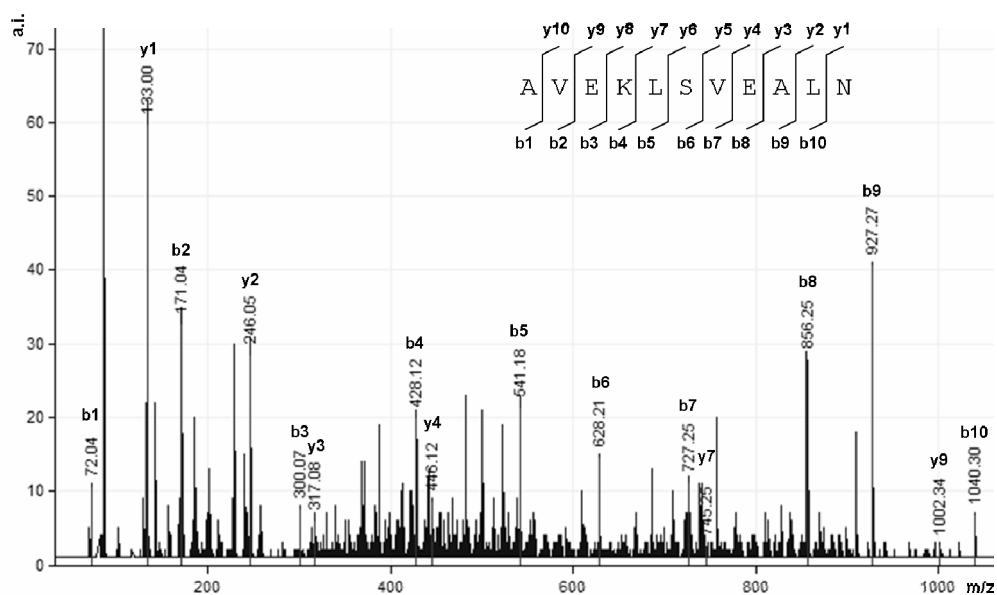
Figure 2. Primary sequence of porcine CK (NCBI nonredundant database accession number NP-001123421). The same sequence also corresponds to the entry KCRM_PIG in UniProtKB/Swiss-Prot protein database. Cleavage sites of the peptides identified in the present work are indicated with black arrows.

As shown in **Table 1**, peptides have been sequenced matching the MS/MS spectra of 2, 3, 4, and 6 times charged ions. In this way, 27 peptides were sequenced from double-charged ions, whereas nineteen and thirteen peptides were sequenced from 3 and 4 times charged ions, respectively. Four peptides containing a high proportion of basic amino acids were sequenced from 6 times charged ions (peptides 1-3 and 32). **Table 1** also indicates the exact position of the identified peptides within the CK sequence, as well as their observed and calculated masses.

The 58 peptides identified in this study cover around the 44% of the total sequence of CK protein and a total of 27 peptides have been identified in at least two of the three studied hams.

Sarcoplasmic proteins correspond to approximately 30% of the total muscle protein and are generally more susceptible to denaturation than myofibrillar proteins (23).

Peptide 36 (586.71²⁺)



Peptide 36 (586.71 ²⁺)				
	b	Sequence	y	
1	72.04	A		11
2	171.04	V	1101.61	10
3	300.07	E	1002.34	9
4	428.12	K	873.50	8
5	541.18	L	745.25	7
6	628.21	S	632.32	6
7	727.25	V	545.29	5
8	856.25	E	446.12	4
9	927.27	A	317.08	3
10	1040.30	L	246.05	2
11		N	133.00	1

Figure 3. MS/MS spectrum of ion 586.71²⁺ (peptide 36). The peptide sequence matching the product ion spectrum is shown in capital letters, together with observed *b* and *y* ions. The spectrum is presented with its corresponding table showing the ions matched by MASCOT in bold letters.

Structural studies of rabbit and chicken CK based on the identification of the major products obtained after digestion by trypsin, chymotrypsin and endoproteinase Glu-C, showed that the C-terminal region (positions 215 to 380) was more resistant to

digestion than the N-terminal region (positions 1 to 133), whereas the central tract of 81 residues (positions 134 to 214), was particularly sensitive to digestion by all three peptidases (24). Contrary to that, most CK fragments identified in this study correspond to the C- and N-terminal portions of the protein (**Figure 2**). In the present study, a total of 34 and 22 peptides from C- and N-terminal sections, respectively, have been identified, whereas only 2 of the total 58 CK fragments sequenced in this study come from the central section of the CK sequence. A possible explanation would be an increased proteolysis suffered by the central area of CK during ripening, which could have generated fragments smaller than 1000 Da, and thus out of the peptide mass range studied in the present work.

Muscle sarcoplasmic proteins constitute relevant substrates for proteolysis occurring during the processing of dry-cured ham. The main enzymes responsible for the degradation of these proteins during this period are muscle endopeptidases and certain groups of exopeptidases.

Cathepsins B (EC 3.4.22.1), H (EC 3.4.22.16) and L (EC 3.4.22.15) have been reported to be stable during dry-cured ham processing, showing activity even after 15 months of processing (7, 25). Several studies relate the action of cathepsins with the disappearance of CK. In fact, sea bass muscle sarcoplasmic extract was incubated with a mixture of cathepsins L, B and D (EC 3.4.23.5), showing the degradation of the CK-aldolase doublet (26). Studies carried out with these enzymes separately established that both cathepsins B and L were especially active against CK, whereas cathepsin D was not able to degrade any sarcoplasmic protein (16). However, calpains (EC 3.4.22.17) might participate in the postmortem muscle proteolysis only during the first stages of curing processes because both the high salt content and low pH values found in subsequent steps would completely inhibit their activity. In this way, it has been summarized that CK is an *in vitro* substrate of calpain, suggesting that m-calpain might regulate the activity of this protein as well as its postmortem degradation (27).

Table 1. CK fragments identified in *Biceps femoris* muscle of Spanish dry-cured ham.

Peptide	Observed ^a	Charged State	Calculated ^b	Score ^c		Position ^d	MALDI-TOF ^e	LC-MS/MS ^e	Identified ^f
				Mascot	Paragon				
1	698.36	(6+)	4183.14		14	15-50		X	X
2	676.86	(6+)	4055.04		14	16-50		X	X
3	504.61	(6+)	3021.62		14	25-50		X	X
4	687.99	(3+)	2061.15	29		33-50	X	X	X
5*	539.94	(4+)	2155.99	42		15-32	X	X	X
6	739.62	(4+)	2954.46	54		42-68	X	X	X
7	711.35	(4+)	2841.36	32		43-68	X	X	X
8	912.85	(2+)	1823.87	34		52-68	X	X	X
9	862.3	(2+)	1722.82	33		53-68	X	X	X
10	805.77	(2+)	1609.73	54		54-68	X	X	X
11	748.25	(2+)	1494.71	39		55-68	X	X	X
12	690.71	(2+)	1379.68	49		56-68	X	X	X
13	847.05	(3+)	2538.19	49		44-67	X	X	X
14	808.71	(3+)	2423.16	63		45-67	X	X	X
15	839.41	(2+)	1676.8	56		52-67	X	X	X
16	788.79	(2+)	1575.75	61		53-67	X	X	X
17	732.25	(2+)	1462.67	52		54-67	X	X	X
18	674.84	(2+)	1347.64	55		55-67	X	X	X
19	693.83	(2+)	1385.67	50		52-64	X	X	X
20	643.24	(2+)	1284.62	47		53-64	X	X	X
21	832.89	(2+)	1663.79	44		44-58	X	X	X
22	516.26	(3+)	1545.96		13	31-43	X	X	X
23	599.24	(4+)	2393.12	41		106-126	X	X	X
24	589.26	(3+)	1764.79		19	109-124	X	X	X
25	584.89	(3+)	1751.8	61		108-123	X	X	X
26	551.57	(3+)	1650.75	72		109-123	X	X	X
27*	712.72	(2+)	1423.62		14	111-123	X	X	X
28	655.23	(2+)	1308.59		14	112-123	X	X	X
29*	552.84	(3+)	1655.73		16	108-122	X	X	X
30*	519.25	(3+)	1554.68		15	109-122	X	X	X
31*	655.21	(2+)	1308.56		14	111-122	X	X	X

32	434.73	(6+)	2602.3	23	95-115	X
33 ^o	617.82	(4+)	2468.21	16	89-109	X
34	552.28	(4+)	2205.13	14	91-109	X
35	630.2	(2+)	1258.68	44	153-164	X
36	586.71	(2+)	1171.64	69	153-163	X
37	495.61	(3+)	1483.81	17	303-314	X
38	479.23	(3+)	1434.76	37	299-310	X
39	417.82	(3+)	1250.64	14	301-310	X
40 ^v	842.41	(3+)	2524.28	13	335-358	X
41	808.32	(2+)	1614.85	79	344-358	X
42	973.36	(2+)	1944.94	46	335-352	X
43	917.27	(2+)	1831.85	68	335-351	X
44	859.31	(2+)	1716.83	62	336-351	X
45 ^h	766.77	(2+)	1531.71	15	338-351	X
46	969.94	(2+)	1937.9	54	332-349	X
47	803.27	(2+)	1604.73	61	335-349	X
48	739.26	(2+)	1476.67	40	335-348	X
49	637.75	(4+)	2547.27	46	360-381	X
49*	641.75	(4+)	2563.27	25	360-381	X
49***	645.8	(4+)	2579.26	42	360-381	X
49****	649.75	(4+)	2595.26	45	360-381	X
50**	612.94	(4+)	2448.22	48	361-381	X
51**	588.22	(4+)	2349.15	41	362-381	X
52**	555.97	(4+)	2220.11	49	363-381	X
53	558.23	(3+)	1671.85	46	367-381	X
53*	563.57	(3+)	1687.84	45	367-381	X
54	697.36	(3+)	2089.04	15	361-378	X
55*	626.58	(3+)	1876.93	36	363-378	X
56*	582.88	(3+)	1745.89	44	364-378	X
57*	539.94	(3+)	1616.84	38	365-378	X
58 ^A	808.33	(2+)	1614.83	36	364-377	X
58** ^A	816.4	(2+)	1630.82	36	364-377	X

^a Molecular ion mass observed in the LC-MS/MS system calculated in Daltons. ^b Calculated relative molecular mass (Da) of the matched peptide. ^c Scores obtained in Mascot (absolute scores) and Paragon (relative scores) using NCBInr database. Results present extensive homology (p<0.05). ^d Position of the peptides inside the CK sequence identified for porcine specie (NCBI accession number NP_001123421). ^e Peptides marked with an 'X' were observed using the corresponding mass spectrometric technique. ^f Peptides identified in at least two of the three hams. ^g Peptides presenting an asparagine deamidation; ^h aspartic acid dehydration; ⁱ glutamine deamidation; *one methionine oxidation, ** two methionine oxidations, *** three methionine oxidations and ^A a modification of glutamic acid to pyroglutamic in its N-terminal site.

Cathepsins B and L, together with m-calpain, seem to be the main endopeptidases responsible for the hydrolysis of muscle CK during the first stages of dry-curing. Observing the results obtained in this study, peptides 4 and 5 (**Table 2**) appear consecutively in the sequence of CK. Peptide 5 expands from position 15 to position 32, whereas peptide 4 expands from position 33 to 50. Observing **Table 2**, it seems that peptide 1 could be the origin of peptides 4 and 5. Thus, it would be possible that any of these endopeptidases were responsible for the cleavage suffered between positions 32 - 33, although more studies would be necessary to assign the contribution of these enzymes to the generation of these peptides.

Amino peptidase activity has been detected in dry-cured ham even after more than 12 months of processing. This procedure has been associated with the remarkable increase in free amino acid concentration observed during dry-cured ham processing. Glutamic and aspartic acids, alanine, leucine, lysine, valine and threonine appear to be some of the amino acids experiencing larger increases (7, 28, 29).

CK peptides identified in this study constitute an important evidence of the contribution of aminopeptidases to the remarkable increase in free amino acids observed during dry-cured ham processing. As can be seen in **Table 2**, peptides 8, 15, 19, 25 and 29 show the loss of threonine at N-terminal site, whereas peptides 10, 11, 13, 17, 26, 30 and 43 show the loss of aspartic acid. **Table 2** also illustrates the degradation of CK in the release of free lysine, leucine, asparagine, methionine, valine and glutamic acid from the N-terminal end. Peptides 6, 9 and 16 show the loss of a N-terminal leucine, whereas it is possible to appreciate the loss of methionine in peptides 49 and 55, glutamic acid in peptides 51 and 56, lysine in peptide 1, valine in peptide 50 and asparagine in peptide 27. Peptides 8 to 12, 15 to 18, 49 to 52 and 55 to 57 show the sequential losses of N-terminal amino acids, proving the important role of muscle aminopeptidases.

It has been reported that alanyl aminopeptidase (AAP; EC 3.4.11.14) is the most relevant aminopeptidase found in porcine skeletal muscle. It accounts for as much as 83% of the total aminopeptidase activity, showing a broad substrate specificity hydrolyzing aromatic, aliphatic, and basic amino acids from the N-terminal end of

peptides. This enzyme hydrolyzes unblocked N-terminal Ala residues as well as Leu, Arg, Phe, Tyr and Met.

Table 2. Sequences and fractions of the CK peptides identified in Spanish dry-cured ham after separation by reversed-phase chromatography.

Peptide	Identified sequence	RP Fraction*
1	¹⁵ KAE E E Y P D L S K H N N H M A K A L T L E I Y K K L R D K E T P S G ⁵⁰	55
2	¹⁶ A E E E Y P D L S K H N N H M A K A L T L E I Y K K L R D K E T P S G	55
3	²⁵ K H N N H M A K A L T L E I Y K K L R D K E T P S G	53
4	³³ A L T L E I Y K K L R D K E T P S G	52
5	¹⁵ K A E E E Y P D L S K H N N H M A K ³²	36
6	⁴² L R D K E T P S G F T L D D V I Q T G V D N P G H P F ⁶⁸	59
7	⁴³ R D K E T P S G F T L D D V I Q T G V D N P G H P F	59
8	⁵² T L D D V I Q T G V D N P G H P F	54
9	⁵³ L D D V I Q T G V D N P G H P F	52
10	⁵⁴ D D V I Q T G V D N P G H P F	48
11	⁵⁵ D V I Q T G V D N P G H P F	48
12	⁵⁶ V I Q T G V D N P G H P F	45
13	⁴⁴ D K E T P S G F T L D D V I Q T G V D N P G H P F ⁶⁷	55
14	⁴⁵ K E T P S G F T L D D V I Q T G V D N P G H P	55
15	⁵² T L D D V I Q T G V D N P G H P	47
16	⁵³ L D D V I Q T G V D N P G H P	44
17	⁵⁴ D D V I Q T G V D N P G H P	39
18	⁵⁵ D V I Q T G V D N P G H P	38
19	⁵² T L D D V I Q T G V D N P ⁶⁴	48
20	⁵³ L D D V I Q T G V D N P	43
21	⁴⁴ D K E T P S G F T L D D V I Q ⁵⁸	55
22	³¹ A K A L T L E I Y K K L R ⁴³	44
23	¹⁰⁶ H K T D L N H E N L K G G D D L D P N Y V ¹²⁶	43
24	¹⁰⁹ D L N H E N L K G G D D L D P N ¹²⁴	47
25	¹⁰⁸ T D L N H E N L K G G D D L D P ¹²³	40
26	¹⁰⁹ D L N H E N L K G G D D L D P	40
27	¹¹¹ N H E N L K G G D D L D P	36
28	¹¹² H E N L K G G D D L D P	36
29	¹⁰⁸ T D L N H E N L K G G D D L D ¹²²	38
30	¹⁰⁹ D L N H E N L K G G D D L D	47
31	¹¹¹ N H E N L K G G D D L D	36
32	⁹⁵ D R H G G Y K P T D K H K T D L N H E N L ¹¹⁵	40
33	⁸⁹ F D P I I Q D R H G G Y K P T D K H K T D ¹⁰⁹	52
34	⁹¹ P I I Q D R H G G Y K P T D K H K T D	52
35	¹⁵³ A V E K L S V E A L N S ¹⁶⁴	45
36	A V E K L S V E A L N ¹⁶³	45
37	³⁰³ S K H P K F E E I L T R ³¹⁴	48
38	²⁹⁹ L A H L S K H P K F E E ³¹⁰	40
39	³⁰¹ H L S K H P K F E E	36
40	³³⁵ D V S N A D R L G S S E V E Q V Q L V V D G V K ³⁵⁸	55
41	³⁴⁴ S S E V E Q V Q L V V D G V K	53
42	³³⁵ D V S N A D R L G S S E V E Q V Q L ³⁵²	49

43	DVSNADRLGSSEVEVQ ³⁵¹	40
44	³³⁶ VSNADRLGSSEVEVQ	38
45	³³⁸ NADRLGSSEVEVQ	36
46	³³² SVFDVSNADRLGSSEVEVQ ³⁴⁹	48
47	³³⁵ DVSNADRLGSSEVEVQ	36
48	DVSNADRLGSSEVE ³⁴⁸	36
49	³⁶⁰ MVEMEKKLEKQSIIDMIPAQK ³⁸¹	44,48
50	³⁶¹ VEMEKKLEKQSIIDMIPAQK	45
51	³⁶² EMEKKLEKQSIIDMIPAQK	44
52	³⁶³ MEKKLEKQSIIDMIPAQK	43
53	³⁶⁷ LEKQSIIDMIPAQK	44
54	³⁶¹ VEMEKKLEKQSIIDMIP ³⁷⁸	50
55	³⁶³ MEKKLEKQSIIDMIP	50
56	³⁶⁴ EKKLEKQSIIDMIP	49
57	³⁶⁵ KKLEKQSIIDMIP	48
58	³⁶⁴ EKKLEKQSIIDMI ³⁷⁷	48,49

* Fractions corresponding to the reversed-phase chromatogram (Figure 2).

Arginyl aminopeptidase (RAP; EC 3.4.11.6), also named aminopeptidase B, is the second most important aminopeptidase existing in skeletal muscle, showing substrate specificity against basic aminoacyl bonds (30). Alanyl and arginyl aminopeptidase, which show good stability during dry-curing and have an optimal neutral pH, appear to be the main contributors to the generation of free amino acids during the processing of dry-cured ham (6). Two other aminopeptidases existing in skeletal muscle are leucyl (LAP; EC 3.4.11.1) and pyroglutamyl aminopeptidases (PGAP; EC 3.4.19.3). LAP catalyzes the release of leucine and methionine as well as other hydrophobic amino acids such as valine from the N-terminus of polypeptides and, despite its optimum basic pH, it keeps some of the initial activity at the pH found at the end of the curing process (pH 6). PGAP activity is negligible at about 40 days of processing. However, due to its high specificity towards pyroglutamic acid, it could contribute to the increase in free glutamic acid because of the transformation from pyroglutamic to glutamic acid. Methionyl aminopeptidase (MAP; EC 3.4.11.18), whose activity is enhanced in the presence of NaCl, can also generate free amino acids in cured pork meat products. Methionyl aminopeptidase has a broad substrate specificity, exhibiting maximal activity against Met and good activity against Leu (31). Recently, a novel glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase A) has been purified from chicken meat (32). This enzyme liberates glutamic or aspartic acid from N-

terminus of peptides. However, no information related to its stability during dry-cured processing has been reported to date.

Taking into account all the experimental data obtained in this study, alanyl aminopeptidase could be one of the enzymes responsible for the loss of N-terminal leucine and methionine in peptides 6, 9, 16, 49 and 55 (**Table 2**). Leucyl aminopeptidase could be responsible for the N-terminal hydrolysis in these peptides as well as for the threonine and valine losses in peptides 8, 15, 19, 25, 29 and 50, but this possibility seems to be less probable due to its low activity in the late steps of the dry-curing. On the other hand, methionyl aminopeptidase could also be responsible for the loss of leucine and methionine in the mentioned peptides.

Carboxypeptidases constitute another group of exopeptidases responsible for the hydrolysis of amino acids from the C-terminal site of peptides. The most studied carboxypeptidases are tissue carboxypeptidases A and B and lysosomal carboxypeptidases A and B, but only carboxypeptidases A have been previously studied in skeletal muscle (33, 34). Tissue carboxypeptidase A (EC 3.4.17.1) is most active on hydrophobic C-terminal residues such as phenylalanine and leucine although it is unable to hydrolyze proline. At neutral pH, it can also hydrolyze threonine and glutamine. Lysosomal carboxypeptidase A (EC 3.4.16.1) has also preference for substrates with hydrophobic amino acid residues at their C-terminal site, being phenylalanine and leucine the most preferred substrates at pH 5.0 - 5.2. Although little is known about the effect of curing agents on the activity of these enzymes and their stability during the ripening period, it seems that these enzymes could be the responsible for the C-terminal loss of phenylalanine in peptides 6 to 12, leucine in peptide 42, glutamine in peptides 46 and 47 (tissue carboxypeptidase A) and proline in peptides 54 - 57 (lysosomal carboxypeptidase A).

In conclusion, 58 CK fragments have been found for the first time in Spanish dry-cured ham, proving the intense proteolysis suffered by this protein during the processing of this product. Observing the obtained sequences, there are evidence of the contribution of aminopeptidases and carboxypeptidases to the generation of peptides and the release of free amino acids during dry-cured ham processing. The generated free amino acids will contribute, together with other compounds, to the

development of the characteristic flavour in Spanish dry-cured ham. Further studies dealing with the enzymatic action that takes place during dry-curing would be needed to provide a better understanding of muscle proteolysis and flavor generation in these types of products.

ACKNOWLEDGMENTS

Food Standards Agency project Q 01R006 (U.K.), FPU scholarship from Ministerio de Educación y Ciencia (Spain) to L.M., Grant AGL2007-65379-C02-01/ALI from Ministry of Education and Science (Madrid, Spain) and FEDER are fully acknowledged. We give special thanks to the Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) Proteomics core facility (Proteored member), Valencia, Spain, for its valuable contribution in the ProteinPilot data analysis.

LITERATURE CITED

1. Di Luccia, A.; Picariello, G.; Cacace, G.; Scalonì, A.; Faccia, M.; Liuzzi, V.; Alviti, G.; Musso, S. S. Proteomic analysis of water soluble and myofibrillar protein changes occurring in dry-cured hams. *Meat Sci.* **2005**, *69* (3), 479-491.
2. Toldrà, F.; Flores, M. The role of muscle proteases and lipases in flavor development during the processing of dry-cured ham. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1998**, *38* (4), 331-352.
3. Lametsch, R.; Karlsson, A.; Rosenvold, K.; Andersen, H. J.; Roepstorff, P.; Bendixen, E. Postmortem proteome changes of porcine muscle related to tenderness. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51* (24), 6992-6997.
4. Nagaraj, N. S.; Santhanam, K. Effects of muscle proteases, endogenous protease inhibitors and myofibril fragmentation on postmortem aging of goat meat. *J. Food Biochem.* **2006**, *30* (3), 269-291.
5. Sentandreu, M. A.; Coulis, G.; Ouali, A. Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends Food Sci. Technol.* **2002**, *13* (12), 400-421.
6. Toldrà, F.; Aristoy, M. C.; Flores, M. Contribution of muscle aminopeptidases to flavor development in dry-cured ham. *Food Res. Int.* **2000**, *33* (3-4), 181-185.

7. Toldrá, F.; Flores, M.; Sanz, Y. Dry-cured ham flavour: Enzymatic generation and process influence. *Food Chem.* **1997**, *59* (4), 523-530.
8. Toldrá, F. Proteolysis and lipolysis in flavour development of dry-cured meat products. *Meat Sci.* **1998**, *49*, S101-S110.
9. Tuomola, M.; Vainio, J.; Lovgren, T. Rapid time-resolved immunofluorometric assay for the measurement of creatine kinase in serum and whole blood samples. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50* (23), 6659-6662.
10. Fábrega, E.; Manteca, X.; Font, J.; Gispert, M.; Carrión, D.; Velarde, A.; Ruiz-de-la-Torre, J. L.; Diestre, A. Effects of halothane gene and pre-slaughter treatment on meat quality and welfare from two pig crosses. *Meat Sci.* **2002**, *62* (4), 463-472.
11. Daroit, D. J.; Brandelli, A. Implications of skeletal muscle creatine kinase to meat quality. *J. Anim. Feed Sci.* **2008**, *17* (3), 285-294.
12. van de Wiel, D. F. M.; Zhang, W. L. Identification of pork quality parameters by proteomics. *Meat Sci.* **2007**, *77* (1), 46-54.
13. Ryu, Y. C.; Choi, Y. M.; Kim, B. C. Prediction for quality traits of porcine Longissimus dorsi muscle using histochemical parameters. *Food Sci. Biotechnol.* **2005**, *14* (5), 628-633.
14. Sayd, T.; Morzel, M.; Chambon, C.; Franck, M.; Figwer, P.; Larzul, C.; Le Roy, P.; Monin, G.; Cherel, P.; Laville, E. Proteome analysis of the sarcoplasmic fraction of pig *Semimembranosus* muscle: Implications on meat color development. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (7), 2732-2737.
15. Toyohara, M.; Murata, M.; Ando, M.; Kubota, S.; Sakaguchi, M.; Toyohara, H. Texture changes associated with insolubilization of sarcoplasmic proteins curing salt-vinegar curing of fish. *J. Food Sci.* **1999**, *64* (5), 804-807.
16. Godiksen, H.; Morzel, M.; Hyldig, G.; Jessen, F. Contribution of cathepsins B, L and D to muscle protein profiles correlated with texture in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Chem.* **2009**, *113* (4), 889-896.
17. Picariello, G.; De Martino, A.; Mamone, G.; Ferranti, P.; Addeo, F.; Faccia, M.; SpagnaMusso, S.; Di Luccia, A. Proteomic study of muscle sarcoplasmic proteins using AUT-PAGE/SDS-PAGE as two-dimensional gel electrophoresis. *J. Chromatogr. B-Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2006**, *833* (1), 101-108.
18. Pérez, A. S.; Ruiz, A. G.; Contreras, C. M.; Ibáñez, M. D. C. Separation and identification of sarcoplasmic proteins from hams from three white pig crosses containing Duroc. *Eur. Food Res. Technol.* **2003**, *216* (3), 193-198.

19. Sentandreu, M. A.; Armenteros, M.; Calvete, J. J.; Ouali, A.; Aristoy, M. C.; Toldrá, F. Proteomic identification of actin-derived oligopeptides in dry-cured ham. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55* (9), 3613-3619.
20. Sforza, S.; Boni, M.; Ruozi, R.; Virgili, R.; Marchelli, R. Identification and significance of the N-terminal part of swine pyruvate kinase in aged Parma hams. *Meat Sci.* **2003**, *63* (1), 57-61.
21. Hughes, M. C.; Kerry, J. P.; Arendt, E. K.; Kenneally, P. M.; McSweeney, P. L. H.; O'Neill, E. E. Characterization of proteolysis during the ripening of semi-dry fermented sausages. *Meat Sci.* **2002**, *62* (2), 205-216.
22. Stoeva, S.; Byrne, C. E.; Mullen, A. M.; Troy, D. J.; Voelter, W. Isolation and identification of proteolytic fragments from TCA soluble extracts of bovine *M-longissimus dorsi*. *Food Chem.* **2000**, *69* (4), 365-370.
23. Farouk, M. M.; Wieliczko, K.; Lim, R.; Turnwald, S.; MacDonald, G. A. Cooked sausage batter cohesiveness as affected by sarcoplasmic proteins. *Meat Sci.* **2002**, *61* (1), 85-90.
24. Webb, T.; Jackson, P. J.; Morris, G. E. Protease digestion studies of an equilibrium intermediate in the unfolding of creatine kinase. *Biochem. J.* **1997**, *321*, 83-88.
25. Toldrá, F.; Rico, E.; Flores, J. Cathepsin B, D, H and L Activities in the processing of dry-cured ham. *J. Sci. Food Agric.* **1993**, *62* (2), 157-161.
26. Delbarre-Ladrat, C.; Verrez-Bagnis, V.; Noël, J.; Fleurence, J. Relative contribution of calpain and cathepsins to protein degradation in muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). *Food Chem.* **2004**, *88* (3), 389-395.
27. Purintrapiban, J.; Wang, M. C.; Forsberg, N. E. Identification of glycogen phosphorylase and creatine kinase as calpain substrates in skeletal muscle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2001**, *33* (5), 531-540.
28. Rodríguez-Nuñez, E.; Aristoy, M. C.; Toldrá, F. Peptide generation in the processing of dry-cured ham. *Food Chem.* **1995**, *53* (2), 187-190.
29. Sentandreu, M. A.; Stoeva, S.; Aristoy, M. C.; Laib, K.; Voelter, W.; Toldrá, F. Identification of small peptides generated in Spanish dry-cured ham. *J. Food Sci.* **2003**, *68* (1), 64-69.
30. Flores, M.; Aristoy, M. C.; Toldrá, F. HPLC Purification and characterization of porcine muscle aminopeptidase-B. *Biochimie* **1993**, *75* (10), 861-867.
31. Flores, M.; Marina, M.; Toldrá, F. Purification and characterization of a soluble methionyl aminopeptidase from porcine skeletal muscle. *Meat Sci.* **2000**, *56* (3), 247-254.

32. Maehashi, K.; Abe, T.; Yasuhara, T.; Yamasato, K.; Yamamoto, Y.; Udaka, S. Purification and characterization of a novel glutamyl aminopeptidase from chicken meat. *Meat Sci.* **2003**, *64* (2), 163-168.
33. Bodwell, J. E.; Meyer, W. L. Purification and characterization of carboxypeptidase-A from rat skeletal-muscle. *Biochem.* **1981**, *20* (10), 2767-2777.
34. Iodice, A. A.; Leong, V.; Weinstoc, I. M. Separation of cathepsins A and D of skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* **1966**, *117* (3), 477.

Capítulo 7

**Identificación de péptidos pequeños derivados de la Troponina T en jamón
curado**



www.elsevier.com/locate/foodchem

Identification of Small Troponin T Peptides Generated in Dry-Cured Ham

Leticia Mora, Miguel Angel Sentandreu and Fidel Toldrá

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

Sent for review May 20, 2009.

Abstract

Troponin T (TnT) is a myofibrillar protein present in striated muscle that develops important structural and regulatory functions. This protein is easily degraded during post-mortem ageing but the details of the TnT hydrolysis occurring during much longer processes like the dry-cured processing as well as the specific sequences of the generated fragments still remain undetermined. In the present study, the isolation and identification of 27 peptides generated from TnT during dry-cured processing are reported for the first time. This study has been developed using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF) and it evidences the extensive degradation of TnT occurred during the processing of dry-cured ham. Some of the cleavage sites corresponding to these sequenced fragments confirm the sites reported by other authors both *in vitro* and during post-mortem ageing of meat.

Keywords: Dry-Cured ham; proteolysis; proteomics; mass spectrometry; peptides, troponin T.

INTRODUCTION

Troponin T (TnT) is present in striated muscle of vertebrates and invertebrates and it develops an important regulatory and structural role in thin filaments (Perry, 1998). In skeletal muscle, the contractile process is regulated by Ca^{2+} through the troponin complex in the thin filament. Troponin complex consists of three subunits: troponin C (TnC), the calcium-binding subunit; troponin I (TnI), the inhibitory subunit; and troponin T (TnT), the tropomyosin-binding subunit with which the C-terminal region of tropomyosin is known to interact, being responsible for the location of the troponin complex along the thin filament of the myofibril (Pearson & Young, 2008). In addition to this structural role, TnT has the function of transforming the TnI-TnC complex into a system where its inhibitory activity becomes sensitive to calcium ions. In fact, fibers containing slow troponin have higher Ca^{2+} sensitivity than those containing fast troponin (Perry, 1998).

It has been widely studied that TnT is a myofibrillar protein easily degraded during post-mortem aging of animal muscles (Kitamura, Muroya, Nakajima, Chikuni & Nishimura, 2006). In this way, a 30 kDa polypeptide is detected in post-mortem muscles at about the same time that TnT content is decreasing (Olson, Parrish, Dayton & Goll, 1977; Ho, Stromer & Robson, 1994). Degradation of TnT has been positively correlated with the post-mortem tenderization of beef (Olson, Parrish, Dayton & Goll, 1977), and peptides generated by TnT degradation have been found to contribute to the improvement of beef taste (Nishimura, Rhue, Okitani & Kato, 1988) Rhue, Okitani and Kato, 1988) and to be useful as conditioning markers in pork loins (Okumura, Yamada & Nishimura, 2003). Meat quality has also been related to TnT degradation. In this way, Laville et al. (2005) showed that troponin T was less proteolysed in defective *semimembranosus* muscles, obtaining a higher quantity of whole TnT in PSE zones. In relation to this, also Hwang, Park, Kim, Cho and Lee (2005) established a negative correlation of troponin T slow type isoform with drip loss, suggesting that a larger degradation of this protein resulted in a higher drip loss. The evolution of myofibrillar protein hydrolysis during dry-cured processing has also been studied by many authors and changes in structural proteins like troponin T have

been observed along the ripening period (Toldrá, Rico & Flores, 1993; Larrea, Hernando, Quiles, Lluch & Pérez-Munuera, 2006). However, despite the importance of TnT degradation in various aspects of meat and its derived products, the details of the degradation and its effects on quality remain poorly understood. In dry-cured ham processing, both the specific muscle enzymes responsible for the TnT fragmentation and its specific cleavage sites are still unknown, mainly due to the lack of information regarding the peptide sequences derived from TnT degradation existing in dry-cured ham. Changes observed in the structural proteins help to understand the evolution of texture and perception of the typical flavour of dry-cured ham.

In the present work, a proteomic analysis has been used for the identification of the TnT fragments generated in dry-cured ham as a way to improve the knowledge about the post-mortem proteolysis occurring during dry-cured ham processing and the potential peptidases responsible for this action.

MATERIALS AND METHODS

Dry-cured ham preparation

Three Spanish dry-cured hams were produced using raw material from 6-months old pigs (Landrace x Large White). Selected hams were processed according to traditional procedures based on: pre-salting using a mixture of curing ingredients (salt, nitrate and nitrite) for 30 min; salting in chambers for 11-12 days set at 4 °C and 85-90% relative humidity; resting for 50 days at a temperature below 4 °C and relative humidity between 75-85 % and ripening in air-conditioning chambers, where the hams were subjected to different time, temperature and relative humidity cycles. Higher temperatures (14-20 °C) and lower relative humidity (until 70%) were set during ripening in order to accelerate the drying process. The total length of the curing process was 9 months.

Extraction of peptides and deproteinisation

Fifty grams of muscle coming from the 9 months processed dry-cured hams were depicted of extramuscular fat, minced and homogenised with 100 mL of 0.01N HCl in

a stomacher (Seward Laboratory) for 8 min. The homogenate was centrifuged in the cold (24500 g for 20 min at 4 °C) and, after filtering through glass wool, the supernatant was deproteinized by adding 3 volumes of ethanol and maintaining the sample 20 min at 4 °C. After that, the sample was centrifuged again (24500 g for 20 min at 4 °C) and the supernatant was dried in a rotatory evaporator. The dried deproteinized extract was redissolved in 25 mL of 0.01N HCl, filtered through a 0.45µm nylon membrane filter (Millipore, Bedford, MA) and stored at -20 °C until use.

Size-exclusion chromatography

A 5 mL aliquot of the deproteinized dry-cured ham extract was subjected to size-exclusion chromatography in order to fractionate the peptides according to their molecular mass. For this purpose, a Sephadex G25 column (2.5 x 65 cm, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), previously equilibrated with 0.01N HCl, was employed. The separation was performed using an isocratic gradient of 0.01N HCl at a flow rate of 15 mL/h. Fractions of 5 mL were collected using an automatic fraction collector and further monitored by ultraviolet (UV) absorption at 214 nm (Agilent 8453 UV spectrophotometer, Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Fractions corresponding to a molecular weight between 1500 and 4000 Da were pooled together, dried under vacuum and redissolved in 5 mL of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water/acetonitrile (H₂O:ACN, 95:5, v/v).

Reversed-phase chromatography

A 100 µL aliquot of the redissolved mixture of peptides was injected into an HPLC Agilent 1100 Series system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipped with an autosampler and a diode array detector, which was used in the range 195-300 nm. The separation of peptides was carried out using a Symmetry® C18 column (250 x 4.6 mm, 5 µm particle size) from Waters (Milford, MA, USA) at 25 °C. Mobile phases consisted of solvent A, containing 0.1% TFA in water and solvent B, containing 0.05% TFA in water/acetonitrile (5:95). Both mobile phases A and B were filtered through a 0.45 µm filter and degassed prior to any analytical run. The chromatographic separation consisted of a 5 min isocratic gradient with solvent A, followed by a linear

gradient from 0 to 40% of solvent B in 70 min at a flow rate of 1 mL/min. The separation was monitored using a diode array detector at a wavelength of 214 nm and 1 mL fractions were collected and lyophilised for storage at -20 °C.

MALDI-TOF/TOF mass spectrometry

Lyophilised fractions were redissolved in 40 μ L of 0.1% of formic acid (FA) and 2% of ACN in water. 1 μ L of each fraction of interest was spotted onto a MALDI plate by triplicate. After air-drying, 0.5 μ L of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) solution (#C2020, Sigma, St Louis, MO) at a concentration of 4.73 mg/mL in 8 mM of ammonium phosphate, 50% of ACN and 0.1% of TFA was added as matrix solution. Mass spectra were recorded in positive-reflectron mode using a 4700 Applied Biosystems MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (CA, USA) equipped with delayed extraction by summing 2000 shots with a laser intensity of 5000 (YAG LASER, 200 Hz). For the MS/MS analyses, in first aliquot of every fraction five of the most intense precursor ions were selected. The next five most intense precursors were selected in the second aliquot. In the third aliquot the ten more intense precursors were excluded, being precursors selected from an inclusion list to a maximum of five. Every time selection was done according to the threshold criteria (minimum signal-to-noise 10; minimum cluster area, 500; maximum precursor gap, 200 ppm; maximum fraction gap, 4).

The mass spectrometer was calibrated externally once before each analysis using the 4700 Proteomics Analyzer calibration mixture (#4333604, Applied Biosystems, CA, USA) containing des_Arg1-Bradykinin, Angiotensin I, Glu1-Fibrinopeptide B, Adrenocorticotrophic hormone (ACTH; 1-17 clip), ACTH (18-39 clip) and ACTH (7-38 clip) and covering the m/z range 904.47-3657.93 Da. The calibration of the MS/MS acquisition method was done using the Angiotensin I fragmentation spectra.

Peptide identification

The MS/MS information was sent to Mascot *via* the GPS Explorer software (Applied Biosystems). Identification of the protein origin of peptides was done against NCBI nonredundant protein database using the Mascot search engine

(<http://www.matrixscience.com>). Matched peptides for the obtained MS/MS data were further verified manually.

RESULTS

Fractionation and isolation of peptides

A deproteinized dry-cured ham extract was submitted to size-exclusion chromatography in order to fractionate the peptides mixture according to their molecular mass sizes. Fractions corresponding to an elution volume between 125 - 190 mL and containing peptides with sizes ranging between 1500 - 4000 Da were pooled together, concentrated and subjected to reversed-phase chromatography. After separation on a Symmetry C18 column, peptides eluting at a concentration of ACN from 21 to 27%, corresponding to a total volume of 6 mL, were collected in aliquots of 1mL, dried and analyzed by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry.

Peptide sequencing using mass spectrometry

Fractions obtained after reversed-phase chromatography were analyzed by MALDI-TOF/TOF MS in order to identify the sequence of the TnT fragments generated after the dry-curing process. By this way, a total of twenty-five fragments corresponding to fast troponin T and two fragments corresponding to slow troponin T were obtained (listed in **Table 1**).

Figure 1 shows the MALDI-TOF mass spectrum of the fraction eluted at a concentration of 22 % ACN in the reversed-phase chromatography. The mass spectrum shows the molecular masses of the singly charged ions ($[M + H]^+$) 1760.84, 2045.06, 2057.01, 2158.05, 2213.12, 2314.16, 2515.21, 2583.33, 2643.37, 2690.42, 2811.42 and 2912.48, which are in accordance with peptides 23, 17, 22, 21, 16, 15, 4, 8, 3, 26, 2 and 1, respectively, presented in **Table 1**. The molecular masses of peptides 26 and 27 (**Table 1**), from slow skeletal muscle troponin T, are in accordance with the signals obtained from the MALDI-TOF mass spectrum indicated in **Figure 2**, eluting at a concentration of 26% ACN in the RP-HPLC separation. In that respect, peptide 26 can be observed in both spectra (see **Figures 1** and **2**) but its

intensity is much higher in **Figure 2**, where it appears next to peptide 27, the second peptide coming from slow skeletal muscle TnT identified in this study.

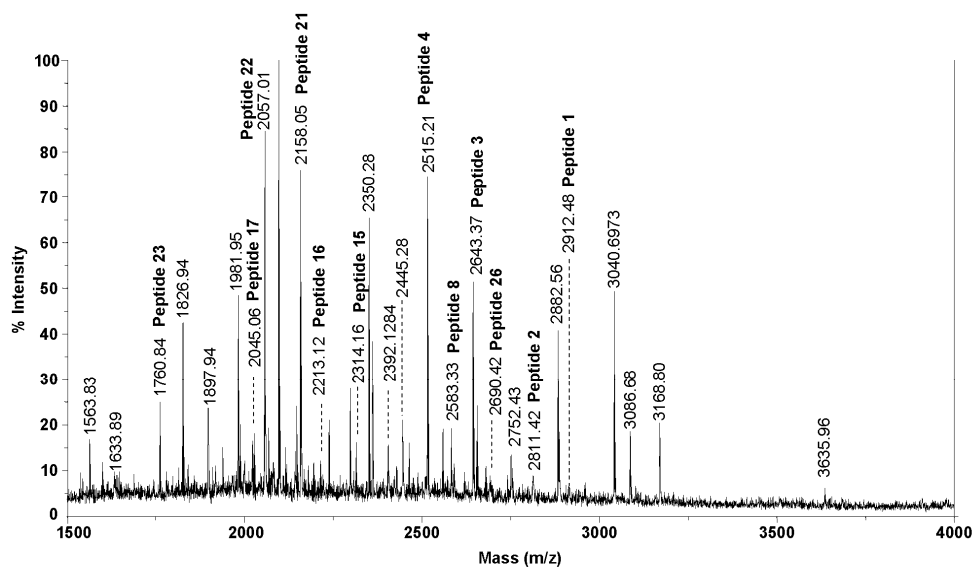


Figure 1. MALDI-TOF mass spectrum obtained for the RP-HPLC fraction containing most fragments of fast skeletal troponin T.

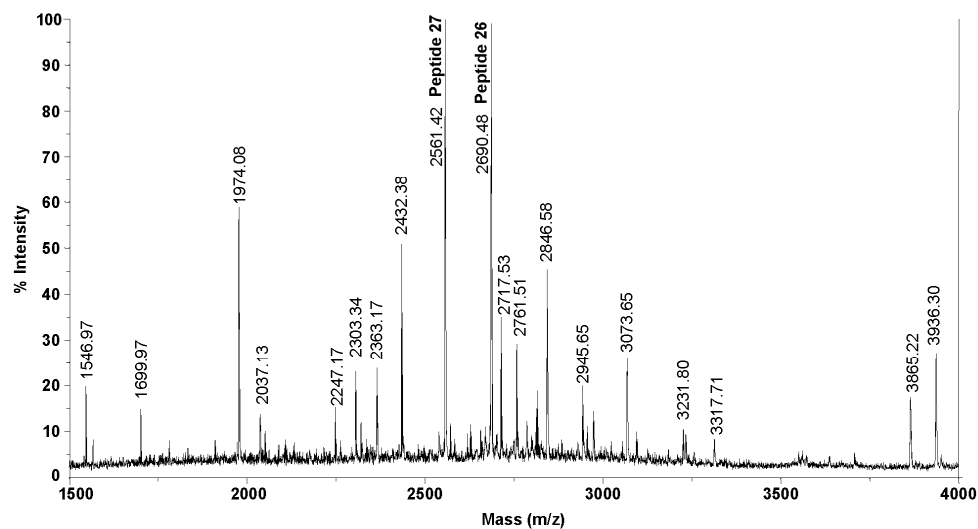


Figure 2. MALDI-TOF mass spectrum of the RP-HPLC fraction containing most fragments of slow skeletal troponin T.

All peptides of interest, obtained after MALDI-TOF MS analysis, were sequenced by matching data obtained from MS/MS spectra of the singly charged ions ($[M + H]^+$) with sequences contained in protein databases. **Table 1** also shows the expected and calculated masses of the identified peptides, as well as the scores obtained using the Mascot search engine.

Table 1. Troponin T fragments identified in *Biceps femoris* muscle of Spanish dry-cured ham. Peptides corresponding to slow TnT (protein accession number Q75ZZ6 in NCBI nonredundant database) are indicated with an asterisk (*). The rest of the peptides correspond to fast TnT (protein accession number BAD15381 in NCBI nonredundant database).

Peptide	Observed Mass (Da) ^a	Expected Mass (Da) ^b	Calculated Mass (Da) ^c	Score ^d	Identified ^e
1	2912.48	2911.47	2911.54	50	X
2	2811.42	2810.42	2810.49	105	X
3	2643.37	2642.36	2642.40	31	X
4	2515.27	2514.26	2514.31	59	X
5	2799.39	2798.38	2798.46	25	
6	2698.34	2697.33	2697.41	60	X
7	2684.36	2683.35	2683.43	56	X
8	2583.33	2582.32	2582.38	82	X
9	2415.26	2414.25	2414.29	73	
10	2287.16	2286.15	2286.20	54	
11	2442.21	2441.20	2441.29	32	
12	2341.20	2340.19	2340.24	73	X
13	2173.17	2172.16	2172.15	38	
14	3162.76	3161.75	3161.76	21	
15	2314.16	2313.15	2313.23	90	X
16	2213.12	2212.12	2212.19	130	X
17	2045.06	2044.05	2044.10	88	X
18	1916.97	1915.96	1916.00	92	X
19	1706.80	1705.79	1705.86	110	X
20	3006.64	3005.63	3005.65	32	
21	2158.05	2157.05	2157.13	38	
22	2057.01	2056.00	2056.08	52	X
23	1760.84	1759.84	1759.90	36	
24	1550.70	1549.70	1549.76	38	X
25	1971.05	1970.04	1970.10	33	
26*	2690.48	2689.47	2689.48	39	
27*	2561.42	2560.41	2560.44	21	

^aMolecular mass observed after MALDI-TOF/TOF mass spectrometry analysis.

^bExpected relative molecular mass of the matched peptide.

^cCalculated relative molecular mass of the matched peptide.

^dScores obtained in Mascot using the NCBI non-redundant protein database.

^ePeptides marked with an 'X' were identified in at least two of the three hams.

Table 2 shows the sequences of the 27 TnT fragments identified by MALDI-TOF/TOF from dry-cured ham. Peptides have been arranged and aligned according to their positions in the sequence of either fast or slow skeletal muscle TnT (see **Figure 3**).

Table 2. Sequences of the 27 troponin T fragments identified in dry-cured ham using MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. Peptides corresponding to slow TnT (protein accession number Q75ZZ6 in NCBI nonredundant database) are indicated with an asterisk (*). The rest of the peptides correspond to fast TnT (protein accession number BAD15381 in NCBI nonredundant database).

Peptide	Residue in P ₁	Identified Sequence	Residue in P' ₁	Position ^a
1	L	TAPKIPEGEKVFDDIQKKRQNKDL	M	57-81
2	T	APKIPEGEKVFDDIQKKRQNKDL	M	58-81
3	P	KIPEGEKVFDDIQKKRQNKDL	M	60-81
4	K	IPEGEKVFDDIQKKRQNKDL	M	61-81
5	L	TAPKIPEGEKVFDDIQKKRQNKD	L	57-80
6	T	APKIPEGEKVFDDIQKKRQNKD	L	58-80
7	L	TAPKIPEGEKVFDDIQKKRQNK	D	57-79
8	T	APKIPEGEKVFDDIQKKRQNK	D	58-79
9	P	KIPEGEKVFDDIQKKRQNK	D	60-79
10	K	IPEGEKVFDDIQKKRQNK	D	61-79
11	L	TAPKIPEGEKVFDDIQKKRQ	N	57-77
12	T	APKIPEGEKVFDDIQKKRQ	N	58-77
13	P	KIPEGEKVFDDIQKKRQ	N	60-77
14	E	EKPRPKLTAPKIPEGEKVFDDIQKKR	Q	50-76
15	L	TAPKIPEGEKVFDDIQKKR	Q	57-76
16	T	APKIPEGEKVFDDIQKKR	Q	58-76
17	P	KIPEGEKVFDDIQKKR	Q	60-76
18	K	IPEGEKVFDDIQKKR	Q	61-76
19	P	EGEKVFDDIQKKR	Q	63-76
20	E	EKPRPKLTAPKIPEGEKVFDDIQKK	R	50-75
21	L	TAPKIPEGEKVFDDIQKK	R	57-75
22	T	APKIPEGEKVFDDIQKK	R	58-75
23	K	IPEGEKVFDDIQKK	R	61-75
24	P	EGEKVFDDIQKK	R	63-75
25	R	KKEEEELVALKERIEK	R	96-111
26*	R	EEERP KPSRPVVPPLIPPKIPEGE	R	36-59
27*	R	EEERP KPSRPVVPPLIPPKIPEG	E	36-58

^a Position of the peptides inside the TnT sequence of porcine specie.

The whole fast TnT fragments identified in this work share the common sequence EGEKVFDDIQKK (peptide 24), with the exception of peptide 25. Nevertheless, as can be observed in **Table 2**, peptides 1 to 23 show remarkable differences at their N- and C- terminal end. Looking at the N-terminal site, peptides 1, 5, 7, 11, 15 and 21

have an additional threonine with respect to peptides 2, 6, 8, 12, 16 and 22, whereas peptides 3, 9 and 17 present an extra lysine with respect to peptides 4, 10 and 18. In addition to this, dipeptide losses were also observed at the N-terminal side. In this way, peptides 2, 8, 12 and 16 show an additional Ala-Pro compared to peptides 3, 9, 13 and 17, whereas Ile-Pro losses were detected in peptides 19 and 24 with respect to peptides 18 and 23. With regard to the C-terminal side, the loss of amino acids leucine (peptides 1 to 4), aspartic acid (peptides 5 and 6), glutamine (peptides 11 to 13), arginine (peptides 14 to 19) and glutamic acid (peptide 26) were observed. Peptide 25 is the only peptide identified from a different region of the fast TnT sequence (see **Figure 3**). On the other hand, peptides 26 and 27 are fragments of the slow skeletal muscle TnT. Peptide 26 presents an additional glutamic acid at the C-terminal position with respect to peptide 27. **Table 2** also indicates the amino acid residue situated before and after the cleavage site and the position of the peptide in the TnT sequence (**Figure 3**).

BLAST sequence similarities searches revealed 100% homology of the peptides 1-25 to porcine fast TnT (protein accession number BAD15381 in NCBI nonredundant database) and peptides 26 and 27 to porcine slow TnT (protein accession number Q75ZZ6 in NCBI nonredundant database).

DISCUSSION

One of the most important biochemical changes that occur during the ham dry-curing process is the intense proteolysis that takes place as a result of the action of endogenous muscle peptidases. It is assumed that the main enzymes responsible for the degradation of muscle proteins during this period are several endopeptidases and certain groups of exopeptidases, but the exact role of each individual enzyme is not known in detail (Toldrá, 2002; Sentandreu, Coulis & Ouali, 2002). Endopeptidases degrade the myofibrillar structure by cleaving intact proteins, giving rise to large polypeptides which are further degraded by exopeptidases. In this way, dipeptidyl peptidases would contribute, in addition to aminopeptidases and carboxipeptidases, to the extensive degradation of the polypeptide fragments and to the generation of

showing activity even after 15 months of processing. In the case of cathepsin D, even if its activity in the dry-curing process could be restricted to the first few months of processing (Toldrá, Rico & Flores, 1993) its action on dry-cured ham proteolysis seems to be relevant (Sentandreu et al., 2007). Many authors have studied the contribution of cathepsins in the hydrolysis of muscle myofibrillar proteins, obtaining opposite results with respect to the action of these endopeptidases on TnT degradation. *In vitro* proteolysis of myofibrillar proteins coming from sea bass white muscle demonstrated that troponin T was degraded by cathepsins B and L with a concomitant appearance of a 30 kDa band, whereas it was resistant to cathepsin D action (Ladrat, Verrez-Bagnis, Noel & Fleurence, 2003). Aoki and Ueno (1997) agreed in that mackerel cathepsin L hydrolysed TnT but, according to their results, cathepsin B did not hydrolyse any of the myofibrils from mackerel white muscle. The effect of cathepsins L and D on myofibrillar proteins coming from beef, pork, rabbit or chicken samples was also studied by some authors. Zeece, Katoh, Robson and Parrish (1986) incubated cathepsin D with bovine skeletal sample myofibrils under *in vitro* conditions and, contrary to the above mentioned results obtained by Ladrat et al (2003), they observed the degradation of a small amount of TnT. On the other hand, (Mikami, Whiting, Taylor, Maciewicz & Etherington, 1987) studied the degradation of rabbit, chicken and beef myofibrils by cathepsin L and lysosomal lysates, reporting the disappearance of troponin T just after 15 min of incubation in the presence of cathepsin L.

Calpains (EC 3.4.22.17) can participate in the post-mortem muscle proteolysis only during the first stages of the curing processes due to their relatively poor stability and because both the high salt content and low pH values found in subsequent stages would inhibit the enzyme. Post-mortem degradation of TnT has been associated with the action of both μ -calpain (Lametsch, Roepstorff & Bendixen, 2002) and m-calpain (Whipple & Koohmaraie, 1991).

In relation to μ -calpain, Hughes, Geary, Dransfield, McSweeney and O'Neill (2001) incubated rabbit skeletal muscle TnT with this enzyme and identified four principal cleavage sites, two of them being Thr₄₅-Ala₄₆ and Leu₆₉-Met₇₀. According to the results obtained by these authors, μ -calpain could be responsible for the cleavage

site Leu₈₁-Met₈₂ corresponding to the C-terminal side of peptides 1 to 4 identified in this work (see **table 2**). However, we cannot assure that this enzyme is the responsible for the cleavage site Thr₅₇-Ala₅₈ in the generation of peptides 2, 6, 8, 12, 16 and 22 because in all cases the same peptide but with an additional threonine in the N-terminal side have been identified (peptides 1, 5, 7, 11, 15 and 21, respectively), suggesting any aminopeptidase action as main responsible for the cleavage site Thr₅₇-Ala₅₈.

The effect of m-calpain in *longissimus* pork muscle was studied *in vitro* by Kitamura et al. (2005). These authors determined the N-terminal amino acid sequences of the TnT degradation fragments generated both during post-mortem ageing of meat and by the incubation of this enzyme with TnT. Postmortem TnT degradation was also studied in bovine *longissimus* muscle by Muroya et al. (2004). These authors determined the specific cleavage sites of the two fast TnT isoform types predominantly expressed in this muscle, together with the N-terminal amino acid sequence of the generated TnT fragments. The results obtained by Kitamura, Muroya, Tanabe, Okumura, Chikuni and Nishimura (2005) and Muroya, Kitamura, Tanabe, Nishimura, Nakajima and Chikuni, (2004) confirmed the cleavage site Thr₅₇-Ala₅₈ (**table 2**). These authors determined the N-terminal amino acid sequences APKIPEGEKVDF and APKIPEGE, respectively. On the other hand, sequences EKPRPKLTAPKIPEG and EKPRPKLT, determined respectively by same authors, coincide with the N-terminal sequence of peptides 14 and 20 (**Table 2**). The fact that *in vitro* proteolysis of TnT by calpains generate cleavage sites that have also been found in post-mortem meat samples and in naturally generated peptides at the end of the dry-cured ham processing indicates the importance of calpains in the biochemistry of dry-cured ham.

It is important to take into account that compositions of both the intact TnT isoforms and the post-mortem fragments differed among the muscles examined, indicating that each TnT isoform degrades into an specific fragment in each muscle (Muroya, Nakajima, Oe & Chikuni, 2006). In this way, Whipple et al. (1992) examined the amount of post-mortem proteolysis in three different lamb muscles and concluded that degradation products derived from TnT in *supraspinatus*, a slow type muscle,

were distinct from those in *longissimus* and *gluteus medius*, fast type muscles. On the other hand, Muroya, Nakajima and Chikuni (2003) established that slow-oxidative muscles were richer in slow TnT isoforms than fast muscles. In this study, twenty-five fragments of fast TnT have been identified against only two slow TnT fragments. A possible explanation for these differences between the quantity of fragments identified in slow and fast TnT could be the nature of *biceps femoris* as a fast skeletal muscle.

Contribution of exopeptidases: dipeptidyl peptidases, aminopeptidases and carboxipeptidases.

Dipeptidyl peptidases (DPP I, II, III, and IV) are enzymes able to release different dipeptides from the N-terminal side of peptides. In relation to their substrate specificity, DPP I and III are unable to attack those peptides containing a proline residue in any side of the peptide bond (Smyth & O'Cuinn, 1994; Sentandreu & Toldrá, 1998; Sentandreu & Toldrá, 2000), whereas DPP II and IV from porcine skeletal muscle are able to release dipeptides from the N-termini having a proline residue in penultimate position. According to Sentandreu and Toldrá (2001), DPP II activity would be restricted during salting and resting times due to its poor activity at low temperatures and optimum relatively acid pH, so its activity would be relevant only from the end of the post-salting period (50 days) till 240 days when its activity decreases. The contribution of DPP IV activity during dry-curing is also expected although in a lower degree, as it expresses a low percentage of activity at pH around 6.0 and low temperatures, in addition to be partially inhibited by NaCl (Sentandreu & Toldrá, 2001). Thus, considering both the high stability of DPP II and IV during the processing of dry-cured ham and their substrate specificity, these enzymes could be responsible for the observed loss of dipeptide Ala-Pro in peptides 3, 9, 13 and 17 (**Table 2**) with respect to peptides 2, 8, 12 and 16, respectively, and dipeptide Ile-Pro in peptides 19 and 24 with respect to peptides 18 and 23.

A remarkable increase in free amino acid concentration has been observed during dry-cured ham processing. Glutamic and aspartic acids, alanine, leucine, lysine, valine and threonine appear to be some of the amino acids experiencing larger

increases (Rodríguez-Nuñez, Aristoy & Toldrá, 1995; Toldrá, Aristoy & Flores, 2000). Troponin T peptides identified in this study constitute an important evidence of the contribution of aminopeptidases and carboxipeptidases to such increase in free amino acids.

Aminopeptidase activity has been detected in dry-cured ham even after more than 12 months of processing, suggesting that these enzymes may be involved in the latter stages of protein degradation (Toldrá, Cervero & Part, 1993; Toldrá et al., 2000). Alanine aminopeptidase (AAP; EC 3.4.11.14) and arginine aminopeptidases (RAP; EC 3.4.11.6), which show good stability during dry-curing and have an optimal neutral pH, appear to be the main contributors to the generation of free amino acids during the processing of dry-cured ham. Methionine aminopeptidase (MAP; EC 3.4.11.18), whose activity is enhanced in the presence of low amounts of NaCl, can also generate free amino acids in cured pork meat products. This enzyme has broad substrate specificity, exhibiting maximal activity in the hydrolysis of N-terminal Met (100%) and Lys (81%) (Flores, Marina & Toldrá, 2000). **Table 2** shows the contribution of TnT fragments to the increases of free threonine (peptides 1, 5, 7, 11, 15 and 21) and lysine (peptides 3, 9 and 17). Considering the stability of aminopeptidases during dry-cured processing, alanine, arginine and methionine aminopeptidase could be responsible for the loss of N-terminal lysine in peptides 3, 9 and 17 (**Table 2**).

Carboxypeptidases constitute another relevant group of exopeptidases. These enzymes are responsible for the hydrolysis of amino acids from the C-terminal site of peptides. Looking at the TnT fragments identified in this study (**Table 2**), it is possible to appreciate the intense action of carboxypeptidases over the C-terminal end of peptides. In this way, the loss of leucine (peptides 5 and 6 with respect to peptides 1 to 4), aspartic acid (peptides 7 to 10 with respect to peptides 5 and 6), glutamine (peptides 11 to 13 with respect to peptides 7 to 10) and arginine (peptides 20 to 24 with respect to peptides 14 to 19) were observed in fast skeletal muscle TnT. Peptide 26, derived from slow TnT, present an additional glutamic acid at the C-terminal position with respect to peptide 27 (**Table 2**). Only carboxypeptidase A has been previously studied in skeletal muscle. Tissue carboxypeptidase A (EC 3.4.17.1) is most active on hydrophobic C-terminal residues such as leucine (peptides 1 to 4) at

pH 7.5 whereas at neutral pH, it can also hydrolyze glutamine (peptides 11 to 13) (Bodwell & Meyer, 1981). Lysosomal carboxypeptidase A (EC 3.4.16.1) has also preference for substrates with hydrophobic amino acid residues at their C-terminal site, being phenylalanine and leucine the most preferred substrates at pH 5.0-5.2 (Pshezhetsky, 2004). Although little is known about the effect of curing agents on the activity of these enzymes and their stability during the ripening period, it seems that carboxipeptidases would be responsible for the C-terminal loss of the mentioned amino acids in **Table 2**.

CONCLUSION

In this study, the identified fragments coming from troponin T provide clear evidence of the extensive hydrolysis suffered by this protein during the processing of dry-cured ham and prove the relevant action of endogenous muscle enzymes during this period. In fact, some of the cleavage sites corresponding to the peptides identified in this work have been already reported by other authors both *in vitro*, incubating TnT in the presence of μ - and m-calpains, and during post-mortem ageing of meat.

ACKNOWLEDGMENTS

FPU scholarship from Ministerio de Educación y Ciencia (Spain) to L.M. and grant AGL2007-65379-C02-01/ALI from Ministry of Education and Science (Madrid, Spain) and FEDER are fully acknowledged. We give special thanks to the Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) Proteomics core facility (Proteored member), Valencia, Spain, for its valuable contribution to the MALDI-TOF/TOF MS analysis.

REFERENCES

- Aoki, T. & Ueno, R. (1997). Involvement of cathepsins B and L in the post-mortem autolysis of mackerel muscle. *Food Research International* **30**(8), 585-591.
- Bodwell, J. E. & Meyer, W. L. (1981). Purification and characterization of carboxypeptidase-A from rat skeletal-muscle. *Biochemistry* **20**(10), 2767-2777.

- Flores, M., Marina, M., & , Toldrá, F. (2000). Purification and characterization of a soluble methionyl aminopeptidase from porcine skeletal muscle. *Meat Science* **56**(3), 247-254.
- Ho, C. Y., Stromer, M. H., & , Robson, R. M. (1994). Identification of the 30-kDa polypeptide in post-mortem skeletal-muscle as a degradation product of troponin-T. *Biochimie* **76**(5), 369-375.
- Hughes, M. C., Geary, S., Dransfield, E., McSweeney, P. L. H., & , O'Neill, E. E. (2001). Characterization of peptides released from rabbit skeletal muscle troponin-T by mu-calpain under conditions of low temperature and high ionic strength. *Meat Science* **59**(1), 61-69.
- Hwang, I. H., Park, B. Y., Kim, J. H., Cho, S. H., & , Lee, J. M. (2005). Assessment of postmortem proteolysis by gel-based proteome analysis and its relationship to meat quality traits in pig *longissimus*. *Meat Science* **69**(1), 79-91.
- Kitamura, S., Muroya, S., Nakajima, I., Chikuni, K., & , Nishimura, T. (2006). Amino acid sequences of porcine fast and slow troponin T isoforms. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **70**(3), 726-728.
- Kitamura, S. I., Muroya, S., Tanabe, S., Okumura, T., Chikuni, K., & , Nishimura, T. (2005). Mechanism of production of troponin T fragments during postmortem aging of porcine muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**(10), 4178-4181.
- Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., Noel, J., & , Fleurence, J. (2003). In vitro proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*): effects of cathepsins B, D and L. *Food Chemistry* **81**(4), 517-525.
- Lametsch, R., Roepstorff, P., & , Bendixen, E. (2002). Identification of protein degradation during post-mortem storage of pig meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**(20), 5508-5512.
- Larrea, V., Hernando, I., Quiles, A., Lluch, M. A., & , Pérez-Munuera, I. (2006). Changes in proteins during Teruel dry-cured ham processing. *Meat Science* **74**(3), 586-593.
- Laville, E., Sayd, T., Sante-Lhoutellier, V., Morzel, M., Labas, R., Franck, M., Chambon, C., & , Monin, G. (2005). Characterisation of PSE zones in *semimembranosus* pig muscle. *Meat Science* **70**(1), 167-172.
- Mikami, M., Whiting, A. H., Taylor, M. A. J., Maciewicz, R. A., & , Etherington, D. J. (1987). Degradation of myofibrils from rabbit, chicken and beef by cathepsin-I and lysosomal lysates. *Meat Science* **21**(2), 81-97.
- Muroya, S., Kitamura, S., Tanabe, S., Nishimura, T., Nakajima, I., & , Chikuni, K. (2004). N-terminal amino acid sequences of troponin T fragments, including 30 kDa one, produced during postmortem aging of bovine *longissimus* muscle. *Meat Science* **67**(1), 19-24.

- Muroya, S., Nakajima, I., & , Chikuni, K. (2003). Amino acid sequences of multiple fast and slow troponin T isoforms expressed in adult bovine skeletal muscles. *Journal of Animal Science* **81**(5), 1185-1192.
- Muroya, S., Nakajima, I., Oe, M., & , Chikuni, K. (2006). Difference in postmortem degradation pattern among troponin T isoforms expressed in bovine *longissimus*, *diaphragm*, and *masseter* muscles. *Meat Science* **72**(2), 245-251.
- Nishimura, T., Rhue, M. R., Okitani, A., & , Kato, H. (1988). Components contributing to the improvement of meat taste during storage. *Agricultural and Biological Chemistry* **52**(9), 2323-2330.
- Okumura, T., Yamada, R., & , Nishimura, T. (2003). Survey of conditioning indicators for pork loins: changes in myofibrils, proteins and peptides during postmortem conditioning of vacuum-packed pork loins for 30 days. *Meat Science* **64**(4), 467-473.
- Olson, D. G., Parrish, F. C., Dayton, W. R., & , Goll, D. E. (1977). Effect of postmortem storage and calcium activated factor on myofibrillar proteins of bovine skeletal-muscle. *Journal of Food Science* **42**(1), 117-124.
- Pearson, A. M. & Young, R. B. (2008). *Proteins Of The Thick Filament*. United Kingdom: Academic Press, Inc.
- Perry, S. V. (1998). Troponin T: Genetics, properties and function. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* **19**(6), 575-602.
- Pshezhetsky, A. V. (2004). Lysosomal carboxypeptidase A. In *Handbook Of Proteolytic enzymes* (Eds A. J. Barrett, N. D. Rawlings, & J. F. Woessner), pp. 1923-1929. London (UK): Elsevier Academic Press.
- Rodríguez-Núñez, E., Aristoy, M. C., & , Toldrá, F. (1995). Peptide generation in the processing of dry-cured ham. *Food Chemistry* **53**(2), 187-190.
- Sentandreu, M. A., Armenteros, M., Calvete, J. J., Ouali, A., Aristoy, M. C., & , Toldrá, F. (2007). Proteomic identification of actin-derived oligopeptides in dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**(9), 3613-3619.
- Sentandreu, M. A., Coulis, G., & , Ouali, A. (2002). Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science & Technology* **13**(12), 400-421.
- Sentandreu, M. A. & Toldrá, F. (2001). Dipeptidyl peptidase activities along the processing of Serrano dry-cured ham. *European Food Research and Technology* **213**(2), 83-87.
- Sentandreu, M. A. & Toldrá, F. (2000). Purification and biochemical properties of dipeptidyl peptidase I from porcine skeletal muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**(10), 5014-5022.

-
- Sentandreu, M. A. & Toldrá, F. (1998). Biochemical properties of dipeptidyl peptidase III purified from porcine skeletal muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**(10), 3977-3984.
- Smyth, M. & O'Cuinn, G. (1994). Dipeptidyl aminopeptidase III of guinea-pig brain: specificity for short oligopeptide sequences. *J.Neurochem.* **63**(4), 1439-1445.
- Toldrá, F. (2002). *Dry-Cured Meat Products*. Iowa: Willey-Blackwell, Ames.
- Toldrá, F., Aristoy, M. C., & Flores, M. (2000). Contribution of muscle aminopeptidases to flavor development in dry-cured ham. *Food Research International* **33**(3-4), 181-185.
- Toldra, F., Cervero, M. C., & Part, C. (1993). Porcine aminopeptidase activity as affected by curing agents. *Journal of Food Science* **58**(4), 724.
- Toldrá, F., Rico, E., & Flores, J. (1993). Cathepsin B, D, H and L activities in the processing of dry-cured ham. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **62**(2), 157-161.
- Whipple, G. & Koohmaraie, M. (1992). Effects of lamb age, muscle type, and 24-hour activity of endogenous proteinases on postmortem proteolysis. *Journal of Animal Science* **70**(3), 798-804.
- Whipple, G. & Koohmaraie, M. (1991). Degradation of myofibrillar proteins by extractable lysosomal-enzymes and m-calpain, and the effects of zinc-chloride. *Journal of Animal Science* **69**(11), 4449-4460.
- Zeece, M. G., Kato, K., Robson, R. M., & Parrish, F. C. (1986). Effect of cathepsin-D on bovine myofibrils under different conditions of pH and temperature. *Journal of Food Science* **51**(3), 769.

IV. Discusión general

IV. Discusión general

El proceso de elaboración empleado en la fabricación de productos cárnicos es crucial debido a la gran influencia que éste tiene sobre las características del producto final. Por ello, parte de este estudio se ha centrado en el desarrollo y la aplicación de nuevos métodos no destructivos y rápidos para el control de los procesos de producción, tanto del jamón cocido como del tradicional jamón curado.

A la vista de los resultados presentados en esta tesis, se concluye que los compuestos bioquímicos participantes en el metabolismo energético muscular, como la creatina y creatinina, son potenciales marcadores de calidad de la carne y los productos cárnicos. Su participación en el conjunto de las reacciones químicas y enzimáticas que tienen lugar en el músculo desde las primeras horas postmortem los convierten en buenos marcadores para conocer el estado de maduración en la carne y el tiempo de curado y/o cocción en productos cárnicos.

Con el fin de desarrollar nuevos métodos rápidos para el control de calidad de la carne y los productos derivados, en esta tesis se ha desarrollado un nuevo método de análisis por HPLC basado en la cromatografía de interacción hidrofílica para la determinación simultánea de creatina y creatinina, así como de los dipéptidos carnosina, anserina y balenina (capítulo 1). Para ello, se han establecido las condiciones óptimas de separación mediante el estudio de los efectos del par iónico, el pH, y el gradiente de acetonitrilo en la separación. Este método cromatográfico requiere una manipulación mínima de la muestra, evitando el tedioso paso de extracción en fase sólida o derivatización. Además, se trata de un método rápido y fiable, como indica su validación en términos de linealidad, repetibilidad, reproducibilidad, y recuperación, donde se han obtenido resultados similares a los publicados por otros autores en la cuantificación de creatina y creatinina (Pais et al., 1999; Purchas et al., 2004) y los dipéptidos carnosina, anserina y balenina (Aristoy y Toldrá, 1998; Cornet y Bousset, 1998; Aristoy y Toldrá, 2004; Aristoy et al., 2004). La ausencia de pasos intermedios en el procesado de la muestra, la fiabilidad demostrada, y su compatibilidad con el análisis posterior de los compuestos por

espectrometría de masas, hacen de este método una alternativa interesante a los ya existentes para el análisis tanto estos compuestos como de otras sustancias polares. Aplicando la metodología desarrollada al análisis de creatina y creatinina en siete músculos de cerdo de distinto tipo metabólico, se observaron diferencias significativas en el contenido de estos compuestos en función del tipo de metabolismo muscular ($p < 0.05$). En este sentido, los niveles más altos de creatina y creatinina, coincidiendo con lo anteriormente publicado por otros autores para carnosina (Macy et al., 1970; Aristoy et al., 1998), se encontraron en los músculos glucolíticos *Semimembranosus*, *Longissimus dorsi*, *Gluteus maximus* y *Biceps femoris*. Estos valores más altos de creatina podrían provenir de la fosfocreatina, que transfiere el grupo fosfato al ADP para formar ATP en el metabolismo anaeróbico postmortem del músculo esquelético. Los músculos *Gluteus medius* y *Trapezius*, ambos con un metabolismo energético intermedio, presentaron concentraciones de creatina y creatinina intermedias, mientras que el *Masseter*, músculo oxidativo, mostró los contenidos más bajos en estos compuestos.

La conversión de creatina en creatinina se ve favorecida por el aumento de la temperatura, el tiempo, y los cambios en el pH (Edgar G. y Shiver H.E., 1925; Fuller y Elia, 1988; Kvasnicka y Voldrich, 2000). Los estudios realizados con patrones y con músculos de distinto tipo metabólico (y, por tanto, con distintas concentraciones iniciales de creatina), demostraron que existía una relación entre la cantidad inicial de creatina y la cantidad de creatinina formada tras el calentamiento, indicando que la concentración inicial de creatina, además de la temperatura, el tiempo y el pH, constituye un factor decisivo en la formación de creatinina. Dado que esta conversión es inducida por calor durante la cocción, los contenidos en creatina decrecen mientras que los de creatinina se incrementan (Macy et al., 1970; Purchas et al., 2006). Este hecho, junto a que los músculos principales del jamón (*Semimembranosus*, *Biceps femoris* y *Gluteus maximus*) presentan metabolismos similares y, por tanto, concentraciones de creatina y creatinina muy parecidas, hacen de estos compuestos unos posibles marcadores de calidad a tener en cuenta durante el procesado del jamón cocido.

Así pues, tras evaluar el efecto de los dos procedimientos de cocción más comúnmente empleados en la elaboración de jamón cocido (a temperatura constante y por incremento de temperatura o ΔT), se observó que, efectivamente, se producía una disminución en la concentración de creatina y un incremento en la de creatinina. En este sentido, se obtuvieron valores de la ratio creatinina/creatina mayores en los jamones cocidos mediante el procedimiento de incremento de temperatura por etapas que con el procedimiento de temperatura constante. Por otro lado, se ha observado que la conversión de creatina es más rápida en la superficie que en el centro de la pieza de jamón, probablemente debido al mayor tiempo en contacto con el agua de cocción y a los mayores valores de transferencia de calor que corresponden a esta posición en la pieza. En base a los resultados obtenidos y tras estudiar las ratios creatinina/creatina en jamones comerciales, se ha establecido que dicha ratio podría utilizarse como índice para determinar el alcance del tratamiento térmico aplicado durante el procesado de jamón cocido, tratándose de una técnica no destructiva que requiere únicamente de una pequeña porción de jamón tomada en la superficie. Según los resultados obtenidos, en piezas de 5.5 Kg de peso sería necesaria una ratio de creatinina/creatina superior a 0.4 para asegurar un tratamiento térmico mínimo de 70 °C en el centro de la pieza de jamón.

El curado del jamón es un proceso muy largo donde se producen numerosos cambios en los componentes de la carne. Como se ha comentado anteriormente, la conversión de la creatina en creatinina depende en gran medida de la temperatura y el tiempo, factores que son fundamentales durante el proceso de curado del jamón. Así pues, se decidió estudiar el efecto del proceso de curado de jamones salados con distintas formulaciones sobre la concentración de creatina, creatinina, y su ratio con el fin de determinar la posibilidad de utilizar estos compuestos como marcadores de calidad del producto final. Este estudio demostró claramente que el tiempo de procesado de jamón curado tiene un efecto significativo ($p < 0.001$) sobre las concentraciones de creatina y creatinina, mientras que no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de estos compuestos entre jamones salados con distintas formulaciones y cantidades de sal. Las principales diferencias en creatina y creatinina se observaron entre el periodo de postsalado (20, 50 y 80 días)

y el de curado (7, 9 y 11 meses), obteniendo un valor estable tanto para la creatina como creatinina a partir de los 7 meses de curado.

Para comprobar la estabilidad de los valores de creatina y creatinina tras 7 meses de curado, se aplicaron condiciones extremas de temperatura (20, 30, 40 y 70 °C) y tiempo (20, 40 y 70 min) sobre el músculo *Semimembranoso* de jamón curado de 11 meses. Por otro lado, también se analizaron jamones comerciales curados durante un periodo entre 12 y 18 meses. El hecho de que bajo condiciones extremas de tiempo y temperatura no se observaran cambios significativos ($p < 0.001$) en las concentraciones de creatina y creatinina, junto con la estabilidad detectada en estos compuestos ($p < 0.001$) en los análisis de jamones comerciales con tiempos de curado de hasta 18 meses confirma que, tras los 7 meses de curado, se alcanzan unos valores constantes mínimo de creatina y máximo de creatinina que ponen de manifiesto la utilidad de estos compuestos para tener una estimación del tiempo mínimo de curado.

Como se ha visto, el proceso de curado de jamón conlleva numerosos cambios en compuestos relacionados con el metabolismo energético como son la creatina y la creatinina pero, además, durante el proceso ocurren una serie de reacciones bioquímicas que se traducen en una intensa proteólisis, la cual afecta tanto a proteínas miofibrilares como sarcoplásmicas (Macy et al., 1970; Toldrá y Flores, 1998; Di Luccia et al., 2005). Esta proteólisis es debida a la acción de varias enzimas musculares: por un lado, las endopeptidasas musculares (catepsinas y calpaínas, principalmente), las cuales son responsables de la rotura inicial de las proteínas, generando grandes polipéptidos (Toldrá et al., 1998; Lametsch et al., 2003; Nagaraj y Santhanam, 2006); y, por otro lado, las exopeptidasas musculares, responsables de la ruptura a nivel de enlace peptídico de estos polipéptidos, generando aminoácidos libres y péptidos de pequeño tamaño responsables de las características organolépticas del producto final (Toldrá et al., 1997; Toldrá, 1998; Toldrá et al., 2000).

Aunque se asume que estas enzimas endógenas del músculo son las principales responsables de la degradación de las proteínas musculares durante el proceso de curado, todavía se desconoce la participación concreta de cada enzima en este

proceso. Es más, a pesar de tener la evidencia de la presencia de oligopéptidos y péptidos de pequeño tamaño al final del proceso de curado, se sabe muy poco acerca de la secuencia específica de estos péptidos.

En el análisis mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con analizadores híbridos del tipo cuadrupolo-tiempo de vuelo de algunos de los péptidos generados durante el proceso de curado de jamón, se identificaron por primera vez un total de catorce fragmentos derivados de proteínas miofibrilares. Nueve de los péptidos identificados procedían de la cadena ligera de miosina I y evidenciaban la contribución de las dipeptidilpeptidasas en la generación de dipéptidos durante el procesado de jamón curado. Las dipeptidilpeptidasas son enzimas muy estables durante todo el proceso de curado (Sentandreu y Toldrá, 2001) y parecen ser las responsables de la pérdida consecutiva de dipéptidos ocurrida en el extremo N-terminal de los fragmentos identificados en este trabajo (capítulo 4). Los dipéptidos generados, Pro-Ala y Ala-Ala, podrían contribuir, junto con otros compuestos no volátiles, al desarrollo del flavor en el jamón curado. Los cinco fragmentos restantes provenían de la región PEVK de la proteína titina, responsable de la elasticidad del sarcómero. Las enzimas μ -calpaína y calpaína 3, junto con las dipeptidilpeptidasas, serían pues potenciales responsables de la generación de estos fragmentos durante las primeras fases del curado (Virgili et al., 1995; Huff-Lonergan et al., 1996; Koohmaraie y Geesink, 2006).

Las proteínas sarcoplásmicas son, por lo general, más susceptibles a la desnaturalización que las proteínas miofibrilares (Farouk et al., 2002). La enzima creatina quinasa se ha relacionado en muchos estudios con la calidad de la carne en lo que se refiere a pérdidas por exudado (Ryu et al., 2005; van de Wiel y Zhang, 2007), al color (Ryu et al., 2005; Sayd et al., 2006) y a la textura (Toyohara et al., 1999). La identificación de 58 fragmentos de creatina quinasa generados de forma natural por la acción de enzimas endógenas del músculo es una prueba evidente de la intensa proteólisis sufrida por esta proteína durante el proceso de curado del jamón. Esta es la primera vez que se identifica la secuencia completa de péptidos procedentes de la hidrólisis de la creatina quinasa durante el curado. El total de los péptidos identificados constituye aproximadamente un 44 % del total de la secuencia

de esta proteína. Durante el proceso de curado de jamón se produce un importante aumento en la concentración de aminoácidos libres (Mc Cain et al., 1968; Virgili et al., 1999; Toldrá et al., 2000; Martín et al., 2001). En relación con esto, los fragmentos de creatina quinasa identificados en este estudio evidencian la contribución de las aminopeptidasas y carboxipeptidasas al aumento en la cantidad de aminoácidos libres observada durante el proceso de curado.

Estudios realizados mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF permitieron identificar un total de 27 péptidos derivados de la troponina T, proteína miofibrilar presente en el músculo estriado. La degradación postmortem de esta proteína ha sido ampliamente estudiada (Kitamura et al., 2006); sin embargo, los detalles de su degradación en procesos más largos como el curado de jamón, así como las secuencias específicas de los fragmentos que se generan quedaban sin determinar hasta la realización del presente trabajo (capítulo 7). La identificación de estos fragmentos ha permitido demostrar la relevancia que tienen las endopeptidasas musculares durante este periodo. Hay que destacar que algunos de los sitios de corte correspondientes a los fragmentos identificados en este trabajo ya habían sido anteriormente reproducidos por otros autores mediante incubación *in vitro* de la TnT en presencia de μ - y m- calpaínas (Hughes et al., 2001; Kitamura et al., 2005), y durante el almacenamiento postmortem de la carne (Muroya et al., 2004).

Los compuestos que se generan a partir de la proteólisis en jamón curado podrían ser marcadores de calidad del proceso y, además, podrían estar ejerciendo importantes actividades antihipertensivas, antimicrobianas, etc. en el producto final. La identificación de la secuencia completa de estos compuestos y de sus proteínas de origen es básica para fundamentar una investigación posterior que pueda permitir estudiar tanto su potencial como marcadores de calidad del proceso como sus propiedades como compuestos bioactivos. En este trabajo se han identificado péptidos de una masa molecular comprendida entre los 1000 y los 3000 Da. La contribución de péptidos de este tamaño a la generación del aroma y sabor característicos del jamón ha sido estudiada (Aristoy y Toldrá, 1995; Flores et al., 1997), aunque no se han descifrado aún todos los péptidos presentes en dicha fracción. Este hecho y la existencia de péptidos marcadores del grado de ternura y

maduración de la carne (Nakai et al., 1995) nos indica la importancia de los péptidos generados, lo que fundamenta la necesidad de futuras investigaciones con el fin de mejorar el control de la calidad y del proceso de curado del jamón.

Bibliografía

- Aristoy, M. C., Soler, C., & Toldrá, F. (2004). A simple, fast and reliable methodology for the analysis of histidine dipeptides as markers of the presence of animal origin proteins in feeds for ruminants. *Food Chemistry* **84**(3), 485-491.
- Aristoy, M. C. & Toldrá, F. (1998). Concentration of free amino acids and dipeptides in porcine skeletal muscles with different oxidative patterns. *Meat Science* **50**(3), 327-332.
- Aristoy, M. C. & Toldrá, F. (2004). Histidine dipeptides HPLC-based test for the detection of mammalian origin proteins in feeds for ruminants. *Meat Science* **67**(2), 211-217.
- Aristoy, M. C. & Toldrá, F. (1995). Isolation of flavor peptides from raw pork meat and dry-cured ham. In *Food flavors: Generation, analysis and process influence* (Ed G. Charalambous), pp. 1323-1344. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science.
- Cornet, M. & Bousset, J. (1998). Free amino acids and dipeptides in porcine muscles: differences between 'red' and 'white' muscles. *Meat Science* **51**(3), 215-219.
- Di Luccia, A., Picariello, G., Cacace, G., Scaloni, A., Faccia, M., Liuzzi, V., Alvitì, G., & Musso, S. S. (2005). Proteomic analysis of water soluble and myofibrillar protein changes occurring in dry-cured hams. *Meat Science* **69**(3), 479-491.
- Edgar G. & Shiver H.E. (1925). The equilibrium between creatine and creatinine, in aqueous solution. The effect of hydrogen ion. *Journal of American Chemical Society* (47), 1179-1188.
- Farouk, M. M., Wieliczko, K., Lim, R., Turnwald, S., & MacDonald, G. A. (2002). Cooked sausage batter cohesiveness as affected by sarcoplasmic proteins. *Meat Science* **61**(1), 85-90.
- Flores, M., Aristoy, M. C., Spanier, A. M., & Toldra, F. (1997). Non-volatile components effects on quality of "Serrano" dry-cured ham as related to processing time. *Journal of Food Science* **62**(6), 1235-1239.
- Fuller, N. J. & Elia, M. (1988). Factors Influencing the Production of Creatinine - Implications for the determination and interpretation of urinary creatinine and creatine in man. *Clinica Chimica Acta* **175**(3), 199-210.
- Huff-Lonergan, E., Mitsuhashi, T., Beekman, D. D., Parrish, F. C., Olson, D. G., & Robson, R. M. (1996). Proteolysis of specific muscle structural proteins by mu-calpain at low pH and temperature is similar to degradation in postmortem bovine muscle. *Journal of Animal Science* **74**(5), 993-1008.

- Hughes, M. C., Geary, S., Dransfield, E., McSweeney, P. L. H., & O'Neill, E. E. (2001). Characterization of peptides released from rabbit skeletal muscle troponin-T by mu-calpain under conditions of low temperature and high ionic strength. *Meat Science* **59**(1), 61-69.
- Kitamura, S., Muroya, S., Nakajima, I., Chikuni, K., & Nishimura, T. (2006). Amino acid sequences of porcine fast and slow troponin T isoforms. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **70**(3), 726-728.
- Kitamura, S. I., Muroya, S., Tanabe, S., Okumura, T., Chikuni, K., & Nishimura, T. (2005). Mechanism of production of troponin T fragments during postmortem aging of porcine muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**(10), 4178-4181.
- Koohmaraie, M. & Geesink, G. H. (2006). Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Science* **74**(1), 34-43.
- Kvasnicka, F. & Voldrich, M. (2000). Isotachophoretic determination of creatinine in meat and meat products. *Electrophoresis* **21**(14), 2848-2850.
- Lametsch, R., Karlsson, A., Rosenvold, K., Andersen, H. J., Roepstorff, P., & Bendixen, E. (2003). Postmortem proteome changes of porcine muscle related to tenderness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**(24), 6992-6997.
- Macy, R. L., Naumann, H. D., & Bailey, M. E. (1970). Water-soluble flavor and odor precursors of meat .5. Influence of heating on acid-extractable non-nucleotide chemical constituents of beef, lamb and pork. *Journal of Food Science* **35**(1), 83.
- Martín, L., Antequera, T., Ventanas, J., Itez-Donoso, R., & Córdoba, J. J. (2001). Free amino acids and other non-volatile compounds formed during processing of Iberian ham. *Meat Science* **59**(4), 363-368.
- Mc Cain, G. R., Blumer, T. N., Craig, H. B., & Steel, R. G. (1968). Free amino acids in ham muscle during successive aging periods and their relation to flavor. *Journal of Food Science* **33**(2), 142.
- Muroya, S., Kitamura, S., Tanabe, S., Nishimura, T., Nakajima, I., & Chikuni, K. (2004). N-terminal amino acid sequences of troponin T fragments, including 30 kDa one, produced during postmortem aging of bovine longissimus muscle. *Meat Science* **67**(1), 19-24.
- Nagaraj, N. S. & Santhanam, K. (2006). Effects of muscle proteases, endogenous protease inhibitors and myofibril fragmentation on postmortem aging of goat meat. *Journal of Food Biochemistry* **30**(3), 269-291.
- Nakai, Y., Nishimura, T., Shimizu, M., & Arai, S. (1995). Effects of freezing on the proteolysis of beef during storage at 4 degrees C. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **59**(12), 2255-2258.

- Pais, P., Salmon, C. P., Knize, M. G., & Felton, J. S. (1999). Formation of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in dry-heated model systems, meats, and meat drippings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**(3), 1098-1108.
- Purchas, R. W., Busboom, J. R., & Wilkinson, B. H. P. (2006). Changes in the forms of iron and in concentrations of taurine, carnosine, coenzyme Q(10), and creatine in beef longissimus muscle with cooking and simulated stomach and duodenal digestion. *Meat Science* **74**(3), 443-449.
- Purchas, R. W., Rutherford, S. M., Pearce, P. D., Vather, R., & Wilkinson, B. H. P. (2004). Concentrations in beef and lamb of taurine, carnosine, coenzyme Q(10,) and creatine. *Meat Science* **66**(3), 629-637.
- Ryu, Y. C., Choi, Y. M., & Kim, B. C. (2005). Prediction for quality traits of porcine Longissimus dorsi muscle using histochemical parameters. *Food Science and Biotechnology* **14**(5), 628-633.
- Sayd, T., Morzel, M., Chambon, C., Franck, M., Figwer, P., Larzul, C., Le Roy, P., Monin, G., Cherel, P., & Laville, E. (2006). Proteome analysis of the sarcoplasmic fraction of pig Semimembranosus muscle: Implications on meat color development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**(7), 2732-2737.
- Sentandreu, M. A. & Toldrá, F. (2001). Dipeptidyl peptidase activities along the processing of Serrano dry-cured ham. *European Food Research and Technology* **213**(2), 83-87.
- Toldrá, F. (1998). Proteolysis and lipolysis in flavour development of dry-cured meat products. *Meat Science* **49**, S101-S110.
- Toldrá, F., Aristoy, M. C., & Flores, M. (2000). Contribution of muscle aminopeptidases to flavor development in dry-cured ham. *Food Research International* **33**(3-4), 181-185.
- Toldrá, F. & Flores, M. (1998). The role of muscle proteases and lipases in flavor development during the processing of dry-cured ham. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **38**(4), 331-352.
- Toldrá, F., Flores, M., & Sanz, Y. (1997). Dry-cured ham flavour: Enzymatic generation and process influence. *Food Chemistry* **59**(4), 523-530.
- Toyohara, M., Murata, M., Ando, M., Kubota, S., Sakaguchi, M., & Toyohara, H. (1999). Texture changes associated with insolubilization of sarcoplasmic proteins curing salt-vinegar curing of fish. *Journal of Food Science* **64**(5), 804-807.
- Van de Wiel, D. F. M. & Zhang, W. L. (2007). Identification of pork quality parameters by proteomics. *Meat Science* **77**(1), 46-54.
- Virgili, R., Parolari, G., Bordini, C. S., Schivazappa, C., Cornet, M., & Monin, G. (1999). Free amino acids and dipeptides in dry-cured ham. *Journal of Muscle Foods* **10**(2), 119-130.

Virgili, R., Parolari, G., Schivazappa, C., Bordini, C. S., & Borri, M. (1995). Sensory and texture quality of dry-cured ham as affected by endogenous cathepsin B activity and muscle composition. *Journal of Food Science* **60**(6), 1183-1186.

V. Conclusiones

V. Conclusiones

- Se ha desarrollado un nuevo método sencillo, fiable y rápido para el análisis simultáneo de carnosina, anserina, balenina, creatina y creatinina en músculo haciendo uso de la cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) en HPLC. Este nuevo método supone un avance con respecto a métodos anteriores que requieren etapas más complejas de preparación de las muestras e incluso la derivatización de estos compuestos.
- La creatina y creatinina son compuestos bioquímicos presentes en la carne y los productos cárnicos que pueden ser potenciales marcadores de calidad de dichos productos. Ambos, al igual que la carnosina, pueden ser indicadores del tipo de metabolismo muscular. Los valores de creatinina y creatina podrían ser utilizados para verificar la eficacia del tratamiento térmico aplicado durante el procesado de jamones cocidos y para el control del tiempo de curado mínimo aplicado en el proceso de jamones curados.
- Se ha realizado por primera vez la identificación masiva de péptidos provenientes de la degradación de las proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas durante el curado del jamón haciendo uso de las técnicas actuales en espectrometría de masas aplicadas al campo de la proteómica. Los péptidos identificados en este trabajo constituyen una clara evidencia de la intensa proteólisis que las proteínas cadena ligera de miosina I, titina, creatina quinasa, y troponina T durante el proceso de curado de jamón. También se evidencia la utilidad y el potencial de las técnicas de proteómica en la identificación de péptidos y en su contribución a aumentar el conocimiento de la bioquímica del jamón, confirmando la acción de las calpaínas, catepsinas, dipeptidilpeptidasas, aminopeptidasas y carboxipeptidasas en la generación de péptidos. Algunos de los péptidos identificados podrían ser utilizados en un futuro como marcadores de calidad del jamón curado.

