



**Consejo Superior de Investigaciones
Científicas (CSIC)
Instituto de Agroquímica y
Tecnología de Alimentos**



**Universidad Politécnica
de Valencia
Departamento de Tecnología de
Alimentos**

**REDUCCIÓN DE SODIO EN LOMO Y JAMÓN CURADOS.
EFECTO SOBRE LA PROTEOLISIS Y LAS
CARACTERÍSTICAS SENSORIALES**

Tesis Doctoral

Presentada por:

Mónica Armenteros Cuesta

Dirigida por:

Prof. Dr. Fidel Toldrá Vilardell

Dra. M^a Concepción Aristoy Albert

Valencia, Febrero 2010



**Consejo Superior de Investigaciones
Científicas (CSIC)
Instituto de Agroquímica y
Tecnología de Alimentos**



**Universidad Politécnica
de Valencia
Departamento de Tecnología de
Alimentos**

Dr. Fidel Toldrá Vilardell, Profesor de Investigación y Dra. M^a Concepción Aristoy Albert, Investigador Titular de OPIs, ambos del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

HACEN CONSTAR: que el trabajo de investigación titulado “*Reducción de Sodio en Lomo y Jamón Curados. Efecto sobre la Proteólisis y las Características Sensoriales*” que presenta Dña Mónica Armenteros Cuesta por la Universidad Politécnica de Valencia, ha sido realizado en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC) bajo nuestra dirección y que reúne las condiciones para optar al grado de doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos la presente en Valencia a 4 de Febrero de 2010.

Valencia, 4 de Febrero de 2010

Fdo: Prof. Dr. Fidel Toldrá

Fdo: Dra. M^a Concepción Aristoy

RESUMEN

En esta tesis se abordó en primer lugar el estudio “*in vitro*” del efecto del NaCl, KCl, MgCl₂ y CaCl₂ sobre la actividad de las enzimas proteolíticas musculares (catepsinas, dipeptidilpeptidasas y aminopeptidasas). Se comprobó que el KCl no ejercía ningún efecto significativamente diferente al del NaCl sobre la actividad de dichas enzimas, mientras que se necesitaron concentraciones mucho más bajas de sales divalentes (CaCl₂ y MgCl₂) para conseguir el mismo efecto inhibitorio.

Seguidamente, se aplicaron una serie de tratamientos de salado en lomo curado, en los que se había sustituido parcialmente el contenido de NaCl por sales de K⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺, y se evaluó el efecto de dicha sustitución sobre la proteólisis, lipólisis y la calidad sensorial del producto final. A partir de estos resultados se seleccionaron los tratamientos de salado que obtuvieron mejores resultados: 50 % NaCl- 50 % KCl y 55 % NaCl, 25 % KCl, 15 % CaCl₂ y 5 % MgCl₂. Estas formulaciones fueron utilizadas para la fabricación de dos lotes de jamones con bajo contenido en sal, alrededor de 2.5 % en producto final, en los que se llevó a cabo el estudio de la proteólisis a lo largo del proceso de elaboración de los mismos, y de la calidad sensorial del producto final. Asimismo, se elaboraron otros dos lotes de jamones utilizando una técnica alternativa de salado, el salado a vacío, con un contenido en sal de producto terminado de entre el 4.5-5.5 % y se evaluó la calidad sensorial del producto final.

Los resultados obtenidos en jamón curado indican que, la sustitución parcial del NaCl por mezclas de sales de cloruro de K⁺, Mg²⁺ y Ca²⁺ en las proporciones indicadas, no alteraba de manera significativa el fenómeno proteolítico que tuvo lugar durante su elaboración. Asimismo, el análisis sensorial mostró que los jamones elaborados con mezclas de NaCl-KCl al 50 % y concentraciones de sal alrededor de 2.5 % fueron bien valorados por el panel de catadores, mientras que en los que contenían una mayor cantidad de sal (4.5 a 5.5 %) se detectaron defectos, especialmente en cuanto al sabor amargo, debido al alto contenido en K⁺.

ABSTRACT

In this thesis an “in vitro” study on the effect of NaCl, KCl, MgCl₂ and CaCl₂ on muscle protease activities (cathepsins, dipeptidylpeptidases and aminopeptidases) was performed. It was found that KCl did not exert any significant different effect than that due to NaCl on the activity of these enzymes, while divalent salts (CaCl₂ and MgCl₂) required much lower concentrations to obtain a similar enzyme inhibition rate than NaCl.

Then, a series of salting treatments on dry-cured loin with partial replacement of NaCl content by chloride salts of K⁺, Mg²⁺ and Ca²⁺ were applied, and their effects on proteolysis, lipolysis and sensory quality of the final product were assessed. From these results, those salting treatments which had obtained the best marks, consisting of 50 % NaCl-50 % KCl and 55 % NaCl, 25 % KCl, 15 % CaCl₂ y 5 % MgCl₂ were selected. These formulations were used for the manufacture of two batches of hams with low total salt content, around 2.5 % at the final product, with the aim to study the proteolysis phenomena during the processing and the sensory characteristics of the final product. Also, other two batches of hams using an alternative technique of salting vacuum impregnation with a total salt content among 4.5-5.5 % at the final product were elaborated and the sensory quality of the final product evaluated.

These results pointed out that the partial replacement of NaCl in the dry-cured ham by the indicated K⁺, Mg²⁺ and Ca²⁺ chloride salts mixtures, did not alter significantly the proteolytic phenomena occurring during processing. Additionally, the sensory analysis showed that the hams manufactured with NaCl-KCl at 50 % and total concentrations of salt around 2.5 % were the most valued by the non-trained panel, whereas some defects appeared in those salted using more total salt content (4.5 -5.5 %), particularly related to bitter taste, due to the high K⁺ content.

RESUM

En aquest treball de tesi es va abordar en primer lloc l'estudi "*in vitro*" de l'efecte del NaCl, KCl, MgCl₂ i CaCl₂ sobre l'activitat dels enzims proteolítics musculars (catepsines, dipeptidilpeptidases i aminopeptidases). Es va comprovar que el KCl no exercia cap efecte significativament diferent respecte al NaCl sobre l'activitat dels enzims, mentre que es van necessitar concentracions molt més baixes de sals divalents (CaCl₂ i MgCl₂) per tal d' aconseguir el mateix efecte inhibidor.

A continuació, es van aplicar una sèrie de tractaments de salat en l'homogenat, en els que s'havia substituït parcialment el contingut de NaCl per sals de K⁺, Ca²⁺ i Mg²⁺, i es va avaluar l'efecte d'aquesta substitució sobre la proteolisi, lipolisi i la qualitat sensorial del producte final. A partir d'estos resultats es van seleccionar els tractaments de salat que van obtenir millors resultats: 50 % NaCl-50 % KCl i 55 % NaCl, 25 % KCl, 15 % CaCl₂ i 5 % MgCl₂. Aquestes formulacions van ser utilitzades per a la fabricació de dos lots de pernils amb baix contingut total de sal de 2.5 % en producte final en els que es va dur a terme l'estudi de la proteolisi al llarg del procés d'elaboració dels mateixos, i de la qualitat sensorial del producte final. Així mateix, es van elaborar altres dos lots de pernils utilitzant una tècnica alternativa de salat, la impregnació a buit, i un contingut total en sal entre el 4.5-5.5 % en producte acabat i es va avaluar la qualitat sensorial del producte final.

Els resultats obtinguts en pernil curat indiquen que, la substitució parcial del NaCl per mescles de K⁺, Mg²⁺ i Ca²⁺ en les proporcions indicades, no alterava de manera significativa el fenomen proteolític que va tindre lloc durant la seua elaboració. Així mateix, l'anàlisi sensorial va mostrar que els pernils elaborats amb mescles de NaCl-KCl al 50 % i concentracions de sal de 2.5 % van estar ben valorats pel panell de tastadors, mentre que en els que s'havia empleat una major quantitat de sal (4.5-5.5 %) van detectar defectes especialment quant al sabor amarg, degut al elevat contingut en K⁺.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar al Prof. Dr. Fidel Toldrá y a la Dra. M^a Concepción Aristoy, directores de esta tesis, su orientación y apoyo en la realización de la misma, ya que sin su dedicación, consejos y ayuda no hubiera sido posible su realización.

Asimismo, me gustaría dar mi más sincero agradecimiento al Dr. Miguel Ángel Sentandreu por confiar en mí e introducirme en el mundo de la Ciencia de la Carne y a la Dra. Mónica Flores por su orientación en la realización de los análisis sensoriales.

Al personal del departamento de Ciencia de la Carne, M^a Pilar Valero y Maribel Nadal por su inestimable asistencia en la realización de los análisis químicos y sensoriales. A M^a Angeles García por su saber hacer y resolverme cuantas dudas administrativas se me plantearon.

A los profesores J.M. Barat y Raúl Grau y a la becaria Marta Aliño pertenecientes a la Universidad Politécnica de Valencia, por su colaboración y ayuda en la realización de las experiencias de salado y en el muestreo de los jamones y lomos curados.

Al panel de catadores (Personal del IATA) y al personal de la sala de catas que de forma desinteresada colaboraron en la realización de las catas de jamón y lomo curado.

A mis compañeros de laboratorio, tanto aquellos con los que empecé esta andadura; María, Manolo, Maijo como aquellos con los que terminé Aleida, Alicia, Eli, Liliana, Leticia, Susana y Paolo. Al igual que al resto de compañeros del IATA que durante estos años han estado ahí; en especial a Álvaro por estar siempre incansable preparando planes y a Aurora y Andy, como no, por estar siempre para lo que necesite.

I would also like to acknowledge my foreign supervisors Dra. Marina Heinonen and Dr. Mario Estévez, (Department of Applied Chemistry and Microbiology, Division of Food Chemistry, University of Helsinki, Finland) for welcoming in their laboratory and also in their research group and making me feel at home during my stay abroad. Both of you are outstanding persons and two excellent academic supervisors. I would also like to thank all the mates and collages, but particularly to my Spanish friends Alfonso, Sonia and Isa for their hospitality and friendship.

A Patricia, Tere y Vero por escucharme y darme ánimos en la distancia, en especial en estos últimos meses que tan cuesta arriba se me han hecho.

A mis compis de “Paseo de Rajolar” Ana, Sofía, Maite y John por ser esa pequeña familia de extranjeros en tierras valencianas.

A mis padres por darme su total confianza y apoyo incondicional, y a mis hermanos Ángel y Jorge, testimonio de que con esfuerzo se puede conseguir lo que te propongas. Y a mi sobrino Mateo por ser la luz que me guía.

La realización de esta tesis ha sido posible gracias a la concesión de una Beca F.P.I (BES-2005-9382) del Ministerio de Ciencia e Innovación enmarcada dentro de los proyectos AGL 2004-05064-C02-01 y AGL 2007-65379-C02-01.

A todos vosotros **¡Muchas Gracias!**

*Un científico debe tomarse la libertad de
plantear cualquier cuestión, de dudar de cualquier
afirmación, de corregir errores.*

Julius Robert Oppenheimer.

*A mis padres,
A mis hermanos Ángel y Jorge,
A mi sobrino Mateo.*

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción.....	23
1.1 Historia de la Sal.....	23
1.2 Usos de la Sal en la Industria Alimentaria.....	25
1.3 Efecto de la Sal en la Salud.....	27
1.3.1 Antecedentes Históricos.....	27
1.3.2 Efectos de la Sal en el Organismo.....	28
1.3.3 Sal y Presión Arterial.....	28
1.3.3.1 Estudios epidemiológicos.....	29
1.3.3.2 Estudios de migración.....	30
1.3.3.3 Estudios genéticos en humanos.....	30
1.3.3.4 Estudios de intervención clínica.....	30
1.3.3.5 Empleo de suplementos alimenticios de KCl, CaCl ₂ y MgCl ₂ como tratamiento para la hipertensión.....	31
1.3.4 Adopción de Medidas sobre Sal y Salud.....	33
1.4 La Sal en el Sector Cárnico.....	36
1.4.1 Aporte de Sodio de los Productos Cárnicos.....	36
1.4.2 Funciones de la Sal en los Productos Cárnicos.....	38
1.4.2.1 Estabilización microbiológica del producto.....	38
1.4.2.2 Contribución al Característico Sabor Salado.....	39
1.4.2.3 Regulación de la actividad de las enzimas proteolíticas musculares..	41
1.4.2.3.1 Endopeptidasas.....	42
1.4.2.3.1.1 Calpaínas.....	43
1.4.2.3.1.2 Catepsinas.....	43
1.4.2.3.1.3 Proteosoma.....	45
1.4.2.3.2 Exopeptidasas.....	45
1.4.2.3.2.1 Tripeptidilpeptidasas (TPP).....	45
1.4.2.3.2.2 Dipeptidilpeptidasas (DPP).....	46
1.4.2.3.2.3 Carboxipeptidasas.....	46
1.4.2.3.2.4 Aminopeptidasas.....	47
1.4.2.4 Parcial solubilización de las proteínas miofibrilares.....	48
1.4.2.5 Modificador de la capacidad de retención de agua.....	49
1.4.3 Sal y Oxidación.....	50
1.5 Elaboración de los Productos Curados.....	55
1.5.1 Lomo Curado.....	55
1.5.2 Jamón Curado.....	57

1.5.2.1 Proceso de Salado.....	58
1.5.2.2 Sales de curado.....	58
1.5.2.3 Presalado	60
1.5.2.4 Salado	60
1.5.2.4.1 Salado por vía seca	61
1.5.2.4.2 Salado por vía húmeda	62
1.5.2.5 Factores que afectan a la penetración y difusión de la sal en el interior del jamón.....	63
1.5.2.6 Factores a tener en cuenta en la reducción del contenido de sal en el jamón.....	65
1.6 Reducción del Contenido de Sal en los Alimentos Procesados	67
1.6.1 Problemática que Plantea la Reducción o Sustitución de NaCl en Productos Cárnicos	68
1.6.2 Empleo de Sustancias Alternativas al NaCl.....	69
1.6.3 Respuesta de la Industria Alimentaria a la Reducción del Contenido de Sodio.....	72
2. Objetivos.....	75
3. Plan de Trabajo	81
4. Materiales y Métodos	87
4.1 Materiales	87
4.1.1 Materias Primas	87
4.1.1.1 Sal.....	87
4.1.1.2 Carne.....	87
4.1.1.3 Productos cárnicos para el estudio de oxidación proteica	88
4.1.1.4 Materia prima empleada en la elaboración de los productos curados.....	88
4.1.2 Reactivos Químicos.....	89
4.2 Métodos	90
4.2.1 Fabricación del Lomo Curado	90
4.2.2 Fabricación del Jamón Curado.....	92
4.2.2.1 Elaboración de los jamones destinados a estudio del post-salado.....	92
4.2.2.2 Elaboración de los jamones destinados al estudio del producto terminado	95
4.2.3 Determinación de la Actividad Enzimática.....	100
4.2.3.1 Preparación de extractos enzimáticos musculares.....	100
4.2.3.1.1 Catepsinas.....	100
4.2.3.1.2 Dipeptidilpeptidasas y aminopeptidasas.....	100

4.2.3.2 Medida de la actividad enzimática.....	101
4.2.3.2.1 Catepsinas.....	101
4.2.3.2.2 Dipeptidilpeptidasas.....	101
4.2.3.2.3 Aminopeptidasas.....	102
4.2.3.2.4 Método de medida.....	102
4.2.3.2.5 Cálculos.....	103
4.2.4 Efecto del Cloruro Sódico, Potásico, Cálcico y Magnésico sobre la Actividad de las Enzimas Proteolíticas Musculares.....	104
4.2.5 Determinación de la Actividad Enzimática en Productos Cárnicos.....	104
4.2.6 Determinación de la Concentración de Cationes y Aniones en Productos Cárnicos.....	105
4.2.7 Estudio de la Degradación Proteica en Productos Cárnicos.....	106
4.2.7.1 Extracción de proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares.....	106
4.2.7.2 Determinación de la concentración de proteína.....	107
4.2.7.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	107
4.2.8 Análisis de Aminoácidos Libres en Productos Cárnicos.....	108
4.2.9 Análisis de Ácidos Grasos Libres en Productos Cárnicos.....	110
4.2.10 Análisis de Humedad.....	110
4.2.11 Análisis Sensorial.....	110
4.2.11.1 LomoCurado.....	111
4.2.11.2 Jamón Curado.....	111
4.2.11.2.1 Muestreo.....	111
4.2.11.2.2 Evaluación de las muestras.....	113
4.3 Análisis Estadístico de los Resultados.....	114
4.4 Análisis del Daño Oxidativo en Productos Cárnicos.....	115
4.4.1 Análisis Químicos en Productos Cárnicos.....	115
4.4.2 Estudio de la Oxidación Lipídica en Productos Cárnicos.....	115
4.4.3 Estudio de la Oxidación Proteica en Productos Cárnicos.....	116
4.4.3.1 Método del DNPH.....	116
4.4.3.2 Espectroscopía de fluorescencia.....	117
4.4.3.3 Análisis de los semialdehidos α -aminoadípico (AAS) y γ -glutámico (GGS).....	118
4.4.3.3.1 Preparación de las muestras.....	118
4.4.3.3.2 Cuantificación del AAS y del GGS.....	119
4.4.4 Análisis Estadístico de los Resultados.....	120
5. Resultados y Discusión.....	123

Capítulo I: <i>Efecto del Cloruro Sódico, Potásico, Cálcico y Magnésico Sobre la Actividad de las Enzimas Proteolíticas Musculares</i>	127
Capítulo II: <i>Cambios Bioquímicos en Lomos Curados Salados con Sustitución Parcial del Contenido de NaCl por KCl</i>	137
Capítulo III: <i>Propiedades Bioquímicas y Sensoriales en Lomos Curados con Sustitución Parcial de Sodio por Potasio, Calcio y Magnesio</i>	149
Capítulo IV: <i>Cambios Bioquímicos Durante la Elaboración del Jamón Curado con Sustitución Parcial del Contenido de Cloruro Sódico por Otras Sales (KCl, CaCl₂ y MgCl₂)</i>	161
Capítulo V: <i>Características Sensoriales del Jamón Curado con Sustitución Parcial del Contenido de NaCl por Otras Sales: Influencia del Contenido de Sal y las Condiciones de Procesamiento</i>	183
Capítulo VI: <i>Análisis de la Oxidación en Proteínas de Origen Cárnico mediante el Empleo del Método de la Dinitrofenilhidrazina (DNPH), Espectroscopía de Fluorescencia y Cromatografía Líquida Acoplada a un Espectrómetro de Masas con Fase Electrospray (LC-ESI-MS)</i>	197
6. Discusión General.....	213
7. Conclusiones.....	221
8. Bibliografía.....	225
9. Difusión de Resultados.....	249
10. Anexos.....	251
Anexo 1: <i>Eur. Food Res. Tech.</i> 2009: 229, 93-98.....	255
Anexo 2: <i>Food Chem.</i> 2009: 117, 627-633.....	259
Anexo 3: <i>J. Agric. Food Chem.</i> 2009: 57, (20), 9699-9705.....	263
Anexo 4: <i>Meat Sci.</i> 2009: 83, (1); 104-112.....	267

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1 Historia de la Sal

La costumbre de adicionar sal a la comida se remonta a tiempos de la prehistoria. Hay quienes la sitúan en el periodo del Neolítico (7.000 años antes de Cristo), otros en la edad de Bronce. Durante la época neolítica, el mayor consumo de vegetales que siguió a la introducción de la agricultura y de la vida sedentaria la convirtió en un elemento de primera necesidad. Se había incorporado a su modo de vida, primero como conservante de alimentos y luego añadida como condimento a la dieta, permitiendo de este modo el desarrollo y asentamiento de las comunidades y convirtiéndose en una de las sustancias más comerciadas y apreciadas.

La sal empezó a utilizarse en los sitios donde se encontraba fácilmente, es decir, regiones como el Oriente Medio, del Jordán, Nilo, valles de Méjico y del Perú, China y Europa Central. La cultura que primero documentó el uso, extracción y explotación de la sal fue la china (desde el siglo XXVII A.C.). En el Imperio chino, la sal tuvo un gran auge, de tal forma que 511 años antes de Cristo, el impuesto sobre la venta de sal significaba el 80 % de sus ingresos.

El valor de la sal queda reflejado, por ejemplo, en la antigua Grecia, donde un esclavo valía su peso en sal. Además, en la cultura de los pueblos antiguos la imagen de la sal estaba unida a los conceptos de fidelidad, de la amistad y de la mutua confianza e incluso se convirtió en un símbolo religioso. En el Imperio Romano se crearon rutas específicas en Europa para facilitar el mercadeo de la sal, una de las más importantes tiene su origen en Roma, y es la denominada “Vía Salaria”. El uso de la sal estaba tan extendido, que los legionarios romanos recibían cada día como parte del pago de sus servicios un puñado de sal al que denominaron “*salarium*”, término del que deriva la palabra salario en castellano. Mientras que, en Roma, uno de sus primeros reyes, Ancus Martius instauró un tipo de impuesto sobre la sal denominado “salinator”. La valoración como moneda de cambio de la sal que había estado llevándose a cabo, así como el hecho de que sólo se encontraba en

determinados y concretos puntos de un territorio y debía de ser transportada por las obligadas “rutas de la sal”, despertó la codicia hacia su control y monopolio, dando origen a importantes ciudades y centros de comunicación, a la par que fue causa de múltiples guerras (James et al., 1987, Nestle 2002).

Durante la Edad Media los señores feudales se hicieron con el control de las explotaciones salinas e impusieron elevados impuestos a sus consumidores (Puig, 1984). En épocas más modernas, se impuso la compra obligatoria de la sal, en la cantidad que los recaudadores estipulaban y a un precio fijado. Es decir, no se compraba la sal que uno suponía necesitar, sino que le imponían la cantidad que tenía que comprar o consumir, lo que en Francia se denominó “la gabelle”. En otros países no existía “la gabelle”, sino un fuerte impuesto sobre la venta de sal. De hecho, en el siglo XVII, a un obrero el coste de sal de un año le equivalía a dos semanas de trabajo (Fritsche, 1964). No fue hasta la Revolución Francesa (1789), cuando se inició la abolición de este impuesto, dado que se desarrollaron nuevos procesos industriales para la conservación de alimentos.

Ya a comienzos del siglo XIX, la idea de generar frío artificial para conservar los alimentos se va perfeccionando poco a poco con numerosas invenciones que mejorarían las prestaciones ya existentes. De tal manera que progresivamente la explotación y venta de la sal fue declarándose libre en toda Europa culminando el libre comercio de la misma durante el siglo XX (Laszlo, 2001). Los avances en la conservación de alimentos y la eficiencia de la industria de la sal hicieron decrecer la demanda mundial de sal. Así pues el uso de la sal fue más allá de la condimentación y la conservación ya que empezó a emplearse en la fabricación de numerosos productos industriales, químicos y farmacéuticos. Asimismo, durante este siglo los beneficios y perjuicios del consumo excesivo de sal se fueron clarificando cuando en el año 1994 el COMA (Comittee on Medical Aspects of Food and Nutrition Policy) recomienda una dosis máxima de ingesta de sal por persona de 6 g al día.

Y a comienzos del siglo XXI, las normas dietéticas de la mayoría de países occidentales recomienda reducir la cantidad total de sal en los alimentos procesados, tal y como se refleja en la Tabla 1 en la que aparecen las recomendaciones de la Food Standard Agency (FSA) para algunos de estos productos. Todo esto se debe a que cada vez es más evidente la relación existente entre la ingesta de elevadas cantidades de sal en la dieta y el aumento de la presión arterial (He y MacGregor, 2003; Obarzanek et al., 2003).

1.2 Usos de la Sal en la Industria Alimentaria

El cloruro de sodio, comúnmente conocido como “sal”, representa el ingrediente más usado en alimentación después del azúcar (Reddy y Marth, 1991). De manera tradicional se ha usado como conservante de alimentos ya que es capaz de disminuir la actividad de agua del producto previniendo el crecimiento de microorganismos patógenos (Kurlanski, 2002). Sin embargo, la sal no solo actúa como agente conservante sino que también ejerce diversas funciones en el alimento ya que es capaz de enriquecer el sabor de un producto e incluso a veces se le atribuye la capacidad de influir en la textura y el “cuerpo” de un alimento. Por todas estas razones, se utiliza en el proceso de elaboración de una gran variedad de alimentos (ver Tabla 1).

Así, en productos lácteos como los quesos además de controlar el crecimiento microbiano, ayuda al desarrollo del sabor y la textura del alimento durante la etapa de maduración ya que regula la actividad de los enzimas proteolíticos (Kilcast y Ridder, 2007).

En la industria panadera se utiliza como enriquecedor del sabor y juega un papel importante controlando el ritmo de fermentación de las levaduras. En los encurtidos, el alimento se sumerge durante un cierto tiempo en una solución de vinagre y sal, donde la sal actúa controlando la flora bacteriana y evitando el desarrollo de procesos fermentativos indeseables (Reddy y Marth, 1991). En pescados, como el bacalao y la anchoa la utilización de la sal representa un método clásico para la conservación de este tipo de productos, que tradicionalmente

comprende una etapa de salazón seguida por un secado al aire libre (Bjornson, 2000).

Tabla 1. Contenido de sodio en alimentos procesados (2007) y las recomendaciones de la Food Standards Agency (FSA) para el año 2010.

Tipo de Alimento	n	Contenido de sodio (mg/100g)	Nivel máximo de sodio (mg/100g) recomendado por la FSA en 2010
<i>Pan</i>			
Blanco	29	449	400
Integral	13	459	400
Otros	15	448	400
<i>Cereales</i>			
Bajos en Fibra	5	618	300
Altos en fibra	27	226	300
<i>Queso</i>			
Curado	23	637	670
Fundido	16	1183	1170
Cremoso	3	282	320
<i>Galletas</i>			
Para el Desayuno	13	708	500
Rellenas de Chocolate	5	166	280
Aperitivos Salados	14	887	500
<i>Productos Cárnicos</i>			
Productos curados y embutidos	10	1101	1000
Salchichas	8	747	550
Bacon	9	1420	1400
Hamburguesas	2	440	400
<i>Pescados</i>			
Conservas de Atún	7	357	300
Conservas de Salmón	2	440	300
<i>Sopas</i>			
En sobre	9	274	280
En conserva	9	329	25
<i>Pizza</i>	15	405	470
<i>Salsas</i>			
Para pasta	3	439	470
Para el resto de platos	8	539	470
<i>Mayonesas</i>	7	604	600
<i>Conservas de pastas</i>	6	331	300
<i>Conservas de legumbres</i>	13	235	50
<i>Snacks</i>	9	659	600

Pero sin duda alguna, es en los productos cárnicos donde la sal tiene una mayor importancia debido a que contribuye a la capacidad de retener agua del

producto, controla el crecimiento microbiano, facilita la solubilización de ciertas proteínas y confiere el típico sabor salado. Además, afecta a reacciones enzimáticas como la proteólisis, la lipólisis y la oxidación que influyen directamente en el desarrollo de la textura, el aroma y el sabor del producto (Andrés et al., 2004; Guárdia et al., 2006; Toldrá, 2006a).

De la sal se puede conocer el consumo en toneladas por una determinada nación; sin embargo, la cifra pierde precisión cuando se refiere a la cantidad que se destina a la alimentación, y de ésta, la destinada a la salazón y conservación de alimentos y la destinada a la cocina y mesa. La imprecisión aumenta a medida que intentamos acercarnos al consumo individual, ya que existen numerosas diferencias. De cualquier manera, se podría establecer que la mayor parte de la sal presente en nuestra dieta es añadida por la industria de la alimentación y el sector de la hostelería (restaurantes, catering y comida rápida). Esta representa aproximadamente el 76 % de la ingesta diaria de sal, siendo el pan y los cereales (38 %), los productos cárnicos (17 %), los productos lácteos (11 %) y los condimentos (9 %) los mayores colaboradores a dicha ingesta (Dyer et al., 1997; Margerison et al., 2004). Del 24 % restante, el 19 % es añadida durante el cocinado o en la mesa y tan solo el 5 % es constituyente natural de los alimentos (Gilbert y Heiser, 2005).

1.3 Efecto de la Sal en la Salud

1.3.1 Antecedentes Históricos

200 años A.C. los chinos Huan Ti Nei y Ching Su Wen, ya relacionaban el consumo de sal con las funciones renal y cardíaca.

A principios del siglo XIX, clínicos franceses señalaron la interrelación existente entre la sal y la hipertensión, e intentaron disminuir el consumo de sal por parte de los enfermos hipertensos. Estas observaciones estimularon una serie de estudios sobre la relación entre la sal y la hipertensión, que a causa de los recursos de la época y las técnicas analíticas empleadas, condujeron a malas interpretaciones. Puesto que, se dedujo que era el ión cloro el causante de los trastornos en la tensión

arterial, y consecuentemente se recomendaron dietas llamadas “decloruradas”, a base de sales de sulfato, formiato u otras, hasta que Gamble et al. (1923) demostraron que era el ión sodio y no el ión cloro el responsable de provocar problemas de hipertensión.

A principios del siglo pasado, cuando el tema quedó aclarado, se produjo de nuevo una grave controversia, ya que los científicos de la época pretendieron sustituir el cloruro sódico por el cloruro potásico, dado que aunque este último, si bien puede amortiguar los efectos del sodio, también puede provocar alteraciones del ritmo cardíaco, acidosis y debilidad muscular (Puig, 1984).

En la actualidad, se han llevado a cabo estudios empleando suplementos alimenticios de CaCl_2 y MgCl_2 como tratamiento para la hipertensión aunque los resultados obtenidos no han sido concluyentes (Beyer et al., 2006).

1.3.2 Efectos de la Sal en el Organismo

La sal está constituida por los iones sodio y cloruro en una proporción del 40 y 60 %, en peso respectivamente; de modo que una cucharadita de sal (aproximadamente 6 g) contiene 2.4 g de sodio.

Ambos iones (Na^+ y Cl^-) desempeñan diferentes funciones en el organismo. El sodio junto con el potasio es un elemento mineral esencial para poder llevar a cabo la regulación del balance hídrico corporal, la transmisión del impulso nervioso y la inervación muscular. Este se encuentra en un 50 % en los líquidos extracelulares, un 10 % dentro de las células y en un 40 % en los huesos. El cloruro es el anión del ácido clorhídrico; forma parte del líquido intra y extracelular, es necesario para mantener el equilibrio ácido-base y la osmolaridad de los tejidos; asimismo participa en la activación enzimática digestiva (Reddy y Marth, 1991).

1.3.3 Sal y Presión Arterial

En la mayor parte de las dietas actuales, el contenido de sal excede la necesaria para el mantenimiento de la homeostasis electrolítica del organismo. En

estas condiciones de exceso es de vital importancia el riñón como órgano regulador aunque se ha sugerido que existe un cierto grado de incapacidad por parte de éste para eliminar el exceso de sodio. Esta circunstancia daría lugar a un aumento de la presión arterial, que forzaría la eliminación del sodio sobrante a través de un mecanismo de incremento de presión denominado natriuresis. Cualquier fallo en esta adaptación, que requiere un funcionamiento coordinado del sistema circulatorio, de la filtración glomerular y de la función tubular renal puede provocar la aparición de hipertensión arterial.

Esta hipótesis viene avalada por diversos experimentos realizados en animales de experimentación. De hecho, los efectos de la sal sobre la hipertensión son muy evidentes en algunos animales de laboratorio. En el chimpancé, por ejemplo, se ha demostrado que al añadir sal a su dieta habitual, se produce un significativo aumento de la presión arterial al cabo de un periodo de solo veinte meses. Los estudios en animales de experimentación sugieren también que las dietas ricas en sal no solamente dan lugar a un aumento de la presión arterial, sino que favorecen además las complicaciones derivadas del mismo como la hipertrofia del ventrículo izquierdo o los accidentes vasculares cerebrales.

En cambio, la demostración de que existe una relación entre el consumo de sal y los niveles de presión arterial en el ser humano se basan en investigaciones de tipo antropológico, en estudios de carácter epidemiológico, de migración, ensayos de intervención clínica y genéticos (Segura et al., 2000; He, y MacGregor, 2003; Lev-Ran y Pota, 2005; He y Mac Gregor, 2007).

1.3.3.1 Estudios epidemiológicos

La mayoría de estudios epidemiológicos realizados por investigadores de todo el mundo relacionan el consumo elevado de sal y la hipertensión. Uno de los más conocidos es el estudio INTERSALT (An International Study of Electrolyte Excretion and Blood Pressure), que comprobó de manera positiva el grado de asociación entre la ingesta de sal y la presión arterial. Según este estudio, aquellos

individuos cuya ingesta diaria de sal se redujo a 5.8 g al día presentaron una disminución de la presión arterial sistólica de 3.1 mm de Hg (INTERSALT, 1988). De hecho, aquellas poblaciones que tenían una dieta baja en sal presentaban niveles más bajos de presión arterial (Elliott et al., 1996).

Estudios más recientes como el INTERMAP (International Study on Micronutrient and Blood Pressure), el EPIC-Norfolk (The Norfolk Cohort of the European Prospective Investigation into Cancer) y el WHO-Cardiac (World Health Organization Cardiovascular Diseases and Alimentary Comparison) también confirmaron la relación existente entre la presión arterial y la sal, llegando a la conclusión final de que una disminución en la ingesta diaria de sal produciría una disminución generalizada de la presión arterial en la población (He y MacGregor, 2007; Mohan y Campbell, 2009).

1.3.1.2 Estudios de migración

Los grupos de población que migran de zonas donde se consume poca cantidad de sal, generalmente zonas rurales, a otras donde la ingesta de sal es elevada, generalmente grandes urbes, muestran un aumento en la presión arterial (He y MacGregor, 2007; Mohan y Campbell, 2009).

1.3.1.3 Estudios genéticos en humanos

Actualmente se conocen las causas genéticas de la hipertensión humana por las que se encuentra afectada la capacidad de excreción de sodio por los riñones y se indica claramente la relación de la sal con la regulación de la presión arterial (Lifton et al., 2001).

1.3.1.4 Estudios de intervención clínica

Los resultados de la mayoría de estudios de intervención clínica en humanos generalmente confirman que se produce un aumento de la presión arterial

cuando se incrementa la ingesta de sal y por el contrario, dietas bajas en sal producen una reducción de la presión arterial.

Uno de los estudios más importantes fué el DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension) que trató sobre el efecto de la ingesta de sodio sobre la presión arterial a tres niveles diferentes (bajo, intermedio y alto) utilizando dos dietas: la dieta DASH (rica en magnesio, potasio, calcio así como proteínas y fibras) y una dieta control. El tipo de dieta y la cantidad de sodio que se ingirieron fueron determinantes en la reducción de la presión arterial (Sacks, et al., 2001).

1.3.3.5 Empleo de suplementos alimenticios de KCl, CaCl₂ y MgCl₂ como tratamiento para la hipertensión

Durante la última década se han llevado a cabo diversos estudios que sugieren una relación clara y evidente entre la ingesta de calcio, potasio y/o magnesio y la presión arterial. Así pues, un aumento en el consumo de estos minerales podría disminuir la presión arterial a corto plazo. De hecho, las funciones y la concentración celular de estos minerales en el organismo están interrelacionadas con las del ión sodio (Laragh y Brenner, 1995; Hooper et al., 2002; He y MacGregor, 2004).

El potasio es uno de los cationes más abundantes en el organismo. En la naturaleza está presente en forma de sal orgánica e inorgánica en gran cantidad de frutas, verduras, legumbres y oleaginosas. De hecho, el consumo diario de K⁺ se sitúa entre 25-90 mmol/día (Luft y Weinberger, 1987). La ingesta de K⁺ juega un papel importante en la regulación de la presión arterial. Un incremento en la ingesta diaria de potasio, alrededor de 30-45 mmol K⁺ al día, es capaz de provocar una disminución de la presión arterial entorno a 2-3 mm de Hg (INTERSALT 1988; Dyer et al., 1994; Buemi et al., 2002; He y MacGregor, 2007). Varios mecanismos parecen estar involucrados en la disminución de la presión arterial provocada por el potasio; ya que es capaz de mejorar la natriuresis, así como de reducir la actividad nerviosa simpática y de disminuir la respuesta presora a la noradrenalina y a la

angiotensina II (Vaskonen, 2003; Nowson et al., 2003; Beyer, et al., 2006; He y MacGregor, 2007).

El calcio es un elemento esencial para llevar a cabo muchas de las funciones biológicas en el organismo. La mayor parte se encuentra en los huesos y dientes y únicamente el 1% se encuentra en el líquido plasmático. De este 1 %, casi la mitad se encuentra en forma ionizada, mientras que el resto se encuentra unido a proteínas o formando complejos (Schuchardt et al., 2008). Solo la forma ionizada es fisiológicamente activa y actúa como mensajero secundario mediando respuestas celulares a una gran variedad de estímulos y al mismo tiempo actúa como vasoconstrictor del tono muscular, en la secreción de catecolaminas, en la regulación del sistema nervioso simpático, y en la regulación de la presión arterial (Buemi et al., 2002). Los pacientes hipertensos normalmente muestran niveles bajos de calcio plasmático por lo que elevar los niveles de calcio en la dieta aumentaría la excreción de sodio y favorecería una disminución de la presión arterial (Beyer et al., 2006; Schuchardf et al., 2008). Sin embargo, estudios realizados con anterioridad por Sacks et al., (1998) cuestionaron esto, debido a que solamente se logró una pequeña disminución de la presión arterial, de 0-1.7 mm Hg, en personas hipertensas.

El ión magnesio es otro de los cationes más abundantes en el organismo. Interviene como cofactor en la regulación de muchos procesos biológicos a nivel celular, como la síntesis de proteínas, también regula el funcionamiento de las bombas de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ e incluso interviene en la contracción muscular. Por otro lado, participa estrechamente en la regulación del equilibrio osmótico celular, a través de su asociación con el sodio, el calcio y el potasio (Gums, 2004).

Diversos estudios sostienen que niveles bajos de magnesio en el organismo están relacionados con problemas de hipertensión, en base a las propiedades vasodilatadoras que este catión posee. De hecho existe una clara relación dosis-respuesta entre la ingesta de magnesio y la presión arterial (Beyer et al., 2006).

Así pues, una reducción de la ingesta diaria de sodio, junto con un incremento en la ingesta de potasio podría ayudar a mantener la presión arterial dentro de sus límites en personas hipertensas. Sin embargo, actualmente no existen estudios suficientes para que podamos sugerir que los suplementos alimenticios de calcio y magnesio tengan el mismo efecto, con eso y con todo, la dieta DASH, rica en potasio, calcio, magnesio, fibra y proteína y baja en sodio, podría ser una dieta relativamente eficaz para reducir la presión arterial, ya que se comprobó una disminución de ésta en los sujetos sometidos a este tipo de dieta (Sacks et al., 2001).

1.3.4 Adopción de Medidas sobre Sal y Salud

En la mayoría de países desarrollados, la reducción de la ingesta de sal se puede lograr mediante un descenso gradual y sostenido en la cantidad de sal que la industria alimentaria añade a sus productos. Paralelamente son necesarias las campañas de salud pública para alentar a los consumidores a usar menos cantidad de sal en el cocinado doméstico.

En este sentido, son mucho los países que han elaborado sus propias recomendaciones sanitarias dirigidas a distintos sectores de la población (niños, ancianos, industria alimentaria, restauración) y han sugerido distintas medidas para llegar a la meta admitida como saludable por la Organización Mundial de la Salud (OMS), que es de 6 g al día como máximo (ver Tabla 2).

Tabla 2. Directrices de la ingesta de sal marcadas por el “Scientific Advisory Committee on Nutrition” (SACN).
(Fuente: <http://www.sacn.gov.uk>).

Edad	Ingesta media recomendada de sal (g/día)
0-6 meses	< 1 g/ día
7-12 meses	1 g/día
1-3 años	2 g/día
4-6 años	3 g/día
7-10 años	5g/día
11-14 años	6g/día
Adultos	6g/día

En España, una de las acciones más relevantes llevada a cabo durante los últimos años desde el Ministerio de Sanidad y Consumo, a través de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) fue la Estrategia NAOS (Estrategia para la Nutrición, Actividad Física y Prevención de la Obesidad) cuyo objetivo fue fomentar una alimentación saludable y promover la actividad física para invertir la tendencia ascendente de la obesidad y, con ello, reducir sustancialmente la morbilidad y mortalidad atribuible a enfermedades crónicas como las enfermedades cardiovasculares, *diabetes mellitus* tipo 2, hipertensión arterial y ciertos tipos de cáncer (Fuente: Ministerio de Sanidad y Política Social, 2005).

Uno de los proyectos surgidos a raíz de esto sería reducir la sal en la alimentación. Así pues, han surgido nuevas iniciativas para contrarrestar los datos recogidos por la AESAN que aseguran que en nuestro país el pan es el alimento que más sodio aporta a la dieta, en concreto, el 19 % del total ingerido. Hasta el momento se ha conseguido que la misma cantidad de pan aporte un 25.9 % menos de sal (Fuente: Ministerio de Sanidad y Asuntos Sociales, 2005).

Asimismo, un estudio reciente en el cual se determinó la cantidad de sal que contienen 67 alimentos procesados, entre los cuales figuran embutidos, cereales de desayuno, patatas fritas, anchoas en conserva, etc., reveló que solamente, 15 de los 67 alimentos estudiados indicaban la cantidad de sal o sodio que contenían (ver Tabla 3).

Dado que el consumo excesivo de sal está vinculado con la hipertensión, parecería exigible que el contenido en sal estuviera claramente indicado en la etiqueta de los alimentos ya que el consumidor necesita información precisa y veraz para elegir conforme a sus necesidades (Fuente: Revista Consumer.es, 2006). Con esta información, se debería evitar el consumo de alimentos con más de un 1.3 % de sal o al menos ser consumidos de manera ocasional por personas que deban seguir una dieta baja en sodio.

Tabla 3. Contenido de sal en 67 alimentos procesados. ⁽¹⁾ Etiquetado incorrecto; hace referencia exclusivamente a sí la cantidad de sal o de sodio es la correcta. Se ha estimado incorrecta cuando la cantidad de sal supera en un 20 % a la indicada en su etiqueta. ⁽²⁾ Sopas de sobre: el contenido reflejado en la tabla hace referencia a 100 gramos de sopa ya elaborada (Fuente: www.revista.consumer.es: Alimentos elaborados cuanta sal tienen, 2006).

PRODUCTO	MARCA	VALORES DECLARADOS		VALORES REALES		VALORACIÓN DEL ETIQUETADO
		Sal (%) (Cloruro sódico)	Sodio	Sal (g/100g) (Cloruro sódico)	Sodio (mg/100g)	
Filetes de anchoa de la costa del Cantábrico	La Nutricuara	No indica	No indica	14,67	5,77	
Filetes de anchoa del Cantábrico	De Nuestra Tierra	No indica	No indica	13,65	5,37	
Filetes de anchoa	Aldaz	No indica	No indica	13,26	5,21	
Jamón Trevelez Cumbre Frita	Noel	No indica	No indica	6,63	2,61	
Jamón curado	Navidul	No indica	No indica	5,14	2,02	
Jamón curado loncheado	España	No indica	No indica	3,99	1,57	
Salchichas Junior	Oscar Mayer	No indica	No indica	5,72	2,25	
Salchichas Frankfurt	El Pozo	No indica	No indica	3,28	1,29	
Salchichas Frankfurt	Campofrío	No indica	No indica	2,75	1,08	
Chorizo recto Soria extra	Moreno Saez	No indica	No indica	4,55	1,79	
Chorizo extra Tradición	Revilla	No indica	No indica	4,48	1,76	
Chorizo Vela	Argal	No indica	No indica	3,92	1,54	
Aceitunas rellenas de anchoas Clásicas	La Española	No indica	1,16 g	3,59	1,41	Incorrecto ¹
Aceitunas rellenas de anchoas	Sarasa	No indica	No indica	2,34	920	
Aceitunas manzanillas verdes rellenas de anchoa	Torre de Plata	No indica	No indica	1,96	770	
Ketchup	Heinz	No indica	No indica	3,2	1,26	
Ketchup	Prima	No indica	No indica	3,19	1,25	
Ketchup	Orlando	No indica	No indica	2,83	1,11	
Jamón York	Noel	No indica	No indica	2,8	1,1	
Jamón York	Campofrío	No indica	No indica	2,34	920	
Jamón York	Argal	No indica	No indica	2,26	890	
Queso curado	Gamonal	No indica	No indica	2,8	1,1	
Queso curado	El Pastor	No indica	No indica	2,11	830	
Queso curado	Flor de Esqueva	No indica	No indica	1,6	630	
Aperitivos de maíz horneado	Rufinos	No indica	No indica	2,75	1,08	
Productos de aperitivo horneados	Tejitas Matariel	No indica	No indica	0,86	340	
Productos de aperitivo horneados: Gusanitos	Risi	No indica	No indica	0,79	310	
Paté de hígado de cerdo	La Pira	No indica	No indica	2,01	790	
Paté de hígado de cerdo	Apis	No indica	No indica	1,81	710	
Paté de hígado de cerdo	Mna	No indica	No indica	1,6	630	
Patatas fritas	Santa Ana	No indica	No indica	1,94	760	
Patatas fritas	Lays	No indica	0,7 g	1,91	750	Correcto
Patatas fritas artesanas en aceite de oliva	Santa Clara	No indica	No indica	0,96	380	
Copos de maíz tostados	Pascual	No indica	0,83 g	1,83	720	Correcto
Copos de trigo integral	Nestlé	No indica	0,5 g	1,17	460	Correcto
Copos de maíz tostados y azucarados	Kellogs	No indica	0,45 g	1,04	410	Correcto
Queso en lonchas "Sabanitas"	Hochland	No indica	No indica	1,73	680	
Queso en lonchas	El Caserio	No indica	No indica	0,05	20	
Queso en lonchas "Tranchetes"	Krafft	No indica	No indica	0,03	10	
Pizza	Palacios	No indica	No indica	1,42	560	
Pizza	Tarradellas	No indica	No indica	1,4	550	
Pan común		No indica	No indica	1,28	500	
Croquetas con jamón serrano congeladas	La Cocinera	No indica	No indica	1,17	460	
Croquetas de jamón congeladas	Findus	No indica	0,5 g	1,12	440	Correcto
Ensalada rusa con atún	Mizanor	No indica	No indica	1,14	450	
Ensalada rusa con atún	McSalad	No indica	No indica	0,92	360	
Ensaladilla rusa	Frudesa	0,9 g	No indica	0,88	350	Correcto
Alubias con chorizo	Orlando	No indica	No indica	1,13	440	
Fabada asturiana	Litoral	No indica	0,33 g	0,9	350	Correcto
Fabada	La Asturiana	No indica	No indica	0,44	170	
Atún claro en aceite girasol	Rianzera	No indica	0,62 g	1,09	430	Correcto
Atún claro en aceite vegetal	Calvo	No indica	0,67 g	1	390	Correcto
Atún claro en aceite vegetal	Isabel	No indica	0,5 g	0,03	10	Correcto
Pan de molde	Brook's	No indica	0,59 g	1,05	410	Correcto
Pan de molde	Bimbo	No indica	0,445 g	1,03	400	Correcto
Pan de molde	Panrico	No indica	0,43 g	0,96	380	Correcto
Lasaña boloñesa	Noel	No indica	No indica	1,01	400	
Lasaña boloñesa	Come a casa	No indica	No indica	0,99	390	
Lasaña boloñesa	Eutoni	No indica	No indica	0,76	300	
Galletas Marbú Dorada	Fontaneda	No indica	No indica	0,84	330	
Galletas Doradas al horno	Flora	No indica	0,3 g	0,52	200	Correcto
Galletas Doradas al horno	Yayitas de Lu	No indica	No indica	0,2	80	
Preparado alimenticio al cacao	Nesquik	No indica	No indica	0,41	160	
Preparado alimenticio al cacao	Cola Cao	No indica	No indica	0,19	70	
Sopa de sobre "Sopa Maravilla" 2	Knorr	No indica	No indica	0,09	34	
Sopa de sobre "Sopa de cocido" 2	Maggi	No indica	No indica	0,08	30	
Sopa de sobre "Sopa de verduras" 2	Gallina Blanca	No indica	No indica	0,08	30	

1.4 La Sal en el Sector Cárnico

La sal es uno de los ingredientes habitualmente empleados en la elaboración de productos cárnicos; de hecho ha sido utilizada desde la antigüedad por su acción conservante debido a que es capaz de reducir la actividad de agua del producto y, por lo tanto, retrasar el crecimiento microbiano. La sal es además un agente potenciador del sabor y también es responsable del desarrollo de la textura, y característico sabor en los productos cárnicos procesados.

1.4.1 Aporte de Sodio de los Productos Cárnicos

La carne y los productos cárnicos contribuyen en gran medida al aporte diario de sodio, ocupando el segundo puesto después de los cereales y sus derivados (Figura 1).

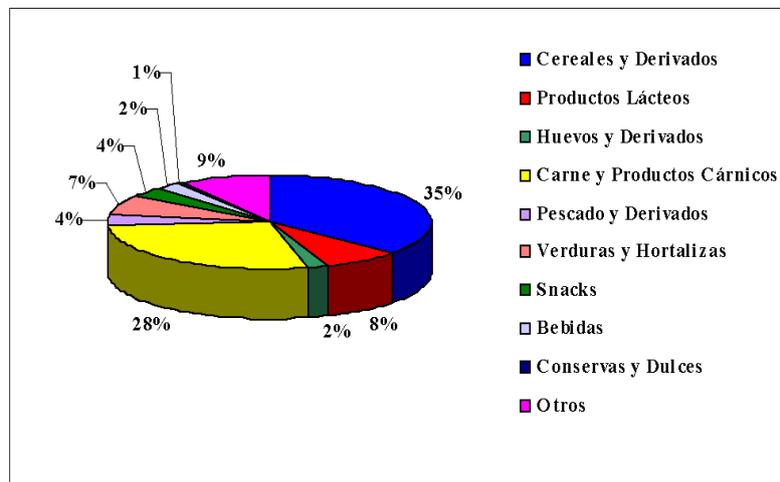


Figura 1. Contribución de diferentes alimentos procesados a la ingesta diaria de sal (NDNS adults aged 19 to 64, volume 5, 2004).

La mayor parte de este aporte proviene de los productos cárnicos procesados, aunque hay diferencias entre países. El consumo de productos cárnicos está ampliamente extendido, representando una parte importante de la ingesta diaria de sal, que puede llegar al 30 %, en Irlanda, Inglaterra o E.E.U.U. la contribución

diaria de sal por parte de los productos cárnicos procesados se sitúa entorno al 20 % (Desmond et al., 2006).

También hay que tener en cuenta que no todos los productos cárnicos contienen los mismos niveles de sal e incluso dentro de un mismo producto puede variar considerablemente su contenido en sal. Así, en productos cocidos y en embutidos cárnicos fermentados, como el salchichón, nos podemos encontrar porcentajes de sal del orden del 2-3 %, en bacon del 3- 4 %, mientras que en jamón curado el porcentaje de sal se sitúa entorno al 5-8 % (Ruusunen y Puolanne, 2005; Matthews y Strong, 2005; Guárdia et al., 2006; Desmond et al., 2006).

En el caso del jamón curado, la sal es sin duda alguna el ingrediente más importante tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo. Por ello, el Na^+ es el elemento mayoritario, variando su concentración entre 30.8 y 57.0 mg / g en función del método de salado empleado en los diferentes tipos de jamón curado procedentes de países del sur de Europa (Tabla 4).

Tabla 4. ^a Valores medios y S.D. del contenido en NaCl y grasa del músculo *Biceps femoris* de jamones Europeos expresado en base húmeda (Monin, 1995); ^b Valor medio y S.D. del contenido de Na^+ del músculo *Biceps femoris* de jamones Europeos expresado en base seca (Lozano et al., 1998).

Parámetro	Tipo					
	<i>Jamón De Bayona</i>	<i>Corso</i>	<i>Ibérico</i>	<i>Italian Country Style</i>	<i>Parma</i>	<i>Serrano</i>
^a NaCl (%)	6.9±0.8	10.3±1.5	5.2±0.9	7.1±1.5	6.9±0.6	7.9±0.9
^a Grasa (mg/g)	31.0±8.7	128.3±44.8	105.0±22.8	31.4±11.2	42.7±13.9	41.2±15.7
^b Na ⁺ (mg/g)	49.1±7	57.0±15.8	30.8±6.4	48.4±10.6	51.4±6.7	55.1±6.5

Asimismo, durante la elaboración de algunos productos cárnicos se añaden ciertos aditivos adicionales como el glutamato monosódico, el fosfato sódico, el nitrato sódico, el ascorbato sódico o el nitrito sódico que van a actuar como fuentes adicionales de sodio, aunque, la contribución al contenido final de sodio por parte de éstos es baja en comparación con la del cloruro sódico que es aproximadamente de un 75 % (Ruusunen y Puolanne, 2005; Desmond, 2006).

1.4.2 Funciones de la Sal en los Productos Cárnicos

La sal mejora la aptitud tecnológica de los productos cárnicos. Afecta a la textura al aumentar la capacidad de retención de agua y facilita la incorporación de la grasa a la masa cárnica. Es también esencial para el desarrollo del aroma y sabor. Asimismo, es necesaria para la conservación de los productos cárnicos por su efecto bacterioestático (Terrell, 1983). Los estudios para la reducción de sal deben abordar la problemática que plantea la disminución o la sustitución parcial de ésta sobre el producto cárnico (propiedades sensoriales, estabilidad, tiempo de vida útil, etc.).

Por lo tanto, para establecer el tipo de estrategia a seguir a la hora de reducir el contenido de sal en los productos cárnicos es de vital importancia revisar las funciones que realiza la sal en los mismos.

1.4.2.1 Estabilización microbiológica del producto

El cloruro sódico actúa como agente bacteriostático, frenando el crecimiento microbiano. Este hecho se debe fundamentalmente al descenso de la actividad del agua (a_w) que provoca su adición y que se ve reflejado en una deshidratación osmótica del producto cárnico y, por consiguiente, inhibe la proliferación de los microorganismos.

El modo de actuación del cloruro sódico “sal” sobre la a_w se debe a que es capaz de ionizarse completamente en soluciones acuosas en los iones Na^+ y Cl^- , los cuales son capaces de atraer hacia sí las moléculas de agua haciendo que no estén disponibles para el crecimiento de los microorganismos y provocando la deshidratación del producto cárnico. Este efecto de deshidratación también ejerce una acción directa sobre las enzimas que se expresa en un aumento de la vida útil del producto (Man, 2007).

El efecto conservador del NaCl se encuentra condicionado por la concentración de sal añadida al producto. De hecho, se requieren concentraciones muy altas en medios de cultivo (en torno al 10 % en peso) para inhibir el

crecimiento de gran número de especies microbianas. En la práctica, las concentraciones de cloruro sódico presentes en los productos cárnicos curados, en concreto en jamón curado no llegan a niveles del 10 % en peso por lo que no serían suficientes para ejercer un efecto bacteriostático por sí solo que permita la conservación del producto y, por tanto, se hace necesario el uso paralelo de otros conservantes como los nitratos y los nitritos que controlen el crecimiento microbiano, protegiendo así al producto de posibles contaminaciones y con ello lograr inhibir o retardar el crecimiento de bacterias como *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* o *Staphylococcus aureus* (Toldrá, 2002; Matthews y Strong, 2005; Betts, et al., 2007).

Por otro lado, hay muy pocos datos disponibles acerca de las propiedades antimicrobianas de las sales empleadas como sustitutivas del NaCl como son el cloruro potásico (KCl), el cloruro cálcico (CaCl_2), el cloruro magnésico (MgCl_2) y el lactato sódico o potásico. Solamente se ha demostrado que el empleo de KCl tiene efectos similares al del NaCl, sobre la conservación de los productos cárnicos, lo mismo que el lactato potásico a concentraciones del orden del 3 % (Betts et al., 2007).

1.4.2.2 Contribución al Característico Sabor Salado

La sal confiere el sabor salado a los productos cárnicos curados y potencia el desarrollo de su sabor característico. La percepción del sabor salado y su intensidad dependen del contenido de sal en el producto y es provocada por la estimulación de las papilas gustativas de los bordes laterales de la lengua al entrar en contacto con la sal. De este modo, los iones Na^+ y Cl^- , que a bajas temperaturas se encuentran formando complejos estables con las proteínas, son destruidos por el calentamiento, hecho que hace que se perciba la sensación a salado. Esto explica que un mismo producto tenga sabores salados más acusados cuando es calentado (Figura 2) (Russunen y Puolanne, 2005; Desmond, 2006; Kilcast, y Ridder, 2007).

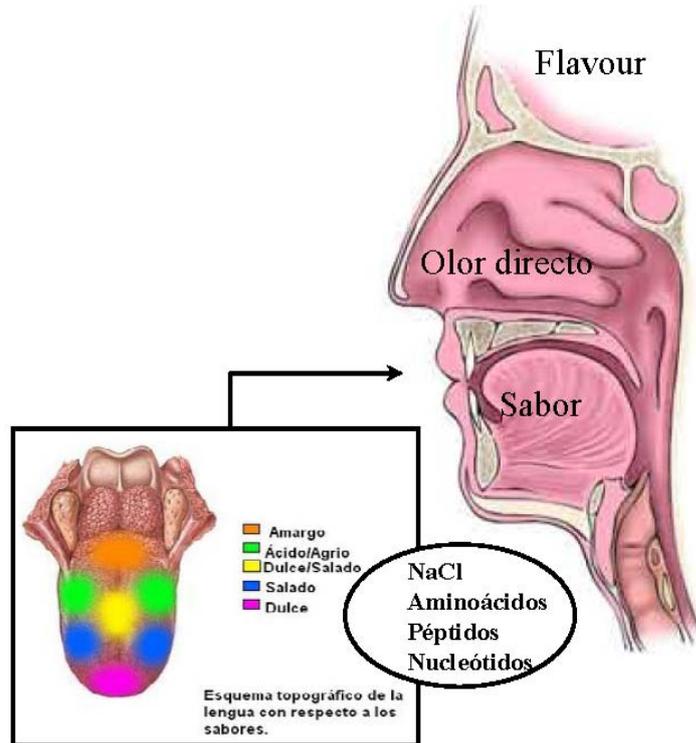


Figura 2. El flavour del jamón es el resultado de la percepción conjunta del sabor, olor y textura (García y Timón, 2001).

Por otro lado, la misma cantidad de sal no supone la misma sensación de sabor ya que influyen otros factores como las propias características del producto, la cantidad de grasa o la formación de complejos entre los aniones y las proteínas, que secuestran cierta cantidad de sal disminuyendo el grado de sabor salado.

Además, la percepción del sabor salado también está afectada por la presencia de algunos aminoácidos u otras sustancias procedentes de la proteólisis que pueden ser potenciadores o enmascarantes del sabor (Aristoy y Toldrá, 1995).

Otras especies químicas (cloruros, bromuros, yoduros, nitratos y sulfatos de potasio o litio) pueden producir un sabor salado combinado con otras percepciones, pero solamente el cloruro sódico da lo que generalmente se reconoce como sabor

“salado puro”. Así, las sales de litio producen sabores salados, el cloruro potásico produce sabores amargos y las sales divalentes como el cloruro cálcico o magnésico pueden generar sabores metálicos o incluso sensaciones astringentes al contactar con las papilas gustativas (Fennema, 1993; Lawless et al., 2003).

Así pues, las variaciones, tanto en el contenido de sal como en su composición, pueden tener importantes consecuencias tanto directas, sobre el sabor del producto final, como indirectas, al verse afectadas las reacciones bioquímicas responsables del desarrollo del sabor y que llevarían a la aparición de sabores desagradables (amargos, metálicos, etc.) (Toldrá y Flores, 1998; Toldrá 2006b).

1.4.2.3 Regulación de la actividad de las enzimas proteolíticas musculares

El efecto de la sal sobre el sistema proteolítico muscular ha sido ampliamente estudiado a lo largo de las últimas décadas, dado que la actividad sobre algunos de sus enzimas como las catepsinas y algunas proteasas, como la alanil-aminopeptidasa (AAP), están influidas por el contenido de sal (Rico et al., 1991; Toldrá et al., 1993; Flores et al., 1997a; Sentandreu and Toldrá, 2001c; Toldrá, 2002).

El sistema enzimático muscular implicado en la proteólisis es bastante complejo y está dividido en dos grandes grupos de enzimas; las endoproteasas (calpaínas I y II, catepsinas B, B+L y H y proteosoma) y las exopeptidasas que incluyen las tri-peptidilpeptidasas I y II, las di-peptidilpeptidasas I, II, III y IV, las carboxipeptidasas y la alanil-, arginil-, metionil-, leucil- y piroglutamil-aminopeptidasas (Toldrá y Flores, 1998). Todas ellas juegan un papel importante en la cadena proteolítica, especialmente durante la etapa de curado, ya que originan una serie de productos finales (péptidos y aminoácidos libres) implicados en el desarrollo del aroma y del flavor del producto (Figura 3) (Toldrá 1998).

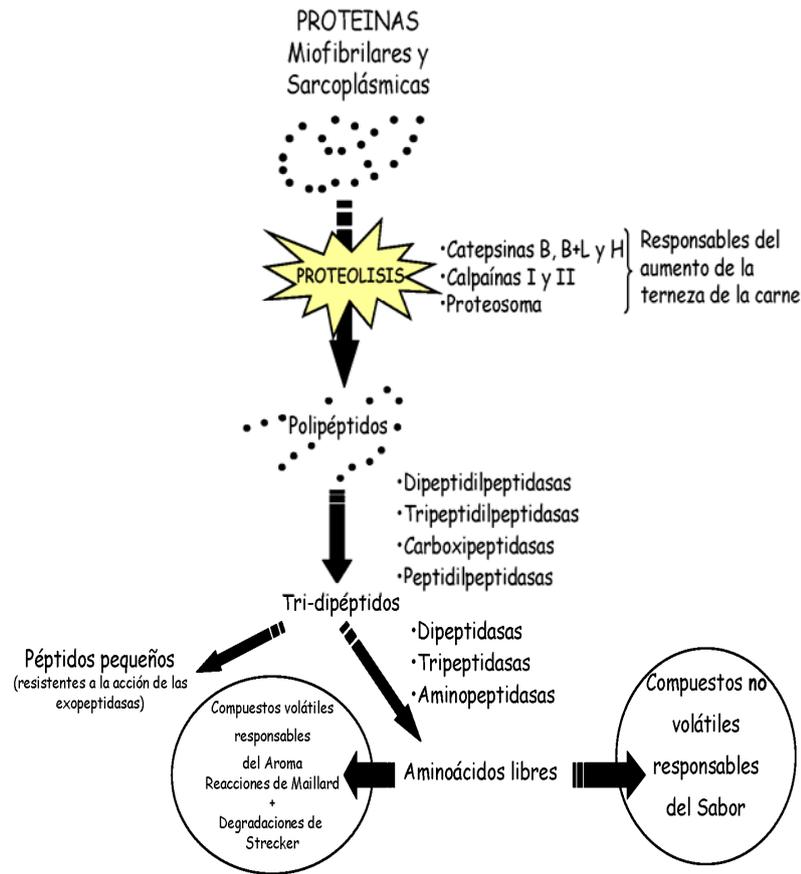


Figura 3. Esquema de la cadena proteolítica implicada en la degradación de las proteínas musculares.

1.4.2.3.1 Endopeptidasas

Las endopeptidasas son enzimas proteolíticas tisulares responsables mayoritariamente de la degradación de proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas. El resultado de su actuación es la generación de fragmentos proteicos y peptídicos procedentes en su mayoría de la rotura de las proteínas miofibrilares que van a servir de sustrato para la actuación de las exopeptidasas (Toldrá y Flores; 1998; Toldrá 2006b).

Dentro de este grupo nos encontramos con las calpaínas, catepsinas y proteosoma que son descritas a continuación.

1.4.2.3.1.1 Calpaínas

Las calpaínas (EC 3.4.22.17) son cisteína endopeptidasas localizadas en el citosol, alrededor del disco Z, y de ahí su importancia en la rotura de la estructura miofibrilar y en el aumento de la terneza de la carne. Están formadas por la calpaína I (μ -calpaína), la cual requiere de 50-70 μM de Ca^{2+} para su activación, la calpaína II (m-calpaína), que requiere de concentraciones de 0.1-0.5 mM de Ca^{2+} para su actuación y la calpastatina, una proteína que inhibe de modo específico la actividad de las calpaínas I y II (Koomaraie, 1994).

Las calpaínas I y II presentan una actividad óptima a pH neutro, alrededor de 7.5, muy poca actividad a pH 6.0 y son inactivas a pH 5.5-6.0. Son heterodímeros de un tamaño molecular de alrededor de 110 kDa, compuestos por una subunidad catalítica de 80 kDa y otra subunidad con función aún desconocida de 30 kDa. Son capaces de degradar las troponinas T e I, tropomiosina, proteína C, filamina, desmina, vinculina, titina y nebulina generando un gran número de péptidos, pero no son activas sobre la miosina, la actina, la troponina y la α -actinina (Koochmaraie, 1994; Sentandreu et al., 2002).

Durante el curado de productos cárnicos, la actividad de las calpaínas quedaría restringida a las primeras semanas, debido a la pobre estabilidad de estas enzimas. En productos como el jamón curado solo se detecta actividad calpaína hasta los inicios de la etapa de post-salado. Asimismo, agentes de curado como la sal (NaCl), activan la calpaína a bajas concentraciones de sal pero un exceso de sal en el producto podría inhibirla completamente (Rosell y Toldrá, 1996).

1.4.2.3.1.2 Catepsinas

Las catepsinas son proteinasas ácidas lisosomales de pequeño tamaño molecular (entre 20-40 kDa), siendo especialmente activas a pH ácido; de hecho, sus

óptimos de pH están alrededor del pH de la carne (pH 6.0). De todas ellas, las más estudiadas son las catepsinas B (EC 3.4.22.1), H (3.4.22.16), L (EC 3.4.22.15) y D (EC 3.4.23.5). Todas ellas pertenecen a la clase de las cisteína proteinasas a excepción de la catepsina D que es una aspartil proteinasa. Las cisteína proteinasas requieren de un medio reductor para expresar su actividad de manera óptima (Toldrá, 2002). La actividad de todas ellas está regulada en el músculo “*in vivo*” por sus inhibidores endógenos que se denominan cistatinas (Sentandreu et al., 2002).

La catepsina B, además de poseer actividad endopeptidasa, también se le atribuye una cierta actividad exopeptidasa. Asimismo, es capaz de hidrolizar miosina, actina, tropomiosina, troponina T y colágeno. La catepsina H, aparte de su débil actividad endopeptidasa posee una importante actividad aminopeptidasa, por lo que también se la conoce como “arginil aminopeptidasa lisosomal”. La catepsina L degrada una amplia variedad de proteínas miofibrilares como la titina, nebulina, α -actinina, desmina y elastina (Barret et al., 1998).

La actividad de las catepsinas tiene una gran importancia al provocar la liberación de fragmentos proteicos de tamaño intermedio procedentes en gran medida de la degradación de las proteínas miofibrilares. Sin embargo, en la degradación de la estructura miofibrilar hay que pensar en una acción sinérgica entre calpaínas y catepsinas, puesto que ambas son capaces de atacar a la mayoría de proteínas estructurales que forman las miofibrillas (Sentandreu et al., 2002).

A diferencia de las calpaínas, todas las catepsinas son bastante estables a lo largo del proceso de curado (6 meses aproximadamente), incluso muestran actividad, del orden del 5 a 10 %, después de 15 meses de curado (Rico et al., 1991; Sárraga et al., 1993; Toldrá y Flores, 1998). Sin embargo, agentes de curado como la sal inhiben fuertemente su actividad y por tanto, controlan la proteólisis. Hay que tener en cuenta que un exceso en la actividad catepsina en productos como el jamón curado, cuando las piezas poseen en su interior una concentración salina baja y además se someten a temperaturas moderadamente altas, puede dar lugar a un

ablandamiento de la pieza y/o incluso a la formación de cristales de tirosina (Martín et al., 1998; García-Garrido, et al., 2000; Toldrá, 2006a).

1.4.2.3.1.3 Proteosoma

El proteosoma, o complejo endopeptidasa multicatalítico, (EC 3.4.99.46) es un complejo enzimático de numerosas subunidades, con una masa molecular en torno a los 700 kDa. Presenta una estructura cilíndrica (11x17 nm) con una disposición en subunidades (de 20-30 kDa) a modo de hélice. Tiene un intervalo óptimo de pH entre 7 y 9, dependiendo de la reacción que catalice. En el músculo se supone que su función está relacionada con la regulación del recambio de las proteínas musculares (Sentandreu et al., 2002). Sin embargo, se desconoce todavía la evolución y actuación del proteosoma a lo largo del proceso de curado de los productos cárnicos.

1.4.2.3.2 Exopeptidasas

Las exopeptidasas son un grupo de enzimas proteolíticas caracterizados por hidrolizar las cadenas pépticas por sus extremos terminales dando lugar a la liberación de péptidos y aminoácidos libres. Dentro de este grupo podemos distinguir:

1.4.2.3.2.1 Tripeptidilpeptidasas (TPP)

Las tripeptidilpeptidasas (TPP) son capaces de hidrolizar diferentes tripéptidos del extremo N- terminal de péptidos y proteínas. La TPP I (EC 3.4.14.9) está localizada en los lisosomas, tiene un pH óptimo ácido (pH 4.0) y es capaz de hidrolizar tripéptidos con la secuencia Gly-Pro-X, donde X es un aminoácido de naturaleza hidrofóbica. La TPP II (EC 3.4.14.10) es una enzima con una masa molecular relativamente alta (1,000 kDa), tiene un pH óptimo neutro (6.5-7.5) y una amplia especificidad de sustratos, con preferencia hacia la secuencia Ala-Ala-Phe (Toldrá, 2002).

1.4.2.3.2.2 Dipeptidilpeptidasas (DPP)

Las dipeptidilpeptidasas (DPP) constituyen un grupo de exopeptidasas, capaces de liberar dipéptidos del extremo N-terminal de péptidos y proteínas. Se han descrito cuatro dipeptidilpeptidasas diferentes: DPP I (EC 3.4.14.1), DPP II (3.4.14.2.), DPP III (3.4.14.4) y DPP IV (3.4.14.5) en función de su especificidad por un tipo de sustrato determinado. DPP I y DPP II están localizadas en los lisosomas, DPP III en el citosol y la DPP IV está ligada a la membrana plasmática. Su masa molecular es entre 100 y 200 kDa, y el pH óptimo de actuación es tanto ácido (5.5 para la DPP I y DPP II) como básico (7.5-8.0 para la DPP III y IV) (Sentandreu y Toldrá, 1998, 2000, 2001a, 2001b).

La DPP I es la más activa en el músculo postmortem y mantiene un importante porcentaje de actividad a bajas temperaturas, así que puede estar activa durante las fases de salado y post-salado en el jamón curado (Sentandreu y Toldrá, 2000). Tiene especial preferencia por hidrolizar dipéptidos con la secuencia Ala-Arg y Gly-Arg, mientras que la DPP II y la DPP IV por Gly-Pro y la DPP III por la Arg-Arg y Ala-Arg. De cualquier manera, estas enzimas son capaces de hidrolizar otros dipéptidos aunque en menor porcentaje.

Estas enzimas están implicadas en la generación y acumulación de una gran variedad de dipéptidos en el músculo postmortem y durante el procesamiento de los productos cárnicos. Agentes de curado como la sal manifiestan una moderada inhibición sobre la actividad dipeptidilpeptidasa (Sentandreu y Toldrá, 2001c).

1.4.2.3.2.3 Carboxipeptidasas

Las carboxipeptidasas están localizadas en los lisosomas y presentan un pH óptimo de actuación ácido. Estas enzimas liberan aminoácidos del extremo carboxi-terminal de péptidos y proteínas. La carboxipeptidasa A (3.4.16.1) tiene preferencia por los aminoácidos hidrofóbicos, mientras que la carboxipeptidasa B (3.4.18.1) presenta un amplio espectro de actuación (McDonald y Barret, 1986).

1.4.2.3.2.4 Aminopeptidasas

Las aminopeptidasas son metaloproteínas con pesos moleculares altos y estructura compleja. Se han purificado y caracterizado 5 aminopeptidasas diferentes en el músculo porcino: la alanil- (AAP) (3.4.11.14), arginil- (ARG) (3.4.11.6), leucil-(LAP) (3.4.11.1), piroglutamil- (PGAP) (3.4.19.3), y metionil- (MAP) (3.4.11.18) aminopeptidasa (Flores et al., 1997a; Flores et al., 2000). Todas ellas son activas a pH neutro (AAP y RAP) o básico (LAP o PGAP) y son capaces de hidrolizar aminoácidos del extremo N-terminal de péptidos y proteínas, incrementando el *pool* de aminoácidos libres especialmente durante las fases de secado y maduración de los productos cárnicos (Flores et al., 1997a, Toldrá y Flores, 1998; Toldrá et al., 2000).

La alanil-aminopeptidasa es la aminopeptidasa más importante de todas ellas, ya que su actividad representa el 86 % de la actividad aminopéptidasica total de la fracción citosólica del músculo esquelético. Presenta una amplia especificidad de sustratos y es activa en presencia de Co^{2+} y Ca^{2+} , mientras que se inhibe en presencia de agentes quelantes, bestatina, amastatina, puromicina y en menor medida por agentes bloqueantes del grupo tiol (Flores et al., 1996). La arginil-aminopeptidasa, también conocida como aminopeptidasa B, hidroliza preferentemente aminoácidos básicos, arginina o lisina, del extremo N terminal a un pH óptimo de 6.5. Se activa notablemente en presencia de ión Cl^- y se inhibe por bestatina (Flores et al., 1993). La metionilaminopeptidasa es activada por Ca^{2+} , y tiene un amplio espectro de actividad con cierta preferencia por hidrolizar metionina, alanina, lisina y leucina (Flores et al., 2000). Mientras que, la leucil- y piroglutamil- aminopeptidasas están presentes en el músculo porcino en niveles bajos, y su pH óptimo de actuación está muy lejos del que nos podemos encontrar en jamón (Toldrá, 2002).

Todas estas enzimas son bastante estables a lo largo del proceso de maduración del jamón curado, e incluso se mantienen activas después de 8 meses de curado (Toldrá y Flores, 1998). Sin embargo, agentes de curado como la sal pueden

reducir significativamente la actividad de alguna de ellas como en el caso de la AAP y la PGAP que se ven fuertemente inhibidas por la sal, mientras que la LAP y la MAP no se ven afectadas y la RAP experimenta una sensible activación en presencia de sal, debido a que es una enzima activada por cloro (Flores et al., 1997a; Flores et al., 2000; Toldrá et al., 2000).

Los aminoácidos libres y pequeños péptidos liberados por la acción de las exopeptidasas son de gran importancia puesto que contribuyen al desarrollo del sabor y el flavor típico del producto (Toldrá, 1998).

1.4.2.4 Parcial solubilización de las proteínas miofibrilares

Las proteínas solubles, tanto las sarcoplásmicas como las miofibrilares, experimentan durante la maduración de los productos cárnicos curados un proceso de desnaturalización que se manifiesta en un descenso en la cantidad de proteína solubilizada (Bellati et al., 1983; Toldrá et al., 1993; Córdoba et al., 1994). Cualquier factor que altere la solubilidad de dichas proteínas afectará necesariamente a la textura del producto ya que dicha pérdida de solubilidad puede influir sobre los procesos proteolíticos, estimulándolos o inhibiéndolos, y modifica algunas propiedades funcionales, como la capacidad de retención de agua que disminuye, favoreciéndose la deshidratación.

La desnaturalización de las proteínas se desencadena, pero también se controla, por las condiciones que van creándose durante el proceso de elaboración de los productos cárnicos curados. Aunque se produce tanto en proteínas sarcoplásmicas como miofibrilares son estas últimas las que van a verse más afectadas. Los principales agentes causantes de estos fenómenos son la sal y/o la temperatura (Antequera y Martín, 2001a).

La presencia de sal en el medio provoca un incremento en la fuerza iónica aumentando la solubilidad de las proteínas miofibrilares que son solubles en soluciones de fuerza iónica media-alta. Asimismo, la sal junto con temperaturas relativamente altas que se producen en determinadas etapas del proceso ocasionan

cambios estructurales en las proteínas debido principalmente a las interacciones electrostáticas que se producen entre éstas y los iones sodio y cloruro (Xiong, 1997; Sárraga y García-Regueiro, 1998).

Una vez solubilizadas la proteínas, por el efecto conjunto de la sal, la deshidratación y la temperatura, éstas pueden sufrir procesos de desnaturalización parcial y reorganización que darán lugar a un gel proteico, constituido por carne, grasa y agua, que va a permitir una mejor ligazón de la masa muscular y, por lo tanto, la terneza y jugosidad del producto se va a ver mejorada (Ruusunen y Puolanne, 2005; Desmond 2006).

1.4.2.5 Modificador de la capacidad de retención de agua

La presencia de cloruro sódico en la carne aumenta su capacidad de retención de agua (Figura 4). La mayoría del agua presente en la carne se encuentra retenida por fenómenos de capilaridad entre los microfilamentos de las fibras musculares formados principalmente por las proteínas actina y miosina. Esto se debe a que el anión Cl^- , que es capaz de unirse a los grupos cargados positivamente en las proteínas, provoca una disminución de su punto isoeléctrico. Como consecuencia, se produce un incremento del número neto de cargas negativas en las proteínas, y por fenómenos de repulsión se produce un aumento del espacio entre las proteínas y, por consiguiente, un incremento en la capacidad de retener agua (Figura 4) (Andrés y Ruiz, 2001).

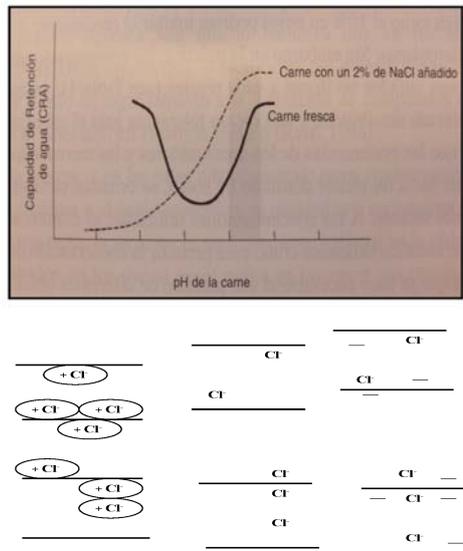


Figura 4. Efecto del cloruro sódico sobre la capacidad de retención de agua de la carne. Se esquematiza la unión de los iones cloruro a los grupos con carga positiva de las proteínas miofibrilares (Andrés y Ruiz, 2001).

1.4.3 Sal y Oxidación

La sal es un potente agente pro-oxidante que va a favorecer en gran medida el enranciamiento oxidativo de los lípidos en productos cárnicos curados como el jamón curado. Aunque esta característica se podría considerar negativa a priori, la oxidación de los lípidos juega un papel determinante en el desarrollo del aroma característico del producto, aunque si las reacciones oxidativas se producen en exceso podrían generar olores y sabores desagradables en el producto.

Por consiguiente, es fundamental que exista un equilibrio entre factores pro-oxidantes y compuestos con actividad antioxidante que puedan frenar el proceso de oxidación como los tocoferoles, nitrito, ácido ascórbico, aminoácidos libres, péptidos y productos de la reacción de Maillard formados durante el proceso de elaboración de productos cárnicos como el jamón curado (Antequera y Martín, 2001a; Toldrá, 2006a).

El estudio del daño oxidativo en los productos cárnicos tradicionalmente se ha centrado en la oxidación lipídica. Sin embargo, recientemente varios autores han demostrado que las proteínas pueden ser susceptibles de sufrir también daño oxidativo (Xiong et al., 1995; Lund et al., 2007). Las causantes del daño oxidativo de las proteínas musculares sarcoplásmicas y miofibrilares son los productos de la oxidación lipídica (hidroperóxidos y aldehidos), iones metálicos (Cu^{2+} y Fe^{2+}), agentes pro-oxidantes endógenos del músculo (mioglobina y/o ferritina) y otros productos generados durante el procesamiento del producto (Park et al., 2006). En la carne y productos cárnicos los aminoácidos que tienen grupos sulfhidrilo (metionina y cisteína) son especialmente susceptibles de sufrir este daño oxidativo agudizado por la presencia de agentes pro-oxidantes.

El principal cambio que se produce en las proteínas oxidadas es la formación de grupos carbonilo, seguido por la formación de puentes de unión (cross-links) entre aminoácidos como es el caso de los puentes ditirosina (Figura 5) o los puentes disulfuro.

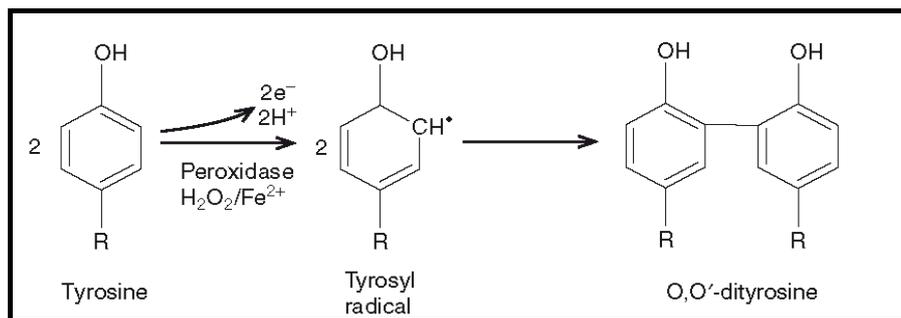


Figura 5. Formación de puentes de unión ditirosina (Estévez et al., 2008b).

El desarrollo de este tipo de reacciones de oxidación implica una pérdida de aminoácidos y vitaminas que afectaría a propiedades como el color, el flavor, la textura y el valor nutritivo del producto (Estévez et al., 2008b). En vista de esto existe una necesidad incipiente por investigar la oxidación de las proteínas musculares durante el manejo, procesamiento y almacenamiento de los productos

cárnicos, especialmente por el carácter prooxidante del Na^+ , ingrediente fundamental en los productos curados.

Las técnicas que se están utilizando para detectar el daño oxidativo en proteínas de origen cárnico son en su mayoría adaptadas de aquellas desarrolladas en la investigación biomédica. Así pues, la cuantificación de los grupos carbonilo a través del método de la dinitrofenilhidrazina (DNPH) se ha convertido en el procedimiento de uso generalizado y rutinario en gran variedad de productos cárnicos como la carne fresca, las emulsiones cárnicas y los productos cárnicos curados (Estévez y Cava, 2004; Ventanas et al., 2006a; Lund et al., 2007). Este método cuantifica los grupos carbonilo presentes en las proteínas previa derivatización con DNPH (Oliver et al., 1984). El DNPH es capaz de reaccionar con los grupos carbonilo formando un compuesto cromóforo, la DNP- hidrazona, que se cuantifica espectrofotométricamente a 370 nm (Figura 6).

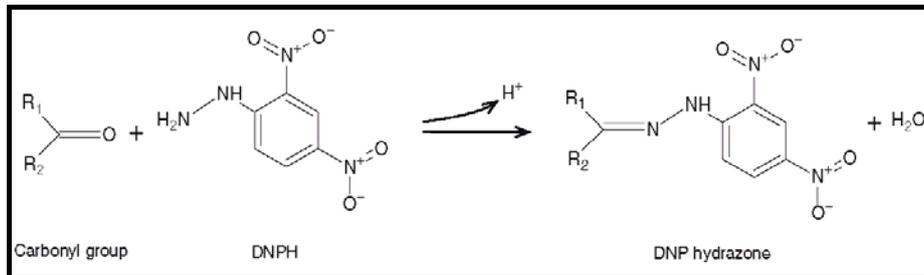


Figura 6. Detección de grupos carbonilo usando DNPH (Estévez et al., 2008b).

Aunque este método se ha descrito como robusto y preciso, el DNPH no reacciona específicamente con los grupos carbonilo de las proteínas sino que también es capaz de reaccionar con los grupos carbonilo de los lípidos, dando lugar a una sobreestimación en la concentración total de carbonilos procedentes de proteínas. Asimismo, es un procedimiento muy tedioso y necesita un gran volumen de reactivos para su realización.

Un método alternativo es la espectroscopía de fluorescencia que recientemente ha sido aplicada con éxito para evaluar el daño oxidativo en

emulsiones, liposomas y proteínas miofibrilares (Estévez et al., 2008a; Viljanen et al., 2004). Se basa en que determinados compuestos carbonílicos generados como resultado de las reacciones entre los productos de oxidación lipídica (aldehídos) y los grupos amino de las proteínas son conjugados fluoróforos con propiedades espectrales que pueden ser medidas a 450 nm cuando son excitados a 350 nm. Sin embargo, este método resulta también poco específico ya que mide la concentración total de una gran variedad de productos carbonílicos formados a través de rutas inespecíficas durante los procesos oxidativos que tienen lugar en los productos cárnicos.

Por lo tanto, se necesitan métodos más específicos para determinar el daño oxidativo, únicamente en proteínas de la carne. En este sentido, los semialdehídos α -aminoadípico y el γ -glutámico (AAS y GGS, respectivamente) podrían utilizarse como marcadores de daño oxidativo en proteínas de origen cárnico puesto que se consideran los principales compuestos carbonílicos derivados de la oxidación de las proteínas y ya se han utilizado como biomarcadores de daño oxidativo en proteínas de origen biológico; en concreto para el estudio de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Daneshvar et al., 1997; Choi et al., 2002). El AAS deriva de la oxidación del aminoácido lisina, mientras el GGS se forma como resultado de la oxidación de los aminoácidos arginina y prolina (Figura 7).

Durante las últimas décadas se han desarrollado varios procedimientos para cuantificar estos semialdehídos (AAS y GGS) en muestras biológicas basados en la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (CG-MS) (Daneshvar et al., 1997), en la cromatografía líquida de alta resolución con detector de diodos (HPLC-DAD) (Requena et al., 2001) o con detector de fluorescencia (HPLC-FLD) (Akagawa et al., 2006). Estos métodos implican un paso previo de derivatización usando NaBH_4 , fluoresceínamina (FINH_2) o ácido *p*- amino benzoico (ABA), respectivamente.

Más recientemente, Estévez et al., (2009) analizaron ambos semialdehídos (AAS y GGS) en proteínas miofibrilares, α -lactoalbúmina, albúmina (BSA) y

proteínas de soja usando cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas (LC-ESI-MS) y ABA como reactivo de derivatización, mientras que Armenteros et al., (2009d) detectaron y cuantificaron ambos semialdehídos (AAS y GGS) utilizando LC-ESI-MS en diferentes tipos de productos cárnicos, entre ellos el jamón curado, y propusieron al semialdehído GGS como índice del daño oxidativo en proteínas de origen cárnico.

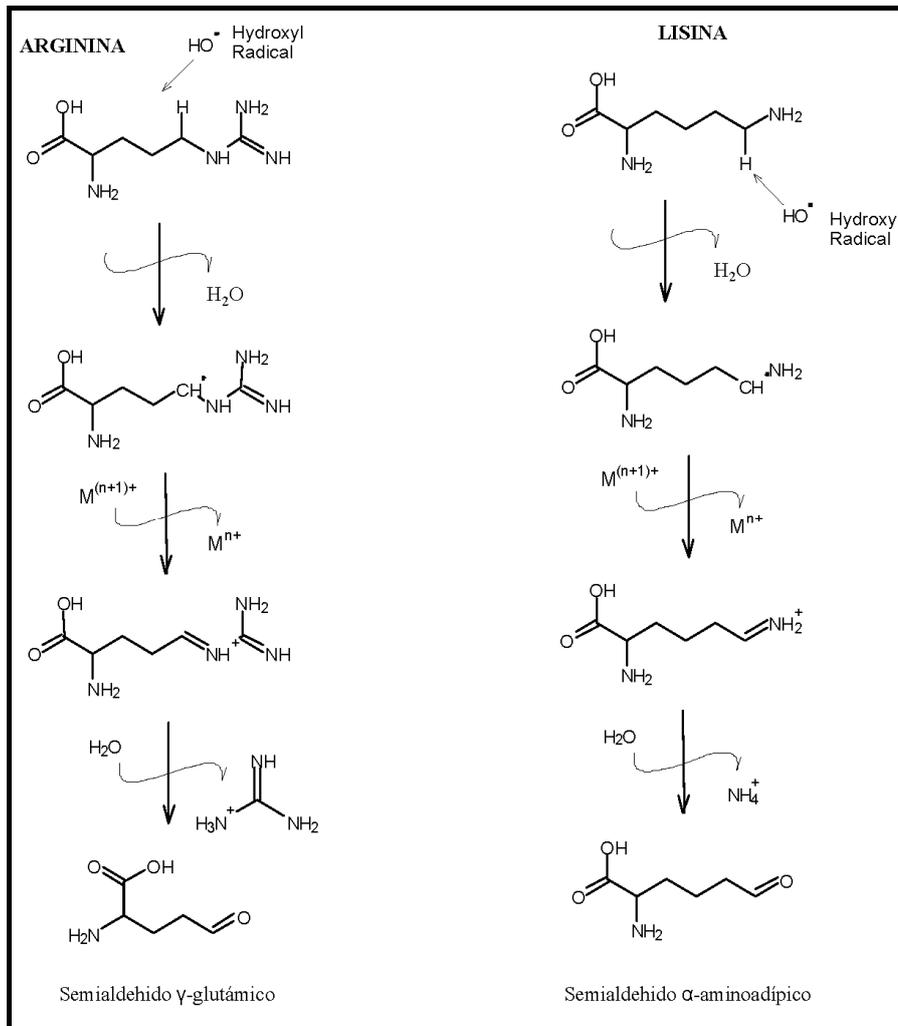


Figura 7. Formación de los semialdehídos γ-glutámico (GGG) y α-amino adípico (AAS) a partir de la oxidación de la arginina y lisina, respectivamente (Armenteros et al., 2009d).

1.5 Elaboración de los Productos Curados

Los productos cárnicos curados, entre ellos el lomo y el jamón curado tienen una larga tradición en la gastronomía española. Estos productos se procesan conforme a métodos tradicionales de elaboración, aunque en los últimos años han sido incorporadas nuevas tecnologías a este proceso (Pérez-Alvarez, 1997).

1.5.1 Lomo Curado

Según la orden de 27 de febrero de 1980, B.O.E. 21/3/80, el lomo curado es un producto elaborado a partir del músculo íleo-espinal del cerdo (prácticamente libre de grasa externa), aponeurosis y tendones, salado, adobado y embutido en tripas naturales o artificiales permeables y que se ha sometido a un proceso de maduración apropiado.

Para elaborar el lomo curado se pueden utilizar gran variedad de procedimientos diferentes, variando las proporciones, etapas y parámetros de tiempos, temperaturas y humedades.

Así pues podemos diferenciar varias etapas en su elaboración:

- **Preparación:** Tras el sacrificio, los lomos se refrigeran durante 48 horas en una cámara frigorífica industrial a 2-4 °C. Transcurrido este tiempo se congelan a -40 °C en un congelador industrial y se almacenan durante aproximadamente 5 días a -20 °C. Finalmente, son sometidos a un proceso de descongelación previo a su procesado en una cámara de refrigeración a 3-4 °C durante 5 días (Bañón et al., 1999).
- **Nitrificación:** En esta etapa se mezclan las sales de nitrificación (nitros y nitros) con la cantidad de sal correspondiente y a continuación se frotan los lomos mediante masaje en bombo durante aproximadamente 20 minutos. Seguidamente se depositan en una cubeta o contenedor añadiendo la sal que haya podido

quedar restante en el bombo y de esta forma se llevan a la cámara de frío. A continuación se mantienen en refrigeración a 4 °C durante 2 días para estabilizar el producto.

- **Adobo:** Se sacan los lomos de la cámara de refrigeración y se adoban con una mezcla de especias, aditivos y azúcar, mediante masaje en bombo durante 20 minutos a velocidad lenta, preferiblemente empleando vacío. Acabado el proceso se vuelven a colocar en las cubetas.
- **Maceración:** Se mantienen en las cubetas, tapados con plástico, en cámara de maceración, durante 4-8 días a 4°C.
- **Embuchado:** A continuación se embuten en tripas naturales o artificiales de un calibre adecuado al grosor del lomo, se debe procurar unas condiciones de secado más suaves si se utilizan estas últimas, para que no se retraiga más rápidamente la carne que la tripa y ésta quede despegada.
- **Secado-Maduración:** Si se desea una curación rápida se efectúa un ligero estufaje a una temperatura de 20-22 ° C y una humedad relativa del 95 %, durante 2-3 días según el grosor del lomo, pasando entonces al secadero. Si no se hace el estufaje, se deben mantener con una humedad entre el 90-95 %, durante los primeros 4-5 días a 10 °C y después en el secadero se va reduciendo progresivamente la humedad.

La curación del lomo de cerdo blanco, se efectúa en secadero a una temperatura de 10-12 ° C y 75-80 % de H.R. la duración puede oscilar entre 25 y 45 días, según la clase de tripa utilizada y su calibre. Si no se dispone de secadero con temperatura y humedad controladas, se debe aproximar al máximo a los datos citados y las piezas deben situarse en un lugar que no tenga

corrientes de aire, evitando en lo posible los cambios bruscos de temperatura y humedad.

Así pues, la utilización de bajas temperaturas y un proceso de curado lento favorecen la elaboración de un lomo con calidades organolépticas excepcionales.

1.5.2 Jamón Curado

El jamón curado constituye uno de los productos típicos de la gastronomía española. Su elaboración se realiza mediante salazonado y posterior secado-maduración de los perniles. La calidad del producto final es el resultado de una combinación de factores ligados a la raza y al proceso de elaboración del jamón que requiere de largas etapas de secado en bodega.

La producción y comercialización de jamón y paleta curados alcanza un volumen de gran importancia en el conjunto de la industria alimentaria española con una producción anual que supone más de 4.000 millones de euros al año (Fuente: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2009). De hecho, en los últimos 10 años, la producción de jamones y paletas se ha incrementado en un 42. 2 %, y este hecho implica un consumo aproximado de 5 Kg per cápita y sitúa a estos productos como los elaborados cárnicos más importantes del mercado español (Figura 8) (Cruz, 2007).

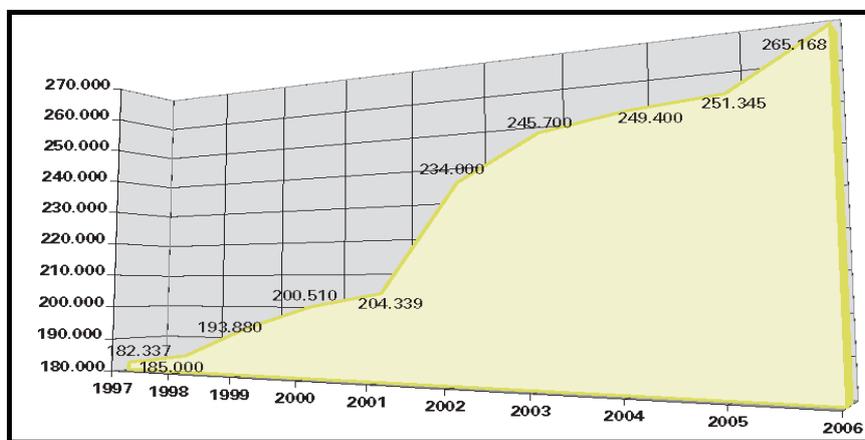


Figura 8. Evolución de la producción de jamón curado en España (Cruz, 2007).

Todo esto, a pesar de que en las sociedades occidentales existe una concienciación cada vez mayor de que la ingesta de elevadas cantidades de sal está estrechamente ligada con el aumento de la tensión arterial, y de que existe una tendencia por parte de los consumidores a demandar productos con bajo contenido en sodio (Morgan et al., 2001; Guardia et al., 2006). Uno de los principales retos con el que se está encontrando el sector del jamón curado consiste en disminuir el contenido de NaCl que se sitúa en torno al 5-8 %, y que convierte al jamón en un producto desaconsejable para aquellas personas que padecen de hipertensión.

La principal dificultad para alcanzar dicho objetivo se encuentra en la propia complejidad del producto y de los cambios que sufre éste durante su proceso de elaboración, proceso que se describe a continuación.

1.5.2.1 Proceso de Salado

El jamón curado es un producto cárnico en el que la sal constituye el ingrediente fundamental. Tradicionalmente, junto a la sal se añaden otras sales de curado como son los nitratos sódico o potásico para productos de larga maduración y el nitrito en los procesos en los que se desea una nitrificación rápida, aunque lo más común es una combinación de ambos para asegurar una buena cobertura de seguridad microbiológica a lo largo de todo el proceso (Toldrá, 2003).

El proceso de salado va normalmente precedido por la selección, la clasificación, la identificación y el desangrado de la materia prima, y suele constar de una fase de presalado y una posterior de salado.

1.5.2.2 Sales de curado

Los nitratos y los nitritos son los principales agentes de curado utilizados en la elaboración del jamón curado. La sal es el ingrediente de curado por excelencia debido a las características que confiere al producto y que se describieron en el apartado anterior. La concentración normal de sal en el interior

del pernil es de un 5-8 % aunque se pueden encontrar concentraciones más elevadas del orden del 8-9 % o incluso superiores (Toldrá, 2002).

El nitrito se añade para evitar el crecimiento de microorganismos patógenos como *Clostridium botulinum* y *Salmonella spp.*, pero además otorga al producto el color rojizo característico y contribuye al aroma. La concentración de nitrito en el interior del pernil disminuye durante el salado y primeras semanas del post-salado. El nitrito, nada más incorporarse a la pieza se transforma en óxido nítrico, por lo que se requiere un aporte suficiente de nitrito para lograr un color homogéneo al corte y evitar los halos de nitrificación. El óxido nítrico que se forma es muy reactivo e interacciona con las proteínas y otros compuestos de la carne, como son la mioglobina formando nitrosomioglobina, que confiere el color rojo característico a los productos cárnicos curados (Toldrá, 2002).

Por otro lado, el nitrato por sí solo carece de las propiedades mencionadas y su efecto depende de su reducción a nitrito. La transformación del nitrato a nitrito depende del pH de la carne y de la flora con actividad nitrato reductasa, cuyo crecimiento está influido por la temperatura.

De acuerdo a la Directiva Europea 2006/52/EC, la cantidad máxima permitida de adición de nitrato y nitrito es de 150 ppm para cada uno si se adiciona solo o bien de 300 ppm si se adicionan conjuntamente, mientras que el valor residual máximo en el producto debe de ser de 100 ppm para el caso del nitrito o 250 ppm en el caso del nitrato (Toldrá, et al., 2009).

A la mezcla de sales de curado también se pueden adicionar ciertos aditivos como el ascorbato o el isoascorbato, azúcares entre otros. El ascorbato o el isoascorbato aceleran la transformación del nitrito a óxido nítrico evitando la formación de nitrosaminas. Los azúcares (glucosa o fructosa) estabilizan el color, favorecen el crecimiento de la flora superficial, confieren un ligero sabor dulce y reducen los precipitados de fosfatos en la superficie del pernil; por el contrario, pueden generar olores extraños y sabores ácidos (Boadas et al., 2000). En ciertas

ocasiones, también se puede añadir ciertas especias, vino, condimentos y aromas que enriquecen el perfil de volátiles y pueden contribuir a mejorar la calidad sensorial de los jamones que se elaboran mediante procesos de corta duración.

1.5.2.3 Presalado

En los procesos de apilado, se efectúa un presalado previo mediante masajeado en superficie de una pequeña cantidad de sal que contiene la dosis exacta de aditivos (principalmente nitratos y nitritos) que se quiera incorporar al jamón, lo que facilita la distribución superficial y la penetración de estos. Se puede realizar manualmente, pero lo más habitual es realizarlo mediante masajeadoras o bombos (con o sin vacío). Este masajeado puede ser complementado con un ligero prensado, que también reduce el espesor de la pieza y, por lo tanto, el tiempo necesario para que las sales y los aditivos alcancen el centro del pernil (Toldrá 2006a; Arnau, 2007).

1.5.2.4 Salado

El salado o salazón constituye la fase del proceso en que se adicionan sobre la superficie del jamón la sal común para que una vez distribuida por toda la pieza, pueda darse el proceso de maduración que generará las características de aspecto, textura y flavor, propias y características del jamón curado. En estas condiciones se produce la paulatina deshidratación en el pernil y se inhibe el desarrollo de microorganismos anaerobios alterantes y potencialmente patógenos (*Clostridium botulinum*) (Toldrá, 2002).

Entre los procedimientos de salado se pueden distinguir el salado en seco, y el salado húmedo con salmuera. Asimismo, se han probado diversas tecnologías para acelerar la penetración de la sal en el jamón, como son la inyección, el masaje, los ultrasonidos, la centrifugación, el vacío, la congelación, la corriente eléctrica, la sobrepresión y la alternancia de sobrepresión y vacío (Vandendriessche, 2005).

En países del área mediterránea se utiliza el salado por vía seca, mientras que en el norte de Europa es común tanto el salado por vía seca como el salado en salmuera. El salado en seco, produce una mayor deshidratación osmótica del jamón y un mayor consumo de sal, mientras que con el salado en salmuera tanto la deshidratación osmótica como el consumo de sal son menores (Barat et al., 2006).

1.5.2.4.1 Salado por vía seca

El salado por vía seca puede realizarse utilizando dos metodologías distintas:

- a) Salado de los jamones por recubrimiento ilimitado de sal:

Este método se utiliza normalmente en países como España, Francia o Italia. Puede hacerse mediante salado individual de los perniles por frotación de la sal sobre la superficie magra del pernil o por recubrimiento de toda la superficie del pernil con sal. En el primer caso los perniles una vez salados se disponen en bandejas individuales, mientras que en el segundo caso una vez que los perniles son recubiertos totalmente con la sal se disponen en capas alternativas de perniles y sal, con la cara muscular hacia arriba, es lo que denominamos salado en pila. Actualmente, se va generalizando la utilización de contenedores de acero inoxidable o plástico, que van reemplazando a las tradicionales pilas de sal, facilitando así la manipulación de un número mayor de piezas (Figuras 9.1, 9.2 y 9.3).



Figura 9.1. Salado en bandejas.



Figura 9.2. Salado en pila.



Figura 9.3. Salado en contenedores.

Es muy importante durante la salazón controlar la temperatura y la humedad relativa de los saladeros. En principio, cuanto más elevada es la temperatura mayor es la difusión pero también el desarrollo de microorganismos. Por consiguiente, para conseguir un equilibrio entre ambos aspectos, la temperatura se mantiene durante todo el proceso entre 3-4 °C, mientras que la humedad relativa se sitúa entorno al 90-95 %.

Estas condiciones se mantendrán durante aproximadamente 1.1 día por kilo de peso de la pieza para los jamones refrigerados y dos días menos para los congelados (Ventanas et al., 2001a; Toldrá, 2002; Arnaú, 2007).

- b) Salado mediante una cantidad de sal limitada (proporcional al peso del jamón):

Esta metodología consiste en adicionar la cantidad exacta de sal por kilo de la pieza sobre la superficie magra del pernil. Este método lleva consigo un periodo de tiempo prolongado, entre 14-21 días dependiendo del tamaño del pernil, puesto que es necesario esperar hasta que toda la sal sea absorbida.

Una metodología alternativa a esta consiste en realizar un masaje en bombo junto con los ingredientes y aditivos y un reposo posterior en contenedores donde el jamón está en contacto directo con la salmuera exudada (Arnau, 2007).

1.5.2.4.2 Salado por vía húmeda

El salado por vía húmeda puede realizarse por inmersión en salmuera o mediante su inyección en el producto. Cuando se utilizan salmueras saturadas el pernil adquiere un contenido de sal excesivo y existe mayor riesgo de quemaduras debidas a la sal. Además tiene la ventaja de que no hace falta descongelar los perniles previamente a su introducción en la salmuera con lo que se reduce considerablemente el tiempo de descongelación y el necesario para que la sal penetre en el interior del pernil, pero debido a que se produce poca deshidratación osmótica se alarga el tiempo de secado (Barat et al., 2006).

Una vez acabado el periodo de salazón, tanto por vía seca como por vía húmeda, se elimina la sal superficial de los perniles mediante lavado y cepillado, y a veces se puede aplicar un masaje adicional en máquinas de rodillo (Arnau, 2007).

1.5.2.5 Factores que afectan a la penetración y difusión de la sal en el interior del jamón

La penetración de la sal provoca unos movimientos internos de las moléculas salinas y de agua desde aquellos tejidos más profundos con menores contenidos salinos hacia las zonas exteriores, donde dicha concentración es superior. Tales movimientos tienen la finalidad de proporcionar una distribución homogénea de dichas moléculas para que se establezca el correspondiente equilibrio osmótico y con ello facilitar de una manera lenta pero constante la evaporación superficial del agua, con la consiguiente desecación de las piezas (Bello, 2008).

El factor principal que regula la velocidad de penetración de la sal es la formación de una salmuera saturada en la superficie de la carne, lo cual explica que la sal húmeda penetre más rápidamente que la seca. De ahí que sea necesario un control riguroso de la humedad relativa de las cámaras de salado, dado que la sal va a tomar la humedad ambiental y se va a transformar en salmuera que será la que penetrará en el interior del pernil. Asimismo, hay que tener en cuenta que la elevación de la temperatura va a favorecer la difusión de la sal, sin embargo se hace necesario utilizar temperaturas bajas durante las etapas de salado y post-salado con el fin de evitar el desarrollo microbiano (Arnau et al., 1987). Otros factores que van a afectar a la penetración y difusión de los iones Na^+ y Cl^- en el interior de pernil se describen brevemente a continuación (Poma, 1998):

- **Superficie de Intercambio.** La sal se absorbe con mayor facilidad por la parte magra del pernil. Cuanto mayor sea la superficie magra en contacto con la sal mayor será su absorción. En cambio, la cantidad de sal que penetra por la corteza aumenta a medida que disminuye el espesor de la grasa subcutánea. También

influye la presencia de huesos, de forma que, si los huesos coxal y codillo son retirados antes del salado se facilitará la absorción y la penetración uniforme de la sal por todo el jamón. La forma de colocar los jamones en los contenedores, o su situación en la pila, también va a afectar de manera diferencial a la absorción de sal. Para paliar este efecto, se puede alterar el orden de los jamones a mitad de proceso de salado, al efecto de que los jamones que queden arriba pasen abajo y viceversa (Albarracín et al., 2005).

- **Espesor de la pieza.** La distancia a recorrer por la sal desde la superficie va a afectar al perfil de concentración de sal en el interior del pernil. Para disminuir la distancia que tenga que recorrer la sal desde la superficie se puede pulir la corteza y la grasa externa, utilizar jamones menos conformados, prensar los jamones antes, durante o después del salado, inyectar salmuera o bien utilizar jamones deshuesados (Arnau, 2007).

- **Difusividad.** La difusividad de la sal se reduce a medida que aumenta el contenido de grasa intramuscular y disminuye el contenido de agua e incrementa al disminuir el valor de pH. Cuanto mayor sea el contenido de grasa intermuscular peor será la difusión desde los músculos Semimembranosus y Adductor hacia el Bíceps femoris. El proceso de congelación/descongelación de los jamones también puede aumentar la velocidad de difusión de la sal debido a la rotura de estructuras celulares que producen los cristales de hielo, especialmente cuando estos crecen por efecto de la recristalización que se produce a temperaturas ligeramente inferiores al punto de congelación, o por almacenamiento prolongado y oscilaciones de temperatura. Barat et al. (2006) encontraron una mayor absorción de sal en jamones congelados/descongelados que en jamones frescos al realizar el salado en salmuera. En los jamones descongelados los daños celulares dependen de la forma en que se realiza la congelación-descongelación y del tiempo y condiciones de almacenamiento, por lo que es de esperar que el uso de jamones descongelados genere una mayor variabilidad de contenido de sal que los frescos.

- **Gradiente de concentraciones de sal.** La zona más superficial de los jamones salados en pila suele estar saturada de sal. Sin embargo, cuando el aporte de sal es limitado o cuando se realiza el salado en salmuera, la diferencia de concentraciones será menor a lo largo del proceso de salado, lo que puede afectar a la difusión.

- **Tiempo de Salado.** El tiempo de salado depende del tipo de procesamiento utilizado. Este puede oscilar entre unos 0.65 a 2 días por kilo de pieza en el caso del salado tradicional (con aporte de sal ilimitado), hasta unos 30 días cuando se utiliza un aporte de sal limitado. En el caso del salado en pila, para determinar el tiempo de salazón, es conveniente tener en cuenta que la cantidad de sal absorbida aumenta con el tiempo, y por ello se debe tener en cuenta los días de pre-salado. En el salado en contenedores se produce una pérdida de exudado importante que se ve reflejada en una disminución del área de contacto del jamón con la sal. Por lo tanto el tiempo en que la superficie del jamón está cubierta de salmuera saturada será variable en función de las condiciones de salado utilizadas.

1.5.2.6 Factores a tener en cuenta en la reducción del contenido de sal en el jamón

El contenido de sal en el jamón curado se puede reducir disminuyendo el tiempo de salazón, la cantidad de sal cuando se opta por un aporte de sal limitado ó por sustitución parcial del NaCl por otras sales alternativas como el KCl, el CaCl₂, el MgCl₂, el lactato potásico, etc., (Gou et al., 1996; Gelabert et al., 2003; Armenteros et al., 2009 b,c). Para efectuar una reducción en la concentración de sal en el jamón curado sin que tenga efectos importantes en la flora microbiana, la textura y/o el flavor debemos de tener en cuenta las siguientes premisas:

- Dado que una reducción importante del contenido de NaCl disminuye la inhibición de las catepsinas reflejándose en la aparición de texturas blandas en el producto (Toldrá et al., 1992, 1993), se debería seleccionar si es posible mediante métodos de genética molecular animales con bajo potencial proteolítico al igual que

establecer las condiciones de cría más adecuadas para que disminuya dicho potencial proteolítico en los animales. De esta manera podremos obtener materia prima que genere pocos problemas de texturas blandas, cristales de tirosina y sabores amargos (Guerrero et al., 2004).

- En el caso que se utilice KCl como sustituto parcial del contenido de NaCl, hay que tener en cuenta que cristaliza a H.R. < 87.7 a 5 °C y a < 84.3 a 25 °C y, por lo tanto, pueden aparecer cristalizaciones de KCl en la superficie del jamón en las condiciones habituales de secado. Por otro lado, el empleo de altas concentraciones de KCl puede aumentar el sabor amargo. Si se emplean sales divalentes como el CaCl₂ o el MgCl₂, como sustitutos parciales del NaCl en la salmuera, hay que tener en cuenta que los cationes Ca²⁺ y Mg²⁺ al difundir hacia el interior del pernil pueden unirse fuertemente con los grupos polares de las proteínas ralentizándose la penetración de la sal por toda la pieza (Xiong y Brekke, 1991); además de los defectos que pueden aparecer en las características organolépticas del producto como son los sabores metálicos del Mg²⁺ (Lawless et al., 2003).

- Adaptar las condiciones de la cámara de secado durante las etapas de post-salado, secado y maduración ya que a una misma H.R., la superficie del jamón es más susceptible al encostrado. Además, si el contenido de sal es bajo el jamón es menos fibroso, y más blando, pastoso y adhesivo como consecuencia de la actividad de las enzimas proteolíticas (Sárraga et al., 1989; Rico et al., 1991).

- Utilizar tratamientos adicionales, como las altas presiones para lograr que el producto siga siendo seguro y estable en las condiciones normales de comercialización y consumo (Serra et al., 2006).

- Añadir potenciadores del sabor o aroma que potencien el flavor del jamón con baja cantidad de sal, ya que por una parte la sal actúa tanto como saborizante como potenciador del sabor y, por otra, modifica el aroma global del producto debido a su acción sobre la liberación de compuestos volátiles.

Por lo tanto, la salazón es una etapa crítica para evitar el crecimiento de microorganismo indeseables y para el desarrollo de las características organolépticas del jamón curado. Así pues, las investigaciones para reducir el contenido de sodio en jamón curado deben dirigirse en dos sentidos. Por un lado, seleccionar una materia prima adecuada, para mantener unos buenos niveles de seguridad y estabilidad y por otro, adaptar y/o modificar el proceso con el fin de obtener un producto con unas características aceptables desde el punto de vista sensorial.

1.6 Reducción del Contenido de Sal en los Alimentos Procesados

La reducción o eliminación total de la sal en los alimentos resulta compleja en muchos casos debido a las funciones que cumple en éstos: conservación, realza el sabor, mejora la textura, confiere aromas característicos, aporta minerales, etc. Con la reducción de sodio se consigue modificar el perfil nutricional de los alimentos, permitiendo posicionarlos en el mercado como alimentos “saludables”. Sin embargo, la reducción de la sal en los alimentos procesados continúa siendo un importante desafío para la industria alimentaria, por lo que la investigación en este campo se centra en la búsqueda de soluciones que no comprometan la seguridad, la textura y el sabor del producto final.

Los sustitutos de la sal existentes en el mercado suelen estar constituidos por uno o varios compuestos, formulados en función del tipo de alimento al que van destinados. Poseen un sabor agradable, parecido a la sal común, y generalmente se dosifican en una proporción similar a la sal. La mayoría contiene cloruro potásico como componente principal ya que es el producto que más se asemeja al cloruro sódico, tanto en sabor como en propiedades funcionales. Otros compuestos que suelen estar presentes en estas formulaciones son los nucleótidos, extractos de levadura, ácidos orgánicos, especias y hierbas (Picaza y Riesco, 2008).

La legislación española (Santiago y Cuervo, 2003) señala que para que un alimento sea considerado de “reducido contenido en sodio” debe de contener como máximo 120 mg de sodio / 100 g de producto terminado, y el alimento calificado

como “muy pobre en sodio” tendrá un máximo de 40 mg de sodio/ 10 g de producto terminado. Existen ya productos en el mercado, como pan, biscotes, jamón de york, caldos vegetales deshidratados, mantequilla, salsas de tomate y Ketchup, etc., con bajo contenido en sodio.

Sin embargo, en relación a los productos cárnicos curados y a pesar de la importancia socio-económica de éstos en nuestro país (ver apartado 1.6) existe muy poca información científico-técnica acerca de las consecuencias de reducir el contenido de sal en ellos. Si bien el desarrollo de productos bajos en sal no es sencillo, cuando se trata de productos curados se presentan problemas añadidos a la disminución de la percepción del característico sabor salado y/o la intensidad del flavor del producto, y que se discuten en este trabajo.

1.6.1 Problemática que Plantea la Reducción o Sustitución de NaCl en Productos Cárnicos

El éxito en la reducción del contenido de sodio no sólo depende de aspectos tales como el tipo de producto sino también de las condiciones de preparación, la composición y el tipo de procesamiento requerido. Todos estos factores van a determinar cuales son las limitaciones tecnológicas a la hora de poder establecer una reducción del contenido de sal empleado (Ruusunen et al., 2005). Así pues, para desarrollar productos bajos en sal las industrias de la alimentación y en concreto la industria cárnica dispone de varias estrategias a seguir:

- Reducción del contenido total de NaCl añadido.
- Sustitución total o parcial del contenido de NaCl por otras sales (KCl, MgCl₂ y CaCl₂).
- Sustitución parcial del contenido de NaCl por sales no cloradas como los fosfatos o bien por otras sustancias como el K-lactato o la glicina.

- Cambios en las técnicas de elaboración y/o el empleo de varias de estas propuestas simultáneamente (Ruusunen y Puolanne, 2005).

Todas estas propuestas presentan limitaciones a su uso, especialmente en los productos cárnicos, ya que la reducción del contenido total de NaCl añadido en éstos, puede originar defectos en el producto acabado como texturas blandas, etc., debido a un exceso de proteolisis como resultado de un aumento en la actividad degradativa de las catepsinas (Rico, et al., 1991; Toldrá et al., 1993; Sárraga, et al., 1993; Gil et al., 1999). Asimismo, las exopeptidasas pueden sobrereactuar sobre los péptidos y proteínas generando un exceso de compuestos nitrogenados de bajo peso molecular que podrían originar en el producto sabores desagradables (metálicos y/o amargos) (Martín et al., 1998; Toldrá, 1998; Toldrá et al., 2000). De hecho, Barbut et al., (1986) detectaron considerables defectos en la apariencia y en la palatabilidad del producto acabado (salchichas tipo “Frankfurt) cuando la cantidad total de sal se redujo a un 1-1.5 %.

La disminución del contenido total de sal en productos cárnicos parece que tiene un ligero efecto promotor de la lipólisis (Andrés et al., 2005), y así Flores et al., (2005) y Olesen et al., (2004) observaron en embutidos curados que la disminución de la cantidad total de sal influye significativamente sobre la liberación de los compuestos volátiles y sobre el flavor del producto.

Finalmente, cabría mencionar la necesidad de aumentar los niveles de sustancias nitrificantes añadidas para estabilizar microbiológicamente a un producto al que se ha disminuido el contenido total de sal añadida y con ello su a_w (Toldrá, 2003; Ruusunen y Puolanne, 2005; Blesa et al., 2008).

1.6.2 Empleo de Sustancias Alternativas al NaCl

La reducción parcial del contenido de NaCl mediante el empleo de sales y/o sustancias alternativas como el KCl, el CaCl_2 , el MgCl_2 , el K-lactato, la glicina, etc., es una técnica que ya se ha utilizado en la elaboración de salsas, salchichas, quesos, pan, embutidos curados, jamón cocido, jamón “country style” y lomo curado

(Salovaara, 1982; Reddy y Marth, 1991; Ibañez et al., 1995; Gou et al., 1996; Gimeno et al., 1999, 1998; Katsiari et al., 2000a,b; Gelabert et al., 2003; Sanceda et al., 2003; Ruusunen, et al., 2003; Devlieghere et al., 2009).

De todas ellas, parece que la sustitución parcial de NaCl por KCl es la mejor alternativa para reducir el contenido de sodio en productos cárnicos puesto que ambas sales tienen propiedades químicas similares y la ingesta de potasio no está relacionada con el aumento de la presión arterial (Buemi et al., 2002; Kimura et al., 2004; Geleijnse et al., 2007). No obstante, hay que tener en cuenta que la adición de KCl a los productos alimenticios está limitada debido a que el empleo de elevadas cantidades de KCl origina sabores amargos en el producto (Reddy & Marth, 1991).

Durante las últimas décadas se han desarrollado productos bajos en sal con cualidades organolépticas aceptables usando mezclas de NaCl/KCl en diferentes proporciones. Así, en salsas de pescado se han llevado a cabo sustituciones de NaCl por KCl en el ratio 75:25 o 50:50 sin que afectara a las características sensoriales del producto (Chayovan et al., 1983; Sanceda et al., 2003). En queso tipo Feta y Kefalogriera sustituciones del orden del 50 % de NaCl por KCl no afectan ni a los fenómenos proteolíticos ni a los lipolíticos que tienen lugar durante el proceso de curado, y tampoco a las características organolépticas del producto acabado (Katsiari et al., 1997; 1998; Katsiari et al., 2000a; Katsiari et al., 2000b; Katsiari et al., 2001). En productos cárnicos curados como el jamón y el lomo curado, y los embutidos curados fermentados como el salchichón o las salchichas secas, sustituciones ≤ 50 % de NaCl por KCl parecen ser adecuadas para obtener un producto aceptable desde el punto de vista sensorial y bioquímico (Gou et al., 1996; Gelabert et al., 2003; Gúardia et al., 2008; Armenteros et al., 2009b).

El uso del CaCl_2 y del MgCl_2 como sales sustitutivas del NaCl se ha empleado con el fin de enriquecer a los productos lácteos o zumos (Weaver, 1998) en este tipo de minerales ya que proporcionan una excelente oportunidad para aumentar la ingesta diaria de calcio y magnesio por parte del consumidor. También

el CaCl_2 se ha utilizado tradicionalmente para mejorar la ternura de la carne (Koochmarie y Shackelford, 1991).

El uso de este tipo de sales durante la elaboración de productos como el queso tipo Cheddar, las salchichas, los embutidos curados fermentados o el jamón curado ha originado considerables defectos en la calidad final del producto (Seman et al., 1980; Hand et al., 1982b; Fitzgerald y Buckley, 1985; Frye et al., 1986; Gimeno et al., 1999, 1998; Flores et al., 2005). Sin embargo, Armenteros et al., (2009c), utilizaron una mezcla de sales divalentes junto KCl como sustitutos parciales del contenido de NaCl en lomo curado sin que se vieran afectadas las características del producto. Asimismo, Gimeno et al., (2001), usaron ascorbato cálcico como parcial sustituto del contenido de NaCl en embutidos curados y no detectaron cambios tecnológicos en el proceso de elaboración del producto (Gimeno et al., 2001).

El uso de otras sustancias alternativas como el K-lactato o la glicina como sustitutos del NaCl en lomo curado en porcentajes ≤ 40 % no alteran el flavor ni la textura del producto (Gou et al., 1996). Estos sustitutivos han sido utilizados más en productos cocidos y así, el uso de sales comerciales como el Purasal[®] Opti. Form PD4, que contienen una mezcla comercial de K-lactato y Na-diacetato, permite la reducción del contenido de sal de hasta un 40 % en productos cárnicos cocidos, sin que afecte a la vida útil del producto ni a sus características organolépticas (Devlieghere et al., 2009). De igual modo, el uso de sustancias como el citrato sódico o el carragenato para reducir el contenido de sal en productos como las salchichas tipo Bologna pueden usarse sin que afecte a las características organolépticas del producto, aunque puede aumentar la percepción a sabor salado (Ruusunen et al., 2003). Asimismo, el uso de pequeños péptidos como la L-orнитil taurina o la L-orнитil β -alanina y los ésteres metílicos y etílicos de la glicina podrían originar sabores salados en el producto e incluso parece que lo pueden potenciar (Seki et al., 1990; Nakamura et al., 1996; Kuramitsu et al., 1997).

1.6.3 Respuesta de la Industria Alimentaria a la Reducción del Contenido de Sodio

La industria de la alimentación reconoce la necesidad de responder a la demanda de los consumidores de reducir el nivel de sal en los productos alimenticios procesados, empleando alternativas al sodio pero al mismo tiempo manteniendo las características sensoriales del producto. A lo largo de la última década se han realizado numerosos esfuerzos por parte de los gobiernos, la FSA (Food Standard Agency) y el CASH (Consensus Action Salt and Health) para animar a las grandes industrias de la alimentación a disminuir de manera gradual el porcentaje de sal en sus productos hasta que alcanzaran reducciones del orden del 50 %. De hecho en los últimos años se ha observado una gran actividad en cuanto al lanzamiento en Europa de productos bajos en sodio.

Las categorías de alimentos líderes en lo que respecta a la reducción de sal son los alimentos para la población infantil, las bebidas sin alcohol (aguas y zumos), los productos de panadería y snacks, las salsas y condimentos y las comidas preparadas.

En productos cárnicos, el plan de acción se focalizó principalmente en aquellos productos con alto contenido en sal, en previsión de los obstáculos tecnológicos que se podrían encontrar en este tipo de productos y que dificultarían la reducción del nivel de sal en ellos (Tabla 5). De hecho, empresas del sector cárnico como Campofrío y el Pozo ya han lanzado al mercado una gama de productos cárnicos cocidos bajos en sal.

Tabla 5. Nivel máximo de sal que se podría alcanzar en productos cárnicos procesados (Matthews y Strong, 2005).

Categoría	Subcategoría	Nivel Máximo de sal (mg/100g)*
Hamburguesas		450
Productos cárnicos cocidos		800
Salchichas tipo frankfurt y perritos calientes		800
Productos cárnicos derivados del pollo	Hamburguesas de pollo, nuggets, productos marinados	450
Salchichas		750
Bacon		-
Productos cárnicos curados	Jamón curado, lomo curado y embutidos curados fermentados	-

* Según el plan de acción para la reducción de sodio establecido por el Joint Sodium Working Party (JSWP) (Matthews y Strong, 2005).

El sector del jamón curado es uno de los más perjudicados por estas nuevas tendencias ya que debido a sus características y método tradicional de elaboración es un producto de elevado contenido en sodio y que lo convierte en un producto desaconsejable para aquellas personas que padecen problemas de hipertensión. Algunos productores de jamón curado en España ya están intentando reducir la cantidad de sal junto con una reducción del tiempo de salado (Blesa et al., 2008).

El éxito de estos nuevos productos bajos en sal dependerá del sabor final del producto, de la textura, de la vida útil y seguridad del producto y del precio final ya que en muchos casos es necesario reemplazar la sal común por otros compuestos más caros. Hay que destacar que también la palatabilidad y el sabor del producto son claves en la aceptación y el éxito del mismo por parte de los consumidores.

Por lo tanto, la mejor estrategia a seguir se basará en la reducción de sodio más que en la eliminación total, que resulta muy compleja. La transparencia y claridad en el etiquetado es especialmente importante con el fin de que el consumidor sepa en todo momento la cantidad diaria de sodio que está ingiriendo al día (Picaza y Riesco, 2008).

OBJETIVOS

2. Objetivos

Teniendo en cuenta la problemática que plantea la ingesta de elevadas cantidades de sal en la dieta sobre la hipertensión arterial y, dado que en España el consumo de jamón curado es muy apreciable y está ampliamente extendido, se plantean los siguientes objetivos:

1. Estudiar el efecto “*in vitro*” de varias sales sustitutivas del NaCl como son el KCl, CaCl₂ y MgCl₂, sobre la actividad de las enzimas proteolíticas musculares con una destacada actuación durante el curado del jamón.

2. Utilizar el lomo curado, por su forma característica, homogeneidad y corto periodo de elaboración como un sistema modelo para evaluar los tratamientos de salado que pudieran resultar más adecuados con miras a su posterior aplicación a jamón curado.

3. A partir de los resultados obtenidos tras los ensayos “*in vitro*” y aplicados en lomo curado, establecer las condiciones más adecuadas para su aplicación al jamón curado, y realizar los siguientes estudios:

3.1. Estudio de la penetración de las sales empleadas mediante su análisis en el interior del jamón a diferentes tiempos de post-salado y en el producto final.

3.2. Medida de la actividad enzimática a diferentes tiempos de post-salado y en el producto final.

3.3. Estudio de la degradación de las proteínas musculares (miofibrilares y sarcoplásmicas), a diferentes tiempos de post-salado y en el producto final.

3.4. Análisis de los productos resultantes de la actividad proteolítica (aminoácidos libres), a diferentes tiempos de post-salado y en el producto final.

3.5. Evaluación de las propiedades sensoriales del producto final acabado.

3.6. Análisis del daño oxidativo de las proteínas del jamón curado en comparación a otros productos cárnicos.

PLAN DE TRABAJO

3. Plan de Trabajo

Con el fin de llevar a término los objetivos propuestos anteriormente, se planteó el siguiente plan de trabajo:

1. Estudio “*in vitro*” del efecto de las sales sustitutivas del NaCl (KCl, CaCl₂ y MgCl₂) sobre la actividad de las enzimas proteolíticas musculares de tipo endopeptidasas (catepsinas B, B+L y H) y exopeptidasas (dipeptidilpeptidasas I, II, III y IV y alanil-, arginil-, leucil-, y metionil-aminopeptidasas).
2. Utilización del lomo curado como sistema modelo por su forma, homogeneidad y corto periodo de elaboración con el fin de optimizar los tratamientos de salado más adecuados para su posterior aplicación a jamón curado. Para tal fin se llevaron a cabo los siguientes estudios:
 - 2.1 Análisis de las sales empleadas en el producto acabado (~ 2 meses).
 - 2.2 Medida de la actividad de las enzimas proteolíticas musculares en el producto acabado (lomo curado).
 - 2.3 Análisis de los productos resultantes (fragmentos proteicos, aminoácidos libres y ácidos grasos libres) de la actuación de las enzimas proteolíticas y lipolíticas que sirven como marcadores de proteolisis y lipólisis, respectivamente.
 - 2.4 Realización de una prueba de aceptación sensorial de los lomos curados mediante catadores no entrenados usando descriptores previamente establecidos en productos cárnicos curados.

3. Todos estos resultados nos permiten disponer de una primera aproximación acerca de lo que puede suceder en el jamón curado, así como seleccionar las combinaciones de sales que hayan dado un producto de mayor aceptación, especialmente en sabor y aroma. Así pues, sobre estos resultados se establecieron los tratamientos de salado más adecuados con los que se fabricó un primer lote de jamones en los que se realizaron los siguientes estudios:
 - 3.1 Análisis de las sales empleadas en el interior del pernil a distintos tiempos de post-salado (20, 50 y 80 días) y en el producto acabado.
 - 3.2 Medida de la actividad de las enzimas proteolíticas (catepsinas, dipeptidilpeptidasas y aminopeptidasas) a distintos tiempos de de post-salado (20, 50 y 80 días) y en el producto acabado.
 - 3.3 Estudio de la degradación de las proteínas musculares (miofibrilares y sarcoplásmicas) por las enzimas musculares a distintos tiempos de post-salado (20, 50 y 80 días) y en el producto acabado y se analizarán los productos resultantes de dicha actividad enzimática (aminoácidos libres).
 - 3.4 Evaluación de las propiedades sensoriales del producto acabado (9 meses de proceso, aproximadamente).
4. En función de los resultados obtenidos, se elaboró un segundo lote de jamones curados en el que se corrigieron aquellos aspectos que eran susceptibles de mejora como son el ajuste de la cantidad de sal, tiempos de cada etapa, etc. Finalizado el proceso de curado, se realizaron nuevamente los estudios que se detallan en el apartado anterior pero solamente en el producto acabado (~ 11 meses de proceso).
5. Se analizaron los productos derivados de la oxidación proteica en jamón curado en comparación con otros productos cárnicos. Para ello se comparó

la técnica espectrofotométrica del DNPH usada de manera habitual en el estudio del daño oxidativo, con la espectroscopía de fluorescencia y con el análisis de los semialdehidos α -aminoadipico y γ -glutámico como marcadores de daño oxidativo, por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-ESI-MS).

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales y Métodos

4.1 Materiales

4.1.1 Materias Primas

4.1.1.1 Sal

Las sales: cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico y cloruro magnésico empleadas en los tratamientos de salado fueron suministradas por Quality Chemicals (Quality Chemicals S.L., Esparraguera, Barcelona, España). Dichas sales se mezclaron en diferentes proporciones de acuerdo a un diseño experimental de seis combinaciones tal y como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos de salado.

Tratamientos de Salado	NaCl (%)	KCl (%)	CaCl ₂ (%)	MgCl ₂ (%)
I ^a	100	-	-	-
II	65	35	-	-
III	50	50	-	-
IV	30	70	-	-
V	55	25	15	5
VI	45	25	20	10
VII	30	50	15	5

^aEl tratamiento I (100% NaCl) se corresponde con el tradicionalmente empleado en el salado de productos cárnicos tales como el lomo y el jamón curado.

4.1.1.2 Carne

El estudio “*in vitro*” de las sales de curado (NaCl, KCl, CaCl₂ y MgCl₂) sobre la actividad de las enzimas proteolíticas musculares se realizó en el músculo *Longissimus dorsi* (lomo) procedente de cerdos del cruce *Landrace x Large White* de seis meses de edad. Los lomos utilizados fueron loncheados y envasados al vacío

entre las 12 y 24 horas postmortem para ser inmediatamente congelados a -20 °C hasta su posterior uso.

4.1.1.3 Productos cárnicos para el estudio de oxidación proteica

Para realizar el estudio de la oxidación proteica se emplearon seis tipos de productos cárnicos, representativos de los que se encuentran de manera habitual en el mercado. Así pues, la carne picada, el salami, las salchichas y el paté se adquirieron en una gran superficie del área de Helsinki (Finlandia), mientras que el lomo y el jamón curado de aproximadamente 2 y 9 meses de curación, respectivamente, se compraron en la sección de charcutería de una gran superficie comercial de la zona de Valencia.

4.1.1.4 Materia prima empleada en la elaboración de los productos curados

La materia prima para las experiencias de curado se obtuvo de una empresa cárnica de la zona de Valencia.

Para las experiencias con lomo curado se emplearon lomos frescos (*Longissimus dorsi*) procedentes de cerdos con las características descritas en el apartado 4.1.1.2. Se seleccionaron 30 lomos frescos en base al criterio de homogeneidad de peso (entre 2.600 y 3.400 g), se envasaron al vacío y fueron inmediatamente congelados en un túnel de congelación a -40 °C y almacenados durante un mínimo de 5 días a -20°C hasta su uso.

Para la realización de las diferentes experiencias de jamón curado se utilizaron las extremidades posteriores del cerdo, el denominado pernil. Se seleccionaron un total de 57 perniles procedentes de cerdos del cruce *Landrace x Large White* de 6 meses de edad, con un peso medio comprendido entre 10-11 kg y un pH de 6.0 ± 0.2 . Una vez seleccionados fueron congelados en un túnel industrial a -40 °C y almacenados a -20 °C hasta su uso.

4.1.2 Reactivos Químicos

Análisis enzimáticos: Los sustratos peptídicos derivados de la 7-amino-4-metil-cumarina (AMC), el ácido etilenglicoltetraacético (EGTA), el ditioneitol (DTT), el β -mercaptoetanol, la cisteína, la puromicina, la bestatina, y el cloruro de cobalto empleados para los análisis enzimáticos fueron de la marca Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.E.U.U). El cloruro de sodio, el cloruro de potasio y el cloruro de magnesio 6-hidrato, el Tritón X-100, la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético 2-hidrato (EDTA) y los compuestos químicos utilizados en los distintos tampones se adquirieron de Panreac (Panreac Química, S.A., Barcelona, España) mientras que el cloruro de calcio fue de Scharlau (Scharlau Chemie, S.A., Barcelona, España).

Análisis de cationes y aniones: Los patrones de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , NO_2^- y NO_3^- (1000 ppm) utilizados fueron de Fluka (Fluka Chemie GMBH, Buchs SG, Suiza). Los reactivos utilizados para la fase móvil de la cromatografía fueron obtenidos de Scharlau (el ácido nítrico) y Panreac (la acetona, el bi-carbonato sódico y el carbonato sódico anhidro).

Electroforesis: Los patrones de proteína para las electroforesis, la acrilamida, el N, N, N', N'-tetra-metil-etilendiamina (TEMED), el persulfato amónico y el Comassie Brilliant Blue R-250 se obtuvieron de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratorios, Hercules, CA, E.E.U.U.). El resto de reactivos químicos utilizados fueron adquiridos en Panreac, a excepción de la urea, la glicina, el DTT y el azul de bromofenol que fueron de Sigma-Aldrich, el sodio dodecil sulfato (SDS) de Merck (Merck Egaa, Darmstadt, Alemania) y el metanol y el dicromato potásico de Scharlau.

Análisis de Aminoácidos libres: Los patrones de aminoácidos y los reactivos empleados para la derivatización se obtuvieron de Sigma-Aldrich y Fluka, respectivamente. Los disolventes orgánicos utilizados para la fase móvil (acetonitrilo y metanol) fueron de Scharlau calidad HPLC supragradient y el resto de reactivos químicos utilizados se obtuvieron de Panreac.

Ácidos grasos libres: Los patrones de los ácidos grasos libres se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Los reactivos utilizados fueron obtenidos de Scharlau a excepción de la acetona que se adquirió de Panreac, la resina de intercambio iónico Amberlyst A26 de Rohm & Haas (Rohm & Haas, Delf, Holanda) y el trifluoroboro-metanol de Sigma-Aldrich.

Análisis de la oxidación proteica en productos cárnicos: Los reactivos químicos utilizados fueron adquiridos de Fluka, Sigma-Aldrich y J.T Baker (Deventer, Holanda). El etanol y acetato de etilo grado espectrofotometría de absorción atómica se adquirieron de Rathburn Chemicals Ltd. (Walkerburn, Escocia).

El agua bidestilada empleada en todos los análisis fue de calidad Milli[®]-Q (Millipore, Milli[®]-Q Plus, Billerica MA, E.E.U.U.).

4.2 Métodos

4.2.1 Fabricación del Lomo Curado

Se elaboraron dos lotes (lote 1 y 2) de lomos curados diferentes, con 15 lomos cada uno. Así, en el lote 1 se emplearon 4 tratamientos de salado diferentes con distintos niveles de sustitución del contenido de NaCl por KCl tal y como aparece en la Tabla 2.

Tabla 2. Tratamientos de salado empleados en la elaboración del Lote 1.

Tratamientos de Salado	NaCl (%)	KCl (%)	CaCl₂ (%)	MgCl₂ (%)
I^a	100	-	-	-
II	65	35	-	-
III	50	50	-	-
IV	30	70	-	-

^a El tratamiento I: 100% NaCl se utilizó como control.

En el lote 2 se emplearon 4 tratamientos de salado diferentes con sustituciones parciales del contenido de NaCl por una mezcla de KCl, CaCl₂ y MgCl₂ tal y como se muestra en la Tabla 3. En ambos casos, el tratamiento de salado I (100% NaCl) se utilizó como control en los análisis bioquímicos y sensoriales.

Tabla 3. Tratamientos de salado empleados en la elaboración del Lote 2.

Tratamientos de Salado	NaCl (%)	KCl (%)	CaCl₂ (%)	MgCl₂ (%)
I^a	100	-	-	-
V	55	25	15	5
VI	45	25	20	10
VII	30	50	15	5

^aEl tratamiento I: 100% NaCl se utilizó como control.

Los lomos, descritos en el apartado 4.1.1.3 fueron descongelados en una cámara refrigerada a 3-4 °C durante 5 días con el fin de simular las condiciones que se llevan a cabo durante el proceso industrial (Bañon et al., 1999). Una vez descongelados, tres lomos por cada lote se emplearon para caracterizar la materia prima fresca. El resto, 12 lomos por lote, fue dividido en cuatro grupos con el fin de aplicar las diferentes mezclas de sales objeto de estudio (Tabla 2 y 3).

El método de salado empleado en todos ellos fue por frotación de la sal sobre la superficie del lomo, también denominada como la técnica del aporte de sal limitado (Andrés y Ruiz, 2001). Una vez pesados los lomos, se colocaron en bandejas de plástico de manera individual, con el fin de proceder al masajeado sobre la superficie magra del mismo de las distintas formulaciones de sales. A la cantidad de sal inicial se incorporó 150 ppm de nitratos, en forma de nitrato potásico y 150 ppm de nitrito, en forma de nitrito sódico (en relación al peso de la materia prima) con el fin de prevenir el desarrollo de microorganismos patógenos (Toldrá, 2006a).

La aplicación de la sal sobre la superficie del lomo mediante masajeado duró aproximadamente 20 minutos, transcurridos los cuales los lomos se colocaron en estantes en la cámara de salado donde las condiciones termohigrométricas fueron de 3 ± 1 °C de temperatura y un 90 % de humedad relativa (H.R.) durante 6 días.

Transcurrida la fase de salado se procedió al embutido manual de los lomos en tripas de colágeno y al secado de los mismos en cámaras de secado a 3 °C y 90 % H.R durante cinco días más. Transcurridos doce días aproximadamente desde el inicio del salado, los lomos fueron introducidos en la cámara de maduración, a 10 °C y 85 % H.R; estas condiciones se mantuvieron durante siete días más, transcurridos los cuales se cambiaron a 12 °C y 75 % H.R hasta que los lomos alcanzaron una humedad comercial del 47 % (equivalente a 35 % mermas).

Una vez alcanzada dicha humedad, un lomo por tratamiento de salado se destinó a la realización del análisis sensorial, mientras que el resto (2 lomos por tratamiento) se envasaron al vacío y se almacenaron a -20 °C hasta la realización de los respectivos análisis bioquímicos.

4.2.2 Fabricación del Jamón Curado

Se realizaron 2 fabricaciones de jamón curado diferentes donde se aplicaron los tratamientos de salado (para la reducción de sodio) previamente optimizados en las experiencias con lomo curado. La primera fabricación se usó para estudiar los efectos de la sustitución del NaCl por otras sales en la etapa del post-salado y la segunda en el producto curado.

4.2.2.1 Elaboración de los jamones destinados a estudio del post-salado

Con el objeto de estudiar el efecto de la sustitución parcial del contenido de sodio en el pernil, durante la etapa de post-salado, se seleccionaron 30 pernils congelados del lote inicial (ver Apto 4.1.1.3) con un peso medio de 10.7 ± 0.5 kg.

Los pernils seleccionados fueron descongelados en una cámara de refrigeración a 3 °C durante 5 días con el fin de simular el proceso que se lleva a cabo en cualquier industria cárnica (Blesa, et al., 2008). Tres pernils se usaron para caracterizar la materia prima en estado fresco. El resto, 27 pernils, fueron divididos en tres grupos a los que se les aplicó las formulaciones de sales de la siguiente forma: los pernils pertenecientes al 1^{er} grupo (7 pernils) se salaron usando el método tradicional, 100 % NaCl (Tratamiento I), el 2^o grupo (10 pernils) se saló con 50 % NaCl -50 % KCl (tratamiento II) y el 3^{er} grupo (10 pernils) con 55 % NaCl- 25 % KCl-15 % CaCl₂-5 % MgCl₂ (tratamiento III). El tratamiento de salado I, 100 % NaCl, fue utilizado como control en los correspondientes análisis bioquímicos (Tabla 4).

Tabla 4. Tratamientos de salado seleccionados para el estudio con jamón curado.

Tratamientos de Salado	NaCl (%)	KCl (%)	CaCl₂ (%)	MgCl₂ (%)
I^a	100	-	-	-
II	50	50		
III	55	25	15	5

^a El tratamiento I: 100% NaCl se utilizó como control en los análisis bioquímicos.

En los 3 grupos la sal fue aplicada sobre la superficie magra del pernil con el fin de incorporar las sales mediante masajeado en superficie durante 4 días, y así favorecer la penetración de toda la sal adicionada en función del peso inicial de la pieza. Adicionalmente, a esa cantidad de sal se añadieron 200 ppm de nitrato potásico y 100 ppm de nitrito sódico (Toldrá, 2006a).

Durante toda la etapa de salado, los pernils se colocaron de manera individual en bandejas de plástico con el magro en contacto con la bandeja y se apilaron de tres en tres en la cámara de salado, donde las condiciones termohigrométricas eran similares a las que se utilizan en el salado en pila; 3±1 °C de temperatura y 90 % de humedad relativa.

Estas condiciones se mantuvieron durante aproximadamente diez días. Transcurrido el tiempo de salazón, el exceso de sal exterior se eliminó de la superficie del pernil mediante un cepillado.

Finalizada la etapa de salado, los perniles fueron introducidos en la cámara de post-salado, donde permanecieron 20, 50 y 80 días (en función del intervalo de tiempo a estudiar) a temperaturas entre 4-5 °C y humedad relativa entre 75-85 %. A lo largo de todo el proceso se registró de manera automática por ordenador, la temperatura (T^a) y la humedad relativas (H.R.) de la cámara de refrigeración. También fueron registradas semanalmente por pesada las pérdidas de peso (mermas) experimentadas por los perniles.

La primera toma de muestra (3 perniles por tratamiento de salado) se realizó a los 20 días de post-salado. La segunda toma de muestras se realizó a los 50 días de post-salado (4 perniles por tratamiento de salado), tiempo que se consideró suficiente para que los iones Na^+ y Cl^- , inicialmente en la superficie del pernil, penetraran en el interior del mismo deprimiendo la actividad de agua (a_w) y asegurando la estabilidad del producto; de hecho es el tiempo que normalmente se usa en la industria cárnica.

Finalmente, la tercera toma de muestra se realizó a los 80 días de post-salado únicamente en los tratamientos de salado II y III (3 perniles por tratamiento), tiempo que se consideró necesario para que los iones K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} penetraran en las zonas más internas del jamón y se alcanzaran los mismos valores de a_w que en el pernil salado tradicionalmente (Blesa et al., 2008).

En todos los casos, la toma de muestra se realizó cortando dos lonchas de la parte central del pernil por sección transversal respecto al eje mayor del jamón (Figura 1). Las muestras se envasaron al vacío y se almacenaron en un congelador a -80°C hasta la realización de los correspondientes análisis bioquímicos.

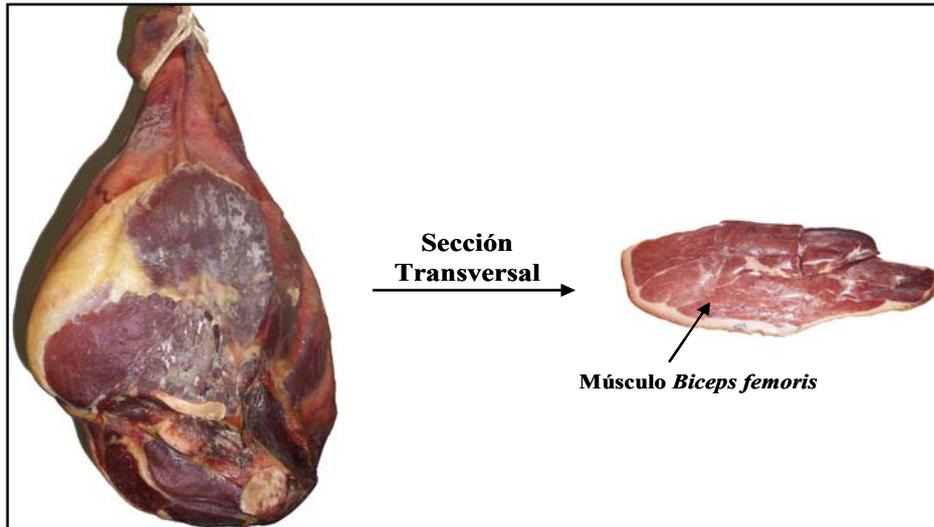


Figura 1. Muestreo para el estudio del postsalado. El músculo *Biceps femoris* se utilizó para la realización de los análisis bioquímicos.

4.2.2.2 Elaboración de los jamones destinados al estudio del producto terminado

Para la elaboración de los jamones curados se utilizaron 27 pernils del lote inicial congelados con un peso medio de 10 ± 1 Kg, con los que se elaboraron dos lotes mediante dos técnicas de salado diferentes:

Por un lado se aplicó el salado por frotación de la sal sobre la superficie del pernil según fue optimizada previamente en el apartado 4.2.2.1. Sin embargo, esta técnica presenta limitaciones tales como el alto coste de producción debido a la mano de obra requerida (Andrés y Ruíz, 2001), por lo que se ensayó además una técnica alternativa que consistió en el salado en seco usando vacío, también denominada como salado a vacío.

El primer lote de pernils se elaboró aplicando la técnica de frotación de la sal sobre la superficie magra del pernil (Figura 2). Así pues, 18 pernils del lote inicial, se descongelaron en una cámara de refrigeración a $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 días y se

dividieron en tres grupos con el fin de aplicar los tratamientos de salado optimizados en la experiencia anterior (Tabla 4). Así, al grupo I (6 pernils) se aplicó la metodología tradicional de salado 100 % NaCl, el grupo II (6 pernils) se saló con 50 % NaCl- 50 % KCl y el grupo III (6 pernils) con 55 % NaCl- 25 % KCl-15 % CaCl₂-5 % MgCl₂. El grupo I (100 % NaCl) se usó como control.

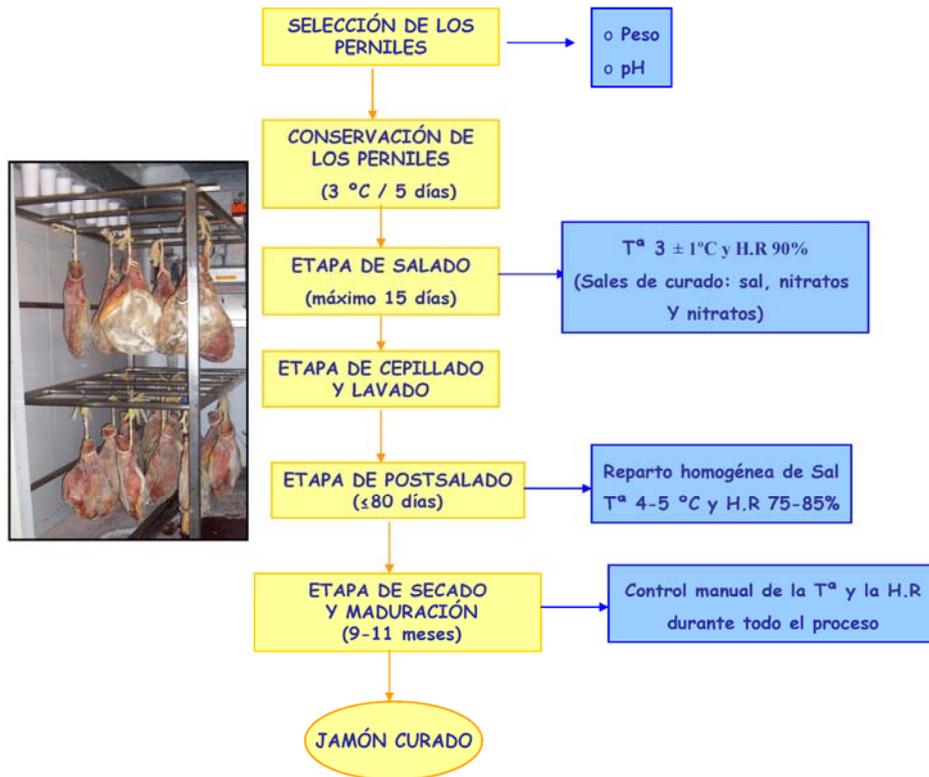


Figura 2. Esquema de fabricación de Jamón Curado.

La etapa de salado se llevó a cabo en una cámara frigorífica donde los pernils estuvieron sometidos a temperaturas de 3 ± 1 °C y humedades relativas entorno al 90 % durante un total de 10 días. Finalizada la etapa de salado y tras proceder a la eliminación del exceso de sal y las impurezas de la superficie de cada

pieza se inició la etapa de post-salado. La etapa de post-salado se llevo a cabo en las mismas condiciones que se indican en el apartado 4.2.2.1 durante un periodo de tiempo de hasta 80 días. Finalizada la etapa de post-salado, se pasó a la etapa de secado, durante la cual la temperatura de la cámara aumentó y la H.R. disminuyó paulatinamente llegando a estar sometidos los perniles a temperaturas de 22 °C y humedades relativas entorno al 65-75 %. Una vez que los perniles alcanzaron un porcentaje de pérdidas de peso (merma) entorno al 33-34 %, fueron mantecados para evitar un secado excesivo.

Durante todo el proceso se registró de forma automática la temperatura (T^a) y la humedad relativa (H.R.) de la cámara.

La toma de muestra se realizó una vez que los perniles alcanzaron 9 meses de curado y una merma del 33-34 %. Se analizaron 6 jamones curados por cada grupo (I, II, III). Cada muestra se dividió en dos porciones por sección transversal respecto al eje mayor del jamón (Figura 3).

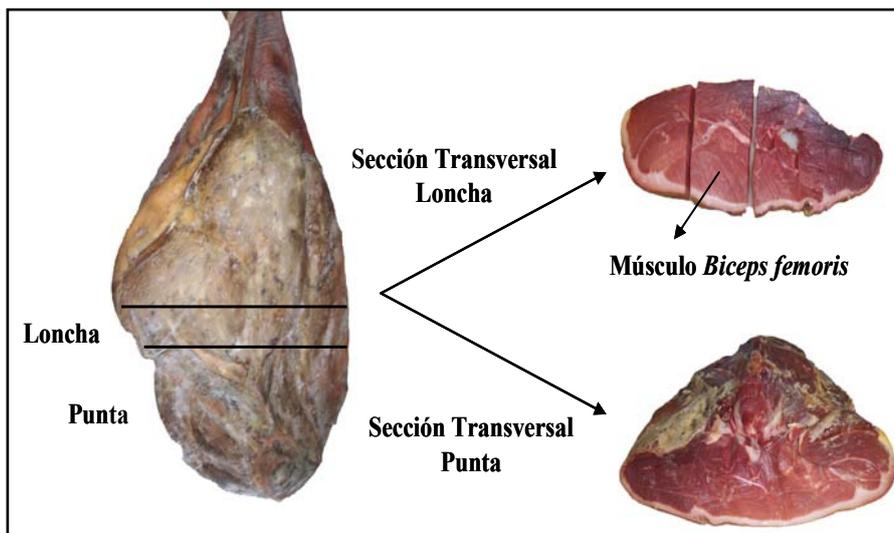


Figura 3. Muestreo para el estudio del jamón curado. Esquema de obtención de muestras transversales respecto al eje mayor del jamón. Se usó el músculo *Biceps femoris*, para la realización de los análisis bioquímicos, mientras que la punta se utilizó para la realización de los análisis sensoriales.

De cada pernil se extrajo una loncha central de aproximadamente 3 cm de grosor, se envasó al vacío y se almacenó a -80 °C hasta la realización de los correspondientes análisis bioquímicos (músculo *Biceps femoris*), mientras que de la parte central hacia la punta se reservó en refrigeración para la realización del análisis sensorial.

Finalizada la elaboración del primer lote de jamón curado y tras el análisis de los resultados, se procedió a la fabricación de un segundo lote de perniles, pero en este caso se incorporó la sal mediante el método de salado a vacío.

Para tal fin, se usaron 9 perniles del lote inicial con un peso medio de 10 ± 1 Kg. Tras ser descongelados en una cámara frigorífica a 3 °C durante aproximadamente 5 días, se procedió al salado de las piezas.

En este caso se aplicó la técnica del aporte de sal limitado usando bolsas de vacío (salado a vacío). Así pues, los perniles se dividieron en tres grupos con el fin de aplicar a cada uno de ellos los tratamientos con las distintas sales de curado (Tabla 4). Asimismo, se añadieron 200 ppm de nitrato potásico y 100 ppm de nitrito sódico a la sal con el fin de evitar posibles alteraciones microbianas (Toldrá, 2006a).

Cada pernil fue introducido de manera individual en una bolsa de vacío, y se le aplicó sobre la superficie magra del mismo la cantidad de sal adecuada en función del peso inicial de la pieza, siendo finalmente envasado a vacío con una envasadora industrial (Figura 4).

Durante la etapa de salado, los perniles se colocaron en estantes en la cámara de refrigeración dispuestos de manera individual en bandejas de plástico (Figura 5). El proceso de salado duró entorno a 13-15 días, durante los cuales las condiciones de la cámara fueron de 3 °C de temperatura y 90 % de humedad relativa. Transcurrido el tiempo de salazón, el exceso de sal exterior se eliminó para iniciarse la etapa de post-salado, que duró aproximadamente 80 días. Durante

este tiempo, los perniles estuvieron expuestos a temperaturas de 5 °C y humedades relativas entorno al 75 % (Figura 6).



Figura 4. Salazón de los perniles mediante salado a vacío.



Figura 5. Etapa de Salado ($T^{\circ} 3\pm 1^{\circ}\text{C}$ y H.R. 90%).

Las etapas siguientes fueron las fases de secado y bodega donde las condiciones de la cámara se mantuvieron constantes entorno a 15 °C de temperatura y 75 % de humedad relativa (Figura 7).



Figura 6. Etapa de Postsalado ($T^{\circ} 5^{\circ}\text{C}$ y H.R. 75%/ 60 días).



Figura 7. Etapa de Secado-Maduración (~ 6 meses).

Cuando alcanzaron un 33-34 % de mermas se mantecaron y se mantuvieron en la cámara de maduración hasta los 11 meses de curado.

La toma de muestra se realizó a los 11 meses de maduración como en la fabricación anterior.

4.2.3 Determinación de la Actividad Enzimática

4.2.3.1 Preparación de extractos enzimáticos musculares

4.2.3.1.1 Catepsinas

El extracto enzimático para el ensayo de catepsinas se preparó tal y como describen Toldrá y Etherington (1988). Se utilizaron 2.5 g de músculo triturado exento de grasa y tejido conectivo visible. Posteriormente, se homogenizaron 1:10 (p/v) a 4 °C con 25 mL de tampón citrato sódico 50 mM, pH 5.0, conteniendo EDTA 1 mM y Tritón X-100 al 2 % (v/v), usando un Polytron® PT-MR 2100 (Kinematica AG, Luzernerstrasse, Suiza) (3 x 10s) a 26.000 r.p.m. El homogeneizado resultante se centrifugó a 10.000 x g durante 20 minutos a 4 °C, en una centrífuga refrigerada Sorvall® Evolution RC (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, TX, E.E.U.U). El sobrenadante se recogió y se filtró a través de lana de vidrio con el fin de retener la grasa y se almacenó a 4 °C hasta su uso. Este sobrenadante constituye el extracto enzimático.

4.2.3.1.2 Dipeptidilpeptidasas y aminopeptidasas

La preparación del extracto enzimático para peptidasas (dipeptidilpeptidasas y aminopeptidasas) se realizó como previamente describen Flores et al. (1997a). Se tomaron porciones de 4.0 g de músculo triturado desprovisto de grasa y de tejido conectivo visible, que se homogenizaron 1:5 (p/v) con 20 mL de tampón fosfato 50 mM, pH 7.5, conteniendo EGTA 5 mM, y se procesaron y almacenaron en las condiciones descritas en el apartado anterior.

4.2.3.2 Medida de la actividad enzimática

Las actividades enzimáticas se midieron empleando sustratos fluorescentes específicos para cada tipo de enzima.

4.2.3.2.1 Catepsinas

El ensayo fluorimétrico para medir la actividad catepsina se realizó siguiendo el método descrito por Rico et al. (1991). Las catepsinas B (EC 3.4.22.1) y B+L (EC 3.4.22.15) se ensayaron en tampón fosfato 40 mM, pH 6.0, conteniendo cisteína 10 mM y EDTA 0.4 mM. En el caso de la catepsina B se usó N-CBZ-Arg-Arg-AMC 0.05 mM como sustrato fluorescente, mientras que para la catepsina B+L se utilizó como sustrato N-CBZ-Phe-Arg-AMC 0.05 mM. La actividad de la Catepsina H (EC 3.4.22.16) se ensayó en el mismo tampón pero a pH 6.8 y usando Arg-AMC 0.05 mM como sustrato.

4.2.3.2.2 Dipeptidilpeptidasas

La actividad de cada una de las dipeptidilpeptidasas se determinó tal y como describieron Sentandreu y Toldrá (2001c). Para determinar la actividad de la dipeptidilpeptidasa I (DPPI) (EC 3.4.14.1) se utilizó como sustrato Gly-Arg-AMC 0.5 mM en tampón acetato 50 mM, pH 5.5, conteniendo DTT 5 mM, mientras que para la dipeptidilpeptidasa II (DPPII) (EC 3.4.14.2) se empleó el mismo tampón pero usando como sustrato Lys-Ala-AMC 0.5mM conteniendo bestatina 0.032 mM. La medida de actividad de la dipeptidilpeptidasa III (DPPIII) (EC 3.4. 14.5) se determinó empleando como sustrato H-Arg-Arg-AMC 0.5 mM, en tetraborato sódico 50 mM, pH 8.0, conteniendo cloruro de cobalto 0.05 mM y bestatina 0.032 mM. Finalmente, para determinar la actividad de la dipeptidilpeptidasa IV (DPPIV) (EC 3.4.14.5) se usó como sustrato Gly-Pro-AMC 0.25 mM en tampón Tris base 50 mM, pH 8.0, conteniendo DTT 5 mM.

4.2.3.2.3 Aminopeptidasas

Para determinar la actividad alanil aminopeptidasa (AAP) (EC 3.4.11.14.) en el extracto cárnico se utilizó tampón fosfato 100 mM, pH 6.5, conteniendo β -mercaptoetanol 2 mM y como sustrato fluorescente se usó Ala-AMC 0.1 mM (Flores et al., 1996). Mientras que en el caso de la arginil aminopeptidasa (RAP) (EC 3.4.11.6) se utilizó el mismo tampón, pero conteniendo cloruro sódico (NaCl) 200 mM, puromicina 0.25 mM y Arg-AMC 0.1 mM como sustrato (Flores et al., 1993). La actividad de la leucil aminopeptidasa (LAP) (EC 3.4.11.1) se determinó utilizando como tampón de reacción borato-NaOH 50 mM, pH 9.5, conteniendo cloruro de magnesio 5 mM y Leu-AMC 0.25 mM como sustrato (Flores, et al., 1997a). Por último, la medida de actividad de la metionilaminopeptidasa (MAP) se realizó en tampón fosfato 100 mM, pH 7.5, añadiendo DTT 10 mM y bestatina 0.05 mM usando Ala-AMC 0.15 mM como sustrato (Flores, et al., 2000).

4.2.3.2.4 Método de medida

La medida de la actividad enzimática se realizó mediante un lector de fluorescencia Fluoroskan Ascent FL (Thermo Electron Corporation LabSystems, Helsinki, Finlandia). Así pues, a 250 μ L de cada uno de los tampones de reacción anteriormente citados incluyendo el sustrato se adicionó 50 μ L del extracto enzimático. La mezcla de reacción (300 μ L) se depositó en una placa de fluorescencia de 96 pocillos y se incubó a 37 °C durante 15 minutos. La lectura de fluorescencia se realizó en continuo ($t=0$ y $t=15$), empleando longitudes de onda de excitación y emisión de 355 nm y 460 nm, respectivamente.

Las medidas se realizaron por cuadruplicado, a excepción del caso de las dipeptidilpeptidasas que se realizaron por triplicado. Una unidad de actividad (U) se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 μ mol de sustrato por minuto a 37 °C.

4.2.3.2.5 Cálculos

La actividad enzimática se expresó en micromoles de AMC liberados por minuto y por mL de disolución de enzima. Los micromoles de AMC liberados por cada enzima durante el tiempo de incubación se obtienen por interpolación de los valores de fluorescencia obtenidos en las lecturas del fluorímetro en una recta patrón que correlaciona distintos valores de fluorescencia con sus correspondientes concentraciones micromolares de AMC. La ecuación general que proporciona el valor de dicha actividad enzimática es:

$$\text{Actividad} \left(\frac{\mu\text{moles}}{\text{min} \cdot \text{mL}} \right) = \frac{\Delta F \times k \times V_t \times V_{ET} \times D}{t \times V_E \times g}$$

ΔF : Incremento de fluorescencia en el pocillo desde $t=0$ al tiempo de medida (en este caso $t= 15$ minutos).

k : pendiente de la recta patrón que relaciona los ΔF con la concentraciones de AMC.

V_t : Volumen total de reacción (mL).

V_{ET} : Volumen de extracto obtenido (mL).

D : factor de dilución de la muestra.

t : tiempo de incubación (minutos).

V_E : Volumen de la muestra enzimática añadida al volumen de sustrato (mL).

g : Cantidad de carne o jamón utilizados (gramos).

4.2.4 Efecto del Cloruro Sódico, Potásico, Cálculo y Magnésico sobre la Actividad de las Enzimas Proteolíticas Musculares

El efecto del NaCl y el KCl sobre la actividad de las proteasas musculares (catepsinas, dipeptidilpeptidasas y aminopeptidasas) se estudió en extractos de músculo *L. dorsi* siguiendo las metodologías anteriormente descritas, adicionando NaCl y KCl al tampón de reacción en el intervalo de concentración de 0-1.5 M. Mientras que el efecto de las sales divalentes ($MgCl_2$ y $CaCl_2$) sobre la actividad proteasa se ensayó en presencia de $MgCl_2$ 0-500 mM ó $CaCl_2$ 0-150 mM usando el medio de reacción apropiado para cada enzima, pero con algunas modificaciones (Armenteros et al., 2009a). Así pues, el efecto del $MgCl_2$ sobre la actividad de las catepsinas B, B+L y H se estudió usando los tampones anteriormente descritos y los sustratos específicos para cada tipo de enzima pero sin adicionar EDTA, mientras que el efecto del $CaCl_2$ sobre la actividad de la catepsina B y B+L se estudió usando tampón Tris (tris-(hidroximetil)-aminometano)-HCl, 0.1 M a pH 6.0, como medio de reacción, y en el caso de la catepsina H se determinó usando tampón acetato 0.1 M a pH 6.8. En ambos análisis se utilizaron sustratos apropiados para cada tipo de enzima.

Para estudiar el efecto del $CaCl_2$ sobre la actividad de la alanil-, arginil-, y metionil- aminopeptidasa se utilizó tampón acetato 0.1 M a pH adecuado para cada enzima al igual que se usaron los sustratos y reactivos específicos para cada una de ellas.

Se utilizó como control la medida de la actividad enzimática (catepsina, dipeptidilpeptidasa y aminopeptidasa) de un extracto de músculo *L. dorsi* fresco sin adicionar sal (NaCl, KCl, $MgCl_2$ y $CaCl_2$) al tampón de reacción. La actividad de cada enzima se expresó en unidades U.

4.2.5 Determinación de la Actividad Enzimática en Productos Cárnicos

La actividad de las diferentes enzimas proteolíticas musculares (catepsinas, dipeptidilpeptidasas y aminopeptidasas) se cuantificó en productos cárnicos siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.2.3. Tras obtener los

correspondientes extractos enzimáticos para cada grupo de enzimas, se determinó su actividad mediante la utilización de sustratos fluorescentes específicos para cada una de ellas. Los resultados se expresaron en micromoles de AMC liberados por minuto y por mL de solución de enzima.

4.2.6 Determinación de la Concentración de Cationes y Aniones en Productos Cárnicos

La extracción de los iones se realizó previo troceado y picado de las muestras en una trituradora de uso doméstico. Así pues, 5 g de la muestra triturada se homogenizaron con 50 mL de agua bidestilada (calidad Milli[®]-Q) en un masticador (IUL Instruments, Barcelona, España) durante 10 minutos a 4 °C. Los homogeneizados obtenidos se centrifugaron a 10.000 x g, 20 minutos a 4 °C en una centrifuga refrigerada (Sorvall[®] Evolution). El sobrenadante obtenido se filtró a través de lana de vidrio e inmediatamente se congeló a -20 °C hasta su uso.

Previo a la realización del análisis cromatográfico, las muestras descongeladas se filtraron a través de filtros de nylon de 0.45 µm de tamaño de poro para seguidamente ser inyectadas en el equipo cromatográfico de análisis de iones Metrohm 838 Advanced Sample processor (Metrohm, Lt., Herisau, Suiza). Este equipo dispone de un módulo para la preparación de la muestra constituido por una Unidad de Manejo de Líquidos (838 Advanced Sample Processor), que cuenta con un carro para 148 viales y una aguja para la toma de muestras conectada con una bomba peristáltica de doble canal, que impulsa la muestra de manera continua a través de una membrana de ultrafiltración “*in line*” de acetato de celulosa de 0.2 µm de tamaño de poro, hasta el bucle de inyección y 20 µL son inyectados en la columna. Para el análisis de cationes (Na⁺, K⁺, Mg²⁺ y Ca²⁺) se utilizó una columna de intercambio catiónico, Metrosep C3 -250 de 4.0 x 250 mm y 5 µm de tamaño de poro equipada con un guarda columna S-Guard de 5.0 x 4.0 mm (Metrohm Ltd. Herisau, Suiza). La fase móvil utilizada fue ácido nítrico 3 mM al que se adicionó 50 mL/L acetona. Para el análisis de aniones (Cl⁻, NO₂⁻ y NO₃⁻) se utilizó una columna de intercambio aniónico, Supp 5-250 de 4.0 x 250 mm y 5

µm de tamaño de poro equipada con un guarda columna A Supp 4/5 de 5.0 x 4.0 mm (Metrohm Ltd. Herisau, Suiza) y como fase móvil se utilizó bi-carbonato sódico 1.0 mM y carbonato sódico 3.2 mM, con adición de 30 mL/L de acetona. La detección de los iones se realizó por conductimetría y en el caso de los aniones (Cl^- , NO_2^- y NO_3^-) se llevó a cabo una supresión iónica cuya finalidad fue amplificar químicamente la señal de las muestras en el detector a base de eliminar previamente la conductividad de la fase móvil. Previo al análisis de las muestras se obtienen rectas de calibrado para cada uno de los iones estudiados, utilizando patrones estándar de cationes (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+}) y aniones (Cl^- , NO_2^- y NO_3^-). Para procesar y analizar los datos se empleó el software IC Net 2.3 Metrohm® Ltd. (Herisau, Suiza).

La concentración de cada catión se determinó por interpolación del área cromatográfica en su correspondiente recta de calibrado. Los resultados se expresaron en mg/ 100g de muestra tras realizar la media de tres determinaciones.

4.2.7 Estudio de la Degradación Proteica en Productos Cárnicos

El estudio de la degradación de proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas, se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

4.2.7.1 Extracción de proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares

La extracción de las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares se realizó siguiendo el método descrito por Molina y Toldrá (1992). Así pues, las muestras trituradas (5g) se homogenizaron 1:10 (p/v) con tampón fosfato 0.03M, pH 7.4 durante 3 minutos a 4 °C usando un masticador (IUL Instruments) y se centrifugaron a 10.000 x g durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido, que contenía las proteínas sarcoplásmicas se filtró a través de lana de vidrio y se reservó en frío (4 °C) hasta su uso, mientras que el pellet se lavó tres veces más en las condiciones descritas anteriormente con el objeto de eliminar cualquier resto de proteínas sarcoplásmicas. El pellet resultante se pesó y se resuspendió en 9 volúmenes de tampón fosfato 100 mM a pH 7.4 conteniendo KI 0.7 M y azida de

sodio al 0.02 % (p/v) y se homogenizó en el masticador durante 8 minutos para seguidamente centrifugarse a 10.000 x g durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante, que contenía las proteínas miofibrilares fue filtrado a través de lana de vidrio y se mantuvo en frío (4 °C) hasta su uso.

4.2.7.2 Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína se determinó por el método de Smith et al. (1985), empleando el ácido binciconínico (BCA) (BCA proteína assay kit, Sigma-Aldrich) como agente reactivo y la albumina de suero bovino (BSA) (Roche Diagnostiscs Corporation, Indianapolis, IN, E.E.U.U.) como proteína patrón. Se construyeron curvas patrón de 6 puntos en el intervalo de concentración de 0 a 1.20 mg/ mL. La proteína se monitorizó mediante la lectura de absorbancia a 565 nm.

4.2.7.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

El estudio de la proteolisis se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes mediante SDS-PAGE al 12 o al 15 % como se describe en Toldrá et al. (1992). Los extractos de proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares, obtenidos según el apartado 4.2.7.1 (100 µL) se mezclaron en la proporción 1:1 (v/v), con tampón Tris 50 mM, pH 6.8 conteniendo 8 M urea, 2 M tiourea, 75 mM DTT, 3 % (p/v) SDS y 0.05 % (p/v) de azul de bromofenol. Las mezclas (200 µL) se calentaron a 100 °C durante 4 minutos, se enfriaron rápidamente y se almacenaron a -20 °C, hasta su uso.

Los geles se prepararon usando una concentración de acrilamida del 12 o 15 % y utilizando en el gel de Stacking una concentración del 3 %.

Conocida la carga de proteína de las muestras (ver Apdo 4.2.7.2), se ajustó dicha carga a 1 mg / ml mediante dilución con el tampón anterior. Seguidamente, 12 µL (equivalente a 12 µg de proteína) de cada una de las muestras fueron inyectadas en el gel de electroforesis, hasta un máximo de 9 muestras por gel, junto con una muestra patrón (en este caso 5 µL) compuesta por

una mezcla de miosina (200 kDa), β -galactosidasa (116 kDa), fosforilasa B (97 kDa), albúmina del suero (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de tripsina (21,5 kDa), lisozima (14 kDa) y aprotinina (6,5 kDa). La electroforesis se realizó siguiendo el método descrito por Laemmli (1970), empleando una fuente de alimentación 3000 Xi (Bio-Rad, Richmond E.E.U.U) a la que se aplicó un voltaje de 200 V y 25 mA. La tinción se realizó usando Coomassie Brilliant Blue R-250 (Laemmli, 1970) y/o plata (Merril et al., 1981) para mejorar la visualización de las bandas de los geles de electroforesis, como fue el caso de los perfiles utilizados en el estudio de post-salado. Finalmente, los geles se fotografiaron con un equipo Fujifilm Las 1000 Intelligent Dark Box II (Fujifilm, S.A., España).

En los casos donde se requirió, se determinaron las masas moleculares de los fragmentos proteicos resultantes de la degradación de proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas. Para ello, se calculó el cociente (valor Rf) entre la distancia de migración de cada uno de los patrones y la distancia recorrida por el frente de la electroforesis y se relacionó con el logaritmo de los respectivos valores de masa molecular de cada una de las proteínas patrón, obteniéndose una curva semilogarítmica que permitió determinar mediante interpolación de los respectivos valores Rf de las bandas proteicas, las masas moleculares de los fragmentos proteicos presentes en el gel.

4.2.8 Análisis de Aminoácidos Libres en Productos Cárnicos

Las muestras fueron troceadas y trituradas (5g) y homogeneizadas 1:5 (p/v) con ácido clorhídrico (HCl) 0.01 N en el masticador durante 8 minutos a 4 °C. Los homogenizados obtenidos se centrifugaron a 10.000 x g, durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se filtró a través de lana de vidrio y se almacenó a -20 °C hasta su uso (Aristoy y Toldrá, 1991).

Los extractos se desproteinizaron siguiendo el método descrito por Aristoy y Toldrá (1991). Para ello, a los extractos descongelados se les añadió un patrón interno Nor-leucina (10 mM) y aproximadamente 2.5 volúmenes de acetonitrilo.

Las cantidades (volúmenes) de extracto y patrón interno dependieron del tipo de muestra, tal y como aparece en la Tabla 5.

Tabla 5. Volumen en μL de patrón interno y de acetonitrilo que se añade a cada extracto proteico.

	Volumen de Extracto (μL)	Volumen de Patrón Interno ^a (μL)	Volumen Acetonitrilo (μL)
Carne Fresca	250	50 ^b	750
Perniles Frescos	250	50 ^b	750
Lomo Curado	200	50	600
Jamón Curado	100	50	400

^a Patrón Interno: Norleucina 10 mM.

^b Patrón Interno diluido a la mitad.

Tras dejar reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron en una microcentrifuga Microfuge® 22R Centrifuge (Beckman Coulter TM, Fullerton, CA, E.E.U.U.) durante 5 minutos a 12.000 r.p.m. y a 4 °C. Los sobrenadantes se sometieron a derivatización con fenilisotiocianato siguiendo el método descrito por Bidlingmeyer et al. (1987) y se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa empleando una columna Nova-Pak® C18 (3.9x300mm) (Waters Corporation, Milford, MA, E.E.U.U), en un cromatógrafo modelo 1100 de Agilent Technologies (Palo Alto, CA, E.E.U.U) equipado con un sistema de bombeo cuaternario, sistema de desgasificación de disolventes en línea, horno para la columna y detector de fotodiodos. La separación se realizó en 56 minutos, manteniendo la columna a 52 °C, y empleando un gradiente entre dos fases: A: acetato sódico 70 mM a pH 6.55, conteniendo 2.5 % de acetonitrilo y B: metanol, acetonitrilo y agua bidestilada grado Milli®-Q, en la siguiente proporción 40:45:15 (v/v), a un flujo de 1 mL / min, tal y como se describe en Flores et al. (1997b). La detección se realizó a 254 nm. Los resultados se expresaron en mg /100g muestra como medias de tres determinaciones.

4.2.9 Análisis de Ácidos Grasos Libres en Productos Cárnicos

Los lípidos totales fueron extraídos a partir de 5 g de muestra utilizando el método descrito por Folch et al. (1957), empleando como disolvente diclorometano: metanol 2:1 (v/v) en lugar de cloroformo: metanol 2:1 (v/v). La fracción de los ácidos grasos libres se purificó siguiendo el método descrito por Countron- Gambotti y Gandemer (1999) usando una resina de intercambio aniónico Amberlyst A26 (Rohm & Haas, Delf, Holanda). La composición de ácidos grasos libres se determinó como describe Needs et al. (1983), mediante cromatografía de gases de los correspondientes ésteres metílicos, con algunas modificaciones. Los derivados fueron obtenidos según el método de Berry et al. (1965) y la separación y análisis se llevó a cabo tal y como describen Navarro et al. (2001) usando un cromatógrafo de gases Fisons 816 (Fisons Instruments, San Carlos, CA, E.E.U.U) equipado con un detector de ionización de llama. La inyección se realizó en split (1:50) y se utilizó una columna capilar DB-225, de 30m x 0,25 mm y 0.25 μ m de espesor de film; (J&W Scientific, Barcelona, España). El detector y el inyector se mantuvieron a temperatura de 240 °C. Los ácidos grasos se identificaron individualmente por comparación de sus tiempos de retención con los respectivos patrones. El patrón interno utilizado fue ácido araquídico C20:0. Los resultados se expresaron en mg / 100g muestra como medias de tres determinaciones.

4.2.10 Análisis de Humedad

El contenido en humedad de los perfiles se determinó usando un analizador de humedad halógeno compacto HB 43 (Mettler Toledo, Greifensee, Suiza). Así pues, 2.5 g de muestra triturada se expuso durante aproximadamente 28 minutos a una temperatura constante de 150 °C con el fin de obtener de manera automática el contenido en humedad del producto.

4.2.11 Análisis Sensorial

Las sesiones se realizaron en cabinas individuales a 22 °C, equipadas con luz blanca fluorescente (220-230 V 35 W) y un ordenador personal (Hewlett-

Packard). La evaluación de los respectivos análisis sensoriales se realizó utilizando el programa de ordenador Compusense® five versión 4.6 (Compusense Inc., Guelph, Ontario, Canadá).

4.2.11.1 Lomo Curado

Al final del proceso de curado (~ 2 meses), los lomos se envasaron al vacío y se mantuvieron en refrigeración hasta el día del análisis. Entonces, se cortaron lonchas de aproximadamente 5 mm de grosor usando un cortafiambre industrial. Las lonchas se dispusieron en platos de plástico para la evaluación de los atributos sensoriales sabor y textura y se dejaron equilibrar durante 20 minutos a temperatura ambiente (20-30 °C) antes de servirse a los catadores, junto con un vaso de agua y una tostada de pan sin sal. Para el análisis de color, las muestras se dispusieron en una cámara de iluminación Multilight D65. Las lonchas para el aroma se colocaron en placas petri.

El análisis se llevó a cabo por un panel de 48 catadores no entrenados en cuatro sesiones diferentes y consistió en un prueba de comparación por parejas (ISO 5495, 1983), en la que se utilizó como control los lomos salados con el tratamiento I (100% NaCl). Cada tratamiento de salado se comparó respecto al control, para determinar qué muestra era la preferida por cada catador respecto a los atributos color, aroma, sabor, textura y aceptación global.

4.2.11.2 Jamón Curado

4.2.11.2.1 Muestreo

El jamón curado es una pieza formada por varios músculos, corteza y grasa, lo que le confiere una elevada heterogeneidad, por lo que resulta de suma importancia definir la zona de muestreo si queremos obtener unos resultados reproducibles y comparables (Guerrero et al., 1996). Así pues, para tener una buena caracterización sensorial del jamón se decidió analizar cortes que incluían

los músculos *Semimembranosus* (SM), *Semitendinosus* (ST) y *Biceps femoris* (BF) (Gou et al., 1995).

Con el fin de obtener muestras representativas y lo más homogéneas posible de dichos músculos se realizaron dos cortes transversales en la punta del jamón obteniéndose una loncha de 10-15 cm de espesor (ver Apdo 4.2.2.2). Sobre está se realizó un tercer corte logitudinal obteniéndose una loncha de aproximadamente 3 cm sobre la cuál se valoraran los atributos visuales correspondientes. El resto de loncha (~ 7 cm) fue dividido en dos por la parte central con el fin de obtener lonchas transversales de los músculos SM, ST y BF de aproximadamente 2 mm de grosor usando un cortafiambre industrial. En total se necesitaron dos lonchas por muestra y catador; una para la evaluación de los atributos sabor y aroma y otra para la textura. Una vez cortadas las lonchas, inmediatamente se enrollaron de tal manera que la grasa quedó situada hacia el interior del rollito y se dispusieron en placas petri con el fin de conservar todas sus propiedades organolépticas, especialmente el aroma (Figura 8).

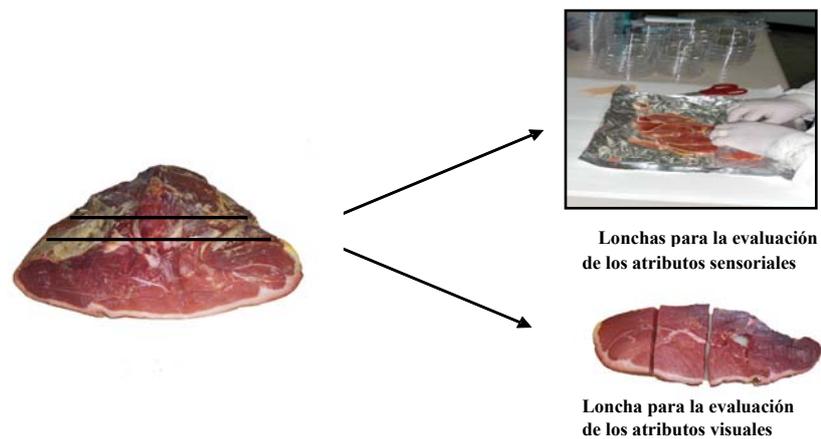


Figura 8. Esquema de obtención de muestras para la realización del análisis sensorial.

Posteriormente las muestras fueron evaluadas por el panel de catadores no entrenados.

4.2.11.2.2 Evaluación de las muestras

Las pruebas de evaluación sensorial que se llevaron a cabo fueron las siguientes:

a. Prueba de comparación por parejas

La prueba de comparación por parejas se realizó según la norma ISO 5495 (1983) para establecer si existía o no preferencia manifiesta por alguna de las muestras presentadas en cada par. Las parejas se establecieron de forma que las muestras a evaluar se enfrentaban con la muestra control (tratamiento I, 100% NaCl) y entre sí.

Las muestras se analizaron por un panel de 48 catadores no entrenados en una sola sesión. A cada catador se le presentaron cada una de las parejas de muestras y se le pidió que escogiera cuál prefería dentro de cada pareja en base a los atributos sensoriales: aroma, sabor, textura en sus parámetros dureza y jugosidad, así como la aceptación global. Para el atributo apariencia, las lonchas de aproximadamente 3 cm de grosor se colocaron en platos de plástico sobre un fondo blanco en una cabina de iluminación Multilight D65. Junto con las muestras se sirvió un vaso de agua y una tostada de pan sin sal.

b. Prueba Triangular (ISO 4120, 1983)

El objetivo de esta prueba fue establecer diferencias entre jamones curados con los tres tratamientos de salado que se describen en la Tabla 4, para evaluar el impacto de éstos sobre las características sensoriales del producto acabado. El tratamiento I (100% NaCl) se usó como control.

Las muestras se presentaron tal y como se describe en el apartado 4.2.10.2.1. La evaluación de las muestras se realizó por un panel constituido por 50 catadores no entrenados, en una sola sesión, de modo que a cada catador, se le sirvieron de manera simultánea tres muestras, dos de las cuales eran iguales, con el

fin de que identificara la muestra diferente. Junto con las muestras, se suministró una tostada de pan sin sal y un vaso de agua.

c. Prueba hedónica de aceptabilidad

Se aplicó una prueba de aceptabilidad de escala hedónica de 9 puntos (1= me disgusta extraordinariamente a 9= me gusta extraordinariamente) con el fin de evaluar las preferencias de cada catador no entrenado en base a los atributos sensoriales; sabor, aroma, textura en sus parámetros dureza y jugosidad, así como la aceptación global para cada una de las muestras objeto de estudio (Willians y Langron, 1984). Las muestras fueron analizadas por un panel de catadores no entrenados formado por estudiantes y personal de ambos sexos pertenecientes al Instituto de Agroquímica y tecnología de alimentos (IATA, Valencia, España), dentro del rango de edad comprendido entre los 18-65 años. El tratamiento de las muestras fue el descrito en el apartado 4.2.10.2.1. Para el atributo apariencia, las lonchas de aproximadamente 3 cm de grosor se colocaron en platos de plástico sobre un fondo blanco en una cabina de iluminación Multilight D65. Las muestras se analizaron por un panel de 100 catadores en dos sesiones diferentes. A cada catador se le sirvió, de manera individual y aleatoria, cada muestra junto con un vaso de agua y una tostada de pan sin sal.

4.3 Análisis Estadístico de los Resultados

La evaluación del efecto de la sustitución parcial de NaCl por otras sales de curado (KCl, CaCl₂ y MgCl₂) sobre las variables estudiadas (actividades enzimáticas, aminoácidos, ácidos grasos libres y el contenido de Na⁺, K⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺), así como en los resultados de los análisis sensoriales, se llevó a cabo mediante un análisis de la varianza (ANOVA) realizado con el software estadístico Stagraphics plus (versión 5.1). En aquellos casos en que el efecto del tratamiento de salado sobre la variable estudiada fuera significativo ($p < 0.05$), las medidas de cada tratamiento se compararon por medio del test de Fisher de la diferencia mínima significativa (LSD) ($p < 0.05$).

4.4 Análisis del Daño Oxidativo en Productos Cárnicos

4.4.1 Análisis Químicos en Productos Cárnicos

Las muestras (ver Apdo 4.1.1.3) se caracterizaron mediante la determinación del contenido en humedad y de la concentración total de grasa y proteína siguiendo los métodos oficiales de análisis para productos cárnicos de la AOAC (2000a, 2000b, 2000c).

4.4.2 Estudio de la Oxidación Lipídica en Productos Cárnicos

El estudio de la oxidación lipídica en productos cárnicos se llevó a cabo por 2 métodos: el análisis de la formación de hexanal por cromatografía de gases de espacio de cabeza estático y el análisis de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

El análisis de hexanal se realizó a partir de 1 g de muestra, previamente triturada, usando un cromatógrafo de gases de espacio de cabeza estático equipado con un inyector automático (Autosystem XL; Perkin-Elmer, Shelton, CT, USA; column NB-54, Nordion) siguiendo el método descrito por Frankel et al. (1994).

Los TBARS se cuantificaron siguiendo el método descrito por Salih et al. (1987). Así pues, 2.5 g de cada muestra, previamente descongelada y triturada se homogenizaron 1:3 (v/v) con ácido perclórico al 3.86 %, conteniendo 0.25 mL de BHT (butilhidroxitolueno) (disuelto en etanol al 4.2 %) usando un Ultra-Turrax® T-50 Homogenizer (IKA®, Staufen, Alemania) durante 1 minuto. Durante la homogenización las muestras se mantuvieron sumergidas en un baño de hielo para minimizar el desarrollo de reacciones de oxidación durante la extracción de los TBARS. El homogenizado resultante se filtró a través de filtros de papel de 70 mm de diámetro y se centrifugó a 3.500 r.p.m durante 5 minutos. A continuación, se tomaron alícuotas de 2 ml de cada muestra, se mezclaron con 2 mL de ácido tiobarbitúrico 0.02 M (TBA) y se incubaron en un baño a 90 °C durante 30 minutos. Al mismo tiempo se realizó un curva patrón y un blanco (2 ml de ácido perclórico y 2 mL de TBA). Tras la incubación, las muestras, la recta patrón y el

blanco se enfriaron en un baño de hielo para seguidamente medir la absorbancia en un espectrofotómetro a 532 nm. La recta patrón se preparó usando 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) (25 nmol / mL) en ácido perclórico a 3.86 %. Los resultados se expresaron como nmol malondialdehído (MDA)/ Kg muestra.

4.4.3 Estudio de la Oxidación Proteica en Productos Cárnicos

El estudio de la oxidación proteica en productos cárnicos se llevó a cabo por tres métodos diferentes: en 1^{er} lugar, por cuantificación de los grupos carbonilo mediante espectrofotometría utilizando 2,4- dinitrofenilhidrazina (DNPH) como reactivo, en 2^o lugar mediante la evaluación de los productos de la oxidación proteica que emiten fluorescencia natural por espectrofluorescencia y por último se realizó el análisis de los semialdehídos α -aminoadípico y γ -glutámico (AAS y GGS) utilizados como marcadores del daño oxidativo en proteínas mediante cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas (LC-ESI-MS).

4.4.3.1 Método del DNPH

El análisis de la oxidación proteica mediante el método del DNPH se realizó previa derivatización con 2,4 -dinitrofenilhidrazina (DNPH) según describe Oliver et al. (1987) con ligeras modificaciones (Lund et al., 2007).

Los productos cárnicos se descongelaron, trituraron y homogenizaron 1:10 (v/v) con tampón pirofosfato ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) 2 mM, tris-maleato 10 mM, KCl 100 mM, MgCl_2 2 mM y EGTA 2 mM, pH 7.4 usando un Ultra-Turrax® T-50 durante 30 segundos. Los homogenizados resultantes se dividieron en dos alícuotas de 0.1 mL. Las proteínas presentes se precipitaron mediante la adición de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % y se centrifugaron a 5.000 r.p.m durante 5 minutos desechando los sobrenadantes. Uno de los pellets se trató con 1 mL de HCl 2 N (para cuantificar la concentración de proteína) y al otro se adicionó 1 mL de DNPH al 0.2 % disuelto en HCl 2 N (para cuantificar la concentración de carbonilos). Ambas alícuotas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente (agitándose cada

15 minutos). Finalizada la incubación, se adicionó a cada alícuota 1 mL de TCA al 10 %, para, seguidamente, lavarse dos veces con 1 mL de etanol: etilacetato 1:1 (v:v). En cada paso de lavado las muestras se agitaron y centrifugaron a 10.000 r.p.m durante 5 minutos. Finalmente, los pellets se resuspendieron con 1.5 mL de tampón fosfato 20 mM, pH 6.5 conteniendo hidrocloreuro de guanidina 6 M, se agitaron y centrifugaron durante 2 minutos a 5.000 r.p.m con el fin de eliminar fragmentos insolubles presentes en las muestras.

La proteína se monitorizó mediante la lectura de la absorbancia emitida por las muestras a 280 nm. La concentración de proteína se determinó usando albúmina de suero bovino como proteína patrón. Se construyeron curvas patrón de 6 puntos en el intervalo de concentración de 0 a 2 mg/ mL.

La cantidad total de carbonilos se midió a 370 nm y se expresó como nmol de carbonilos por mg de proteína, usando el coeficiente de extinción molar para las hidrazonas ($21.0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.4.3.2 Espectroscopía de fluorescencia

La oxidación proteica en productos cárnicos se evaluó también mediante la medida de la fluorescencia emitida por los productos de oxidación proteica presentes en extractos cárnicos acuosos según describen Estévez et al. (2008a), y Heinonen et al. (1998). Los productos cárnicos se trituraron y homogenizaron 1:10 (v:v) con tampón fosfato 10 mM, pH 6.0 conteniendo cloruro sodico 0.6 N usando un Ultra-Turrax®. Previo al análisis, las muestras fueron filtradas a través de gasa quirúrgica. Entonces, 4 mL de cada extracto se transfirieron a una cubeta de cuarzo de 4 mL de capacidad. Las medidas se realizaron en un fluorímetro LS 55 Perkin-Elmer (Beaconsfield, Inglaterra), midiendo la fluorescencia a una λ_{ex} = 350 nm y una λ_{em} = 450 nm.

Los resultados obtenidos se expresaron en unidades de fluorescencia emitidas por los productos de oxidación proteica a 450 nm. Estos valores fueron corregidos teniendo en cuenta el contenido de proteína en cada producto. Así, las

unidades de fluorescencia (U) se multiplicaron por un factor de corrección (Cf); $C_f = P_t / P_p$, donde P_t es la concentración media de proteína de los productos cárnicos objeto de estudio y P_p es la concentración de proteína en cada producto cárnico (ver Apdo. 4.4.1).

4.4.3.3 Análisis de los semialdehidos α -aminoadípico (AAS) y γ -glutámico (GGS)

Se analizaron las concentraciones de AAS y GGS en productos cárnicos previa derivatización de las muestras según el método descrito por Akagawa et al. (2006), usando LC-ESI-MS como describe Estévez et al. (2009).

4.4.3.3.1 Preparación de las muestras

Las muestras fueron cortadas, trituradas y seguidamente se homogenizaron 1:10 (p/v) en tampón fosfato 10 mM conteniendo cloruro sodico 0.6 M usando un Ultra-Turrax® durante 30 segundos. A continuación, se tomaron alícuotas de 200 μ L de cada muestra, se precipitaron con 2 mL de TCA al 10 % y se centrifugaron a 2.000 r.p.m durante 30 minutos. Los sobrenadantes se desecharon y el pellet resultante se trató con 2 mL de TCA al 5 % y se centrifugó a 5.000 r.p.m durante 5 minutos. A continuación las muestras se derivatizaron. En primer lugar se añadió a cada muestra 500 μ L de tampón ácido 2-(*N*-morfolino) etanosulfónico (MES) 250 mM, pH 6.0, conteniendo SDS al 1 % y 1 mM de ácido dietilenotriaminopentaacético. Seguidamente, se adicionó 500 μ L de tampón MES 250 mM, pH 6.0 conteniendo 50 mM de ácido *p*- amino benzoico (ABA) y 250 μ L de tampón MES, pH 6.0 conteniendo NaCNBH₃ 100 mM. La mezcla se incubó en un baño termostático con agitación a 37 °C durante 1 hora. Finalizada la incubación, las proteínas presentes en la muestras fueron precipitadas mediante la adición de 500 μ L de TCA al 50 % y se separaron por centrifugación a 10.000 r.p.m durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se desechó y el pellet se lavó en primer lugar con 1 mL de TCA al 10 % y después otras dos veces más con etanol/éter etílico 1:1 (v/v); en cada paso de lavado las muestras se agitaron y centrifugaron 5 minutos a 10.000 r.p.m. Posteriormente, los precipitados se

hidrolizaron usando HCl 6 N a 110 °C durante 18 h. Las proteínas hidrolizadas se secaron en un evaporador rotatorio a 40 °C. Finalmente, los hidrolizados fueron resuspendidos en 200 µL de agua calidad Milli®-Q, para su análisis por LC-ESI-MS. Por otro lado, las soluciones patrón de AAS y GGS, se sintetizaron “*in vitro*” a partir de *N*-acetil-L-lisina y *N*-acetil-L-orнитina usando lisil oxidasa extraída de la membrana de la cáscara del huevo, siguiendo el método descrito por Akagawa et al. (2006).

4.4.3.3.2 Cuantificación del AAS y del GGS

Para cuantificar los semialdehidos AAS y GGS presentes en los hidrolizados de muestras cárnicas, se inyectaron 2 µL de cada hidrolizado en un equipo HPLC Agilent 1100 series, equipado con una columna de fase reversa Luna (5 µm, 150 x 1.00 mm) (Phenomenex Torrance, CA, E.E.U.U) utilizando como fase móvil una mezcla de agua-ácido acético al 2.5 % (solvente A; 95 %) y metanol-ácido acético 2.5 % (solvente B; 5 %) a un flujo de trabajo de 50 µL/ min. La columna se mantuvo durante todo el análisis a 30 °C. El eluido de la columna se transfirió a un espectrómetro de masas de tipo cuadrupolo-trampa iónica equipado con interfase electrospray (ESI) (Esquire-LC quadrupole ion trap mass spectrometer with ESI interface, Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) que nos permitió detectar cada semialdehido por separado. El voltaje aplicado fue de 3500 V. Los espectros de masas de los semialdehidos AAS y GGS se obtuvieron cubriendo el intervalo de masas de 100 a 700 m/z. La presión del gas nebulizador (nitrogeno) fue de 50 psi, a un flujo de 8 L/ min, manteniendo la temperatura a 300 °C.

Para recoger y analizar los datos se utilizó el programa informático LC-MSD, versión 5.2 (Bruker Daltonics). La identificación de ambos semialdehidos se confirmó mediante correlación con los tiempos de retención y los espectros de masas de los correspondientes patrones. Los picos que se corresponden con las formas moleculares de los iones AAS-ABA y GGS-ABA se integraron manualmente y las áreas resultantes se utilizaron como indicadores arbitrarios de

abundancia de ambos semialdehidos. Los resultados se corrigieron considerando la concentración de proteína de cada producto cárnico, como se describe en el apartado 4.4.3.2.

4.4.4 Análisis Estadístico de los Resultados

A lo largo del estudio se utilizaron dos lotes de productos y todos los análisis se realizaron por triplicado (n=6). Los datos obtenidos del análisis de oxidación proteica y lipídica se usaron como variables del estudio y se les realizó un análisis de la varianza (ANOVA) (SPSS, 1999) para comparar medias entre diferentes productos cárnicos.

En los casos en que las diferencias fueron significativas, las medias se compararon usando el Test de Tukey's. Adicionalmente, se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson's para establecer analogías entre los resultados de los análisis proteicos y lipídicos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. Resultados y Discusión

El presente apartado de *resultados y discusión* está formado por una compilación de capítulos que forman parte de una serie de publicaciones que se detallan en el apartado de difusión de resultados. Al mismo tiempo cabe mencionar que al final de cada capítulo se incluye una discusión general del mismo que engloba y enlaza los temas tratados durante la realización de esta tesis doctoral.

CAPÍTULO I: *Efecto del Cloruro Sódico, Potásico, Cálculo y Magnésico Sobre la Actividad de las Enzimas Proteolíticas Musculares.*

(European Food Research and Technology, 2009: 229, 93-98)

CAPÍTULO II: *Cambios Bioquímicos en Lomos Curados Salados con Sustitución Parcial del Contenido de NaCl por KCl.*

(Food Chemistry, 2009: 117, 629-633)

CAPÍTULO III: *Propiedades Bioquímicas y Sensoriales en Lomos Curados con Sustitución Parcial de Sodio por Potasio, Calcio y Magnesio.*

(Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009: 57 (20), 9699-9705)

CAPÍTULO IV: *Cambios Bioquímicos Durante la Elaboración del Jamón Curado con Sustitución Parcial del Contenido de NaCl por Otras Sales.*

(Pendiente de enviar Meat Science)

CAPÍTULO V: *Características Sensoriales del Jamón Curado con Sustitución Parcial del Contenido de NaCl por Otras Sales: Influencia del Contenido de Sal y las Condiciones de Procesamiento.*

(Pendiente de enviar Meat Science)

CAPÍTULO VI: *Análisis de la oxidación en Proteínas de Origen Cárnico Mediante el Empleo del Método de la Dinitrofenilhidrazina (DNPH), Espectroscopía de Fluorescencia y Cromatografía Líquida Acoplada a un Espectómetro de Masas Con Fase Electrospray (LC-ESI-MS).*

(Meat Science, 2009: 83 (1), 104-112)

CAPÍTULO I

Efecto del Cloruro Sódico, Potásico, Cálcico y Magnésico Sobre La Actividad de Las Enzimas Proteolíticas Musculares.

European Food Research and Technology, 2009:229, 93-98

Capítulo I. Efecto del Cloruro Sódico, Potásico, Cálcico y Magnésico Sobre la Actividad de las Enzimas Proteolíticas Musculares.

Durante la última década la mayoría de estudios realizados han demostrado que el cloruro de sodio actúa como fuerte inhibidor de la actividad de las enzimas proteolíticas musculares (Sárraga, et al., 1989; Rico et al., 1991; Toldrá et al., 1993; Flores et al., 1997a). Sin embargo, no existen actualmente datos disponibles acerca del efecto que podría causar el uso de las sales sustitutivas del NaCl (KCl, CaCl₂ y MgCl₂) sobre la actividad de dichas enzimas proteolíticas.

Asimismo, a la hora de reducir el contenido de sodio en los productos cárnicos o sustituirlo por otras sales alternativas hay que tener en cuenta que el empleo de éstas podría tener importantes consecuencias sobre los fenómenos proteolíticos, que a su vez se vería reflejado en las características organolépticas del producto final. Por este motivo, es de suma importancia conocer los efectos que provocaría el empleo de estas sales alternativas sobre la actividad de las enzimas proteolíticas, ya que éstas juegan un papel de suma importancia durante la elaboración de los productos cárnicos curados. Más aún si se considera que su actividad, de manera general, está regulada por la concentración de NaCl que se añade al producto.

Por consiguiente, en este capítulo se comparará el efecto del NaCl con el del KCl, CaCl₂ y MgCl₂ sobre la actividad de las enzimas proteolíticas musculares con el fin de conocer si el uso de dichas sales como sustitutivas del NaCl, podría tener consecuencias importantes sobre la actividad enzimática proteolítica del músculo porcino.

Entre los resultados obtenidos se comprobó que el KCl ejerce el mismo efecto inhibidor que el NaCl sobre la actividad de las enzimas proteolíticas

estudiadas (catepsinas, dipeptidilpeptidasas y aminopeptidasas), mientras que las sales divalentes, CaCl_2 y MgCl_2 , mostraron fuertes diferencias sobre la actividad de dichas enzimas en relación al NaCl . Más concretamente, las cuatro sales estudiadas pero especialmente las sales divalentes (CaCl_2 y MgCl_2) inhibieron fuertemente la actividad catepsina (ver Figura 1).

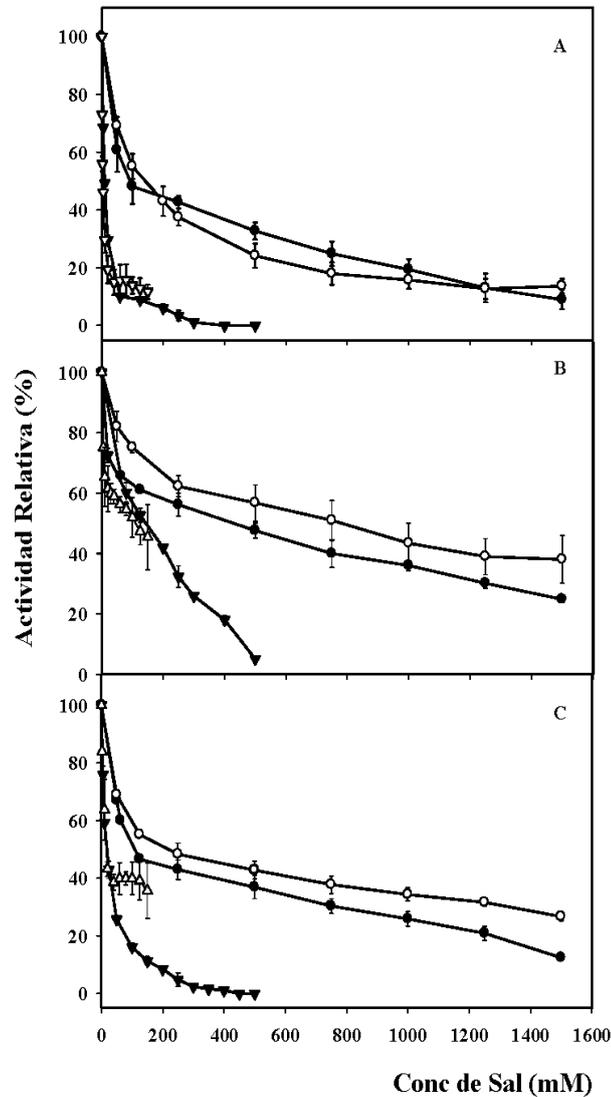


Figura 1. Efecto de las sales de cloruro (●) NaCl , (○) KCl , (▼) MgCl_2 y (▽) CaCl_2 sobre la actividad de la catepsina B (A), la catepsina B+L (B) y la catepsina H (C).

De tal manera que la presencia de bajas concentraciones tanto de CaCl_2 como de MgCl_2 provocaron un efecto inhibitor más pronunciado que el del NaCl sobre la actividad catepsina. Ambas sales tuvieron un efecto muy similar sobre la actividad de las catepsinas B y B+L, pero en relación a la catepsina H, el efecto inhibitor del MgCl_2 fué mucho mayor, y así, mientras que una concentración de 0.1 M de CaCl_2 inhibió hasta el 60 % la actividad de la catepsina H, la misma concentración de MgCl_2 inhibió la actividad en más del 80 % (ver Figura 1 C).

En el caso de las dipeptidilpeptidasas, solo la DPPIII y la DPPIV se mostraron inhibidas en presencia de todas las sales estudiadas. Y de nuevo el KCl ejerció un efecto similar al del NaCl sobre la actividad dipetidilpeptidasa (ver Figura 2). Adicionalmente, cabe mencionar que la DPPI fue activada en presencia de concentraciones de NaCl , KCl y MgCl_2 inferiores a 0.6 M (ver Figura 2 A). Asimismo, muy bajas concentraciones de CaCl_2 alrededor de 10 mM activaron al enzima, aunque concentraciones de esta sal del orden de 100 mM provocaron una fuerte inhibición de la misma.

La DPPII fue activada en presencia únicamente de MgCl_2 en el medio de reacción y moderadamente inhibida por las otras sales (ver Figura 2 B), mientras que la DPPIII y DPPIV fueron inhibidas por todas las sales estudiadas (ver Figura 2 C, D), mostrando perfiles de inhibición mucho más pronunciados en presencia de bajas concentraciones de sales divalentes (MgCl_2 y CaCl_2).

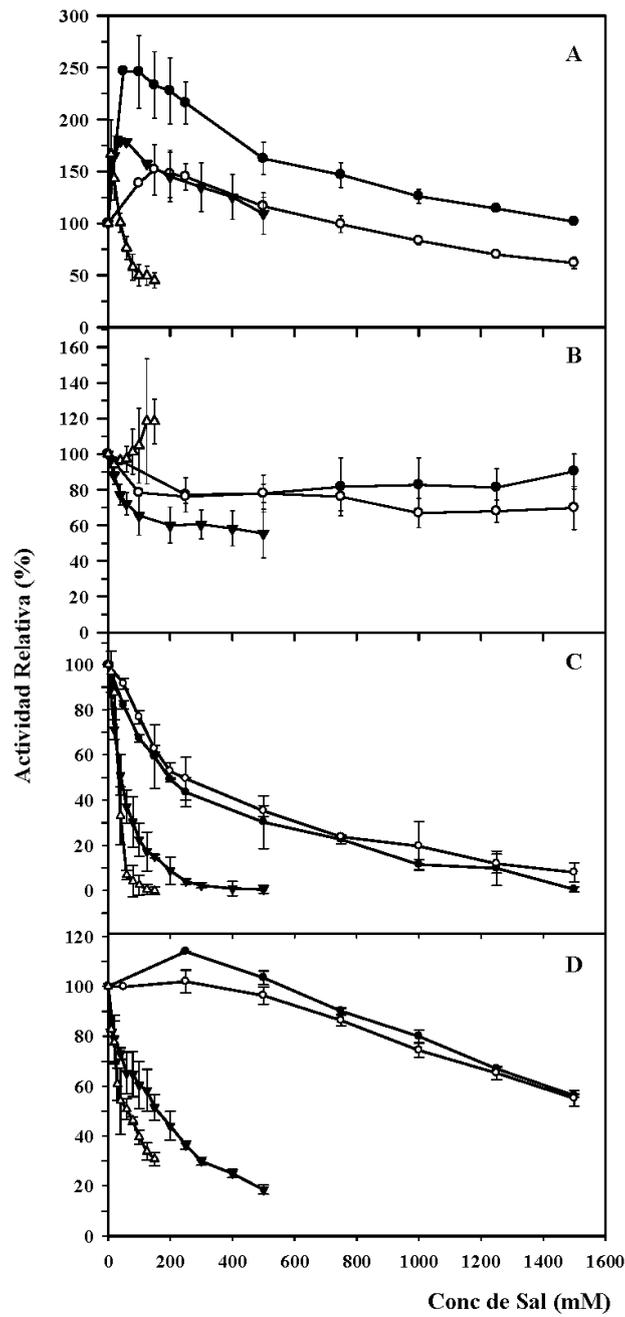


Figura 2. Efecto de las sales de cloruro (●) NaCl, (○) KCl, (▼) MgCl₂ y (▽) CaCl₂ sobre la actividad de la DPPI (A), la DPPII (B), la DPPIII (C) y la DPPIV (D).

Para finalizar, cabe mencionar que el efecto de las sales sustitutivas del NaCl sobre la actividad aminopeptidasa fue diferente dependiendo del tipo de enzima a estudiar (ver Figura 3). En general, el CaCl₂ se mostró como el inhibidor más potente de la actividad aminopeptidasa a excepción del caso de la enzima leucil aminopeptidasa (LAP). El KCl ejerció nuevamente un efecto muy similar al del NaCl sobre la actividad aminopeptidasa, y únicamente presentó algunas diferencias en el caso de la enzima arginilaminopeptidasa (RAP) (ver Figura 3 B). Asimismo, la aminopeptidasa más importante a nivel proteolítico, la alanilaminopeptidasa (AAP), fue fuertemente inhibida por todas las sales estudiadas y, en especial, por las divalentes (ver Figura 3A). Por el contrario, la arginilaminopeptidasa (RAP) mostró una activación en presencia de sales monovalentes y se inhibió en presencia de CaCl₂ en el medio de reacción. El MgCl₂ ejerció una activación del enzima a muy bajas concentraciones pero concentraciones alrededor de 200 mM inhibieron su actividad (ver Figura 3 B). La actividad de la enzima leucilaminopeptidasa (LAP) no se vio afectada por la presencia de las sales estudiadas en el medio de reacción (ver Figura 3C), mientras que la metionilaminopeptidasa (MAP) no estuvo afectada por la presencia de sales monovalentes. En cambio, la presencia de las sales divalentes en el medio de reacción (CaCl₂ y MgCl₂) inhibió su actividad a diferentes grados.

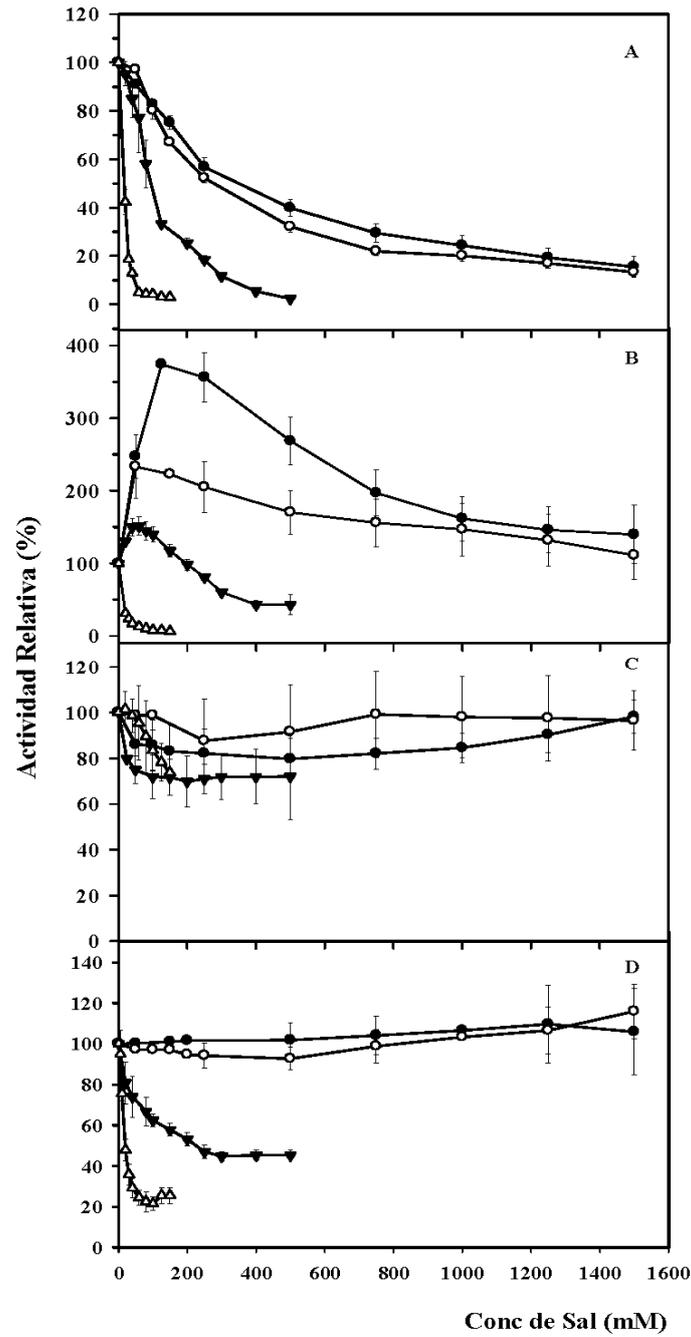


Figura 3. Efecto de las sales de cloruro (●) NaCl, (○)KCl, (▼) MgCl₂ y (▽) CaCl₂ sobre la actividad de la alanil- (A), arginil- (B), leucil- (C) y metionil (D) aminopeptidasa.

Así pues, el KCl no ejerció ningún efecto significativamente diferente al del NaCl sobre la actividad de las enzimas proteolíticas musculares estudiadas mientras que las sales divalentes (CaCl_2 y MgCl_2) por su parte ejercieron un efecto similar al del NaCl pero mucho más acusado para la mayoría de las enzimas estudiadas, es decir, que se requerirían concentraciones mucho más bajas de estas sales para conseguir el mismo efecto. La que presentó el efecto más dispar fue el CaCl_2 , en especial sobre la DPPI y II, y sobre la arginilaminopeptidasa (RAP).

Por consiguiente, la sustitución parcial del contenido de NaCl por una concentración similar de KCl o por bajas concentraciones de sales divalentes no debería alterar la actividad enzimática, especialmente si ajustamos debidamente las concentraciones de las sales divalentes. Con esto se podría disminuir la concentración de NaCl en productos cárnicos curados, sin afectar sensiblemente el proceso proteolítico que tiene lugar durante su elaboración.

CAPÍTULO II

Cambios Bioquímicos en Lomos Curados Salados con Sustitución Parcial del Contenido de NaCl por KCl.

Food Chemistry, 2009: 117, 629-633

Capítulo II. Cambios Bioquímicos en Lomos Curados con Sustitución Parcial del Contenido de NaCl por KCl.

Actualmente existe la tendencia por parte de los consumidores de demandar productos elaborados bajos en sal, dado que se ha comprobado la relación existente entre el aumento de la presión arterial y el consumo elevado de sal en la dieta (Matthews y Strong, 2005; Russunen y Puolanne, 2005).

Por este motivo, y a tenor de que el NaCl es uno de los ingredientes esenciales de los productos cárnicos, durante los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios con el fin de elaborar productos cárnicos bajos en sal usando mezclas de NaCl y KCl. Sin embargo, únicamente sustituciones de hasta un 50 % de NaCl por KCl resultaron adecuadas para obtener un producto aceptable desde el punto de vista de la calidad sensorial sin que se vieran afectadas sus propiedades microbiológicas (Whiting y Jenkins, 1981; Hand et al., 1982b; Keeton, 1984; Pasin et al., 1989; Gou et al., 1996; Gelabert et al., 2003).

Por otro lado, existe muy poca información acerca del efecto que produce la sustitución del contenido de NaCl por KCl sobre los fenómenos proteolíticos y lipolíticos que tienen lugar a lo largo del proceso de elaboración de los productos cárnicos curados. Por lo tanto, el objetivo fundamental de este capítulo fue evaluar el efecto que provoca la sustitución parcial del contenido de NaCl por KCl sobre las características bioquímicas y sensoriales del lomo curado, al final de la fase de maduración de dicho producto.

En primer lugar, con el fin de comprobar la correcta penetración de las sales utilizadas en los tratamientos de salado, se determinó el contenido residual de los cationes sodio y potasio en los lomos curados al final del proceso de maduración. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Contenido de sodio y potasio (mg /100 g m.s) en los lomos curados utilizando cuatro tipos de tratamientos de salado: I: Control, 100 % NaCl; II: 65 % NaCl-35 % KCl; III: 50 % NaCl-50 % KCl y IV: 30 % NaCl-70 % KCl.

Cationes	Tratamientos de Salado			
	I	II	III	IV
Na ⁺	2782.0	2454.0	1555.0	1230.0
K ⁺	621.0	1707.0	1859.0	2631.0
Na ⁺ :K ⁺ ratio	4.48	1.44	0.84	0.47
mEq Na ⁺	120.9	106.6	67.6	53.4
mEq K ⁺	15.9	43.7	47.6	67.4
mEq Na ⁺ :K ⁺ ratio	7.60	2.43	1.42	0.79

mEq Na⁺ = mg / 100 g Na⁺/23.

mEq K⁺ = mg / 100 g K⁺/39.

Como era de esperar, los lomos curados salados con una mezcla de NaCl y KCl (tratamientos II, III y IV) mostraron un aumento en el contenido residual del ión K⁺, el cuál aumentó de manera proporcional a la concentración de KCl que se añadía a la mezcla de sales.

El análisis sensorial de los lomos curados, al final de la etapa de maduración, y cuyos resultados aparecen en la Tabla 2, no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$ %) con respecto a los atributos aroma, textura y sabor entre los lomos control (tratamiento I, 100 % NaCl), y aquellos lomos sometidos a los tratamientos de salado II y III, donde se produjeron sustituciones de hasta un 50 % de NaCl por KCl. Además, los lomos curados salados con los tratamientos II y III fueron preferidos por el panel de catadores respecto a los atributos color y aceptación global. Sin embargo, los lomos curados salados con un 70 % de KCl (tratamiento IV) recibieron baja puntuación por el panel de catadores con respecto a todos los atributos estudiados a excepción del color el cuál no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$ %) con respecto a los lomos control.

Tabla 2. Análisis Sensorial (test de preferencia por parejas) de los lomos curados salados con los cuatro tratamientos de salado diferentes al final del proceso de maduración.

Atributos Sensoriales	Tratamientos de Salado ^a				P-valor ^b
	I	II	III	IV	
Color	8 ^c	40			<0.001
	5		43		<0.001
	23			25	n.s
Aroma	28	20			n.s
	29		19		n.s
	34			14	<0.01
Textura	18	30			n.s
	19		29		n.s
	31			17	<0.01
Sabor	18	30			n.s
	21		27		n.s
	37			11	<0.001
Aceptación Global	14	34			<0.01
	17		31		<0.1
	38			10	<0.001

^a Tratamientos de salado: I: Control (100 % NaCl); II: lomos curados salados con el tratamiento II (65 % NaCl- 35 % KCl); III: lomos curados salados con el tratamiento III (50 % NaCl- 50 % KCl); IV: lomos curados salados con el tratamiento IV (30 % NaCl- 70 % KCl).

^b Nivel de significación: n.s ($p > 0.05$ %).

^c Número de catadores que prefieren cada tratamiento (número total igual a 48).

Estos resultados se correlacionan con los encontrados por Gelabert et al. (2003) y Gou et al., (1996) en embutidos curados fermentados y en lomo curado, respectivamente, e indican que sustituciones de hasta un 50 % de NaCl por KCl no afectan a la textura o el color del producto y además proporcionan un flavor aceptable sin que se aprecie sabor a amargo de manera notable. De hecho, los mejores valores obtenidos en nuestro estudio se corresponden con los lomos curados

salados con sustitución parcial de un 50 % del contenido de NaCl por KCl (tratamiento III).

Con el fin de conocer cómo se vieron afectadas las enzimas proteolíticas tras el empleo de los distintos tratamientos de salado (I, II, III y IV) se estudiaron las actividades residuales catepsinas, dipeptidilpeptidasas y aminopeptidasas en los lomos curados.

Estudios previos ya habían demostraron que la sal (NaCl) induce un efecto inhibitorio sobre la actividad de las catepsinas B y B+L (Rico et al., 1991; Toldrá et al., 1993). En este caso, en los lomos curados en presencia de KCl se observó una mayor actividad residual de la catepsina B y B+L en comparación con los lomos sometidos al tratamiento control (tratamiento I, 100 % NaCl). La diferencia fue significativamente mayor ($p < 0.05$ %) en aquellos lomos sometidos a los tratamientos de salado III y IV (50 y 70 % de KCl, respectivamente) como se muestra en la Tabla 3. Por otro lado, la actividad de la catepsina H no se vió afectada seriamente por ninguno de los tratamientos de salado experimentales estudiados (II, III y IV).

Tabla 3. Actividad proteolíticas enzimática ($U \times g \times 10^{-3}$) en los lomos curados salados con los cuatro tipos de tratamientos de salado: I: Control, 100 % NaCl; II: 65 % NaCl- 35 % KCl; III: 50 % NaCl- 50 % KCl y IV: 30 % NaCl- 70 % KCl.

Enzima	Tratamientos de Salado				Media E.S. ¹
	I	II	III	IV	
Catepsina B	1.26 ^a ±0.28	1.33 ^a ±0.05	2.29 ^b ±0.06	2.23 ^b ±0.00	0.10
Catepsina B+L	3.68 ^a ±0.29	4.46 ^a ±0.24	7.92 ^b ±1.09	8.63 ^b ±0.01	0.41
Catepsina H	0.08±0.05	0.24±0.00	0.02±0.00	0.12±0.06	0.09
Dipeptidipeptidasa I	4.64 ^a ±0.41	2.35 ^b ±0.12	1.00 ^c ±0.15	2.42 ^b ±0.05	0.18
Dipeptidilpeptidasa II	0.28±0.13	0.31±0.04	0.36±0.10	0.37±0.06	0.08
Dipeptidilpeptidasa III	5.76 ^a ±0.29	5.02 ^{ab} ±0.24	4.10 ^b ±0.08	1.63 ^c ±0.50	0.28
Dipeptidilpeptidasa IV	1.19 ^a ±0.28	0.39 ^b ±0.01	0.99 ^a ±0.11	1.25 ^a ±0.05	0.11
Alanilaminopeptidasa	8.48 ^a ±0.90	9.45 ^{ab} ±0.31	6.52 ^c ±0.16	10.23 ^b ±0.29	0.42
Arginilaminopeptidasa	0.71 ^a ±0.13	0.61 ^a ±0.02	1.08 ^b ±0.04	0.92 ^c ±0.02	0.05
Leucilaminopeptidasa	4.37 ^a ±0.06	4.97 ^a ±0.11	4.73 ^a ±0.21	6.41 ^b ±0.12	0.13
Metionilaminopeptidasa	2.11 ^a ±0.45	1.22 ^b ±0.16	0.86 ^b ±0.17	1.14 ^b ±0.06	0.21

Diferentes superíndices dentro de la misma línea, indican diferencias significativas entre tratamientos de salado ($p < 0.05$ %).

¹ E.S.: Error estándar.

Estos resultados sugieren que sustituciones del orden del 50 % de NaCl por KCl o superiores podrían dar lugar a un aumento de la actividad de la catepsina B y B+L que se vería reflejado en una prolongación de la proteólisis.

La actividad residual de las dipeptidilpeptidasas en los lomos curados fue diferente dependiendo del tipo de tratamiento de salado empleado (ver Tabla 3). La excepción fue la DPPII, que no se vio afectada por el tipo de tratamiento ($p < 0.05$ %). Así pues, la actividad de la DPPI fue significativamente mayor ($p < 0.05$ %) en los lomos curados con 100 % NaCl (tratamiento I, control) en comparación con aquellos salados con los tratamientos experimentales II, III y IV. La actividad de la DPPIII disminuyó significativamente ($p < 0.05$ %), tanto más cuanto mayor fue el porcentaje de sustitución de NaCl, mientras que la actividad de la DPPIV no se vio afectada por ninguno de los tratamientos de salado estudiados, excepto por el tratamiento II que ejerció un ligero efecto inhibitorio sobre su actividad ($p < 0.05$ %).

Por último, la actividad aminopeptidasa estuvo afectada por los tratamientos de salado empleados de la siguiente manera: la RAP mostró mayor actividad residual en aquellos lomos salados con los tratamientos III y IV, mientras que la LAP solamente en aquellos lomos salados con el tratamiento IV (ver Tabla 3).

Por el contrario, la actividad residual de la MAP fue significativamente menor en los lomos salados con mezclas de NaCl y KCl. El efecto del potasio sobre la actividad residual de la AAP, fue variable y no se encontró una clara relación con el porcentaje de sustitución.

Las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares se extrajeron al final del proceso de curado de los lomos salados con los cuatro tratamientos de salado y su composición se analizó por electroforesis (ver Figura 1 y 2, respectivamente).

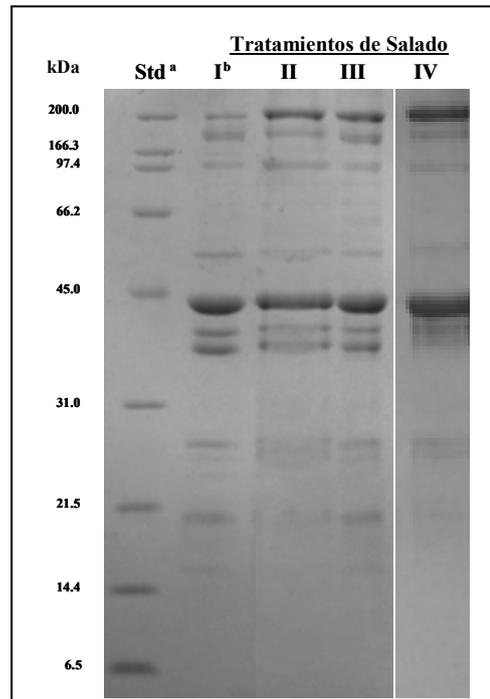


Figura 1. SDS-PAGE al 12% de las proteínas miofibrilares de los lomos curados salados con cuatro tipos de tratamientos de salado. ^aStd: Masas moleculares de los patrones de proteína. ^b Tratamientos de salado: I: 100% NaCl; II: 65 % NaCl- 35 % KCl; III: 50 % NaCl- 50 % KCl y IV: 30 % NaCl – 70 % KCl.

Como se muestra en las Figuras 1 y 2, las diferencias más relevantes se observaron en las proteínas sarcoplásmicas, mientras que los perfiles electroforéticos de las proteínas miofibrilares fueron muy similares en todos los tratamientos. De hecho, los electroferogramas de las proteínas miofibrilares (ver Figura 1) mostraron en todas las muestras una intensa degradación de las bandas de miosina y actina, a lo largo de la fase de maduración como previamente ya se había observado en jamón curado (Toldrá et al., 1993).

Por otro lado, los perfiles electroforéticos de las proteínas sarcoplásmicas mostraron más densidad de bandas en los lomos curados salados con sustitución parcial del contenido de NaCl (tratamientos II, III y IV) que aquellos salados tradicionalmente (tratamiento I), como se muestra en la Figura 2. Más concretamente, los lomos curados con los tratamientos II, III y IV mostraron un progresivo incremento en la intensidad de bandas entre los 55 kDa y los 28 kDa. Esto estaría relacionado con la alta actividad catepsina B y B+L que se encontró en aquellos lomos salados con alta concentración de potasio. La excepción fue la banda de 36 kDa, correspondiente a la gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa, y que se mantuvo en todas las muestras con la misma densidad.

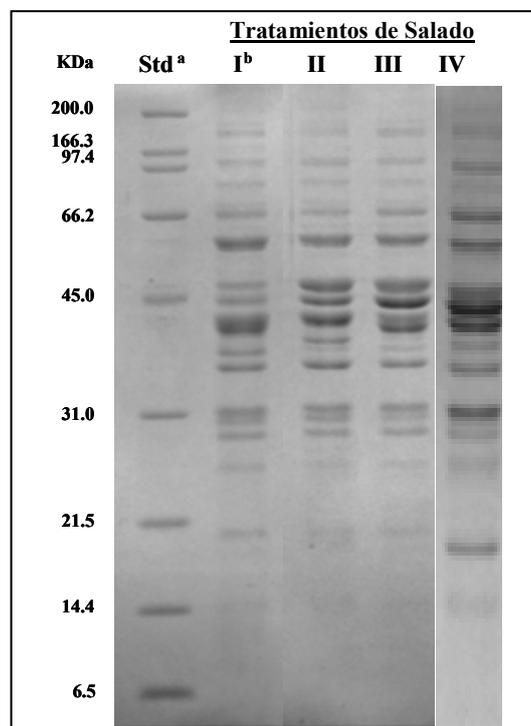


Figura 2. SDS-PAGE al 12% de las proteínas sarcoplásmicas de los lomos curados salados con cuatro tipos de tratamiento de salado diferentes. ^aStd: Pesos moleculares de los patrones de proteína. ^b Tratamientos de salado: I: 100% NaCl; II: 65 % NaCl- 35 % KCl; III: 50 % NaCl- 50 % KCl y IV: 30 % NaCl – 70 % KCl.

Los aminoácidos libres, que se originan como producto final de la proteólisis, son de gran importancia no solamente porque contribuyen a generar sabores específicos sino también porque están implicados en reacciones de degradación que generan compuestos volátiles responsables del flavor típico de los productos cárnicos (Toldrá et al., 2000).

Del estudio de los aminoácidos libres también podemos deducir cuál ha sido el comportamiento de las enzimas proteolíticas en su conjunto durante el proceso de curado. Así, tal como se ve en la Tabla 4, no ha habido un efecto significativo de los tratamientos de salado sobre la liberación total de los aminoácidos ($p > 0.05$ %), lo cual indica que la actividad aminopeptidasa global fue similar en ellos. Sí que existió alguna diferencia en el contenido de algún aminoácido aunque no parece muy importante.

Tabla 4. Concentración de aminoácidos libres (mg / 100g muestra) en los lomos curados salados con los cuatro tipos de tratamientos de salado diferentes. Tratamiento I: Control, 100 % NaCl; tratamiento II: 65 % NaCl- 35 % KCl; tratamiento III: 50 % NaCl- 50 % KCl y tratamiento IV: 30 % NaCl- 70 % KCl.

Aminoácidos libres (FAA)	Tratamientos de Salado			
	I	II	III	IV
Asp	7.36±0.94	7.98±1.14	12.21±4.14	5.39±1.77
Glu	34.86±4.24	35.34±6.27	44.40±6.16	27.23±1.98
Ser	41.34±2.33	36.32±1.62	46.17±4.52	36.94±1.16
Asn	15.93±1.20	12.27±0.68	14.12±0.94	10.78±2.52
Gly	32.13±1.57	30.87±1.58	36.48±3.41	30.21±0.42
Gln	34.39 ^a ±1.95	33.31 ^a ±1.51	37.23 ^{ab} ±1.63	45.32 ^b ±3.95
β-ala ¹	3.55±0.30	3.38±0.41	4.21±0.49	3.73±0.02
Ala	70.94±2.37	75.39±4.28	79.90±4.87	68.74±3.65
Arg	36.41 ^a ±2.69	25.85 ^b ±1.54	33.48 ^{ab} ±3.15	28.90 ^{ab} ±1.56
Pro	35.92 ^a ±1.30	34.73 ^a ±4.88	58.36 ^b ±3.61	37.45 ^a ±3.71
Tyr	49.63 ^a ±2.73	46.70 ^{ab} ±1.07	45.84 ^{ab} ±0.86	36.83 ^b ±2.55
His	17.91±1.34	13.63±0.51	18.62±2.10	14.67±2.01
Thr	36.65±1.78	33.61±1.59	41.01±3.54	32.45±0.65
Val	54.56 ^a ±1.65	52.34 ^a ±2.18	69.33 ^b ±3.01	44.22 ^a ±1.93
Met	32.78±2.00	30.80±1.28	30.17±1.32	27.67±2.05
Ile	49.88±3.26	45.40±2.72	48.20±2.68	39.74±5.46
Leu	92.36±5.93	75.50±3.80	83.00±2.62	74.15±12.56
Phe	55.34±4.53	50.08±3.10	49.66±2.82	46.06±8.54
Lys	47.94±4.94	33.65±1.95	44.99±6.57	33.35±1.79
Total FAA	749.88±4.86	677.16±4.48	797.40±4.89	643.83±4.20

Los resultados se expresan como media de tres repeticiones ± error estándar.

^{a, b} Diferentes superíndices dentro de la misma línea, indican diferencias significativas entre tratamientos de salado ($p < 0.05$ %).

¹β-ala: β-alanina.

De hecho, resultados similares se encontraron en salsas de pescado fermentadas (Sanceda et al., 2003) y en queso Feta (Katsiari et al., 2000a), donde la proteólisis no estuvo afectada por la sustitución parcial del contenido de NaCl por KCl durante la elaboración de estos productos.

Finalmente, el contenido de ácidos grasos libres (FFA) fue analizado al final de la etapa de maduración, con el fin de utilizarlos como indicadores del proceso lipolítico que tuvo lugar durante el proceso de elaboración del lomo curado (ver Tabla 5).

Tabla 5. Composición de ácidos grasos libres (expresada en mg / 100 g de muestra) en los lomos curado salados con los cuatro tipos de tratamientos de salado: I: Control, 100 % NaCl; II: 65 % NaCl- 35 % KCl; III: 50 % NaCl- 50 % KCl y IV: 30 % NaCl- 70 % KCl.

Ácidos Grasos Libres (FFA)	Tratamientos de Salado			
	I	II	III	IV
C14:0	2.88 ^{ab} ±0.42	4.14 ^b ±0.59	1.81 ^a ±0.45	2.66 ^{ab} ±0.33
C16:0	95.30±9.44	103.05±4.70	92.37±11.49	105.98±2.86
C18:0	59.49±6.92	60.80±5.08	57.58±5.73	62.06±1.40
SFA ¹	157.67±16.15	167.99±8.22	152.21±17.00	170.70±3.91
C16:1	8.52±1.21	12.20±1.60	8.00±1.60	13.35±3.20
C18:1	136.81±16.37	150.98±14.55	119.25±23.26	177.39±24.56
C20:1	2.25 ^{ab} ±0.34	2.24 ^{ab} ±0.32	1.62 ^a ±0.29	3.00 ^b ±0.34
MUFA ²	147.58±17.85	165.42±16.44	128.88±25.03	193.74±38.89
C18:2	145.13±12.30	158.85±6.86	144.84±12.36	164.48±13.78
C18:3	3.53±0.69	3.74±0.22	3.41±0.39	4.46±0.11
C20:2	2.06 ^a ±0.34	1.69 ^a ±0.30	2.46 ^{ab} ±0.35	3.29 ^b ±0.46
C20:3	4.88±0.40	3.93±0.28	5.18±0.89	5.48±0.64
C20:4	42.98±3.81	30.24±1.54	43.75±6.60	44.60±2.70
C22:4	2.10±0.61	1.01±0.49	1.65±0.35	2.59±0.69
PUFA ³	203.47±17.62	165.41±8.56	215.64±25.84	224.91±16.70
Total FFA	508.72±47.58	498.82±13.90	496.73±20.85	589.36±38.22

Los resultados se expresan como media de tres repeticiones ± error estandar.

^{ab} Diferentes superíndices dentro de la misma línea, indican diferencias significativas entre tratamientos de salado ($p < 0.05$ %).

¹SFA: Concentración total de ácidos grasos saturados.

²MUFA: Concentración total de ácidos grasos monoinsaturados.

³PUFA: Concentración total de ácidos grasos poliinsaturados.

Como se puede apreciar, los tratamientos experimentales de salado no promovieron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la concentración total de ácidos grasos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) o poliinsaturados (PUFA) en los lomo curados con respecto a aquellos salados tradicionalmente (tratamiento I, control, 100 % NaCl). Estos resultados son semejantes a los encontrados en queso (Lindsay et al., 1982; Katsiari et al., 2001), donde sustituciones de hasta un 50 % de NaCl por KCl no afectaron al fenómeno lipolítico que tuvo lugar durante la maduración de este producto; incluso en jamón curado, el contenido de sal empleado en la salmuera no afectó a la composición final de ácidos grasos libres (Countron-Gambotti et al., 1999).

En resumen, estos resultados ponen de manifiesto que sustituciones de hasta un 50 % de NaCl por KCl no afectan significativamente a los fenómenos proteolíticos y lipolíticos que tienen lugar durante la elaboración de los lomos curados. Tampoco se observaron diferencias significativas en cuanto a las características sensoriales e incluso aquellos que contenían un 50 % de KCl (bajo las condiciones de uso) estuvieron mejor valorados por el panel de catadores.

Así pues, estos resultados pueden ser útiles como punto de partida para el estudio de la reducción del contenido de NaCl en otros productos cárnicos curados como el jamón curado.

CAPÍTULO III

Propiedades Bioquímicas y Sensoriales en Lomos Curados con Sustitución Parcial de Sodio por Potasio, Calcio y Magnesio.

Journal Agricultural and Food Chemistry, 2009: 57 (20), 9699-9705

Capítulo III. Propiedades Bioquímicas y Sensoriales en Lomos Curados con Sustitución parcial de Sodio por Potasio, Calcio y Magnesio.

Hoy en día se han desarrollado diferentes estrategias con el fin de reducir el contenido de sodio en productos cárnicos; principalmente por sustitución parcial del NaCl por otras sales como el KCl (Terrell, 1983; Gimeno et al., 1998; Gou et al., 1996; Armenteros et al., 2009b; Toldrá y Barat, 2009). Sin embargo, el uso de cantidades elevadas de KCl genera sabores amargos en el producto y, por consiguiente, está limitado (Leak et al., 1987). Recientemente, Armenteros et al., (2009b) lograron sustituir hasta un 50 % el contenido de NaCl por KCl en lomo curado sin que se vieran afectados los fenómenos proteolíticos y lipolíticos ni sus propiedades sensoriales.

El empleo de sales divalentes, como CaCl_2 y MgCl_2 , como sustitutos parciales del contenido de NaCl no está muy estudiado, y las pocas investigaciones que hay al respecto ponen de manifiesto que el uso de este tipo de sales genera defectos en la calidad final de los productos (Hand et al., 1982a; Gimeno et al., 1999). A pesar de ello, el empleo de estas mezclas de sales no solamente permite reducir el contenido de sodio en los productos cárnicos, sino que mejora la aportación nutricional diaria de este tipo de minerales (Gimeno, et al., 1998).

El objetivo principal de este trabajo fue determinar el porcentaje máximo de sustitución de NaCl por una mezcla de KCl y sales divalentes (CaCl_2 y MgCl_2) sin que las propiedades bioquímicas y sensoriales del producto final (lomo curado) se vieran afectadas.

Se ha estudiado el efecto del cloruro sódico sobre la actividad de las enzimas proteolíticas musculares (Toldrá et al., 1993; Flores et al., 1997a; Sentandreu y Toldrá, 2001c). Recientemente, Armenteros et al., (2009a), llevaron a

cabo un estudio “*in vitro*” orientado a esclarecer el efecto del KCl, CaCl₂ y MgCl₂ sobre la actividad de las enzimas proteolíticas musculares y se pudo comprobar que el KCl ejerce un efecto inhibitorio muy similar al del NaCl sobre todas las enzimas proteolíticas estudiadas (catepsinas, dipeptidilpeptidasas y aminopeptidasas), mientras que las sales divalentes (CaCl₂ y MgCl₂) alcanzaron valores de inhibición similares al del NaCl pero a concentraciones mucho menores.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que la actividad proteolítica dentro del lomo no solo depende de la cantidad y del tipo de sal empleada en su elaboración, sino también de la difusión de ésta hacia el interior del músculo, así como también de la actividad de agua (*a_w*), la temperatura, el pH y las condiciones de procesamiento (Bañón et al., 1999; Toldrá 2006a). Así pues, cualquier variación en alguno de estos factores podría tener efectos notables sobre la textura, el flavor y la apariencia final del producto (Toldrá 2006a; Armenteros et al., 2009a).

El estudio de la penetración de las sales de curado se realizó mediante el análisis de los distintos cationes en el interior del lomo una vez terminado. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Contenido de los cationes sodio, potasio, calcio y magnesio (en mg / 100 g m.s.) en los lomos curados salados con los cuatro tipos de tratamientos de salado diferentes. ^A Materia Fresca ^B Tratamientos de salado: I: Control, 100 % NaCl; II: 55 % NaCl, 25 % KCl, 15 % CaCl₂ y 5 % MgCl₂; III: 45 % NaCl, 25 % KCl, 20 % CaCl₂ y 10 % MgCl₂ y IV: 30 % NaCl, 50 % KCl, 15 % CaCl₂ y 5 % MgCl₂.

Cationes	Materia Prima ^A	I ^B	II	III	IV
Na ⁺	55.83 ^a ±0.65	2944.23 ^c ±88.65	1685.13 ^b ±180.43	1634.85 ^b ±134.57	1414.78 ^b ±125.76
K ⁺	359.58 ^a ±1.66	597.00 ^b ±17.72	1235.29 ^c ±61.34	1350.66 ^c ±39.38	1886.32 ^c ±77.69
Ca ²⁺	13.48 ^a ±0.30	81.91 ^b ±9.16	166.78 ^{cd} ±17.80	212.29 ^d ±20.55	162.33 ^c ±7.30
Mg ²⁺	9.49 ^a ±0.05	43.46 ^b ±1.93	92.11 ^c ±8.10	120.75 ^c ±8.18	91.73 ^c ±4.26

Los resultados se expresan como medias de tres determinaciones ± error estandar.

^{a,b,c} Diferentes superíndices dentro de la misma línea, indican diferencias significativas entre tratamientos de salado (*p* < 0.05 %).

Teniendo en cuenta la concentración natural de estos cationes en el lomo fresco (ver Tabla 1), la concentración de los mismos al final de la fase de maduración es un reflejo de la penetración y difusión de las sales empleadas en los tratamientos de salado. Sin embargo, se encontraron concentraciones más bajas respecto a las esperadas de los cationes de Ca^{2+} y Mg^{2+} en los lomos sometidos a los tratamientos de salado II, III y IV en relación con la proporción de éstas sales (CaCl_2 y MgCl_2) en la salmuera. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Aliño et al., (2009b) en lomo de cerdo y Martínez-Álvarez (2005) en bacalao, y ponen de manifiesto la dificultad de los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} para penetrar en el interior del lomo. Este hecho se podría explicar porque ambos cationes presentan alta densidad de carga (0.050 y 0.082 unidades de carga / peso molecular, respectivamente), lo que incrementaría su dificultad para penetrar en el interior del lomo (Blesa et al., 2008). Además, los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} se pueden unir fuertemente con los grupos funcionales más externos de las proteínas musculares compactando la superficie de la carne y, por consiguiente, retardando su penetración hacia el interior del lomo (Iyengar y Sen, 1970).

La actividad residual de las enzimas proteolíticas (catepsinas, dipeptidilpeptidasas y aminopeptidasas) al final del proceso de maduración de los lomos curados con los cuatro tratamientos de salado (tratamientos I, II, III y IV) se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Actividad proteolítica (U / g) 10^{-3} en los lomos curados salados con los cuatro tipos de tratamientos de salado diferentes. ¹Tratamientos de salado: I: Control, 100 % NaCl; II: 55 %, 25 % KCl, 15 % CaCl_2 y 5 % MgCl_2 ; III: 45 % NaCl, 25 % KCl, 20 % CaCl_2 y 10 % MgCl_2 y IV: 30 % NaCl, 50 % KCl, 15 % CaCl_2 y 5 % MgCl_2 . ²E.S: Error estandar.

Enzima	I	II	III	IV	\sum^2 E.S.
Catepsina B	0.89 ^a ±0.04	1.80 ^b ±0.20	1.24 ^a ±0.07	2.01 ^b ±0.02	0.08
Catepsina B+L	3.10 ^a ±0.21	6.22 ^b ±0.24	4.15 ^c ±0.09	5.59 ^b ±0.18	0.18
Catepsina H	0.08±0.05	0.03±0.00	0.03±0.00	0.16±0.10	0.05
Dipeptidilpeptidasa I	4.64 ^a ±0.41	1.52 ^b ±0.08	1.03 ^c ±0.07	1.06 ^b ±0.03	0.15
Dipeptidilpeptidasa II	0.27±0.04	0.38±0.07	0.31±0.01	0.28±0.10	0.06
Dipeptidilpeptidasa III	4.51 ^a ±0.79	4.49 ^a ±1.18	4.10 ^a ±0.60	1.71 ^b ±0.29	0.72
Dipeptidilpeptidasa IV	0.31±0.05	0.21±0.02	0.27±0.06	0.20±0.03	0.04
Alanilaminopeptidasa	7.66 ^a ±0.66	13.17 ^b ±0.28	9.92 ^c ±0.08	11.05 ^b ±0.19	0.30
Arginilaminopeptidasa	0.31 ^a ±0.07	0.81 ^c ±0.02	0.59 ^b ±0.02	0.49 ^b ±0.01	0.03
Leucilaminopeptidasa	3.23 ^a ±0.36	7.55 ^b ±0.09	4.24 ^b ±0.26	6.73 ^b ±0.22	0.23
Metionilaminopeptidasa	1.63 ^a ±0.19	1.03 ^b ±0.06	1.16 ^b ±0.08	1.64 ^a ±0.05	0.10

^{a,b,c} Diferentes superíndices dentro de la misma línea, indican diferencias significativas entre tratamientos de salado ($p < 0.05$ %).

Como se puede apreciar, los lomos salados con los tratamientos II y IV no muestran diferencias significativas en la actividad residual de las catepsinas B y B+L y además presentan valores significativamente más altos en la actividad de estas enzimas que aquellos sometidos al tratamiento III y que los salados tradicionalmente (ver Tabla 2). Esto podría ser debido a que en ambos tratamientos se emplearon concentraciones similares de sales divalentes (CaCl_2 y MgCl_2), mayores que en el tratamiento III, y que además los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} obstaculizan la penetración de la sal hacia el interior del lomo por unirse fuertemente a los grupos polares de las proteínas (Xiong y Brekke, 1991). Por lo tanto, la mayor actividad catepsina que se encontró en los lomos sometidos a los tratamientos de salado II y IV era de esperar ya que la concentración de la sal en el interior de los mismos fue menor.

Con respecto a las exopeptidasas (dipeptidilpeptidasas y aminopeptidasas), los lomos salados con los tratamientos II, III y IV mostraron menor actividad residual del enzima DPPI respecto a los lomos control, mientras que la actividad residual de la DPPIII únicamente fue inferior en aquellos lomos donde se aplicó el tratamiento de salado IV, donde el porcentaje de sustitución de NaCl alcanzó valores del 70 %. Las actividades residuales de la DPPII y DPPIV no estuvieron afectadas por ninguno de los tratamientos experimentales de salado empleados (ver Tabla 2). Finalmente, la actividad residual de las aminopeptidasas; AAP, RAP y LAP, fue significativamente mayor en los lomos salados con los tratamientos experimentales (II, III y IV), salvo en el caso de la actividad de la MAP, la cuál fue considerablemente menor en los lomos salados con los tratamientos II y III.

El resultado de la actividad proteolítica fue estudiado por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-Page) de las proteínas musculares. Los perfiles electroforéticos de las proteínas miofibrilares (Figura 1) y sarcoplásmicas (Figura 2) extraídas al final de la fase de curado no revelaron un claro efecto debido al tipo de tratamiento de salado en la proteólisis de los lomos.

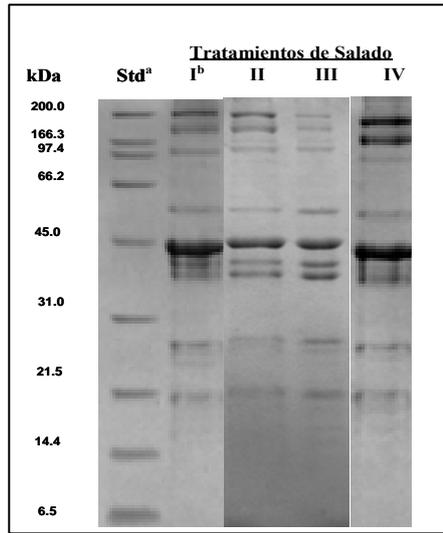


Figura 1. SDS-Page al 12% de las proteínas miofibrilares de los lomos curados salados con cuatro tipos de tratamientos de salado diferentes.^a Std: Pesos moleculares de los patrones de proteína. ^bTratamientos de Salado: I: 100% NaCl; II: 55 % NaCl, 25 % KCl, 15 % CaCl₂ y 5 % MgCl₂; III: 45 % NaCl, 25 % KCl, 20% CaCl₂ y 10 % MgCl₂ y IV: 30% NaCl, 50 % KCl , 15 % CaCl₂ y 5 % MgCl₂.

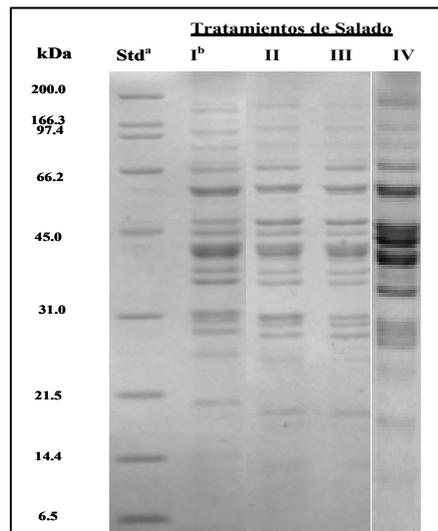


Figura 2. SDS-Page al 12% de las proteínas sarcoplásmicas de los lomos curados salados con cuatro tipos de tratamientos de salado diferentes.^a Std: Pesos moleculares de los patrones de proteína. ^bTratamientos de Salado: I: 100% NaCl; II: 55 % NaCl, 25 % KCl, 15 % CaCl₂ y 5 % MgCl₂; III: 45 % NaCl, 25 % KCl, 20 % CaCl₂ y 10 % MgCl₂ y IV: 30 % NaCl, 50 % KCl, 15 % CaCl₂ y 5 % MgCl₂.

Los polipéptidos generados durante la hidrólisis de las proteínas cárnicas pueden ser degradados a pequeños péptidos y aminoácidos libres principalmente por la acción de las exopeptidasas, (dipeptidilpeptidasas y aminopeptidasas) (Toldrá y Flores, 1998).

Algunos de los aminoácidos liberados son de gran importancia porque están involucrados en reacciones de degradación que generan compuestos volátiles que a su vez contribuyen al desarrollo del flavor de los productos cárnicos. Los resultados de la concentración de aminoácidos libres de los lomos curados salados con los cuatro tipos diferentes de tratamientos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentración de aminoácidos libres (mg / 100g muestra) en lomos curados con los cuatro tipos de tratamientos de salado diferentes: Tratamiento I: Control, 100 % NaCl; tratamiento II: 55 % NaCl, 25 % KCl, 15 % CaCl₂ y 5 % MgCl₂; tratamiento III: 45 % NaCl, 25 % NaCl, 20 % CaCl₂ y 10 % MgCl₂ y tratamiento IV: 30 % NaCl, 50 % KCl, 15 % CaCl₂ y 5 % MgCl₂.

Aminoácidos libres (FAA)	I	II	III	IV
Asp	7.36 ^a ±0.94	15.88 ^b ±4.13	18.01 ^b ±3.64	14.86 ^{ab} ±4.27
Glu	34.86 ^a ±4.24	52.25 ^{ab} ±8.99	71.06 ^b ±8.71	45.88 ^{ab} ±9.75
Ser	41.34 ^a ±2.33	65.96 ^b ±12.06	66.38 ^b ±7.76	54.69 ^{ab} ±6.84
Asn	15.93 ^a ±1.20	27.79 ^b ±4.54	29.03 ^b ±3.24	20.79 ^{ab} ±2.67
Gly	32.13 ^a ±1.57	45.70 ^b ±7.21	45.70 ^b ±5.14	39.78 ^{ab} ±4.30
Gln	34.39 ^a ±1.95	76.67 ^c ±10.45	63.21 ^{bc} ±4.21	43.00 ^{ab} ±6.22
Ala	70.94 ^a ±2.37	99.83 ^b ±12.17	96.00 ^b ±11.54	82.08 ^{ab} ±7.32
Arg	36.41 ^a ±2.69	63.52 ^b ±12.98	71.51 ^b ±12.18	51.04 ^{ab} ±6.24
β-ala ⁴	3.55±0.30	3.18±0.34	3.25±0.39	2.33±0.19
Pro	35.92 ^a ±1.30	50.24 ^b ±7.43	50.74 ^b ±7.38	39.63 ^{ab} ±6.94
Tyr	49.63±2.76	55.79±8.56	57.23±6.55	55.33±3.03
His	17.91 ^a ±1.34	36.02 ^b ±7.28	36.47 ^b ±6.69	25.79 ^{ab} ±4.74
Thr	36.65 ^a ±1.78	48.83 ^b ±6.77	50.17 ^b ±5.67	48.68 ^{ab} ±5.74
Val	54.56 ^a ±1.65	69.88 ^{ab} ±9.14	79.77 ^b ±11.63	65.62 ^{ab} ±5.58
Met	32.78 ^a ±2.00	43.93 ^b ±4.45	51.61 ^b ±4.90	45.55 ^{ab} ±2.19
Ile	49.88 ^a ±3.26	71.76 ^b ±8.63	79.93 ^b ±10.13	64.27 ^{ab} ±2.69
Leu	92.36 ^a ±5.93	131.46 ^b ±16.83	140.76 ^b ±19.26	119.63 ^{ab} ±4.68
Phe	55.34 ^a ±4.53	76.28 ^b ±8.05	82.20 ^b ±8.65	71.68 ^{ab} ±1.64
Lys	47.94 ^a ±4.90	94.01 ^{bc} ±11.84	104.31 ^c ±14.74	62.45 ^{ab} ±10.87
Total FAA	749.88^a±4.86	1128.99^b±2.99	1197.33^b±7.29	953.08^{ab}±5.82

Los resultados se expresan como medias de tres repeticiones ± error estandar.

^{a,b,c} Diferentes superíndices dentro de la misma línea, indican diferencias significativas entre tratamientos de salado ($p < 0.05$ %).

Como se puede observar, se produjo una mayor concentración total de aminoácidos libres en los lomos salados con los tratamientos experimentales II, III y IV en relación a los lomos control. Este incremento podría ser atribuido a la alta actividad de las enzimas alanil-, arginil- y leucil-aminopeptidasas (AAP, RAP y LAP) que se vió reflejada en una mayor actividad residual en los lomos salados con los tratamientos experimentales II, III y IV en relación al control, como se muestra en la Tabla 2.

La composición de ácidos grasos libres (FFA) al final del proceso de maduración se utilizó como índice de la lipólisis que tuvo lugar en los lomos curados (Tabla 4).

Tabla 4. Composición de ácidos grasos libres (expresada en mg/ 100 g muestra) en los lomos curados salados con los cuatro tipos de tratamientos de salado diferentes: I: Control, 100 % NaCl; II: 55% NaCl, 25 % KCl, 15 % CaCl₂ y 5 % MgCl₂; III: 45 % NaCl, 25 % KCl, 20 % CaCl₂ y 5 % MgCl₂ y IV: 30 % NaCl, 50 % KCl, 15 % CaCl₂ y 5 % MgCl₂.

Ácidos Grasos Libres (FFA)	I	II	III	IV
C14:0	2.88 ^a ±0.42	2.01 ^{ab} ±0.05	1.53 ^b ±0.20	2.36 ^{ab} ±0.56
C16:0	95.30±9.44	113.14±8.42	73.22±10.02	105.66±17.56
C18:0	59.49 ^{ab} ±6.92	82.54 ^b ±4.67	54.75 ^a ±5.34	71.06 ^{ab} ±11.19
SFA^A	157.67 ^{ab} ±16.15	197.70 ^b ±12.66	129.49 ^a ±15.35	179.08 ^{ab} ±29.11
C16:1	8.52±1.21	6.87±0.26	5.38±1.04	9.82±1.70
C18:1	136.81 ^a ±16.37	107.55 ^{ab} ±5.29	71.18 ^b ±9.62	155.27 ^a ±26.61
C20:1	2.25 ^{ab} ±0.34	1.87 ^{ab} ±0.08	1.28 ^b ±0.09	2.65 ^a ±0.59
MUFA^B	147.58 ^a ±17.85	116.29 ^{ab} ±5.12	77.84 ^b ±10.75	167.74 ^a ±28.83
C18:2	145.13±12.30	152.04±15.85	109.47±17.05	172.00±48.93
C18:3	3.53 ^{ab} ±0.69	3.19 ^{ab} ±0.25	2.45 ^b ±0.48	5.51 ^a ±0.87
C20:2	2.06 ^a ±0.34	2.48 ^{ab} ±0.32	1.75 ^a ±0.23	3.87 ^b ±0.99
C20:3	4.88 ^a ±0.40	4.34 ^{ab} ±0.59	3.33 ^b ±0.50	6.40 ^a ±0.58
C20:4	42.98 ^{ab} ±3.81	40.10 ^{ab} ±6.24	30.51 ^b ±3.02	57.77 ^a ±8.70
C22:4	2.10 ^{ab} ±0.61	1.49 ^{ab} ±0.24	0.64 ^b ±0.09	2.79 ^a ±0.37
PUFA^C	203.47±17.62	203.64±23.41	148.17±20.03	248.34±58.26
Total FFA	508.72±47.58	517.62±40.87	355.49±44.36	595.71±115.22

Los resultados se expresan como medias de tres repeticiones ± error estandar.

^{a,b,c}. Diferentes superíndices dentro de la misma línea, indican diferencias significativas entre tratamientos de salado ($p < 0.05$ %).

^ASFA: Concentración total de ácidos grasos saturados .

^BMUFA: Concentración total de ácidos grasos monoinsaturados.

^CPUFA: Concentración total de ácidos grasos poliinsaturados.

Los lomos sometidos a los tratamientos de salado experimentales (II, III y IV) no manifestaron de manera significativa ($p < 0.05$ %) cambios en la concentración de ácidos grasos saturados (SFA) con respecto al tratamiento de salado tradicional (100 % NaCl). Además, los lomos salados con los tratamientos II y IV, que tenían la misma concentración de sales divalentes no vieron afectada significativamente ni la concentración total de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) ni la concentración total de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), en relación a los lomos control. Sin embargo, los lomos salados con el tratamiento III mostraron una disminución significativa en la concentración total de MUFA y PUFA. En quesos elaborados con mezclas de Mg^{2+} y Na^+ , se observó una disminución del fenómeno lipolítico (Legase et al., 1993). Este fenómeno se ha observado en los lomos curados con el tratamiento III, donde la mezcla de sales contenía hasta un 25 % de sales divalentes. Parece indicar que el empleo de altas concentraciones de cationes divalentes en la mezcla de sales contribuyó a disminuir el fenómeno lipolítico, lo que se vió reflejado en la menor concentración de ácidos grasos totales, aunque ésta no fuera significativa.

Finalmente, se llevó a cabo la evaluación sensorial de los lomos curados con sustitución parcial del contenido de sodio por una mezcla de sales. La tabla 5 muestra las puntuaciones obtenidas para los atributos sensoriales de color, aroma, textura, sabor y aceptación global de los lomos curados salados con los cuatro tipos diferentes de tratamientos de salado.

Los lomos curados con el tratamiento de salado II, en los que el NaCl fue sustituido hasta el 45 % no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$ %) con los lomos control (100 % NaCl) respecto a los atributos color, textura, sabor y aceptación global e incluso fueron preferidos por el panel de catadores en relación al atributo aroma ($p < 0.05$ %). Estos resultados están en concordancia con los encontrados en embutidos curados fermentados (Gelabert et al., 2003) y lomo curado (Armenteros et al., 2009b) para porcentajes de sustitución de hasta un 50 % de NaCl. El tratamiento III que contenía mayor proporción de cationes divalentes, afectó negativamente al aroma ($p < 0.001$ %), sabor ($p < 0.05$ %) y aceptación global

($p < 0.001$ %). El tratamiento IV afectó a la textura ($p < 0.01$ %), sabor ($p < 0.001$ %) y aceptación global ($p < 0.001$ %), siendo para estos atributos menos apreciado por el panel.

Así pues, los lomos control y los salados con el tratamiento II fueron los preferidos por el panel de catadores con respecto a los atributos sabor y aceptación global. Esto podría atribuirse al empleo de una adecuada concentración de KCl que juntamente con pequeñas cantidades de sales divalentes, evitó que se detectaran olores y sabores extraños (off-flavors) en el producto final. De hecho, varios autores (Hand et al., 1982a; Frye et al., 1986) observaron ésto cuando usaron $MgCl_2$ como agente de curado. Por consiguiente, el tratamiento II podría ser el elegido como la mejor opción para reducir el contenido de NaCl sin que se viera afectada la aceptabilidad del producto final.

Tabla 5. Análisis sensorial (test de preferencia por parejas) al final del proceso de maduración de los lomos curado salados con los cuatro tratamientos de salado diferentes.

Atributos Sensoriales	I ^a	II ^a	III ^a	IV ^a	P-valor ^b
Color	27 ^c	21			n.s
	25		23		n.s
	19			29	n.s
Aroma	16	32			*
	37		11		***
	30			18	n.s
Textura	22	26			n.s
	28		20		n.s
	33			15	**
Sabor	25	23			n.s
	32		16		*
	36			12	***
Aceptación Global	25	23			n.s
	35		13		***
	35			13	***

^aTratamientos de salado: I: Control, 100 % NaCl; II: 55 % NaCl, 25 % KCl, 15 % $CaCl_2$ y 5 % $MgCl_2$; III: 45 % NaCl, 25 % KCl, 20 % $CaCl_2$ y 10 % $MgCl_2$ y IV: 30 % NaCl, 50 % KCl, 15 % $CaCl_2$ y 5 % $MgCl_2$.

^b Nivel de significación: n.s: no significativo, (*) $P < 0.05$ %, (**) $P < 0.01$ %, (***) $P < 0.001$ %

^c Número de catadores que prefieren cada tratamiento (número total igual a 48).

En resumen, en este capítulo se estudió el efecto de la sustitución parcial de NaCl por una mezcla de sales de K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} . A la vista de los resultados obtenidos parece que la sustitución parcial de NaCl por una combinación de sales de $MgCl_2$ y $CaCl_2$, además de KCl provocó una mayor proteólisis en el producto final (lomo curado) que se vio reflejada en un incremento en la concentración de aminoácidos libres al final de la fase de maduración. Además, el análisis sensorial demostró claramente que el tratamiento de salado II no mostró diferencias significativas con los lomos control e incluso fue preferido por el panel de catadores en relación al atributo aroma. Por lo tanto, este tratamiento podría ser utilizado con éxito para reducir el contenido de sodio en productos cárnicos sin que se vieran afectadas las propiedades bioquímicas y sensoriales del producto final.

CAPÍTULO IV

**Cambios Bioquímicos Durante la Elaboración del Jamón Curado
con Sustitución Parcial del Contenido de Cloruro Sódico por otras
Sales (KCl, CaCl₂ y MgCl₂).**

(Pendiente de enviar a Meat Science)

Capítulo IV. Cambios Bioquímicos Durante la Elaboración del Jamón Curado con Sustitución Parcial del Contenido de Cloruro Sódico por Otras Sales (KCl, CaCl₂ y MgCl₂).

El jamón curado es uno de los productos cárnicos curados típicos de la gastronomía del área mediterránea, con una producción anual superior a 40 millones de piezas en países como España (Cruz, 2007). El curado del jamón se remonta a tiempos inmemoriales cuando se utilizaba esta técnica como método de conservación. Hoy en día, gracias al uso extendido de la refrigeración y a un mayor conocimiento de la tecnología del curado, se ha mejorado el proceso y se ha extendido su producción a otros países dando lugar a productos sabrosos y exquisitos.

En el área mediterránea podemos diferenciar varios tipos de jamón curado en base al tipo de alimentación, edad y raza del animal y a las condiciones de procesamiento de los perniles. Algunos de los más importantes son el jamón Ibérico, el jamón Serrano, el jamón de Parma, el jamón San Daniele y el jamón de Bayona (Toldrá, 2002).

Durante años, la falta de conocimientos acerca de los mecanismos bioquímicos relacionados con el desarrollo del sabor, aroma y textura en el jamón curado ha frenado la evolución tecnológica de este tipo de producto. Sin embargo, en los últimos años se ha producido un aumento significativo en el estudio de los procesos bioquímicos, en especial de los cambios que afectan a proteínas y lípidos y que tienen lugar durante la elaboración de dicho producto (Andrés et al., 2004; Toldrá 2006a). El fenómeno proteolítico es el responsable directo del desarrollo de una adecuada textura en el producto final mediante la rotura de la estructura muscular (proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas) por la acción de las enzimas

proteolíticas endógenas (Sentandreu et al., 2002). Asimismo, contribuye al desarrollo del sabor y del aroma a través de la generación de pequeños péptidos y aminoácidos (Toldrá, 2006a). El fenómeno lipolítico, por su parte, es el responsable del desarrollo del aroma característico del jamón curado a través de la generación de ácidos grasos y las posteriores reacciones de formación de compuestos volátiles a partir de estos (Toldrá, 1998).

Hoy en día, existen claras evidencias acerca de que la dieta está fuertemente ligada a la salud. Se sabe que la ingesta de elevadas cantidades de sodio puede ser determinante para el desarrollo de la hipertensión (McCarty, 2004). Este conocimiento y las consiguientes recomendaciones de las entes sanitarias, ha llevado a la industria cárnica a intentar reducir la cantidad de sal en el jamón curado ya que su elevado contenido en sal (5-8 %) lo convierte en un producto desaconsejable, para aquellas personas que tienen problemas de hipertensión. Sin embargo, a pesar de la importancia socio-económica del sector del jamón curado existe muy poca información científico-técnica acerca de cómo reducir la sal, y la existente, se refiere a la reducción de la cantidad total de sal en el producto (Gelabert et al., 2003; Andrés et al., 2005).

En este capítulo, se parte esencialmente de los conocimientos adquiridos con las experiencias realizadas con el lomo curado (capítulos 2 y 3) y se ensayó la sustitución parcial del contenido de NaCl por una mezcla de sales de K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} . La composición de las sales de curado que se van a estudiar son las que se optimizaron para el lomo curado: 50 % NaCl, 50 % KCl (tratamiento II) y 55 % NaCl, 25 % KCl, 15 % $CaCl_2$ y 5 % $MgCl_2$ (tratamiento III), y se compararán con la tradicional de 100 % NaCl (tratamiento I, control). Los resultados obtenidos se describen a continuación:

I. Evolución de los parámetros fisicoquímicos durante la elaboración de los perniles con sustitución parcial del NaCl por otras sales.

El jamón curado experimenta durante su elaboración una importante pérdida de humedad, que junto a la paulatina incorporación de la sal y las bajas

temperaturas a las que se ve sometido durante las primeras etapas del procesado (salado, post-salado), desarrolla un producto con una actividad de agua (a_w) que garantiza su estabilidad a temperatura ambiente. Este descenso en la a_w no es independiente de los fenómenos bioquímicos responsables de las características del jamón curado.

Al introducir cambios en el proceso de elaboración tradicional del jamón curado, como es la sustitución parcial del contenido de NaCl por otras sales, se hace necesario adaptar determinadas etapas del proceso como son el post-salado, el secado y la maduración para prevenir posibles alteraciones en el producto acabado (Ventanas y Cava, 2001b). Así, se hace necesario controlar bien la temperatura del post-salado y secado-maduración, y en especial reducir la temperatura en la fase de bodega para obtener un producto final con unas características organolépticas aceptables. Las condiciones de temperatura (T^a) y humedad relativa (H.R.) que se aplicaron se muestran en la Figura 1.

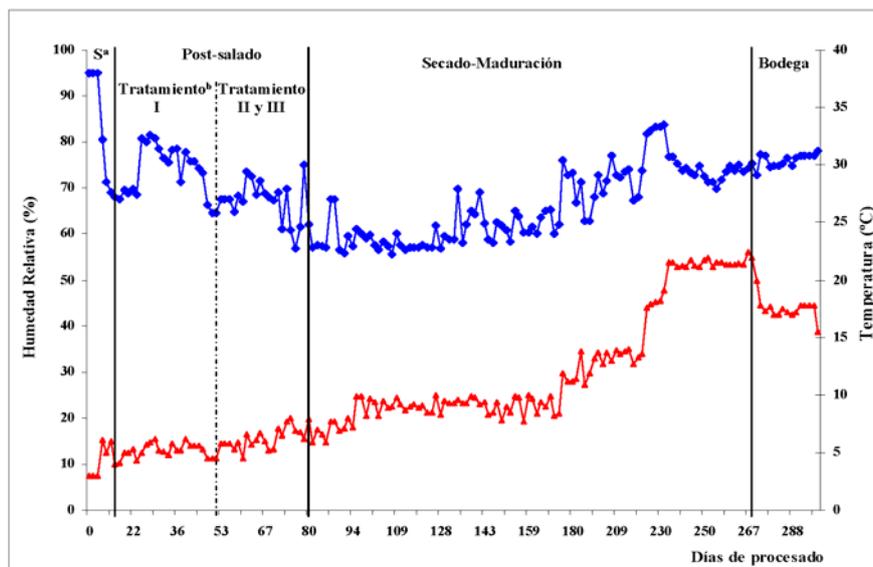


Figura 1. Evolución de la temperatura y la humedad relativa durante el proceso completo de elaboración de jamón curado con sustitución parcial de NaCl por otras sales.^a S: etapa de salado.^b Tratamientos de salado: I: 100 % NaCl, control; II: 50 % NaCl, 50 % KCl; 55 % NaCl, 25 % KCl, 15 % CaCl₂ y 5 % MgCl₂ (●, azul) Humedad relativa (H.R.). (▲, rojo) Temperatura (T^a).

El proceso de deshidratación que sufrieron los pernils bajo estas condiciones, se controló haciendo un seguimiento de las pérdidas de peso (% mermas) a lo largo del proceso (Ver Figura 2). Este reveló que los mayores descensos tuvieron lugar durante los primeros 150 días, en los que los pernils perdieron entorno a un 30 % del peso inicial, siendo la deshidratación mucho más paulatina durante la etapa de bodega hasta que finalmente alcanzaron una merma global cercana al 34 %.

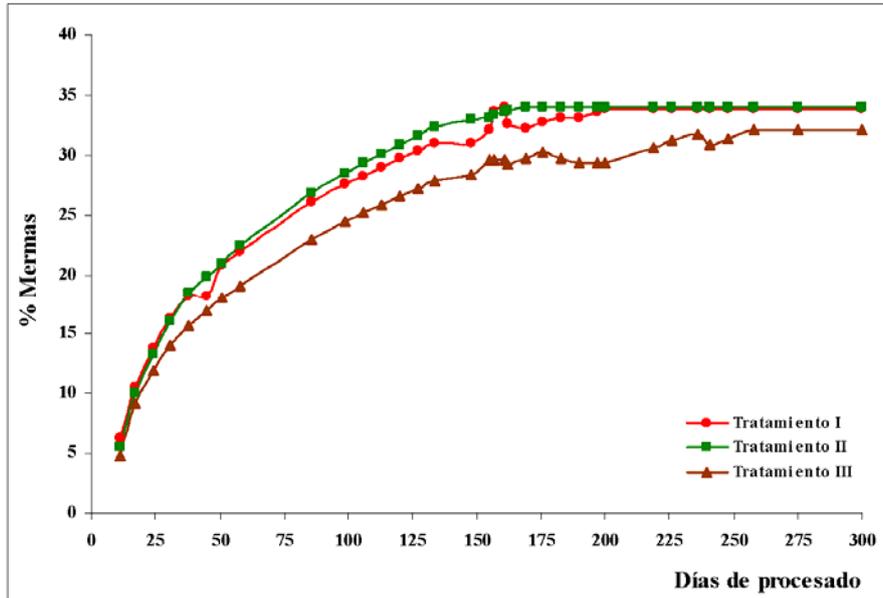


Figura 2. Pérdidas de peso (mermas) durante el procesamiento de elaboración de los pernils sometidos a los tratamientos de salado: Tratamiento I: 100 % NaCl (Control); tratamiento II: 50 % NaCl- 50 % KCl; tratamiento III: 55% NaCl, 25 % KCl, 15 % CaCl₂ y 5 % MgCl₂.

Tras la etapa de salazón y durante el post-salado se registraron las pérdidas de peso más importantes debido a la acción higroscópica de la sal que favoreció la evaporación de una gran cantidad de agua no retenida y situada más superficialmente. El aumento de la temperatura fue paulatino durante la etapa de post-salado lo cual resultó en un incremento en la deshidratación de los pernils

hasta llegar a la etapa de secado-maduración donde las condiciones termohigrométricas de la cámara se suavizaron y el ritmo de pérdida de peso se ralentizó hasta llegar a estabilizarse en la etapa de bodega. La presencia de sales de calcio y magnesio aceleró las pérdidas de peso en las primeras etapas (Ver Figura 2).

Dado que el intercambio acuoso y salino se realiza a través de la zona del jamón que estaba desprovista de piel y grasa (músculo *Semimembranosus*), la humedad (%) en las zonas próximas a la superficie (músculo *Semimembranosus*) y en las profundas (músculo *B. femoris*) fueron marcadamente diferentes, a lo largo de todo el proceso y en el producto final (Ver Figura 3). En todos los perfiles se observó un descenso significativo de la humedad en ambos músculos que fue cuantitativamente más rápido y marcado en el músculo *Semimembranosus* por ser este el más externo y el que primero entró en contacto con la sal.

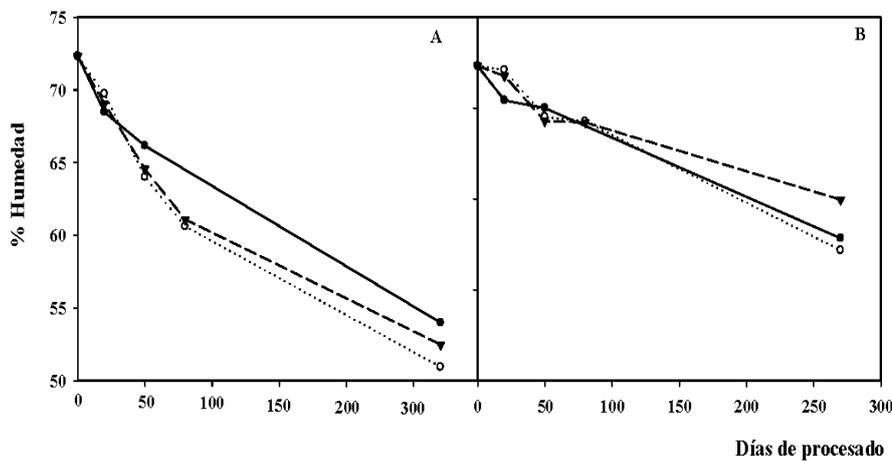


Figura 3. Evolución de la humedad a lo largo del proceso de elaboración de los perfiles sometidos a los tratamientos de salado: (●) Tratamiento I: 100 % NaCl Control; (○)tratamiento II: 50 % NaCl- 50 % KCl; (▼) tratamiento III: 55% NaCl, 25 % KCl, 15 % CaCl₂ y 5 % MgCl₂.^A Músculo *Semimembranosus*. ^B Músculo *B. femoris*.

En la evolución no hubo grandes diferencias debidas al tratamiento de salado, y lo importante fue que al final de la etapa de bodega, se alcanzaron los mismos valores de humedad en los tres tratamientos: 50-53 % en la zona externa (*Semimembranosus*) y 62-64 % en la zona interna (*B. femoris*).

II. Evolución del contenido de nitrato y nitrito durante el procesado de los perniles con sustitución parcial de NaCl por otras sales.

La penetración de los nitratos y nitritos y el seguimiento de su evolución a lo largo del proceso, y en especial en las primeras etapas es de suma importancia para garantizar unas condiciones sanitarias adecuadas que impidan la proliferación de *Clostridium botulinum* y la producción de su toxina (Toldrá, 2003; Toldrá et al., 2009). Esto es especialmente importante cuando se utilizan bajas concentraciones de sal (Betts et al., 2007).

Las figuras 4 y 5 muestran la evolución del contenido de nitrito y nitrato en el músculo *Semimembranosus* y *B. femoris*, respectivamente, durante el proceso de elaboración tanto de los perniles control (100 % NaCl, tratamiento I) como de aquellos elaborados con sustitución parcial del contenido de NaCl (tratamientos II y III).

En el procesado del jamón curado se añade una mezcla de nitratos y nitritos. Los nitritos son muy reactivos y se reducen rápidamente a óxido nítrico, mientras que el aporte conjunto de nitratos supone una fuente adicional de nitritos durante las primeras etapas del proceso (salado y post-salado).

Esto ha quedado reflejado en las gráficas de la figura 4 donde puede observarse, cómo el nitrito (Figura 4 A), una vez absorbido por el músculo *Semimembranosus*, en lugar de desaparecer rápidamente, mantiene su concentración a lo largo del post-salado gracias al aporte de NO_3^- . Mientras que la concentración de nitrato decrece paulatinamente a medida que transcurre el proceso de elaboración de los perniles por su conversión a nitrito (Ver Figura 4 B).

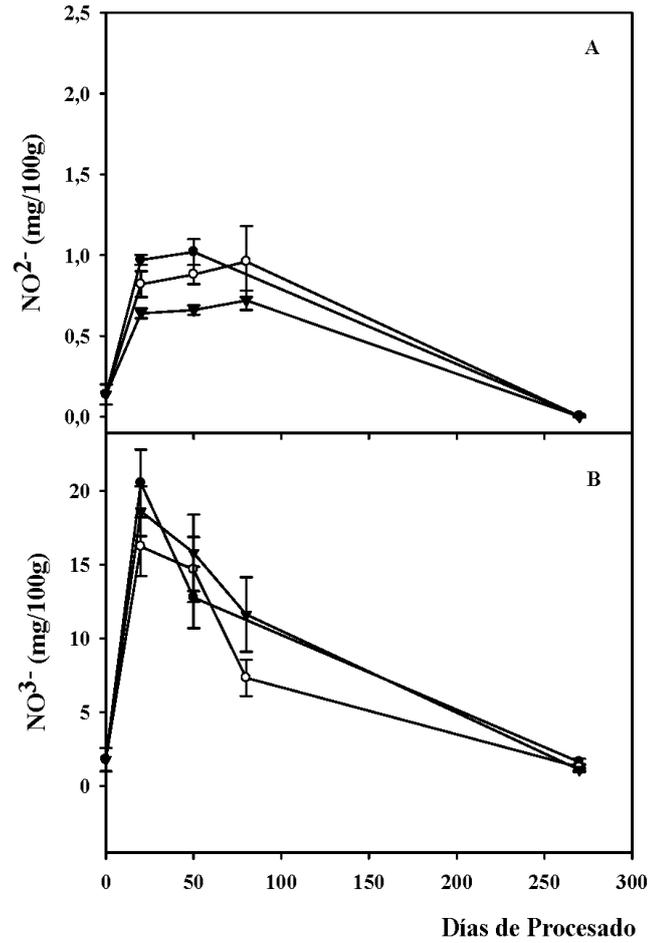


Figura 4. Evolución del contenido de (A) nitrito y (B) nitrato en el músculo *Semimembranosus* a lo largo del proceso de elaboración de los perniles sometidos a los tratamientos de salado: (●) Tratamiento I: 100 % NaCl (Control); (○) tratamiento II: 50 % NaCl- 50 % KCl y (▼) tratamiento III: 55% NaCl, 25 % KCl, 15 % CaCl_2 y 5 % MgCl_2 .

En el músculo *B. femoris*, lo que se observa es un aporte correcto de nitrito y nitrato confirmando la correcta penetración de estas sales de curado desde la superficie del pernil (músculo *Semimembranosus*), hacia zonas más profundas (músculo *B. femoris*) (Ver Figura 5 A y B).

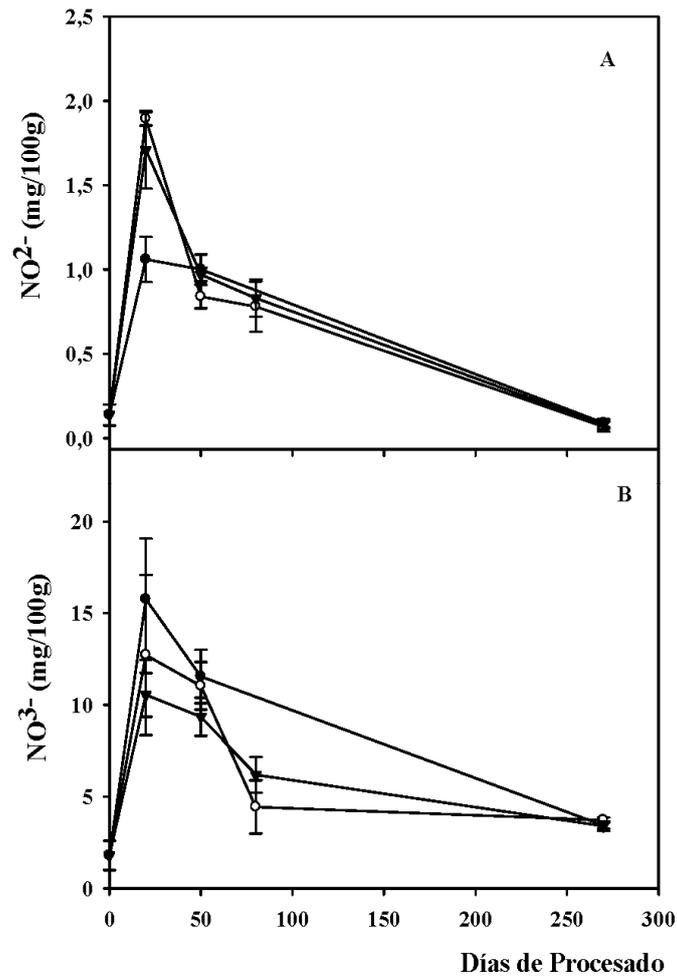


Figura 5. Evolución del contenido de (A) nitrito y (B) nitrato en el músculo *B. femoris* a lo largo del proceso de elaboración de los perniles sometidos a los tratamientos de salado: (●) Tratamiento I: 100 % NaCl (Control); (○) tratamiento II: 50 % NaCl- 50 % KCl; (▼) tratamiento III: 55% NaCl, 25 % KCl, 15 % CaCl₂ y 5 % MgCl₂.

III. Evolución del contenido de sales empleadas como tratamientos de salado durante el proceso de elaboración de los perniles.

Es de suma importancia conocer la penetración de la sal a lo largo del procesado del pernil debido a su función reguladora del fenómeno proteolítico.

De ahí que se haya estudiado la evolución del contenido de cloruros en los músculos *B. femoris* y *Semimembranosus* durante el proceso de fabricación. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6. De la figura se interpreta que la concentración de Cl⁻ en el músculo *Semimembranosus* alcanza un pico de concentración a los 20 días de post-salado, tras el cual llega a un equilibrio (entre 1500 y 2000 mg / 100 g) en la etapa de salado por su difusión hacia el interior del jamón. A partir de aquí, el Cl⁻ que penetra difunde hacia zonas interiores del pernil (músculo *B. femoris*), donde aumenta su concentración hasta llegar también al equilibrio en la etapa de curado, con las mismas concentraciones de Cl⁻ que en el músculo *Semimembranosus*.

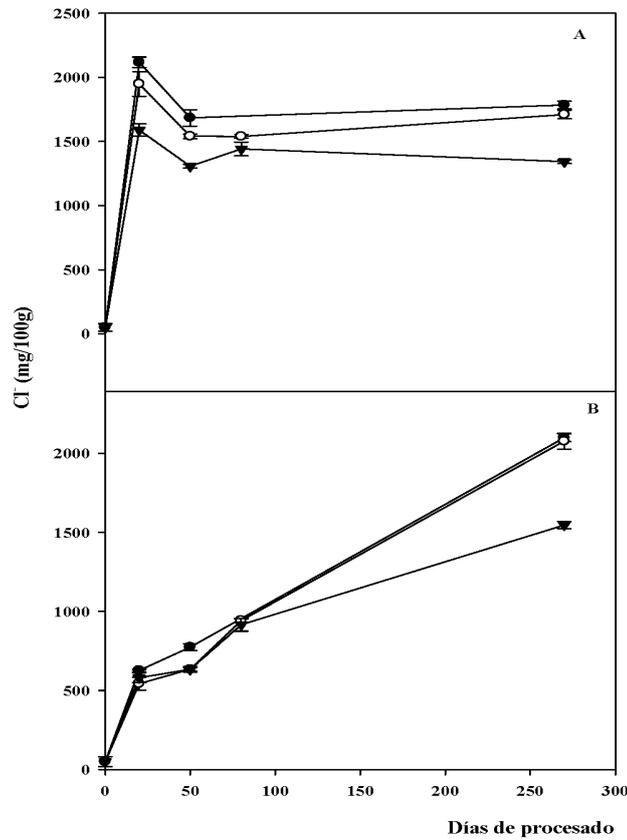


Figura 6. Evolución del contenido de cloruros en los músculos (A) *Semimembranosus* y (B) *B. femoris* a lo largo del proceso de elaboración de los pernils sometidos a los tratamientos de salado : (●) Tratamiento I: 100 % NaCl (Control); (○) tratamiento II: 50 % NaCl- 50 % KCl y (▼) tratamiento III: 55% NaCl, 25 % KCl, 15 % CaCl₂ y 5 % MgCl₂.

La concentración de Cl^- que se alcanza en el músculo *B.femoris* fue mayor en los perniles sometidos a los tratamientos de salado I (Control, 100 % NaCl) y II (50 % NaCl-50 % KCl) (Ver Figura 6 B), lo que puso de manifiesto la dificultad de las sales divalentes (MgCl_2 y CaCl_2) empleadas en el tratamiento de salado III para penetrar hacia las zonas internas del pernil. Este hecho ya se había observado en lomo curado (Armenteros et al., 2009c) y en bacalao, Martínez-Alvarez y Gómez-Guillén, (2005). También, se estudió la evolución del contenido de los cationes Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} en los mismos músculos. Los resultados se muestran en las Figuras 7 y 8, respectivamente.

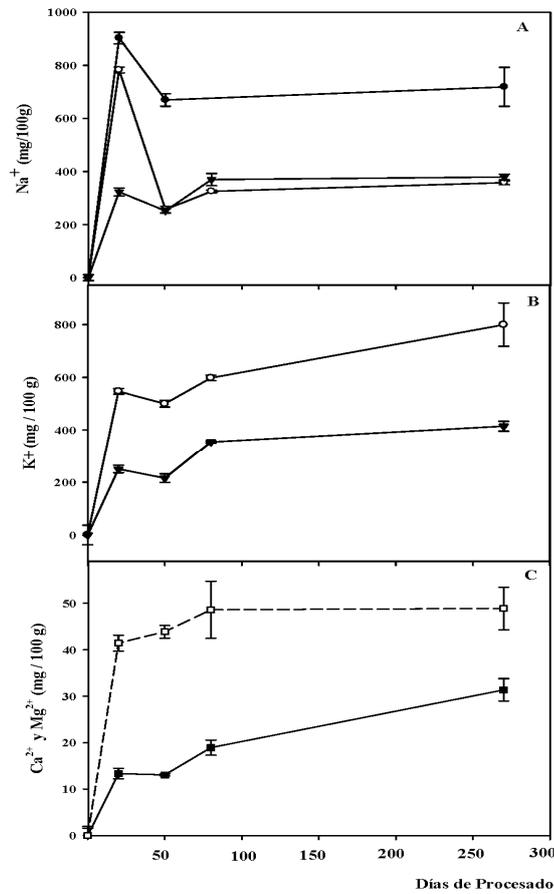


Figura 7. Evolución del contenido de los cationes (A) Na^+ , (B) K^+ , (C) Ca^{2+} (---) y Mg^{2+} (—) en el músculo *Semimembranosus* a lo largo del proceso de elaboración de los perniles sometidos a los tratamientos de salado: (●) Tratamiento I: 100 % NaCl (Control); (○) tratamiento II: 50 % NaCl- 50 % KCl y (▼, □, ■) tratamiento III: 55% NaCl, 25 % KCl, 15 % CaCl_2 y 5 % MgCl_2 .

El Na^+ mostró los mismos perfiles de penetración que el ión Cl^- , en ambos músculos. En el *Semimembranosus* aparece un pico de concentración al inicio del post-salado, para llegar rápidamente al equilibrio a partir de los 50 días de post-salado y hasta el final del proceso (Figura 7A), mientras que en el *B. femoris* (Figura 8A) se observa un aumento paulatino de concentración, para llegar al equilibrio durante el secado. Los cationes K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} penetraron más lentamente que el Na^+ en el músculo *Semimembranosus*, pero más aún en el *B. femoris* por lo que en los tratamientos II y III se creyó conveniente alargar la etapa de post-salado hasta los 80 días y así asegurar una correcta difusión de los cationes divalentes hasta el interior del pernil (Blesa et al., 2008).

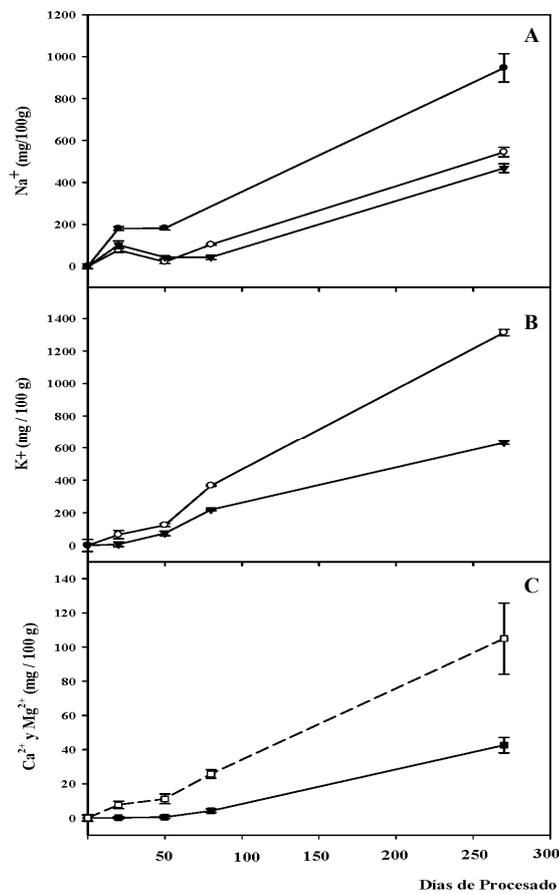


Figura 8. Evolución del contenido de los cationes (A) Na^+ , (B) K^+ , (C) Ca^{2+} (---) y Mg^{2+} (—) en el músculo *B. femoris* a lo largo del proceso de elaboración de los pernils sometidos a los tratamientos de salado: (●) Tratamiento I: 100 % NaCl (Control); (○) tratamiento II: 50 % NaCl - 50 % KCl y (▼, □, ■) tratamiento III: 55% NaCl , 25 % KCl , 15 % CaCl_2 y 5 % MgCl_2 .

La evolución del contenido de los cationes Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} en el músculo *B. femoris* (ver Figura 8) reflejó el perfil de penetración de las sales empleadas como tratamientos de salado durante el proceso de elaboración de los pernils.

IV. Efecto de los tratamientos de salado sobre la actividad de las enzimas proteolíticas musculares

La proteólisis que tiene lugar durante el curado del jamón se atribuye a la acción de las enzimas proteolíticas endógenas del músculo porcino (catepsinas, dipeptidilpeptidasas y aminopeptidasas). La acción de las proteasas microbianas es prácticamente despreciable puesto que el crecimiento de microorganismos en el interior del pernil está limitado por el pH, la concentración de la sal y nitrificantes y la actividad de agua (Toldrá, 2002). El estudio del fenómeno proteolítico es de gran importancia por su impacto sobre la calidad final del jamón al contribuir de manera directa al desarrollo de la textura, el sabor y el aroma del producto final (Toldrá y Flores, 1998).

Por estos motivos, y dado que la concentración y naturaleza de las sales empleadas en el curado influirán en la proteólisis, se estudió la actividad de las enzimas proteolíticas endógenas musculares (catepsinas, dipeptidilpeptidasas y aminopeptidasas), a lo largo del proceso de elaboración del jamón en los tres tipos de tratamientos de curado.

Para este estudio se utilizó el músculo *B. femoris*, ya que su localización más interna lo convierten en un medio idóneo debido principalmente a que la penetración y difusión de la sal es más tardía en relación al músculo *Semimembranosus* (Rico et al., 1991; Toldrá et al., 1993). En la figura 9 se muestran los resultados obtenidos del estudio de actividad de las catepsinas B, B+L y H.

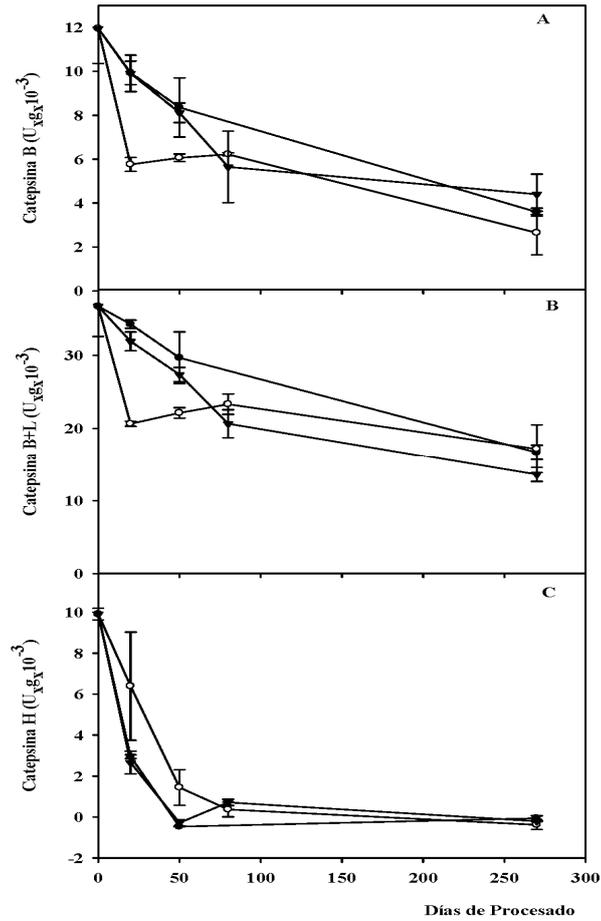


Figura 9. Evolución de la actividad de las catepsinas B, B+L y H en el músculo *B. femoris* a lo largo del proceso de elaboración de los perniles sometidos a los tratamientos de salado: (●) Tratamiento I: 100 % NaCl (Control); (○) tratamiento II: 50 % NaCl- 50 % KCl y (▼) tratamiento III: 55% NaCl, 25 % KCl, 15 % CaCl₂ y 5 % MgCl₂.

Se observó un rápida disminución en la actividad de las catepsinas B y B+L hasta el final del post-salado en todos los jamones, aunque fue más acusada en el caso de los sometidos al tratamiento de salado II (50 % NaCl- 50 % KCl). Trascurrido este tiempo, dicha actividad fue disminuyendo lentamente hasta alcanzar el 16 y 41 % a los 9 meses de procesado. Estos resultados indican que estas enzimas se mantienen activas a lo largo de todo el proceso de elaboración del jamón

curado (Toldrá et al., 1993). La actividad de la catepsina H se redujo rápidamente durante el post-salado hasta valores de actividad prácticamente despreciables tanto en los perniles control (tratamiento I, 100 % NaCl) como en aquellos salados con los tratamientos II y III (Ver figura 9). Estos resultados indican que la sustitución parcial del contenido de NaCl por las mezclas de sales no alteró la actividad catepsina durante el procesado de los perniles. De hecho, este efecto fue observado “*in vitro*” por Armenteros et al., (2009a), donde se demostró que la sustitución parcial de NaCl por KCl, o por bajas concentraciones de sales divalentes (CaCl₂ y MgCl₂), ejercerían el mismo efecto que el 100 % NaCl sobre la actividad de las catepsinas B, B+L y H durante el proceso de elaboración del jamón curado.

Las catepsinas son responsables de la generación de polipéptidos que pueden ser degradados a pequeños péptidos y aminoácidos por la acción de las exopeptidasas. Estas exopeptidasas son las dipeptidilpeptidasas, capaces de liberar dipéptidos del extremo amino de péptidos y proteínas, y aminopeptidasas responsables de la liberación de aminoácidos. Asimismo, tanto las dipeptidilpeptidasas como las aminopeptidasas, permanecen activas hasta el final de la fase de curado (Toldrá y Flores, 1998).

No se observaron grandes diferencias en la actividad de la DPPI y la DPPIII entre los perniles control (100 % NaCl) y los sometidos a los tratamientos experimentales II y III (Figuras 10 A y C). Sin embargo, la actividad de DPPII durante las primeras etapas del post-salado fue menor en los perniles sometidos al tratamiento de salado III, mientras que en los perniles elaborados con los tratamientos I y II, se dio una activación durante ese tiempo (Figura 10 B). La actividad de la DPPIV sufrió un ligero aumento en los perniles sometidos al tratamiento de salado II, durante las primeras etapas de post-salado, en comparación con los sometidos a los tratamientos de salado I (Control 100 % NaCl) y III (Ver figura 10D).

Como ya observaron Sentandreu y Toldrá (2001), al final del proceso se detectó actividad residual de las 4 dipeptidilpeptidasas, siendo casi inapreciable para

el caso de la DPPII. Tampoco en la actividad aminopeptidasa se observó grandes diferencias de actividad a lo largo del proceso en los tres tratamientos estudiados (ver Figura 11).

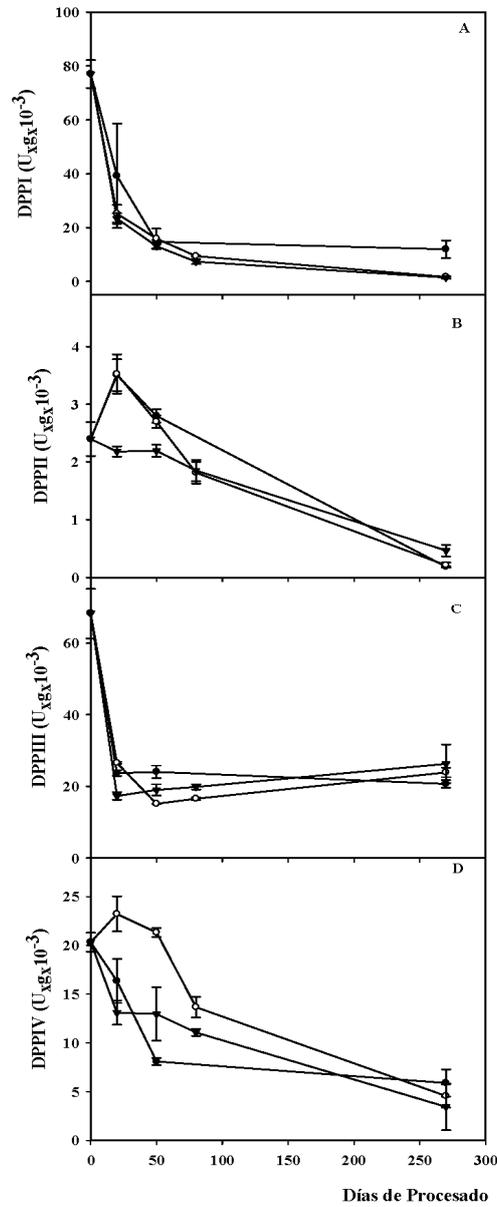


Figura 10. Evolución de la actividad de la DPPI, DPPII, DPPIII y DPPIV en el músculo *B. femoris* a lo largo del proceso de elaboración de los pernils sometidos a los tratamientos de salado: (●) Tratamiento I: 100 % NaCl (Control); (○) tratamiento II: 50 % NaCl- 50 % KCl y (▼) tratamiento III: 55% NaCl, 25 % KCl, 15 % CaCl₂ y 5 % MgCl₂.

La evolución de las 4 enzimas estudiadas AAP, RAP, LAP y MAP, fue similar entre ellas y en los 3 tipos de tratamiento, con algunas salvedades (ver Figura 11).

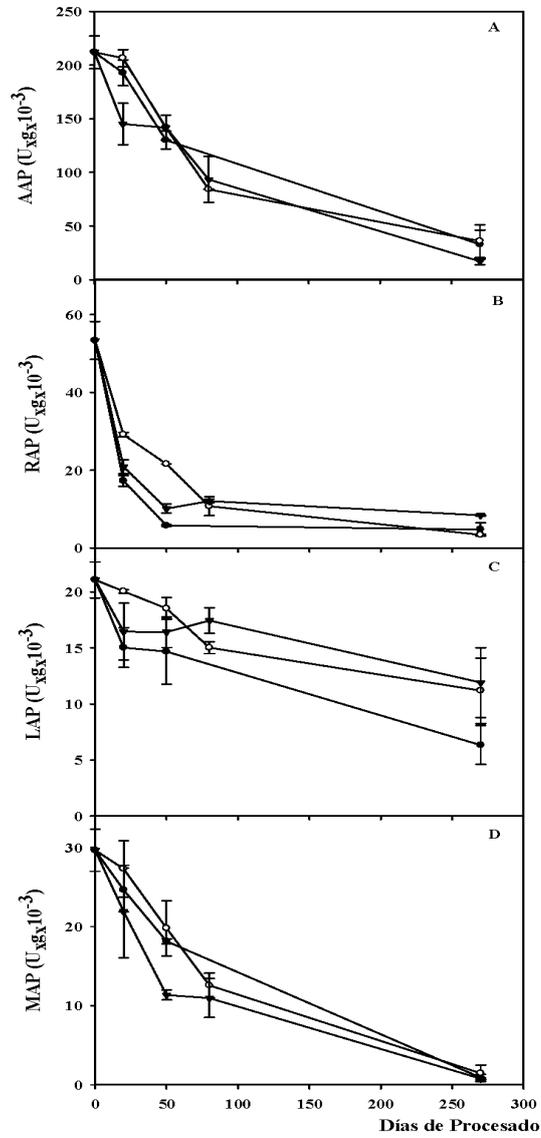


Figura 11. Evolución de la actividad de la AAP, RAP, LAP y MAP en el músculo *B. femoris* a lo largo del proceso de elaboración de los pernils sometidos a los tratamientos de salado: (●) Tratamiento I: 100 % NaCl (Control); (○) tratamiento II: 50 % NaCl- 50 % KCl y (▼) tratamiento III: 55% NaCl, 25 % KCl, 15 % CaCl₂ y 5 % MgCl₂.

Las 4 sufrieron una inactivación paulatina a lo largo de todo el proceso, que fue más brusca en el caso de la RAP, que al final del post-salado había llegado ya al mínimo de actividad (< 20 %). La actividad residual al final del proceso fue muy baja para la AAP, RAP y MAP en los tres tratamientos. No así para la LAP que mostró una actividad residual, muy variable (ver la dispersión de los resultados), pero importante (alrededor del 46.5 %) en los 3 tratamientos.

Los dipéptidos generados por la acción de las dipeptidilpeptidasas y los aminoácidos liberados por la acción de las aminopeptidasas son de gran importancia porque van a contribuir de manera directa al desarrollo de sabor y aroma en el jamón curado (Sentandreu y Toldrá, 2001c).

Las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares fueron extraídas del músculo *B.femoris* y analizadas mediante SDS-Page a lo largo del procesado de los pernils sometidos a los 3 tratamientos de salado. Los electroferogramas obtenidos tanto para proteínas miofibrilares como sarcoplásmicas no revelaron diferencias significativas entre los pernils control y los sometidos a los tratamientos experimentales II y III. Confirmando que la hidrólisis tanto de las proteínas miofibrilares como sarcoplásmicas fue muy similar durante su proceso de elaboración como previamente ya lo había comprobado Armenteros et al. (2009b,c) en lomo curado (datos no mostrados).

La intensa proteólisis que ocurre durante la maduración del jamón da lugar a un considerable incremento en la concentración de aminoácidos libres, superando en muchos casos su umbral de percepción del sabor con lo que se desarrolla el sabor típico de este producto y potenciando por lo tanto el flavor de este producto (Nishimura y Kato, 1988; Kato et al., 1989; Aristoy y Toldrá, 1995). El contenido de aminoácidos fue utilizado como indicador del grado de proteólisis en función de la composición en sales de los 3 tipos de tratamientos. Los resultados se muestran en las tablas 1, 2 y 3.

Tabla 1. Evolución de la concentración de aminoácidos libres (mg / 100 g m.s) en el músculo *B. femoris* en los pernils sometidos al tratamiento de salado I: Control, 100 % NaCl.

Aminoácidos Libres (FAA)	Post-salado			Final Curado
	0 ^A	20	50	270
ASP	19.26 ^a ±0.94	65.89 ^a ±16.88	208.92 ^b ±17.71	237.37 ^b ±43.77
GLU	51.64 ^a ±5.77	229.13 ^{ab} ±60.40	413.08 ^b ±151.89	741.53 ^c ±75.64
SER	42.68 ^a ±4.27	192.18 ^a ±45.62	335.15 ^c ±26.31	477.38 ^d ±36.23
ASN	14.97 ^a ±1.64	96.74 ^b ±33.12	187.74 ^c ±27.96	208.26 ^c ±9.42
GLY	75.65 ^a ±3.98	186.42 ^a ±41.72	368.20 ^b ±51.09	439.26 ^b ±29.71
GLN	200.00 ^a ±69.78	691.90 ^b ±20.82	751.17 ^b ±10.14	94.57 ^a ±4.60
β-ALA ^B	17.27 ^{ab} ±1.21	24.80 ^{ab} ±8.01	30.08 ^b ±8.46	9.10 ^a ±1.38
TAU	68.84 ^a ±11.02	74.96 ^b ±19.18	70.15 ^a ±8.53	233.12 ^b ±13.25
HIS	24.39 ^a ±3.58	100.83 ^b ±24.53	206.75 ^c ±17.77	226.27 ^c ±24.84
THR	22.49 ^b ±6.02	148.31 ^b ±34.70	324.79 ^c ±28.63	507.97 ^d ±43.56
ALA	114.93 ^a ±30.08	435.52 ^b ±97.06	712.66 ^c ±38.43	790.25 ^c ±56.63
ARG	40.17 ^a ±6.43	193.71 ^a ±49.29	464.08 ^b ±70.87	541.82 ^b ±64.36
PRO	27.73 ^a ±3.96	117.71 ^b ±20.87	303.15 ^c ±303.15	560.97 ^d ±20.14
TYR	33.01 ^a ±6.60	165.34 ^b ±44.64	262.31 ^c ±32.12	287.67 ^{bc} ±16.62
VAL	64.87 ^b ±3.99	231.83 ^b ±60.11	486.21 ^c ±37.57	551.40 ^c ±20.15
MET	34.12 ^a ±5.83	126.70 ^b ±31.97	224.93 ^c ±20.27	380.49 ^d ±2.18
ILE	47.64 ^a ±5.39	172.21 ^b ±40.07	351.25 ^c ±30.71	461.48 ^d ±11.96
LEU	66.91 ^a ±2.25	333.86 ^b ±87.09	611.10 ^c ±50.42	999.28 ^d ±15.59
PHE	48.58 ^a ±6.88	172.67 ^b ±49.65	275.10 ^c ±21.14	681.46 ^d ±28.93
LYS	62.44 ^a ±12.69	356.35 ^b ±70.89	560.59 ^c ±71.51	734.81 ^c ±87.54
Total FAA	1060.32 ^a	4092.26 ^b	7117.33 ^c	9155.36 ^c

Los resultados se expresan como media de tres determinaciones ± error estandar.

^{a,b,c,d} Diferentes superíndices dentro de la misma línea, indican diferencias significativas entre el tiempo de procesado.

^A Días de procesado.

^Bβ-ala: β-alanina.

Tabla 2. Evolución de la concentración de aminoácidos libres (mg / 100 g m.s) en el músculo *B. femoris* en los pernils sometidos al tratamiento de salado II: 50 % NaCl- 50 % KCl.

Aminoácidos Libres FFA	Post-salado				Final Curado
	0 ^A	20	50	80	270
ASP	19.26 ^a ±0.94	107.68 ^b ±10.23	191.90 ^c ±11.28	250.64 ^c ±43.15	262.58 ^c ±29.88
GLU	51.64 ^a ±5.77	273.12 ^{ab} ±4.22	391.35 ^b ±81.52	438.34 ^b ±134.89	692.10 ^c ±80.91
SER	42.68 ^a ±4.27	278.76 ^b ±32.56	366.60 ^{bc} ±30.47	427.30 ^{bc} ±98.60	460.30 ^c ±16.84
ASN	14.97 ^a ±1.64	118.57 ^{ab} ±5.05	184.16 ^b ±36.63	197.53 ^b ±77.42	203.71 ^b ±9.79
GLY	75.65 ^a ±3.98	292.89 ^b ±32.54	349.45 ^{bc} ±19.96	414.33 ^c ±67.61	417.84 ^c ±30.64
GLN	200.00 ^a ±69.78	773.13 ^b ±1.99	901.30 ^b ±70.94	914.17 ^b ±114.46	63.49 ^c ±12.12
β-ALA ^B	17.27 ^{ab} ±1.25	21.96 ^{abc} ±8.02	24.86 ^{bc} ±2.50	27.26 ^c ±2.05	14.33 ^b ±1.81
TAU	68.84 ^a ±11.02	68.84 ^a ±9.73	74.38 ^a ±7.87	73.74 ^a ±13.04	220.71 ^b ±10.86
HIS	24.39 ^a ±3.58	133.95 ^b ±10.10	203.41 ^c ±15.56	232.08 ^c ±53.66	234.20 ^c ±32.11
THR	22.49 ^a ±6.02	222.33 ^b ±22.59	309.61 ^{bc} ±17.31	377.72 ^{cd} ±77.64	413.33 ^d ±20.81
ALA	114.93 ^a ±30.08	639.68 ^b ±46.83	668.44 ^b ±67.57	765.62 ^b ±139.48	783.59 ^b ±30.93
ARG	40.17 ^a ±6.43	268.33 ^b ±28.02	468.17 ^c ±44.73	535.13 ^c ±115.24	623.37 ^c ±9.98
PRO	27.73 ^a ±3.96	181.15 ^b ±26.97	301.34 ^{bc} ±20.32	398.07 ^{cd} ±29.52	437.89 ^d ±65.82
TYR	33.01 ^a ±6.60	211.27 ^b ±14.29	266.63 ^b ±42.92	268.68 ^b ±104.04	280.80 ^b ±15.74
VAL	64.87 ^a ±3.99	328.49 ^b ±22.03	443.93 ^{bc} ±45.24	525.30 ^c ±115.69	571.09 ^c ±21.76
MET	34.12 ^a ±5.83	158.79 ^b ±14.75	237.57 ^c ±24.30	258.64 ^c ±57.01	279.79 ^c ±7.03
ILE	47.64 ^a ±5.39	235.40 ^b ±16.24	291.58 ^{bc} ±25.05	333.81 ^{bc} ±117.508	397.18 ^c ±6.47
LEU	66.91 ^a ±2.25	415.32 ^b ±41.79	653.65 ^{bc} ±88.19	778.42 ^{cd} ±186.97	833.15 ^d ±29.68
PHE	48.58 ^a ±6.88	206.11 ^{ab} ±14.72	318.84 ^{bc} ±51.19	442.30 ^{cd} ±115.06	557.41 ^d ±30.83
LYS	62.44 ^a ±12.69	503.30 ^b ±64.43	572.29 ^b ±60.86	631.36 ^{bc} ±18.46	833.42 ^c ±62.22
Total FFA	1060.32 ^a	5417.11 ^b	7194.60 ^{bc}	8263.18 ^c	8565.95 ^c

Los resultados se expresan como media de tres determinaciones ± error estandar.

^{a,b,c,d} Diferentes superíndices dentro de la misma línea, indican diferencias significativas entre el tiempo de procesado.

^A Días de procesado.

^Bβ-ala: β-alanina.

Tabla 3. Evolución de la concentración de aminoácidos libres (mg / 100 g m.s) en el músculo *B. femoris* en los periles sometidos al tratamiento de salado III: 50 % NaCl, 25 % KCl, 15 % CaCl₂ y 5 % MgCl₂.

Aminoácidos Libres FFA	Post-salado				Final Curado
	0 ^A	20	50	80	270
ASP	19.26 ^a ±0.94	84.44 ^{ab} ±25.48	174.23 ^{bc} ±30.11	226.23 ^{bc} ±57.63	283.70 ^c ±61.65
GLU	51.64 ^a ±5.77	291.62 ^b ±4.03	382.07 ^b ±76.97	396.03 ^b ±100.27	631.94 ^c ±47.39
SER	42.68 ^a ±4.27	250.82 ^b ±12.01	326.86 ^{bc} ±48.54	369.12 ^{bc} ±73.46	430.60 ^c ±31.61
ASN	14.97 ^a ±1.64	142.80 ^b ±10.59	144.72 ^b ±37.37	176.67 ^b ±45.34	224.81 ^c ±10.35
GLY	75.65 ^a ±3.98	231.63 ^{ab} ±15.57	243.38 ^b ±68.10	347.81 ^b ±55.98	363.14 ^b ±48.14
GLN	200.00 ^a ±69.78	656.63 ^b ±23.66	701.27 ^b ±124.12	744.52 ^b ±157.33	71.08 ^a ±5.88
β-ALA^B	17.27±1.21	17.35±1.01	18.53±4.08	20.90±2.99	13.25±2.85
TAU	68.84 ^a ±11.02	87.18 ^a ±2.96	69.58 ^a ±2.30	80.56 ^a ±5.03	298.40 ^b ±33.49
HIS	24.39 ^a ±3.58	135.52 ^b ±15.63	141.69 ^b ±37.26	188.11 ^b ±46.35	203.29 ^b ±15.71
THR	22.49 ^a ±6.02	164.58 ^b ±113.72	280.84 ^{bc} ±33.33	339.30 ^c ±58.45	455.07 ^c ±19.34
ALA	114.93 ^a ±30.08	514.29 ^b ±138.07	525.57 ^b ±163.39	589.86 ^b ±177.94	622.72 ^b ±37.19
ARG	40.17 ^a ±6.43	290.66 ^b ±26.67	332.30 ^b ±58.66	356.22 ^b ±102.07	362.86 ^b ±35.74
PRO	27.73 ^a ±3.96	116.69 ^a ±19.38	237.18 ^b ±25.13	321.48 ^b ±52.19	534.81 ^c ±19.63
TYR	33.01 ^a ±6.60	227.08 ^b ±17.04	259.31 ^b ±44.98	284.42 ^b ±10.74	283.79 ^b ±25.10
VAL	64.87 ^a ±3.99	317.79 ^{ab} ±130.59	357.37 ^b ±83.89	430.49 ^b ±141.83	573.94 ^b ±12.04
MET	34.12 ^a ±5.83	180.86 ^b ±10.44	211.48 ^b ±20.98	228.75 ^{bc} ±36.28	301.42 ^c ±14.37
ILE	47.64 ^a ±5.39	252.31 ^b ±115.87	333.69 ^{bc} ±43.03	352.70 ^{bc} ±61.04	401.29 ^c ±17.44
LEU	66.91 ^a ±2.25	483.61 ^b ±29.49	616.29 ^{bc} ±57.00	727.20 ^{cd} ±119.28	829.51 ^d ±16.88
PHE	48.58 ^a ±6.88	243.91 ^b ±14.03	305.73 ^b ±40.60	307.46 ^b ±41.05	539.42 ^c ±14.07
LYS	62.44 ^a ±12.69	455.87 ^b ±32.28	490.37 ^b ±148.57	659.83 ^b ±203.02	679.11 ^b ±106.46
Total FFA	1060.32 ^a	5128.29 ^b	6133.86 ^{bc}	7126.76 ^{cd}	8090.9 ^d

Los resultados se expresan como media de tres determinaciones ± error estandar.

^{a,b,c,d} Diferentes superíndices dentro de la misma línea, indican diferencias significativas entre el tiempo de procesado.

^A Días de procesado.

^Bβ-ala: β-alanina.

Como se puede observar, la generación de aminoácidos tanto en los perfiles control (tratamiento I, 100 % NaCl), como en aquellos sujetos a los tratamientos de salado II y III va aumentando paulatinamente desde el inicio del salado hasta el final de la etapa de curado.

La liberación de aminoácidos es muy grande en los 3 tratamientos de salado durante las etapas iniciales. Es en este periodo, cuando las enzimas proteolíticas, y en especial las aminopeptidasas, se mostraron más activas, y entre ellas cabe destacar la alanilaminopeptidasa (AAP) que es capaz de hidrolizar un amplio espectro de aminoácidos por el extremo amino terminal de las proteínas. En etapas posteriores la generación de aminoácidos sigue pero a un ritmo más lento, debido por un lado a la reducción de la actividad aminopeptidasa y, por otro, a las reacciones de degradación de los aminoácidos a compuestos volátiles que participan en el desarrollo del aroma (Toldrá, 2000).

La concentración de todos los aminoácidos aumentó entre 5 (glicina) y 20 (treonina) veces, excepto la β -alanina. La β -alanina no es un aminoácido proteico y únicamente se encuentra libre o formando parte de los dipéptidos naturales; carnosina, anserina y balenina, y el hecho de que no aumentó indica que estos dipéptidos no se hidrolizan durante el proceso de curado como ya observaron otros autores (Toldrá et al., 2000). La glutamina es otra excepción. Este aminoácido aumenta durante el post-salado, pero disminuye drásticamente durante el curado o maduración como han observado otros autores (Flores et al., 2009).

La taurina no es un aminoácido propiamente dicho, ya que en su molécula, en lugar de un ácido carboxílico existe un ácido sulfúrico. No forma parte de proteínas y, como puede observarse, se mantiene estable durante el post-salado.

El total de aminoácidos libres para los 3 tipos de tratamientos no se diferenció significativamente ($p < 0.05$ %), excepto para el caso de los aminoácidos metionina, isoleucina, leucina y fenilalanina que fue significativamente menor ($p < 0.05$ %) en los perfiles sometidos a los tratamientos experimentales (II y III) de

lo que se deduce que al final del proceso y de manera global, la proteólisis no se vió afectada por la sustitución parcial del NaCl por las otras sales en las proporciones ensayadas.

Por lo tanto, la sustitución parcial del contenido de NaCl por mezclas alternativas (tratamientos II y III) se puede lograr con éxito sin que el fenómeno proteolítico se vea afectado. Cuando se emplearon CaCl_2 y MgCl_2 fue necesario aumentar el tiempo de post-salado para permitir una difusión adecuada hacia zonas más profundas del pernil y garantizar así la estabilidad del producto.

CAPÍTULO V

Características Sensoriales del Jamón Curado con Sustitución Parcial del Contenido de NaCl por Otras Sales: Influencia del Contenido de Sal y las Condiciones de Procesamiento.

(Pendiente de enviar a Meat Science)

Capítulo V. Características Sensoriales del Jamón Curado con Sustitución Parcial del Contenido de NaCl por Otras Sales: Influencia del Contenido de Sal y las Condiciones de Procesamiento.

El jamón curado es uno de los productos cárnicos con más aceptación en el mercado español. Esta alta aceptación se debe principalmente a las características sensoriales que presenta, que son el resultado tanto del empleo de una buena materia prima como del método tradicional de salado y curado (Toldrá, 2006a).

El proceso tradicional de elaboración del jamón curado incluye varias etapas: salado, lavado-prensado, post-salado, maduración, secado y la etapa final de bodega (Toldrá 2002). La salazón es una de las etapas críticas, ya que constituye la fase del proceso en la que se adicionan a la superficie del jamón las sales de curado necesarias para que una vez distribuidas por la pieza pueda darse el proceso de maduración que generará las características de aspecto, textura, sabor y aroma deseadas y propias del producto (Arnau, 2007). La sal, los nitratos y los nitritos constituyen los principales ingredientes de las sales de curado empleados en su elaboración. Estos desempeñan un papel importante en el desarrollo del color rojizo característico de los productos curados, en la prevención del crecimiento de microorganismos patógenos y en la estabilidad y desarrollo del sabor del producto (Flores, 1997; Toldrá, 2002; Arnau 2007).

Tradicionalmente, el salazonado de los perniles se lleva a cabo por frotación de las sales nitrificantes mezcladas con la sal fina sobre la superficie magra del pernil y posterior introducción de los perniles en pilas de sal, o bien una vez salados se disponen en bandejas individuales en la cámara de refrigeración (Andrés y Ruiz, 2001). El proceso de salazón de este tipo de productos suele ser lento y tarda varios días (~ 10- 15 días) debido a que la difusión de la sal se ralentiza a temperaturas bajas (3-5 °C) (Barat et al., 2004). Por eso se ha propuesto el empleo

de técnicas alternativas al proceso tradicional de fabricación del jamón curado como es el salado a vacío (Chiralt et al., 2001). Esta técnica consiste en la fijación de la sal mediante el empleo de vacío y se ha aplicado con éxito en quesos tipo “Manchego” (Chiralt y Fito, 1997) y en jamón (Barat et al., 1998).

Diversos estudios realizados durante la última década, tanto en animales como en humanos, han demostrado la relación existente entre la ingesta de elevadas cantidades de sal y el aumento de la presión arterial (Tobian, 1991). Hoy en día los consumidores cada vez están más concienciados de los efectos nocivos que produce el consumo de elevadas cantidades de sal, por eso existe una demanda creciente de alimentos procesados que cumplan con las recomendaciones dietéticas en cuanto a contenido de sal y que son inferiores a 6 g / día (Loria et al., 2001; Guárdia et al., 2006). Por este motivo, la industria cárnica está interesada en el desarrollo de productos con bajo contenido en sodio.

Dentro de este contexto, y utilizando el jamón curado como producto cárnico a estudiar, en este capítulo se analizó desde el punto de vista sensorial los resultados de sustituir parcialmente el contenido de NaCl por una mezcla de sales de K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} previamente ajustadas en los capítulos 2 y 3 (tratamiento I: 100 % NaCl, control; tratamiento II: 50 % NaCl, 50 % KCl; tratamiento III: 55 % NaCl, 25 % KCl, 15 % $CaCl_2$ y 5 % $MgCl_2$) y según el proceso optimizado en el capítulo 4. Para ello, se compararon dos técnicas alternativas de salado el masajeado en superficie (MS) y el salado a vacío (IMV).

En primer lugar, se estudió la penetración de las sales empleadas en los tratamientos de salado mediante el análisis de éstas en el músculo *B. femoris* al final de la etapa de curado tanto en los perniles elaborados utilizando MS como en aquellos elaborados mediante IMV. Los resultados se muestran en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

Tabla 1. Concentración de las sales (mg / 100 g m.s) en el músculo *B.femoris* al final de la etapa de curado de los pernils elaborados utilizando el masajeado en superficie (MS).

Sales de Curado	Tratamientos de Salado ^a		
	I	II	III
NaCl	6735.9	3865.6	4355.1
KCl	-	2894.9	1045.7
CaCl ₂	-	-	338.7
MgCl ₂	-	-	312.8
Total	6735.9	6760.5	6052.3

^aTratamientos de salado: I: Control, 100 % NaCl; II: 50 % NaCl- 50 % KCl; III: 55 % NaCl, 25 % KCl, 15 % CaCl₂ y 5 % MgCl₂.

Tabla 2. Concentración de las sales (mg / 100 g m.s) en el músculo *B.femoris* al final de la etapa de curado de los pernils elaborados utilizando la técnica de salado a vacío (IMV).

Sales de Curado	Tratamientos de Salado ^a		
	I	II	III
NaCl	12614.4	7646.5	7710.9
KCl	-	5927.4	2897.4
CaCl ₂	-	-	558.3
MgCl ₂	-	-	338.6
Total	12614.4	13573.9	11505.2

^aTratamientos de salado: I: Control, 100 % NaCl; II: 50 % NaCl- 50 % KCl; III: 55 % NaCl, 25 % KCl, 15 % CaCl₂ y 5 % MgCl₂.

La penetración de la sal fue correcta mediante el empleo de las dos tecnologías de salado. Sin embargo, la mayor concentración de sal inicial utilizada para la elaboración de los pernils mediante IMV podría afectar a la calidad del producto acabado, dando lugar a defectos en la textura o a la aparición de sabores amargos, metálicos o astringentes por el empleo de mayores concentraciones de las sales sustitutivas del NaCl (KCl, CaCl₂ y MgCl₂) (Pasin et al., 1989; Lawless, et al., 2003).

Asimismo, se comprobó que los pernils elaborados con el tratamiento de salado III (55 % NaCl, 25 % KCl , 15 % CaCl₂ y 5 % MgCl₂) aplicado mediante los

dos métodos de salado (MS e IMV) obtuvieron una concentración de sales al final de la etapa de curado algo menor que en los otros dos tratamientos (I y II), poniendo de manifiesto la dificultad de las sales divalentes (CaCl_2 y MgCl_2) de penetrar hacia zonas más profundas del pernil (Xiong y Brekke, 1991) aún incluso cuando se utilizan técnicas como la IMV. Esto ya se había comprobado previamente en lomo curado (Armenteros et al., 2009c; Aliño et al., 2009a) y, de hecho, se aumentó el tiempo de post-salado para que pudieran difundir y penetrar hacia zonas más profundas del pernil tal y como sugirieron Blesa et al. (2008).

I. Influencia de las condiciones de procesado en la calidad sensorial de los perniles

Las características sensoriales del jamón curado dependen principalmente de la materia prima utilizada y del proceso tecnológico aplicado. Durante el procesado del jamón ocurren una serie de cambios que afectan a su composición y estructura y que influyen decisivamente en las características sensoriales del producto acabado. Por eso el análisis sensorial es de gran importancia, ya que nuestros sentidos son la manera más simple y natural de decidir nuestra aceptación o preferencia hacia un producto (Flores et al., 1997c; Ruiz, et al., 2002a).

Las Tablas 3-5 muestran los resultados de los análisis sensoriales realizados al final del proceso de curado de los perniles elaborados con diferente contenido de sales y diferentes condiciones de procesamiento.

Al final de la etapa de curado (~ 9 meses) los perniles salados con las diferentes composiciones de sal (tratamientos I, II y III) y elaborados aplicando masajeado en superficie se sometieron a una prueba de comparación por parejas (ISO 5495, 1983) para los atributos aroma, sabor, dureza, jugosidad y aceptación, en la que a cada catador se le preguntaba cuál de las muestras prefería de entre las dos que se le presentaban. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados del test de preferencia por parejas de los jamones elaborados con NaCl (tratamiento I, control) y con sustitución parcial de este por otras sales (tratamientos II y III) aplicadas por masajeado en superficie.

Atributos Sensoriales	Tratamientos de Salado ^a			P-valor ^b
	I ^a	II	III	
Aroma	24 ^c	24		n.s
	33		15	*
		34	14	**
Sabor	31	17		**
	37		11	***
		36	12	***
Dureza	28	20		n.s
	35		13	**
		34	14	**
Jugosidad	27	21		n.s
	32		16	*
		30	18	n.s
Aceptación global	31	17		**
	39		9	***
		37	11	***

^aTratamientos de salado: I: Control, 100 % NaCl; II: 50 % NaCl- 50 % KCl; III: 55 % NaCl, 25 % KCl, 15 % CaCl₂ y 5 % MgCl₂.

^bNivel de significación: n.s: no significativos, (*) $p < 0.05$ %, (**) $p < 0.01$ %, (***) $p < 0.001$ %.

^cNúmero de catadores que prefieren cada tratamiento de salado (número total igual a 48).

No se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$ %) con respecto a los atributos aroma, dureza y jugosidad entre los perniles control (100 % NaCl, tratamiento I) y aquellos sometidos al tratamiento de salado II. En cuanto a los atributos sabor y aceptación global, el panel de catadores prefirió aquellos salados de manera tradicional (100 % NaCl, tratamiento I). Estos resultados están en concordancia con los encontrados por Askar et al. (1994), y ponen de manifiesto que el empleo de KCl propicia la aparición de sabores amargos en el producto acabado. Aunque Armenteros et al. (2009b), en lomo curado y Guàrdia et al. (2008) en embutidos curados de pequeño calibre lograron reducir el contenido de NaCl por KCl hasta un 50 % sin que afectara a las características sensoriales del producto. Sin embargo, los perniles elaborados con el tratamiento III recibieron baja puntuación por el panel de catadores con respecto a todos los atributos estudiados,

especialmente en cuanto a los atributos dureza y sabor. Resultados similares fueron encontrados por Hand et al. (1982a) en salchichas tipo “Frankfurters” y Frye et al. (1986) en jamón elaborado con Mg^{2+} . Estos resultados ponen de manifiesto que el empleo de mezclas de KCl, $MgCl_2$ y $CaCl_2$ propicia la aparición de defectos en la calidad final del producto.

Con respecto a los jamones curados salados a vacío, el análisis sensorial se realizó a los 11 meses de curado, con el fin de observar desde el punto de vista del consumidor las diferencias relacionadas con la sustitución parcial del contenido de NaCl por otras sales (KCl, $CaCl_2$ y $MgCl_2$). Se efectuaron dos pruebas, una discriminatoria, que consiste en una prueba triangular para determinar si se observaban diferencias significativas entre los jamones curados sometidos a los tratamientos experimentales (II y III) y el control (tratamiento I, 100 % NaCl) y otra preferencial, que es una prueba hedónica de consumidores mediante la cual los catadores evaluaron distintos atributos de calidad del jamón curado: sabor, aroma, textura en sus parámetros dureza, jugosidad, apariencia y aceptabilidad global.

Los resultados de la prueba triangular se recogen en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultados de la prueba triangular de los jamones elaborados con sustitución parcial del contenido de NaCl (tratamientos I, II y III) aplicando salado a vacío.

Número de respuestas positivas			
Parejas	Tratamiento II	Tratamiento III	<i>P-valor</i> ^b
Control-II	33		0.1
Control-III		31	0.1

^aTratamientos de salado: I: Control, 100 % NaCl; II: 50 % NaCl- 50 % KCl; III: 55 % NaCl, 25 % KCl, 15 % $CaCl_2$ y 5 % $MgCl_2$.

^b*P-valor*: Nivel de significación.

La prueba reveló diferencias significativas con un nivel de confianza del 90 % entre aquellos jamones sometidos a los tratamientos experimentales de salado (II y III) y el control. De los 54 jueces que intervinieron en la prueba, 33 eligieron los perniles elaborados con el tratamiento de salado II, en cambio 31 de los 54 catadores juzgaron mejor a los perniles elaborados con el tratamiento de salado III. Así pues, los resultados obtenidos permiten afirmar que existió una preferencia significativa ($p < 0.1\%$) por los jamones sometidos a los tratamientos de salado experimentales (II y III).

Los resultados de la prueba preferencial (prueba hedónica de consumidores) se recogen en la Tabla 5, donde figuran las puntuaciones obtenidas por los atributos sensoriales evaluados, así como la aceptabilidad global. Para evaluar estas características se utilizó una escala del 1 al 9.

Tabla 5. Resultados de la prueba hedónica de consumidores al final de la fase de curado de los jamones elaborados con sustitución parcial del contenido de NaCl (tratamientos I, II y III) aplicando salado a vacío.

Atributos	Tratamientos de Salado			EEM ^b	P-valor ^c
	I ^a	II	III		
Aroma	6.24 ^a	5.82 ^{ab}	5.59 ^b	0.134	**
Sabor	6.32 ^a	5.20 ^b	5.67 ^b	0.145	***
Dureza	6.41 ^a	5.83 ^b	6.05 ^{ab}	0.132	**
Jugosidad	6.46 ^a	5.75 ^b	5.95 ^b	0.126	***
Apariencia	5.48 ^a	5.58 ^a	4.52 ^b	0.140	***
Aceptabilidad	6.38 ^a	5.15 ^c	5.67 ^b	0.139	***

^aTratamientos de salado: I: Control, 100 % NaCl; II: 50 % NaCl- 50 % KCl; III: 55 % NaCl, 25 % KCl, 15 % CaCl₂ y 5 % MgCl₂.

^bE.E.M: error estandar de la media.

^c P-valor: (*) $p < 0.05$ %, (**) $p < 0.01$ %, (***) $p < 0.001$ %.

No se detectaron diferencias significativas para los atributos aroma y apariencia ($p < 0.01$ % y 0.001 %, respectivamente) entre los perniles control y los elaborados con el tratamiento de salado II. Para el resto de atributos (sabor, dureza,

jugosidad y aceptabilidad) se registraron puntuaciones significativamente inferiores a los controles. Las bajas puntuaciones obtenidas pueden deberse a la aparición de sabores amargos propiciado por el aumento del contenido de KCl en la sal (Gou et al., 1996; Gelabert et al., 2003).

Los perniles sometidos al tratamiento de salado III no fueron muy bien valorados por el panel de catadores respecto a los perniles control, excepto en el caso del atributo dureza, donde no se encontraron diferencias significativas entre los perniles control y aquellos sometidos al tratamiento de salado III. La aparición de defectos en la calidad del producto podría ser atribuido a una mayor rotura de las proteínas de la carne a causa de un aumento de la proteólisis (Knight y Parson, 1988; Toldrá, et al., 1993). Sin embargo, obtuvieron mejores puntuaciones para los atributos sabor, dureza, jugosidad y aceptabilidad que los elaborados con el tratamiento II, así que parece que el empleo de vacío permitió que la difusión de la sal fuera más uniforme y la calidad sensorial del producto mejorara en cuanto al empleo de sales divalentes. De hecho, Guamis et al., (1997) en queso tipo “Manchego” observaron este mismo efecto cuando aplicaron IMV y además no detectaron defectos en la textura del producto final.

En resumen, el análisis sensorial del producto acabado nos sirvió para averiguar si los procesos tecnológicos de salado y la concentración inicial de sal aplicados fueron o no adecuados. A la vista de los resultados obtenidos, el empleo de ambos procesos tecnológicos no propició diferencias significativas en cuanto a la concentración final de sales en el pernil. Las diferencias encontradas fueron debidas a la cantidad inicial de sal que se añadió en cada tratamiento. En cuanto al tipo de proceso tecnológico aplicado, fueron los perniles sometidos al tratamiento de salado II y elaborados aplicando masajeado en la superficie los preferidos por el panel de catadores, mientras que cuando se aplicó vacío fueron los perniles elaborados con el tratamiento III mejor valorados que con el tratamiento II.

Por lo tanto, el uso de vacío permitió una penetración más intensa de la sal en el interior del pernil, aunque el contenido de NaCl que se podría reemplazar es

menor dado los defectos en la calidad final del producto que origina, en particular cuando se utiliza KCl en la sal. Así pues, el salado a vacío se puede considerar como una metodología alternativa para obtener jamón bajo en sal y de hecho, ya se ha empleado con éxito en queso tipo “Manchego” (Pavia et al., 2000).

CAPÍTULO VI

Capítulo VI: Análisis de la Oxidación en Proteínas de Origen Cárnico mediante el Empleo del Método de la Dinitrofenilhidrazina (DNPH), Espectroscopía de Fluorescencia y Cromatografía Líquida Acoplada a un Espectrómetro de Masas con Fase Electrospray (LC-ESI-MS).

Meat Science, 2009:83 (1), 104-112

Capítulo VI: Análisis de la Oxidación en Proteínas de Origen Cárnico Mediante el Empleo del Método de la Dinitrofenilhidrazina (DNPH), Espectroscopía de Fluorescencia y Cromatografía Líquida Acoplada a un Espectrómetro de Masas con Fase Electrospray (LC-ESI-MS).

Durante las últimas décadas, la mayoría de estudios que abordan el daño oxidativo en proteínas se han centrado en examinar el papel que desempeñan las proteínas oxidadas en enfermedades neurodegenerativas (Elias et al., 2008). Solamente unos pocos trabajos han intentado elucidar el efecto del manejo, procesamiento y manipulación de los productos cárnicos sobre la intensidad e incidencia de los procesos oxidativos en proteínas de la carne (Estévez et al., 2005; Salminen et al., 2006; Ventanas et al., 2007).

Las proteínas musculares son susceptibles de daño oxidativo promovido por diferentes agentes prooxidantes. Como consecuencia de este daño oxidativo, los aminoácidos sufren diversas modificaciones como la generación de grupos carbonilo y/o la formación de puentes de unión disulfuro o ditirosina entre otros (Estévez et al., 2008b). Por ese motivo, es de suma importancia estudiar el daño oxidativo en proteínas de origen cárnico dado que afecta al valor nutricional de la carne, por producir la pérdida de aminoácidos esenciales y disminuir la digestibilidad de las proteínas, además de que puede provocar la aparición de defectos en el color y la textura del producto final (Estévez et al., 2005).

Asimismo, en vista de la falta de conocimiento de los efectos que provocan la oxidación de las proteínas musculares, existe la necesidad de investigar las rutas de oxidación proteicas, al igual que los productos que se originan de las mismas durante el manejo, procesamiento y almacenamiento de los productos cárnicos. A

fin de cumplir estos objetivos, es esencial desarrollar procedimientos adecuados para el control de dicha oxidación. Como los semialdehidos AAS y GGS que se utilizan de manera habitual como marcadores del daño oxidativo en proteínas de origen biológico.

El objetivo del presente capítulo fue analizar en diversos productos cárnicos la presencia de AAS y GGS mediante el empleo de la cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas con fase electrospray (LC-ESI-MS) y comparar los resultados con los obtenidos por otras metodologías más convencionales y que se utilizan de manera rutinaria como son el método de la dinitrofenilhidrazina (DNPH) y la espectroscopía de fluorescencia.

I. Composición química

La composición química básica, humedad, grasa y proteína de los distintos productos cárnicos es muy diferente y depende de la materia prima empleada y del tipo de proceso implicado en la fabricación (ver Tabla 1).

Tabla 1. Composición química (media \pm desviación estandar) de los diferentes productos cárnicos. Los resultados se expresan como g / 100 g de cada producto cárnico.

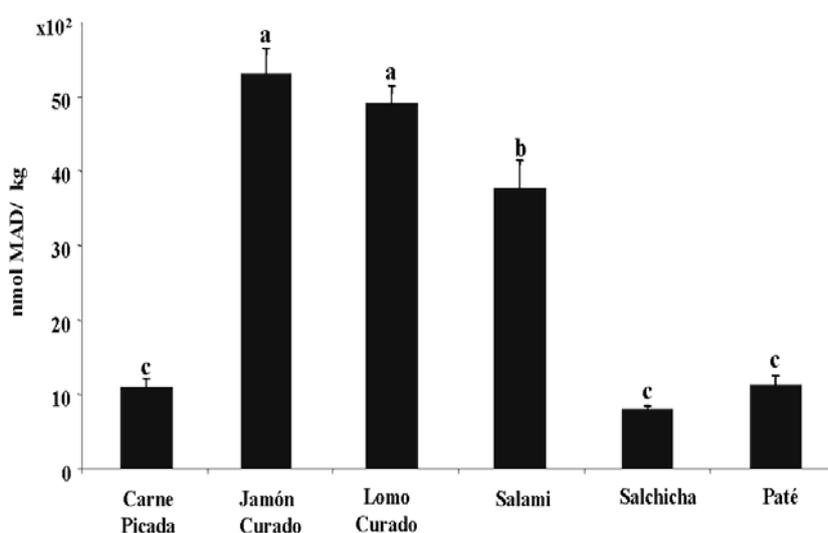
	Humedad	Proteína	Grasa
Carne Picada	67.47 \pm 0.84	20.60 \pm 0.96	9.39 \pm 0.19
Jamón Curado	56.04 \pm 0.70	32.88 \pm 0.79	9.55 \pm 0.65
Lomo Curado	52.52 \pm 0.25	37.64 \pm 1.04	5.5 \pm 0.21
Salami	34.66 \pm 0.40	20.85 \pm 1.36	34.72 \pm 1.10
Salchicha	65.22 \pm 0.70	14.76 \pm 0.20	14.47 \pm 0.15
Paté de Hígado	55.49 \pm 0.41	12.78 \pm 1.49	24.55 \pm 1.39

II. Cuantificación de la oxidación lipídica

Los parámetros TBARS y hexanal fueron estudiados como indicadores de oxidación lipídica en los productos cárnicos objeto de estudio. Los valores medios de los niveles de TBARS, expresados como mg malondialdehido (MDA)/ Kg, y el hexanal (expresados como unidades de absorbancia, AU) se muestran en las Figuras 2 y 3, respectivamente.

El método TBARS se utiliza normalmente para medir los productos derivados de la oxidación secundaria de los lípidos en sistemas musculares. Como se puede apreciar (ver Figura 2), se encontraron diferencias significativas en los niveles de TBARS entre los diferentes productos cárnicos objeto de estudio. Los productos curados mostraron niveles de TBARS significativamente más altos que la carne picada, los productos cocidos (salchicha) y el paté, mientras que entre los productos cárnicos curados, el jamón, el lomo curado y el salami mostraron los valores más altos.

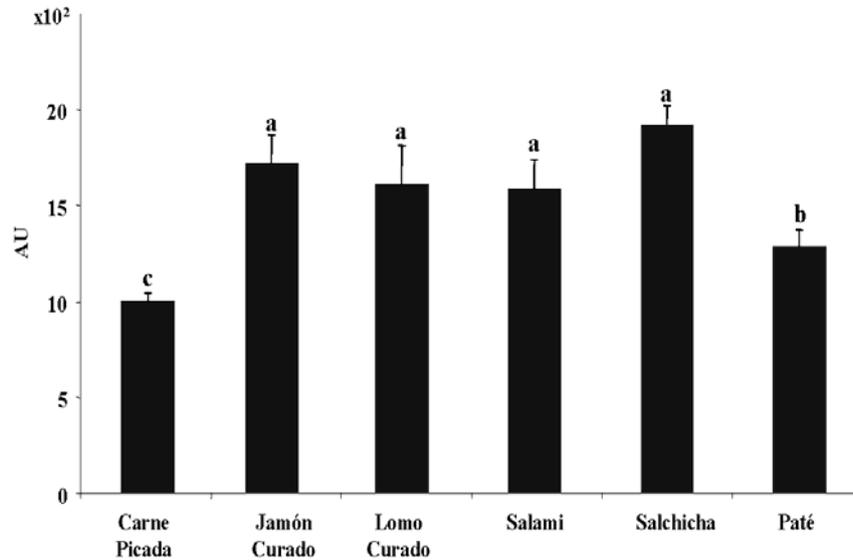
Figura 2. Medida de los niveles de TBARS, expresados como mg malondialdehído / Kg, en diferentes productos cárnicos.



^{a,b,c} Diferentes superíndices sobre las barras de error indican diferencias significativas entre productos.

En relación al hexanal, los productos cárnicos curados y las salchichas mostraron cantidades significativamente más altas de hexanal que la carne picada y el paté (ver Figura 3).

Figura 3. Medida de hexanal en diferentes productos cárnicos.



^{a,b,c} Diferentes superíndices sobre las barras de error indican diferencias significativas entre productos.

A la vista de los resultados obtenidos, podemos decir que existe una incoherencia entre la media de los niveles TBARS y el hexanal en nuestro estudio. De acuerdo con los valores TBARS, los productos cárnicos curados estarían más oxidados a pesar de que éstos y los productos cárnicos cocidos (salchicha) sufren reacciones de oxidación en un grado similar de acuerdo con el análisis de hexanal (ver Figura 3). Sin embargo, estos resultados están en concordancia con los encontrados anteriormente por otros autores (Antequera et al., 1992; Ruiz et al., 2002b y Andrés et al., 2004).

Por otro lado, el hexanal deriva de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), principalmente del ácido linoleico C18:2. El destino del hexanal después de su formación es bastante complejo, ya que puede verse involucrado en otras reacciones y, por lo tanto, la cantidad de hexanal en los productos cárnicos varía considerablemente durante el procesamiento y

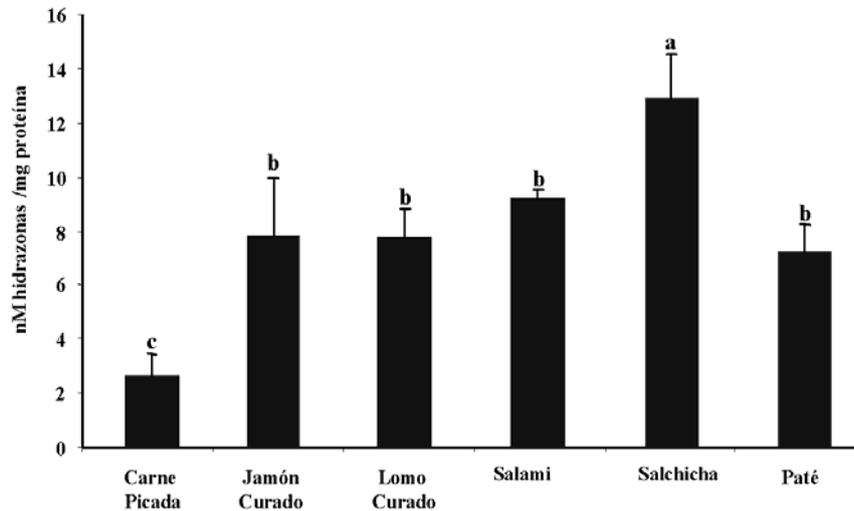
almacenamiento. Andrés et al., (2004) y Ventanas et al., (2008) describieron fluctuaciones en la concentración de hexanal durante la etapa de curado-maduración del jamón y lomo curado, respectivamente. Según estos autores, el hexanal no puede ser un indicador fiable de la oxidación de los lípidos en productos cárnicos sometidos a un proceso de maduración largo, ya que eventualmente podrían reaccionar con otros compuestos dando lugar a unos niveles inesperadamente bajos de este compuesto. De hecho, se ha descrito el desarrollo de reacciones de Maillard entre aldehídos derivados de la oxidación de lípidos y los aminoácidos liberados durante la maduración de los productos cárnicos (Antequera et al., 1992; Ventanas et al., 1992; Pripis et al., 2000). Este hecho fue confirmado en sistemas modelo de origen cárnico donde se observó la formación de aldehídos a través de la degradación de Strecker (Ventanas et al., 2006b). Además, la liberación de hexanal durante su análisis en el espacio de cabeza y, por tanto, su análisis usando cromatografía de gases (GC) depende de una gran variedad de factores físico-químicos (composición y estructura del producto cárnico) que no tienen nada que ver con los procesos de oxidación. En nuestro estudio, el índice de TBARS fue más conveniente que la medida de hexanal para evaluar el daño oxidativo de un grupo muy heterogéneo de productos cárnicos, ya que el hexanal podría no reflejar con exactitud el estado oxidativo de los productos cárnicos curados. De acuerdo con los niveles de TBARS, serían los productos cárnicos curados los que presentan valores más altos de oxidación lo que cabe de esperar al estar sujetos a un largo periodo de deshidratación, altas temperaturas, rotura de tejidos, y una fase previa de salado, lo que aumenta las reacciones de oxidación en estos productos.

III. Cuantificación de los compuestos carbonilo

La concentración total de compuestos carbonilo presentes en diferentes productos de origen cárnico se estudió por tres métodos: el DNPH, la medida de la

fluorescencia emitida a 450 nm y el análisis de los semialdehidos AAS y GGS. Los resultados obtenidos con el método del DNPH se muestran en la Figura 4 .

Figura 4. Concentración total de carbonilos de origen proteico en diferentes productos cárnicos según el método del DNPH.



^{a,b,c} Diferentes superíndices sobre las barras de error indican diferencias significativas entre productos.

Como se puede observar, los productos cárnicos cocidos (salchichas) presentaron los valores más altos en cuanto al contenido de hidrazonas mientras que la carne picada mostró los valores más bajos. Asimismo, se encontró una correlación positiva entre la medida de la concentración de grupos carbonilo en proteínas mediante el método del DNPH y la medida de la oxidación lipídica, cuantificada mediante la determinación de la concentración de hexanal ($R^2= 0.66$; $p < 0.001$), mientras que los resultados obtenidos por el método del DNPH no mostraron una correlación significativa con los niveles de TBARS.

Cuando se midió la fluorescencia emitida por los productos de oxidación proteica a 450 nm (ver Figura 5) como indicador del daño oxidativo en proteínas en los diferentes productos cárnicos se encontraron diferencias significativas entre

todos ellos (ver Figura 6). Los productos cárnicos cocidos (salchicha) mostraron la intensidad de fluorescencia más alta seguida por el paté. La carne picada presentó la intensidad de fluorescencia más baja y entre los productos cárnicos curados, el salami presentó una intensidad de fluorescencia significativamente más alta que el jamón y el lomo curado.

Figura 5. Espectros de Fluorescencia de los grupos carbonilo de origen proteico (λ excitación 350 nm) medidos en extractos acuosos procedentes de diferentes productos cárnicos.

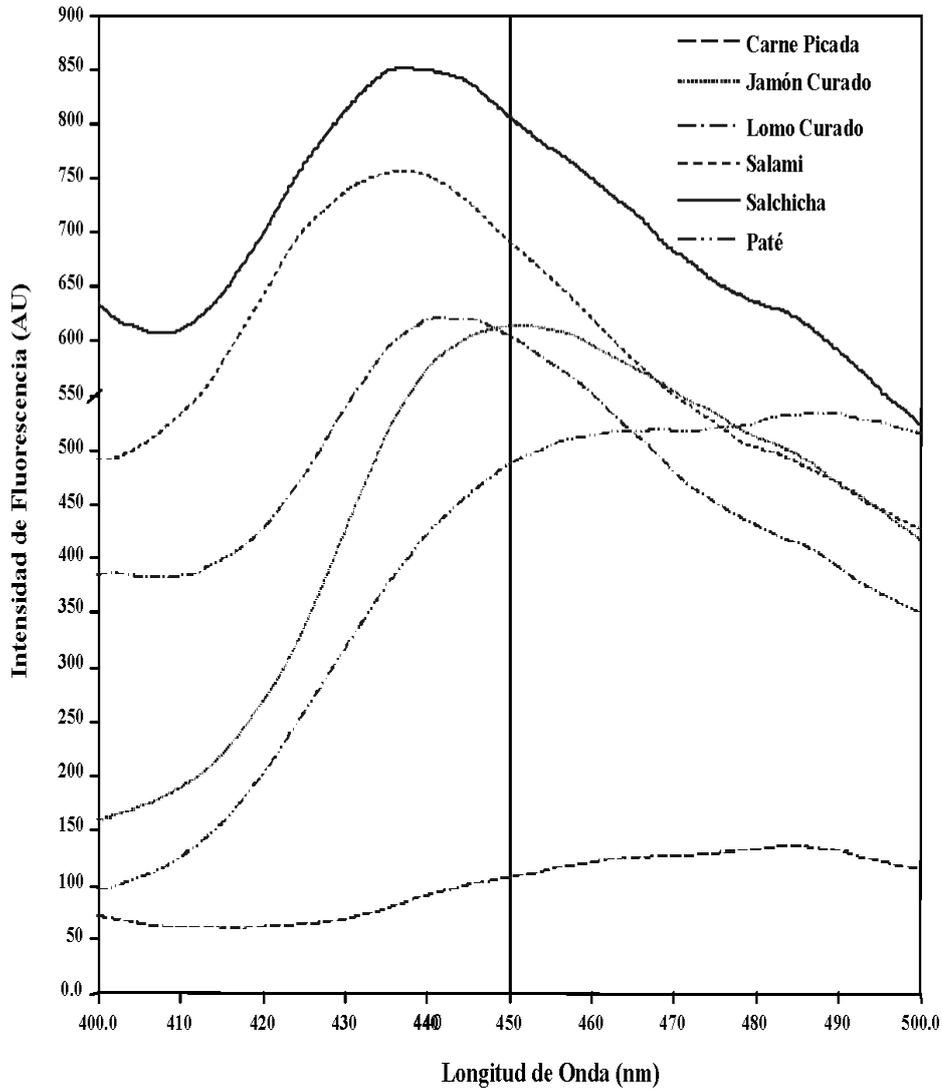
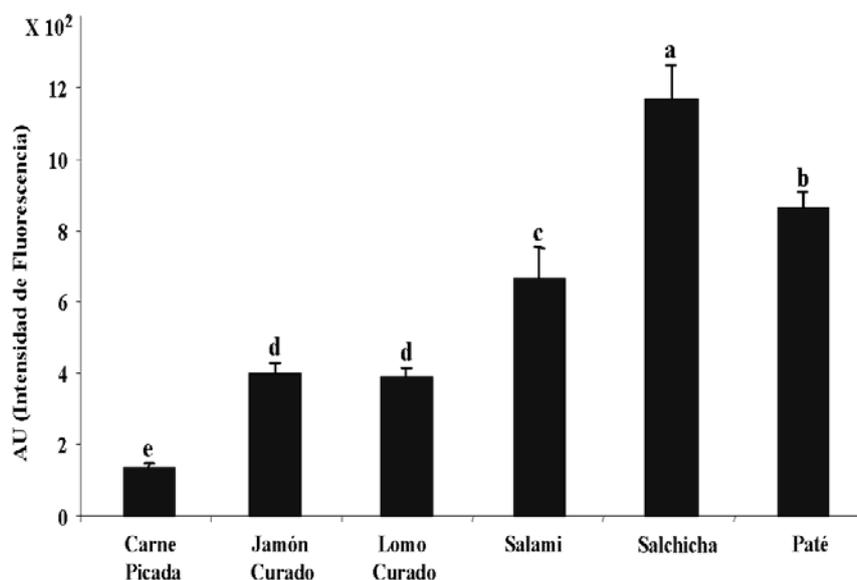


Figura 6. Intensidad de Fluorescencia¹ correspondiente de los grupos carbonilo de origen proteico, medidos en extractos acuosos procedentes de diferentes productos cárnicos.



¹ Los valores medios de intensidad de fluorescencia fueron corregidos considerando la concentración total de proteína en cada producto cárnico.

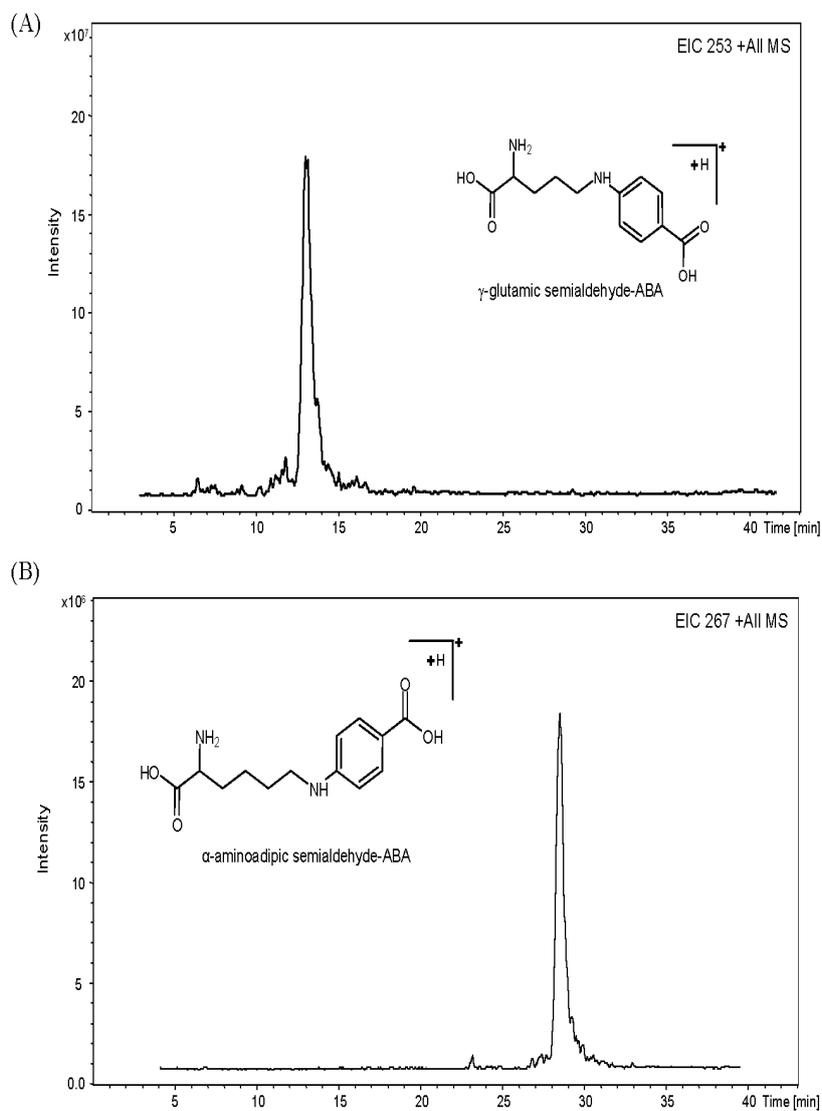
^{a, b, c} Diferentes superíndices sobre las barras de error indican diferencias significativas entre productos.

La fluorescencia emitida se correlacionó con el contenido de hexanal ($R^2=0.74$; $p < 0.001$) y con el análisis de los grupos carbonilo por el método del DNPH ($R^2=0.83$; $p < 0.001$).

Los marcadores de oxidación proteica AAS y GGS fueron analizados y detectados por primera vez en proteínas de origen cárnico previa derivatización con ABA, usando LC-ESI-MS. Los picos correspondientes a los iones moleculares $[M+H]^+$ de las formas derivatizadas de los semialdehidos GGS y AAS (GGS-ABA y AAS-ABA, respectivamente) se muestran en los cromatogramas de MS (ver Figura 7). Ambos compuestos (GGS-ABA y AAS-ABA) fueron positivamente identificados por los tiempos de retención (GGS: 14.5 min; AAS: 28.4 min), el espectro de masas (GGS: m/z 253; AAS: m/z 267) y los patrones de fragmentación

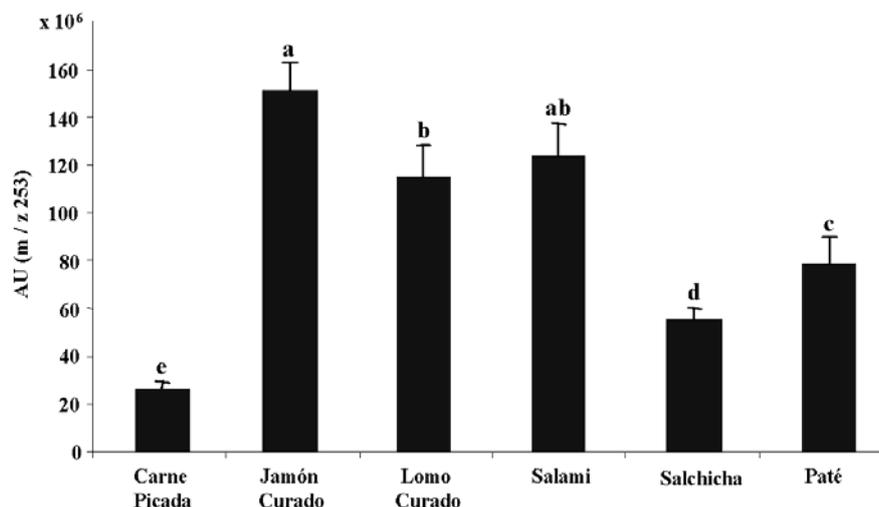
(Estévez et al., 2009), los cuales fueron idénticos a los mostrados por los patrones estándar.

Figura 7. EIC cromatogramas correspondientes a (A) $[M+H]^+$ 252 (GGS-ABA) y (B) $[M+H]^+$ 267 (AAS-ABA) y las estructuras químicas de las formas derivatizadas de los semialdehdos (semialdehdos-ABA) de los marcadores de oxidación proteica.



En el estudio realizado, la concentración de GGS formado de la oxidación de proteínas fue considerablemente más alta que la de AAS en todos los productos cárnicos (ver Figuras 8 y 9).

Figura 8. Niveles de GGS analizados en diferentes productos cárnicos por LC-MS.



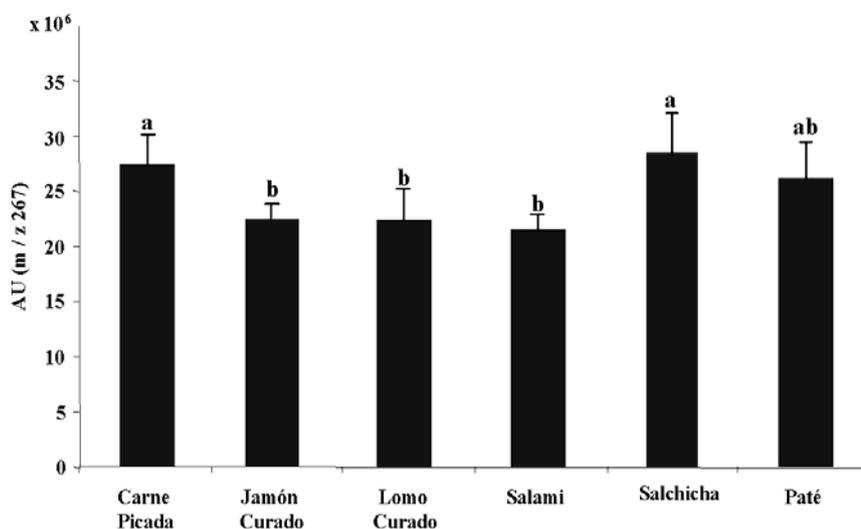
¹Los valores medios de las áreas del pico correspondiente al semialdehído GGS derivatizado (EIC [M+H]⁺ 253 (GGS-ABA) fueron corregidos considerando la concentración total de proteína de cada producto cárnico.

^{a, b, c} Diferentes superíndices sobre las barras de error indican diferencias significativas entre productos.

Los productos cárnicos curados, y en particular el jamón curado y el salami, mostraron la cantidad significativamente más alta de GGS, seguidos por el paté y la salchicha, mientras que la carne picada mostró los niveles más bajos. En cambio, no se encontraron diferencias en el contenido de AAS excepto en la carne y la salchicha que mostraron niveles significativamente más altos que los productos cárnicos curados. Asimismo, no se encontraron correlaciones significativas ni con el método del DNPH ($R^2= 0.02$ y $R^2= 0.27$, AAS y GGS, respectivamente) ni con la intensidad de fluorescencia emitida por los productos de oxidación proteica ($R^2= -0.09$ y $R^2= 0.37$, AAS y GGS, respectivamente). Sin embargo, se encontró una correlación

significativamente positiva y alta entre los valores de GGS obtenidos por MS y los niveles de TBARS de los productos cárnicos objeto de estudio ($R^2= 0.83$, $p < 0.001$).

Figura 9. Niveles de AAS analizados en diferentes productos cárnicos por LC-MS.



¹Los valores medios de las áreas del pico correspondiente al semialdehído AAS derivatizado (EIC $[M+H]^+$ 267 (AAS-ABA) fueron corregidos considerando la concentración total de proteína de cada producto cárnico.

a, b, c Diferentes superíndices sobre las barras de error indican diferencias significativas entre productos.

La formación de los compuestos carbonilo es uno de los cambios más notables que se produce durante la oxidación de las proteínas (Stadman et al., 2000; Requena et al., 2003). En este trabajo se han aplicado diferentes metodologías para la evaluación de los grupos carbonilos de las proteínas de origen cárnico. El contenido de grupos carbonilo presente en un determinado producto normalmente se evalúa mediante la cuantificación de los derivados del DNPH. Sin embargo, en base al estudio realizado por Estévez et al., (2008a) hemos tratado de ensayar la idoneidad de la espectroscopía de fluorescencia para evaluar procesos oxidativos en diferentes tipos de productos cárnicos. En el presente estudio además se han

detectado en productos cárnicos, los productos de oxidación proteica de determinadas rutas específicas, es decir los semialdehídos GGS y AAS, que ya se habían analizado en muestras biológicas usando GC-MS (Requena et al., 2001) y HPLC-FLD (Akagawa et al., 2006). Para el análisis se empleó LC-ESI-MS como desarrolló Estévez et al. (2009).

Los resultados demostraron que los residuos de lisina, prolina y arginina procedentes de proteínas miofibrilares oxidadas durante el procesamiento y almacenamiento de productos cárnicos dieron lugar a los semiladehídos AAS y GGS, respectivamente. Sin embargo, AAS mostró niveles considerablemente más bajos que el GGS aunque deriva del aminoácido lisina que es uno de los más abundantes en la carne. En trabajos anteriores, Estévez et al., 2009 observaron que el AAS, a diferencia del GGS, disminuye lentamente durante los ensayos de oxidación “*in vitro*”, demostrando que este semialdehido podría actuar como reactivo en determinadas reacciones. De hecho, se ha comprobado que el AAS formado como resultado de la oxidación del aminoácido lisina podría eventualmente verse involucrado en reacciones alternativas durante el procesamiento y almacenamiento de los productos cárnicos (formación de bases de Schiff) (Requena et al., 2001) que podría explicar por qué los productos cocidos e incluso los productos cárnicos ligeramente procesados (i.e la carne picada) tienen niveles más altos de AAS que aquellos productos sujetos a procesos tecnológicos más tediosos y largos periodos de procesamiento. Mientras que, el GGS es un compuesto más estable que puede permanecer como tal en los productos cárnicos y proporcionar así una prueba fiable de la situación oxidativa de las proteínas de la carne.

Así pues, los diferentes métodos para cuantificar el daño oxidativo usados muestran diferentes resultados, aunque el empleo de método del DNPH y la espectroscopía de fluorescencia mostraron resultados muy similares. De hecho, se encontró una correlación significativamente positiva entre ambos métodos, sugiriendo que ambas técnicas aportan medidas equivalentes. En contraste, se observó una falta de consistencia entre las medidas realizadas usando LC-MS y aquellas obtenidas usando el método del DNPH y la espectroscopía de fluorescencia.

La falta de consistencia entre ambos métodos es causada por la sobreestimación de la cantidad total de compuestos carbonilo de origen proteico mediante la medida de los productos de oxidación lipídica (método del DNPH) (Estévez et al., 2008b) o los productos derivados de la interacción entre lípidos y proteínas oxidados (bases de Schiff) (Cheld et al., 2007) mediante espectroscopía de fluorescencia, mientras LC-MS proporciona información más precisa de los productos de oxidación proteica. Comparando los resultados de los diferentes métodos, es evidente que existe una notable sobreestimación en productos como la salchicha, el salami y el paté. Estos productos tienen la concentración más alta de lípidos y además las interacciones entre los lípidos y las proteínas oxidadas es muy intensa en emulsiones cárnicas como la salchicha o el paté. Es razonable considerar a la vista de las reacciones de interacción que se producen entre lípidos y proteínas en emulsiones cárnicas y en particular en productos cocidos, que estos productos muestren los valores más altos en cuanto a la concentración de hidrazonas, los valores más altos de fluorescencia y los más bajos de TBARS. En contraposición a esto, Estévez et al. (2009), recientemente encontraron una buena correlación entre los resultados obtenidos por el método del DNPH y el LC-MS. Sin embargo, en dicho estudio las proteínas se oxidaron en ausencia total de lípidos, lo que apoya la hipótesis expresada en este capítulo.

Por lo tanto, la evaluación de los productos de oxidación proteica usando el método del DNPH y la espectroscopía de fluorescencia podría dar lugar a una sobreestimación de los resultados que dependen de la composición lipídica del producto y de su estructura. AAS y GGS obviamente no se ven afectados por la composición y la estructura de la matriz cárnica y son muy específicos dado que proporcionan información precisa acerca del destino de determinados aminoácidos durante el almacenamiento y procesamiento de los productos cárnicos. Estos compuestos, y particularmente el GGS, podrían ser usados como marcadores de daño oxidativo en proteínas como los TBARS se usa de manera rutinaria para cuantificar daño oxidativo en los lípidos. De hecho, ambas medidas muestran una

correlación positivamente alta y significativa lo cual ilustra la relación entre ambos eventos oxidativos.

DISCUSIÓN GENERAL

6. Discusión General

El cloruro de sodio, “sal común”, ha tenido una especial importancia a lo largo de la evolución del hombre, representando el aditivo más usado después del azúcar. La sal ejerce diversas funciones en los alimentos y, de hecho, se utiliza durante el proceso de elaboración de una gran variedad de estos (Reddy y Marth, 1991), siendo en los productos cárnicos donde quizás tenga mayor relevancia, utilizándose para el control del crecimiento microbiano, y además contribuye a la capacidad de retención de agua del producto, facilita la solubilización de ciertas proteínas miofibrilares y confiere el típico sabor salado. Además, afecta a reacciones enzimáticas como la proteólisis, la lipólisis y la oxidación que influyen directamente en el desarrollo de las características organolépticas del producto (Andrés et al., 2004; Toldrá, 2006a).

Durante las últimas décadas se han llevado a cabo diversos estudios que han demostrado la relación existente entre el consumo de elevadas cantidades de sal y la hipertensión (Elliot et al., 1996; Sacks et al., 2001; He y MacGregor 2007). A raíz de esto, la industria cárnica ha desarrollado diversas estrategias con el fin de reducir el contenido de sal en sus productos que en algunos de ellos como es el caso del jamón curado está entre el 5 y el 8 % lo que lo convierte en un producto desaconsejado para aquellas personas que sufren problemas de hipertensión (Toldrá 2002; Gúardia et al., 2006). Una de las estrategias que se ha empleado consiste en la sustitución total o parcial del NaCl por sales de K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} (Ruusunen y Puolanne, 2005). Así, se ha conseguido con éxito sustituir parte del NaCl por KCl sin que se vieran afectadas las propiedades organolépticas de productos como los embutidos y el lomo curado (Gou et al., 1996; Gelabert et al. 2003; Gúardia et al., 2009). Los porcentajes de sustitución son muy reducidos cuando se emplean sales divalentes debido a los defectos que pueden llegar a causar en la calidad del producto final (Hand et al., 1982a; Frye et al., 1986; Gimeno et al., 1998, 1999).

Existe, sin embargo, un total desconocimiento acerca del efecto que puede producir la sustitución del NaCl por estas sales sobre los fenómenos proteolíticos

que tienen lugar durante el proceso de elaboración de productos cárnicos curados como el jamón y el lomo curados. En vista de esto nos planteamos en primer lugar estudiar el efecto “*in vitro*” de las sales sustitutivas del cloruro sódico, KCl, CaCl₂ y MgCl₂ sobre la actividad de las enzimas proteolíticas del músculo porcino (catepsinas, dipeptidilpeptidasas y aminopeptidasas) y compararla con la del NaCl. Se comprobó que el KCl actúa de manera similar al NaCl sobre la actividad de dichas enzimas, mientras bajas concentraciones de las sales divalentes (CaCl₂ y MgCl₂) ejercían un efecto similar al del NaCl e incluso mucho más potente (Armenteros et al., 2009a). Estos resultados marcan el punto de partida para poder reducir la concentración de NaCl en productos cárnicos como el jamón y el lomo curados a base de sustituir la concentración de NaCl por sales de K⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺ sin que el fenómeno proteolítico se viera afectado sensiblemente, pero siempre y cuando se ajuste correctamente la concentración de sales que constituyen la salmuera.

En base a los resultados obtenidos en otros trabajos (Hand et al., 1982b, Gou et al., 1996; Gimeno et al., 1998, 1999; Coutron-Gambotti et al., 1999; Gelabert et al., 2003; Andrés et al., 2005; Armenteros et al., 2009a) se establecieron los tratamientos de salado y los porcentajes más adecuados de sustitución de NaCl por sales de K⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺. En primer lugar se optimizaron con lomo curado y posteriormente fueron aplicados a jamón curado. Se pudo comprobar que sustituciones ≤ 50 % de NaCl por KCl en el lomo curado, no afectaron de manera significativa al proceso proteolítico y lipolítico que tuvo lugar durante la maduración del mismo, tal y como reveló el contenido de aminoácidos y ácidos grasos libres que se encontró al final del proceso de maduración. Estos resultados están en concordancia con los encontrados por Katsiari et al. (2000a,b) en queso tipo “Feta”. Asimismo, el análisis sensorial realizado en los lomos curados confirmó que aquellos salados con sustituciones del 35 y 50 % de NaCl por KCl, no mostraron diferencia apreciables con los lomos control (100 % NaCl), e incluso los salados con 50 % NaCl- 50 % KCl fueron los mejor valorados por el panel de catadores (Armenteros et al., 2009b). De hecho, Gou et al. (1996) en lomo curado y Gelabert et al. (2003) en embutidos curados no encontraron defectos en la calidad sensorial

del producto cuando realizaron sustituciones ≤ 50 % de NaCl por KCl, confirmando que dichos reemplazamientos pueden ser factibles y que no alteran las propiedades sensoriales del producto.

También en lomo curado se observó que el empleo de mezclas de sales de KCl, CaCl₂ y MgCl₂ como sustitutos parciales del NaCl produjo una mayor proteólisis en el producto, mientras que el contenido total de ácidos grasos libres fue significativamente menor cuando se emplearon altas concentraciones de sales divalentes. Este hecho ya había sido comprobado previamente en queso tipo “Camembert” (Lesage et al., 1983). Asimismo, el análisis sensorial demostró que únicamente aquellos lomos donde se reemplazó el 45 % de NaCl por una mezcla de K⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺ no mostraron diferencias significativas con los lomos control (100 % NaCl) e incluso fueron preferidos por el panel de catadores en relación con el atributo aroma (Armenteros et al., 2009c). Por lo tanto, esta composición de sales de curado podría ser utilizada con éxito para reducir el contenido de sodio en el jamón curado sin que se vieran afectadas las propiedades bioquímicas y sensoriales del producto final.

Partiendo de los conocimientos adquiridos con las experiencias realizadas con lomo curado, se intentó extrapolarlas a la fabricación del jamón curado eligiendo los tratamientos de salado que habían obtenido los mejores resultados en el lomo curado y utilizando además una cantidad de sal ajustada a valores bajos (Armenteros et al., 2008 b, Armenteros et al., 2008 c).

En primer lugar, se hizo necesario un control riguroso de las condiciones termohigrométricas de las cámaras durante la elaboración de los perniles con bajo contenido en sal con el fin de obtener un producto estable y seguro desde el punto de vista microbiológico (Toldrá 2006a). Se emplearon temperaturas frías y humedades relativas altas durante las etapas iniciales (salado-post-salado) y temperaturas suaves, más bajas de lo normales, durante las etapas de secado maduración (Ventanas y Cava, 2001b).

Para garantizar la estabilidad del producto a los largo del proceso, era necesaria una correcta difusión de las sales empleadas en los tratamientos de salado. Se observó que las sales de K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} fueron capaces de difundir y penetrar hacia las zonas más profundas del pernil (músculo *B.femoris*), cuando se alargó el tiempo de post-salado, tal y como había sugerido Blesa et al. (2008). La velocidad de penetración de estos cationes es pues más lenta puesto que son capaces de interaccionar con los grupos polares de las proteínas retardando su difusión y penetración hacia zonas más profundas del pernil (Iyengar y Sen, 1970; Xiong y Brekke, 1991).

Tal y como había sucedido en el lomo curado (Armenteros et al., 2009b,c), la sustitución parcial del contenido de NaCl por sales de K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} no alteró significativamente el fenómeno proteolítico que tuvo lugar durante su elaboración, reflejándose en la concentración total de aminoácidos libres, la cual fue muy similar tanto en los tratamientos experimentales de salado como en el control, con 100 % NaCl. Finalmente, el análisis sensorial demostró que los perniles elaborados en la primera experiencia con una mezcla de sales constituida por 50 % NaCl- 50 % KCl estuvieron bien valorados por el panel de catadores, hecho corroborado recientemente por Gúardia et al. (2008) en embutidos curados de pequeño calibre.

Posteriormente se realizó otra experiencia de jamones curados para estudiar la aplicación de un proceso alternativo de salado, como fue el salado a vacío y un aumento en la concentración inicial de la sal permitió una mayor y más homogénea concentración de sales en el interior de los perniles. De hecho, esta metodología ya había sido aplicada con éxito para elaborar queso “Manchego” bajo en sodio (Pavia et al., 2000). Sin embargo, aparecieron defectos en la calidad sensorial del producto en los perniles salados con mezclas del 50 % NaCl/ 50 % KCl ya que se apreciaba el sabor amargo debido al K^+ al aumentar la concentración por encima del umbral de detección (Askar et al., 1994). Por lo tanto, el empleo del vacío permitió una penetración más homogénea y segura de las sales que el uso del masajeado, pero la cantidad de NaCl que se puede reemplazar resulta menor debido a los defectos observados en la calidad sensorial del producto.

El análisis de los productos de oxidación proteica mediante el empleo de métodos tradicionales, como el DNPH, o técnicas más recientes como la espectroscopía de fluorescencia, dio lugar a una sobreestimación de la concentración de carbonilos debido principalmente a la composición y estructura de la matriz cárnica (Estévez et al., 2008b). El empleo de los semialdehidos α -aminoadípico (AAS) y γ - glutámico (GGS) como marcadores de daño oxidativo, parece ser un método más fiable de medida ya que son capaces de cuantificar únicamente el daño oxidativo en proteínas sin otras interferencias. Se trata de una medida muy específica porque estos semialdehidos proceden de la oxidación de determinados aminoácidos, como lisina, arginina y prolina, de origen miofibrilar (Estévez et al., 2009). Así pues, se pudo comprobar que especialmente el semialdehido GGS podría usarse como marcador de daño oxidativo en proteínas de la carne, de forma similar a como se utiliza el índice TBARS para cuantificar el daño oxidativo en lípidos (Armenteros et al., 2009d).

CONCLUSIONES

7. Conclusiones

- La realización de ensayos “in vitro” de la actividad inhibidora de las sales alternativas al NaCl (KCl, CaCl₂ y MgCl₂) sobre la actividad de las enzimas proteolíticas musculares (catepsinas, dipeptidilpeptidasas y aminopeptidasas) demuestran que el KCl no ejercía ningún efecto significativamente diferente al del NaCl sobre la actividad de dichas enzimas, mientras que las sales divalentes CaCl₂ y MgCl₂ ejercían un efecto inhibitor más intenso a concentraciones más bajas.
- Las experiencias de fabricación de lomo curado pusieron de manifiesto que sustituciones del 50 % de NaCl por KCl no afectaban de manera significativa al proceso proteolítico ni a la calidad sensorial, por lo que constituye una alternativa válida para la de reducción de sodio en dicho producto. El empleo de sales de Ca²⁺ y Mg²⁺ produjo una mayor proteolisis además de algunos defectos en la calidad sensorial del producto, lo cual complica su uso potencial como alternativas al sodio.
- Las experiencias de fabricación de jamón curado pusieron de manifiesto que el empleo de sales de K⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺, como sustitutos parciales del NaCl, a bajas concentraciones (alrededor de 2.5 %) de sales, no alteraba de manera significativa el fenómeno proteolítico durante su proceso de elaboración. Los jamones elaborados con sustituciones del 50 % de NaCl por KCl fueron bien valorados por el panel de catadores.
- El empleo en el jamón curado de sales alternativas al NaCl a mayores concentraciones (4.5 a 5.5 %) generó defectos en la calidad sensorial del producto, debido a la alta concentración final de potasio.

BIBLIOGRAFÍA

8. Bibliografía

Akagawa, M., Sasaki, D., Ishii, Y., Kurota, Y., Yotsu-Yamashita, M., Uchida, K. y Suyuma, K. (2006). New methods for the quantitative determination of mayor protein carbonyls, α -amino adipic and γ -glutamic semialdehydes: Investigation of the formation mechanism and chemical nature in vitro and in vivo. *Chemical Research in Toxicology*, 19, 1059-1065.

Albarracín, W., Grau, R., Barat, J.M., Blesa, E. y Pagán, M.J. (2005). Influencia del apilado durante la etapa de salado de jamones. III Congreso Mundial del Jamón. Ed. Consejo Regulador de la Denominación de Origen "Jamón de Teruel", 421-423.

Aliño, M., Grau, R., Toldrá, F., Blesa, E., Pagán, M.J., Barat, J.M. (2009a). Influence of sodium replacement on physicochemical properties of dry-cured loin. *Meat Science*, 83, 423-430.

Aliño, M., Grau, R., Baigts, D. y Barat, J.M. (2009b). Influence of sodium replacement on the salting kinetics of pork loin. *Journal of Food Engineering*: 95, 551-557.

Andrés, A.I., Cava, R., Martín, D., Ventanas, J. y Ruiz, J. (2005). Lypolysis in dry-cured ham: Influence of salt content and processing conditions. *Food Chemistry*, 90, 523-533.

Andrés, A.I., Cava, R., Ventanas, J., Muriel, E. y Ruíz, J. (2004). Lipid oxidative changes throughout the ripening of dry-cured hams with different salt contents and processing conditions. *Food Chemistry*, 84, 375-381.

Andrés, A.I. y Ruíz, J. (2001). Tecnología del Salazonado del jamón Ibérico. En: Tecnología del jamón Ibérico de los Sistemas Tradicionales a la Explotación Racional del Sabor y el Aroma. Eds. Ventanas, J et al., pp. 232-253, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España.

Antequera, T. y Martín, L. (2001a). Reacciones química y bioquímicas que se desarrollan durante la maduración del jamón Ibérico. En: Tecnología del Jamón Iberico: De los sistemas tradicionales a la explotación racional del sabor y el aroma. Eds. Ventana, J. et al., pp 293-322. Ediciones Mundi Prensa, Madrid, España.

Antequera, T. y Martín, L. (2001b). Composición química general del jamón Ibérico: interés nutritivo y dietético. En: Tecnología del Jamón Ibérico. Eds. Ventanas, J. et al., pp 439-465. Ediciones Mundi-Prensa., Madrid, España.

Antequera, T., López-Bote, C.J., Córdoba, J.J., García, C., Asensio, M.A., Ventanas, J., García-Regueiro, J.A. y Díaz, I. (1992). Lipid oxidative changes in the processing of Iberian pig hams. *Food Chemistry*, 45, 105-110.

AOAC (2000a). Moisture content 950.46. En *Official methods of analysis* (17th ed.). Gaithersburgh, Maryland: *Association of Official Analytical Chemists*.

AOAC (2000b). Solvent extraction method for fat in meat 991.36. En *Official methods of analysis* (17th ed.). Gaithersburgh, Maryland: *Association of Official Analytical Chemists*.

AOAC (2000c). Protein content in meat 928.08. En *Official methods of analysis* (17th ed.). Gaithersburgh, Maryland: *Association of Official Analytical Chemists*.

Aristoy, M.C y Toldrá, F. (1995) Isolation of flavor peptides from raw pork meat and dry-cured ham. En: Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence. Eds. Charalambous Amsterdam, pp.1323-1344G. The Netherlands: Elsevier Science Publishers BV.

Aristoy, MC y Toldrá, F. (1991). Desproteinization techniques for HPLC amino acid analysis in fresh pork muscle and dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1792-1795.

Armenteros, M., Aristoy, M.C. y Toldrá, F. (2009a). Effect of sodium, potassium, calcium and magnesium chloride salts on porcine muscle proteases. *European Food Research and Technology*, 229, 93-98.

Armenteros, M., Aristoy, M.C., Barat, J.M. y Toldrá, F. (2009b). Biochemical changes in dry-cured loins salted with partial replacements of NaCl by KCl. *Food Chemistry*, 117, 627-633.

Armenteros, M., Aristoy, M.C., Barat, J.M. y Toldrá, F. (2009c). Biochemical and Sensory Properties of Dry-Cured Loins as Affected by Partial Replacement of Sodium by Potassium, Calcium, and Magnesium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 9699-9705.

Armenteros, M., Heinonen, M., Toldrá, F. y Estévez, M. (2009d). Analysis of protein carbonyls in meat products by using the DNPH-method, fluorescence spectroscopy and liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry (LC-ESI-MS). *Meat Science*, 83, (1), 104-112.

Arnau, J. (2007). Factores que afectan a la salazón del jamón curado. *Eurocarne*, 160, 59-76.

Arnau, J., Hugas, M. y Monfort, J.M. (1987). Jamón Curado. Aspectos Técnicos. Grafis-Sant S.A., Girona, España.

Askar, A., El-Samahy, S.K., y Tawfik, M. (1994). Pasterna and beef bouillon. The effect of substituting KCl and K-lactate for sodium chloride. *Fleischwirtschaft*, 73 ,(3), 289-292.

Bañón, S., Cayuela, J.M., Granados, M.V. y Garrido, M.D. (1999). Pre-cure freezing affects proteolysis in dry-cured hams. *Meat Science*, 51, 11-16.

Barat, J.M., Grau, R., Ibáñez, J.B., Pagán, M.J., Flores, M., Toldrá, F. y Fito, P. (2006). Accelerated processing of dry-cured ham. Part I: Viability of the use of brine thawing/salting operation. *Meat Science*, 72, (4), 757-765.

Barat, J.M., Grau, R., Montero, A., Chiralt, A., y Fito, P. (1998). Feasibility of brining of ham for Turing. En: Meat consumption and culture. Eds Diestre, A. y Monfort J.M. (Vol. II, pp. 970-971). Institute of Food Agricultural and Technology (IRTA) y Eurocarne.

Barbut, S., Tanaka, N. y Maurer, A.J. (1986). Effects of varying levels of chloride salts on *Clostridium botulinum* toxin production in turkey frankfurters. *Journal of Food Science*, 51, 1129-1131.

Barret, A.J, Rawlings, N.D. y Woessner, J.F. (1998). Handbook of proteolytic enzymes. London: Academic Press

Bellati, M., Dazzi, G., Chizzolini, R., Palmia, F. y Palorari, G. (1983). Physical and Chemicals changes occurring in proteins during the maturation of Parma hams. *Industria Conserve*, 58, 143-146.

Bello, J. (2008). Jamón Curado. Aspectos Científicos y Tecnológicos. Perspectiva desde la Unión Europea. Ediciones Díaz de Santos, Madrid, España.

Berry, J.F., Cevallos, W. H., y Wade, R.R. (1965). Lipid class and fatty acids composition of intact peripheral nerve and during wallerian degeneration. *Journal of American Oil and Chemistry Society*, 42, 492-495.

Betts, G., Everis, L. y Betss, R. (2007). Microbial issues in reducing salt in food products. En: Reducing Salt in foods, practical strategies. Eds. Kilcast, D. y Angus, F. pp 175-199. CRC Press, Boca Raton, FL, E.E.U.U.

Beyer, F.R., Dickinson, H.O., Nicolson, D.J., Ford G.A y Mason, J. (2006). Administración de suplementos de calcio, magnesio y potasio combinados para el tratamiento de la hipertensión primaria en adultos. (Revisión Cochrane traducida). En: *La Biblioteca Cochrane Plus*, Número 2. Oxford: Update Software Ltd. Disponible en: <http://www.update-software.com>.

Bidlingmeyer, B.A., Cohen, S.A., Tavoin, T.L., y Frost, B. (1987). A new rapid high sensitivity analysis of amino acids in food type samples. *Journal of the Association of Official Analytical Chemistry*, 70, 24-247.

Bjornsson, A. (2000). Groundfish Forum. Madrid, 17-19 October, 2000. Morgunbladid, 13.

Blesa, E., Aliño, M., Barat, J.M., Grau, R., Toldrá, F. y Pagán, M.J. (2008). Microbiology and physico-chemical changes of dry-cured ham during the post-salting stage as affected by parcial replacement of NaCl by other salts. *Meat Science*, 78, 135-142.

Boadas, C., Gou, P., Valero, A. y Arnau, J. (2000). Changes in different zones of dry-cured ham during drying. *Fleischwirtschaft International*, 4, 45-48.

B.O.E (1980). Real decreto 1043/1973. Norma de calidad para productos cárnicos embutidos crudos-curados en el mercado interior. Boletín Oficial del Estado, 21/3/80.

Buemi, M., Senatore, M., Corica, F., Aloisi, C., Romeo, A., Tramontana, D. y Frisina, N. (2002). Diet and Arterial Hypertension: Is the Sodium Ion Alone Important? *Medical Research Reviews*, 22, (4), 419-428.

Chayovan, S., Rao, R.M. y Liuzzo, J.A. y Khan, M.A. (1983). Chemical Characterization and Sensory Evaluation of a Dietary Sodium-Potassium Fish Sauce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31, (4), 859-863.

Cheld, I., Gatellier, P. y Santé-Lhoutellier, V. (2007). Characterisation of fluorescent Schiff bases formed during oxidation of pig myofibrils. *Meat Science*, 76, 210-215.

Chiralt, A. y Fito, P. (1997). Salting of Manchego type cheese by vacuum impregnation. En Food Engineering 2000 Eds Fito, P, Ortega, E. y Barbosa, G. pp. 214-230. New York (E.E.U.U) Chapman & Hall.

Choi, J., Malakowsky, C.A., Talent, J.M., Conrad, C.C., y Gracy, R.W. (2002). Identification of oxidized plasma proteins in Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293, 1566-1570.

Consumer Eroski, Reducir el consumo de sal (2009). <http://www.revista.consumer.es>

Consumer Eroski, Alimentos Elaborados: ¿cuánta sal tienen? (2006). <http://www.revista.consumer.es>

Córdoba, J.J., Antequera, T., Ventanas, J., López-Bote, C., García, C. y Asensio, M.A. (1994). Hydrolysis and loss of extractibility of proteins during ripening of Iberian ham. *Meat Science*, 37, 217-227.

Coutron-Gambotti, C., Gandemer, G., Rousset, S., Maestrini, O. y Casabianca, F. (1999) Reducing salt content of dry-cured ham: effect on lipid composition and sensory attributes. *Food Chemistry* 64, 13-19.

Coutron-Gambotti, C., y Gandemer, G. (1999). Lipolysis and oxidation in subcutaneous adipose tissue during dry-cured ham processing. *Food Chemistry*, 64, 95-101.

Cruz, J. (2007). La evolución del sector productor de jamón curado en España. *Eurocarne*, 154, (3) 29-40.

Daneshavar, B., Frandsen, H., Artrup, H. y Dragsted, L.O. (1997). γ -Glutamyl semialdehyde and α -amino-adipic semialdehyde : Biomarkers of oxidative damage to proteins. *Biomarkers*, 2, 117-123.

Desmond, E. (2006). Reducing salt: A challenge for the meat industry. *Meat Science*, 74, 188-196.

Devlieghere, F., Vermerien, L., Bontenbal, E., Lamers, P.-P. y Debevere, J. (2009). Reducing salt intake from meat products by combined use of lactate and diacetate salts without affecting microbial stability. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 337-341.

Dyer, A., Elliot, P., Chee, D. y Stamler, J. (1997). Urinary biochemical markers of dietary intake in the INTERSALT Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 65, 1246S-1253S.

Dyer, A.R., Elliot, P. y Shipley, M. (1994). Urinary electrolyte excretion in 24 hours and blood pressure in the INTERSALT Study. II. Estimates of electrolyte-blood pressure associations corrected for regression dilution bias. The INTERSALT Cooperative Research Group. *American Journal of Epidemiology*, 139, (9), 283-289.

Elias, R.J., Kellerby, S.S. y Decker, E.A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 430-441.

Elliott, P., Stamler, J., Nichols, R., Dyer, A.R., Stamler, R., Kesteloot, H. y Marmot, M. (1996). Intersalt revisited: further analyses of 24 hour sodium excretion and blood pressure within across populations. *British Medical Journal*, 312, (7041), 1249-1253.

Estévez, M., Ollilainen, V. y Heinonen, M. (2009). Analysis of protein oxidation markers α -amino adipic and γ -glutamic semialdehydes in food proteins using liquid chromatography (LC)-Electrospray ionization (ESI)-Multistage tandem mass spectrometry (MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 3901-3910.

Estévez, M., Kylli, P., Puolanne, E., Kivikari, R. y Heinonen, M. (2008a). Fluorescence spectroscopy as a novel approach for the assessment of myofibrillar protein oxidation in oil-in-water emulsions. *Meat Science*, 80, (4), 1290-1296.

Estévez, M., Morcuende, D., y Ventanas, S. (2008b). Determination of oxidation. En: Handbook of Muscle Foods Analysis. Eds. Nollet, L.M.L. y Toldrá, F., pp. 221-239, CRC Press, Boca Ratón FL, E.E.U.U,

Estévez, M., Ventanas, S. y Cava, R. (2005). Protein oxidation in frankfurters with increasing levels of added rosemary essential oil: Effect on colour and texture deterioration. *Journal of Food Science*, 70, 427-432.

Estévez, M. y Cava, R. (2004). Lipid and protein oxidation, release of iron from heme molecule and colour deterioration during refrigerated storage of liver pâté. *Meat Science*, 68, 551-558.

Fennema, O.R. (1993). Flavor. En: Química de los Alimentos. Ed. Acribia, pp. 659-709, Zaragoza, España.

Fitzgerald, E. y J. Buckley. (1985). Effect of Total and Partial Substitution of Sodium-Chloride on the Quality of Cheddar Cheese. *Journal of Dairy Science* 68, (12), 3127-3134.

Flores, J. (1997). Mediterranean vs Northern European meat products. Processing Technologies and main differences. *Food Chemistry*, 59, (4), 505-510.

Flores, M., Aristoy, M.C., Antequera, T., Barat, J.M. y Toldrá, F. (2009). Effect of prefreezing hams on endogenous enzyme activity during the processing of Iberian dry-cured hams. *Meat Science*, 82, 241-246.

Flores, M., Nieto, P., Ferrer, J.M., y Flores, J. (2005). Effect of calcium chloride on the volatile pattern and sensory acceptance of dry-fermented sausages. *European Food Research and Technology*, 221, 624-630.

Flores, M., Marina, M. y Toldrá, F. (2000). Purification and characterization of a soluble methionyl aminopeptidase from porcine skeletal muscle. *Meat Science*, 56, 247-254.

Flores, M., Aristoy, M.C. y Toldrá, F. (1997a). Curing agents affect aminopeptidase activity from porcine skeletal muscle. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchungund-Forschung A*, 205, 343-346.

Flores, M., Aristoy, M.C., Spanier, A.M., y Toldrá, 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., Ingram, D.A., Bett, K.L., Toldrá, F. y Spanier, A.M. (1997c). Sensory characteristics of Spanish “Serrano” dry-cured ham. *Journal of Sensory Studies*, 12, 169-179.

Flores, M., Aristoy, M.C. y Toldrá, F. (1996). HPLC Purification and Characterization of Soluble Alanyl Aminopeptidase from Porcine Skeletal Muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2578-2583.

Flores, M., Aristoy, M.C. y Toldrá, F. (1993). HPLC purification and characterization of porcine muscle aminopeptidase B. *Biochimie*, 75, 861-867.

Folch, J., Lees, M., y Sloane Stanlye, G.H. (1957). A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-508.

Food Standards Agency, (2008). Summary table of commitments to salt reduction. Disponible en la web: <http://www.food.gov.uk/multimedia/spreadsheets/saltcommitmentsum.xls>.

FSA (Food Standards Agency) (2002). Mc Cance and Widdowson's the Composition of Foods, Sixth Summary Edition, Royal Society of Chemistry, Cambridge.

Frankel, E.N., Huang, S-W., Kanner, J. y German, J.B. (1994). Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: Bulk oil vs. emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1045-1059.

Fritsche, B. (1964) Der Zucker Salzhandel im 19 Jahrhundert Dissertation-Eigenverlag , pp. 132. Zurich. Alemania.

Frye, C.B., Hand, L.W., Calkins, C.R., y Mandigo, R.W. (1986). Reduction or replacement of sodium chloride in a tumbled ham product. *Journal of Food Science*, 51, 836-837.

Gamble, J.L., Ross, G.S. y Tisdall, F.F. (1923). The metabolism of fixed based during fasting. *Journal of Biological Chemistry*, 57, 633-695.

García-Garrido, J.A., Quiles-Zafra, R., Tapiador, J. y Luque de Castro,

M.D. (2000). Activity of cathepsin B, D, H and L in Spanish dry-cured ham of normal and defective texture. *Meat Science*, 56, 1-6.

García, C. y Timón, M.L. (2001). Los compuestos responsables del “flavor” del jamón Ibérico. Variaciones en los distintos tipos de jamones. En: Tecnología del Jamón Ibérico: De los sistemas tradicionales a la explotación racional del sabor y el aroma. Eds. Ventana, J. et al., pp 367-390, Ediciones Mundi Prensa, Madrid, España.

Gelabert, J., Gou, P., Guerrero, L. y Arnau, J. (2003). Effect of sodium chloride replacement on some characteristics of fermented sausages. *Meat Science*, 65, 833-839.

Geleijnse, J.M., Witteman, C.M., Stijnen, T., Kloos, M.W., Hofman, A. y Grobbee, D.E. (2007). Sodium and potassium intake and risk of cardiovascular events and all-cause mortality: the Rotterdam study. *European Journal of Epidemiology*, 22, 763-770.

Gilbert, P.A. y Heiser, G. (2005). Salt and health: the CASH and BPA perspective. *British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin*, 30, 62-69.

Gil, M., Guerrero, L. y Sárraga, C. (1999). The effect of meat quality, salt and ageing time on biochemical parameters of dry-cured *Longissimus dorsi* muscle. *Meat Science*, 51, 329-337.

Gimeno, O., Astiasarán, I. y Bello, J. (2001) Calcium ascorbate as a potential partial substitute for NaCl in dry fermented sausages: effect on colour, texture and hygienic quality at different concentrations. *Meat Science* 57, (1), 23-29.

Gimeno, O., Astisaran, I. y Bello, J. (1999). Influence of Partial Replacement of NaCl with KCl and CaCl₂ on Texture and Color of Dry Fermented Sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 873-877.

Gimeno, O., Astisaran, I. y Bello, J. (1998). A mixture of Potassium, Magnesium, and Calcium Chlorides as a partial replacement of sodium chloride in dry- fermented sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4372-4375.

Gou, P., Guerrero, L., Gelabert, J. y Arnau, J. (1996). Potassium chloride, potassium lactate and glycine as sodium chloride substitutes in fermented sausages and in dry-cured pork loin. *Meat Science*, 42, 37-48.

Gou, P., Guerrero, L., y Arnau, J. (1995). Sex and crossbreed effects on the characteristics of dry-cured ham. *Meat Science*, 40, 21-31.

Granger, J.P. y Schnackenberg, C.G. (2000). Renal mechanisms of angiotensin II-induced hypertension. *Seminars in Nephrology*, 20, 417-425.

Guàrdia, M.D., Guerrero, L., Gelabert, J., Gou, P. y Arnau, J. (2008). Sensory characterisation and consumer acceptability of small calibre fermented sausages with 50% substitution of NaCl by mixtures of KCl and potassium lactate. *Meat Science*, 80, 1225-1230.

Guàrdia, M.D., Guerrero, L., Gelabert, J., Gou, P., y Arnau, J. (2006). Consumer attitude sodium reduction in meat products and acceptability of fermented sausages with reduced sodium content. *Meat Science*, 73, 484-490.

Guamis, B., Trujillo, A.J., Ferragut, V., Chiralt, A., Andres, A. y Fito, P. (1997). Ripening Control of Manchego Type Cheese Salted by Brine Vacuum Impregnation. *International Dairy Journal*, 7, 185-192.

Guerrero, L., Gobantes, I., Oliver, M.A., Arnau, J., Guàrdia, M.D. Elvira, J., Riu, P., Grébol, N. y Monfort, J.M. (2004). Green hams electrical impedance spectroscopy (ESI) measures and pastiness prediction of dry cured hams. *Meat Science*, 66, 289-294.

Guerrero, L., Gou, P., Alonso, P., y Arnau, J. (1996). Study of the Physicochemical and Sensorial Characteristics of Dry-Cured Hams in Three Pig Genetic Types. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70, 526-530.C

Gums, J.G. (2004). Magnesium in cardiovascular and other disorders. *American Society of Health-System Pharmacy*, 61, 15, 1569-1576.

Hand, L.W., Terrell, R.N. y Smith, G.C. (1982a). Effects of Chloride Salts on Physical, Chemical and Sensory Properties of Frankfurters. *Journal of Food Science*, 47, 1800-1802.

Hand, L.W., Terrell, R.N. y Smith, G.C. (1982b). Effects of complete or partial replacement of sodium chloride on processing and sensory properties of hams. *Journal of Food Science*, 47, 1776-1778.

He, F.J. y MacGregor, G.A. (2007). Dietary salt, high blood pressure and other harmful effects on health. En: Reducing salt in foods, practical strategies. Eds: Kilcast, D. y Angus, pp19-53F. CRC Press, Boca Raton, FL, E.E.U.U.

He, F.J. y MacGregor, G.A. (2004). Effect of longer-term modest salt reduction on blood pressure. In: *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.

He, F.J., y MacGregor, G.A. (2003). How far should salt intake be reduced? *Hypertension*, 42, 1093-1099.

Heinonen, M., Rein, D., Satue-Gracia, M.T., Huang, S-W., German, J.B. y Frankel, E.N. (1998). Effect of protein on the antioxidant activity of phenolic compounds in a lecithin-liposome oxidation system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 917-922.

Hooper, L., Bartlett C., Smith, D., Ebrahim, S. (2002). Systematic review of long term effects of advice to reduce dietary salt in adults. *An International General Medical Journal*, 325, 628-636.

Ibañez, C., Quintanilla, L., Irigoyen, A., García-Jalón, I., Cid, C., Astiasarán, I. y Bello, J. (1995) .Partial replacement of sodium chloride with potassium chloride in dry fermented sausages: Influence on carbohydrate fermentation and the nitrosation process. *Meat Science*, 40, 45-53.

INTERSALT. (1988). Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. "Intersalt Cooperative Research Group". *An International General Medical Journal*, 297, 6644, 319-328.

ISO Norm R-5495, International Standards Organisation (1983). Sensory analysis. Methodology. Paired comparison test.

ISO Norm 4120, International Standards Organisation (1983). Sensory analysis. Methodology. Triangular Test.

Iyengar, J.R. y Sen, D.P. (1970). The equilibrium relative humidity relationship of salted fish (*Barbus carnaticus* and *Rastelliger canagurta*): effect of calcium and magnesium as impurities in common salt used for curing. *Journal of Food Science & Technology*, 9, 17-19.

James, W.P., Ralph, A. y Sanchez-Castillo, C.P. (1987). The dominance of salt in manufactured food in the sodium intake of affluent societies. *Lancet*, 1 (8530), 426-429.

Kato, H., Rhue, M.R. y Nishimura, T. (1989). Role of free amino acids and peptides in food taste. En Flavor chemistry. Trends and development. Eds. Teranishi, R., Buttery, R.G. y Shahidi, F, pp. 158-174, Congress of the North American Continent (195th) Meeting of the American Chemical Society. Toronto, Ontario, Canadá.

Katsiari, M. C., Voutsinas, L.P., Alichandis, G., y Roussis, I.G (2001) Lipolysis in reduced sodium Kefalograviera cheese made by partial replacement of NaCl with KCl. *Food Chemistry*, 72 ,(2), 193-97.

Katsiari, M. C., Voutsinas, L.P., Alichandis, G., y Roussis, I.G. (2000a) Proteolysis in reduced sodium Feta cheese made by partial substitution of NaCl by

KCl. *International Dairy Journal*, 10, (9), 635-46.

Katsiari, M. C., Voutsinas, L.P., Alichandis, G., y Roussis, I.G. (2000b) Lipolysis in reduced sodium Feta cheese made by partial substitution of NaCl by KCl. *International Dairy Journal*, 10, (5-6), 369-73.

Katsiari, M. C., Voutsinas, L.P., Alichandis, G., y Roussis, I.G. (1998) Manufacture of Kefalograviera cheese with less sodium by partial replacement of NaCl with KCl. *Food Chemistry*, 61, (1-2), 63-70.

Katsiari, M. C., Voutsinas, L.P., Alichandis, G., y Roussis, I.G. (1997) Reduction of sodium content in feta cheese by partial substitution of NaCl by KCl. *International Dairy Journal*, 7, (6-7), 465-72.

Keeton, J.T (1984). Effects of potassium chloride on properties of Country-Style hams. *Journal of Food Science*, 49, 146-148.

Kilcast, D. y Ridder, C. (2007). Sensory issues in reducing salt in food products. En: *Reducing Salt in Foods: Practical strategies*. Eds. Kilcast, D. y Angus, F., pp. 202-220. CRC Press, Boca Ratón, FL, E.E.U.U.

Kimura, M., Lu, X., Skurnick, J., Awad, G., Bogden, J., Kemp, F., et al., (2004). Potassium chloride supplementation diminishes platelet reactivity in humans. *Hypertension*, 44, 969-973.

Knight, P. y Parson, N. (1988). Action of NaCl and polyphosphates in meat processing: Responses of myofibrils concentrated salt solutions. *Meat Science*, 24, 275-300.

Koohmaraie, M. (1994). Muscle Proteinases and Meat Aging. *Meat Science*, 36, 93-104.

Koohmaraie, M. y Shackelford, S.D. (1991). Effect of calcium chloride infusion on the tenderness of lambs fed a β -adrenergic agonist. *Journal of Animal Science*, 69, 2463-2471.

Kurlanski, M. (2002). Salt. *A World History*. London: Random House.

Kuramitsu, R., Segauwa, D., Nakamura, K., Muramatsu, S. y Okai, H. (1997). Remodelling of foodstuffs and the application to food systems. 2. Further studies on the preparation of low sodium chloride containing soy sauce by using ornithyl taurine hydrochloride and its related compounds. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 61, 1163-1167.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Laragh, J.H. y Brenner, B.M. (1995). Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management. Vol. 1, 2. **New York: Raven Press Ltd.**

Laszlo, P. (2001). Salt: Grain of life. Columbia University Press. Nueva York, E.E.U.U.

Lawless, H.T., Rapacki, F., Horne, J. y Hayes, A. (2003). The taste of calcium and magnesium salts and anionic modifications. **Food Quality and Preference**, (4), 319-325

Leak, F.W, Kemp, J.D., Fox, J.D. y Langlois, B.E. (1987). Effects of boning time, mechanical tenderization and partial replacement of sodium chloride on the quality and microflora of boneless dry-cured ham. **Journal of Food Science**, 52, (2), 263-266.

Lesage, L.; Voilley, A.; Lorient, D. y Bézard, J. (1983). Sodium chloride and magnesium chloride affected by ripening of camembert cheese. **Journal of Food Science**, 58, 1303-1306.

Lev-Ran, A. y Porta, M. (2005). Salt and hipertensión: a phylogenetic perspectiva. **Diabetes Metabolism Research and Reviews**, 21, 118-131.

Lindsay, R.C., Hargett, S.M. y Bush, C.S. (1982). Effect of sodium/potassium (1:1) Chloride and low sodium chloride concentrations on quality of Cheddar Cheese. **Journal of Dairy Science**, 65, 360-370.

Lifton, R.P., Gharavi, A.G. y Geller, D.S. (2001). Molecular mechanisms of human hypertension. **Cell** 104, 545-556.

Loria, C.M.; Obarzanek, E. y Ernst, N.D. (2001). Choose and prepare foods with less salt: dietary advice for all Americans. **Journal Nutrition**, 131, 536-551.

Lozano, M., Vidal-Aragón, M.C., Montero de Espinosa, V. y Sabio, E. (1998). Características nutricionales de 6 tipos de jamón curado procedentes de países del sur de Europa: Bayona, Corso, Iberico, Italian Country Style, Parma y Serrano. Preferencias de los consumidores españoles. **Alimentaria**, 99-103.

Luft, F.C. y Weinberger, M.H. (1987). Potassium and blood pressure regulation. **American Society for Clinical Nutrition**, 45, 1289-1294.

Lund, M.N., Lametsch, R., Hviid, M.S., Jenses, O.N., y Skibsted, L.H. (2007). High-oxygen packaging atmosphere influences protein oxidation and tenderness of porcine longissimus dorsi during chill storage. **Meat Science**, 77, 295-303.

Mc Carty, M.F. (2004). Should we restrict chloride rather than sodium? *Medical Hypothesis* 63, 138-148.

Man, C.M.D. (2007). Technological functions of salt in food products. En: Reducing salt in foods: Practical strategies. Eds. Kilcast, D, y Angus, F. pp. 157-173. CRC Press, Boca Raton, FL, E.E.U.U.

Margerison, C., Nowson, C.A., Worsley, T., Jorna, M.K. y Frame, A.G. (2004). Food Source of sodium prior to and during the OZDASH study. *Journal of Clinical Nutrition*, 13, S58.

Martín, L., Córdoba, J.J., Antequera, T., Timón, M.L. y Ventanas, J. (1998). Effect of salt and Temperature on Proteolysis during Ripening of Iberian Ham. *Meat Science*, 49, (2), 145-153.

Martínez-Alvarez, O. y Gómez-Guillén M.C. (2005). The effect of brine composition and pH on the yield and nature of water-soluble proteins extractable from brined muscle of cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*, 92, 71-77.

Matthews, K., y Strong, M. (2005). Salt-its role in meat products and the industry's action plan to reduce it. *British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin*, 30, 55-61.

McDonald, J.K y Barret, A.J.(Eds) (1986). Mammalian Proteases. A Glossary and Bibliography. Vol. 2. Exopeptidases. Academic Press, London.

Merril, C.R., Goldman, D., Sedman, S.A. y Ebert, M.H. (1981). Ultrasensitive Stain for Proteins in Polyacrylamide Gels Shows Regional Variation in Cerebrospinal Fluid Proteins. *Science*, 211, 1437-1438.

Mohan, S. y Campbell, N.R.C. (2009). Salt and high blood pressure. *Clinical Science*, 117, 1-11.

Molina, I. y Toldrá, F. (1992). Detection of Proteolytic Activity in Microorganisms Isolated from Dry-cured Ham. *Journal of Food Science*, 57, (6), 1308-1310.

Monin, G. (1995): Establishing scientific bases for control and improvement of sensory quality of dry-cured hams in southern European countries, Informe anual del Contract AIRCT93-1757, comunicación personal.

Morgan, T., Aubert, J.F. y Brunner, H. (2001). Interaction between sodium intake angitensin II and blood pressure as a cause of cardiac hypertension. *American Journal of Hypertension*, 14, 914-920.

Nakamura, K., Kuramitsu, R., Kataoka, S., Segauwa, D., Tahara, K., Tamura, M., y Okai, H. (1996). Convenient synthesis of L-ornithil taurine hydrochloride and the effect on saltiness in a food material. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2481-2485.

Navarro, J.L., Nadal, M. I., Nieto, P., y Flores, J. (2001). Effect of nitrate and nitrite curing salts on the generation and oxidation of fatty acids in non-fermented sausages. *European Food Research and Technology*, 214 (4), 421-425.

Needs, E.C., Ford, G. D., Owen, A. J., y Tuckley, B. (1983). A method for the quantitative determination of individual free fatty acids in milk by ion exchange resin adsorption and gas-liquid chromatography. *Journal of Dairy Research*, 50, 321-329.

Nestle, M. (2002). Food Politics-How the Food Industry Influences Nutrition and Health. London, University of California Press.

Nishimura, T., y Kato, H. (1988). Taste of free amino acids and peptides. *Food Reviews International*, 4, 175-194.

Nowson, C.A., Morgan, T.O. y Gibbons, C. (2003). Decreasing dietary sodium while following a self-selected potassium-rich diet reduces blood pressure. *Journal of Nutrition*, 133, 12, 4118-4123.

Obarzanek, E., Prosscham, M.A., Vollmer, W.M., Moore, T.J., Sacks, F.M., Appel, I.J., et al. (2003). Individual blood pressure responses to changes in salt intake: Results from the DASH-sodium trial. *Hypertension*, 42, 459-467.

Olensen, P.T., Meyer, A.S. y Stahnke, L.H. (2004). Generation of flavour compounds in fermented sausages the influence of curing ingredients, *Staphylococcus* starter culture and ripening time. *Meat Science*, 66, 675-687.

Oliver, C.N., Ahn, B-W., Moerman, E.J., Goldstein, S., y Stadman, E.R. (1987). Age-related changes in oxidized proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 5488-5491.

Pasin, G., O'Mahony, M., York, G., Meitzel, B., Gabriel, L., y Zeidler, G. (1989). Replacement of sodium chloride by modified potassium chloride in fresh pork sausage: acceptability testing using signal detection measures. *Journal of Food Science*, 54, 553-555.

Pavia, M, Trujillo, A.J., Guamis, B. y Ferragut, V. (2000). Ripening control of salt-reduced Manchego-type cheese obtained by brine vacuum-impregnation. *Food Chemistry*, 70, 155-162.

Park, D., Xiong, Y.L. y Alderton, A.L. (2006). Concentration effects of hydroxyl radical oxidizing systems on biochemical properties of porcine muscle myofibrillar protein. *Food Chemistry*, 101, 1239-1246.

Pérez-Alvarez, J.A., Sánchez-Rodríguez, E., Fernández-López, J., Gago-Gago, M.A., Ruíz-Peluffo, C., Rosmini, M., Pagán-Moreno, M.J., López-Santoveña, F. y Aranda-Catalá, V. (1997). Chemical and color characteristics of “Lomo Embuchado” during salting seasoning. *Journal of Muscle Foods*, 8, 395-411.

Picaza, N. y Riesco, S. (2008). Reducción de la sal en los alimentos procesados. 1988-334X, Número 2. Aliment@tec-Informes de Innovación y Tendencias (www.alimentatec.com).

Pripis-Nicolau, L., Revel, G., Bertrand, A. y Maujean, A. (2000). Formation of flavour components by the reaction of amino acid and carbonyl compounds in mild conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 9, 3761-3766.

Puig, P. (1984). Sal y Alimentación: Un absurdo desbarajuste. Ediciones Sirocco Sociedad Anónima, Barcelona, España.

Poma, J.P. (1998). Le jambon sec et les petites salaisons. Ed. ERTI, Paris, 166p.

Reddy, K.A. y Marth, E.H. (1991). Reducing the Sodium Content in Foods: A review. *Journal of Food Protection*, 54, (2), 138-150.

Requena, J.R., Levine, R.L. y Stadtman, E.R. (2003). Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino Acids*, 25, 221-226.

Requena, J.R., Chao, C.-C., Levine, R.L., y Stadtman, E.R. (2001). Glutamic and amino adipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 69-74.

Rico, E., Toldrá, F. y Flores, J. (1991). Effect of dry-curing process parameters on pork muscle cathepsin B, H and L activity. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchungund-Forschung*, 193, 541-544.

Rosell, C.M. y Toldrá, F. (1996). Effect of curing agents on m-calpain throughout the curing process. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchungund-Forschung*, 203, 320-325.

Ruiz, J., García, C., Muriel, E., Andrés, A.I. y Ventanas, J. (2002a). Influence of sensory characteristics on the acceptability of dry-cured ham. *Meat Science*, 61, 347-354.

Ruiz J, Muriel, E. y Ventanas, J. (2002b). The flavour of Iberian ham. En: Research advances in the quality of meat and meat products. *Research Singpost*, Eds Toldrá, F. et al., (pp 290-309) Trivandrum, Kerala, India.

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

Ruusunen, M., Vainiopää, J., Lyly, M., Lähtenmäki, L., Niemistö, M., Ahvenainen, R. y Puolanne, E. (2005). Reducing the sodium content in meat products: The effect of the formulation in low-sodium ground meat patties. *Meat Science*, 69, 53-60.

Ruusunen, M., Vanionpaa, J., Puolanne, E., Lyly, M., Lahtenmaki, L., Niemisto, M. y Ahvenainen, R. (2003). Effect of sodium citrate, carboxymethyl cellulose and carrageenan levels on quality characteristics of low-salt and low-fat bologna type sausages. *Meat Science*, 64, (4), 371-81.

Sacks, F.M., Svetkey L.P., Vollmer, W.M., et al. (2001) DASH Collaborative Research Group: Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. *The new England Journal of Medicine*, 334, 3-10.

Sacks, F.M., Willett, W.C., Smith, A., Brown, L.E., Rosner, B. y Moore, T.J. (1998). Effect on blood pressure of potassium, calcium, and magnesium in women with low habitual intake. *Hypertension*, 31, (1), 131-138.

SACN (2003). Scientific Advisory Committee on Nutrition, Salth and Health. (2003). The Stationery Office. Available at http://www.sacn.gov.uk/pdfs/scan_salt_final.pdf. Accessed 22 March 2005.

Salminen, H., Estévez, M., Kivikari, R. y Heinonen, M. (2006). Inhibition of protein and lipid oxidation by rapessed, camelina and soy meal in cooked pork meat patties. *European Food Research and Technology*, 223, 461-468.

Salovaara, H. (1982). Sensory Limitations to Replacement of Sodium with Potassium and Magnesium in Bread. *American Association of Cereal Chemists*, 59 (5), 427-430.

Salih, A.M., Smith, D.M., Price, J.F. y Dawson, L.E. (1987). Modified extraction 2-thiobarbituric acid method for measuring lipid oxidation in poultry. *Poultry Science*, 66, 1483-1489.

Salovaara, H. (1982). Sensory Limitations to Replacement of Sodium with Potassium and Magnesium in Bread. *American Association of Cereal Chemists*, 59, (5), 427-430.

Sanceda, N., Suzuki, N., y Kuruta, K. (2003). Quality and sensory acceptance of fish sauce partially substituting sodium chloride or natural salt with potassium chloride during the fermentation process. *International Journal of Food Science and Technology*, 38, 435-443.

Santiago, S. y Cuervo, M. (2003). Productos para alimentación especial. En: Alimentos y Nutrición en la Práctica Sanitaria. Eds Astiasarán et al., pp 95-114. Ediciones Díaz de Santos, Madrid, España

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

Sárraga, C., Gil, M. y García-Regueiro, J.A. (1993). Comparison of Calpain and Cathepsin (B, L and D) Activities during Dry-cured Ham Processing from Heavy and Light Large White Pigs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62, 71-75.

Sárraga, C., Gil, M., Arnau, J., Monfor, J.M. y Cusso, R. (1989). Effect of Curing Salt and Phosphate on the Activity of Porcine Muscle Proteases. *Meat Science*, 25, (4), 241-249.

Schuchardt, J.P., Hahn, D. y Hahn, A. (2008). The nutritional physiological importance of calcium. *Wellness Foods Europe*, 3, 44-51.

Seki, T., Kawasaki, Y., Tamura, M., Tada, M. y Okai, H. (1990). Further study on the salty peptide ornithyl β -alanine. Some effects of pH and additive ions on the saltiness. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 38, 25-29.

Segura, R., Webb, S., Tovar, J.L. y Gausí, C. (2000). Importancia de la sal en la alimentación. Los minerales y la salud. Fundación Sal y Salud. Plaza & Janés Editores, Barcelona, España pp.279-336.

Seman, D.L., Olson, D.G. y Mandigo, R.W. (1980). Effect of reduction and partial replacement of sodium on bologna characteristics and acceptability. *Journal of Food Science*, 45, 1116-1121.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gattner, F.H., y Provenzano, M.D. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150, 76-85

Sentandreu, M.A., Coulis, G. y Ouali, A. (2002). Role of muscle

endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science & Technology*, 13: 400-421.

Sentandreu, M.A. y Toldrá, F. (2001a). Dipeptidyl peptidase IV from porcine skeletal muscle: purification and biochemical properties. *Food Chemistry* 75, (2) 159-68.

Sentandreu, M.A. y Toldrá, F. (2001b). Partial purification and characterisation of dipeptidyl peptidase II from porcine skeletal muscle. *Meat Science*, 57,(1), 93-103.

Sentandreu, M.A. y Toldrá, F. (2001c). Dipeptidyl peptidase activities along the processing of Serrano dry-cured ham. *European Food Research and Technology*, 213, 83-87.

Sentandreu, M.A. y Toldrá, F. (2000). Purification and biochemical properties of dipeptidyl peptidase I from porcine skeletal muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5014- 5022.

Sentandreu, M.A. y Toldrá, F. (1998). Biochemical properties of dipeptidyl peptidase III purified from porcine skeletal muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3977-3984.

Serra, X., Gou, P., Guerrero, L., Guàrdia, M.D., Picouet, P., Grébol, N., Monfort, J.M. y Arnau, J. (2006). Effect of high pressure on sensory properties of pasty hams. IUFoST, 13th World Congress of Food Science and Technology, 17-21 September 2006, Nantes, Francia.

SPSS (1999). SPSS for Windows: advanced statistic release, Chicago. SPSS.

Stadman, E.R y Levine, R.L. (2000). Protein Oxidation. *Annals New York Academy of Sciences*, 899, 1, 191-208.

Statgraphics® Plus 5.1. (1994-2001) for Statistical Graphics Corp. Warrenton, V.A. E.E.U.U.

Terrell, R.N. (1983). Reducing the Sodium Content of Processed Meats. *Food Technology*, 37, (7), 66-71.

Tobian, L. (1991). Salt and hypertension: lessons from animal models that relate to human hypertension. *Hypertension* 17, 52-58.

Toldrá, F., Aristoy, M.C. y Flores, M. (2009). Relevance of nitrate and nitrite in dry-cured ham and their effects on aroma development. *Grasas y Aceites*, 60, (3), 291-296.

Toldrá, F. y Barat, J.M. (2009). Recent patents for sodium reduction in foods. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 1, 80-86.

Toldrá, F. (2006a). Dry-cured ham. En: Handbook of Food Science Technology and Engineering, vol. 4, pp 164-1- 164-11. Ed: Y.H. Hui et al. CRC Press, Boca Raton, FL, E.E.U.U.

Toldrá, F. (2006b). The role of muscle enzymes in dry-cured meat products with different drying conditions. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 164-168.

Toldrá, F. (2003). Norma Europea de Aditivos: Implicaciones de la Reducción de Nitratos y Nitritos en el Jamón Curado. Proc. Congreso Mundial del Jamón, Teruel. pp. 129-134.

Toldrá, F. (2002). Dry-cured meat products. Trumbull, CT 06611 USA; Food & Nutrition Press INC.

Toldrá, F., Aristoy, M.C. y Flores, M. (2000). Contribution of muscle aminopeptidases to flavour development in dry-cured ham. *Food Research International*, 33, 181-185.

Toldrá, F. y Flores, M. (1998). The role of muscle proteases and lipases in flavour development during the processing of dry-cured ham. *Critical Reviews in Food Science*, 38, (4), 331-352.

Toldrá, F. (1998). Proteolysis and lipolysis in flavour development of dry-cured meat products. *Meat Science*, 49, (Suppl 1), S101-S110.

Toldrá, F., Rico, E. y 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, 157-161.

Toldrá, F., Miralles, M.C. y Flores, J. (1992). Protein extractibility in dry-cured ham. *Food Chemistry*, 44, 391-399.

Toldrá, F., y Etherington, D.J. (1988). Examination of Cathepsins B, D, H and L Activities in Dry-cured Hams. *Meat Science*, 23, 1-7.

Vandendriessche, F. (2005). Tecnologías centroeuropeas de elaboración de jamón curado. III Congreso Mundial del Jamón. Ed. Consejo Regulador de la Denominación de Origen "Jamón de Teruel", 192-212.

Vaskonen, T. (2003) Dietary minerals and modification of cardiovascular risk factors. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 14, 492-506.

Ventanas, S., Estévez, M, Andrés, A.I. y Ruiz, J. (2008). Analysis of volatile compounds of Iberian dry-cured loins with different intramuscular fat contents using SPME–DED. *Meat Science*, 79, 172-180.

Ventanas, S., Ventanas, J., Tovar, J., García, C. y Estévez, M. (2007). Extensive feeding versus oleic acid and tocopherol enriched mixed diets for the production of Iberian dry-cured hams: Effect on chemical composition, oxidative status and sensory traits. *Meat Science*, 77, 246-25.

Ventanas, S., Estévez, M., Tejada, J.F. y Ruiz, J. (2006a). Protein and lipid oxidation in *Longissimus dorsi* and dry-cured loin from Iberian pigs as affected by crossbreeding and diet. *Meat Science*, 72, 647-655.

Ventanas, S., Estévez, M., Delgado, C.L. y Ruiz, J. (2006b). 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, 665-675.

Ventanas, J., Ruiz, J. y Córdoba, J.J. (2001a). El jamón curado de cerdo Ibérico: descripción del proceso tradicional de elaboración. En: Tecnología del Jamón Ibérico: De los sistemas tradicionales a la explotación racional del sabor y el aroma. Ed. Ventanas, J. et al. pp 45-72. Ediciones Mundi Prensa, Madrid, España.

Ventanas, J. y Cava, R. (2001b). Dinámica y control del proceso de secado del jamón Ibérico en secaderos y bodegas naturales y en cámaras climatizadas. En Tecnología del jamón Ibérico de los Sistemas Tradicionales a la Explotación Racional del Sabor y el Aroma. Ed. Ventanas, J. et al. (pp. 255-291), Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España.

Ventanas, J., Córdoba, J.J., Antequera, T., García, C., López-Bote, C. y Asensio, M.A. (1992). Hydrolysis and Maillard reactions during ripening of Iberian ham. *Journal of Food Science*, 57, 4, 813-815.

Viljanen, K., Kylli, P., Kivikari, R. y Heinonen, M. (2004). Inhibition of protein and lipid oxidation in liposomes by berry phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7419-7424.

Weaver, C.M. (1998). Calcium in food fortification strategies. *International Dairy Journal*, 8, 443-449.

Whiting, H. y Jenkins, R.K. (1981). Partial substitution of sodium chloride by potassium chloride in frankfurter formulations. *Journal of food quality*, 4, 259-269.

Willians, A.A. y Langron, S.P. (1984). The use of free-choice profiling for the evaluation of commercial ports. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35, (5), 558-568.

Xiong, Y.L. (1997). Structure-Functionality relationship of muscle proteins. En: Food Proteins and their Applications. Eds. Damoradan, S. y Paraf, A. Capítulo 12, pp. 341-392. Marcel Dekker, Inc., New York, E.E.U.U.

Xiong, Y.L. y Decker, E.A. (1995). Alterations in muscle protein functionality by oxidative and antioxidative process. *Journal of Muscle Foods*, 6, 139-160.

Xiong, Y.L. y Brekke, C.J. (1991). Gelation properties of chicken myofibrils treated with calcium and magnesium chlorides. *Journal of Muscle Foods*, 2, 21-36.

DIFUSIÓN DE RESULTADOS

9. Difusión de Resultados

Hasta el momento el trabajo descrito ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

Armenteros, M., Aristoy, M.C. y Toldrá, F. (2009). Effect of sodium, potassium, calcium and magnesium chloride salts on porcine muscle proteases. **European Food Research and Technology**, 229, 93-98.

Armenteros, M., Aristoy, M.C., Barat, J.M. y Toldrá, F. (2009). Biochemical changes in dry-cured loins salted with partial replacements of NaCl by KCl. **Food Chemistry**, 117, 627-633.

Armenteros, M., Aristoy, M.C., Barat, J.M. y Toldrá, F. (2009). Biochemical and Sensory Properties of Dry-Cured Loins as Affected by Partial Replacement of Sodium by Potassium, Calcium, and Magnesium. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57, (20), 9699-9705.

Armenteros, M., Heinonen, M., Toldrá, F. y Estévez, M. (2009). Analysis of protein carbonyls in meat products by using the DNPH-method, fluorescence spectroscopy and liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry (LC-ESI-MS). **Meat Science**, 83, (1), 104-112.

ANEXOS

ANEXO 1

***“Effect of sodium, potassium, calcium and magnesium
chloride salts on porcine muscle proteases”***

Armenteros, M., Aristoy, M.C. y Toldrá, F.

European Food Research and Technology, 2009, 229, 93-98.

Effect of sodium, potassium, calcium and magnesium chloride salts on porcine muscle proteases

Mónica Armenteros · M-Concepción Aristoy · Fidel Toldrá

Received: 14 March 2008 / Revised: 21 January 2009 / Accepted: 29 January 2009 / Published online: 21 February 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract This study is focused on the effect of sodium chloride alternative salts (KCl, MgCl₂ and CaCl₂) on porcine muscle proteases (cathepsins, dipeptidylpeptidases and aminopeptidases). In general, KCl exerted a very similar effect to NaCl for all the studied enzymes, while the effect of divalent salts (CaCl₂ and MgCl₂) was more pronounced. Cathepsins, dipeptidyl peptidase III, dipeptidyl peptidase IV and alanyl aminopeptidase activities were strongly inhibited by all the chloride salts especially by divalent ones. Dipeptidyl peptidase II and leucyl aminopeptidase were little affected and methionyl aminopeptidase was only inhibited by divalent salts. Dipeptidyl peptidase I was strongly activated by low concentrations of the chloride salts except NaCl. Arginyl aminopeptidase was activated by NaCl and KCl and low amounts of MgCl₂, while CaCl₂ showed a strong inhibitory effect. This is very important as these enzymes play important roles in dry-cured meats and their activity is, in general, regulated by sodium chloride. Thus, reductions in the sodium concentration with subsequent increases of other alternative cations may have relevant consequences on enzyme activity that should be taken into account when processing dry-cured meats.

Keywords Muscle proteases · Enzyme inhibition · Sodium chloride · Potassium chloride · Magnesium chloride · Calcium chloride

M. Armenteros · M.-C. Aristoy · F. Toldrá (✉)
Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC),
P.O. Box 73, 46100 Burjassot, Valencia, Spain
e-mail: ftoldra@iata.csic.es

Introduction

Sodium chloride has been traditionally used in foods due to its different roles such as a preservative, salty taste and flavour enhancer. Sodium chloride is a typical ingredient in dry-cured meats. It gives a typical salty taste and reduction in water activity, but also affects the proteolysis and lipolysis phenomena during the processing of dry-cured meat products improving the product texture and contributing directly to flavour [1, 2]. Nevertheless, sodium intake exceeds the nutritional recommendations in many countries (maximum of 5–6 g/day), which is associated with an increase in blood pressure and consequently with an increased risk of stroke and cardiovascular diseases [3]. Therefore, there is a current trend towards the reduction of the content of salt (NaCl) in meat products [4]. Sodium reduction can be achieved either by lowering NaCl addition or by replacing it by other salts. Many compounds have been assayed to replace NaCl in cured meat products such as other chloride salts like KCl, MgCl₂, CaCl₂, phosphates or other substances like K-lactate or glycine [5]. The effect of the NaCl replacement on the sensory quality and microbiological stability of meat products has been studied. KCl has similar properties to NaCl, but its addition to meat products is limited (<40%) because it contributes to bitter tastes at higher content [6, 7]. The partial or total replacement of sodium chloride by MgCl₂ and CaCl₂ may have healthy and nutritional benefits although some effects on texture, metallic after taste, colour and microbiological stability have been reported in dry-fermented sausages [8, 9]. On the other hand, unpleasant flavours were also detected in dry-cured pork loin when NaCl was partially substituted by other substances like K-lactate and glycine [7].

The effect of salt reduction on the proteolytic and lipolytic enzyme systems in meat products has been studied

Anexo 2

***“Biochemical changes in dry-cured loins salted with
partial replacements of NaCl by KCl”***

Armenteros, M., Aristoy, M.C., Barat, J.M y Toldrá, F.

Food Chemistry, 2009, 117, 627-633 .



Biochemical changes in dry-cured loins salted with partial replacements of NaCl by KCl

M. Armenteros^a, M.C. Aristoy^a, J.M. Barat^b, F. Toldrá^{a,*}

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

^bInstituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 5 December 2008
Received in revised form 23 February 2009
Accepted 17 April 2009

Keywords:
Dry-cured loin
Sodium replacement
Potassium chloride
Proteolysis
Lipolysis
Sensory properties

ABSTRACT

The effect of partial replacement of NaCl by KCl in the dry-curing of loins has been evaluated by biochemical and sensory analysis of the final products. Endoproteolytic enzymes like cathepsins B and B+L appeared to be more active when more KCl and less NaCl were present in the curing salt while cathepsin H remained unaffected. Proteolysis was reflected by SDS-PAGE in the higher density of the sarcoplasmic proteins bands within the range 55.0–28.0 kDa. Alanyl aminopeptidase (AAP) was unaffected while arginyl and leucyl aminopeptidases were more activated by KCl. On the other hand, methionyl aminopeptidase and dipeptidylpeptidase I and III were more inhibited as KCl increased in the curing salt blends. The sensory analysis revealed no significant differences between control loins with 100% NaCl and those with up to 50% of KCl substitution. Furthermore, loins elaborated with 50% of each salt obtained the highest scores.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

During the last decades, several studies have linked high levels of sodium chloride (NaCl) intake with raised blood pressure, also known as hypertension (He & MacGregor, 2003; Obarzanek et al., 2003). This fact has promoted the current tendency to reduce sodium intake, in order to proportionally lower blood pressure levels and confer significant health benefits by contributing to a decreased risk of cardiovascular disease (Matthews & Strong, 2005). For these reasons, consumer demand for a variety of low-salt products, especially meat products has increased considerably (Russunen & Puolanne, 2005).

NaCl is an essential ingredient in processed meat products for its contribution to the water-holding capacity, prevention of microbial growth, reduction of water activity, facilitating the solubilisation of certain proteins and conferring a typical salty taste by enhancing the flavour of such food products. Moreover, salt affects some chemical and biochemical phenomena such as proteolysis, lipolysis and lipid oxidation which contribute to the development of texture and typical flavour in meat products (Andrés, Cava, Ventanas, Muriel, & Ruiz, 2004; Guàrdia, Guerrero, Gelabert, Gou, & Arnau, 2006; Toldrá, 2006a). Nevertheless, consumers are demanding lower sodium chloride content in meat products (Gou, Guerrero, Gelabert, & Arnau, 1996; Guàrdia et al., 2006;

Russunen & Puolanne, 2005). However, sodium chloride must be reduced without altering the curing process. In this sense, main approaches are focused towards the reduction of the NaCl added or substitution with other salts like KCl, but these actions may require an alteration of the processing techniques. The reduction of the level of NaCl added has led to some problems such as an excess of proteolysis due to the intense action of endopeptidase enzymes resulting in defective textures like softness, and also exopeptidase enzymes which could overact on polypeptides and proteins generating excessive content of low molecular weight nitrogen compounds (peptides and free amino acids), which could lead to unpleasant flavour by enhancing the bitter and metallic tastes (Martín, Córdoba, Antequera, Timón, & Ventanas, 1998; Toldrá 1998; Toldrá, Aristoy, & Flores, 2000). Further, the decrease of salt content in meat products also seems to have a slight promoting effect on the lipolysis phenomena (Andrés, Cava, Martín, Ventanas, & Ruiz, 2005).

The partial substitution of NaCl by KCl appears to be the best alternative to reduce sodium content in meat products. Indeed both salts have similar properties and potassium intake has not been linked to the development of hypertension and cardiovascular diseases (Buemi et al., 2002; Geleijnse et al., 2007; Kimura et al., 2004), although its addition to meat products is mainly limited by its bitter and astringent taste (Reddy & Marth, 1991).

In this sense, numerous attempts have been made during the last decades by several researchers to develop acceptable low salt meat products using NaCl/KCl mixtures. Thus, curing salts with up

* Corresponding author. Tel.: +34 963900022; fax: +34 963636301.
E-mail address: ftoldra@ata.csic.es (F. Toldrá).

ANEXO 3

***“Biochemical and Sensory Properties of Dry-Cured Loins
as Affected by Partial Replacements of Sodium by
Potassium, Calcium, and Magnesium”***

Armenteros, M., Aristoy, M.C., Barat, J.M. y Toldrá, F.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57, 9699-9705.

Biochemical and Sensory Properties of Dry-Cured Loins as Affected by Partial Replacement of Sodium by Potassium, Calcium, and Magnesium

MÓNICA ARMENTEROS,[†] MARÍA-CONCEPCIÓN ARISTOY,[†] JOSÉ MANUEL BARAT,[‡] AND FIDEL TOLDRA^{*,†}

[†]Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), P.O. Box 73, 46100 Burjassot (Valencia), Spain, and [‡]Department of Food Technology, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

An attempt to decrease the NaCl content in dry-cured products through the use of three different salting treatments (I: 55% NaCl, 25% KCl, 15% CaCl₂, 5% MgCl₂; II: 45% NaCl, 25% KCl, 20% CaCl₂, 10% MgCl₂; and III: 30% NaCl, 50% KCl, 15% CaCl₂, 5% MgCl₂) in comparison to a control (I: 100% NaCl) was assayed to evaluate the biochemical and sensory characteristics in the final product. Most proteolytic enzyme activities from the loins submitted to the experimental salting treatments, especially treatments II and III, remained higher than those salted traditionally (control). The higher aminopeptidase activity was also reflected in a larger release of free amino acids. Finally, a sensory paired comparison test revealed that those loins salted with the treatment II were not significantly different from the loins salted traditionally (100% NaCl), so that this treatment could be successfully used for sodium reduction.

KEYWORDS: dry-cured loin; low sodium; low salt; potassium chloride; magnesium chloride; calcium chloride

INTRODUCTION

Sodium chloride is the main curing agent used in the manufacture of processed meats because it contributes to characteristic flavor and texture as well as improvement of shelf life and protein solubilization (1). Moreover, it is known that salt is also controlling the proteolytic and lipolytic phenomena inside the meat product. Indeed, salt has shown a strong inhibitory action on cathepsins and other proteases such as alanyl aminopeptidase (AAP) and also of neutral lipase and acid esterase (2–5). Hence, the use of low salt concentrations in meat products is difficult because it could lead to a defective texture in the final product, such as softness (6–8).

On the basis of the scientific information and following health recommendations, the meat industry is trying to develop low-salt products because meat products represent a relatively relevant part of the dietary sodium intake. Furthermore, the demand for low-salt-meat products by consumers is increasing in order to reduce the risk of cardiovascular diseases, such as hypertension, which is related to an excessive intake of sodium (9, 10).

Nowadays, different strategies have been attempted to reduce sodium content in meat products, mainly by replacing the NaCl with other chloride salts such as potassium chloride (KCl), magnesium chloride (MgCl₂), or calcium chloride (CaCl₂) (11–15). However, KCl, the most used NaCl substitute, imparts a bitter taste at high concentrations, and consequently, its

use is restricted (16). Indeed, the maximum level of NaCl that could be substituted in fermented sausages (17) and dry-cured loins (13) without imparting undesirable flavor and texture attributes was 40%. More recently, Armenteros et al. (11) have reported substitutions of up to 50% by KCl in dry-cured loin without affecting the sensory properties nor the proteolytic and lipolytic activity.

The substitution of Na⁺ by CaCl₂ and MgCl₂ salts may generate off-flavors (18, 19). Lately, Gimeno et al. (20) replaced sodium content with calcium ascorbate in dry-fermented sausages and obtained an acceptable product without affecting attributes such as texture and color. The majority of the studies carried out with divalent salts have focused on the fortification of food products such as yogurt, fruit juice, or even beef frankfurter with magnesium and particularly with calcium to provide an opportunity for increasing their dietary intake (21, 22). CaCl₂ has also been traditionally used in infusion, injection, or marination to improve meat tenderness (23). However, experimental studies conducted to examine the taste of these divalent cations in meat products have concluded that magnesium and calcium could lead to bitter tastes, off-flavors, or metallic and astringent sensations. Nevertheless, the presence of sodium chloride together with these cations could suppress these unpleasant tastes, especially bitterness (24, 25).

The main objective of this work is to reduce the sodium content in dry-cured loin by partial substitution with a mixture of calcium and magnesium chlorides in addition to potassium chloride without affecting the biochemical and sensory properties of the product.

*To whom correspondence should be addressed. Phone: +34963990022. Fax: +34963636301. E-mail: ftoldra@iata.csic.es.

ANEXO 4

***“Analysis of protein carbonyls in meat products by using
the DNPH-method, fluorescence spectrosopy and liquid
chromatography-elctrospray ionisation-mass
spectrometry (LC-ESI-MS)”***

Armenteros, M., Heinonen, M., Toldrá, F. y Estévez, M.

Meat Science, 2009, 83, (1), 104-112.



Analysis of protein carbonyls in meat products by using the DNPH-method, fluorescence spectroscopy and liquid chromatography–electrospray ionisation–mass spectrometry (LC–ESI–MS)

M. Armenteros^a, M. Heinonen^b, V. Ollilainen^b, F. Toldrá^a, M. Estévez^{b,*}

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

^b Department of Food Technology, Meat Technology, University of Helsinki, Latokartanokaari 11, 00014 Helsinki, Finland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 December 2008
Received in revised form 20 March 2009
Accepted 6 April 2009

Keywords:

Protein oxidation
DNPH
Spectrofluorometry
LC–ESI–MS
 α -Aminoaliphatic semialdehyde
 γ -Glutamic semialdehyde
Meat products

ABSTRACT

Liquid chromatography–electrospray ionisation–mass spectrometry (LC–ESI–MS) was applied as an advanced methodology to study the suitability of using α -aminoaliphatic semialdehyde (AAS) and γ -glutamic semialdehyde (GGS) as protein oxidation markers in meat products. The results obtained were compared to those obtained by using the DNPH-method and fluorescence spectroscopy for the analysis of protein carbonyls. Lipid oxidation was also investigated in order to elucidate the relationship between lipid and protein oxidation measurements. Both semialdehydes were originally detected in a food system which proves that lysine, arginine and proline are degraded as a result of oxidative reactions to yield AAS and GGS in meat products. A lack of consistency was observed between the MS results for AAS and GGS and the values obtained by the DNPH-method and the fluorescence spectroscopy. Unlike the last two methods, AAS and GGS measurements have proved to be unaffected by the composition or the structure of the food matrix providing precise information about the fate of particular amino acids during processing of muscle foods. These semialdehydes, and particularly GGS, could be used as indicators of protein oxidation in meat products like TBARS numbers are commonly used as lipid oxidation markers. In fact, a significant correlation was found between GGS values and TBARS highlighting the timely interaction between lipid and protein oxidation.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

During the last decades, most of the studies carried out on protein oxidation have been conducted to examine the role played by oxidized proteins in a variety of human diseases whereas the occurrence of protein oxidation in food systems has been largely unknown (Elias, Kellerby, & Decker, 2008). Only few studies have recently tried to shed light on the influence of meat origin and industrial processing conditions on the occurrence and intensity of protein oxidation in meat products (Estévez, Ventanas, & Cava, 2005; Lund, Lametsch, Hviid, Jensen, & Skibsted, 2007; Salminen, Estévez, Kivikari, & Heinonen, 2006; Ventanas, Ventanas, Tovar, García, & Estévez, 2007). Muscle proteins are susceptible to oxidative reactions caused by different oxidation initiators like oxidizing lipids, metal ions, and other pro-oxidants generated during meat processing (Estévez, Kylli, Puolanne, Kivikari, & Heinonen, 2008a; Xiong & Decker, 1995). Amino acid residues are modified as a direct consequence of the oxidative damage leading to the loss of

sulphydryl groups, the generation of oxidized derivatives such as protein carbonyls and the formation of cross-links and aggregates (revised by Estévez, Morcuende, and Ventanas (2008b)). The oxidation of myofibrillar proteins has an impact on the nutritional value of meat as it involves the loss of essential amino acids and decreases protein digestibility (revised by Xiong, 2000). Furthermore, the development of protein oxidation in meat systems has been related to colour and texture deterioration (Estévez et al., 2005) whereas the precise chemical mechanisms are not well understood. In view of the lack of knowledge of the chemical effects on protein oxidation, there is a factual need to investigate the fate of oxidizing proteins in muscle foods during handling, processing and storage. In order to fulfil this objective, it is essential to develop suitable advanced analytical procedures.

So far, the analytical procedures used in biomedical sciences for quantifying protein carbonyls, have also been extrapolated and commonly used in muscle food systems. Amongst them, the 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH)-method (Oliver, Ahn, Moerman, Goldstein, & Stadtman, 1987) has become a widespread and routine procedure for evaluating protein oxidation in a large variety of muscle foods including raw meat, meat emulsions and dry-cured products (Estévez & Cava, 2004; Lund et al., 2007; Ventanas, Estévez, Tejada, & Ruiz, 2006a). By using this method,

* Corresponding author. Address: Applied Chemistry and Microbiology, Food Chemistry Division, University of Helsinki, Finland. Tel.: +358 9 191 58280; fax: +358 9 19158475.

E-mail address: mario.estevez@helsinki.fi (M. Estévez).

