

DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA, SALUD  
PÚBLICA

CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS  
AROMÁTICOS EN EMBUTIDOS CRUDOS CURADOS Y  
ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN A SU  
GENERACIÓN

AURORA MARCO CELDRÁN

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2007

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 30 de Maig de 2007 davant un tribunal format per:

- D. Jordi Mañes Vinuesa
- D. Lorenzo de la Hoz Perales
- D. José Antonio García Regueiro
- D. Jorge Ruiz Carrascal
- D<sup>a</sup>. María Jesús Lagarda Blanch

Va ser dirigida per:

D<sup>a</sup>. Mónica Flores LLovera

©Copyright: Servei de Publicacions  
Aurora Marco Celdrán

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6886-2

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115



Facultat de Farmàcia  
Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Ciències de  
l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal



Institut d'Agroquímica i Tecnologia d'Aliments (IATA, CSIC)  
Departament de Ciència dels Aliments

**CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS  
AROMÁTICOS EN EMBUTIDOS CRUDOS  
CURADOS Y ESTUDIO DE LOS FACTORES  
QUE AFECTAN A SU GENERACIÓN**

**TESI DOCTORAL:**

**Presentada per:  
AURORA MARCO CELDRÁN**

**Dirigida per:  
Dra. MÓNICA FLORES LLOVERA  
Dr. JOSÉ LUIS NAVARRO FABRA**

**València, 2007**



MINISTERIO  
EDUCACIÓN  
CIENCIA

DE  
Y



CONSEJO SUPERIOR DE  
INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS

INSTITUTO DE AGROQUÍMICA  
Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

MÓNICA FLORES LLOVERA, DOCTORA EN FARMACIA Y CIENTÍFICO TITULAR Y JOSÉ LUIS NAVARRO FABRA, DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS E INVESTIGADOR CIENTÍFICO, AMBOS DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS EN EL INSTITUTO DE AGROQUÍMICA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

HACEN CONSTAR: Que el trabajo de Investigación, titulado:

“Caracterización de los Compuestos Aromáticos en Embutidos Crudos Curados y Estudio de los Factores que Afectan a su Generación”, realizado por la Licenciada **D<sup>a</sup>. AURORA MARCO CELDRÁN**, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Ciencia de Alimentos de este instituto, reuniendo las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

En Paterna, a 11 de Diciembre de 2006

Dra. Mónica Flores Llovera

Dr. José Luis Navarro Fabra

Direc. Postal: APARTADO CORREOS, 73  
46100 BURJASSOT (VALENCIA)

Domicilio Social: POLÍGONO LA COMA, S/N  
46980 PATERNA (VALENCIA)

TEL: +34 96 390 00 22

FAX: +34 96 363 63 01

Sitio Web: <http://www.iata.csic.es>

The most exciting phrase to hear in science,  
the one that heralds new discoveries,  
is not 'Eureka!' but 'That's funny...'

Isaac Asimov

A mon pare, a ma mare,  
al meu home i al meu germà.

## **AGRAÏMENTS:**

Vull agrair en primer lloc a la Dra. Mónica Flores Llovera i al Dr. José Luis Navarro Fabra, directors d'aquesta tesi, la seua orientació i recolzament, perquè sense la seua dedicació, consells i ajuda no haguera sigut possible la realització d'aquest treball. D'altra banda, la realització d'aquesta tesi ha sigut possible gràcies a la concessió d'una beca predoctoral del programa I3P del CSIC i el Ministeri d'Educació i Ciència. Els treballs presentats en ella s'ha finançat amb el projecte AGL2005-00713 del Ministeri d'Educació i Ciència i l'ajuda GV05/067 per a grups emergents de la Generalitat Valenciana.

Un agraïment molt especial al panell de catadors de l'experiència de l'olfactometria: Mónica Flores, Josep Vicent Forment, José Luis Navarro, Alberto Muñoz, María Pérez i Juan Antonio Tamayo, perquè sense la seua ajuda invaluable i la seua paciència, una part molt important d'aquesta tesi no s'hauria pogut realitzar. I també a tots els companys que han passat per la sala de cates per a les probes de preferència dels embotits.

Al Dr. José Flores per els ànims constants i el seu interès en la evolució del meu treball.

A Perdo Lorenzo per la seua inestimable ajuda en la fabricació dels embotits. A M<sup>a</sup> Pilar Valero, Pablo Nieto, Amparo Feria, Maribel Nadal i Carmen Laosa per la seua valuosa ajuda i consells en la realització del

anàlisis químics. A M<sup>a</sup> Angeles García per conèixer les respostes a la majoria dels meus dubtes administratius.

A tots els meus companys del laboratori que m'han donat la seua amistat i recolzament en els moments més durs: Miguel Ángel, Leticia, Manolo, Mónica, María, Delia, Julia, Tomás, Merche, Sergio i Asun. A tots els altres companys: Quique, Ana Rosa, Josep Vicent, Beatriz, Berta, Leire i Santi , que han compartit el camí i m'han animat en moments difícils.

A Olga, Mayte i Lourdes per ser per a mi com germanes i estar disponibles per a escoltar els meus dubtes, ajudar-me a prendre decisions i recolzar-me incondicionalment.

A Andy, per tindre tanta paciència i aguantar els nervis dels últims mesos.

Als meus pares per el seu recolzament, per fer-me continuar i per permetrem decidir.

A Marcel lí del Olmo i Emilia Matallana per confiar en mi.

A tots vosaltres que ho esteu llegint.

---

## **ABREVIATURAS:**

**AGL:** Ácidos grasos libres

**AGMI:** Ácidos grasos mono insaturados

**AGPI:** Ácidos grasos polinsaturados

**AGS:** Ácidos grasos saturados

**CAR:** Carboxen

**CG:** Cromatógrafo de gases

**CG-MS:** Cromatógrafo de gases con espectrómetro de masas

**CG-O:** Cromatografía de gases con olfatometría

**DVB:** Divinilbenceno

**FD:** Frecuencia de detección

**FL:** Fosfolípidos

**HCR:** Hidrocarburo ramificado

**HCA:** Hidrocarburo aromático

**HR:** Humedad relativa

**HS-SPME:** Micro-extracción en fase sólida del espacio de cabeza

**IK:** Índice de Kovats



**MA:** Malonaldehído

**MHE:** Extracción múltiple del espacio de cabeza

**MS:** Espectrómetro de masas.

**ms:** Materia seca

**PDMS:** Polidimetilsiloxano

**P/S:** Relación AGPI/AGS

**SPME:** Micro-extracción en fase sólida

**SIM:** Monitorización del ion seleccionado

**TBARS:** Sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico

**TG:** Triglicéridos

**UA:** Unidades de área

---

## ÍNDICE DE CONTENIDOS:

1. Introducción.....	18
2. Objetivos .....	27
3. CAPÍTULO I. Extracción de Compuestos Volátiles de Embutidos Crudos Curados Mediante la Técnica de Micro-Extracción en Fase Sólida (SPME).....	29
3.1. Introducción .....	29
3.2. Materiales y Métodos.....	32
3.2.1 Fabricación de los Embutidos .....	32
3.2.2 Fibras SPME .....	33
3.2.3 Extracción de los Compuestos Volátiles.....	33
3.2.4 Identificación y Cuantificación de los Compuestos Volátiles.....	34
3.3. Resultados y Discusión.....	35
4. CAPÍTULO II: Efecto del Nitrito y el Nitrato en las Características Microbianas, Químicas y Sensoriales de los Embutidos Crudos Curados.....	50
4.1. Introducción .....	50
4.2. Materiales y Métodos.....	52
4.2.1 Fabricación de los Embutidos y Toma de Muestra.....	52
4.2.2 Análisis Microbiológico .....	53
4.2.3 Análisis Químicos (pH, humedad, TBARS, nitrato y nitrito).....	54
4.2.4 Análisis de Lípidos.....	55
4.2.5 Análisis de los Compuestos Volátiles .....	57

4.2.6	Análisis Sensorial .....	57
4.2.7	Análisis Estadístico.....	58
4.3.	Resultados y Discusión.....	58
4.3.1	Análisis Microbiológico .....	58
4.3.2	pH, humedad y TBARS.....	60
4.3.3	Nitritos y Nitratos .....	62
4.3.4	Lípidos.....	64
4.3.5	Compuestos Volátiles .....	70
4.3.6	Análisis Sensorial .....	87
5.	CAPÍTULO III: Efecto de la Etapa de Fermentación y la Adición de Diferentes Sales de Curado en la Calidad Sensorial de Embutidos Crudos Curados.....	90
5.1.	Introducción .....	90
5.2.	Materiales y Métodos.....	92
5.2.1	Fabricación de los Embutidos y Toma de Muestra.....	92
5.2.2	Análisis Microbiológico .....	93
5.2.3	Análisis Químicos.....	93
5.2.4	Compuestos Volátiles .....	93
5.2.5	Análisis Sensorial .....	94
5.2.6	Análisis Estadísticos .....	94
5.3.	Resultados y Discusión.....	95
5.3.1	Análisis Microbiano.....	95
5.3.2	Análisis Químicos.....	95
5.3.3	Compuestos Volátiles .....	101
5.3.4	Análisis Sensorial .....	114

6.	CAPÍTULO IV: Identificación y Cuantificación de los Compuestos Aromáticos Activos Presentes en los Embutidos Crudos Curados.....	116
6.1.	Introducción .....	117
6.2.	Materiales y Métodos .....	120
6.2.1	Reactivos y Estándares .....	120
6.2.2	Fabricación de los Embutidos .....	121
6.2.3	Extracción y Análisis de los Compuestos Volátiles.....	121
6.2.4	Olfatometría (Frecuencia de Detección).....	122
6.2.5	Cuantificación de los Compuestos Aromáticos Activos por Micro-Extracción Múltiple en Fase Sólida del Espacio de Cabeza.....	123
6.2.6	Análisis Estadístico.....	127
6.3.	Resultados .....	127
6.3.1	Frecuencia de Detección .....	127
6.3.2	HS-SPME Múltiple.....	134
6.4.	Discusión.....	139
7.	Conclusiones .....	145
8.	Bibliografía .....	149
9.	Anexos .....	164
9.1	<i>Food Chemistry</i> , 2006: 84, 663-641 .....	165
9.2.	<i>Meat Science</i> , 2004: 73, 660-673 .....	174
9.3.	<i>Eur. Food Res. Technol.</i> , 2007: en prensa .....	188
9.4.	<i>J. Agric. Food Chem.</i> , 2007: 55, 3058-3065.....	198

---

## ÍNDICE DE FIGURAS:

<b>Figura 1.1.</b> Factores que afectan el aroma y el sabor de los embutidos crudos curados .....	21
<b>Figura 3.1.</b> Cromatograma de los compuestos volátiles de embutido crudo curado obtenido por SPME-CG-MS en espacio de cabeza por extracción con la fibra de SPME 75 $\mu\text{m}$ CAR/PDMS durante 3 h a 30 $^{\circ}\text{C}$ .....	36
<b>Figura 3.2.</b> Cromatograma de los compuestos volátiles de embutido crudo curado obtenido por SPME-CG-MS en espacio de cabeza por extracción con la fibra de SPME 50/30 $\mu\text{m}$ DVB/CAR/PMDS durante 3 h a 30 $^{\circ}\text{C}$ .....	37
<b>Figura 3.3.</b> Perfil de adsorción en función del tiempo del total de compuestos volátiles extraídos del embutido crudo curado utilizando diferentes fibras de SPME.....	42
<b>Figura 3.4.</b> Perfiles de adsorción en función del tiempo de los compuestos volátiles de embutido crudo curado utilizando diferentes fibras de SPME: (A) Alcoholes con DVB/CAR/PDMS, (B) Alcoholes con CAR/PDMS, (C) Aldehidos con DVB/CAR/PDMS, (D) Aldehidos con CAR/PDMS, (E) Cetonas con DVB/CAR/PDMS y (F) Cetonas con CAR/PDMS .....	46

**Figura 3.5.** Perfiles de adsorción en función del tiempo de los compuestos volátiles de embutido crudo curado utilizando diferentes fibras de SPME: (A) Ésteres de etilo con DVB/CAR/PDMS, (B) Ésteres de etilo con CAR/PDMS, (C) Ácidos con DVB/CAR/PDMS y (D) Ácidos con CAR/PDMS.....47

**Figura 4.1.** Población de estafilococos y bacterias lácticas durante el proceso de fermentación y secado de los embutidos crudos curados ..... 59

**Figura 4.2.** Evolución del pH y el contenido en humedad medidos durante el proceso de maduración de los embutidos crudos curados ..... 61

**Figura 4.3.** Niveles de TBARS medidos durante el proceso de maduración de embutidos crudos curados fabricados con nitrito y nitrato ..... 62

**Figura 4.4.** Evolución del contenido en nitrito (a) y nitrato (b) medidos durante el proceso de maduración de embutidos crudos curados..... 63

**Figura 4.5.** Área total de los compuestos volátiles de embutidos crudos curados procedentes de la auto-oxidación lipídica extraídos a lo largo del proceso de maduración por la técnica de SPME en el espacio de cabeza ..... 80

- 
- Figura 4.6.** Área total de los compuestos volátiles de embutidos crudos curados procedentes del metabolismo bacteriano extraídos por la técnica de SPME del espacio de cabeza ..... 82
- Figura 5.1.** Población de bacterias lácticas (a) y estafilococos (b) durante el proceso de secado y maduración de los embutidos crudos curados ..... 96
- Figura 5.2.** Evolución del pH durante el proceso de secado y maduración de los embutidos crudos curados ..... 97
- Figura 5.3.** Evolución del contenido en nitrito (a) y nitrato (b) durante el proceso de maduración de los embutidos crudos curados..... 99
- Figura 5.4.** Niveles de TBARS medidos durante el proceso de maduración de los embutidos crudos curados ..... 101
- Figura 5.5.** Área total de los compuestos volátiles extraídos de los embutidos crudos curados por SPME del espacio de cabeza, agrupados según su origen..... 109
- Figura 6.1.** Regiones aromáticas descritas en el perfil cromatográfico obtenido por CG-FID de embutidos crudos curados..... 131
- Figura 6.2.** Aromagrama del espacio de cabeza de embutidos crudos curados fabricados con nitrito o nitrato y sometidos a fermentación lenta ..... 132

**Figura 6.3.** Cromatogramas de las cuatro extracciones sucesivas realizadas por HS-SPME múltiple de un embutido crudo curado.....135

**Figura 6.4.** Disminución exponencial del área del acetato de etilo en cuatro extracciones sucesivas realizadas por HS-SPME múltiple de un embutido crudo curado.....137



---

## ÍNDICE DE TABLAS:

<b>Tabla 1.1.</b> Principales ventajas e inconvenientes de los métodos de extracción de compuestos volátiles .....	23
<b>Tabla 1.2.</b> Principios, ventajas e inconvenientes de las técnicas olfatométricas empleadas para evaluar la intensidad de los compuestos aromáticos activos en alimentos .....	24
<b>Tabla 3.1.</b> Compuestos volátiles de embutidos crudos curados extraídos por SPME del espacio de cabeza después de 3 h de extracción a 30 °C con diferentes fibras (50/30 µm DVB/CAR/PDMS y 75 µm CAR/PDMS).....	39
<b>Tabla 4.1.</b> Concentración de ácidos grasos libres generada durante el proceso de secado y envasado a vacío de los embutidos crudos curados .....	66
<b>Tabla 4.2.</b> Concentración de ácidos grasos de fosfolípidos medida durante el proceso de secado y envasado a vacío de los embutidos crudos curados.....	67
<b>Tabla 4.3.</b> Concentración de ácidos grasos de triglicéridos medida durante el proceso de secado y envasado a vacío de los embutidos crudos curados.....	68
<b>Tabla 4.4.</b> Compuestos volátiles cuantificados en los embutidos crudos curados durante el proceso de secado y envasado a vacío.....	72

<b>Tabla 4.5.</b> Análisis sensorial (test de preferencia) de los embutidos crudos curados a los 105 días de proceso .....	87
<b>Tabla 5.1.</b> Compuestos volátiles identificados y cuantificados en los embutidos crudos curados por SPME del espacio de cabeza.....	102
<b>Tabla 5.2.</b> Compuestos volátiles de los embutidos crudos curados a los 111 días de maduración extraídos por SPME del espacio de cabeza .....	106
<b>Tabla 5.3.</b> Análisis sensorial (test de preferencia) de embutidos crudos curados a los 111 días del proceso de maduración.....	114
<b>Tabla 6.1.</b> Ion seleccionado para la cuantificación de cada compuesto volátil en el modo SIM y concentración del estándar preparado para la calibración por estándar externo.....	126
<b>Tabla 6.2.</b> Compuestos aromáticos activos identificados en el embutido crudo curado con fermentación lenta, cuantificados por HS-SPME múltiple .....	128
<b>Tabla 6.3.</b> Pendiente y coeficiente de correlación de la disminución exponencial del área del compuesto volátil obtenida por HS-SPME múltiple a partir de embutidos crudos curados con fermentación lenta y diferentes sales de curado y de las disoluciones de estándares.....	1138

## INTRODUCCIÓN

---

---

## 1. Introducción

El curado es una técnica de conservación ampliamente utilizada desde la antigüedad para prolongar la vida útil de los alimentos. La fabricación de embutidos crudos curados es importante económicamente en muchos países, entre ellos España, donde en el año 2005 el 6 % de 3 millones de toneladas anuales de carne de porcino se destinaron a la producción de embutidos crudos curados, de las cuales el 11 % se destinó a la exportación (AICE). Las necesidades de tiempo y energía que requiere el proceso de secado contribuyen en gran medida al coste total de la producción de embutidos crudos curados. Por ello, acelerar este proceso resultaría en una reducción del tiempo de almacenamiento y por tanto, en el incremento del margen de beneficios y la competitividad del producto final. Ésta es la razón por la cual, en la fabricación de embutidos crudos curados de gran calibre, el método tradicional (fermentación lenta) ha sido reemplazado por un proceso industrial más corto (fermentación rápida). Sin embargo, este proceso corto causa pérdidas en las características sensoriales típicas de este producto cárnico, principalmente debido a la aparición de un intenso aroma y sabor ácidos (Flores y Bermell, 1996).

Los procesos de curado son diferentes en las distintas regiones europeas (Flores, 1997). En el norte de Europa, los procesos de maduración son cortos, sólo se usa nitrito como agente de curado y van acompañados de un proceso de ahumado. En cambio, en la cuenca mediterránea, los

tiempos de maduración son más largos, se usan indistintamente nitrito y nitrato como agentes de curado, y generalmente no se aplica ahumado.

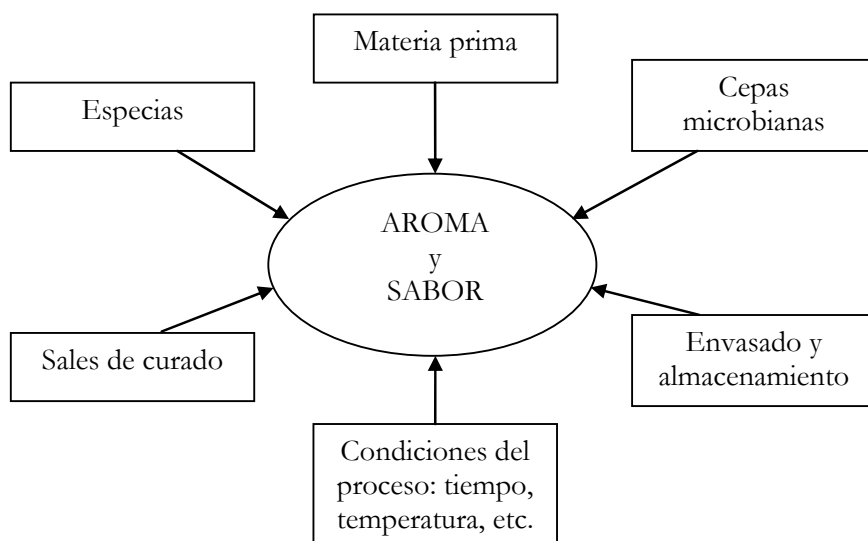
El efecto que produce el nitrito en los productos curados ha sido ampliamente estudiado y se puede resumir en los siguientes cambios: formación del color rojo característico; inhibición del crecimiento y formación de la toxina de *Clostridium botulinum*; contribución al desarrollo del aroma típico a producto cárnico curado; y retraso del enranciamiento por oxidación (Flores y Toldrá, 1993). Por otro lado, el nitrato es necesario en procesos de curado largos para que actúe como un reservorio de nitrito por medio de la actividad del enzima nitrato reductasa presente en los estafilococos (Toldrá, 2005). Además, el uso de nitrato es interesante porque mejora el aroma final comparado con el uso de nitrito (Wirth, 1991).

Sin embargo, el consumo elevado de nitritos representa un riesgo para la salud humana debido a sus posibles efectos alergénicos, efectos vasodilatadores, producción de metamioglobina *in vivo* y la producción de nitrosaminas carcinogénicas (Cammack *et al.*, 1999). Debido a este riesgo biológico, algunos gobiernos han pedido a la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2003) que proponga la reducción los niveles permitidos de adición para el nitrito y el nitrato. El riesgo asociado a la ingestión de nitrato no es otro que el producido por su reducción a nitrito a nivel intestinal. Cabe destacar el hecho de que algunos vegetales tienen concentraciones naturales de nitrato diez veces mayores que la cantidad permitida en productos cárnicos. Además,

debido al bajo pH y a las pequeñas cantidades de nitrito y nitrato adicionadas a los productos curados, el riesgo de producción de nitrosaminas es mínimo (Honikel, 2005).

En resumen, aunque existen diversos estudios sobre los efectos del nitrito y el nitrato en las características químicas y sensoriales de embutidos crudos curados; no está claro cual es su efecto individual ni como afecta el proceso de fermentación a los cambios que estas sales de curado provocan en la matriz cárnica.

El aroma es una característica muy importante en la calidad global de los embutidos crudos curados, siendo éste aroma completamente diferente al de la carne procesada mediante tratamiento térmico. Generalmente, el aroma de los embutidos crudos curados se debe en parte a la naturaleza y cantidad de las especias usadas en el embutido (pimienta, ajo y otros) (Meynier *et al.*, 1999). Además, el uso de especias depende de la localización geográfica y de la tradición de cada lugar. Sin embargo, existen reacciones y rutas metabólicas en la matriz que juegan un papel importante en el aroma global del embutido, como es el caso de la oxidación lipídica y las reacciones de esterificación producidas por el metabolismo microbiano (Stahnke, 1994; Stahnke, 1995c) e incluso, el catabolismo de los aminoácidos y la fermentación de carbohidratos (Ordóñez *et al.*, 1999; Toldrá *et al.*, 2001). Estas rutas de generación se ven afectadas por un gran número de parámetros (ver **figura 1.1**).



**Figura 1.1.** Factores que afectan el aroma y el sabor de los embutidos curados.

Con el fin de identificar las posibles estrategias para potenciar el aroma y mejorar así la calidad sensorial de los embutidos; es necesario, por un lado, desarrollar técnicas que nos permitan caracterizar el perfil de compuestos volátiles presentes en el embutido y observar los cambios que en él se producen; y por otro, identificar los compuestos volátiles de mayor impacto aromático en el aroma global del embutido. El estudio de los compuestos volátiles en embutidos curados se ha realizado principalmente por análisis del espacio de cabeza dinámico utilizando la técnica de purga y trampa (Berdagué *et al.*, 1993; Stahnke, 1994; Stahnke, 1995b; Viallón *et al.*, 1996; Edwards *et al.*, 1999; Bruna *et al.*, 2000a; Bruna *et al.*, 2000b; Bruna *et al.*, 2001a). La **tabla 1.1** recoge las principales ventajas e inconvenientes de los métodos de extracción de compuestos

volátiles. La microextracción en fase sólida (SPME) es una técnica de extracción desarrollada recientemente. En comparación con el análisis de purga y trampa, SPME ofrece las ventajas de no requerir una extensa preparación de la muestra, lo cual implica una reducción del tiempo de análisis; además es más barata y se ha demostrado su superioridad frente al análisis de purga y trampa, con respecto a la repetibilidad, ruido de fondo y contaminación de unas muestras a otras (Marsili, 1999). Sin embargo, la técnica de SPME no es una técnica de extracción extensiva, ya que durante el proceso de extracción se alcanza un equilibrio entre la matriz y la fase estacionaria que recubre la fibra (Zhang y Pawliszyn, 1993). Por tanto, esta técnica no permite la cuantificación absoluta de los compuestos volátiles, pero permite comparar cantidades relativas entre muestras cuando se utiliza exactamente las mismas condiciones de extracción (Roberts *et al.*, 2000). La técnica de SPME no se ha aplicado anteriormente a embutidos y por tanto es necesaria su optimización, respecto a la elección de tanto la fase estacionaria que permita analizar el mayor número posible de compuestos volátiles como de las condiciones óptimas de extracción.

Existe poca información disponible sobre los principales compuestos aromáticos responsables del aroma típico a curado de embutidos fermentados (Ramarathram, 1998). En la **tabla 1.2** se detalla un resumen de las técnicas olfatométricas (CG-O). Con el fin de detectar los compuestos aromáticos activos más potentes en embutidos crudos curados se ha aplicado el análisis por cromatografía de gases combinado con técnicas olfatométricas (Stahnke, 1994; Stahnke, 1995c; Meynier *et*



**Tabla 1.1.** Principales ventajas e inconvenientes de los métodos de extracción de compuestos volátiles (de Toldrá y Flores, 2004)

<b>MÉTODO</b>	<b>VENTAJAS</b>	<b>INCONVENIENTES</b>
<b><i>Técnicas de destilación y extracción con disolventes</i></b>		
Inyección directa (aceites esenciales y muestras acuosas)	Grandes cantidades de material para ser analizadas.	Ninguna de estas técnicas produce un extracto que sea cuantitativamente representativo de la composición del material inicial.
Extracción directa con disolventes	Posibilidad de extracción de componentes presentes en muy bajas cantidades	Posibilidad de formación de artefactos por procesos térmicos u oxidativos.
Destilación a vapor seguida de extracción con disolventes		
Destilación a vapor con extracción simultánea		
Extracción directa con disolventes de muestras sólidas		
Destilación de lípidos a alto vacío		
<b><i>Técnicas de análisis del espacio de cabeza</i></b>		
	Evita el uso de disolventes. Permite el análisis de compuestos de bajo peso molecular. Esta relacionado con el aroma nasal percibido	
Estático	Preparación de la muestra simple	Sólo se analiza una proporción del espacio de cabeza. Baja concentración de volátiles.
Dinámico (purga y trampa)	Mayor rendimiento del material a ser analizado.	Los tiempos para la recolección del espacio de cabeza son mayores. La adsorción depende del material que se use como adsorbente.
Microextracción en fase sólida (SPME)	Preparación de la muestra simple y rápida. Concentra los volátiles del espacio de cabeza.	La afinidad por los compuestos depende de la fibra usada. El perfil de compuestos volátiles depende de su naturaleza química y la naturaleza de la fibra.
<b><i>Desorción térmica directa (DTD)</i></b>	Fácil preparación de la muestra. Requerimientos de la muestra: pequeño tamaño, bajo contenido de humedad, homogeneidad.	Contaminación de unas muestras a otras.

**Tabla 1.2.** Principios, ventajas e inconvenientes de las técnicas olfatométricas empleadas para evaluar la intensidad de los compuestos aromáticos activos en alimentos.

<b>TÉCNICA</b>	<b>PRINCIPIO</b>	<b>VENTAJAS</b>	<b>INCONVENIENTES</b>
<b><i>Técnicas de Dilución</i></b>			
AEDA (Análisis de Dilución de Extractos Aromáticos)	Valor del umbral de detección en unidades FD (flavor dilution)	Bajo número de panelistas	Emplea mucho tiempo. Gran número de ensayos. Estimación inexacta de la importancia de las sustancias aromáticas
AECA (Análisis de Concentración de Extractos aromáticos)	Umbral de detección. El extracto se concentra en etapas por destilación del disolvente.	Previene pérdidas de sustancias aromáticas por evaporación o por reacciones secundarias potenciadas en el extracto concentrado	Emplea mucho tiempo. Gran número de ensayos.
DHDA (Análisis de Dilución de Espacio de cabeza Dinámico)	La dilución de la muestra se realiza por disminución sucesiva del tiempo de purga.	Sugiere volátiles adicionales. Ofrece una nueva perspectiva a los datos conseguidos por AEDA	Muy largo y laborioso
CHARM (Respuesta Aromática-Hedónica Combinada)	Áreas de pico del umbral de detección (valores CHARM) basados en la duración de la detección	Basado en el área del pico cromatográfico obtenido al representar el valor de la dilución frente al índice de retención.	Emplea mucho tiempo. Gran número de ensayos.
<b><i>Técnicas de Tiempo-Intensidad</i></b>			
OSME (olor en griego)	Intensidad del olor real.	Bajo número de inyecciones. Bajo número de panelistas, pero requiere entrenamiento específico para grabar intensidad y tiempo de cada compuesto.	Elevada variabilidad en y entre panelistas para las evaluaciones de intensidad. Dificultades para detectar, describir y registrar una intensidad aromática todo al mismo tiempo durante la elución del pico.
Modalidad cruzada coincidiendo con apertura de dedos	Intensidad del olor real.		
<b><i>Técnicas de Frecuencia de Detección</i></b>			
Frecuencia de Detección	Basado en la frecuencia de detección por los catadores y el tiempo de aparición del olor	Buena reproducibilidad	Elevado número de panelistas (6-20)

*al.*, 1999). Aunque únicamente algunos estudios han aplicado técnicas de dilución, como AEDA (análisis de dilución de extractos aromáticos) para cuantificar la intensidad del aroma (Schmidt y Berger, 1998a; Schmidt y Berger, 1998b; Blank *et al.*, 2001). Estas técnicas aportan información sobre la intensidad y el carácter aromático de los compuestos volátiles. En este sentido, sigue sin haber un consenso sobre cuales son los principales compuestos aromáticos responsables del aroma característico de los embutidos crudos curados.

En definitiva, las técnicas de extracción de compuestos volátiles pueden ser útiles para la industria cárnica, porque aportan información sobre las estrategias a seguir para potenciar la generación de determinados compuestos volátiles y atenuar la presencia de otros. A su vez, ofrecen una herramienta para definir el aroma de los embutidos y evaluar posibles estrategias para la normalización del producto. La información obtenida al aplicar el método olfatométrico de frecuencia de detección, puede resultar interesante para las industrias de saborizantes, por ejemplo, para el desarrollo de nuevos aromas para aperitivos.

En resumen, es importante determinar cuales son los principales compuestos volátiles responsables del aroma de los embutidos crudos curados y cuales son los efectos de las sales de curados y del tipo de fermentación sobre su generación.

## **OBJETIVOS**

---

---

## 2. Objetivos

- Desarrollar una metodología analítica adecuada para la extracción y análisis cualitativo y cuantitativo de los compuestos volátiles presentes en el espacio de cabeza de embutidos crudos curados.
- Determinar el efecto de la adición de nitritos y/o nitratos en procesos de fabricación tradicional e industrial, así como la relación de dichos efectos con la calidad sensorial y la generación de los compuestos volátiles de embutidos crudos curados.
- Estudiar los compuestos aromáticos activos responsables del aroma del embutido crudo curado y cuantificar dichos compuestos, para relacionarlos con las características sensoriales típicas del producto.

**CAPÍTULO I:**

**Extracción de Compuestos Volátiles de Embutidos Crudos  
Curados Mediante la Técnica de Micro-Extracción en Fase Sólida  
(SPME).**

*Food Chemistry*, 2004: 84 (4), 633-641

---

### **3. CAPÍTULO I. Extracción de Compuestos Volátiles de Embutidos Crudos Curados Mediante la Técnica de Micro-Extracción en Fase Sólida (SPME).**

#### ***3.1. Introducción***

El uso de la microextracción en fase sólida (SPME) para el análisis cuantitativo de compuestos volátiles se ha utilizado en una gran variedad de alimentos (Steffen y Pawliszyn, 1996). Sin embargo, en carnes y productos cárnicos, esta técnica se ha centrado en la determinación de productos de la oxidación lipídica (Nielsen *et al.*, 1997; Brunton *et al.*, 2000), y los compuestos volátiles de carne de cerdo cocinada (Elmore *et al.*, 2000) y jamón curado (Ruiz *et al.*, 1998; Gianelli *et al.*, 2002). Además, se ha evaluado el uso de SPME para el análisis de los metabolitos volátiles producidos por los estafilococos usados en la producción de embutidos curados (Vergnais *et al.*, 1998).

El estudio de los compuestos volátiles en embutidos crudos curados se ha realizado, principalmente, por análisis del espacio de cabeza dinámico utilizando la técnica de purga y trampa, tal como se indica en la introducción. En estos estudios, se empleó Tenax TA® como material adsorbente para la cuantificación de compuestos volátiles, aunque Stahnke (1994; 1995b) también utilizó tubos de carbón para su identificación. Generalmente, Tenax TA® es el polímero poroso de

elección para el análisis de compuestos aromáticos en espacio de cabeza dinámico por su estabilidad térmica, su relativa baja retención de agua y su bajo sangrado (Pillonel *et al.*, 2002). Es importante destacar que el volumen de compuestos que escapan de un material adsorbente es altamente dependiente del método de purga y otros parámetros experimentales. En este sentido, el Tenax TA® tiene una baja afinidad por compuestos de bajo peso molecular, es decir que compuestos muy volátiles como el etanol, 2-propanol, 2-metil-propanal y otros, escapan del Tenax TA® sin ser retenidos. Por eso, el perfil cuantitativo obtenido por el método de análisis de espacio de cabeza dinámico no se puede comparar con perfiles cuantitativos obtenidos bajo diferentes circunstancias, como ya indicó Stahnke (1994).

Tal como se expone en la introducción, la técnica de SPME ofrece ciertas ventajas respecto a otras técnicas de espacio de cabeza dinámico (Marsili, 1999). Sin embargo, las condiciones de extracción y la elección de la fase estacionaria que recubre la fibra pueden afectar los perfiles de compuestos volátiles que se obtengan, ya que las diferentes fases estacionarias tienen especial afinidad por compuestos volátiles con diferente naturaleza química. Por este motivo, Elmore *et al.* (1997), al comparar fibras de SPME con fase estacionaria simple (polidimetilxilosano (PDMS) o poliacrilato) con el método de espacio de cabeza dinámico, llegaron a la conclusión que el método de SPME no era recomendable para el análisis de trazas. Recientemente, el uso de fibras con fase estacionaria bipolar, que combinan fases selectivas como carboxen y/o divinilbenceno (DVB) con PDMS, se ha empleado para el



---

análisis de compuestos de bajo peso molecular con un elevado rendimiento de extracción de estos compuestos (Roberts *et al.*, 2000; Elmore *et al.*, 2000; Dufour *et al.*, 2001).

El aroma de embutidos curados se ha estudiado ampliamente, debido a la importancia de este producto cárnico; los estudios se han centrado en los mecanismos responsables de la generación de aromas (Ordóñez *et al.*, 1999) y en el análisis de los compuestos volátiles utilizando principalmente técnicas de espacio de cabeza (Berdagué *et al.*, 1993; Stahnke, 1994; Stahnke, 1995b; Stahnke, 1999; Meynier *et al.*, 1999; Edwards *et al.*, 1999; Bruna *et al.*, 2000a; Bruna *et al.*, 2000b; Bruna *et al.*, 2001a). En los embutidos crudos curados hay varios mecanismos que producen los compuestos responsables del aroma y sabor, como la hidrólisis y auto-oxidación de los lípidos, la proteólisis y transformación de los aminoácidos en compuestos aromáticos, aparte de las especias y otros condimentos que directamente afectan al aroma y sabor y modulan las reacciones de auto-oxidación (Ordóñez *et al.*, 1999). Por ello, en este estudio en la fabricación de los embutidos crudos curados, no se añadieron especias con el fin de evitar que sus compuestos aromáticos interfieran con los generados por procesos químicos o enzimáticos. Aunque se ha descrito el elevado impacto aromático que poseen las especias en el aroma final de los embutidos añadiendo notas características (Stahnke, 1995b), este trabajo se ha centrado en el proceso de optimización necesario para analizar los compuestos generados en los embutidos crudos curados.

El objetivo fue desarrollar y optimizar un procedimiento de microextracción en fase sólida, para la determinación cualitativa y cuantitativa de los compuestos volátiles presentes en embutidos crudos curados, usando diferentes fibras.

## ***3.2. Materiales y Métodos***

### **3.2.1 Fabricación de los Embutidos**

Se fabricaron embutidos con una masa cárnica a base de carne magra (80 %) y panceta (20 %) de cerdo. A la masa cárnica se adicionaron los siguientes aditivos en g/kg de mezcla: cloruro sódico (28), lactosa (10), dextrina (15), caseinato sódico (20), glucosa (7), ascorbato sódico (0,5), nitrito sódico (0,15) y nitrato potásico (0,20). Se pica la carne y la panceta utilizando una picadora con placa de orificios de salida de la masa de 6 mm de diámetro. Posteriormente, la masa obtenida se mezcló a vacío con los ingredientes restantes y se inoculó con un cultivo iniciador (SP-318, Rodia Iberia, grupo Rhône-Poulenc) que contenía *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus xylosus* y *Staphylococcus carnosus* y también con  $5 \cdot 10^6$  ufc/g de *Devaryomyces* spp. CECT 11815, repitiendo la etapa de amasado. Finalmente, la mezcla se embutió en tripas de colágeno (diámetro 75-80 mm) dando lugar a piezas de embutido de unos 500 g. Los embutidos se mantuvieron de 3 a 5 °C durante 24 h en una cámara de refrigeración. La etapa de fermentación se realizó a 24 °C y humedad relativa (HR) 90-80 % durante 12 h, entonces se disminuyó la temperatura a 20 °C y HR 90-80 % durante 12 h más. Finalmente, los embutidos se secaron a 10 °C y HR 90-75 % hasta el final del proceso de

maduración. El tiempo final del proceso de secado fue de 35 días, con pérdidas de peso del 45 %. Los embutidos se envasaron a vacío y se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el día del análisis.

### **3.2.2 Fibras SPME**

La extracción de los compuestos volátiles se realizó empleando un dispositivo de SPME (Supelco, Bellafonte, Pennsylvania, EEUU), utilizando fibras de  $75\text{ }\mu\text{m}$  carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) y  $50/30\text{ }\mu\text{m}$  divinilbenceno/carboxen/polidimetil-xilosano (DVB/CAR/PDMS). Antes del análisis, las fibras se acondicionaron en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases (CG) según lo indicado por el fabricante.

### **3.2.3 Extracción de los Compuestos Volátiles**

En cada experimento se pesaron 3 g de embutido picado y se introdujeron en un vial de espacio de cabeza de 10 ml sellado con un septum de PTFE/silicona (Supelco, Bellafonte, Pennsylvania, EEUU). El vial se atemperó a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 h en un termostato de bloque metálico (J. P. Selecta, Barcelona, España) para equilibrar su espacio de cabeza. La extracción de los compuestos volátiles se realizó exponiendo la fibra del SPME al espacio de cabeza durante diferentes tiempos (30 min, 90 min, 3 h, 5 h y 21 h) mientras se mantenía la temperatura a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Los compuestos adsorbidos por la fibra se identificaron y cuantificaron por análisis en CG usando un detector de espectrometría de masas (MS).

### 3.2.4 Identificación y Cuantificación de los Compuestos Volátiles

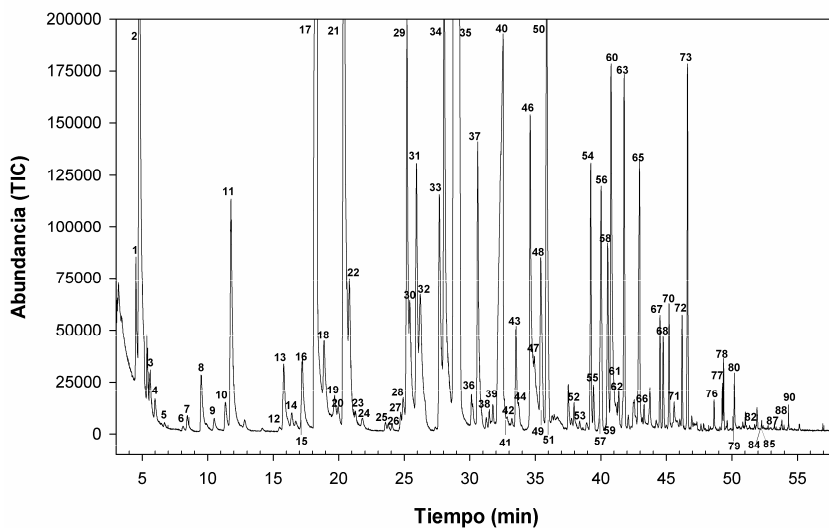
Los compuestos adsorbidos por la fibra se desorbieron en el puerto de inyección del CG (Hewlet Packard 5890 series II, Palo Alto, California, EEUU) durante 6 min a 220 °C con la válvula de purga cerrada (modo “splitless”). Los compuestos se separaron en una columna capilar DB-624 (J & W Scientific, 30 m, 0,25 mm d.i., grosor del film 1,4 µm). El CG estaba equipado con un detector selectivo de masas (HP 5972, Hewlet Packard, Palo Alto, California, EEUU). Se utilizó helio como gas portador a una velocidad lineal de 27,3 cm/s. El programa de temperatura del horno empezó cuando se introdujo la fibra en el inyector manteniendo el horno a 38 °C durante 13 min, la temperatura se incrementó hasta 110 °C a 3 °C/min, entonces se incrementó hasta 150 a 4 °C/min y hasta 210 °C a 10 °C/min y finalmente se mantuvo a 210 °C durante 5 min. El tiempo total del análisis fue de 58 min. La interfase del CG-MS se mantuvo a 240 °C. Los espectros de masas se obtuvieron por impacto electrónico a 70 eV y los datos se adquirieron en el rango de 29-400 uma.

Los compuestos se identificaron a través de sus espectros de masas por comparación con los contenidos en la librería NIST<sup>98</sup>; por comparación de los índices de retención de Kovats (Kovats, 1965) con los obtenidos para sustancias patrones y por comprobación de los IK con valores previamente publicados (Gianelli *et al.*, 2002; Flores *et al.*, 2004). La cuantificación se basó en el área del pico (en unidades de área arbitrarias) del cromatograma de iones totales o del cromatograma de un solo ion,

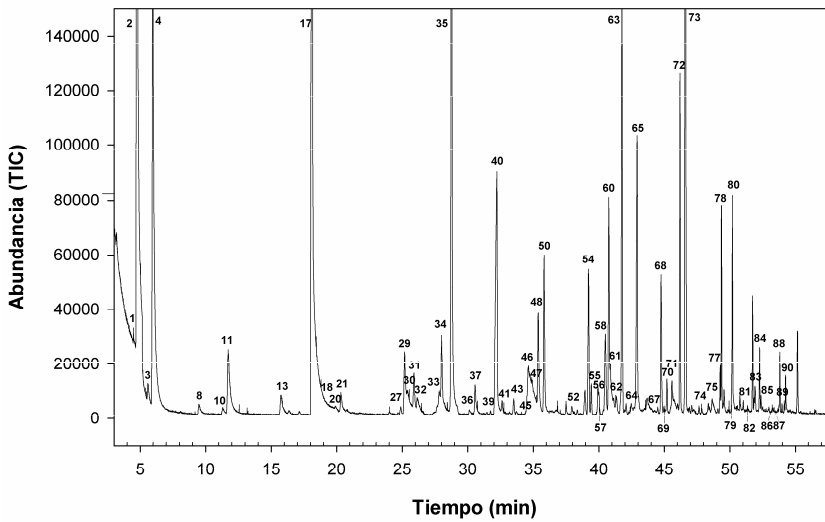
específico del compuesto, cuando los picos no se pudieron resolver completamente. Los resultados en cada punto experimental se expresaron como media de las tres repeticiones.

### ***3.3. Resultados y Discusión***

El análisis de compuestos volátiles en embutidos crudos curados a través de microextracción en fase sólida no ha sido previamente estudiado. La selección de la fibra apropiada depende de la naturaleza química de los compuestos volátiles a extraer y del alimento objeto del análisis. Muchos autores han caracterizado los compuestos volátiles presentes en embutidos crudos curados (Berdagué *et al.*, 1993; Stahnke, 1994; Stahnke, 1995; Viallón *et al.*, 1996; Bruna *et al.*, 2000a; Bruna *et al.*, 2000b; Sunesen, Dorigoni, Zanardi y Stahnke, 2001; Bruna *et al.*, 2001). En nuestro laboratorio se han empleado fibras con fase estacionaria bipolar para la extracción de compuestos volátiles en jamón curado (Gianelli *et al.*, 2002), ya que se obtuvieron bajos rendimientos de extracción con las fases estacionarias de una sola polaridad. Por ello, en este estudio, se utilizaron fibras bipolares para el análisis de compuestos volátiles en embutidos. Además, como ya se ha mencionado previamente, no se añadieron especias durante la fabricación con el fin de evitar que sus compuestos volátiles interfirieran con los generados por procesos químicos y enzimáticos y así también evitar interferencias por las diferentes afinidades que puedan presentar los compuestos volátiles con las fibras usadas. Los compuestos volátiles extraídos por CAR/PDMS y DVB/CAR/PDMS se muestran en las **figuras 3.1 y 3.2**, respectivamente.



**Figura 3.1.** Cromatograma de los compuestos volátiles de embutido crudo curado obtenido por SPME-CG-MS en espacio de cabeza por extracción con la fibra de SPME 75  $\mu\text{m}$  CAR/PMDS durante 3 h a 30  $^{\circ}\text{C}$ . Los números representan los compuestos identificados y listados en la **tabla 3.1**.



**Figura 3.2.** Cromatograma de los compuestos volátiles de embutido crudo curado obtenido por SPME-CG-MS en espacio de cabeza por extracción con la fibra de SPME 50/30  $\mu\text{m}$  DVB/CAR/PMDS durante 3 h a 30  $^{\circ}\text{C}$ . Los números representan los compuestos identificados y listados en la **tabla 3.1**.

Ambas fibras se han utilizado previamente en diversos alimentos (Wyllie y Fellman, 1993; Marsili, 1999; Roberts *et al.*, 2000); sin embargo en carne y productos cárnicos sólo se han aplicado al estudio de la oxidación lipídica en carne de pavo cocinada (Brunton *et al.*, 2000) y en el estudio de los compuestos volátiles presentes en carne de cerdo cocinada (Elmore *et al.*, 2000) y jamón curado (Ruiz *et al.*, 1998; Gianelli *et al.*, 2002). Como se puede observar por el gran número de compuestos detectados, ambas fases estacionarias son útiles para el estudio de los compuestos volátiles presentes en embutidos crudos curados. En la **tabla 3.1** se muestran sus índices de Kovats y las cantidades medias extraídas por las dos fibras durante 3 h.

La extracción de los compuestos volátiles de embutidos crudos curados mediante SPME del espacio de cabeza se realizó de manera continuada durante 21 h a 30 °C. Durante las 5 primeras horas, la fibra CAR/PDMS presentó un incremento pronunciado del área total de compuestos volátiles extraídos, mientras que la fibra DVB/CAR/PDMS presentó un incremento menor, manteniéndose constante el área total extraída a lo largo del tiempo de exposición de la fibra (**figura 3.3**). La gráfica del área total extraída por las fibras bipolares sugiere que la adsorción alcanzó el equilibrio después de 5 h de exposición en el caso de la fibra CAR/PDMS, mientras que el equilibrio se alcanzó a los 90 min con la fibra DVB/CAR/PDMS. Sin embargo, en el caso de la fibra DVB/CAR/PDMS, la extracción de algunos compuestos volátiles específicos podría seguir aumentando, como en el caso de 2-nonanona,



**Tabla 3.1.** Compuestos volátiles de embutidos crudos curados extraídos por SPME del espacio de cabeza después de 3 h de extracción a 30 °C con diferentes fibras (50/30 μm DVB/CAR/PDMS y 75 μm CAR/PDMS).

N <sup>a</sup>	COMPUESTO	IK <sup>b</sup>	F <sup>c</sup>	DVB/CAR/PDMS		CAR/PDMS	
				Área <sup>d</sup>	% <sup>e</sup>	Área	%
1	pentano	500	a	0,190	0,12	1,567	0,35
2	etanol	506	a	26,489	17,17	76,920	17,30
3	acetona	527	a	0,359	0,23	1,145	0,26
4	bisulfuro de carbono	536	a	15,400	9,98	2,069	0,47
5	acetato de metilo	553	a			0,025	0,01
6	2-metil-propanal	597	a			0,293	0,07
7	hexano	600	a			1,235	0,28
8	1-propanol	612	a	0,507	0,33	2,629	0,59
9	butanal	629	a			0,369	0,08
10	2-butanona	637	a	0,246	0,16	1,422	0,32
11	acetato de etilo	640	a	3,268	2,12	34,581	7,78
12	benceno	677	a			0,056	0,01
13	2-metil-1-propanol	688	a	1,112	0,72	13,493	3,03
14	3-metil-butanal	693	a			2,639	0,59
15	heptano (71)	700	a			0,099	0,02
16	2-metil-butanal	702	a			3,538	0,80
17	ácido acético	720	a	31,618	20,49	99,569	22,39
18	2-etil-furano (81)	719	a	tr <sup>f</sup>			
19	1-butanol	726	a			2,034	0,46
20	2-pentanona	733	a	0,630	0,41	2,334	0,52
21	pentanal	737	a	0,737	0,48	6,235	1,40
22	propanoato de etilo	743	a			2,981	0,67
23	acetato de propilo	748	a			1,503	0,34
24	2-pentanol	755	a			1,630	0,37
25	dimetil-disulfuro	774	a			0,408	0,09
26	3-hidroxi-2-butanona (acetoína)	781	a			0,667	0,15
27	2-metil-propanoato de etilo	786	a	0,330	0,21	0,976	0,22
28	tolueno	790	a			1,173	0,26
29	3-metil-1-butanol	793	a	2,086	1,35	29,540	6,64
30	2-metil-1-butanol	795	a	1,781	1,15	16,673	3,75
31	octano	800	a	1,548	1,00	7,376	1,66

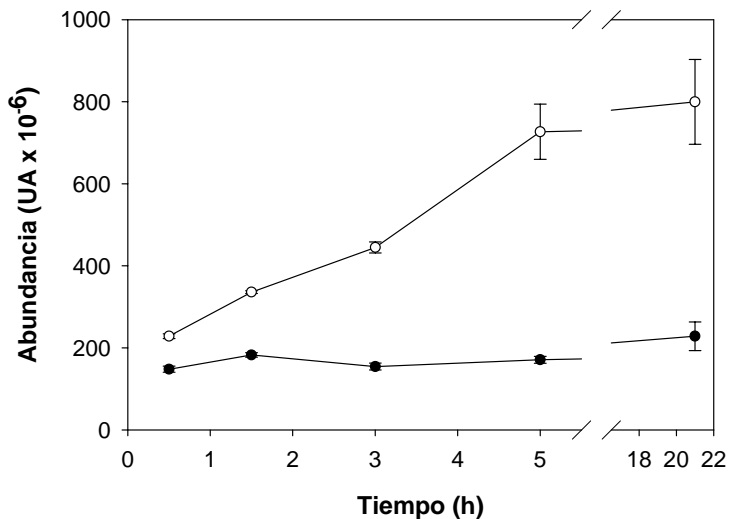
Tabla 3.1. Continuación

N	COMPUESTO	IK	F	DVB/CAR/PDMS		CAR/PDMS	
				Área	%	Área	%
32	Ácido propanoico	806	a	0,977	0,63	10,688	2,40
33	1-pentanol	823	a	0,105	0,07	1,107	0,25
34	butanoato de etilo	829	a	2,285	1,48	20,439	4,60
35	hexanal	840	a	8,776	5,69	35,217	7,92
36	Ácido 2-metil-propanoico	860	a	0,252	0,16	1,679	0,38
37	2-hidroxi-propanoato de etilo	865	a	1,098	0,71	10,091	2,27
38	2-metil-butanoato de etilo	876	a			0,902	0,20
39	3-metil-butanoato de etilo	880	a	0,099	0,06	1,150	0,26
40	Ácido butanoico	890	a	8,510	5,52	23,502	5,29
41	p-xileno (91)	891	a	0,634	0,41	0,762	0,17
42	nonano	900	a			0,485	0,11
43	acetato de 3-metil-1-butilo	905	a	0,398	0,26	1,010	0,23
44	acetato de 2-metil-1-butilo	908	b			0,690	0,16
45	estireno	920	a	0,339	0,22		
46	1-hexanol (69)	921	a	tr		0,178	0,04
47	pentanoato de etilo (85)	928	a	0,019	0,01	0,049	0,01
48	2-heptanona (58)	936	a	0,662	0,43	0,778	0,17
49	Ácido 3-metil-butanoico (60)	936	a			0,209	0,05
50	heptanal (70)	942	a	0,306	0,20	0,179	0,04
51	Ácido 2-metil-butanoico (74)	943	a			0,122	0,03
52	Ácido pentanoico	975	a	0,173	0,11	0,337	0,08
53	2-metil-propanoato de 2-metil-propilo	983	b			0,160	0,04
54	HCR <sup>g</sup>	996	b	3,792	2,46	8,092	1,82
55	Decano	999	a	0,925	0,60	0,480	0,11
56	2-pentil-furano (81)	1009	b	0,110	0,07	0,064	0,01
57	2-heptenal (Z) (41)	1011	a	0,056	0,04	tr	
58	benzaldehido (77)	1020	a	0,167	0,11	0,084	0,02
59	butirolactona (42)	1025	a			0,148	0,03
60	Hexanoato de etilo (88)	1025	a	0,424	0,27	0,348	0,08
61	1-octen-3-ol (57)	1027	a	0,322	0,21	0,092	0,02
62	2-octanona	1037	a	0,544	0,35	0,697	0,16
63	octanal	1044	a	6,396	4,14	1,461	0,33
64	2,4-heptadienal (E,E)	1061	b	tr			
65	Ácido hexanoico	1068	a	4,418	2,86	2,877	0,65

Tabla 3.1. Continuación

N	COMPUESTO	IK	F	DVB/CAR/PDMS		CAR/PDMS	
				Área	%	Área	%
66	HCR	1074	b			0,164	0,04
67	undecano	1100	a	0,220	0,14	0,855	0,19
68	Fenol	1104	a	1,559	1,01	0,856	0,19
69	fenilacetaldehido	1110	b	0,094	0,06		
70	2-octenal (E)	1116	b	0,297	0,19	0,120	0,03
71	heptanoato de etilo	1125	a	0,933	0,60	0,221	0,05
72	2-nonanona	1142	a	3,549	2,30	0,964	0,22
73	nonanal	1152	a	14,867	9,63	0,957	0,22
74	2,4-octadienal	1180	b	0,114	0,07		
75	fenil etil alcohol	1200	b	0,396	0,26		
76	dodecano	1200	a			0,218	0,05
77	2-nonenal	1215	b	tr		tr	
78	octanoato de etilo	1226	a	1,569	1,02	0,397	0,09
79	decanal (70)	1255	a	tr		tr	
80	Ácido octanoico (60)	1257	a	0,275	0,18	0,048	0,01
81	2,4-nonadienal	1287	b	0,221	0,14		
82	tridecano	1300	a	0,194	0,13	tr	
83	2-decenal (E)	1327	a	0,398	0,26		
84	2-undecanona	1346	a	0,512	0,33	0,202	0,05
85	Ácido nonanoico	1351	a	0,120	0,08	tr	
86	2,4-decadienal (E,E)	1392	b	0,079	0,05		
87	tetradecano	1399	a	0,058	0,04	0,064	0,01
88	decanoato de etilo	1421	a	0,330	0,21	0,174	0,04
89	2-undecenal	1428	b	0,082	0,05		
90	ácido decanoico	1442	a	0,356	0,23	0,139	0,03

<sup>a</sup> Número de pico en las figuras 1 y 2. <sup>b</sup> IK: Índices de Kovats calculados para una columna capilar DB-624 (J&W Scientific: 30 m, 0,25 mm d.i., 1,4 µm grosor del film) instalada en un cromatógrafo de gases equipado con un detector selectivo de masas. <sup>c</sup>F: Fiabilidad de la identificación: a, espectro de masas y IK idéntico al del estándar auténtico; b, identificación tentativa por espectro de masas. <sup>d</sup> Resultados expresados como media de tres repeticiones en área del cromatograma de iones totales obtenido por CG-MS, excepto en aquellos compuestos donde un único ion fue utilizado para la cuantificación y esta indicado entre paréntesis. <sup>e</sup> Porcentaje del área total. <sup>f</sup> tr: compuesto detectado como trazas. <sup>g</sup> HCR: Hidrocarburo de cadena ramificada.



**Figura 3.3.** Perfil de adsorción en función del tiempo del total de compuestos volátiles extraídos del embutido crudo curado utilizando diferentes fibras de SPME. (●) DVB/CAR/PDMS y (○) CAR/PDMS.

nonanal, octanoato de etilo y ácido hexanoico (**figuras 3.4 E, 3.4 C, 3.5 A y 3.5 C**, respectivamente).

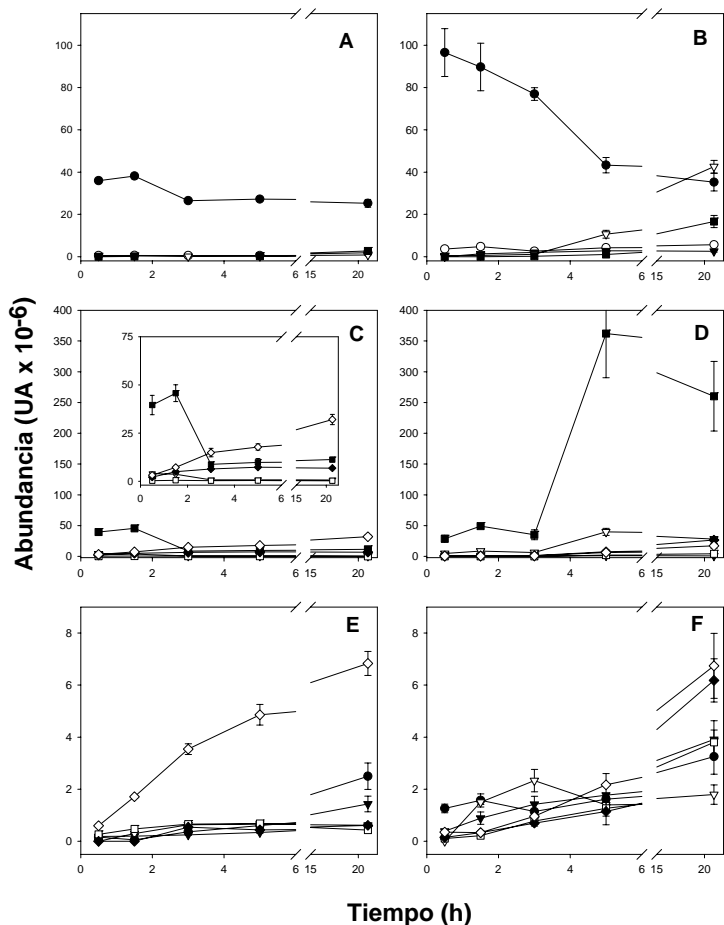
La selectividad varió con el tipo de fibra utilizado, como se puede ver en la **tabla 3.1**. Después de 3 h de exposición, la fibra DVB/CAR/PDMS extrajo, 10 alcoholes (22,3 %), 17 aldehidos (21,1 %), 7 cetonas (4,3 %), 11 ésteres (7,0 %), 9 hidrocarburos (5,1 %), 9 ácidos (30,3 %), 2 furanos y 1 compuesto azufrado (10 %). Esta fibra extrajo siete compuestos en cantidades elevadas, los cuales constituyeron más del 70 % del área total

extraída. Estos compuestos fueron: ácido acético (20,5 %), etanol (17,2 %), bisulfuro de carbono (9,9 %), nonanal (9,6 %), hexanal (5,7 %), ácido butanoico (5,5 %) y octanal (4,1 %). Por otro lado, la selectividad de la fibra CAR/PDMS fue diferente de la anterior como se puede ver por la extracción a las 3 h, de 11 alcoholes (32,6 %), 14 aldehidos (11,5 %), 9 cetonas (2,0 %), 17 ésteres (17,0 %), 15 hidrocarburos (5,1 %), 11 ácidos (31,3 %) y 2 furanos y 2 compuestos azufrados (0,6 %). En este caso, también siete de los compuestos extraídos por la fibra representaron más del 70 % del área total. Los compuestos fueron ácido acético (22,4 %), etanol (17,3 %), hexanal (7,9 %), acetato de etilo (7,8 %), 3-metil-1-butanol (6,6 %), ácido butanoico (5,3 %) y butanoato de etilo (4,6 %). Ambas fibras extrajeron en porcentajes similares cuatro de los principales compuestos extraídos (ácido acético, etanol, hexanal y ácido butanoico). Sin embargo, las principales diferencias observadas fueron una mayor afinidad de DVB/CAR/PDMS por los aldehidos y una mayor afinidad de CAR/PDMS por los ésteres. La presencia de ésteres de etilo en embutidos curados es importante debido a sus bajos umbrales de detección, que aportan notas frutales al aroma del embutido (Stahnke, 1994).

En general, los compuestos extraídos por ambas fibras fueron básicamente los mismos que los extraídos en embutidos crudos curados sin especias utilizando otras técnicas de extracción (Berdagué *et al.*, 1993; Stahnke, 1994; Stahnke, 1995b). La elevada recuperación de etanol y ácido acético por las fibras CAR/PDMS y DVB/CAR/PDMS es una característica de estas fases estacionarias. Debido a la baja afinidad del

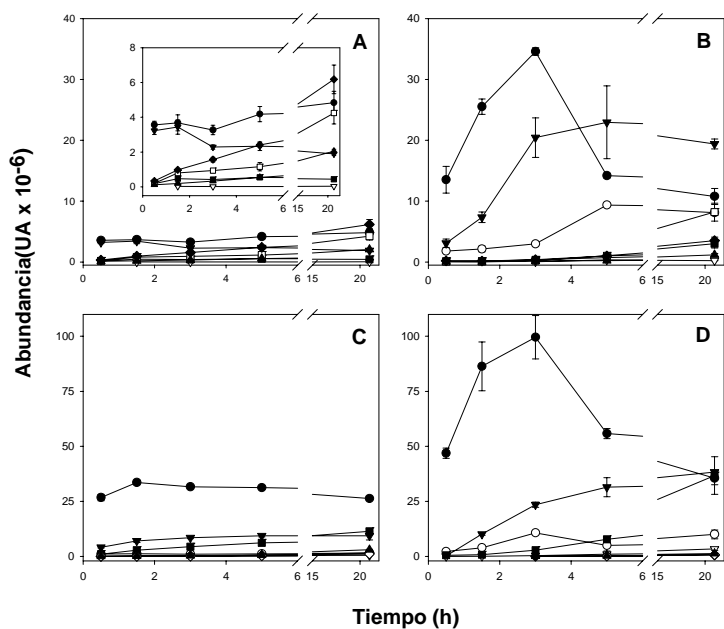
Tenax por compuestos de bajo peso molecular, con el uso de la técnica de purga y trampa se habrían conseguido porcentajes de extracción mucho más bajos para estos compuestos (Berdagué *et al.*, 1993; Stahnke, 1994; Stahnke, 1995). Por su parte, el hexanal, compuesto que tiene su origen en la oxidación lipídica, se detecta siempre en embutidos curados (Berdagué *et al.*, 1993; Stahnke, 1994; Stahnke, 1995b). Los compuestos volátiles extraídos por las dos fibras, tienen sus orígenes principalmente, en procesos de oxidación lipídica, rutas de fermentación de carbohidratos, catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada y algunas contaminaciones. Los compuestos volátiles procedentes de la oxidación lipídica son compuestos alifáticos no ramificados, tales como alcanos, cetonas, aldehidos, alcoholes y furanos cíclicos (Frankel, 1984). Los compuestos de bajo peso molecular, liberados por rutas de fermentación de carbohidratos, son p.e. 3-hidroxi-butanona, etanol y ácido acético. Los compuestos del catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada como los aldehidos ramificados (2-metil-propanal, 2- y 3-metil-butanal) se encontraron en bajos porcentajes, mientras que los alcoholes de cadena ramificada se encontraron en altas proporciones. Se sabe que la naturaleza de los cultivos iniciadores empleados en la fabricación de los embutidos crudos curados tiene una gran influencia en la composición de compuestos volátiles y, por tanto, en las características sensoriales (Berdagué *et al.*, 1993); pero también es muy importante el efecto de otros parámetros del proceso, como la temperatura, humedad relativa, tiempo de secado, etc. (Stahnke, 1994; Stahnke, 1995b).

Los perfiles de adsorción en función del tiempo para los diferentes grupos de compuestos volátiles (alcoholes, aldehidos, cetonas, ésteres y ácidos) obtenidos con ambas fibras se muestran en las **figuras 3.4** y **3.5**. Los dos principales factores que afectaron al proceso de extracción fueron: la fase estacionaria de la fibra y el tiempo de extracción, aunque el efecto del tiempo de exposición fue más marcado para la fibra CAR/PDMS que para la DVB/CAR/PDMS ya que las áreas de los picos de muchos compuestos aumentaban al aumentar el tiempo de exposición. Este aumento se observó en la fibra CAR/PDMS en el caso de cetonas, propanoato de etilo, butanoato de etilo y ácido butanoico (**figuras 3.4 F**, **3.5 F** y **3.5 D**). Sin embargo, el tiempo de exposición sólo mostró un efecto importante en la extracción de 2-nonanona por la fibra DVB/CAR/PDMS (**figura 3.4 E**). Por otra parte, cuando se utilizó la fibra CAR/PDMS cuatro compuestos (hexanal, etanol, acetato de etilo y ácido acético) mostraron un comportamiento sorprendente durante el tiempo de exposición. El etanol mostró una disminución en el área del pico al incrementar el tiempo de exposición (**figura 3.4 B**), lo mismo que el acetato de etilo (**figura 3.5 B**) y el ácido acético (**figura 3.5 D**) cuyas áreas se redujeron a la mitad; mientras que el hexanal mostró un ligero incremento hasta las 3 h de exposición y, a partir de 5 h de exposición, su área aumentó hasta 7 veces (**figura 3.4 D**). La razón de este comportamiento podría ser la existencia de efectos de competencia entre hexanal, acetato de etilo y ácido acético (Roberts *et al.*, 2000). La elevada generación de hexanal debido al fenómeno de oxidación lipídica, podría ser debida al largo tiempo de exposición (5 h). Por ello, un tiempo de muestreo más corto podría ayudar a evitar este efecto de competencia.



**Figura 3.4.** Perfiles de adsorción en función del tiempo de los compuestos volátiles de embutado crudo curado utilizando diferentes fibras de SPME: (A) Alcoholes con DVB/CAR/PDMS, (B) Alcoholes con CAR/PDMS, (C) Aldehidos con DVB/CAR/PDMS, (D) Aldehidos con CAR/PDMS, (E) Cetonas con DVB/CAR/PDMS y (F) Cetonas con CAR/PDMS. Los símbolos representan el numero de carbonos en el compuesto C2 (●), C3 (○), C4 (▼), C5 (▽), C6 (■), C7 (□), C8 (◆), C9 (◇) y C10 (▲).





**Figura 3.5.** Perfiles de adsorción en función del tiempo de los compuestos volátiles de embutido crudo curado utilizando diferentes fibras de SPME: (A) Ésteres de etilo con DVB/CAR/PDMS, (B) Ésteres de etilo con CAR/PDMS, (C) Ácidos con DVB/CAR/PDMS y (D) Ácidos con CAR/PDMS. Los símbolos representan el número de carbonos en el compuesto C2 (●), C3 (○), C4 (▼), C5 (▽), C6 (■), C7 (□), C8 (◆), C9 (◇) y C10 (▲).

En conclusión, el tiempo óptimo de extracción debería ser el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio, evitando la actuación de procesos de oxidación lipídica que se ven favorecidos por el largo tiempo de exposición. En este caso, todos los compuestos extraídos por la fibra DVB/CAR/PDMS, excepto 2-nonanona, alcanzaron el equilibrio en 90 min, mientras que los compuestos extraídos por la fibra CAR/PDMS necesitaron al menos 3 h para alcanzar el equilibrio, siendo el largo tiempo de exposición inapropiado debido a los fenómenos de oxidación que pueden dar lugar a fenómenos de competencia entre los compuestos volátiles.

Así pues, SPME es una herramienta apropiada para el análisis cualitativo y cuantitativo de los compuestos volátiles en embutidos crudos curados. Sin embargo, los rendimientos de extracción de los compuestos volátiles en embutidos crudos curados varían en función de la fibra utilizada. Por ello, es necesario seleccionar las condiciones de extracción cuidadosamente, dependiendo del objetivo del estudio.

**CAPÍTULO II:**

**Efecto del Nitrito y el Nitrato en las Características Microbianas,  
Químicas y Sensoriales de los Embutidos Crudos Curados.**

*Meat Science*, 2006: 73 (4), 660-673

---

## **4. CAPÍTULO II: Efecto del Nitrito y el Nitrato en las Características Microbianas, Químicas y Sensoriales de los Embutidos Crudos Curados.**

### ***4.1. Introducción***

El curado es una técnica de conservación de los alimentos, cuyos orígenes se pierden en la antigüedad. Se descubrió que las impurezas de la sal conocidas como “salpetre”, principalmente nitrato potásico, producían cambios característicos en el sabor, aroma y color. Sin embargo no fue hasta la segunda mitad del siglo XIX cuando se determinó científicamente el modo de acción del nitrato. Se observó que el nitrato se reducía a nitrito por acción bacteriana y que el color característico de los productos cárnicos se debía al efecto del nitrito (Flores y Toldrá, 1993). Los avances de la ciencia han llevado al uso directo del nitrito en lugar de nitrato, lo cual ofrece ciertas ventajas tecnológicas como la adición de menores cantidades y la reducción de los niveles residuales de nitrito. Sin embargo, también se observa que en los procesos tradicionales para la fabricación de productos curados, donde se emplean bajas temperaturas y tiempos de secado largos, el nitrato actúa como reservorio, reduciéndose lentamente a nitrito (Toldrá, 2005), e incluso se afirma que beneficia el aroma y sabor de los embutidos crudos curados (Wirth, 1991).

Actualmente, la Unión Europea está estudiando modificar los niveles permitidos de nitrito y nitrato en productos cárnicos (EFSA, 2003), dado que los niveles indicativos de adición que fija la norma comunitaria se encuentran por encima de los niveles de adición máximos permitidos por la legislación de algunos de los países miembros (Toldrá, 2005). Este es el caso del nitrato, que no se emplea como agente de curado en los países del norte de Europa pero sí en los de la Cuenca Mediterránea.

El efecto del uso exclusivo del nitrito en la maduración de productos cárnicos se ha estudiado en numerosos trabajos científicos, sin embargo, se sabe muy poco del efecto del uso exclusivo del nitrato. Respecto a los trabajos realizados en embutidos, se han realizado comparaciones entre muestras fabricadas sólo con nitrito y otras fabricadas con nitrito y nitrato conjuntamente (Skjelvåg y Tjøberg, 1974; Noel *et al.*, 1990; Stahnke, 1995a; Stahnke, 1995b; Zanardi *et al.*, 2004) o sólo con especias y sin agentes de curado (Aguirrezábal *et al.*, 2000). Únicamente algunos investigadores han fabricado embutidos con sólo nitrito o nitrato en su formulación, permitiendo así diferenciar entre los efectos de uno u otro (Navarro *et al.*, 1998; Navarro *et al.*, 2001; Olesen *et al.*, 2004a).

En este estudio se planteó la determinación del efecto individual de los diferentes agentes de curado, nitrito sódico o nitrato potásico, y su contribución a la generación del aroma en los embutidos crudos curados fabricados con un proceso de curado tradicional.

## **4.2. Materiales y Métodos**

### **4.2.1 Fabricación de los Embutidos y Toma de Muestra**

Se fabricaron dos lotes de embutidos, uno contenía únicamente nitrito y el otro lote contenía nitrato. En la elaboración de la masa cárnica se empleó carne magra (80 %) y panceta (20 %) de cerdo. A la masa cárnica se adicionaron los siguientes aditivos en g por kg de mezcla: cloruro sódico (27), lactosa (20), dextrina (20), caseinato sódico (20), glucosa (7), ascorbato sódico (0,5) y finalmente, nitrito sódico (0,15) o nitrato potásico (0,3) según el lote, siguiendo las cantidades indicativas autorizadas por la Directiva 95/2/EC, de la Unión Europea para aditivos alimentarios diferentes de colorantes y edulcorantes. La carne se picó utilizando una picadora con placa de orificios de salida de la masa de 6 mm de diámetro. La pasta cárnica se mezcló con los demás ingredientes en una amasadora a vacío mediante dos ciclos alternativos de las palas de 2 min cada uno. Seguidamente, se inoculó con el cultivo iniciador comercial SP-318 (Rhodia Iberia, grupo Rhône-Poulenc) que contiene *Lactobacillus sakei*, *Pediococcus pentasaceus*, *Staphylococcus xylosus* y *S. carnosus* y se repitió la operación de amasado. La mezcla resultante se embutió en tripas de colágeno (Fibran, 75-80 mm diámetro) dando lugar a piezas de embutido de unos 500 g. Los embutidos se mantuvieron en una cámara de refrigeración de 3 a 5 °C durante 24 h para permitir que todos los ingredientes se distribuyeran uniformemente. Posteriormente, se secaron a 10 °C y una humedad relativa entre 85 y 75 %. El tiempo total del proceso de secado fue de 45 días con pérdidas de peso de alrededor del 40 %. Finalmente, los embutidos se envasaron a vacío y se

almacenaron a 4 °C durante 2 meses, por tanto la duración final del proceso de maduración fue de 105 días.

De cada lote se tomaron unos 200 g de pasta cárnica antes de embutir, para las determinaciones iniciales, día 0, y además 4 embutidos de cada lote a 14, 31, 45 y 105 días. De cada una de las muestras de pasta cárnica o de los embutidos, se tomaron 20 g para realizar los análisis microbiológicos inmediatamente y otros 20 g se envasaron a vacío y se guardaron a -20 °C para la determinación de los compuestos volátiles. El resto de la muestra se picó, se tomaron 20 g para analizar directamente la humedad y el resto se envasó a vacío y se guardó a -20 °C hasta la realización de los análisis químicos (TBARS, nitrato y nitrito) y de lípidos. Los embutidos restantes al final del proceso (105 días) se utilizaron para el análisis sensorial. Todos los resultados se expresaron como la media de las cuatro repeticiones en materia seca (ms) para cada lote y tiempo del proceso.

#### **4.2.2 Análisis Microbiológico**

20 g de cada muestra se homogeneizaron con 180 ml de agua de peptona en un Stomacher Lab-Blender 400 (Seward Medical, Londres, Reino Unido) durante 1 min. A partir de la suspensión resultante, se realizaron diluciones decimales sucesivas en agua de peptona. De ellas se tomaron alícuotas que se sembraron en placas por duplicado. La población de bacterias lácticas se determinó en MRS agar (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España) empleando la técnica de la doble capa para favorecer el crecimiento anaerobio. El recuento de estafilococos se realizó en

Mannitol Sal agar (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España) por siembra en superficie. Todas las placas se incubaron a 30 °C durante 3 días.

#### **4.2.3 Análisis Químicos (pH, humedad, TBARS, nitrato y nitrito)**

El contenido de humedad en los embutidos se determinó según el método oficial de análisis para productos cárnicos (BOE, 1979) por deshidratación a 100 °C hasta peso constante.

El pH se midió introduciendo un electrodo de punción FC200B (Hanna Instruments Inc., Hoonsocket, EEUU) en el centro del embutido de acuerdo con el protocolo descrito por la ISO 2917 (1999).

Las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) se determinaron según el método descrito por Bruna *et al.* (2001b) utilizando ácido tricloro-acético en lugar de ácido perclórico como disolvente.

La cuantificación de nitrito se realizó por medio de una reacción colorimétrica basada en la reacción del nitrito con los reactivos sulfanilamida y N-(1-naftil)-etilendiamina, la cual da lugar a un diazocompuesto que absorbe la luz a 540 nm. La determinación del nitrato se realizó por reducción de este ion a nitrito utilizando el kit enzimático (Cat. No. 09050658, Roche, Palo Alto, EEUU). Esta determinación se realizó en el mismo extracto que la determinación del



nitrito y la concentración de nitrato se calculó como la diferencia entre la concentración de nitrito total y la concentración previamente determinada en la muestra sin reducir. Los extractos para la determinación de nitrito y nitrato se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Arneith y Herold (1988). Para ello, se pesaron 5 g de muestra previamente picada en un vaso de precipitados, se añadió 50 ml de agua bi-distilada hirviendo y se homogeneizó la mezcla utilizando un Polytron® PT-MR 2100 (Kinematica AG, Suiza) mediante 4 pulsos de 30 seg. Al homogeneizado se añadió 3 ml de cada uno de los reactivos Carrez-I (150 g  $K_4[Fe(CN)_6] \times 3H_2O$  por l de agua) y Carrez-II (230 g  $Zn(CH_3COO)_2 \times 2H_2O$  por l de agua) agitando vigorosamente, y seguidamente se ajustó la solución a pH 8 añadiendo NaOH. La mezcla se aforó a 100 ml y se centrifugó a  $10^4$  rpm durante 5 min. Finalmente, se filtró la mezcla y se utilizó el filtrado para la determinación.

#### 4.2.4 Análisis de Lípidos

Los lípidos totales se extrajeron a partir de 5 g de embutido picado utilizando una variación del método de Folch *et al.* (1957), empleando como disolvente diclorometano:metanol (2:1) en lugar de cloroformo:metanol (2:1). Los extractos obtenidos se llevaron a sequedad a vacío en un evaporador rotatorio y se determinó la cantidad de lípidos totales por diferencia de pesada. El contenido en fosfolípidos se calculó multiplicando por 25 la cantidad de fósforo determinada en el extracto de lípidos totales por el método de Barlett (1959). Los ácidos grasos libres se determinaron por metilación a partir de los lípidos totales según el procedimiento de Gandemer *et al.* (1991) utilizando ácido

eicosanoico (C20:0) como patrón interno para la cuantificación. El extracto de lípidos totales se fraccionó en lípidos polares (fosfolípidos) y neutros según el procedimiento de Juaneda y Rocquelin (1985) y, en cada fracción, se metilaron los ácidos grasos según los protocolos de Berry *et al.* (1965) y Morrison y Smith (1964) para fosfolípidos y lípidos neutros, respectivamente. El contenido de triglicéridos se calculó por diferencia entre los lípidos neutros y los ácidos grasos libres.

El análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se llevó a cabo tal como describen Navarro *et al.* (2001) en un cromatógrafo de gases Fisons 816 equipado con detector de ionización de llama. La inyección se realizó en split (1:50) y se utilizó una columna capilar DB-225 (30 m de longitud, 0,25 mm d.i., 0,25  $\mu$ m de espesor del film; J & W Scientific, Barcelona, España). La separación de los ésteres metílicos se realizó con un gradiente de temperatura empezando a 160 °C durante 2 min, se incrementó hasta 190 °C a 10 °C/min y se mantuvo 5 min, después se incrementó a 210 °C a 10 °C/min, a 220 °C a 7 °C/min y se mantuvo durante 5 min. Se utilizó helio como gas portador con una presión de cabeza de 14 kPa, y una velocidad de flujo de 0,9 ml/min. El detector y el inyector se mantuvieron a temperatura de 240 °C. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se identificaron comparando su tiempo de retención con los de sus respectivos patrones. Para la cuantificación, se calcularon los factores de respuesta de cada éster metílico con respecto al patrón interno.

### **4.2.5 Análisis de los Compuestos Volátiles**

La técnica de SPME en espacio de cabeza se utilizó para la extracción de los compuestos volátiles de los embutidos. Para ello, se empleó una fibra con fase estacionaria CAR/PDMS de 85  $\mu\text{m}$ , del tipo StableFlex (SF) que permite una mayor vida media de la fibra. La extracción se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2.3. La fibra se expuso al espacio de cabeza durante 2 h manteniendo la muestra a 30 °C. Los compuestos adsorbidos por la fibra se identificaron y cuantificaron por separación en un cromatógrafo de gases con un detector de espectrometría de masas (CG-MS) tal como describe el apartado 3.2.4.

### **4.2.6 Análisis Sensorial**

El análisis sensorial se realizó al final del proceso (105 días) en los embutidos de cada lote (fabricado con nitrito o nitrato). A los embutidos, se les quitó la tripa y se cortaron en lonchas de aproximadamente 4 mm de espesor. Las lonchas se dispusieron en platos pequeños y se dejaron equilibrar durante 30 min a temperatura ambiente antes de ser servidas a los catadores, junto con un vaso de agua y una rebanada de pan tostado sin sal. Las muestras se analizaron por un panel de 50 catadores en 2 sesiones diferentes. Se realizó un test de preferencia (ISO 5495, 1983) para determinar cual era la muestra preferida por los catadores. Se pidió a los catadores no entrenados que indicaran en cada caso que muestra preferían en función del color, aroma, sabor y calidad global. La evaluación del análisis sensorial se realizó utilizando el

programa de ordenador Compusense® *five* versión 4.6 (Compusense Inc., Guelph, Ontario, Canada).

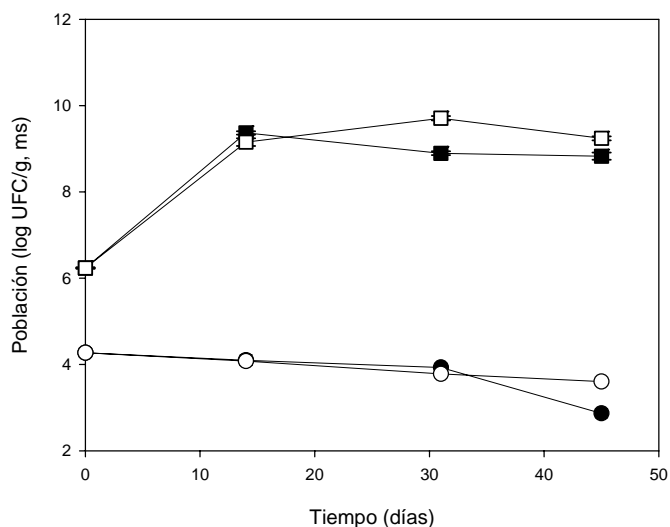
#### **4.2.7 Análisis Estadístico**

Se determinaron los efectos de los agentes de curado y del tiempo de maduración sobre las variables estudiadas por análisis de varianza múltiple (ANOVA) usando el software estadístico Statgraphics plus (v 5.1). En los casos en que el efecto de los factores o de la interacción fue significativo, las medias fueron comparadas utilizando el proceso de la diferencia mínima significativa de Fisher's (LSD) ( $p < 0,05$ ).

### **4.3. Resultados y Discusión**

#### **4.3.1 Análisis Microbiológico**

La evolución de la población de bacterias lácticas y estafilococos durante el proceso de secado se muestra en la **figura 4.1**. Los resultados observados se encontraron dentro del rango esperado en embutidos crudos curados (Sanz *et al.*, 1997). Se observó un crecimiento de las bacterias lácticas superior a 2,5 ciclos logarítmicos durante los 14 primeros días, pero la población decreció a partir de los 31 días del proceso en los embutidos con nitrito y de los 45 días en los embutidos con nitrato. Así pues, se observaron diferencias significativas entre los dos lotes de embutidos a los 31 y 45 días, en donde se encontró una mayor población de bacterias lácticas ( $p < 0,05$ ) en los embutidos fabricados con nitrato. Sanz *et al.* (1998) también encontraron una mayor



**Figura 4.1.** Población de estafilococos y bacterias lácticas durante el proceso de fermentación y secado de los embutidos crudos curados. Estafilococos en el lote fabricado con nitrito (●) y nitrato (○). Bacterias lácticas en el lote fabricado con nitrito (■) y nitrato (□). Los símbolos representan la media y la desviación estándar de las medidas.

población de bacterias lácticas en embutidos de bajo calibre sin cultivo iniciador fabricados con nitrato respecto a otros fabricados con nitrito.

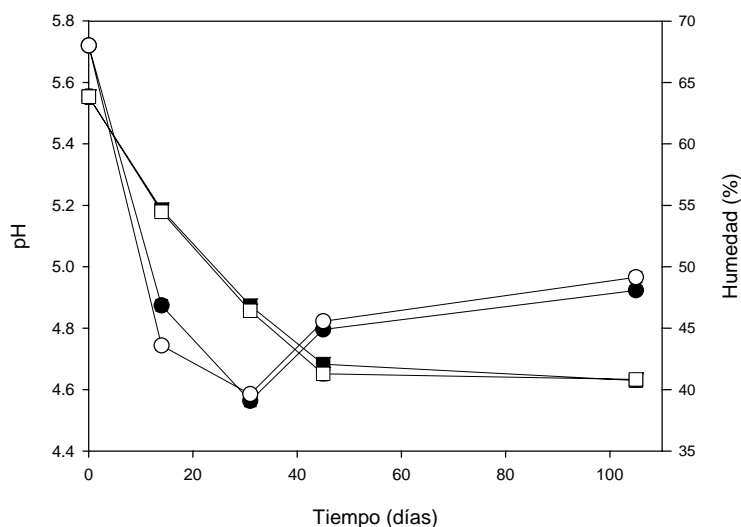
En el caso de los estafilococos, ambos lotes mostraron un descenso de la población durante el proceso de secado, pero la disminución fue mayor en las muestras con nitrito ( $p < 0,05$ ) a los 45 días de secado. Neubauer y Gotz (1996) observaron que la tasa de crecimiento de estafilococos en condiciones anaerobias se vio favorecida por la presencia de nitrato,

capaz de actuar como aceptor final de la cadena de transporte electrónico.

### 4.3.2 pH, humedad y TBARS

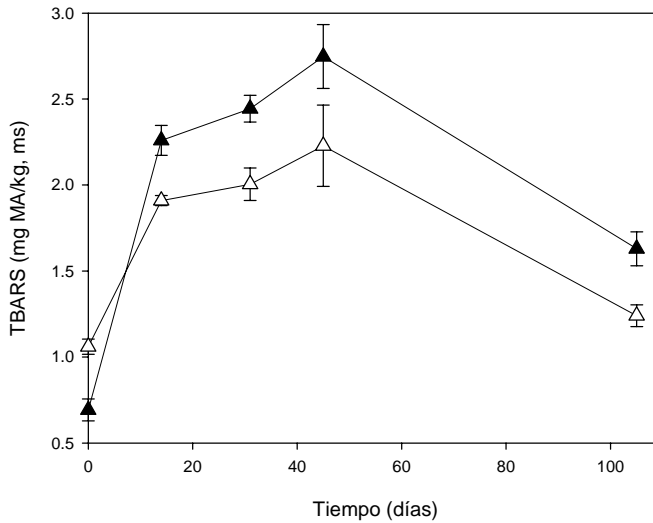
Los resultados de los análisis de pH y humedad en ambos lotes se muestran en la **figura 4.2**. El pH mostró una disminución inicial en ambos lotes que se invirtió a partir del día 31. Se encontraron diferencias significativas, únicamente a los 14 días cuando el pH fue menor en el lote con nitrato ( $p < 0,05$ ). El contenido en humedad decreció desde el 64 % hasta el 41 % a lo largo del proceso de secado sin que se observaran diferencias significativas entre los lotes (**figura 4.2**).

Los niveles de TBARS durante el procesado de secado y almacenamiento a vacío de los embutidos se muestran en la **figura 4.3**, expresado como mg malonaldeído/kg ms. Los niveles de TBARS aumentaron en ambos lotes durante el proceso de secado y mostraron una importante disminución durante la etapa de almacenamiento ( $p < 0,05$ ). Se observaron niveles de TBARS significativamente ( $p < 0,05$ ) mayores en el lote fabricado con nitrito que en el lote con nitrato durante todo el proceso de secado, a partir de los 14 días, es decir que los procesos de oxidación se vieron atenuados por la presencia de nitrato. En cambio, Navarro *et al.* (1998; 2001) encontraron que el índice de peróxidos y el nivel de TBARS eran mayores en muestras fabricadas con nitrato que en otras con nitrito, en embutidos sometidos a un proceso de fermentación rápida con etapa de estufaje y en embutidos no fermentados de bajo



**Figura 4.2.** Evolución del pH y el contenido en humedad medidos durante el proceso de maduración de los embutidos crudos curados. pH del lote fabricado con nitrito (●) y nitrato (○). Contenido de humedad en el lote fabricado con nitrito (■) y nitrato (□). Los símbolos representan la media y la desviación estándar de las medidas

calibre. Las diferencias con respecto al estudio actual, podrían deberse al proceso de fermentación lento y sin etapa de estufaje aplicado en este trabajo. En cambio, Zanardi *et al.* (2004) encontraron que un lote fabricado únicamente con nitrito tenía una concentración de TBARS ligeramente superior que otro fabricado con nitrato y nitrito conjuntamente. En 1999, Talón *et al.* describieron el efecto antioxidante del nitrato en experimentos *in vitro*. Estos autores observaron que el



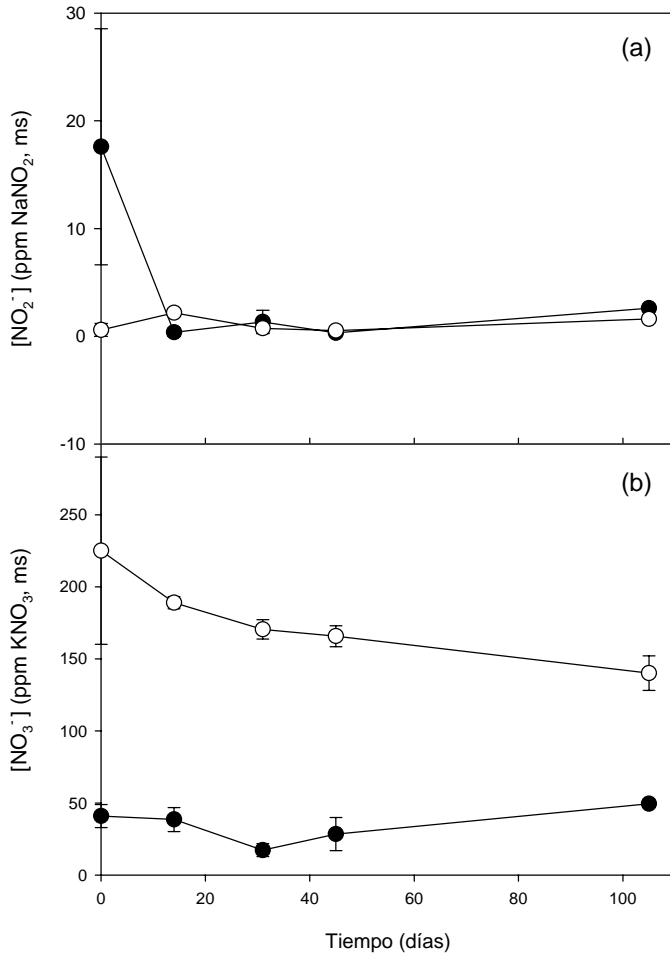
**Figura 4.3.** Niveles de TBARS medidos durante el proceso de maduración de embutidos crudos curados fabricados con nitrito (▲) y nitrato (Δ). Los símbolos representan la media y la desviación estándar de las medidas.

nitrito, en concentraciones por encima de los 300 ppm, activa la producción de la enzima catalasa en *S. xylosus* y que la actividad de ésta es máxima durante la fase de crecimiento estacionario.

### 4.3.3 Nitritos y Nitratos

El contenido de nitrito fue mayor ( $p < 0,05$ ) en el lote fabricado con nitrito a los 0 días de proceso, tal como se muestra en la **figura 4.4 (a)**. Después de este punto, no se encontraron diferencias significativas en el contenido de nitrito entre los lotes de embutidos y las cantidades





**Figura 4.4.** Evolución del contenido en nitrito (a) y nitrato (b) medidos durante el proceso de maduración de embutidos crudos curados. Lote fabricado con nitrito (●) y nitrato (○). Los símbolos representan la media y la desviación estándar de las medidas.

determinadas fueron sólo residuales. El contenido de nitrito disminuyó rápidamente en las muestras debido a su elevada reactividad (Cassens *et al.*, 1979). La formación de nitrito en los embutidos fabricados con nitrato se debió probablemente a la actividad nitrato reductasa de los estafilococos (Flores y Toldrá, 1993; Talón *et al.*, 1999).

En la **figura 4.4 (b)** se muestra el contenido de nitrato en ambos lotes. En las muestras fabricadas con nitrato, la concentración de éste disminuyó desde 225 hasta 140 ppm, mientras que en el lote fabricado con nitrito se encontró una baja concentración de nitrato del orden de 25-50 ppm, producida por reacciones químicas del nitrito con diversos componentes la carne y otros ingredientes (Cassens *et al.*, 1979). El menor pH registrado en los embutidos fabricados con nitrato a los 8 días del proceso de secado, podría haber afectado el proceso de reducción del nitrato a nitrito, dado que la actividad nitrato reductasa de estafilococos se ve inhibida a  $\text{pH} < 5,4$  (Kröckel, 1995).

#### 4.3.4 Lípidos

El contenido en lípidos de la pasta cárnica fue de 32,36 g/100 g ms. Los triglicéridos (TG) constituyeron la fracción más abundante, el 94 % (30,47 g/100 g ms) de los lípidos totales; mientras fosfolípidos (FL) y ácidos grasos libres (AGL) representaron el 5,26 % (1,68 g/100 g ms) y 0,67 % (0,21 g/100 g ms), respectivamente.

La cantidad total de lípidos no varió significativamente durante el proceso de secado, pero las diferentes fracciones lipídicas sí lo hicieron.

Los AGL fueron la fracción más afectada (**tabla 4.1**), la concentración de AGL aumentó significativamente durante el secado y el almacenamiento a vacío en ambos lotes, desde un 0,67 % hasta un 5 % de los lípidos totales. La adición de nitrito o nitrato también afectó esta fracción lipídica. La concentración de AGL fue significativamente mayor ( $p<0,01$ ) en las muestras con nitrito (**tabla 4.1**) debido a la mayor liberación de AGPI ( $p<0,001$ ) y AGMI ( $p<0,01$ ), en particular C18:2 y C18:3 ( $p<0,001$ ) seguidos por C18:1 ( $p<0,05$ ).

El contenido en FL también se vio afectado por el tiempo de proceso (**tabla 4.2**) pero en menor medida. La proporción de esta fracción decreció desde el 5,26 % del total de lípidos a menos del 3 %. Con respecto a la adición de nitritos o nitratos, se observó una mayor hidrólisis de ácidos grasos ( $p<0,001$ ) en los embutidos fabricados con nitrato durante la etapa de secado y se encontraron diferencias significativas ( $p<0,05$ ) entre lotes para C18:2 y C18:3 a los 14 días y en C20:2 a los 14 y 31 días. En cambio, esta tendencia se invirtió durante la etapa de envasado al vacío (**tabla 4.2**). En esta etapa, la liberación de AGS y AGMI fue mayor en las muestras con nitrito. En particular se encontraron diferencias significativas ( $p<0,05$ ) en C16:0, C18:0, C18:1 y C20:1 a los 105 días de proceso.

En la fracción de los TG, se observaron diferencias significativas ( $p<0,05$ ) en la concentración total a lo largo de todo el proceso (**tabla 4.3**). Su concentración disminuyó del 94 % al 92 % de los lípidos totales. Respecto a la adición de nitrito o nitrato, la hidrólisis total de ácidos

**Tabla 4.1.** Concentración de ácidos grasos libres (g/kg ms) generada durante el proceso de secado y envasado a vacío de los embutidos crudos curados.

Ácidos Grasos <sup>a</sup>	0 días		14 días		31 días		45 días		105 días		L <sup>b</sup>	E	L×E
	Nitrito/Nitrato	Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato				
<b>C14:0</b>	0,018d/e	0,042c	0,039d	0,061b	0,056c	0,068b	0,067b	0,13a	0,12a	ns	***	ns	
<b>C16:0</b>	0,38d/e	0,90c	0,95d	1,35b	1,32c	1,42b	1,44b	2,33a	2,13a	ns	***	ns	
<b>C18:0</b>	0,28e/e	0,68d	0,76d	0,90c	0,96c	0,96b	1,03b	1,29a	1,25a	*	***	ns	
<b>AGS</b>	0,68d/e	1,63c	1,74d	2,30b	2,33c	2,45b	2,54b	3,76a	3,50a	ns	***	ns	
<b>C16:1</b>	0,036e/e	0,10d	0,10d	0,15c	0,14c	0,18b	0,16d	0,29a	0,26e	ns	***	ns	
<b>C18:1</b>	0,73e/e	2,20d	2,13b	3,20c <sup>1</sup>	2,87c <sup>2</sup>	3,70d <sup>1</sup>	3,27b <sup>2</sup>	5,68e	5,03a	**	***	ns	
<b>C20:1</b>	0,014e/e	0,046d	0,041d	0,065c	0,064c	0,083b	0,078b	0,12a	0,12a	ns	***	ns	
<b>AGMI</b>	0,78e/e	2,35d	2,27d	3,42c <sup>1</sup>	3,07c <sup>2</sup>	3,95b <sup>1</sup>	3,52b <sup>2</sup>	6,09a	5,41a	**	***	ns	
<b>C18:2</b>	0,54e/e	1,79d	1,68 d	2,61c	2,42c	2,96b <sup>1</sup>	2,62b <sup>2</sup>	4,48a <sup>1</sup>	3,84a <sup>2</sup>	***	***	**	
<b>C18:3</b>	0,022e/e	0,082d	0,074d	0,12c <sup>1</sup>	0,11c <sup>2</sup>	0,14b <sup>1</sup>	0,12b <sup>2</sup>	0,23a <sup>1</sup>	0,20a <sup>2</sup>	***	***	*	
<b>C20:2</b>	0,17e/e	0,054d	0,054d	0,084c	0,080c	0,099b	0,092b	0,15a	0,14a	ns	***	ns	
<b>C20:3</b>	0,010e/e	0,036d	0,037d	0,055c	0,054c	0,063b	0,062b	0,085a	0,083a	ns	***	ns	
<b>C20:4</b>	0,074e/e	0,25d	0,26d	0,38c <sup>2</sup>	0,40c <sup>1</sup>	0,43b	0,44b	0,59a	0,59a	*	***	ns	
<b>C22:4</b>	0,009e/e	0,028d	0,031d	0,043c	0,046c	0,052b <sup>2</sup>	0,056b <sup>1</sup>	0,077a	0,083a	**	***	ns	
<b>AGPI</b>	0,68e/e	2,24d	2,14d	3,29c	3,11c	3,74b <sup>1</sup>	3,40b <sup>2</sup>	5,61a <sup>1</sup>	4,94a <sup>2</sup>	***	***	**	
<b>P/S<sup>c</sup></b>	1,00c/c	1,38b <sup>1</sup>	1,23b <sup>2</sup>	1,43ab <sup>1</sup>	1,33a <sup>2</sup>	1,53a <sup>1</sup>	1,34a <sup>2</sup>	1,50a <sup>1</sup>	1,41a <sup>2</sup>	***	***	ns	
<b>Total</b>	2,13e/e	6,22d	6,16d	9,02c	8,52c	10,15b <sup>1</sup>	9,45b <sup>2</sup>	15,46a	13,85a	**	***	ns	

<sup>1,2</sup>: Medias con diferentes números en la misma etapa indican diferencias significativas (p<0,05) entre lotes. a, b, c, d, e: Medias con diferentes letras en el mismo lote indican diferencias significativas (p<0,05) entre etapas. <sup>a</sup>AGS: ácidos grasos saturados; AGMI: ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: ácidos grasos poliinsaturados. <sup>b</sup>L: lote, E: etapa, L×E: interacción entre lote y etapa. \* Diferencia significativa p<0,05; \*\* diferencia significativa p<0,01; \*\*\* diferencia significativa p<0,001; ns, diferencia no significativa. <sup>c</sup>P/S: Relación AGPI/AGS.

**Tabla 4.2.** Concentración de ácidos grasos de fosfolípidos (g/kg ms) medida durante el proceso de secado y envasado a vacío de los embutidos crudos curados

Ácidos Grasos <sup>a</sup>	0 días		14 días		31 días		45 días		105 días		L <sup>b</sup>	E	L×E
	Nitrito/Nitrato	Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato				
C14:0	0,12a/a	0,12a	0,13a	0,098b	0,10b	0,10b	0,093b	0,078c	0,088b	ns	***	ns	
C16:0	3,06a/a	2,88b	2,81b	2,50c	2,53c	2,34d	2,25d	1,55e <sup>2</sup>	1,84e <sup>1</sup>	ns	***	*	
C18:0	2,43a/a	1,57b	1,50b	1,44c	1,56b	1,27d	1,21c	0,77e <sup>2</sup>	1,00d <sup>1</sup>	ns	***	**	
AGS	5,60a/a	4,57b <sup>1</sup>	4,44b <sup>2</sup>	4,04c	4,18b	3,72d	3,56c	2,39e <sup>2</sup>	2,94d <sup>1</sup>	ns	***	**	
C16:1	0,17b/c	0,26a	0,27a	0,16b	0,13c	0,15b	0,14c	0,14b	0,15b	ns	***	ns	
C18:1	3,12c/bc	4,01a	3,74a	3,42b	3,28b	3,23bc	3,13bc	2,48d <sup>2</sup>	2,80d <sup>1</sup>	ns	***	ns	
C20:1	0,061a/a	0,056ab	0,054ab	0,056ab	0,057ab	0,052b	0,052ab	0,041c <sup>2</sup>	0,050b <sup>1</sup>	ns	***	ns	
AGMI	3,35c/bc	4,32a	4,07a	3,65b	3,50b	3,46bc	3,32bc	2,67d <sup>2</sup>	3,00c <sup>1</sup>	ns	***	ns	
C18:2	4,51a/a	4,57a <sup>1</sup>	3,98b <sup>2</sup>	3,08b	2,97c	2,50c	2,52d	1,80d	1,82e	*	***	*	
C18:3	0,10b/b	0,15a <sup>1</sup>	0,12a <sup>2</sup>	0,10b	0,092b	0,091c	0,092b	0,081c	0,070c	*	***	*	
C20:2	0,10a/a	0,10a <sup>1</sup>	0,092a <sup>2</sup>	0,086b <sup>1</sup>	0,072b <sup>2</sup>	0,070c	0,069b	0,052d	0,054c	*	***	ns	
C20:3	0,14a/a	0,12b	0,11b	0,087c	0,090b	0,060d	0,069c	0,035e	0,028d	ns	***	ns	
C20:4	1,29a/a	1,09b	1,03b	0,77c	0,86b	0,50d	0,64c	0,34e <sup>1</sup>	0,19d <sup>2</sup>	ns	***	ns	
C22:4	0,17a/a	0,14b	0,13bc	0,12b	0,14b	0,095c	0,11c	0,054d	0,041d	ns	***	ns	
AGPI	6,15a/a	6,02a <sup>1</sup>	5,33b <sup>2</sup>	4,07b	4,23c	3,21c	3,40d	2,30d	2,23e	ns	***	*	
P/S <sup>c</sup>	1,10b/ab	1,32a	1,20a	1,01bc	0,95b	0,87d	0,96b	0,97cd <sup>1</sup>	0,70c <sup>2</sup>	ns	***	*	
Total	15,10a/a	14,92b <sup>1</sup>	13,84b <sup>2</sup>	11,77c <sup>1</sup>	11,61c <sup>2</sup>	10,40d <sup>1</sup>	10,27d <sup>2</sup>	7,37e <sup>2</sup>	8,18e <sup>1</sup>	***	***	***	

<sup>1,2</sup>: Medias con diferentes números en la misma etapa indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre lotes. a, b, c, d, e: Medias con diferentes letras en el mismo lote indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre etapas. <sup>a</sup>AGS: ácidos grasos saturados; AGMI: ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: ácidos grasos poliinsaturados. <sup>b</sup>L: lote, E: etapa, L×E: interacción entre lote y etapa. \* Diferencia significativa  $p < 0,05$ ; \*\* diferencia significativa  $p < 0,01$ ; \*\*\* diferencia significativa  $p < 0,001$ ; ns, diferencia no significativa. <sup>c</sup>P/S: Relación AGPI/AGS.

**Tabla 4.3.** Concentración de los ácidos grasos de triglicéridos (g/kg ms) medida durante el proceso de secado y envasado a vacío de los embutidos crudos curados.

Ácidos Grasos <sup>a</sup>	0 días		14 días		31 días		45 días		105 días		L <sup>b</sup>	E	L×E
	Nitrito/Nitrato	Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato				
C14:0	3,84a/a	3,70a	4,17a	3,58a	3,88a	3,21b	3,42b	2,81b <sup>2</sup>	3,24b <sup>1</sup>	***	***	ns	
C16:0	67,02a/b	62,48b <sup>2</sup>	72,15a <sup>1</sup>	62,28b <sup>2</sup>	66,06b <sup>1</sup>	60,21b	65,03b	59,24b <sup>2</sup>	65,16b <sup>1</sup>	***	***	***	
C18:0	34,42a/ab	31,08b <sup>2</sup>	36,15a <sup>1</sup>	31,32b <sup>2</sup>	33,01b <sup>1</sup>	31,54b <sup>2</sup>	35,58ab <sup>1</sup>	31,76b <sup>2</sup>	34,81ab <sup>1</sup>	***	ns	*	
AGS	105,28a/b	97,26b	112,48b	97,18b <sup>2</sup>	102,95b <sup>1</sup>	94,9b <sup>2</sup>	104,08b <sup>1</sup>	93,82b <sup>2</sup>	103,21b <sup>1</sup>	***	***	***	
C16:1	7,15a/ab	6,56ab <sup>2</sup>	7,19a <sup>1</sup>	5,82bc	6,37ab	4,33d <sup>2</sup>	6,14b <sup>1</sup>	4,93cd	6,33ab	***	***	ns	
C18:1	126,29a/ab	115,92b <sup>2</sup>	125,13bc <sup>1</sup>	112,91d	114,10d	117,36b <sup>2</sup>	127,74a <sup>1</sup>	114,55bc <sup>2</sup>	124,13c <sup>1</sup>	***	***	***	
C20:1	2,43a/a	2,08ab	2,23ab	1,97b	2,03b	2,01b	2,20ab	1,98b	2,14b	*	***	ns	
AGMI	135,88a/a	124,56b <sup>2</sup>	134,55ab <sup>1</sup>	120,70c <sup>2</sup>	122,50c <sup>1</sup>	123,30bc <sup>2</sup>	136,98a <sup>1</sup>	121,46bc <sup>2</sup>	132,60b <sup>1</sup>	***	***	***	
C18:2	48,74a/a	45,85ab	44,60b	41,81c <sup>1</sup>	39,50c <sup>2</sup>	43,80bc	43,62b	43,79bc	42,78bc	ns	***	ns	
C18:3	3,17a/a	2,94ab	2,88b	2,61c	2,52c	2,68bc	2,66bc	2,63c	2,63bc	ns	***	ns	
C20:2	2,41a/a	2,09b	1,98b	2,04bc <sup>1</sup>	1,86bc <sup>2</sup>	1,82d	1,83bc	1,87cd	1,75c	ns	***	ns	
C20:3	0,81a/a	0,65b	0,63b	0,59c	0,61b	0,22d	0,24c	0,23d	0,18c	ns	***	ns	
C20:4	0,59a/a	0,13c	0,10c	0,35b	0,22bc	0,42b	0,52a	0,38b	0,32b	ns	***	ns	
C22:4	0,31a/a	0,23bc	0,22bc	0,20c	0,21c	0,24bc	0,28ab	0,26b	0,25bc	ns	***	ns	
AGPI	55,97a/a	51,87ab	50,31b	47,64c <sup>1</sup>	44,76c <sup>2</sup>	49,12bc	49,16b	49,20bc	47,91bc	ns	***	ns	
P/S <sup>c</sup>	0,53-/a	0,531	0,45b2	0,491	0,43b <sup>2</sup>	0,52	0,47b	0,521	0,43b <sup>2</sup>	***	*	ns	
Total	297,13a/b	273,68b <sup>2</sup>	297,34a <sup>1</sup>	265,52d <sup>2</sup>	270,22e <sup>1</sup>	267,87c <sup>2</sup>	290,22c <sup>1</sup>	264,48e <sup>2</sup>	283,72d <sup>1</sup>	***	***	***	

<sup>1,2</sup>: Medias con diferentes números en la misma etapa indican diferencias significativas (p<0,05) entre lotes. a, b, c, d, e: Medias con diferentes letras en el mismo lote indican diferencias significativas (p<0,05) entre etapas. <sup>a</sup>AGS: ácidos grasos saturados; <sup>a</sup>AGMI: ácidos grasos monoinsaturados; <sup>a</sup>AGPI: ácidos grasos poliinsaturados. <sup>b</sup>L: lote, E: etapa, L×E: interacción entre lote y etapa. \* Diferencia significativa p<0,05; \*\* diferencia significativa p<0,01; \*\*\* diferencia significativa p<0,001; ns, diferencia no significativa. <sup>c</sup>P/S: Relación AGPI/AGS.

grasos de TG fue mayor ( $p < 0,001$ ) en los embutidos fabricados con nitrito (**Tabla 4.3**). Las diferencias fueron significativas ( $p < 0,001$ ) para AGS y AGMI a lo largo de todo el proceso, en particular para los ácidos grasos C16:0, C18:0, C16:1 y C18:1.

El efecto del tiempo de proceso en las diferentes fracciones lipídicas fue en general el esperado. Los AGL mostraron un incremento en la proporción de AGPI respecto a los AGS, de acuerdo con lo anteriormente descrito por Navarro *et al.* (1997) y Zanardi *et al.* (2004). Los FL disminuyeron durante el proceso de maduración tal como Johansson *et al.* (1994) y Navarro *et al.* (1997) describieron previamente. Con respecto a los TG, esta fracción mostró una alta liberación de ácidos grasos dado que fue la fracción más abundante en la grasa del embutido. En general, considerando la cantidad de ácidos grasos hidrolizados de FL y TG al final del proceso, la mayoría de los AGL procedían de la fracción de los TG, tal como ya indicaron Molly *et al.* (1996). Además, se observó una elevada especificidad para hidrolizar los ácidos grasos de FL comparados con los de TG, cuando se expresó la fracción hidrolizada como el porcentaje respecto a la cantidad inicial de ácidos grasos presente en cada fracción: 2,5 % de los PL y un 2 % de los TG, lo cual también coincide con lo indicado por Molly *et al.* (1996).

El efecto que produjo la adición de nitrito y nitrato, sin tener en cuenta el almacenamiento a vacío, coincide con los resultados de Navarro *et al.* (2001). Por el contrario, estos resultados no coincidieron con los obtenidos por Navarro *et al.* (1998), en embutidos sometidos a

fermentación rápida, donde no se encontraron diferencias significativas entre los lotes fabricados con nitrito o nitrato. Las diferencias entre estos dos trabajos se debieron probablemente al efecto de la etapa de estufaje que se aplicó en el primer trabajo y no se aplicó en el actual.

#### 4.3.5 Compuestos Volátiles

Un total de 101 compuestos se identificaron en los embutidos crudos curados por extracción con SPME del espacio de cabeza. Todos los compuestos encontrados, incluso aquellos que aparecen en cantidades traza, aparecen listados y cuantificados en la **Tabla 4.4**. Según el grupo químico se encontraron: 19 alcoholes, 19 aldehídos, 11 cetonas, 10 ácidos carboxílicos, 12 ésteres, 4 compuestos azufrados, 2 furanos, 23 hidrocarburos y cloroformo. La mayoría de estos compuestos fueron previamente aislados e identificados en embutidos crudos curados (ver capítulo anterior, **tabla 3.1**; Flores *et al.*, 2004) utilizando el mismo procedimiento de extracción. Estudios realizados en embutidos por otros autores (Berdagué *et al.*, 1993; Stahnke, 1999; Olesen *et al.* 2004) también han identificado la mayoría de estos compuestos, excepto metanotiol, 2-metoxi-propanol, propil-benceno y 2-etil-4-pental. De cualquier modo, estos últimos compuestos se identificaron únicamente de manera tentativa por espectrometría de masas ya que no se confirmó el tiempo de retención mediante la utilización de estándares auténticos.

Los compuestos volátiles se agruparon según su posible origen en: productos de la auto-oxidación lipídica y productos del metabolismo



bacteriano (**tabla 4.4**). El segundo grupo se dividió a su vez en 4 subgrupos: productos de la fermentación de carbohidratos, productos del catabolismo de aminoácidos, productos de la actividad esterasa de estafilococos y productos de la  $\beta$ -oxidación de lípidos. Algunos de los compuestos listados pueden tener más de un origen pero se incluyeron en el origen mayoritario de acuerdo con lo indicado por Ordóñez *et al.* (1999). Berdagué *et al.* (1993) definió también un grupo en el que incluía compuestos procedentes del pienso y varios contaminantes tales como cloroformo, limoneno, tolueno y los isómeros xilenos.

Se considera que los compuestos volátiles procedentes de la auto-oxidación lipídica son esenciales en el aroma característico de los productos cárnicos (Shahidi *et al.*, 1986). Muchos de los compuestos de este grupo (aldehídos, cetonas insaturadas y alquil-furanos) tienen una gran variedad de notas aromáticas y sus olores han sido descritos como aceitoso, seboso, refrito, verde, metálico, pepino, champiñón y afrutado (Ullrich y Grosch, 1987). Este grupo de compuestos fue el mayoritario durante todo el proceso de maduración, representando a los 105 días el 45 y 34 % de los compuestos volátiles totales extraídos del embutido en los lotes con nitrito y nitrato, respectivamente. En ambos lotes, los compuestos volátiles procedentes de la auto-oxidación lipídica mostraron un incremento muy acusado hasta el día 31 y posteriormente decrecieron más lentamente entre los días 45 y 105 (**figura 4.5**). No se observaron diferencias significativas entre lotes durante el proceso. El hexanal es el producto más abundante de la oxidación lipídica en productos cárnicos y por tanto, en numerosas ocasiones se le ha elegido como índice del nivel

**Tabla 4.4.** Compuestos volátiles cuantificados como UA×10<sup>-6</sup>/g ms en los

N <sup>a</sup>	Compuesto/ Origen	IK <sup>b</sup>	F <sup>c</sup>	0 días		14 días	
				Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato
<i>Auto-oxidación Lipídica</i>							
2	Pentano	499	a	17,18b	41,86a	21,17b	23,90b
4	Propanal	521	a	12,08		6,23	6,45
8	Hexano	599	a	3,85abc	6,74a	2,12b <sup>2</sup>	3,65b <sup>1</sup>
9	1-propanol	611	a	2,30b	3,31a	2,68ab	2,22ab
10	Butanal	621	a	0,86c	2,68	1,37bc	1,18
19	1-Hepteno	694	a			0,37b	0,53b
20	Heptano	701	a	1,15c <sup>2</sup>	3,18c <sup>1</sup>	5,55b <sup>2</sup>	11,79b <sup>1</sup>
21	2-etil-furano (81) <sup>e</sup>	718	a			0,32b	0,37b
24	1-butanol (56)	726	a			0,39	
25	1-Penten-3-ona (55)	728	a				
27	Pentanal (44)	736	a	0,65c	2,13c	10,39b	10,69b
39	Octano	801	a	2,21c <sup>2</sup>	5,93b <sup>1</sup>	5,87b <sup>2</sup>	14,48a <sup>1</sup>
40	2-pentenal	805	a			2,80b <sup>2</sup>	5,23b <sup>1</sup>
41+ 43	2-octeno (Z)	811/ 821	a		2,41ab <sup>1</sup>	1,23b <sup>2</sup>	2,03b
42	Ácido propanoico	815	a	0,26c	0,50d	2,19b <sup>2</sup>	2,86c <sup>1</sup>
44	1-pentanol	828	a	1,90c	5,54ab	2,86bc	3,67b
46	Hexanal	842	a	26,95d <sup>2</sup>	52,80c <sup>1</sup>	202,73c	217,70b
56	Nonato	901	a			039b <sup>2</sup>	0,66 <sup>1</sup>
57	2-hexenal	904	a			0,63b	0,79b
61	1-hexanol	925	a	2,18b <sup>2</sup>	3,92b <sup>1</sup>	5,38b	5,96ab
63	Heptanal	941	a	1,06c	3,36b	3,16bc	4,53b
68	2,4-hexadienal	970	a			0,19b	0,24b
70	Ácido pentanoico	983	a	0,24c	0,28c	0,78b <sup>2</sup>	0,96b <sup>1</sup>
72	Decano	1000	a	0,49ab	0,54ab	0,41b	0,50b
74	2-etil-4-pentenal	1006	b			0,16 <sup>2</sup>	0,50b <sup>1</sup>
75	2-pentil-furan (81)	1008	a			0,17b	0,21b
76	2-heptenal (41)	1008	a				0,17ab
78	Butirolactona	1016	a	0,32d	0,55bc	0,43cd	0,44c

embutidos crudos curados durante el proceso de secado y envasado a vacío.

31 días		45 días		105 días		L <sup>d</sup>	E	LxE
Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato			
42,38ab <sup>1</sup>	17,85b <sup>2</sup>	22,84b	19,17b	31,85a <sup>1</sup>	20,53b <sup>2</sup>	ns	ns	**
8,57	6,07	8,64	6,59	6,03	4,81	*	**	ns
3,24b	2,78b	3,15b	2,84b	5,11a	3,43b	ns	**	*
2,97a <sup>1</sup>	1,74b <sup>2</sup>	2,33b <sup>1</sup>	1,41b <sup>2</sup>	2,18b	1,65b	*	ns	*
2,05ab	1,34	2,16a	1,76	1,70ab	1,30	ns	ns	*
1,05a	0,89a	1,11a	1,08 <sup>a</sup>			ns	***	ns
15,93a	13,03ab	16,34a	17,34 <sup>a</sup>	19,19a	14,63ab	ns	***	*
0,98ab	1,11a	0,91ab	0,73ab	1,01a	0,50b	ns	*	ns
0,41 <sup>1</sup>	0,26 <sup>2</sup>	0,38	0,29	0,35	0,32	*	ns	
0,58ab	0,40	0,69a <sup>1</sup>	0,40 <sup>2</sup>	0,32b	0,34	ns	ns	ns
18,55a	13,48ab	18,08a	18,11 <sup>a</sup>	13,34ab	11,32ab	ns	***	ns
12,82a	11,82a	11,64a	15,96 <sup>a</sup>	13,14a	13,16a	**	***	*
6,24ab	5,34b	6,38ab	7,42 <sup>a</sup>	9,07a	6,55ab	ns	***	ns
2,44a	2,41ab	2,41a	3,20 <sup>a</sup>	2,07ab	2,71ab	*	*	
4,15a	4,06b	3,94a	4,41ab	4,71a	4,83a	ns	***	ns
8,62a	4,85ab	7,56a	7,43 <sup>a</sup>	5,82ab	4,08b	ns	***	ns
360,82a	314,20a	320,20ab	291,51ab	238,03ab	222,29b	ns	***	ns
0,68a <sup>2</sup>	0,88 <sup>1</sup>	0,42b <sup>2</sup>	0,71a <sup>1</sup>		0,67	***	**	
1,77a	1,24ab	1,66a	1,84 <sup>a</sup>	0,89b	1,12ab	ns	***	ns
17,99a <sup>1</sup>	5,72ab <sup>2</sup>	14,54a	8,06 <sup>a</sup>	17,01a <sup>1</sup>	6,24ab <sup>2</sup>	***	***	***
8,05a	6,55ab	7,29a	9,22 <sup>a</sup>	5,97ab	5,25ab	ns	***	ns
0,39a	0,42a	0,21b	0,24b	0,35ab		ns	***	
1,41a <sup>1</sup>	1,15ab <sup>2</sup>	1,03b	1,23 <sup>a</sup>	1,00b	1,08ab	ns	***	*
0,43b	0,43b	0,44ab	0,70 <sup>a</sup>	0,84a	0,55ab	ns	ns	ns
0,26 <sup>2</sup>	0,75a <sup>1</sup>	0,25 <sup>2</sup>	0,55b <sup>1</sup>	0,18 <sup>2</sup>	0,55b <sup>1</sup>	***	**	ns
0,44a	0,41ab	0,39a	0,52 <sup>a</sup>	0,29ab	0,27ab	ns	**	ns
0,29ab	0,28a	0,32a	0,26ab	0,15b	0,14b	ns	**	
0,64b	0,65bc	0,58bc <sup>2</sup>	0,75b <sup>1</sup>	2,22a	2,32a	ns	***	ns

Tabla 4.4. Continuación.

N	Compuesto/ Origen	IK	F	0 días		14 días	
				Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato
79	1-octen-3-ona	1018	b	0,23b	0,31b	0,30b	0,40b
80	1-heptanol	1020	a				
85	Octanal	1042	a	1,67c	2,36b	3,68ab	3,49ab
88+ 89+9 90	2,4-Heptadienal	1058/ 1063/ 1072	a			0,13b	0,17b
91	Ácido hexanoico	1077	a	1,28c	1,37c	5,60b	5,97b
92	Undecano	1100	a	0,39a			
96	2-octenal	1114	a		0,48	0,44b	0,59
97	1-octanol	1125	a		0,46b	0,53b	0,56b
99	Nonanal	1149	a	1,38	2,14	1,81	1,74
100	Ácido heptanoico	1177	a		0,36a		
102	Dodecano	1200	a				
103	2-nonenal	1225	a	1,17ab		0,14b	0,13b
105	Ácido octanoico	1264	a	0,18c	0,18b	0,42b <sup>2</sup>	0,58a <sup>1</sup>
<b>Metabolismo Bacteriano</b>							
<b><i>β-oxidacion Lipídica</i></b>							
26	2-pentanona (43)	731	a	1,16bc <sup>1</sup>	0,63a <sup>2</sup>	1,91a <sup>1</sup>	0,71a <sup>2</sup>
28	3-pentanona / 1-penten-3-ol	740	b	3,67b	5,14b		5,60b
31	2-pentanol	755	a	0,25c		1,07b	0,71b
62	2-heptanona	935	a	1,03b	1,44b	4,58a <sup>1</sup>	3,02a <sup>2</sup>
65	2-heptanol	950	a	0,58		0,33	0,43b
82	1-octen-3-ol	1026	a	1,40c	3,02b	2,88bc	3,44b
83	2-octanona	1034	a	0,091		0,13	0,15
98	2-nonanona	1140	a			0,81a <sup>1</sup>	0,48 <sup>2</sup>
<b><i>Fermentación de Carbohidratos</i></b>							
3	Etanol	506	a	20,90c	21,87c	66,26a	56,56a
5	Acetona	526	a	22,67a <sup>1</sup>	14,17a <sup>2</sup>	10,06b <sup>1</sup>	7,52b <sup>2</sup>
11	2-butanona	630	a	7,26ab	7,86b	8,72a <sup>2</sup>	22,82a <sup>1</sup>
13	2-butanol	642	a	0,40b	0,39c	1,56b <sup>2</sup>	5,79b <sup>1</sup>
22	Ácido acético	720	a	4,44d	6,30c	127,65c <sup>2</sup>	209,54b <sup>1</sup>
33	Acetoína (3-hidroxi-2-butanona)	780	a	15,71a	15,92a	6,40b <sup>2</sup>	18,26a <sup>1</sup>
52+ 54	2,3-butanodiol	885/ 892	a			1,19c <sup>2</sup>	34,15b <sup>1</sup>
55	Ácido butanoico	898	a	4,17b	2,78c	21,92a	21,52b

31 días		45 días		105 días		L	E	LxE
Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato			
1,22a	0,88a	1,26a	0,99a	0,49b	0,73ab	ns	***	ns
0,73		0,58	0,72a	0,57	0,40b	ns	ns	
4,40a	4,76a	2,93bc	3,68ab	2,71bc	2,10b	ns	***	ns
0,64a	0,76a	0,62a	0,63a	0,76a	0,78a	ns	***	ns
7,92a	6,72b	6,53ab	8,56a	6,51ab	7,07b	ns	***	ns
0,30a		0,13b	0,17	0,19b	0,11	ns	**	
1,27a	0,90	0,90ab	0,81	0,30b	0,50	ns	**	
0,79a	0,90a	0,38b	0,64ab	0,47b	0,37b	ns	***	
1,96	1,69	1,86	2,35	2,16	1,50	ns	ns	ns
		0,065b		0,19a <sup>1</sup>	0,11b <sup>2</sup>	ns	**	
	0,062	0,23	0,044	0,077	0,070	ns	ns	
0,16b	0,27b	0,16b	0,16b	0,35a	0,30a	ns	**	
0,69a	0,65a	0,45b <sup>2</sup>	0,66a <sup>1</sup>	0,41b	0,64a	**	***	ns
0,72cd <sup>1</sup>	0,31b <sup>2</sup>	0,56d	0,46b	1,56ab <sup>1</sup>	0,63a <sup>2</sup>	***	***	**
9,67a <sup>1</sup>	6,66ab <sup>2</sup>	9,56a	7,76a	7,07a	6,17ab	ns	***	
2,13a <sup>1</sup>	1,36a <sup>2</sup>	2,27a <sup>1</sup>	1,29ab <sup>2</sup>	2,13a	1,64a	***	***	
4,72a <sup>1</sup>	2,89a <sup>2</sup>	4,06a	3,13a	3,56a	2,97a	***	***	*
0,46 <sup>2</sup>	0,94a <sup>1</sup>	0,48	0,58b		0,54b	**	*	
6,64a	5,40a	4,43b	4,67ab	3,93b	3,76ab	ns	***	ns
0,26	0,17	0,25	0,14	0,25 <sup>1</sup>	0,13 <sup>2</sup>	*	ns	
0,69a <sup>1</sup>	0,48 <sup>2</sup>	0,38b	0,36	0,43b	0,36	***	***	*
54,84ab	55,59a	43,92b	41,98b	61,04ab <sup>1</sup>	31,25c <sup>2</sup>	*	***	*
7,93b <sup>1</sup>	6,31b <sup>2</sup>	8,13b	6,48b	7,12b	6,33b	***	**	ns
7,44ab	7,62b	5,37bc	5,61b	4,91c	6,90b	***	***	***
4,14a <sup>2</sup>	10,09a <sup>1</sup>	4,13a <sup>2</sup>	7,80ab <sup>1</sup>	3,04a <sup>2</sup>	9,91ab <sup>1</sup>	***	***	*
166,27b <sup>2</sup>	227,00b <sup>1</sup>	164,39b <sup>2</sup>	212,18b <sup>1</sup>	203,98a <sup>2</sup>	277,31a <sup>1</sup>	***	***	**
2,21c <sup>2</sup>	7,73b <sup>1</sup>	2,54c <sup>2</sup>	7,69b <sup>1</sup>	3,19c <sup>2</sup>	18,98a <sup>1</sup>	***	***	***
5,22ab <sup>2</sup>	44,77b <sup>1</sup>	4,21b <sup>2</sup>	48,32ab <sup>1</sup>	6,27a <sup>2</sup>	62,98a <sup>1</sup>	***	**	*
24,15a	23,33ab	23,15a	22,67ab	22,09a	24,88a	ns	***	ns

Tabla 4.4. Continuación

N	Compuesto/ Origen	IK	F	0 días		14 días	
				Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato
<i>Catabolismo de Aminoácidos</i>							
7	2-metil-propanal	590	a	2,04	2,3a	1,16	0,93b
16	Benceno	676	a	0,18c	0,22ab	0,21bc	0,18b
17	2-metil-1-propanol	681	a	0,61c	0,60b	1,97b <sup>1</sup>	0,53b <sup>2</sup>
18	3-metil-butanal	690	a	1,35c	0,78b	3,65c <sup>2</sup>	5,76b <sup>1</sup>
23	1-metoxi-2-propanol (45)	723	a				
32	Dimetil disulfuro	771	a		0,20b	0,20c <sup>1</sup>	0,06b <sup>2</sup>
34	Tolueno (91)	788	a	0,66	1,23a	0,43	0,36b
36	3-metil-3-buten-1-ol	790	a	2,21ab	1,86	2,03ab	1,65
37	3-metil-1-butanol	795	a	1,86b	2,05c	8,77b <sup>2</sup>	20,16ab <sup>1</sup>
38	2-metil-1-butanol	797	a	1,23b	0,98d	2,81b <sup>2</sup>	4,62c <sup>1</sup>
48	Ácido 2-metil-propanoico	868	a			1,65c <sup>2</sup>	2,79b <sup>1</sup>
64	Ácido 3-metil-butanoico	946	a	0,37c		2,46b <sup>2</sup>	13,06b <sup>1</sup>
66	Ácido 2-metil-butanoico	952	a	0,060d		1,48c <sup>2</sup>	3,07c <sup>1</sup>
67	Metional (3-metiltio-propanal)	968	a	0,18c		0,32bc	0,34b
77	Benzaldehido	1013	a	0,33b	0,36b	0,95a	1,15a
94	Fenilacetaldehido	1105	a	0,23a	0,16b	0,13bc <sup>2</sup>	0,46a <sup>1</sup>
95	Fenol	1112	a	0,22c		1,39a	1,38
101	Fenil etil alcohol	1192	a				0,41b
<i>Actividad Esteras de Estafilococos</i>							
12	Acetato de etilo	634	a			29,68a	37,80a
29	Propanoato de etilo	742	a			4,48b	4,19
30	Acetato de propilo	747	a			1,26	1,21b
35	2-metil-propanoato de etilo (43)	788	a				
45	Butanoato de etilo	832	a	2,52c	3,02b	5,32b	4,81b
47	Lactato de etilo (2-hidroxi-propanoato de etilo)	866	a			1,90b	2,44c
49	2-metil-butanoato de etilo	878	a			0,29b <sup>2</sup>	0,65b <sup>1</sup>
50	3-metil-butanoato de etilo	882	a			0,47b <sup>2</sup>	1,81b <sup>1</sup>
58	Acetato de 3-metil-1-butilo	907	a			0,67b <sup>2</sup>	1,27c <sup>1</sup>
59	Acetato de 2-metil-1-butilo	909	a			0,58b <sup>2</sup>	0,99c <sup>1</sup>

31 días		45 días		105 días		L	E	LxE
Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato			
1,40	2,17a	1,62	2,04a	1,32	1,84a	ns	ns	ns
0,37a <sup>1</sup>	0,26ab <sup>2</sup>	0,29abc	0,33a	0,30ab	0,29a	ns	**	ns
2,51ab	1,26b	2,98ab <sup>1</sup>	1,17b <sup>2</sup>	3,41a	2,99a	***	***	ns
9,25b	10,46b	8,27b	8,20b	15,20a	21,91a	ns	***	ns
				2,742	21,391	***		
0,42bc	0,24b	0,75b <sup>1</sup>	0,38b <sup>2</sup>	1,36a	0,77a	**	***	
0,70 <sup>1</sup>	0,49b <sup>2</sup>	0,52	0,63ab	0,44	0,55ab	ns	*	ns
2,54a <sup>1</sup>	1,722	2,00ab	1,74	1,74b	1,88	*	ns	ns
20,17a	24,84ab	20,94a	19,10b	22,01a	26,49a	*	***	ns
6,35a	7,12ab	6,97a	5,59bc	7,53a	9,30a	ns	***	ns
3,37b <sup>2</sup>	5,69a <sup>1</sup>	4,05ab	4,89a	4,60a	4,49a	***	***	*
4,95a <sup>2</sup>	16,93ab <sup>1</sup>	5,21a <sup>2</sup>	14,24ab <sup>1</sup>	4,31a <sup>2</sup>	17,39a <sup>1</sup>	***	**	
3,14a <sup>2</sup>	4,89a <sup>1</sup>	2,02b <sup>2</sup>	3,48bc <sup>1</sup>	2,30b <sup>2</sup>	4,03ab <sup>1</sup>	***	***	
0,62a	0,59a	0,55a	0,66a	0,43ab	0,57ab	ns	***	ns
1,32a	1,31a	1,05a	1,44a	1,04a	1,57a	*	***	ns
0,17ab <sup>2</sup>	0,45a <sup>1</sup>	0,094c <sup>2</sup>	0,38ab <sup>1</sup>	0,19ab <sup>2</sup>	0,40a <sup>1</sup>	***	**	ns
1,33ab	1,25	0,97b	1,20	0,86b <sup>2</sup>	1,311	ns	***	
0,23 <sup>2</sup>	0,84a <sup>1</sup>	0,16 <sup>2</sup>	0,67ab <sup>1</sup>	0,16 <sup>2</sup>	0,59ab <sup>1</sup>	***	**	
19,86bc	23,82b	15,57c	14,58c	25,81ab <sup>1</sup>	14,07c <sup>2</sup>	ns	***	*
7,64a	6,11	7,05a	6,88	7,15a	6,65	ns	*	ns
1,61	1,37ab	1,74	1,59ab		1,72a	ns	*	
0,11	0,17a	0,13 <sup>1</sup>	0,075b <sup>2</sup>	0,16 <sup>1</sup>	0,042b <sup>2</sup>	*	ns	**
9,39a	8,23a	7,27ab	8,21a	7,94ab <sup>1</sup>	4,77b <sup>2</sup>	ns	***	ns
4,71a	6,06a	4,19a	4,49b	6,10a <sup>1</sup>	2,06c <sup>2</sup>	ns	***	***
0,55a <sup>2</sup>	1,19a <sup>1</sup>	0,44ab <sup>2</sup>	0,68b <sup>1</sup>	0,54a	0,55b	***	***	**
0,95a <sup>2</sup>	3,46a <sup>1</sup>	0,75ab <sup>2</sup>	2,02b <sup>1</sup>	0,80a <sup>2</sup>	1,18a <sup>1</sup>	***	***	***
1,39a <sup>2</sup>	1,96b <sup>1</sup>	1,44a	1,97b	1,67a <sup>2</sup>	2,52a <sup>1</sup>	***	***	ns
1,25a	1,48b	1,18a <sup>2</sup>	1,64ab <sup>1</sup>	1,42a <sup>2</sup>	1,84a <sup>1</sup>	***	***	ns

Tabla 4.4. Continuación

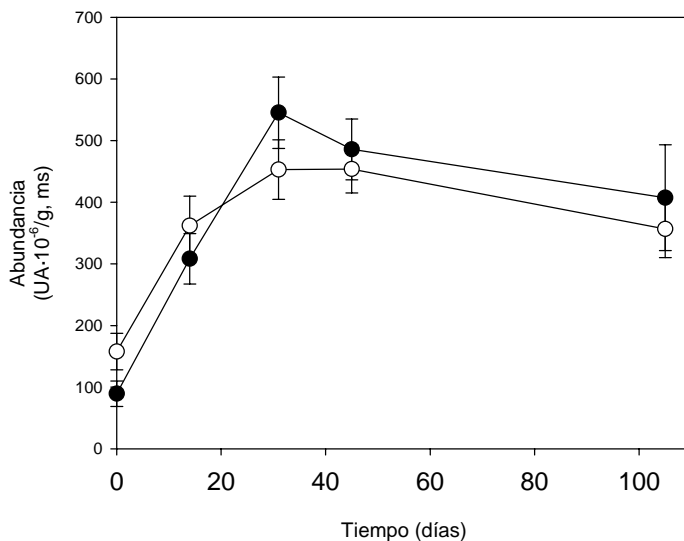
N	Compuesto/ Origen	IK	F	0 días		14 días	
				Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato
81	Hexanoato de etilo	1024	a			1,00b	0,85b
104	Octanoato de etilo	1225	a	0,18ab	0,14c	0,26a	0,26ab
<i>Origen Desconocido, Contaminantes de Carne o Pienso</i>							
1	Metanotiol	472	a			33,70a	28,62
6	Disulfuro de carbono	535	a	440,52a	524,39a	56,80b	93,04b
14	Cloroformo	646	a	2,39	0,89	1,18	
15	HCR1	668				0,21b	
51	m,p-xileno	882	a	0,37	0,48		
53	o-xileno	890	a	0,58	0,77		
60	Estireno	918	a	0,34			
69	Propilbenceno	973	a			0,18	0,22b
71	HCR2	994		0,81b	0,28b	2,23a	2,14a
73	HCA1	1002					
84	Limoneno	1041	a	0,39a	0,61	0,17b	0,29
86	HCR3	1051		0,31		0,45	0,45b
87	HCR4	1055				0,48a	0,52b
93	Dimetoxibenceno	1102	b			0,23	0,18b
	TOTAL			604b	734b	660b	896ab

UA: Unidades de área resultantes del recuento de cromatograma de iones totales significativas ( $p < 0,05$ ) entre lotes. a, b, c, d, e: Medias con diferentes letras en el mismo cromatograma según elución. <sup>b</sup>IK: Índice de Kovats calculado para una columna capilar identificación. a, espectro de masas y tiempo de retención idéntico con un estándar identificación por espectro de masas. <sup>d</sup>L: lote; E: etapa; LxE: interacción entre lote y diferencia significativa  $p < 0,001$ ; ns, diferencia no significativa. <sup>E</sup> Ratio masa/carga del resolver completamente. HCR: hidrocarburo ramificado; HCA: hidrocarburo



31 días		45 días		105 días		L	E	LxE
Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato			
2,23a	1,85a	1,64ab	1,49ab	2,02ab	1,25ab	ns	*	ns
0,26a <sup>2</sup>	0,32a <sup>1</sup>	0,14b <sup>2</sup>	0,23b <sup>1</sup>	0,24ab	0,23a	ns	***	ns
27,36b	27,47	27,46b	26,29	27,31b	30,56	ns	ns	ns
71,44b	69,05b	67,05b	80,82b	74,09	107,91b	ns	***	ns
				1,57		ns	ns	
0,14b		0,43a	0,28		0,34	ns	*	
						ns		
	1,35					ns	ns	
0,42	0,59b	0,34	0,55b	0,422	0,81a1	***	ns	
0,38	0,33ab	0,45	0,40a	0,30	0,35ab	ns	ns	ns
1,81ab	3,36a					ns	**	ns
0,20a	0,20	013b2	0,221			ns	ns	
0,44a	0,53	0,16b	0,28	0,30ab	0,25	ns	**	ns
0,34 <sup>2</sup>	0,87a <sup>1</sup>			0,29 <sup>1</sup>	0,082b <sup>2</sup>	ns	ns	
0,56a <sup>2</sup>	0,97a <sup>1</sup>	0,17b	0,19c	0,089b <sup>2</sup>	0,16c <sup>1</sup>	*	***	ns
	0,38a			0,19		ns	*	
1035a	967ab	944a	906ab	935a <sup>2</sup>	1080a <sup>1</sup>	*	***	ns

(TIC).<sup>1,2</sup>: Medias con diferentes números en la misma etapa indican diferencias lote indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre etapas. <sup>a</sup>Número de pico en el DF-624 (J&W Scientific: 30 m, 0,25mm d.i., 1,4  $\mu$ m espesura del film) <sup>c</sup>Fiabilidad de la auténtico; b, espectro de masas e IK de acuerdo con la literatura; c, tentativa de etapa. \* Diferencia significativa  $p < 0,05$ ; \*\* diferencia significativa  $p < 0,01$ ; \*\*\* ion característico utilizado para la cuantificación en el caso de picos que no se pueden aromático.



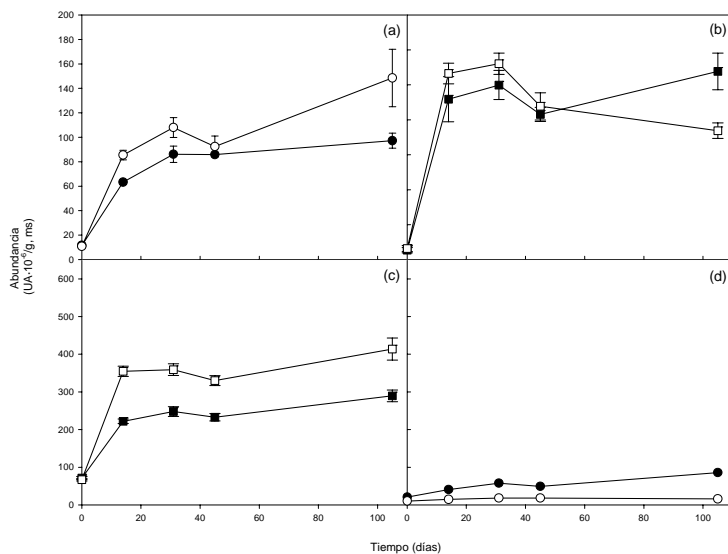
**Figura 4.5.** Área total de los compuestos volátiles de embutidos crudos curados procedentes de la auto-oxidación lipídica extraídos a lo largo del proceso de maduración por la técnica de SPME en el espacio de cabeza. Lote fabricado con nitrito (●) y nitrato (○). Los símbolos representan la media y la desviación estándar de las medidas.

de oxidación lipídica (Wu y Sheldon, 1988; Brunton *et al.*, 2000). En el presente estudio, el hexanal fue el compuesto más abundante en todas las etapas y lotes, y su área aumentó a lo largo del proceso de secado, disminuyendo ligeramente durante la etapa de envasado a vacío (**tabla 4.4**). En ningún momento a lo largo de todo el proceso se encontraron diferencias significativas en los niveles de hexanal entre lotes. Esto pudo ser debido a la gran variabilidad de su área, que representó un 25 % y

21 % del área total de los compuestos volátiles extraídos de los embutidos fabricados con nitrito y nitrato, respectivamente. No se encontró correlación alguna entre el área de hexanal y los niveles de TBARS, pero los resultados podrían haber sido diferentes si se hubiera utilizado para la extracción una fase estacionaria de SPME que fuera más selectiva para el hexanal. Otros compuestos presentes en grandes cantidades dentro de este grupo fueron los hidrocarburos de bajo peso molecular como el pentano, el hexano y el octano, sin embargo estos compuestos no contribuyen de manera importante al perfil aromático debido a sus altos umbrales de detección (Shahidi *et al.*, 1986). Stahnke (1995b), en embutidos fabricados con diferentes niveles de nitrito y nitrato, encontró que el nitrato incrementaba fuertemente la generación de aldehidos lineales, pero este efecto no fue observado en el trabajo actual.

Los compuestos procedentes de la  $\beta$ -oxidación lipídica, producida principalmente por estafilococos como parte de su metabolismo, representaron únicamente el 2 % y el 1 % de los compuestos volátiles totales extraídos de muestras fabricadas con nitrito o nitrato, respectivamente; y su área total fue siempre mayor ( $p < 0,001$ ) en las muestras con nitrito (**figura 4.6 d**).

El área de los compuestos volátiles derivados de la fermentación de carbohidratos por parte de los microorganismos en el embutido (**figura 4.6 c**) mostró un incremento continuo hasta el día 14, y a partir de entonces siguió aumentando a un ritmo más lento. La proporción de



**Figura 4.6.** Área total de los compuestos volátiles de embutidos crudos curados procedentes del metabolismo bacteriano extraídos por la técnica de SPME del espacio de cabeza. Compuestos volátiles procedentes (a) del catabolismo de aminoácidos; (b) actividad esterasa de estafilococos; (c) fermentación de carbohidratos; (d)  $\beta$ -oxidación de lípidos. Lote fabricado con nitrito (●) y nitrato (○). Los símbolos representan la media y la desviación estándar de las medidas.

estos compuestos fue mayor en el lote fabricado con nitrato ( $p < 0,05$ ) que en el lote con nitrito. A los 105 días del proceso de maduración, estos compuestos representaron el 38 % y el 31 % de los compuestos totales, en los lotes fabricados con nitrito y nitrato, respectivamente. En este grupo, el compuesto más abundante fue el ácido acético que representó el 26 % y el 22 % del área de compuesto volátiles totales

extraídos en los lotes fabricados con nitrato y nitrito, respectivamente. Los compuestos que le siguieron en abundancia, en porcentaje respecto al área total de este grupo, fueron etanol (20 %) y ácido butanoico (8 %) en el lote con nitrito y 2,3-butanodiol (15 %) en el lote con nitrato. En cuanto a los compuestos con un umbral de detección más bajo cabe destacar los ácidos butanoico y acético y el 2-butanol (van Gemert, 2004). La generación de 2-butanol, ácido acético, acetoína y 2,3-butanodiol fue mayor ( $p < 0,05$ ) en el lote fabricado con nitrato a lo largo de todo el proceso. Cabe destacar, que al final del proceso (105 días), el 2,3-butanodiol y la acetoína presentaron áreas 10 y 6 veces mayores, respectivamente, que en el lote fabricado con nitrito. Los compuestos 2,3-butanodiol y acetoína, junto con el diacetilo (compuesto que no se detectó en el presente trabajo) son subproductos del metabolismo de las bacterias lácticas que comparten rutas de generación (Axelsson, 1998). Las bacterias lácticas son la fuente de generación más probable para estos compuestos volátiles, dado que son la principal población en número y su crecimiento fue mayor en el lote fabricado con nitrato. Sin embargo, diacetilo y acetoína también son producidos en grandes cantidades por los estafilococos de acuerdo con lo indicado por Stahnke (1999). A su vez, el 2,3-butanodiol es producido por reducción de las metil-cetonas generadas por estafilococos en la  $\alpha$ -oxidación de los ácidos grasos, y la acetoína se puede formar a través de la oxidación química del 2,3-butanodiol (Schmidt y Berger; 1998b). En embutidos fabricados utilizando *S. xylosus* como estárter, Olesen *et al.* (2004) también encontraron que la cantidad de 2,3-butanodiol era mayor en las muestras

fabricadas con nitrato, al igual que en el presente trabajo; sin embargo la cantidad de acetoína era mayor en las muestras fabricadas con nitrito.

Los compuestos volátiles que tienen su origen en la degradación de aminoácidos, presentan diferentes estructuras dependiendo de si provienen de aminoácidos ramificados, azufrados o aromáticos. Los aminoácidos ramificados (Val, Leu e Ile) generan aldehídos, alcoholes y ácidos de cadena ramificada de gran importancia en el aroma de los embutidos (Stahnke, 1994; Stahnke, 1995b). Los compuestos volátiles procedentes de la degradación de aminoácidos, supusieron el 10 % y el 14 % del área de compuestos volátiles totales extraídos a los 105 días en el lote fabricado con nitrito y nitrato, respectivamente. El área de este grupo (**figura 4.6 a**), mostró un rápido incremento con al tiempo de maduración en ambos lotes a lo largo del proceso de secado, hasta los 31 días, y después, la generación se ralentizó permaneciendo estable hasta el final del proceso (105 días). Respecto al uso de las diferentes sales de curado, la proporción de compuestos procedentes del catabolismo de aminoácidos fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en el lote fabricado con nitrato. En este grupo de compuestos, 3-metil-butanol, 3-metil-butanal y ácido 3-metil-butanoico fueron los compuestos más abundantes a los 105 días de proceso, representando el 43 % y el 44 % del área total de este grupo en el lote con nitrito y nitrato, respectivamente. A partir del día 14 del proceso de maduración, el área del ácido 3-metil-butanoico fue el doble ( $p < 0,001$ ) en el lote fabricado con nitrato. Este aumento tan acusado en la concentración del ácido 3-metil-butanoico durante la etapa inicial del proceso puede afectar en

gran medida al aroma inicial de los embutidos, debido a que los ácidos 2 y 3-metil-butanoico, junto con el 2-metil-propanal son los compuestos que presentan un menor umbral de detección en este grupo (Burdock, 2001; van Gemert, 2004). Estos resultados coinciden con los observados por Olesen *et al.* (2004a) quienes encontraron, en embutidos fabricados con nitrito o nitrato, que la proporción de alcoholes y ácidos de cadena ramificada fue mayor en embutidos fabricados con nitrato que con nitrito. En ensayos *in vitro* Olesen *et al.* (2004b), demostraron que ambas sales de curado, nitrito y nitrato, inhibían la generación por parte de los estafilococos del ácido 3-metil-butanoico, sin embargo, el nitrito lo hacía en mayor medida. Estos resultados concuerdan con lo observado por Waade y Stahnke (1997), en embutidos crudos curados fabricados con diferentes contenidos de nitrito y/o nitrato e inoculados con *S. xylosum*. Al estudiar el perfil de aminoácidos de los embutidos, estos autores observaron que el nitrito aceleraba la producción de aminoácidos posiblemente inhibiendo su degradación, mientras que el nitrato disminuía los niveles de aminoácidos presentes en el medio.

La actividad esterasa presente en los estafilococos actúa esterificando los ácidos y alcoholes presentes en el entorno del microorganismo (Talón *et al.*, 1998). Los ésteres son compuestos muy fragantes, que tienen un bajo umbral de detección sensorial y dan notas frutales al aroma del embutido (Stahnke, 1994; Montel *et al.*, 1996). Durante el proceso de secado de los embutidos, se produjo un incremento en la concentración de ésteres en los embutidos, que alcanzó un máximo a los 31 días para mostrar, después, una ligera disminución (**figura 4.6 b**). Hasta los 45 días, no se

apreciaron diferencias entre los dos lotes en general, pero sí se obtuvo una mayor concentración en el lote fabricado con nitrito ( $p < 0,05$ ) después de la etapa de envasado a vacío. A los 105 días, los ésteres representaron el 6 % y el 3 % de los compuestos totales en los lotes fabricados con nitrito y nitrato, respectivamente. Los cambios en la generación de los ésteres descritos en este estudio están de acuerdo con Talón y Montel (1997) y Talón *et al.* (1998) quienes, en experimentos *in vitro*, observaron que la actividad esterasa de estafilococos actúa esterificando ácidos y alcoholes a ésteres hasta alcanzar una concentración máxima, para entonces empezar a hidrolizarlos. El éster más abundante a lo largo de todo el proceso fue el acetato de etilo, que representó al final del proceso (105 días) el 48 % y el 38 % del área total del grupo de los ésteres, en los lotes con nitrito y nitrato, respectivamente. Los ésteres que le siguieron en abundancia fueron propanoato de etilo, butanoato de etilo y lactato de etilo (2-hidroxi-propanoato de etilo). El 2-metil-butanoato de etilo, fue el compuesto con el umbral de detección más bajo de entre todos los compuestos que se identificaron en el embutido (Burdock, 2001; van Gemert, 2004). Le siguieron en intensidad aromática: butanoato de etilo, hexanoato de etilo y 3-metil-butanoato de etilo. En general, a los 105 días, el lote fabricado con nitrito presentó una mayor abundancia ( $p < 0,05$ ) de los ésteres acetato de etilo, 2-metil-propanoato de etilo, butanoato de etilo y lactato de etilo; mientras que en el lote fabricado con nitrato se extrajo una mayor proporción de 3-metil-butanoato de etilo, acetato de 2-metil-butilo y acetato de 3-metil-butilo. En un estudio previo en embutidos fabricados con nitrito o nitrato, Olesen *et al.* (2004a)



encontraron que la concentración de acetato de etilo era mayor en embutidos fabricados con nitrato, mientras que en este trabajo se observó lo contrario.

#### 4.3.6 Análisis Sensorial

No se observaron diferencias significativas entre lotes con respecto al sabor, color y calidad global (**tabla 4.5**). Sin embargo, se observó una pequeña preferencia ( $p < 0,1$ ) por el aroma de embutidos fabricados con nitrato, que pudo ser debida al menor nivel de oxidación (TBARS) sufrido por este lote, así como también a las mayores proporciones de compuestos volátiles procedentes del catabolismo de aminoácidos y carbohidratos. Este resultado se corresponde con el observado por Navarro *et al.* (2001) en embutidos de bajo calibre, quienes encontraron que el aroma de los embutidos fabricados con nitrato era el más intenso y el preferido frente a los fabricados con nitrito.

**Tabla 4.5.** Análisis sensorial (test de preferencia) de los embutidos crudos curados a los 105 días de proceso.

	Número de muestras preferidas		p <sup>a</sup>
	Nitrito	Nitrato	
Color	29	21	> 65 %
Aroma	18	32	> 90 %
Sabor	20	29	> 65 %
Calidad Global	26	24	> 10 %

<sup>a</sup> p: Tendencia de la preferencia de un lote de embutido sobre el otro.

En conclusión, la adición de nitrito o nitrato prácticamente no afectó a las características sensoriales de los embutidos. Sin embargo, el nitrito y el nitrato afectaron tanto a los procesos oxidativos como a la generación de compuestos volátiles procedentes del crecimiento y metabolismo de los microorganismos.

Los niveles de oxidación fueron mayores en el lote fabricado con nitrito que en el lote con nitrato, como se observó por la evolución de los TBARS y de los compuestos volátiles procedentes de la  $\beta$ -oxidación lipídica producida por bacterias. Los fenómenos de oxidación se vieron inhibidos en la etapa de almacenamiento a vacío, ya que durante esta etapa disminuyeron los TBARS y también los compuestos volátiles procedentes de la auto-oxidación lipídica. En cambio, la hidrólisis de ácidos grasos no se vio afectada por esta etapa ya que la cantidad de ácidos grasos libres siguió aumentando durante el envasado a vacío.

Los compuestos volátiles procedentes del catabolismo de aminoácidos y la fermentación de carbohidratos se generaron en mayor proporción en el lote fabricado con nitrato, probablemente debido a la mayor población de microorganismos en estas muestras y al efecto del nitrato en su metabolismo.

En resumen, la adición de nitrito y nitrato afecta a la generación del aroma de embutidos crudos curados, aunque este efecto puede depender altamente del proceso de fermentación, es decir, de la realización o no de la etapa de estufaje en el proceso de fabricación.

**CAPÍTULO III:**

**Efecto de la Etapa de Fermentación y la Adición de Diferentes  
Sales de Curado en la Calidad Sensorial de Embutidos Crudos  
Curados.**

*European Food Research and Technology, 2007: En Prensa*

---

---

## **5. CAPÍTULO III: Efecto de la Etapa de Fermentación y la Adición de Diferentes Sales de Curado en la Calidad Sensorial de Embutidos Crudos Curados**

### ***5.1. Introducción***

En el capítulo anterior se demostró que la utilización de diferentes sales de curado en el proceso de fermentación tradicional tenía distintos efectos en los procesos hidrolíticos y oxidativos de los lípidos y en la generación de compuestos volátiles procedentes tanto del crecimiento como del metabolismo bacteriano.

Por otro lado, el tiempo y la temperatura a los que tiene lugar la fermentación causan un efecto importante en las rutas de generación de compuestos volátiles (Stahnke, 1995b), tal como se indica en la **figura 1.1** de la introducción. El sector industrial tiene interés por reducir el tiempo de maduración de los embutidos crudos curados, ya que esto supone también una reducción del coste de producción. Por ello, los procesos de fabricación industrial se asemejan a los procesos aplicados en el norte de Europa, donde se utiliza únicamente nitrito como sal de curado, y se acorta el tiempo de secado aplicando temperaturas de incubación durante los primeros días del proceso de secado. Esta operación se llama estufaje. De este modo, la principal diferencia entre el proceso industrial y el proceso tradicional, de secado al aire, aplicado en

los países de la cuenca mediterránea, es la temperatura a la que el proceso de pre-maduración (o estufaje) tiene lugar (Lücke, 1985). En el método tradicional (fermentación lenta), se añaden cantidades pequeñas de azúcar y la maduración tiene lugar a bajas temperaturas, el ratio de producción de ácido láctico es bajo y la actividad de bacterias sensibles a los ácidos (micrococos y estafilococos) es alta. Por el contrario, en el método industrial (fermentación rápida), se utilizan tanto cantidades de azúcar como temperaturas más altas, lo cual permite a las bacterias lácticas disminuir el pH del medio muy rápidamente, acidificando el embutido e inhibiendo el crecimiento de cualquier tipo de bacteria deteriorante y patógena. El bajo pH también reduce la actividad nitrato reductasa de los estafilococos, responsable de la reducción del nitrato a nitrito. Esta reacción no tiene lugar a pH por debajo de 5,4 (Kröckel, 1995).

Numerosos artículos científicos han estudiado los efectos de las sales de curado sobre los mecanismos de hidrólisis y oxidación de lípidos y también sobre la generación de aromas. En general, estos estudios se han realizado en embutidos sometidos a la etapa de estufaje, es decir, con un proceso de fermentación rápida. En la mayoría de los estudios en que se compara el efecto del nitrato y el nitrito, los embutidos se fabricaron solamente con nitrito añadido (Skjelvåg y Tjøberg, 1974; Aguirrezábal *et al.*, 2000) o sólo con nitrato (Montel *et al.*, 1996). El efecto del nitrito también se ha estudiado en embutidos con nitrito y nitrato añadidos conjuntamente (Noel *et al.*, 1990; Zanardi *et al.*, 2004). Por otro lado, sólo algunos estudios han comparado el uso de nitritos o nitratos en el

procesos de fermentación rápida (Zaika *et al.*, 1976; Stahnke, 1995a; Stahnke, 1995b; Stahnke, 1995c; Navarro *et al.*, 1998; Olesen *et al.*, 2004a) o sin fermentación (Navarro *et al.*, 2001).

Por tanto, es esencial confirmar el efecto que tienen el nitrito y el nitrato en la etapa de fermentación. Así pues, el objetivo del siguiente trabajo es estudiar el efecto de las sales de curado, cuando se aplican por separado en un proceso de fermentación rápido y lento, centrándonos en la calidad sensorial y en la generación de compuestos volátiles.

## ***5.2. Materiales y Métodos***

### **5.2.1 Fabricación de los Embutidos y Toma de Muestra**

Se fabricaron dos lotes de embutidos, uno que contenía únicamente nitrito sódico (N2) y otro que contenía únicamente nitrato potásico (N3). Posteriormente, cada lote se dividió a su vez en dos, que se sometieron a un proceso de fermentación tradicional (N2S y N3S) e industrial (N2E y N3E), respectivamente. Los embutidos se fabricaron con los mismos ingredientes y siguiendo el mismo procedimiento previamente detallados en el apartado 4.2.1. También se aplicó a los embutidos las mismas condiciones de secado y maduración descritas en el apartado 4.2.1 excepto que la etapa de pre-maduración se realizó de 3 a 5 °C en los lotes sometidos a fermentación tradicional y a 24 °C en los lotes sometidos a fermentación industrial (estufaje). El tiempo total de secado fue de 44 días. Los embutidos fueron entonces envasados a vacío y almacenados a 4 °C durante 2 meses. El tiempo total del proceso de maduración fue de

111 días. De cada lote, se tomaron 3 embutidos a los días 0, 8, 23, 44 (embutido seco) y 111 (envasado a vacío). De cada embutido, se tomaron 20 g para realizar los análisis microbiológicos inmediatamente. El resto de la muestra se picó, se tomaron 20 g para analizar directamente la humedad, y el resto se envasó a vacío y se guardó a  $-20$  °C hasta la realización de los análisis químicos (TBARS, nitrito y nitrato). Además, a los 111 días se tomó una rodaja de aproximadamente 20 g, se envasó a vacío y se guardó a  $-20$  °C para la realización del análisis de los compuestos volátiles. Los embutidos restantes, a los 111 días, se utilizaron para el análisis sensorial. Todos los resultados se expresaron como media de las tres repeticiones en materia seca.

### **5.2.2 Análisis Microbiológico**

El análisis microbiológico se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.2.2.

### **5.2.3 Análisis Químicos**

Los análisis de pH, humedad, niveles de TBARS y concentración de de nitrito y nitrato se realizaron siguiendo los procedimientos detallados en el apartado 4.2.3.

### **5.2.4 Compuestos Volátiles**

La extracción de los compuestos volátiles se realizó mediante la técnica de microextracción en fase sólida, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2.3 y utilizando la fibra y tiempo de extracción indicados en el

apartado 4.3.5. Los compuestos adsorbidos por la fibra se identificaron y cuantificaron por CG-MS tal como describe el apartado 3.2.4.

### **5.2.5 Análisis Sensorial**

El análisis sensorial de los embutidos se realizó en las muestras envasadas a vacío durante 2 meses (tiempo total del proceso 111 días). Los catadores evaluaron la preferencia entre lotes fabricados con nitrito o nitrato; para cada proceso de fermentación siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.2.6.

### **5.2.6 Análisis Estadísticos**

Se comprobaron los efectos de la etapa de fermentación y de los agentes de curado (nitrito y nitrato) sobre las variables estudiadas (análisis microbianos, químicos y de compuestos volátiles) por análisis de varianza de dos factores (ANOVA) usando el software estadístico Statgraphics plus (v 5.1). En los casos en que los efectos de los factores o su interacción fueron significativos ( $p < 0,05$ ), las medias de cada lote se compararon por medio del test de Fisher de la diferencia mínima significativa (LSD) ( $p < 0,05$ ). El efecto de los agentes de curado en los resultados de aceptación sensorial se evaluó por análisis de varianza simple ( $p < 0,05$ ).



### **5.3. Resultados y Discusión**

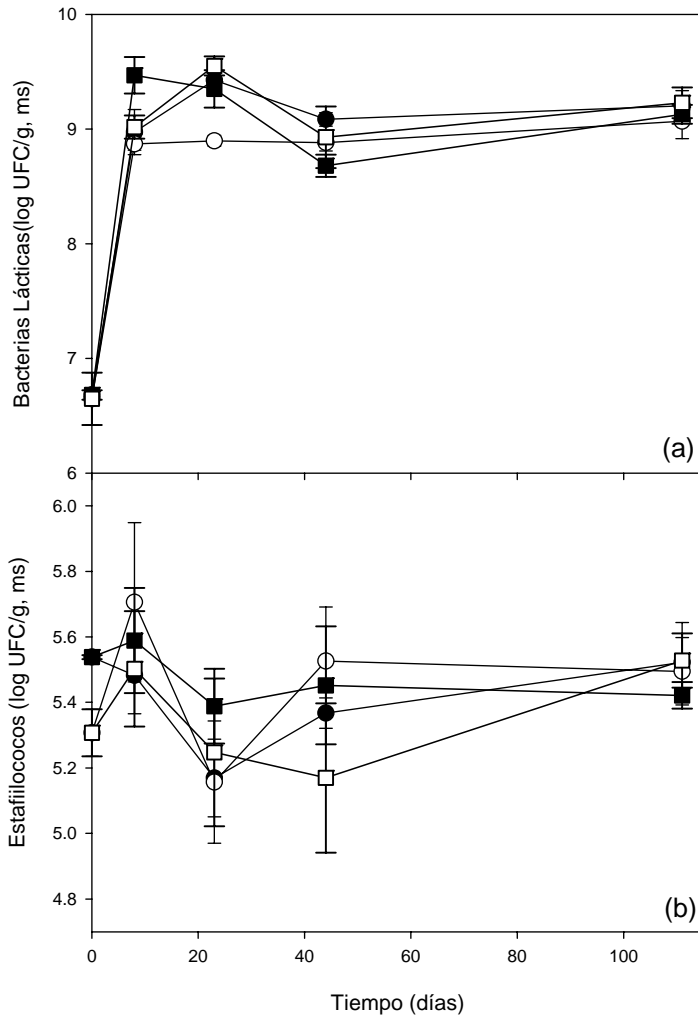
#### **5.3.1 Análisis Microbiano**

El crecimiento de las bacterias lácticas y estafilococos durante el proceso de maduración se representa en la **figura 5.1**. En general, la población de bacterias lácticas y estafilococos se mantuvo dentro del rango esperado para embutidos crudos curados (Durá *et al.*, 2004). Además, las diferencias entre los lotes al final del proceso no fueron significativas ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, a los 23 días se observó una mayor población de bacterias lácticas ( $p < 0,05$ ) en los embutidos sometidos a fermentación rápida, de acuerdo con lo indicado previamente por Lücke (1985).

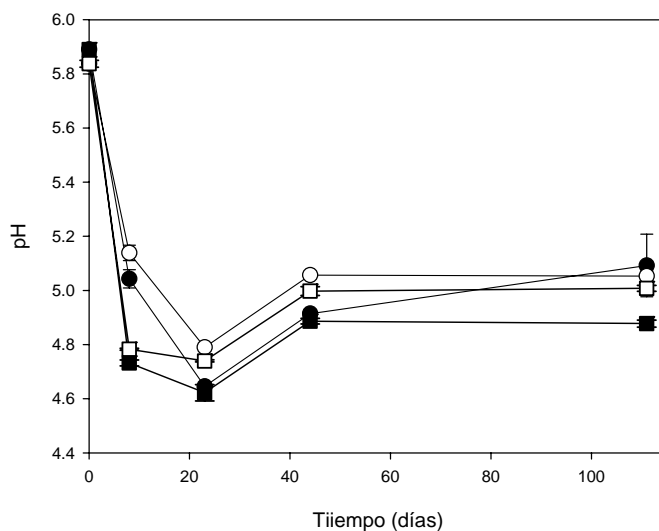
En el caso de los estafilococos la población se mantuvo al mismo nivel a largo de todo el proceso y no se observaron diferencias significativas. Estos resultados no están de acuerdo con lo observado en el capítulo anterior, donde se observó una mayor población de estafilococos en el lote con nitrato a los 45 días de proceso.

#### **5.3.2 Análisis Químicos**

El proceso de fermentación afectó significativamente los valores de pH en los diferentes lotes (**figura 5.2**). Se observó una disminución pronunciada del pH ( $p < 0,05$ ) a los 8 días de proceso en los lotes sometidos a fermentación industrial (proceso rápido). El mayor descenso del pH en estos lotes debería estar relacionado con una mayor población de bacterias lácticas, sin embargo sólo se observaron diferencias de



**Figura 5.1.** Población de bacterias lácticas (a) y estafilococos (b) durante el proceso de secado y maduración de los embutidos crudos curados. Proceso de fermentación lenta con nitrito (●) y nitrato (○) añadido. Proceso de fermentación rápida con nitrito (■) y nitrato (□) añadido. Los símbolos representan la media y la desviación estándar de las medidas.

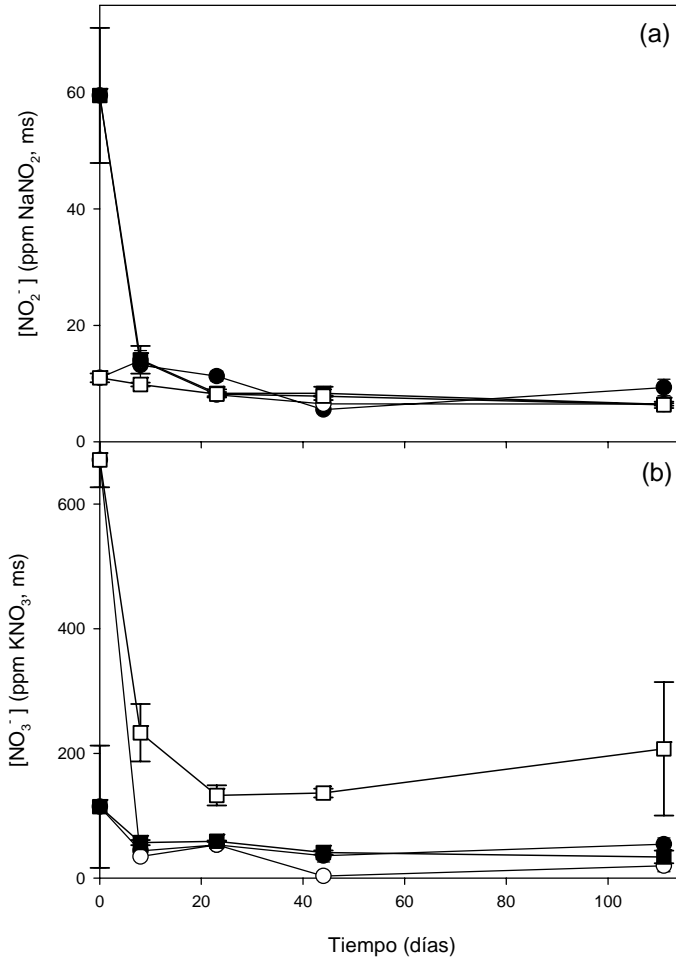


**Figura 5.2.** Evolución del pH durante el proceso de secado y maduración de los embutidos crudos curados. Proceso de fermentación lenta con nitrito (●) y nitrato (○) añadido. Proceso de fermentación rápida con nitrito (■) y nitrato (□) añadido. Los símbolos representan la media y la desviación estándar de las medidas.

población entre embutidos con diferente fermentación a los 23 días. El hecho de no observar diferencias significativas entre la población de bacterias lácticas podría ser debido a la alta variabilidad de los análisis microbiológicos. Los embutidos sometidos al proceso de fermentación lento alcanzaron valores de pH similares a los 23 días de proceso de secado. Un comportamiento similar fue descrito por Lücke (1985) para métodos rápidos y “naturales”. A partir de los 23 días, el pH fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en los lotes fabricados con nitrito, aunque al final del proceso no se encontraron diferencias significativas.

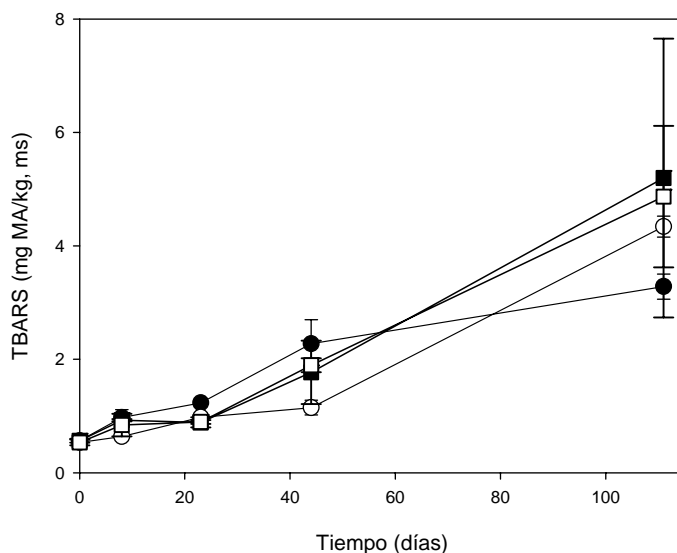
El contenido en humedad de los embutidos disminuyó a lo largo de todo el proceso de maduración desde valores iniciales del 64 % hasta el 35 %. Además, no se mostraron diferencias significativas en cuanto al contenido de humedad entre lotes (datos no mostrados).

Respecto a la concentración de nitrito y nitrato (ppm en base seca), se observó una disminución de la concentración de nitrito en los lotes de embutidos fabricados con nitrito en ambos procesos de fermentación, que mostraron sólo concentraciones residuales al final del proceso (**figura 5.3 a**). La reducción del nitrato en los lotes fabricados con nitrato se vio significativamente afectada ( $p < 0,001$ ) por el proceso de fermentación, de modo que la mayor concentración de nitrato se encontró en los embutidos fabricados con nitrato y sometidos a fermentación rápida a lo largo de todo el proceso (**figura 5.3 b**). Este hecho podría deberse a la inactivación del enzima nitrato reductasa por el bajo pH registrado en el lote de embutidos fabricado con nitrato y sometido a fermentación rápida (Toldrá *et al.*, 2001). Este comportamiento se describió previamente en el capítulo anterior, apartado 4.3.3, en embutidos fabricados con nitrato. En aquel trabajo el lote fabricado con nitrato y sometido a fermentación lenta, mostró una disminución de pH mayor que en la experiencia actual y por eso la conversión de nitrato en nitrito se vio reducida. Respecto al potencial riesgo toxicológico, las concentraciones residuales obtenidas en este estudio se encuentran por debajo de los límites legales, cuando se expresan por cantidad de materia húmeda.



**Figura 5.3.** Evolución del contenido en nitrito (a) y nitrato (b) durante el proceso de maduración de los embutidos crudos curados. Proceso de fermentación lenta con nitrito (●) y nitrato (○) añadido. Proceso de fermentación rápida con nitrito (■) y nitrato (□) añadido. Los símbolos representan la media y la desviación estándar de las medidas.

Con respecto a los niveles de TBARS, únicamente se observaron diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) a los 23 días, en donde se observó una mayor oxidación en los embutidos sometidos a fermentación lenta, en el lote fabricado con nitrito. A pesar de que las diferencias no fueron significativas entre los lotes sometidos a fermentación lenta, se observó un mayor nivel de oxidación en el lote fabricado con nitrito que en el lote con nitrato a lo largo de todo el proceso de secado, hasta los 44 días (**figura 5.4**). Sin embargo, este resultado no nos permite confirmar los resultados presentados en el capítulo anterior, apartado 4.3.3. Tampoco se observaron diferencias en los niveles de TBARS entre lotes fabricados con nitrito o nitrato sometidos a fermentación rápida. Cabe destacar que los lotes sometidos a fermentación rápida presentaron valores de TBARS intermedios respecto a los obtenidos en embutidos sometidos a fermentación lenta fabricados con nitrito o nitrato. Zanardi *et al.* (2004) observaron que un lote de embutido fabricado sólo con nitrito tenía niveles de TBARS ligeramente superiores que otro fabricado con nitrito y nitrato, conjuntamente. Sin embargo, estos resultados no están de acuerdo con Navarro *et al.* (1998), quienes en embutidos fabricados con nitrito o nitrato y sometidos a un proceso de fermentación rápida, detectaron mayores índices de peróxidos en el lote con nitrato. El efecto antioxidante del nitrato ha sido previamente demostrado por Talón *et al.* (1999) en experimentos *in vitro*, donde observaron que el nitrato activaba la producción y liberación del enzima catalasa en *S. xylosus*. Cabe destacar que el nitrito tiene capacidad antioxidante (Wirth, 1991) aunque, parece que su actividad depende del proceso de fermentación.



**Figura 5.4.** Niveles de TBARS medidos durante el proceso de maduración de los embutidos crudos curados. Proceso de fermentación lenta con nitrito (●) y nitrato (○) añadido. Proceso de fermentación rápida con nitrito (■) y nitrato (□) añadido. Los símbolos representan la media y la desviación estándar de las medidas.

### 5.3.3 Compuestos Volátiles

A los 111 días del proceso, se identificaron 97 compuestos volátiles extraídos por SPME del espacio de cabeza de los embutidos crudos curados (tabla 5.1). La mayoría de estos compuestos ya se han identificado previamente en los capítulos I y II (ver tabla 3.1 y 4.4) y también por Flores *et al.* (2004) utilizando la misma técnica de extracción.

**Tabla 5.1.** Compuestos volátiles identificados y cuantificados en los

Compuestos	IK <sup>a</sup>	F <sup>b</sup>	Compuestos	IK	F
<b><i>Auto-oxidación Lipídica</i></b>					
Pentano	500	a	Butirolactona	1013	a
Propanal	520	a	1-octen-3-ona	1017	b
Hexano	600	a	Octanal	1042	a
1-propanol	610	a	2,4-heptadienal	1073	a
Butanal	620	a	Ácido hexanoico	1074	a
1-hepteno	692	b	Undecano	1099	a
Heptano	700	a	2-octenal, (E)-	1112	a
2-etil-furan	717	a	1-octanol	1126	a
1-butanol	720	a	Nonanal	1147	a
1-penten-3-ona	726	a	Ácido heptanoico	1176	a
Pentanal	735	a	Dodecano	1200	a
1-octeno	795	b	2-nonenal	1218	a
Octano	800	a	Ácido octanoico	1263	a
Ácido propanoico	810	a	<b><i>Metabolismo Bacteriano</i></b>		
2-octeno, (Z)-	819	a	<b><i>Fermentación de Carbohidratos</i></b>		
1-pentanol	826	a	Etanol	505	a
Hexanal	840	a	Acetona	526	a
Nonato	901	a	Diacetilo (2,3-butanodiona)	624	a
2-hexenal	903	a	2-butanona	628	a
2-butil-furano	910	b	2-butanol	640	a
1-hexanol	924	a	Ácido acético	717	a
Heptanal	940	a	Acetoína (3-hidroxi-2-butanona)	777	a
Ácido pentanoico	980	a	2,3-butanodiol	882	a
Decano	1000	a	2,3-butanodiol	889	a
2-heptenal, (Z)-	1007	a	Ácido butanoico	896	a
2-pentil-furano	1007	b			

<sup>a</sup>IK: Índices de Kovats calculados para una columna capilar DB-624 (J & W Scientific: con un detector selectivo de masas. <sup>b</sup>F: Fiabilidad de la identificación: a, de identificación por espectro de masas.



embutidos crudos curados por SPME del espacio de cabeza.

Compuestos	IK	F	Compuestos	IK	F
<b><i>Actividad Esterasa de Estafilococos</i></b>					
Acetato de etilo	633	a	Ácido 3-metil-butanoico	942	a
Acetato de propilo	746	a	Ácido 2-metil-butanoico	948	a
2-metil-propanoato de etilo	786	a	Metional (3-metiltio-propanal)	965	a
Butanoato de etilo	830	a	Benzaldehido	1012	a
Lactato de etilo (2-hidroxi-propanoato de etilo)	864	a	Fenilacetaldehido	1102	a
2-metil-butanoato de etilo	877	a	Fenol	1108	a
3-metil-butanoato de etilo	881	a	Fenil etil alcohol	1191	a
Acetato de 3-metil-1-butilo	906	a	<b><i>β-oxidación Lipídica</i></b>		
Acetato de 2-metil-1-butilo	908	a	2-pentanona	730	a
Pentanoato de etilo	928	a	1-penten-3-ol	738	a
Hexanoato de etilo	1024	a	2,3-pentanodiona	741	a
Propanoato de 2-metil-1-butilo	1056	b	2-pentanol	753	a
Octanoato de etilo	1227	a	2-heptanona	934	a
<b><i>Catabolismo de Aminoácidos</i></b>					
2-metil-propanal	590	a	2,3-octanodiona	1023	b
Benceno	673	a	1-octen-3-ol	1025	a
2-metil-1-propanol	678	a	2-octanona	1032	a
3-metil-butanal	686	a	2-nonanona	1128	a
2-metil-butanal	697	a	<b><i>Contaminación u Origen</i></b>		
Dimetil disulfuro	770	a	<b><i>Desconocido</i></b>		
Tolueno	786	a	Acetaldehído	466	a
3-metil-3-buten-1-ol	788	a	Disulfuro de carbono	536	a
3-metil-1-butanol	793	a	Cloroformo	647	a
3-metil-2-buten-1-ol	833	b	1-cloro-pentano	774	b
Ácido 2-metil-propanoico	865	a	m-/p-xileno	890	a
Etilbenceno	881	a	Estireno	917	a
			4-metil-fenol	1168	b

30 m, 0,25 mm d.i., 1,4 μm grosor del film) instalada en un cromatógrafo de gases espectro de masas y tiempo de retención idéntico al del estándar auténtico; b, tentativa

Con el fin de observar los efectos del proceso de fermentación y el uso de diferentes sales de curado en las rutas de generación, se agrupó a los compuestos volátiles de acuerdo con su origen mayoritario siguiendo la clasificación propuesta por Ordóñez *et al.* (1999). Así, se formaron dos grupos principales: productos procedentes de la auto-oxidación lipídica y procedentes del metabolismo bacteriano. El segundo grupo se subdividió a su vez en 4 subgrupos: fermentación de carbohidratos, catabolismo de aminoácidos, actividad esterasa de estafilococos y  $\beta$ -oxidación lipídica. Sólo los compuestos que mostraron diferencias significativas debidas a la etapa de fermentación o a las sales de curado se han incluido en la **tabla 5.2**.

Los compuestos volátiles procedentes de la auto-oxidación lipídica contribuyen de manera esencial al aroma característico de los productos cárnicos (Shahidi *et al.*, 1986). A los 111 días del tiempo de maduración, este grupo representó el 41 %, 28 %, 62 % y 45 % del área total de los compuestos volátiles extraídos en los lotes con nitrito y nitrato en embutidos con fermentación lenta y rápida, respectivamente (N2S, N3S, N2E y N3E). De manera general, la cantidad de compuestos procedentes de la oxidación lipídica fue mayor en los lotes sometidos a fermentación rápida ( $p < 0,05$ ) (**figura 5.5**) En concreto, numerosos compuestos de este grupo mostraron diferencias significativas debidas al proceso de fermentación (**tabla 5.2**). Los resultados más significativos fueron la mayor cantidad de hexanal, 2-pentil-furano, 1-octen-3-ona y ácido hexanoico que se detectó en el proceso de fermentación rápido comparado con el proceso de fermentación lento. Con respecto al uso de

diferentes sales de curado, aunque en general no se observaron diferencias significativas, sí se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en algunos casos. Así, los compuestos propanal, butanal, 1-penten-3-ona, pentanal, heptanal, ácido pentanoico, 2-pentil-furano, 1-octen-3-ona, octanal, ácido hexanoico, 2-octenal y 1-octanol mostraron cantidades superiores en los embutidos fabricados con nitritos. Estos resultados no coinciden con los descritos por Stahnke (1995b) quien encontró en embutidos preparados con diferentes niveles de nitrito y nitrato, que la adición de nitrato incrementaba fuertemente la generación de aldehídos de cadena lineal; y que este efecto se veía favorecido por el aumento de la temperatura durante el estufaje. Por el contrario, nuestros resultados mostraron mayores cantidades de propanal, butanal, pentanal, heptanal, octanal y nonanal en el lote fabricado con nitrito y sometido a un proceso de fermentación rápida, donde la temperatura aplicada fue mayor. En cambio, los resultados obtenidos en embutidos con fermentación lenta confirman los resultados obtenidos en el capítulo anterior donde se observaron pocas diferencias significativas entre lotes fabricados con nitrito o nitrato en los compuestos volátiles procedentes de la auto-oxidación lipídica.

Los compuestos volátiles procedentes de la fermentación de carbohidratos representaron el 41 %, 51 %, 27 % y 39 % del área total de compuestos extraídos en los lotes con nitrito y nitrato sometidos a fermentación lenta y rápida (N2S, N3S, N2E y N3E, respectivamente). En general, la cantidad de compuestos volátiles procedentes de la oxidación lipídica mostró diferencias significativas debidas al proceso de fermentación ( $p < 0,05$ ) (ver **tabla 5.2** y **figura 5.5**). La adición de

**Tabla 5.2.** Compuestos volátiles (UA×10-6/g ms) de los embutidos crudos curados a los 111 días de maduración extraídos por SPME del espacio de cabeza

Compuestos	IK <sup>a</sup>	Fermentación Lenta		Fermentación Rápida		p <sup>b</sup>	p	p
		Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato	Fermentación	Agentes de Curado	Interacción
<i>Auto-oxidación Lipídica</i>								
Propanal	520	4,16b	3,01b	7,83a	4,60b	0,0007	0,0022	0,0683
1-propanol	610	0,59bc	1,44a	0,37c	0,77b	0,0022	0,0002	0,0525
Butanal	620	1,00b	0,71b	2,08a	0,97b	0,0274	0,0234	ns
Ácido heptanoico	700	9,95a	3,64b	5,45b	5,60b	ns	0,0249	0,0205
1-penten-3-ona (55) <sup>c</sup>	720	0,28b	0,20b	1,08a	0,34b	0,0218	0,0393	0,0832
Pentanal (44)	735	8,74bc	5,80c	13,57a	10,44ab	0,0050	0,0367	ns
1-octeno	795	0,91b	1,40a	0,75b	1,02ab	ns	0,0332	ns
1-pentanol	826	2,52ab	2,02b	4,27a	3,28ab	0,0207	ns	ns
Hexanal	840	179,03ab	108,67b	295,67a	244,94ab	0,0041	ns	ns
Heptanal	940	4,36b	3,80b	13,50a	7,22b	0,0007	0,0170	0,0351
Ácido pentanoico	980	0,93a	0,51c	0,88ab	0,65bc	ns	0,0019	ns
2-pentil-furano (81)	1008	0,22c	0,16c	0,49a	0,34b	0,0000	0,0015	0,0441
1-octen-3-ona	1018	1,22bc	0,84c	2,98a	1,55b	0,0005	0,0027	0,0333
Octanal	1042	3,74b	2,82c	6,07a	4,21b	0,0006	0,0019	ns
Ácido hexanoico	1074	4,53c	4,38c	6,73a	5,61b	0,0003	0,0350	0,0853
2-octenal, (E)-	1112	0,76b	0,20c	2,15a	0,84b	0,0000	0,0000	0,0092
1-octanol	1126	0,52a	0,16b	0,57a	0,41a	0,0408	0,0049	ns
Nonanal	1147	1,76b	2,16b	5,37a	2,78b	0,0002	0,0094	0,0018
Ácido heptanoico	1176	0,12a	0,12a	0,09a	0,06b	0,0058	ns	ns
2-nonenal	1218	0,11b	0,18b	0,88a	0,22b	0,0005	0,0032	0,0009
Ácido octanoico	1263	0,37c	0,38c	1,57a	0,81b	0,0001	0,0090	0,0079

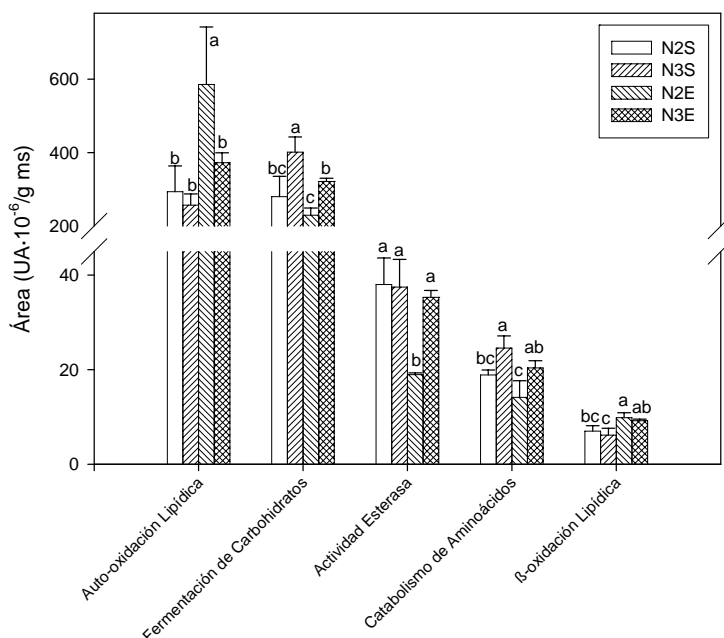
Tabla 5.2. Continuación.

Compuestos	IK <sup>a</sup>	Fermentación Lenta		Fermentación Rápida		p <sup>b</sup>	p	p
		Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato	Fermentación	Agentes de Curado	Interacción
<b><i>Metabolismo Bacteriano</i></b>								
<b><i>Fermentación de Carbohidratos</i></b>								
Diacetilo (2,3-butanodiona)	624	0,27b	0,70a	0,27b	0,38b	0,0116	0,0005	0,0124
2-butanona	628	3,12b	4,51a	2,91b	1,93c	0,0000	ns	0,0001
2-butanol	640	0,75b	1,97a	0,39b	1,56a	ns	0,0004	ns
Ácido acético	717	192,55bc	291,88a	166,17c	234,85b	0,0318	0,0010	ns
Acetoína (3-hidroxi-2-butanona)	777	1,37c	8,73a	0,66c	4,58b	0,0001	0,0000	0,0014
2,3-butanodiol (45)	889	0,41c	7,37a	0,09c	3,25b	0,0002	0,0000	0,0006
Ácido butanoico	896	32,95ab	35,06a	27,20c	32,40ab	0,0494	ns	ns
<b><i>Actividad Esterasa de Estafilococos</i></b>								
Acetato de etilo	633	16,82a	21,93a	7,42b	19,79a	0,0246	0,0030	ns
2-metil-propanoato de etilo (43)	786	0,10b	0,22a	tr	0,06b	0,0040	0,0093	
Lactato de etilo (2-hidroxi-propanoato de etilo)	864	8,85a	6,30b	3,76c	6,25b	0,0024	ns	0,0026
2-metil-butanoato de etilo	877	0,64a	0,49b	0,22d	0,41c	0,0000	ns	0,0002
3-metil-butanoato de etilo (88)	881	0,15bc	0,27a	0,06c	0,19b	0,0169	0,0037	ns
Pentanoato de etilo	928	0,83ab	0,41b	1,64a	0,47b	ns	0,0181	ns
Hexanoato de etilo (88)	1024	0,20a	0,16ab	0,13b	0,19a	ns	ns	0,0065
<b><i>Catabolismo de Aminoácidos</i></b>								
2-metil-propanal	590	0,63a	0,71a	0,41b	0,38b	0,0050	ns	ns
2-metil-1-propanol	678	0,20b	0,30a	0,12b	0,13b	0,0017	0,0410	ns
3-metil-butanal	686	2,10b	3,04a	1,31c	1,76b	0,0001	0,0007	ns
2-metil-butanol	697	0,51ab	0,55a	0,47ab	0,42b	0,0393	ns	ns
3-metil-1-butanol	737	1,23b	3,39a	0,69b	1,43b	0,0013	0,0005	0,0244
Ácido 2-metil-propanoico (41)	865	0,17b	0,31a	0,11b	0,18b	0,0068	0,0051	ns
Ácido 3-metil-butanoico	942	3,66b	7,32a	5,11ab	7,06a	ns	0,0026	ns

Tabla 5.2. Continuación.

Compuestos	IK <sup>a</sup>	Fermentación Lenta		Fermentación Rápida		p <sup>b</sup> Fermentación	p Agentes de Curado	p Interacción
		Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato			
Ácido 2-metil-butanoico	948	2,08a	2,08a	1,25b	1,80a	0,0011	0,0329	0,0339
Metional (3-metil-tio-propanal)	965	0,44bc	0,23c	1,00a	0,71ab	0,0018	ns	ns
Fenilacetaldehído	1102	0,20b	0,25b	0,33b	0,72a	0,0004	0,0022	0,0068
Fenil etil alcohol	1191	0,07b	0,17a	0,12ab	0,16a	ns	0,0056	ns
<b><i>β-oxidación Lipídica</i></b>								
2-pentanona (43)	730	0,33bc	0,53a	0,32c	0,45ab	ns	0,0045	ns
2,3-pentanediona (43)	740	1,17b	0,59b	3,17a	1,66ab	0,0143	ns	ns
2-pentanol	753	1,43a	1,57a	0,60b	1,18a	0,0044	0,0451	ns
2-heptanona	934	1,13b	0,93b	2,48a	2,85a	0,0001	ns	ns
2,3-octanediona (43)	1023	0,86b	0,41b	2,57a	1,42ab	0,0051	ns	ns
1-octen-3-ol (57)	1026	0,59b	0,32c	1,17a	0,70b	0,0003	0,0013	ns
2-octanona	1032	0,83a	0,19c	0,55b	0,29c	ns	0,0001	0,0111
2-nonanona	1138	0,24c	0,23c	0,67b	0,94a	0,0000	ns	0,0450

UA: Unidades arbitrarias del área de pico del compuesto en el cromatograma de iones totales (TIC). a, b, c, d, e: Medias con diferentes letras en el mismo lote indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre lotes. <sup>a</sup>IK: Índices de Kovats calculados para una columna capilar DB-624 (J&W Scientific: 30 m, 0,25 mm d.i., 1,4 μm grosor del film) instalada en un cromatógrafo de gases equipado con un detector selectivo de masas. <sup>b</sup>Valor p para el análisis estadístico. ns: no significativo. <sup>c</sup>Ratio masa/carga del ion característico utilizado para la cuantificación en el caso de picos que no se pueden resolver completamente.



**Figura 5.5.** Área total de los compuestos volátiles extraídos de los embutidos crudos curados por SPME del espacio de cabeza, agrupados según su origen.

diferentes sales de curado también produjo un efecto significativo ( $p < 0,01$ ). En ambos procesos fermentativos, el lote fabricado con nitrato mostró una mayor proporción ( $p < 0,001$ ) de 2-butanol, ácido acético, acetoína y 2,3-butanodiol que el lote fabricado con nitrito (ver **tabla 5.2**). En esta experiencia, las proporciones de 2,3-butanodiol y acetoína volvieron a ser significativamente mayores en los lotes fabricados con nitrato en ambos tipos de fermentación, lo que confirma el resultado

obtenido en el capítulo anterior. Sin embargo, los resultados obtenidos en el proceso de fermentación rápida, no coinciden con los observados por Olesen *et al.* (2004a), en embutidos fabricados utilizando estafilococos como cultivo iniciador, con diferentes sales de curado y sometidos a fermentación rápida; ya que estos autores observaron que la presencia de nitrato favorecía la generación de 2,3-butanodiol pero disminuía la cantidad de acetoina, respecto a los embutidos fabricados con nitrito.

Los estafilococos esterifican los alcoholes y ácidos presentes en su entorno (Galón *et al.*, 1998). Los esterres representaron el 5,4 %, 4,8 %, 2,4 % y 4,3 % del área de los compuestos volátiles totales extraídos en los lotes con nitrito y nitrato en embutidos con fermentación lenta y rápida, respectivamente (N2S, N3S, N2E y N3E, **figura 5.5**). Los compuestos en este grupo, en general, mostraron diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) debidas al proceso de fermentación (**tabla 5.2**). La proporción de 2-metil-butanoato de etilo fue significativamente mayor ( $p < 0,001$ ) en la fermentación lenta que en la rápida. Además, la adición de agentes de curado afectó ( $p < 0,05$ ) la proporción de esterres, a pesar de que su comportamiento dependió de cada compuesto individual. En ambos procesos de fermentación, los lotes fabricados con nitrito mostraron mayores cantidades de pentanoato de etilo ( $p < 0,05$ ) que los lotes fabricados con nitrato, mientras que el 3-metil-butanoato de etilo ( $p < 0,01$ ) mostró el comportamiento opuesto. Los resultados para el 3-metil-butanoato de etilo están de acuerdo con lo observado en el capítulo anterior en embutidos fabricados con nitrato y sometidos a



fermentación lenta. En el proceso de fermentación rápida, algunos esteres como acetato de etilo, 2-hidroxi-propanoato de etilo, 2-metil-butanoato de etilo, 3-metil-butanoato de etilo y hexanato de etilo mostraron cantidades mayores ( $p < 0,01$ ) en el lote fabricado con nitrato. Estos resultados fueron también observados por Olesen *et al.* (2004a) quienes encontraron mayores cantidades de esteres en embutidos fabricados con nitrato frente a otros fabricados con nitrito. Estos autores también indicaron la contribución positiva del nitrato en generar compuestos aromáticos de cadena ramificada y dieron soporte a la teoría de que los estafilococos contribuyen de manera importante al aroma de los embutidos crudos curados.

El catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada genera aldehidos, alcoholes y ácidos de cadena ramificada que también contribuyen de manera importante al aroma de los embutidos crudos curados (Stahnke, 1994). Otros aminoácidos que generan compuestos volátiles interesantes son los aminoácidos aromáticos y azufrados. El área de los compuestos volátiles procedentes del catabolismo de los aminoácidos representó el 2,5 %, 3,1 %, 2,1 % y 2,5 % del área total de los compuestos volátiles totales extraídos en las muestras con nitrito y nitrato en embutidos con fermentación lenta y rápida, respectivamente (N2S, N3S, N2E y N3E). La mayoría de los compuestos procedentes del catabolismo de aminoácidos mostraron diferencias significativas debidas al proceso de fermentación ( $p < 0,05$ ) (ver **tabla 5.2** y **figura 5.5**). El 2-metil-propanal mostró proporciones claramente mayores ( $p < 0,001$ ) en la fermentación lenta que en la rápida, mientras que el metional fue mayor

( $p < 0,01$ ) en los lotes con fermentación rápida. Por otro lado, la adición de diferentes agentes de curado también produjo un efecto significativo ( $p < 0,01$ ). Los compuestos 3-metil-butanal, 2-metil-propanol, 3-metil-1-butanol, ácido 2-metil-propanoico y fenil etil alcohol fueron mayores ( $p < 0,01$ ) en el lote fabricado con nitrato, aunque debido a la interacción entre factores en algunos compuestos ( $p < 0,05$ ) sólo se observaron diferencias en el test de Fisher en las muestras sometidas al proceso de fermentación lenta. El efecto positivo de los nitratos en la generación de compuestos volátiles procedentes del catabolismo de aminoácidos ha sido previamente indicado por otros autores (Waade y Stahnke, 1997; Olesen *et al.*, 2004a; Olesen *et al.*, 2004b).

La  $\beta$ -oxidación lipídica se debe principalmente a los estafilococos lipolíticos (Ordóñez *et al.*, 1999). Este grupo representa únicamente el 1,1 %, 0,8 %, 1,7 % y 1,1 % del área total de los compuestos extraídos en las muestras con nitrito y nitrato en embutidos con fermentación lenta y rápida, respectivamente (N2S, N3S, N2E y N3E). En general, los compuestos volátiles derivados de la  $\beta$ -oxidación lipídica mostraron diferencias significativas debidas al proceso de fermentación ( $p < 0,01$ ) (ver **tabla 5.2** y **figura 5.5**). El efecto más significativo fueron las mayores proporciones de 2,3-pentanodiona, 2-heptanona, 2,3-octanodiona y 2-nonanona en los lotes sometidos a fermentación rápida. La adición de diferentes agentes de curado también tuvo un efecto significativo en algunos compuestos volátiles procedentes de la  $\beta$ -oxidación lipídica. En ambos procesos, se observó una mayor proporción ( $p < 0,05$ ) de 1-octen-3-ol y 2-octanona en los lotes fabricados

con nitrito mientras que la 2-pentanona fue mayor ( $p < 0,01$ ) en los lotes fabricados con nitrato. Estos resultados están parcialmente de acuerdo con los observados en el capítulo anterior donde se observó una mayor proporción de productos de la  $\beta$ -oxidación lipídica en embutidos fabricados con nitrito y sometidos al proceso de fermentación lenta.

En resumen, tanto el proceso de fermentación como la adición de diferentes agentes de curado afectaron significativamente a la generación de compuestos volátiles y por tanto, al aroma final del embutido. Generalmente, el proceso de fermentación rápida está relacionado con cantidades mayores de compuestos volátiles procedentes de la auto-oxidación lipídica y  $\beta$ -oxidación lipídica. Por otro lado, la adición de nitrato es responsable de la disminución de la cantidad de compuestos procedentes de la auto-oxidación lipídica y el incremento de los compuestos procedentes de la fermentación de carbohidratos y catabolismo de aminoácidos. Estos resultados están parcialmente de acuerdo con los de Olesen *et al.* (2004a) y Stahnke (1995b), quienes, en embutidos sometidos a procesos de fermentación rápida, indicaron que los principales factores que afectan al desarrollo de los aromas son el cultivo estárter de estafilococos, los agentes de curado y el pH. En sus resultados, la adición de nitrato produjo cantidades mayores de compuestos volátiles de cadena ramificada y varios compuestos de la auto-oxidación lipídica.

### 5.3.4 Análisis Sensorial

El panel de catadores prefirió el lote fabricado con nitrato en aroma, sabor y calidad global de entre los lotes sometidos al proceso de fermentación lenta (**tabla 5.3**). Este lote mostró los niveles más bajos de compuestos volátiles procedentes de la oxidación lipídica (**figura 5.5**). Sin embargo, no se observaron diferencias en el análisis sensorial entre lotes sometidos a fermentación rápida (**tabla 5.3**), en los cuales no se encontraron diferencias entre los niveles de oxidación (**figura 5.4**). En el capítulo anterior también se detectó una preferencia en el aroma de embutidos fabricados con nitrato y sometidos a un proceso de fermentación lenta, aunque la diferencia observada fue significativa con un valor de  $p < 0,1$ . Estos resultados están de acuerdo con Navarro *et al.* (2001) quienes, para embutidos de bajo calibre sin fermentar, encontraron que el aroma de los embutidos fabricados con nitrato fue preferido al de los embutidos fabricados con nitrito.

**Tabla 5.3.** Análisis sensorial (test de preferencia) de embutidos crudos curados a los 111 días del proceso de maduración.

	Parejas	Número de muestras preferidas				p <sup>a</sup>
		Fermentación Lenta		Fermentación Rápida		
		Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato	
Color	N2S-N3S	25	25			ns
	N2E-N3E			28	22	ns
Aroma	N2S-N3S	18	32			< 0,05
	N2E-N3E			21	29	ns
Sabor	N2S-N3S	18	32			< 0,05
	N2E-N3E			22	28	ns
Calidad global	N2S-N3S	15	35			< 0,01
	N2E-N3E			22	28	ns

<sup>a</sup> p: Tendencia de la preferencia de un lote de embutidos sobre el otro.

En conclusión, los agentes de curado tienen efectos diferentes en la calidad de embutidos crudos curados dependiendo de la velocidad del proceso de fermentación. La preferencia de los consumidores por el lote de fermentación lenta fabricado con nitrato fue probablemente debida a los bajos niveles de oxidación encontrados en este lote, y las mayores proporciones de compuestos volátiles derivados de la fermentación de carbohidratos y del catabolismo de aminoácidos. Sin embargo, cuando los agentes de curado se usaron en el proceso de fermentación rápida, no se apreciaron diferencias por parte del consumidor. En resumen, este estudio indica que el nitrato tiene un efecto positivo en la calidad sensorial de embutidos sometidos al proceso de fermentación lento, mientras que el uso de nitrato en el proceso de fermentación rápido no está justificado desde el punto de vista sensorial.

**CAPÍTULO IV:**

**Identificación y Cuantificación de los Compuestos Aromáticos**

**Activos Presentes en los Embutidos Crudos Curados.**

*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007: 55, 3058-3065

---

## **6. CAPÍTULO IV: Identificación y Cuantificación de los Compuestos Aromáticos Activos Presentes en los Embutidos Crudos Curados**

### **6.1. Introducción**

El aroma es una característica muy importante en la calidad global de los embutidos crudos curados. Generalmente, se caracteriza por la naturaleza y cantidad de las especias usadas en el embutido (Meynier *et al.*, 1999). Sin embargo, las reacciones metabólicas que ocurren en la matriz (oxidación lipídica, fermentación de carbohidratos, catabolismo de aminoácidos y reacciones de esterificación) son el origen de la mayoría de los compuestos volátiles generados durante el proceso de maduración del embutido. Estas reacciones también son las que se ven más afectadas por los diferentes procesos de maduración.

El efecto del nitrito en el desarrollo del aroma a curado característico se ha estudiado ampliamente (Ramarathram, 1998; Ordóñez *et al.*, 1999) aunque aun no se han identificado los compuestos responsables del aroma a curado. Además, mientras que en los países de la cuenca mediterránea, el nitrito y el nitrato se usan indistintamente como agentes de curado, en los países del norte de Europa sólo se usa el nitrito (Flores, 1997). En los capítulos II y III, se ha puesto de manifiesto el efecto significativo tanto del nitrito como del nitrato en los procesos de

hidrólisis y oxidación de los lípidos, en la generación de compuestos volátiles y en las características sensoriales de los embutidos.

En los últimos años, el uso de la micro-extracción en fase sólida (SPME) (Pawliszyn, 1997) ha permitido aislar e identificar un gran número de compuestos volátiles en los embutidos curados (Flores *et al.*, 2004), y también analizar estos compuestos a lo largo del proceso de maduración para determinar el efecto de diversos factores en su generación (como se puede ver en el capítulo II). Sin embargo, el perfil de compuestos volátiles extraídos por la técnica de SPME depende de los coeficientes de partición entre la muestra y el espacio de cabeza y también, entre el espacio de cabeza y la fibra (Zhang y Pawliszyn, 1993). Por tanto, esta técnica no permite la cuantificación absoluta de los compuestos volátiles presentes en la muestra. Además, al igual que en otras técnicas de análisis del espacio de cabeza dinámico, como la purga y trampa, la proporción de compuestos extraídos depende de las condiciones experimentales tales como tiempo de exposición, volumen, fase estacionaria de la fibra, temperatura, etc. (Toldrá y Flores, 2004). Por ello, el perfil cuantitativo obtenido por estas técnicas de espacio de cabeza no puede compararse con los perfiles de otros trabajos obtenidos bajo condiciones diferentes, tal como Stahnke (1994) indicó previamente.

La extracción múltiple del espacio de cabeza (MHE) es un procedimiento originalmente desarrollado para la cuantificación de compuestos volátiles en muestras sólidas (Kolb, 1982). Este método está basado en extracciones de gas sucesivas a intervalos de tiempo



constantes, y permite calcular el área total del compuesto eliminando así la influencia de la matriz de la muestra. La micro-extracción múltiple en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME múltiple) tiene el mismo objetivo que MHE, con el beneficio de ser una técnica libre de disolventes, que proporciona mayor sensibilidad y selectividad que el muestreo directo del espacio de cabeza (Ezquerro *et al.*, 2003a). La cantidad de analito extraída por la fibra es proporcional a la cantidad inicial, y se asume que la concentración de analito en la muestra disminuirá exponencialmente con el número de extracciones. El desarrollo de la técnica de HS-SPME múltiple (Ezquerro *et al.*, 2003) permite cuantificar de manera absoluta los compuestos volátiles en la muestra, ya que al eliminar el efecto matriz sólo se necesita conocer el coeficiente de partición entre el espacio de cabeza y la fibra. El cálculo de este coeficiente de partición para cada compuesto presente en la muestra, sería muy largo y tedioso, pero en su defecto la distribución de los compuestos entre el espacio de cabeza y la fibra se puede calibrar con patrones internos o externos. El método de HS-SPME múltiple ha sido aplicado anteriormente en el campo de la ciencia de los alimentos para la determinación cuantitativa de compuestos volátiles en embalajes multicapa (Ezquerro *et al.*, 2003a; Ezquerro *et al.*, 2003b) y en vino (Martínez-Uruñuela *et al.*, 2004).

La poca información existente sobre los principales compuestos aromáticos responsables del aroma típico a curado de los embutidos crudos curados proviene del análisis por cromatografía de gases combinado con técnicas olfatométricas (CG-O) (Stahnke, 1994; Stahnke,

1995c; Meynier *et al.*, 1999), lo cual indica que compuestos tienen un impacto aromático en el aroma global, pero no aporta información sobre su intensidad. También, se han aplicado técnicas de dilución (AEDA) para cuantificar la intensidad de los compuestos aromáticos (Schmidt y Berger, 1998a; Schmidt y Berger, 1998b; Blank *et al.*, 2001). Sin embargo, no se han aplicado otras técnicas olfatométricas a los embutidos crudos curados, a pesar de que se ha demostrado que el método de frecuencia de detección (Linssen *et al.* 1993; Pollien *et al.*, 1997) proporciona resultados directamente relacionados con la intensidad aromática (van Ruth y O'Connor, 2001).

Los compuestos aromáticos activos presentes en el espacio de cabeza de embutidos crudos curados no se han cuantificado previamente de manera absoluta, dado que su recuperación depende de las técnicas de extracción aplicadas. Por ello, el objetivo de este trabajo fue determinar los compuestos aromáticos activos que contribuían al aroma global de embutidos crudos curados fabricados con nitrito o nitrato por el método de frecuencia de detección y posteriormente, determinar cuantitativamente dichos compuestos por HS-SPME múltiple.

## ***6.2. Materiales y Métodos***

### **6.2.1 Reactivos y Estándares**

Los siguientes reactivos se utilizaron para preparar las disoluciones de estándares: acetato de etilo ( $\geq 99,9$ ), 2-pentanona ( $\geq 99\%$ ), pentanal ( $\geq 97\%$ ), 2,3-pentanodiona ( $\approx 97\%$ ), 2-(E)-hexenal ( $\geq 97\%$ ),

2-heptanona ( $\geq 98\%$ ), heptanal ( $\geq 95\%$ ), 2-(E)-heptenal ( $\approx 98\%$ ), 1-octen-3-ol ( $\geq 98\%$ ), octanal ( $\geq 98\%$ ) y 2-nonanona ( $\geq 99\%$ ) de Fluka; hexanal (98%), 2,4-(E,E)-heptadienal (90%), fenilacetaldehído (90%), 2-(E)-octenal (94%), nonanal ( $\approx 97\%$ ) y 2-(E)-nonenal (97%) de Aldrich; y 1-hexanol de PolyScience.

### **6.2.2 Fabricación de los Embutidos**

Se fabricaron dos lotes de embutidos, uno contenía nitrito sódico y el otro nitrato potásico. Se emplearon la misma formulación y proceso de secado y maduración descritos en el apartado 4.2.1. El tiempo total del proceso de fermentación y secado fue de 44 días. Finalmente, los embutidos se envasaron a vacío y se almacenaron a 4° C durante 2 meses, por tanto la duración final del proceso fue de 111 días. Al final del proceso, tres embutidos de cada lote elegidos al azar se utilizaron para realizar los análisis.

### **6.2.3 Extracción y Análisis de los Compuestos Volátiles**

Se utilizó la técnica de SPME en espacio de cabeza para la extracción de los compuestos volátiles de embutidos crudos curados. Se empleó el procedimiento de extracción descrito en el apartado 3.2.3; y la fibra y tiempo de extracción indicados en el apartado 4.2.5.

Los compuestos volátiles extraídos por la fibra se analizaron por CG-MS, utilizando el método descrito en el apartado 3.2.4.

#### 6.2.4 Olfatometría (Frecuencia de Detección)

Los compuestos adsorbidos por la fibra se desorbieron en el puerto de inyección del CG 8000 Top (Fisons, CE Instruments, Rodano, Milán, Italia) durante 6 min a 240 °C en modo splitless, la válvula de split se abrió después de 1 min. Los compuestos volátiles se separaron utilizando una columna capilar DB-624 (J&W Scientific, 60 m, 0,32 mm d.i., 1,8 µm grosor del film). La columna capilar se dividió (2:1) en dos tubos capilares, sin fase estacionaria y desactivados, conectados al puerto de olfacción y al detector de ionización de llama (FID), respectivamente. Se empleó helio como gas portador a una velocidad lineal de 35,14 cm/seg. El programa de temperatura del horno empezó cuando se introdujo la fibra en el inyector, manteniendo el horno a 38 °C durante 13 min, se incremento la temperatura a 100 °C con un gradiente de 3 °C/min y se mantuvo durante 10 min, posteriormente se incrementó la temperatura hasta 150 °C a 3 °C/min y hasta 210 °C a 5 °C/min donde finalmente se mantuvo durante 10 min. El detector FID se ajustó a 240 °C. El puerto de olfacción estaba equipado con un dispositivo para la humidificación del eluído cromatográfico.

Se utilizó el método de frecuencia de detección para estimar el impacto aromático de cada uno de los compuestos volátiles (Linssen *et al.*, 1993; Pollien *et al.*, 1997). Seis catadores entrenados evaluaron los aromas del eluído cromatográfico y se grabó tanto el tiempo de retención como el descriptor aromático de cada olor percibido. Se realizaron un total de 18 ensayos por lote, 6 valoraciones individuales en cada uno de los 3 embutidos. En cada ensayo, se evaluaron los compuestos eluídos en dos

intervalos de tiempo diferentes (0 a 35 y 35 a 70 min) con el fin de evitar la fatiga olfativa de los catadores. La detección de un aroma en el puerto de inyección por menos de 3 catadores se consideró ruido. La frecuencia de detección final para cada compuesto se obtuvo mediante la suma de las 18 ensayos de olfacción realizadas por cada lote.

Los compuestos se identificaron empleando las siguientes técnicas: comparación con el espectro de masas e índice de retención de Kovats (1965) obtenidos para la misma muestra en el CG-MS; comparación con el tiempo de retención de un estándar auténtico inyectado en el CG-FID; y por coincidencia de los descriptores utilizados por los catadores con los descritos en el *Fenaroli's handbook of flavour ingredients* (Burdock, 2002).

### **6.2.5 Cuantificación de los Compuestos Aromáticos Activos por Micro-Extracción Múltiple en Fase Sólida del Espacio de Cabeza**

El principio de la técnica de MHE se basa en la realización de extracciones sucesivas de una única muestra a intervalos de tiempo constantes (Kolb, 1982). HS-SPME múltiple se basa en el mismo principio excepto por el uso de SPME para la extracción de los compuestos volátiles (Ezquerro *et al.*, 2003a). De este modo, la concentración de analito extraída disminuye exponencialmente con cada extracción; y el área total ( $A_t$ ) del pico correspondiente a la extracción exhaustiva puede ser calculada de la siguiente ecuación (Ezquerro *et al.*, 2003b):

$$A_t = \frac{A_1}{1 - e^{-k}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde  $A_1$  es el área del pico en la primera extracción y  $k$  es la pendiente obtenida cuando se representa el logaritmo neperiano del área del pico frente al número de extracciones menos uno.

Con el fin de calcular la masa inicial de analito en la muestra, se realizó una calibración con estándares externos. El estándar externo se preparó y analizó bajo las mismas condiciones instrumentales que la muestra.

Finalmente, la masa inicial de analito en la muestra ( $m_o$ ) se puede calcular utilizando la siguiente ecuación.

$$m_o = \frac{At \cdot m_s}{At_s} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde  $At$  y  $At_s$  son el área total del compuesto en la muestra y en el estándar externo, respectivamente, calculadas utilizando la ecuación 1, y  $m_s$  es la masa inicial de estándar externo utilizada para la calibración.

Los detalles de las ecuaciones y las condiciones que se deben cumplir para llevar a cabo el HS-SPME múltiple han sido descritos por Ezquerro *et al.* (2003a).

Para el protocolo de extracción, se troceó una loncha de embutido y se congeló en nitrógeno líquido para conseguir su pulverización. Se pesó 1 g de la muestra pulverizada en un vial de 30 ml de tapón de rosca con 15 ml de agua bi-distilada junto con 15  $\mu$ l de una disolución al 5 % (p/v) de hidroxitolueno butilado (BHT) en metanol para evitar la oxidación

lipídica. La muestra se homogeneizó durante 1 min con pulsos de 20 seg, usando un Polytron® PT 1200 (Kinematica AG, Suiza). Se transfirió 1 ml del homogeneizado a un vial de espació de cabeza de 10 ml, sellado con septum de PTFE/silicona (Supelco, Bellefonte, PA, EEUU), con 0,5 g de NaCl. El vial se equilibró a 30 °C durante 1 h. Se sometió la muestra a cuatro extracciones sucesivas exponiendo la fibra CAR/PDMS SF durante 1 h cada vez. Este protocolo se aplicó en 3 muestras de cada uno de los 2 lotes.

Después de cada extracción, se desorbió la fibra en el puerto de inyección del CG-MS para el análisis y cuantificación de los compuestos volátiles, usando las condiciones descritas en el apartado 3.2.4. Los datos se adquirieron en modo de monitorización del ion seleccionado (SIM) empleando un ión específico para cada uno de los compuestos cuantificados (ver iones en la **tabla 6.1**).

Para la calibración con estándares externos, se prepararon disoluciones madre de los compuestos puros en metanol. Cada una de estas disoluciones se diluyó, bien en mezclas o por separado, a la concentración final que se muestra en la **tabla 6.1**. El protocolo de HS-SPME múltiple se aplicó usando las mismas condiciones que en las muestras de embutido. En este caso, se introdujeron 5 µl de la solución estándar en el vial de espació de cabeza de 10 ml con 1 ml (1,4 g) de perlas de vidrio. Las perlas de vidrio se utilizaron para compensar el espació ocupado por la muestra en el vial (Kolb, 1982). Se aplicó al

**Tabla 6.1.** Ion seleccionado para la cuantificación de cada compuesto volátil en modo SIM y concentración del estándar preparado para la calibración por estándar externo.

IK	Compuesto	Cuantificación Ion (m/z)	Concentración del estándar (µg/µl)
466	Acetona	43	– <sup>a</sup>
473	Metanotiol	47	–
603	Butanal	72	–
635	Acetato de etilo	43	0.078
697	Ácido acético	60	–
727	2-pentanona	43	0.772
735	Pentanal	58	0.075
741	2,3-pentanodiona	57	1.000
824	1-pentanol	55	–
829	Hexanal	56	1.608
854	Ácido 2-metil-propanoico	43	–
878	Ácido butanoico	60	–
902	2-hexenal (E)	41	0.006
920	1-hexanol	56	1.600
936	2-heptanona	43	0.006
941	Heptanal	70	0.018
970	Metional	48	–
1016	2-heptenal (E)	41	0.007
1025	1-octen-3-ol	57	1.640
1035	Octanal	41	0.007
1057	2,4-heptadienal	81	0.007
1073	2,4-heptadienal (E,E)	81	0.007
1114	Fenilacetaldehido	91	0.008
1116	2-octenal (E)	41	0.033
1128	1-octanol	41	–
1140	2-nonanona	58	0.006
1151	Nonanal	98	0.013
1199	Fenil etil alcohol	91	–
1226	2-nonenal (E)	41	0.006
1289	Ácido octanoico	60	–

<sup>a</sup>La disolución estándar del compuesto no se preparó ya que no mostró una disminución exponencial en la muestra de embutido.



estándar externo el mismo procedimiento de extracción utilizado con el homogeneizado de la muestra.

### **6.2.6 Análisis Estadístico**

El efecto de las diferentes sales de curado en la concentración de los compuestos aromáticos activos cuantificados se analizó a través del análisis de la varianza (ANOVA) utilizando el software estadístico Statgraphics plus (v 5.1).

## **6.3. Resultados**

### **6.3.1 Frecuencia de Detección**

Se identificaron 97 compuestos volátiles por SPME-CG-MS, tal como se indica en la **tabla 5.1** del capítulo anterior. De todos estos compuestos, se desconoce cuales realmente contribuyen al aroma de los embutidos crudos curados y cuales están presentes en cantidades superiores a su umbral de detección.

Entre los 97 compuestos identificados, se describieron 55 zonas aromáticas diferentes en el embutido (ver **tabla 6.2** y **figura 6.1**). De ellos, 27 se identificaron por coincidencia con el espectro de masas, tiempo de retención y descriptor aromático de un estándar autentico, otros 17 por el espectro de masas y tiempo de retención, y sólo 1 se identificó tentativamente por coincidencia de los índices de Kovats obtenidos en el CG-FID y CG-MS; finalmente 10 compuestos no se

**Tabla 6.2.** Compuestos aromáticos activos identificados en el embutido crudo curado con fermentación lenta y cuantificados por HS-SPME múltiple.

N <sup>a</sup>	Descriptor CG-O	Compuesto	IK <sup>b</sup>	F <sup>c</sup>	Origen <sup>d</sup>	Umbral (ppm) <sup>e</sup>	Referencia <sup>f</sup>	Cantidad (ppm) <sup>g</sup>		
								Nitrito	Nitrato	p <sup>h</sup>
1	acetona, alcohol	Acetona	466	a	CH	1 – 630				
2	huevos podridos, coliflor	Metanotiol	473	b	AA	0,0002 – 0,04				
3	masa de pan, levadura	Etanol	523	b	CH	0,64 – 640				
4	dulce, saborizante	Butanal	603	b	AO	0,00084 – 8,8				
5	queso, gusanitos	Diacetilo (2,3-butanodiona)	615	b	CH	0,005 – 0,02	(1-4)			
6	afrutado, tofe	Acetato de etilo	635	b	E	0,34 – 623	(3;4)	1,30 ± 0,10	0,17 ± 0,03	***
7	rancio, jamón curado	3-metil-butanal	694	b	AA	0,002 – 0,004	(1;2;5)			
8	vinagre	Ácido acético	697	a	CH	0,025 – 25	(2-4)			
9	tostado, ajo	2-etil-furano	718	a	AO	--				
10	tostado, dulce	2-pentanona	727	b	βO	6,7 – 30		1,00 ± 0,20	0,10 ± 0,04	ns
11	hierba recién cortada, rancio	Pentanal	730	a	AO	0,12 – 17,5	(1)	4,4 ± 0,6	2,1 ± 0,25	ns
12	mantequilla, queso	2,3-pentanodiona	741	a	βO	0,01 – 0,06	(1;2)	17,0 ± 7,0	9,6 ± 0,3	ns
13	fresa	2-metil-propanoato de etilo	777	a	E	0,0003 – 0,038	(1;2;6)			
14	queso	Ácido propanoico	819	b	AO	0,003 – 3	(2-4)			
15	tostado, carne tostada	1-pentanol	824	b	AO	0,02 – 5				
16	hierba recién cortada, rancio	Hexanal	829	a	AO	0,02 – 0,33	(1-6)	9,5 ± 1,0	9,5 ± 0,3	ns
17	fresa	Butanoato de etilo	830	a	E	0,0027 – 0,2	(1-5)			
18	graso, aromatizante de snack	Ácido 2-metil-propanoico	854	b	AA	0,005 – 0,24	(2;3)			
19	fresa	2-metil-butanoato de etilo	875	a	E	0,00006 – 0,01	(1-3;5)			
20	queso	Ácido butanoico	878	a	CH	0,0004 – 0,04	(1-4)			
21	carne salada, jamón curado	2-hexenal (E)	902	b	AO	0,05 – 1,8	(2)	0,080 ± 0,015	0,089 ± 0,004	ns
22	hierba, plástico	1-hexanol	920	a	AO	0,04 – 4		0,14 ± 0,01	0,12 ± 0,02	ns
23	fresa	Pentanoato de etilo	927	a	E	0,0003 – 0,33	(1;2)			
24	queso, pies, calcetines sucios	Ácido 3-metil-butanoico	929	a	AA	0,00022 – 0,014	(1-4)			
25	medicinal, frutal	2-heptanona	936	a	βO	0,045 – 3,3	(2)	0,055 ± 0,009	0,046 ± 0,002	ns
26	cítrico, jabón, jamón curado rancio	Heptanal	941	b	AO	0,06 – 0,26	(1;2;5)	0,6 ± 0,2	1,0 ± 0,3	ns
27	plástico, cortezas de cerdo	2-heptanol	944	b	βO	0,1				
28	frutos secos tostados, snack frito	Desconocido 1	966	--						
29	caldo de carne, rancio	Metional (3-metilpropanal)	970	b	AA	0,00006 – 0,06	(6)			
30	pútrido, fresa, dulce	Desconocido 2	994	--						

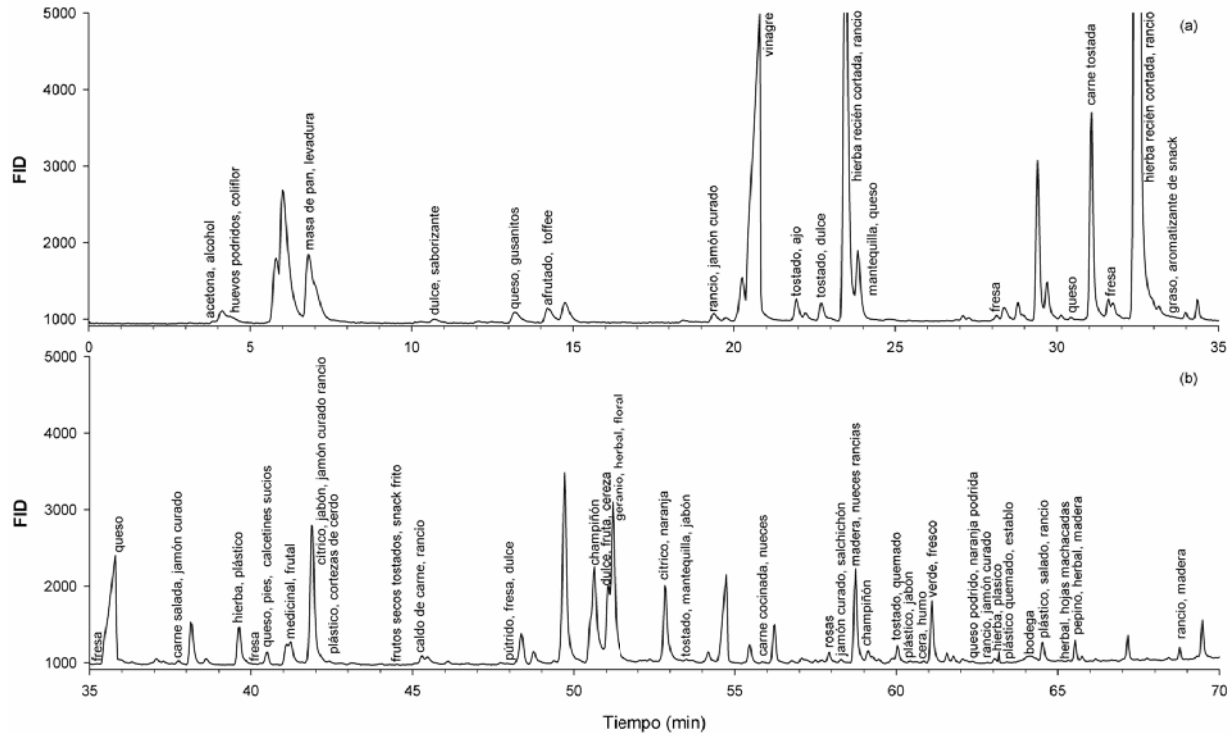
N	Descriptor CG-O	Compuesto	IK	F	Origen	Umbral (ppm)	Referencia	Cantidad (ppm)		
								Nitrato	Nitrato	p
31	cebolla, aromatizante rancio	2-pentyl-furan	1011	c	βO	0,27				
32	rancio, sucio	2-heptenal (E)	1016	b	AO	0,034-2,8	(1)	0,8 ± 0,1	1,3 ± 0,4	ns
33	champiñón	1-octen-3-ol	1025	a	βO	0,012 – 0,11	(3)	0,63 ± 0,04	0,75 ± 0,07	ns
34	dulce, fruta, cereza	Hexanoato de etilo	1031	a	E	0,003 – 0,09	(2;6)			
35	geranio, herbal, floral	Octanal	1035	a	AO	0,005 – 0,02	(1-3)	0,60 ± 0,20	1,29 ± 0,05	*
36	cítrico, naranja	Limoneno	1036	a	cont,		(3-5)			
37	tostado, mantequilla, jabón	2,4-heptadienal (? ,?)	1057	a	AO					
38	carne cocinada, nueces	2,4-heptadienal (E,E)	1073	a	AO	0,057				
		Suma de los isómeros 2,4-heptadienal								
39	rosas	Fenilacetaldehido	1114	b	AA	0,0006 – 0,002		0,16 ± 0,04	0,43 ± 0,06	***
40	jamón curado, salchichón	2-octenal (E)	1116	b	AO	0,009 – 0,25	(2;6)	0,35 ± 0,06	0,40 ± 0,10	ns
41	madera, nueces rancias	Desconocido 3	1121	--						
42	champiñón	1-octanol	1128	a	AO	0,05 – 0,7	(5)			
43	tostado, quemado	2-nonanona	1140	b	βO	0,075 – 5,5	(1;3;4)	0,102 ± 0,004	0,020 ± 0,010	***
44	plástico, jabón	Nonanal	1151	b	AO	0,005 – 0,23	(1;2;6)	0,8 ± 0,4	1,2 ± 0,3	ns
45	cera, humo	Desconocido 4	1152	--						
46	verde, fresco	Desconocido 5	1156	--						
47	queso podrido, naranja podrida	Desconocido 6	1177	--						
48	rancio, jamón curado	Ácido heptanoico	1178	b	AO	0,022 – 2,6				
49	hierba, plástico	Desconocido 7	1180	--						
50	plástico quemado, establo	Desconocido 8	1197	--						
51	bodega	Fenil etil alcohol	1199	b	AA	0,005 – 0,16	(3)			
52	plástico, salado, rancio	Desconocido 9	1207	--						
53	herbal, hojas machacadas	Desconocido 10	1223	--						
54	pepino, herbal, madera	2-nonenal (E)	1226	a	AO	0,0001 – 0,025	(1;2)	0,07 ± 0,02	0,35 ± 0,08	**
55	rancio, madera	Ácido octanoico	1289	b	AO	0,00006 – 0,5				

<sup>a</sup>Número del compuesto aromático en orden de elución cromatográfica. <sup>b</sup>Índice de Kovats calculado para una columna capilar DB-624 (J&W Scientific: 30 m, 0,25 mm d.i., 1,4 μm grosor del film). <sup>c</sup>F: Fiabilidad de la identificación; c: identificación por coincidencia el IK entre el CG-FIC y el CG-MS, b: por espectro de masas y tiempo de retención idéntico al del estándar autentico, a: espectro de masas, tiempo de retención idéntico al del estándar autentico y coincidencia del descriptor aromático con la bibliografía o con Burdock (2002), <sup>d</sup>Origen, de acuerdo con Ordoñez et al, (1999): CH, fermentación de carbohidratos; AA, catabolismo de aminoácidos; AO, auto-oxidación lipídica; E, actividad esterasa; βO, β-oxidación lipídica; cont., contaminante. <sup>e</sup>Umbrales de detección en aire, según van Gemert (2004). <sup>f</sup>Referencias: (1) Stahnke (1994); (2) Stahnke (1995c); (3) Schmidt y Berger (1998a); (4) Schmidt y Berger (1998b); (5) Meynier et al, (1999); (6) Blank et al, (2001). <sup>g</sup>ppm, cuantificados usando HS-SPME múltiple. Resultados expresados como la media de tres repeticiones junto con la desviación estándar. <sup>h</sup> Valor p del análisis de varianza.

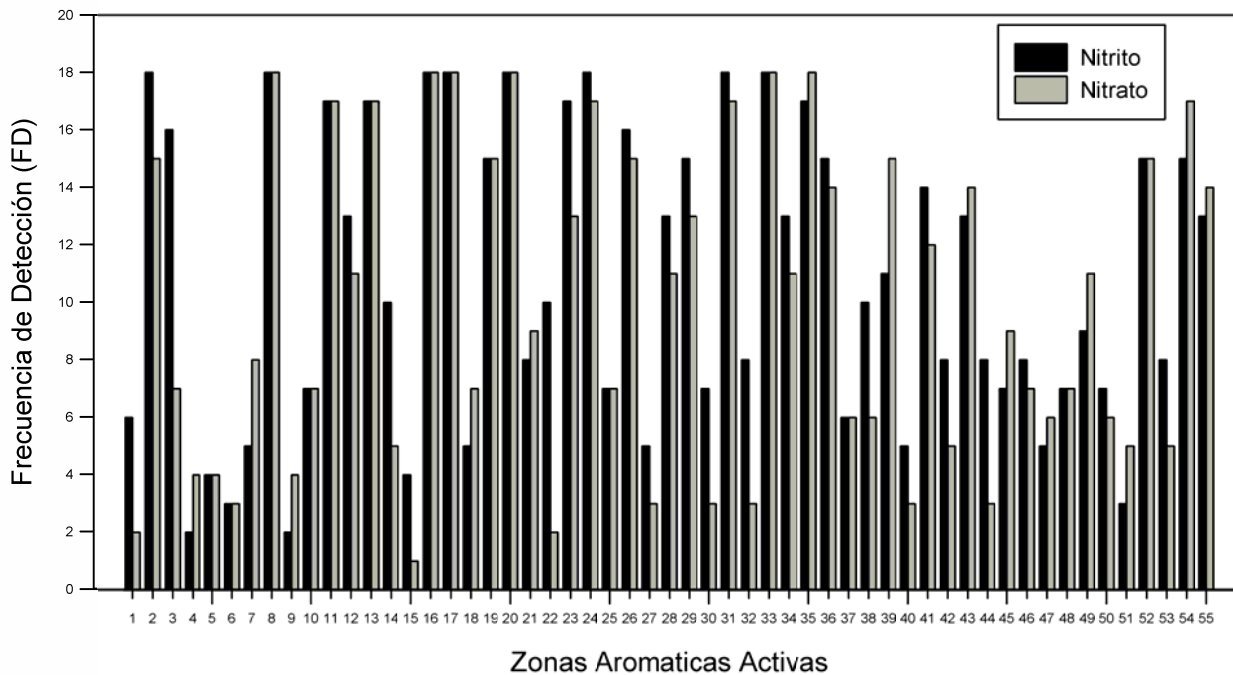
puieron identificar. De los compuestos identificados: 15 eran aldehidos, 8 alcoholes, 7 ácidos orgánicos, 7 cetonas, 6 esterres y 2 furanos. Todos estos compuestos se han identificado previamente en embutidos crudos curados (ver **tablas 3.1, 4.4 y 5.1**).

De los 55 compuestos aromáticos activos, sólo 13 presentaron valores de frecuencia de detección mayores de 17 en al menos uno de los lotes (ver **figura 6.2**), estos compuestos fueron los que contribuyeron en mayor medida al aroma del embutido. De acuerdo con sus orígenes, se encontraron 5 compuestos procedentes de la auto-oxidación lipídica: pentanal, hexanal, 2-pentil-furano, octanal y 2-nonenal que presentaron notas aromáticas de tipo herbal (**tabla 6.2**); 1 compuesto procedente de la  $\beta$ -oxidación lipídica: 1-octen-3-ol (aroma a champiñón); 2 compuestos procedentes de la fermentación de carbohidratos: ácidos acético (aroma a vinagre) y butanoico (aroma a queso); 2 compuestos procedentes del catabolismo de aminoácidos: metanotiol (aroma a huevos podridos) y ácido 3-metil-butanoico (aroma a queso o pies); y tres esterres: butanoato de etilo, 2-metil-propanoato de etilo y pentanoato de etilo que aportaron notas frutales, principalmente aroma a fresa (**tabla 6.2**).

El análisis del aroma por CG-O permitió identificar otras 17 zonas aromáticas que también contribuyeron al aroma del embutido con frecuencias de detección mayores de 10 (ver **figura 6.2**), es decir, compuestos que fueron detectados por los catadores la mitad de las veces que aparecieron. Cinco de estos compuestos procedían de la auto-oxidación de los lípidos: ácido propanoico, 1-hexanol, heptanal, 2,4-



**Figura 6.1.** Regiones aromáticas descritas en el perfil cromatográfico obtenido por CG-FID de embutidos crudos curados. A) Región cromatográfica de 0 a 35 min. B) Región cromatográfica de 35 a 70 min.



**Figura 6.2.** Aromagrama del espacio de cabeza de embutidos crudos curados fabricados con nitrito o nitrato y sometidos a fermentación lenta. Los valores de frecuencia de detección se obtuvieron con 6 catadores y 3 embutidos por lote. Los números corresponden a los descriptores aromáticos indicados en la tabla 6.2.

heptadienal y ácido octanoico; uno de la fermentación de carbohidratos: etanol; dos del catabolismo de aminoácidos: metional y fenilacetaldehído; dos de la  $\beta$ -oxidación lipídica: 2,3-pentanodiona y 2-nonanona; 2 eran ésteres: 2-metil-butanoato de etilo y hexanoato de etilo; limoneno que a menudo aparece como contaminante del pienso; y finalmente cuatro compuestos no identificados, de los cuales dos tenían un característico olor a nueces.

Cabe destacar la presencia de 9 compuestos aromáticos que fueron descritos como aromas relacionados con la carne (**tabla 6.2** y **figuras 6.1** y **6.2**). En orden de elución los compuestos responsables de estos aromas fueron: 3-metil-butanal (rancio, jamón curado), 1-pentanol (carne tostada), 2-hexenal (carne salada, jamón curado), heptanal (cítrico, jabón, jamón curado rancio), 2-heptanol (plástico, cortezas de cerdo), metional (caldo de carne, rancio), 2,4-heptadienal (E,E) (carne cocida, nueces), 2-octenal (jamón curado, salchichón), y ácido heptanoico (rancio, jamón curado).

El uso del método de frecuencia de detección no mostró ninguna diferencia en cuanto a la presencia de compuestos aromáticos en los diferentes lotes, sólo diferencias en el ratio de algunos de ellos. Trece compuestos mostraron una frecuencia de detección mayor en el lote fabricado con nitrito. Entre ellos, cinco presentaron una diferencia mayor de 5 unidades de FD: etanol, 1-hexanol, ácido propanoico, 2-heptenal y nonanal. Otros 8 mostraron diferencias de 3 o 4 unidades de FD: acetona, metanotiol, pentanoato de etilo, 1-pentanol, 2,4-heptadienal

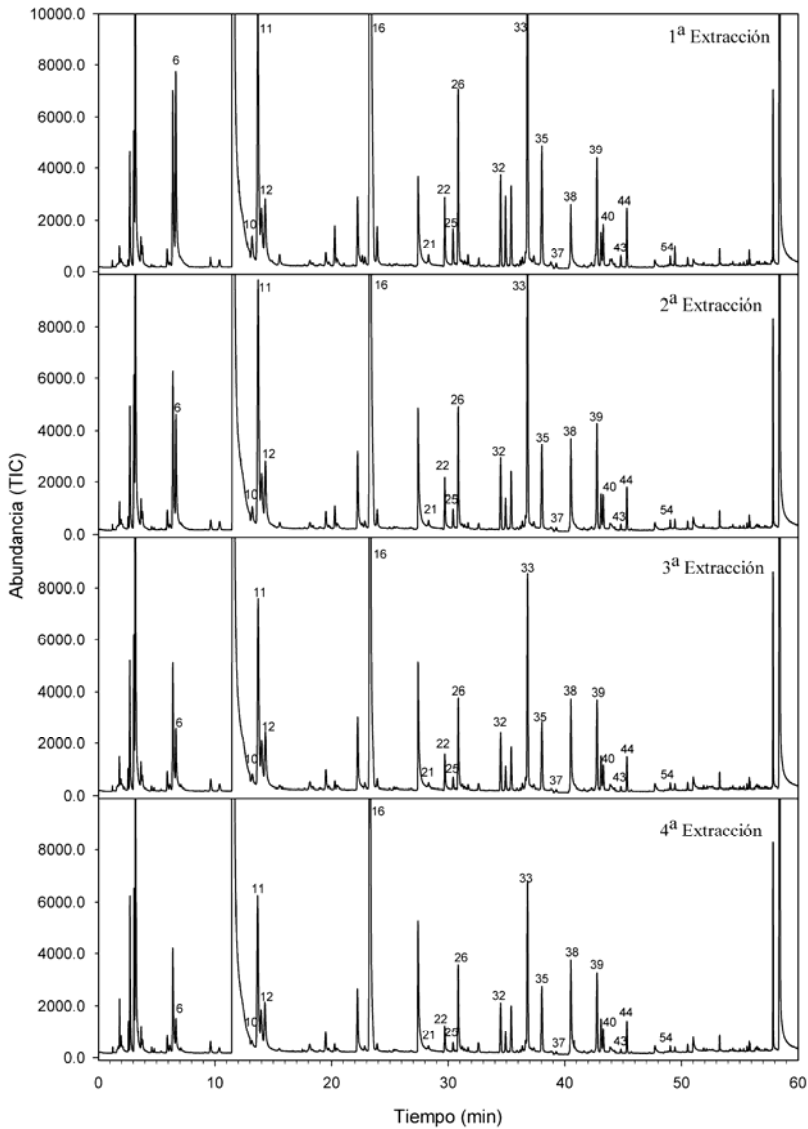
(E,E), 1-octanol y los compuestos desconocidos número 2 y 10. Por otro lado, fenilacetaldehído y 3-metil-butanal mostraron respectivamente 4 y 3 unidades de FD superiores en el lote fabricado con nitrato.

### 6.3.2 HS-SPME Múltiple

Después de determinar los compuestos aromáticos activos en el espacio de cabeza de los embutidos crudos curados, se procedió a la cuantificación absoluta de estos compuestos por HS-SPME múltiple.

Para realizar esta técnica es necesario empezar con una cantidad de muestra muy pequeña para que la disminución exponencial del área del pico pueda ser observada desde el principio de la experiencia (Ezquerro *et al.*, 2003a). Los embutidos presentan una matriz muy heterogénea en contraste con el vino o los materiales de embalaje. Por tanto, es muy difícil conseguir una muestra representativa pesando una cantidad pequeña de embutido. Para evitar este problema, se fijó como peso mínimo un gramo de muestra finamente pulverizada y se realizaron diferentes suspensiones en agua. La dilución elegida fue 1 g de embutido en 15 ml de agua, porque fue la que presentó el mayor número de compuestos con disminución exponencial (ver **figura 6.3**). A 1 ml de esta suspensión se añadió NaCl en concentración saturante para promover la liberación de los compuestos volátiles al espacio de cabeza del vial. También se añadió BHT para evitar los fenómenos de oxidación lipídica en la muestra, ya que durante el proceso de optimización se observó que la cantidad de aldehídos, en lugar de disminuir, aumentaba exponencialmente con cada extracción (datos no incluidos).



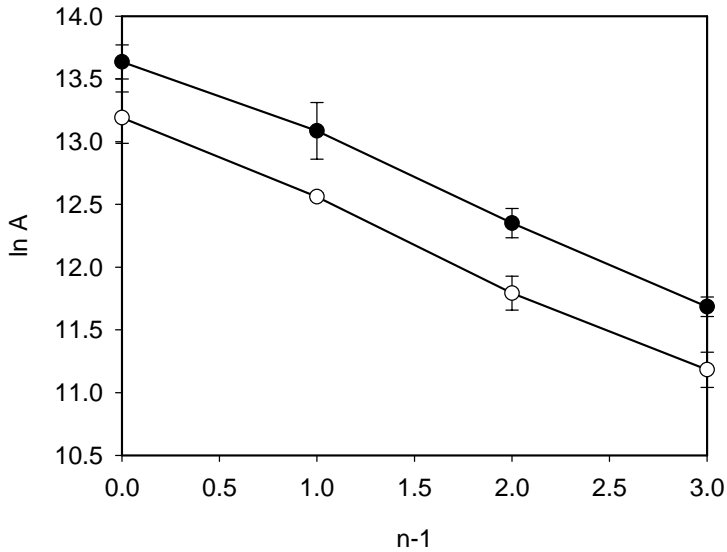


**Figura 6.3.** Cromatogramas de las cuatro extracciones sucesivas realizadas por HS-SPME múltiple de un embutido crudo curado. Los números de pico corresponden a los compuestos indicados en la tabla 6.2.

Las áreas se cuantificaron en modo SIM para incrementar la sensibilidad, porque la cantidad de compuesto volátil extraído era muy baja debido a la pequeña cantidad de muestra utilizada y al hecho de que la fibra sólo se exponía durante 1 h. Por tanto, muchos de los compuestos volátiles detectados en CG-O por extracción de la fibra durante 3 h no fueron encontrados en la extracción por HS-SPME múltiple. Así, de los 55 compuestos aromáticos activos detectados por CG-O sólo 30 fueron detectados en el análisis por HS-SPME múltiple tal como se puede ver en las **tablas 6.1**.

Únicamente 18 compuestos aromáticos activos presentaron una disminución exponencial del área al aplicar el HS-SPME múltiple (**ver figura 6.3**). Para cuantificar los analitos, es necesario observar una disminución exponencial del área del pico (**ver figura 6.4**), por tanto, se determinó la linealidad de la representación para cada lote de embutidos y para la disolución estándar. La **tabla 6.3** muestra las pendientes y los coeficientes de correlación ( $R^2$ ) de cada compuesto con un intervalo de confianza de al menos el 99% en los embutidos y la disolución estándar. Los compuestos que no se mostraron en la **tabla 6.3** mostraron un incremento del área durante las extracciones o coeficientes de correlación bajos y por tanto se no pudieron cuantificar por HS-SPME múltiple bajo las condiciones optimizadas.

Se aplicó el método de HS-SPME múltiple a los embutidos fabricados con nitrito y nitrato por triplicado, la cuantificación de los compuestos aromáticos activos se muestra en la **tabla 6.2**. Sólo algunos compuestos



**Figura 6.4.** Disminución exponencial del área del acetato de etilo en cuatro extracciones sucesivas realizadas por HS-SPME múltiple de un embutido crudo curado. Lote fabricado con nitrito (●) y nitrato (○).

mostraron diferencias significativas entre lotes. La concentración de acetato de etilo y 2-nonanona fue mayor en los embutidos fabricados con nitrito, mientras que octanal, los isómeros 2,4-heptadienal, fenilacetaldehído y 2-nonenal fueron mayores en los embutidos fabricados con nitrato.

Con respecto a los umbrales de detección de los 18 compuestos aromáticos activos cuantificados, la mayoría de ellos se encontraron por encima del límite de detección y por tanto, contribuyeron significativamente al aroma del embutido curado. Otros compuestos

**Tabla 6.3.** Pendientes y coeficientes de correlación de la disminución exponencial del área los compuestos volátiles obtenidas por HS-SPME múltiple a partir de los embutidos crudos curados con fermentación lenta y diferentes sales de curado y de las disoluciones de estándares

N <sup>a</sup>	Compuesto	Nitrito		Nitrato		Estándar	
		Pendiente	R <sup>2</sup>	Pendiente	R <sup>2</sup>	Pendiente	R <sup>2</sup>
6	Acetato de etilo	-0,6586	0,9944	-0,6794	0,9935	-0,1226	0,9126
10	2-pentanona	-0,2197	0,9249	-0,2080	0,9170	-0,1011	0,9545
11	Pentanal	-0,1463	0,9637	-0,2236	0,9784	-0,0535	0,8675
12	2,3-pentanodiona	-0,0959	0,9104	-0,1429	0,9676	-0,2254	0,9264
16	Hexanal	-0,3154	0,9105	-0,3553	0,9714	-0,6609	0,9418
21	2-hexenal	-0,3327	0,8851	-0,2850	0,9087	-0,5040	0,9706
22	1-hexanol	-0,3522	0,9848	-0,3229	0,9957	-11,966	0,8424
25	2-heptanona	-0,3900	0,8870	-0,4589	0,9564	-0,2439	0,7978
26	Heptanal	-0,2610	0,9230	-0,2012	0,8364	-0,1958	0,7366
27	2-heptenal	-0,2682	0,9025	-0,1683	0,7293	-0,6816	0,9067
32	1-octen-3-ol	-0,2607	0,9260	-0,2894	0,9802	-23,988	0,8646
35	Octanal	-0,2709	0,9386	-0,1910	0,8356	-0,2588	0,7674
37+38	Suma de los isómeros						
	2,4-heptadienal	-0,1967	0,9541	-0,1080	0,9479	-19,211	0,9862
39	Fenilacetaldehído	-0,1554	0,9855	-0,1359	0,9779	-0,2438	0,6890
40	2-octenal	-0,2495	0,9443	-0,1676	0,9178	-0,7251	0,9039
43	2-nonanona	-0,3584	0,9077	-0,3343	0,9124	-0,6573	0,9345
44	Nonanal	-0,2267	0,9690	-0,1727	0,8573	-0,3639	0,7730
54	2-nonenal	-0,2590	0,9021	-0,0385	0,7919	-10,813	0,9698

<sup>a</sup> Número de compuesto en orden de elución y correspondientes a los indicados en la tabla 6.2.

como 2-pentanona, acetato de etilo y 2-heptanona, mostraron concentraciones por debajo o alrededor de su umbral de detección y por ello, su contribución al aroma global fue menor.

#### **6.4. *Discusión***

Alrededor de trescientos compuestos volátiles diferentes se han aislado del espacio de cabeza de embutidos crudos curados aplicando diferentes técnicas (Berger *et al.*, 1990; Berdagué *et al.*, 1993; Viallón *et al.*, 1996). En este trabajo, se identificaron 97 compuestos volátiles en embutidos crudos curados, aunque sólo 55 se detectaron como compuestos aromáticos activos por el método de frecuencia de detección. Tal como se indica previamente, el aroma de embutidos crudos curados ha sido evaluado por CG-O usando el método de Análisis de Dilución del Extracto Aromático (AEDA) (Schmidt y Berger, 1998a; Schmidt y Berger, 1998b; Blank *et al.*, 2001). Los compuestos aromáticos más potentes observados por Blank *et al.* (2001) fueron hexanal, metional y 2-acetil-pirrolina. Por otro lado, sin tener en cuenta la contribución de los compuestos aromáticos derivados de las especias, Schmidt y Berger (1998a; 1998b) indicaron que los compuestos aromáticos más potentes fueron el ácido 3-metil-butanoico, butanoato de etilo, 3-metil-butanoato de propilo y ácido acético. Sin embargo, debido a las diferencias de procesado en las diferentes regiones Schmidt y Berger (1998a) encontraron que en el embutido español los compuestos aromáticos más potentes fueron diacetilo, ácido 3-metil-butanoico, propanoato de etilo, fenil etil alcohol y ácido acético. De acuerdo con los resultados presentados en este capítulo, varios compuestos como el hexanal, el

ácido 3-metil-butanoico y el ácido acético han sido generalmente descritos como compuestos aromáticos potentes en los embutidos crudos curados y probablemente, son contribuyentes esenciales del aroma a curado global; aunque debería tenerse en consideración la contribución de otros esteres, aldehidos y ácidos.

En general, se ha atribuido un papel esencial en el aroma de los embutidos crudos curados a los aldehidos de cadena ramificada (Stahnke, 1995b). Algunos autores han seleccionado cepas de microorganismos por su capacidad para producir dichos compuestos (Montel *et al.*, 1996), y otros han tratado de acelerar la maduración del embutido añadiendo enzimas microbianos que promueven la generación de aldehidos ramificados y sus ácidos y alcoholes correspondientes (Bruna *et al.*, 2000a; Bruna *et al.*, 2000b; Bruna *et al.*, 2001a). En contraste, los estudios de CG-O muestran que otros compuestos contribuyen en mayor medida al carácter curado de los embutidos (Schmidt y Berger, 1998a; Schmidt y Berger, 1998b; Blank *et al.*, 2001), tal como se muestra también en el presente estudio. Los embutidos utilizados en este trabajo mostraron bajas concentraciones de aldehidos de cadena ramificada, sin embargo la presencia de levaduras, además de bacterias lácticas y estafilococos en embutidos curados produce una mayor proporción de estos compuestos volátiles (Flores *et al.*, 2004). Esto significa que la concentración de estos compuestos volátiles es altamente dependiente de las condiciones de procesamiento y de los cultivos iniciadores utilizados.

En el capítulo anterior se observó que la adición de nitrato en embutidos crudos curados sometidos a fermentación lenta producía una preferencia significativa en cuanto a aroma, sabor y calidad global. El método de frecuencia de detección se aplicó a ambos lotes con el fin de determinar las posibles diferencias en compuestos aromáticos activos entre ellos. Sin embargo, los 55 compuestos aromáticos activos se detectaron simultáneamente en ambos lotes de embutido. Es decir, no hay compuestos específicos responsables de las diferencias en aroma debidas a los agentes de curado, tal como previamente indicó Stahnke (1995c).

Respecto al efecto de las diferentes sales de curado en las rutas de generación de compuestos volátiles, los valores de frecuencia de detección indicaron que el lote fabricado con nitrito contenía mayores proporciones de compuestos procedentes de la auto-oxidación lipídica, mientras que los compuestos derivados del catabolismo de aminoácidos mostraron valores FD mayores en el lote fabricado con nitrato, tal como se indicó en los capítulos II y III. El efecto del nitrato en promover la generación de compuestos volátiles de cadena ramificada ha sido previamente observado por Olesen *et al.* (2004a) en embutidos con fermentación rápida. Sin embargo, estos resultados no están de acuerdo con Stahnke (1995b) quien observó que la adición de nitrato incrementaba fuertemente la generación de aldehidos lineales, aunque su trabajo fue realizado en embutidos sometidos a fermentación rápida.

Los resultados obtenidos para el HS-SPME múltiple no están completamente de acuerdo con los obtenidos por el método de

frecuencia de detección. Sólo la mayor concentración de fenilacetaldehído en el lote fabricado con nitrato fue detectado por ambos métodos, frecuencia de detección y HS-SPME múltiple.

Se ha de tener en cuenta que utilizando el método HS-SPME múltiple se evita el efecto matriz (Kolb, 1982; Ezquerro *et al.*, 2003a) y por tanto, la concentración detectada por este método no será la de los compuestos liberados en el espacio de cabeza sino la concentración de dichos compuestos en la matriz sólida de la muestra. En contraste, durante el análisis olfatométrico, los compuestos volátiles fueron extraídos del espacio de cabeza del embutido y el perfil y proporción de estos compuestos depende de varios factores, entre ellos, el coeficiente de partición entre la matriz de la muestra y el espacio de cabeza. Por eso, la comparación entre estos métodos, SPME-CG-O y múltiple HS-SPME no se puede hacer directamente. En cualquier caso, los resultados obtenidos al aplicar HS-SPME múltiple proporcionan datos nuevos sobre la concentración real de los compuestos aromáticos activos presentes en embutidos curados sometidos a fermentación lenta.

En el capítulo III, apartado 4.3.4, se observó un efecto del nitrito y el nitrato sobre la matriz cárnica de los embutidos. Es decir, se detectó una mayor lipólisis en los embutidos fabricados con nitrito, que se relacionó con una mayor oxidación; así como, una mayor concentración de triglicéridos en los embutidos fabricados con nitrato. Teniendo en cuenta que los triglicéridos constituyeron un 92 % de los lípidos totales y que los compuestos volátiles tienen una mayor solubilidad en grasa



(Mottram, 1991), la menor concentración de triglicéridos en los embutidos fabricados con nitrito favorecerá la liberación de compuestos volátiles al espacio de cabeza. Por tanto, la concentración total de compuestos volátiles será mayor en los embutidos fabricados con nitrato, ya que estos compuestos estarán disueltos en la mayor proporción de triglicéridos presentes en dicho embutido. Ésta podría ser la razón por la cual se encontró una mayor concentración de compuestos volátiles por HS-SPME múltiple en los embutidos fabricados con nitrato.

En conclusión, este estudio muestra que no hay ningún compuesto volátil específico relacionado con el aroma producido por nitrito o nitrato en los embutidos crudos curados. El aroma de los embutidos es muy complejo y trece compuestos fueron los principales contribuyentes tal como muestran sus elevados valores de FD. Sin embargo, únicamente algunos de ellos se pudieron cuantificar por HS-SPME múltiple y su concentración no se pudo comparar con los valores de FD. Esto se debe a que existe un efecto matriz (lípidos-proteína) que afecta a la liberación de estos compuestos al espacio de cabeza de la muestra en el vial. Por tanto, la concentración de compuestos volátiles obtenidos por HS-SPME múltiple no sería suficiente para determinar la aceptación sensorial de los embutidos crudos curados.

## CONCLUSIONES

---

---

## 7. Conclusiones

- I. La técnica de SPME es una herramienta adecuada para el análisis cualitativo y cuantitativo de los compuestos volátiles presentes en embutidos crudos curados. La fase estacionaria CAR/PDMS es la más adecuada para el muestreo, dado que tiene la capacidad de extraer un mayor número de compuestos que las otras fibras analizadas. El tiempo óptimo de extracción será el mínimo necesario para que los compuestos volátiles alcancen el equilibrio. Además se debe evitar el largo tiempo de exposición que favorece la aparición de fenómenos de oxidación.
  
- II. La adición de diferentes sales de curado, nitrito o nitrato, en los embutidos crudos curados afecta a los mecanismos de hidrólisis y oxidación de los lípidos, y también a la generación de compuestos volátiles procedentes del metabolismo microbiano. Sin embargo, los agentes de curado tienen efectos diferentes en la calidad de dichos embutidos dependiendo del proceso de fermentación, es decir, de la realización o no de la etapa de estufaje en el proceso de fabricación.

- III. La preferencia de los consumidores por los embutidos fabricados con nitrato y sometidos a fermentación lenta se debe a los bajos niveles de oxidación y a las mayores proporciones de compuestos volátiles derivados de la fermentación de carbohidratos y del catabolismo de los aminoácidos. Sin embargo, la utilización de diferentes agentes de curado en el proceso de fermentación rápida, no produce diferencias apreciables por los consumidores, sino únicamente pequeñas diferencias de naturaleza química, como una mayor proporción de compuestos volátiles procedentes de la oxidación lipídica en los embutidos fabricados con nitrito.
- IV. El uso del nitrato sólo está justificado en el proceso de fermentación lenta donde produce un aumento de la calidad sensorial de los embutidos, ya que no produce un beneficio apreciable desde el punto de vista sensorial en el proceso de fermentación rápida.

- V. El empleo de la técnica olfatométrica “frecuencia de detección” indica que el aroma típico de los embutidos crudos curados no se debe a un compuesto volátil en particular sino a la proporción adecuada de una gran variedad de compuestos volátiles de diversa naturaleza química. En este sentido, la adición de nitrito o nitrato únicamente afecta a la proporción existente de dichos compuestos volátiles.
- VI. La técnica de HS-SPME múltiple es adecuada para la cuantificación absoluta de los compuestos volátiles presentes en los embutidos crudos curados. Sin embargo, dicha cuantificación no refleja la proporción de compuestos volátiles que pueden ser percibidos por el consumidor, debido a la presencia de interacciones entre la matriz del embutido (lípidos-proteína) y los compuestos volátiles.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

---

## 8. Bibliografía

- Aguirrezábal, M. M., Mateo, J., Domínguez, M. C. y Zumalacárregui, J. M. (2000). The effect of paprika, garlic and salt on rancidity in dry sausages. *Meat Science*, 54 (1), 77-81.
- AICE. Asociación de Industrias de la Carne de España. (2005). Panorama del sector cárnico. <http://www.aice.es/carne.asp>.
- Arneth, W. y Herold, B. (1988). Nitrat/Nitrit-Bestimmung m Wurstwaren nach enzymatischen Reduktion. *Fleischwirtschaft*, 68, 761-764.
- Axelsson, L. (1998). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: S. Salminen and A. von Wright (Eds.) *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. 2nd. pp. 1-72. New York: Marcel Dekker Inc.
- Bartlett, G. R. (1959). Phosphorous assay in column chromatography. *Journal of Biological Chemistry*, 234, 466-468.
- Berdagué, J. L., Monteil, P., Montel, M. C. y Talón, R. (1993). Effects of starter cultures on the formation of flavour compounds in dry sausage. *Meat Science*, 35, 275-287.
- Berger, R. G., Macku, C., German, J. B. y Shibamoto, T. (1990). Isolation and identification of dry salami volatiles. *Journal of Food Science*, 55, 1239-1242.

- Berry, J. F., Cevallos, W. H. y Wade, R. R. J. (1965). Lipid class and fatty acid composition of intact peripheral nerve and during walerian degeneration. *Journal of American Oil and Chemistry Society*, 42, 492-495.
- Blank, I., Devaud, S., Fay, L. B., Cerny, C., Steiner, M. y Zurbriggen, B. (2001). Odor-Active compounds of dry-cured meat: Italian-type salami and Parma ham. In: G. R. Takeoka, M. Güntert, and K. H. Engel (Eds.) *Aroma-active compounds in foods. Chemistry and sensory properties*. pp. 9-20. Washington, D.C.: American Chemical Society.
- BOE. (1979) Métodos de análisis de productos cárnicos.
- Bruna, J. M., Fernández, M., Hierro, E. M., Ordóñez, J. A. y de la Hoz, L. (2000a). Combined use of Pronase E and a fungal extract (*Penicillium aurantiogriseum*) to potentiate the sensory characteristics of dry fermented sausages. *Meat Science*, 54(2): 135-145.
- Bruna, J. M., Fernández, M., Hierro, E. M., Ordóñez, J. A. y de la Hoz, L. (2000b). Improvement of the sensory properties of dry fermented sausages by the superficial inoculation and/or the addition of intracellular extracts of *Mucor racemosus*. *Journal of Food Science*, 65, 731-738.
- Bruna, J. M., Hierro, E. M., de la Hoz, L., Mottram, D. S., Fernández, M. y Ordóñez, J. A. (2001a). The contribution of *Penicillium*



---

aurantiogriseum to the volatile composition and sensory quality of dry fermented sausages. *Meat Science*, 59, 97-107.

Bruna, J. M., Ordóñez, J. A., Fernández, M., Herranz, B. y de la Hoz, L. (2001b). Microbial and physico-chemical changes during the ripening of dry fermented sausages superficially inoculated with or having added an intracellular cell-free extract of *Penicillium aurantiogriseum*. *Meat Science*, 59 (1), 87-96.

Brunton, N. P., Cronin, D. A., Monahan, F. J. y Durcan, R. (2000). A comparison of solid-phase microextraction (SPME) fibres for measurement of hexanal and pentanal in cooked turkey. *Food Chemistry*, 68 (3), 339-345.

Burdock, G. A. (2002). *Fenaroli's handbook of flavour ingredients*. 4th ed. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc.

Cammack, R., Joannou, C. L., Cui, X. Y., Martínez, C. T., Maraj, S. R. y Hughes, M. N. (1999). Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1411 (2-3), 475-488.

Cassens, R. G., Greaser, M. L., Ito, T. y Lee, M. (1979). Reactions of Nitrite in Meat. *Food Technology*, 33 (7), 46-57.

Dufour, J. P., Delbecq, P. y Perez Albela, L. (2001). Solid-phase microextraction combined with gas chromatography-olfactometry for analysis of cheese aroma in gas chromatography-olfactometry. In: J. V. Leland, P. Schieberle, A.

- Buettener, and T. E. Acree (Eds.) *The state of the art*. pp. 123-137. Washington, D.C.: ACS.
- Durá, M. A., Flores, M. y Toldrá, F. (2004). Effect of *Debaryomyces* spp. on the proteolysis of dry-fermented sausages. *Meat Science*, 68 (2), 319-328.
- Edwards, R. A., Ordóñez, J. A., Dainty, R. H., Hierro, E. M. y de la Hoz, L. (1999). Characterization of the headspace volatile compounds of selected Spanish dry fermented sausages. *Food Chemistry*, 64, 461-465.
- EFSA. (2003) Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on a request from the Commission related to the effects of Nitrites/Nitrates on the Microbiological Safety of Meat Products.
- Elmore, J. S., Erbahadir, M. A. y Mottram, D. S. (1997). Comparison of dynamic headspace concentration on Tenax with solid phase microextraction for the analysis of aroma volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7): 2638-2641.
- Elmore, J. S., Mottram, D. S. y Hierro, E. (2000). Two fibre solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of volatile aroma compounds in cooked pork. *Journal of chromatography*, 905, 233-240.
- Ezquerro, O., Pons, B. y Tena, M. T. (2003a). Multiple headspace solid-phase microextraction for the quantitative determination of

- volatile organic compounds in multilayer packagings. *Journal of Chromatography A*, 999 (1-2), 155-164.
- Ezquerro, O., Pons, B. y Tena, M. T. (2003b). Evaluation of multiple solid-phase microextraction as a technique to remove the matrix effect in packaging analysis for determination of volatile organic compounds. *Journal of Chromatography A*, 1020 (2), 189-197.
- Flores, J. y Toldrá, F. (1993). Curing. In: R. Macrae, R. K. Robinson, and M. J. Sadler (Eds.) *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*. pp. 1277-1282. Academic Press Inc.
- Flores, J. y Bermell, S. (1996). Dry-cured sausages - Factors influencing souring and their consequences. *Fleischwirtschaft*, 76 (2), 163-165.
- Flores, J. (1997). Mediterranean vs northern European meat products. Processing technologies and main differences. *Food Chemistry*, 59 (4), 505-510.
- Flores, M., Durá, M. A., Marco, A. y Toldrá, F. (2004). Effect of *Debaryomyces* spp. on aroma formation and sensory quality of dry-fermented sausages. *Meat Science*, 68 (3), 439-446.
- 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.
- Frankel, E. N. (1984). Recent advances in the chemistry of rancidity of fats. In: A. Bailey (Ed.) *Recent Advances in the Chemistry of Meat*. pp.

- 87-164. Burlington House, London: The Royal society of Chemistry.
- Gandemer, G., Morvan-Mahi, B., Meynier, A. y Leperq, M. (1991). Quantitative and qualitative analysis of free fatty acids in meat and meat products. *Proceedings of the International Congress of Meat Science and Technology*, 37 (3), 1139-1142.
- Gianelli, M. P., Flores, M. y Toldrá, F. (2002). Optimisation of solid phase microextraction (SPME) for the analysis of volatile compounds in dry-cured ham. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82 (14), 1703-1709.
- Honikel, K. O. (2005). Propuesta para el etiquetado y las alegaciones nutricionales en la Unión Europea. Implicancias para los jamones curados. In: *III congreso mundial del jamón*.
- ISO 2917. (1999) Meat and Meat Products. Determination of the pH. Reference method.
- ISO 5495. (1983a) Sensory analysis. Methodology. Paired comparison test.
- Johansson, G., Berdagué, J. L., Larsson, M., Tran, N. y Borch, E. (1994). Lipolysis, proteolysis and formation of volatile components during ripening of a fermented sausage with *Pediococcus pentosaceus* and *Staphylococcus xylosus* as starter cultures. *Meat Science*, 38, 203-218.

- Juaneda, P. y Rocquelin, G. (1985). Rapid and convenient separation of phospholipids and non phosphorous lipids from rat heart using silica cartridges. *Lipids*, 20, 40-41.
- Kolb, B. (1982). Multiple Headspace Extraction - A Procedure for Eliminating the Influence of the Sample Matrix in Quantitative Headspace Gas-Chromatography. *Chromatographia*, 15 (9), 587-594.
- Kovats, E. Sz. (1965). Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. In: J. C. Giddings and R. A. Keller (Eds.) *Advances in chromatography*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Kröckel, L. (1995). Bacterial fermentation of meats. In: G. Campbell-Plat and P. E. Cook (Eds.) *Fermented meats*. pp. 39-52. Glasgow: Blackie Academic y Professional.
- Linssen, J. P. H., Janssens, J. L. G. M., Roozen, J. P. y Posthumus, M. A. (1993). Combined gas chromatography and sniffing port analysis of volatile compounds of mineral water packed in polyethylene laminated packages. *Food Chemistry*, 46(4): 367-371.
- Lücke, F. K. (2006). Fermented sausages. In: B. J. B. Wood (Ed.) *Microbiology of fermented foods*. pp. 41-83. London: Elsevier Applied Science Publishers.
- Marsili, R. T. (1999). Comparison of solid-phase microextraction and dynamic headspace methods for the gas chromatographic-mass

spectrometric analysis of light-induced lipid oxidation products in milk. *Journal of Chromatographic Science*, 37(1): 17-23.

Martínez-Uruñuela, A., Gonzalez-Saiz, J. M. y Pizarro, C. (2004). Optimisation of a headspace solid-phase microextraction method for the direct determination of chloroanisoles related to cork taint in red wine. *Journal of Chromatography A*, 1056 (1-2), 49-56.

Meynier, A., Novelli, E., Chizzolini, R., Zanardi, E. y Gandemer, G. (1999). Volatile compounds of commercial Milano salami. *Meat Science*, 51(2): 175-183.

Molly, K., Demeyer, D., Civera, T. y Verplaetse, A. (1996). Lipolysis in a Belgian sausage: Relative importance of endogenous and bacterial enzymes. *Meat Science*, 43 (3-4), 235-244.

Montel, M. C., Reitz, J., Talón, R., Berdagué, J. L. y Rousset, A. S. (1996). Biochemical activities of Micrococcaceae and their effects on the aromatic profiles and odours of a dry sausage model. *Food Microbiology*, 13, 489-499.

Morrison, W. R. y Smith, L. M. (1964). Preparation of fatty acids methyl esters and dimethyl acetals from lipids with boron fluoride-methanol. *Journal of Lipid Research*, 5, 600-608.

Mottram, D. S. (1991). Meat. In: H. Maarse (Ed.) *Volatile compounds in food and beverages*. pp. 107-177. New York: Marcel Dekker, Inc.

- Navarro, J. L., Nadal, M. I., Izquierdo, L. y Flores, J. (1997). Lipolysis in dry cured sausages as affected by processing conditions. *Meat Science*, 45 (2), 161-168.
- Navarro, J. L., Nadal, M. I., Nieto, P. y Flores, J. (1998). Effect of nitrate and nitrite curing salts on lipolysis in dry sausages produced using a rapid fermentation process. *Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung A/Food Research and Technology*, 206, 217-221.
- 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*, 212(4): 421-425.
- Neubauer, H. y Gotz, F. (1996). Physiology and interaction of nitrate and nitrite reduction in *Staphylococcus carnosus*. *Journal of Bacteriology*, 178 (7), 2005-2009.
- Nielsen, J. H., Sorensen, B. B., Skibsted, L. H. y Bertelsen, G. (1997). Oxidation in Pre-cooked minced pork as influenced by chill storage of raw muscle. *Meat Science*, 46 (2), 191-197.
- Noel, P., Briand, E. y Dumont, J. P. (1990). Role of Nitrite in Flavor Development in Uncooked Cured Meat-Products - Sensory Assessment. *Meat Science*, 28 (1), 1-8.
- Olesen, P. T., Meyer, A. S. y Stahnke, L. H. (2004a). Generation of flavour compounds in fermented sausages-the influence of

- curing ingredients, *Staphylococcus* starter culture and ripening time. *Meat Science*, 66 (3), 675-687.
- Olesen, P. T., Stahnke, L. H. y Talón, R. (2004b). Effect of ascorbate, nitrate and nitrite on the amount of flavour compounds produced from leucine by *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus*. *Meat Science*, 68 (2), 193-200.
- Ordóñez, J. A., Hierro, E. M., Bruna, J. M. y de la Hoz, L. (1999). Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39, 329-367.
- Pawliszyn, J. (1997). Solid phase microextraction – theory and practice. New York: Wiley – VCH.
- Pillonel, L., Bosset, J. O. y Tabacchi, R. (2002). Rapid preconcentration and enrichment techniques for the analysis of food volatile. A review. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 35(1): 1-14.
- Pollien, P., Ott, A., Montigon, F., Baumgartner, M., Muñoz-Box, R. y Chaintreau, A. (1997). Hyphenated headspace-gas chromatography-sniffing technique: screening of impact odorants and quantitative aromagram comparisons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7): 2630-2637.
- Ramarathram, N. (1998). The flavour of cured meat. In: F. Shahidi (Ed.) *Flavour of meat, meat products and seafoods*. pp. 290-319. London, UK: Chapman y Hall.



- Roberts, D. D., Pollien, P. y Milo, C. (2000). Solid-phase microextraction method development for headspace analysis of volatile flavor compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6): 2430-2437.
- Ruiz, J., Cava, R., Ventanas, J. y Jensen, M. T. (1998). Headspace solid phase microextraction for the analysis of volatiles in a meat product: Dry-cured Iberian ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (11), 4688-4694.
- Sanz, Y., Vila, R., Toldrá, F., Nieto, P. y Flores, J. (1997). Effect of nitrate and nitrite curing salts on microbial changes and sensory quality of rapid ripened sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 37 (2-3), 225-229.
- Sanz, Y., Vila, R., Toldrá, F. y Flores, J. (1998). Effect of nitrate and nitrite curing salts on microbial changes and sensory quality of non-fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 42 (3), 213-217.
- Schmidt, S. y Berger, R. G. (1998a). Aroma compounds in fermented sausages of different origins. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft y Technologie*, 31 (6), 559-567.
- Schmidt, S. y Berger, R. G. (1998b). Microbially formed aroma compounds during the maturation of dry fermented sausage (salami). *Advances in Food Sciences*, 20 (5/6), 144-152.

- Shahidi, F., Rubin, L. J. y Dsouza, L. A. (1986). Meat Flavor Volatiles - A Review of the Composition, Techniques of Analysis, and Sensory Evaluation. *Crc Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 24 (2), 141-243.
- Skjelvåle, R. y Tjaberg, T. B. (1974a). Comparison of Salami Sausage produced with and without addition of sodium nitrite and sodium nitrate. *Journal of Food Science*, 39, 520-524.
- Stahnke, L. H. (1994). Aroma components from dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosum*. *Meat Science*, 38, 39-53.
- Stahnke, L. H. (1995a). Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosum* at different temperatures and with different ingredient levels. I. Chemical and bacteriological data. *Meat Science*, 41, 179-191.
- Stahnke, L. H. (1995b). Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosum* at different temperatures and with different ingredient levels. II. Volatile components. *Meat Science*, 41, 193-209.
- Stahnke, L. H. (1995c). Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosum* at different temperatures and with different ingredient levels. III. Sensory evaluation. *Meat Science*, 41(2): 211-223.
- Stahnke, L. H. (1999). Volatiles produced by *Staphylococcus xylosum* and *Staphylococcus carnosus* during growth in sausage minces. I. Collection and identification. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 32 (6), 357-364.

- Steffen, A. y Pawliszyn, J. (1996). Analysis of flavor volatiles using headspace solid-phase microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (8), 2187-2193.
- Sunesen, L. O., Dorigoni, V., Zanardi, E. y Stahnke, L. H. (2001). Volatile compounds released during ripening in Italian dried sausage. *Meat Science*, 58, 93-97.
- Talón, R. y Montel, M. C. (1997). Hydrolysis of esters by staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*, 36 (2-3), 207-214.
- Talón, R., Chastagnac, C., Vergnais, L., Montel, M. C. y Berdagué, J. L. (1998). Production of esters by Staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*, 45 (2), 143-150.
- Talón, R., Walter, D., Chartier, S., Barriere, C. y Montel, M. C. (1999). Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*, 52 (1-2), 47-56.
- Toldrá, F., Sanz, Y. y Flores, M. (2001). Meat fermentation technology. In: Y. H. Hui, W. K. Nip, R. W. Rogers, and A. Y. Owen (Eds.) *Meat Science and Applications*. pp. 537-561. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Toldrá, F. y Flores, M. (2004). Analysis of meat quality. In: L. M. L. Nollet (Ed.) *Handbook of food analysis*. 2nd. pp. 1961-1977. New York: Marcel Dekker, Inc.

- Toldrá, F. (2005). Norma Europea de aditivos: implicaciones de la reducción de nitratos y nitritos en el jamón curado. In: *III congreso mundial del jamón*.
- Ullrich, F. y Grosch, W. (1987). Identification of the most intense volatile flavour compounds formed during autoxidation of linoleic acid. *Lebensm Unters Forsch*, 184, 277-282.
- van Gemert, L. J. y Nettenbreijer, A. (2004). *Compilations of odour threshold values in air, water and other media*. Zeist, The Netherlands: BACIS.
- van Ruth, S. M. y O'Connor, C. H. (2001). Influence of assessors' qualities and analytical conditions on gas chromatography-olfactometry analysis. *European Food Research and Technology*, 213(1): 77-82.
- Vergnais, L., Masson, F., Montel, M. C., Berdagué, J. L. y Talón, R. (1998). Evaluation of solid-phase microextraction for analysis of volatile metabolites produced by staphylococci. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1): 228-234.
- Viallón, C., Berdagué, J. L., Montel, M. C., Talón, R., Martín, J. F., Kondjoyan, N. y Denoyer, C. (1996). The effect of stage of ripening and packaging on volatile content and flavour of dry sausage. *Food Research International*, 29, 667-674.
- Waade, C. y Stahnke, L. H. (1997). Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with

- different ingredient levels. IV. Amino acid profile. *Meat Science*, 46(1): 101-114.
- Wirth, F. (1991). Restricting and dispensing with curing agents in meat products. *Fleischwirtschaft*. 1991, 71(9): 1051-1054.
- Wu, T. C. y Sheldon, B. W. (1988). Flavour components and factors associated with the development of off-flavours in cooked turkey rolls. *Journal of Food Science*, 53 (1), 49-54.
- Wyllie, S. G. y Fellman, J. K. (1993). Formation of volatile branched chain esters in bananas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3493-3496.
- Zaika, L. L., Zell, T. E., Smith, J. L., Palumbo, S. A. y Kissinger, J. C. (1976). Role of Nitrite and Nitrate in Lebanon Bologna, A Fermented Sausage. *Journal of Food Science*, 41 (6), 1457-1460.
- Zanardi, E., Ghidini, S., Battaglia, A. y Chizzolini, R. (2004). Lipolysis and lipid oxidation in fermented sausages depending on different processing conditions and different antioxidants. *Meat Science*, 66 (2), 415-423.
- Zhang, Z. y Pawliszyn, J. (1993a). Headspace solid-phase Microextraction. *Analytical Chemistry*, 65 (14), 1843-1852.

**ANEXOS**

---

## Volatile compounds of dry-fermented sausages as affected by solid-phase microextraction (SPME)

A. Marco, J.L. Navarro, M. Flores\*

*Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Apartado 75, 46100 Burjassot (Valencia), Spain*

Received 5 February 2003; received in revised form 22 May 2003; accepted 22 May 2003

### Abstract

The analysis of volatile compounds from the headspace of dry-fermented sausages was done by solid-phase microextraction (SPME). The effects of exposure time and fibre coating were investigated. A total of 90 different compounds were extracted by the two fibre coatings and these were identified. Sixty-six compounds were extracted by divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) coating and were identified, while 24 more were found with the carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) fibre. These 24 volatile compounds were mainly of low molecular weight. Four of the major compounds extracted: acetic acid, ethanol, hexanal and butanoic acid, were in high proportions in the two fibre coatings. However, the main differences were a higher affinity of DVB/CAR/PDMS for aldehydes while, for CAR/PDMS fibre, the higher affinity was for ester compounds. The extraction yields of dry fermented sausages volatile compounds varied according to the fibre coating used and the time of exposure, although competition effects were detected due to the high generation of lipid oxidation products, such as hexanal.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

*Keywords:* Solid phase microextraction; Dry fermented sausage; Volatile compound; Sausage flavour

### 1. Introduction

The use of solid-phase microextraction (SPME) for the quantitative analysis of volatile compounds has been applied to a high variety of foods (Steffen & Pawliszyn, 1996). However, in meat samples, the use of SPME has been focussed on the analysis of lipid oxidation products (Brunton, Cronin, Monahan, & Durcan, 2000; Nielsen, Sorensen, Skibsted, & Bertelsen, 1997), cooked pork (Elmore, Mottram, & Hierro, 2000) and dry-cured ham (Gianelli, Flores, & Toldrá, 2002; Ruiz, Cava, Ventanas, & Jensen, 1998). Moreover, SPME has been evaluated for the analysis of volatile metabolites produced by *Staphylococci* used in dry sausage manufacture (Vergais, Masson, Montel, Berdagué, & Talon, 1998).

The study of volatile compounds in fermented sausages has been done mainly by dynamic headspace analysis using the purge and trap technique (Berdagué, Montel, Montel, & Talon, 1993; Viallon et al., 1996; Stahnke, 1994, 1995; Bruna, Fernandez, Hierro, Ordoñez, & de la Hoz, 2000a, 2000b; Bruna, Hierro, de la Hoz, Mottram, Fernández, & Ordóñez, 2001; Edwards, Ordóñez, Dainty, Hierro, & de la Hoz, 1999). In these studies Tenax was used as adsorbent material for quantification of volatile compounds, although Stahnke (1994, 1995) also used charcoal tubes for their identification. Tenax TA is generally the porous polymer of choice for the analysis of volatile flavours in dynamic headspace analysis because of its high thermal stability, its relatively low water retention and its low bleed (Pillonel, Bosset, & Tabacchi, 2002). It is important to note that breakthrough volume of compounds in an adsorbent material is highly dependent on purging method and other experimental parameters. In this case, Tenax TA<sup>®</sup> has a low affinity for low-boiling compounds, meaning that compounds, such as ethanol, 2-propanol, 2-methyl-propanal, and other low-boiling types, break through the Tenax

\* Corresponding author. Tel.: +34-96-3636301; fax: +34-96-3636301.

E-mail address: mfloros@iata.csic.es (M. Flores).

TA without being retained. Thus, the quantitative profile, obtained by the dynamic headspace analysis method, cannot be compared to quantitative profiles obtained under different circumstances, as Stahnke (1994) also indicated.

In comparison with dynamic headspace analysis (purge and trap technique), SPME offers the advantages of not requiring extended sample preparation, resulting in time saving; it is less expensive and its superiority over dynamic headspace analysis, with respect to repeatability, background and carry-over peaks has been demonstrated (Marsili, 1999). However, in SPME analysis, an equilibrium is reached between the matrix and the stationary phase coating the fibre (Zhang & Pawliszyn, 1993). Therefore, the choice of the stationary phase and the extraction conditions can affect SPME fibre performance. On the other hand, Elmore, Erbahadir, and Mottram (1997) did not recommend the use of SPME for trace analysis because they compared single coatings (PDMS and polyacrylate) of SPME fibres with the dynamic headspace method. In recent years, the use of bipolar coatings, including selective phases such as carboxen and divinylbenzene with polydimethylsiloxane (PDMS), has been studied for the analysis of low-molecular weight volatile compounds, with higher recoveries (Dufour, Delbecq, & Perez Albela, 2001; Elmore et al., 2000; Roberts, Pollien, & Milo, 2000).

The flavour of dry-fermented sausages has been widely studied in recent years, due to the importance of this meat product (Ordóñez, Hierro, Bruna, & de la Hoz, 1999). The studies have been focused on the mechanism involved in flavour generation (Ordóñez et al., 1999) and on the analysis of volatile components using mainly headspace techniques (Berdagué et al., 1993; Bruna et al., 2000a, 2000b, 2001; Edwards et al., 1999; Meynier, Novelli, Chizzolini, Zanardi, & Gandermer, 1999; Stahnke, 1994, 1995, 1999). In dry-fermented sausages, there are several potential precursors of substances responsible for the flavour and odour. Lipid hydrolysis and autooxidation, proteolysis and transformation of amino acids to aromatic compounds, after spices and other condiments by directly affecting flavour and odour and by the modulation of autooxidative reactions (Ordóñez et al., 1999). Therefore, in this study spices were not added to the fermented sausages in order to avoid their volatile components interfering with those generated during chemical or enzymatic processing. However, spices have a high impact on the final flavour of the sausage by adding characteristic notes (Stahnke, 1995). In this manuscript we focus on the optimisation process to analyse the compounds generated in a dry-fermented sausage.

Our objective was to develop and optimise a solid-phase microextraction sampling procedure, for qualitative and quantitative determination of volatile compounds present in the headspace of dry fermented sausages, using different fibre coatings.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Samples

The dry-fermented sausage consisted of lean pork (80%) and pork back fat (20%) and the following additives added, in g/kg of meat mixture; sodium chloride (28), lactose (10), dextrin (15), sodium caseinate (20), glucose (7), sodium ascorbate (0.5), sodium nitrite (0.15) and potassium nitrate (0.20). The meat was ground through a plate of 6 mm hole diameter, vacuum-minced with the remaining ingredients and inoculated with a starter culture SP-318 (Rhodia Iberia, groupe Rhône-Poulenc) containing *Lactobacillus sakei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus xylosum* and *St. carnosus* and also inoculated with  $5 \times 10^6$  cfu/g of *Debaryomyces* spp. CECT 11815. The mixture was stuffed into collagen casings (75 80 mm diameter), the final mass of each sausage being 500 g. The sausages were kept at 3–5 °C during 24 h in a refrigeration chamber. The fermentation stage was done at 24 °C and 90–80% relative humidity (RH) for 12 h and then, the temperature was lowered to 20 °C and 90–80% RH for an additional 12 h. Finally, the sausages were dried at 10 °C and 90–75% RH until the end of the ripening process. The total time of the process was 35 days with weight losses of about 45%. Sausages were vacuum packaged and stored at –20 °C until the day of analysis.

### 2.2. SPME fibres

The extraction of headspace volatile compounds was done using a SPME device (Supelco, Bellefonte, PA), using fibres of 75 µm, carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) and 50/30 µm, divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS). Before the analysis, the fibres were preconditioned in the injection port of the GC as indicated by the manufacturer.

### 2.3. Procedure

For each experiment 3 g of dry-fermented sausage were minced and weighed into a 10 ml headspace vial and sealed with a PTFE-faced silicone septum (Supelco, Bellefonte, PA, USA). The vial was left at 30 °C in a thermo block (J.P. Selecta, Barcelona, Spain) during 1 h to equilibrate its headspace. Then, a SPME fibre was exposed to the headspace while maintaining the sample at 30 °C during different times (30 min, 90 min, 3 h, 5 h, 21 h). The compounds absorbed by the fibres were identified and quantified by gas chromatographic analysis using MS detectors.

### 2.4. Identification and quantification of volatile compounds

The compounds adsorbed by the fibre were desorbed from the injection port of the gas chromatograph (GC HP 5890 series II) for 6 min at 220 °C with the purge



valve off (splitless mode). The compounds were separated in a DB-624 capillary column (J&W Scientific, 30 m, 0.25 mm i.d., film thickness 1.4  $\mu\text{m}$ ). The GC was equipped with an HP 5972 mass selective detector (Hewlett Packard, Palo Alto, CA). Helium was used as carrier gas with a linear velocity of 27.3 cm/s. The GC oven temperature programme began when the fibre was inserted and held at 38 °C for 13 min, ramped to 110 °C at 3 °C per min, then to 150 at 4 °C per min and to 210 °C at 10 °C per min and finally, held at 210 °C for 5 min. The total run time was 58 min and the GC-mass spectrometer interface was maintained at 240 °C. Mass spectra were obtained by electron impact at 70 eV, and data were acquired across the range 29–400  $\text{u.m.a}$ .

The compounds were identified by comparison with mass spectra from a library database (Nist98), Kovats retention index (Kovats, 1965) and by comparison with authentic standards. Quantification was based on either a total or single ion chromatogram on an arbitrary scale (eV). The results are expressed as means of three replicates for each experimental point.

### 3. Results and discussion

The analysis of volatile compounds in fermented sausages through solid-phase micro-extraction has not been previously reported. However, the selection of an appropriate fibre depends on the compounds and the food to be analysed. In this case, many authors have characterised the volatile compounds present in the headspace of dry-fermented sausages (Berdagué, 1993;

Bruna, 2000a, 2000b; 2001; Stahnke, 1994, 1995; Sørensen, Dorigoni, Zanardi, & Stahnke, 2001; Viallon, 1997). Due to previous experience (Gianelli et al., 2002), we selected bipolar coatings for the extraction of the volatiles present in the headspace of dry fermented sausages because of the low extraction recoveries found with single polarity coatings for other meat products, such as dry-cured ham. In this study, spices were not added in order to avoid their volatile components interfering with those generated by chemical and enzymatic processing and also to avoid interference by the different affinities of the fibre coatings used.

The volatile compounds extracted by CAR/PDMS and DVB/CAR/PDMS fibres are shown in Figs. 1 and 2, respectively. Both fibres have been used for several foods (Marsili, 1999; Roberts et al., 2000; Wylie & Fellman, 2000); however, their application to meat and meat products has only been for the study of lipid oxidation in cooked turkey (Brunton et al., 2000) and volatile compounds present in the headspace of cooked pork (Elmore et al., 2000) and dry-cured ham (Gianelli et al., 2002; Ruiz et al., 1998). Both fibre coatings are useful in the study of volatile compounds present in the headspace of dry-fermented sausages, as seen by the high number of compounds detected. The identification and quantification of the volatile compounds extracted were done by GC-MS as shown in Table 1. Their Kovats indices and average quantities extracted by the two fibres, after 3 h of exposure, are presented.

The extraction of the volatile compounds from the headspace of dry-fermented sausages was followed at 30 °C during 21 h. During the first 5 h, the CAR/PDMS

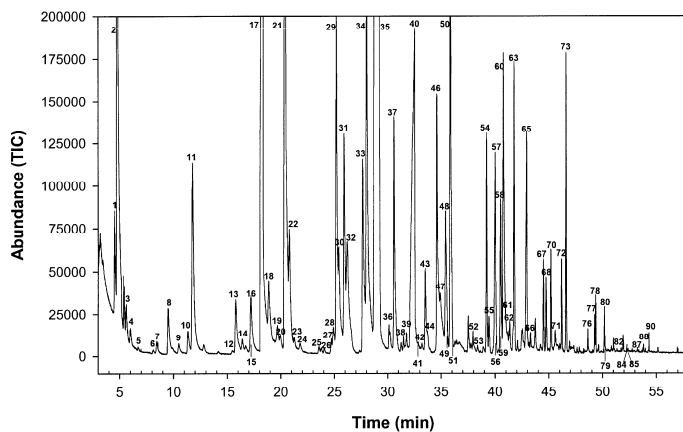


Fig. 1. Chromatograms obtained by SPME GC-MS after maintaining the SPME fibre (75  $\mu\text{m}$  Carboxen/PDMS) for 3 h at 30° in the headspace of dry-fermented sausage. The numbers represent compounds identified and listed in Table 1.

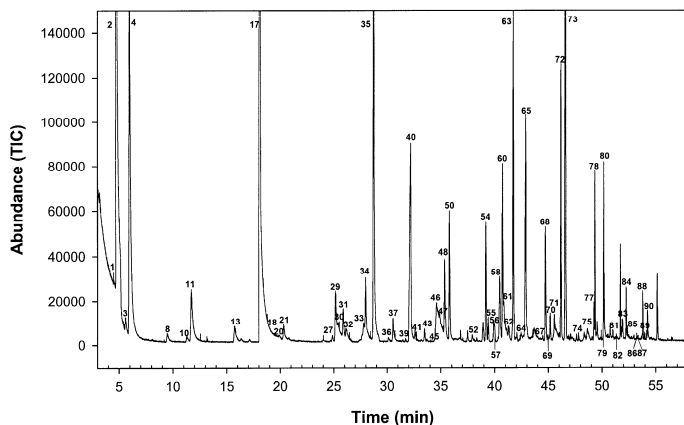


Fig. 2. Chromatograms obtained by SPME GC–MS after maintaining the SPME fibre (50/30  $\mu\text{m}$  DVB/Carboxen/PDMS) for 3 h at 30° in the headspace of dry-fermented sausage. The numbers represent compounds identified and listed in Table 1.

fibre showed increasing volatile extraction, while DVB/CAR/PDMS showed a slight increase, maintaining its total concentration throughout exposure (Fig. 3). The graph of total area counts suggests that absorption reached equilibrium after 5 h of exposure to CAR/PDMS, while the equilibrium was reached in only 90 min with the DVB/CAR/PDMS fibre. However, in the DVB/CAR/PDMS coating, specific compounds extracted may still be increasing, as happens in the case of 2-nonanone, nonanal, ethyl octanoate and hexanoic acid (Figs. 4E and C, 5A and C, respectively).

The selectivity varied with the type of the fibre coating used, as can be seen in Table 1. In the headspace of fermented sausages, the DVB/CAR/PDMS fibre extracted, after 3 h of exposure; 10 alcohols (22.3%), 17 aldehydes (21.1%), 7 ketones (4.2%), 11 esters (7.0%), 9 hydrocarbons (5.1%), 9 acids (30.3%) and 2 furans and 1 sulphur compound (10%). This fibre extracted seven compounds in high quantities, constituting more than 70% of the total area. These compounds were acetic acid (20.5%), ethanol (17.2%), carbon disulphide (9.9%), nonanal (9.6%), hexanal (5.7%), butanoic acid (5.5%) and octanal (4.1%). On the other hand, the selectivity of CAR/PDMS fibre was different as seen by the extraction of 11 alcohols (32.6%), 14 aldehydes (11.5%), 9 ketones (2%), 17 esters (17.0%), 15 hydrocarbons (5.1%), 11 acids (31.3%) and 2 sulphur compounds and 2 furans (0.6%). In this case, seven compounds were also extracted by the fibre representing more than 70% of the total area. The compounds were acetic acid (22.4%), ethanol (17.3%), hexanal (7.9%), ethyl acetate (7.8%), 3-methyl-1-butanol (6.6%), butanoic acid (5.3%) and ethyl butanoate (4.6%). Four of

the major compounds extracted by the two fibres (acetic acid, ethanol, hexanal and butanoic acid) were in similar percentages. However, the main differences were seen by a higher affinity of DVB/CAR/PDMS for aldehydes and a higher affinity of the CAR/PDMS coating for esters. The presence of ethyl esters in dry-fermented sausages is important due to their low sensory threshold values, imparting fruity notes to salami flavour (Stahnke, 1994).

In general, the compounds extracted by the two fibre coatings were basically the same as those extracted from dry-fermented sausages manufactured without the use of spices (Berdagué et al., 1993; Stahnke, 1994, 1995). The high recoveries of ethanol and acetic acid by CAR/PDMS and DVB/CAR/PDMS fibre coatings are characteristic of these coatings. Probably, they have not been recovered in high percentages by dynamic headspace analysis (Berdagué et al., 1993; Stahnke, 1994, 1995) due to the low affinity of Tenax for low-boiling compounds. On the other hand, hexanal has always been detected in the headspace of dry fermented sausages (Berdagué et al., 1993; Stahnke, 1994, 1995) because of its lipid oxidation origin. The volatile compounds extracted by the two fibre coatings appeared to be mainly formed by lipid oxidation, fermentation pathways, catabolism of branched amino acids and contamination. Lipid oxidation products are non-branched aliphatic compounds, such as alkanes, ketones, aldehydes, alcohols and furanic cycles (Frankel, 1984). Compounds of low molecular weight, released from fermentation pathways, are e.g. as 3-hydroxy-2-butanone, ethanol and acetic acid. Compounds from the catabolism of branched chain amino acids, such as

Table 1

Volatile compounds extracted from the headspace of fermented sausages by SPME after 3 h of extraction at 30 °C with different fibres (50/30µm DVB/CAR/PDMS and 75µm CAR/PDMS)

N <sup>a</sup>	Compound	IK <sup>b</sup>	R <sup>c</sup>	DVB/CAR/PDMS		CAR/PDMS	
				Area <sup>d</sup>	% <sup>e</sup>	Area	%
1	pentane	500	a	0.190	0.12	1.567	0.35
2	ethanol	506	a	26.489	17.17	76.920	17.30
3	acetone	527	a	0.359	0.23	1.145	0.26
4	carbon disulphide	536	a	15.400	9.98	2.069	0.47
5	methyl acetate	553	a	–	–	0.025	0.01
6	2-methyl-propanal	597	a	–	–	0.293	0.07
7	hexane	600	a	–	–	1.235	0.28
8	1-propanol	612	a	0.507	0.33	2.629	0.59
9	butanal	629	a	–	–	0.369	0.08
10	2-butanone	637	a	0.246	0.16	1.422	0.32
11	ethyl acetate	640	a	3.268	2.12	34.581	7.78
12	benzene	677	a	–	–	0.056	0.01
13	2-methyl-1-propanol	688	a	1.112	0.72	13.493	3.03
14	3-methyl-butanal	693	a	–	–	2.639	0.59
15	heptane (71)	700	a	–	–	0.099	0.02
16	2-methyl-butanal	702	a	–	–	3.538	0.80
17	acetic acid	720	a	31.618	20.49	99.569	22.39
18	2-ethyl furan (81)	719	a	tr <sup>f</sup>	–	–	–
19	1-butanol	726	a	–	–	2.034	0.46
20	2-pentanone	733	a	0.630	0.41	2.334	0.52
21	pentanal	737	a	0.737	0.48	6.235	1.40
22	ethyl propanoate	743	a	–	–	2.981	0.67
23	propyl acetate	748	a	–	–	1.503	0.34
24	2-pentanol	755	a	–	–	1.630	0.37
25	dimethyl-disulphide	774	a	–	–	0.408	0.09
26	3-hydroxy-2-butanone	781	a	–	–	0.667	0.15
27	ethyl 2-methyl-propanoate	786	a	0.330	0.21	0.976	0.22
28	toluene	790	a	–	–	1.173	0.26
29	3-methyl-1-butanol	793	a	2.086	1.35	29.540	6.64
30	2-methyl-1-butanol	795	a	1.781	1.15	16.673	3.75
31	octane	800	a	1.548	1.00	7.376	1.66
32	propanoic acid	806	a	0.977	0.63	10.688	2.40
33	1-pentanol	823	a	0.105	0.07	1.107	0.25
34	ethyl butanoate	829	a	2.285	1.48	20.439	4.60
35	hexanal	840	a	8.776	5.69	35.217	7.92
36	2-methyl-propanoic acid	860	a	0.252	0.16	1.679	0.38
37	ethyl 2-hydroxy-propanoate	865	a	1.098	0.71	10.091	2.27
38	ethyl 2-methyl-butanoate	876	a	–	–	0.902	0.20
39	ethyl 3-methyl-butanoate	880	a	0.099	0.06	1.150	0.26
40	butanoic acid	890	a	8.510	5.52	23.502	5.29
41	p-xylene (91)	891	a	0.634	0.41	0.762	0.17
42	Nonane	900	a	–	–	0.485	0.11
43	3-methyl-1-butanol acetate	905	a	0.398	0.26	1.010	0.23
44	2-methyl-1-butanol acetate	908	c	–	–	0.690	0.16
45	styrene	920	a	0.339	0.22	–	–
46	1-hexanol (69)	921	a	tr	–	0.178	0.04
47	ethyl pentanoate (85)	928	a	0.019	0.01	0.049	0.01
48	2-heptanone (58)	936	a	0.662	0.43	0.778	0.17
49	3-methyl-butanoic acid (60)	936	a	–	–	0.209	0.05
50	heptanal (70)	942	a	0.306	0.20	0.179	0.04
51	2-methyl-butanoic acid (74)	943	a	–	–	0.122	0.03
52	pentanoic acid	975	a	0.173	0.11	0.337	0.08
53	2-methyl-propyl 2-methyl-propanoate	983	c	–	–	0.160	0.04
54	BCH <sup>g</sup>	996	c	3.792	2.46	8.092	1.82
55	decane	999	a	0.925	0.60	0.480	0.11
56	2-pentyl-furan (81)	1009	c	0.110	0.07	0.064	0.01
57	2-heptenal (Z) (41)	1011	a	0.056	0.04	tr	–
58	benzaldehyde (77)	1020	a	0.167	0.11	0.084	0.02
59	butyrolactone (42)	1025	a	–	–	0.148	0.03

(continued on next page)

Table 1 (continued)

N <sup>a</sup>	Compound	IK <sup>b</sup>	R <sup>c</sup>	DVB/CAR/PDMS		CAR/PDMS	
				Area <sup>d</sup>	% <sup>e</sup>	Area	%
60	ethyl hexanoate (88)	1025	a	0.424	0.27	0.348	0.08
61	1-octen-3-ol (57)	1027	a	0.322	0.21	0.092	0.02
62	2-octanone	1037	a	0.544	0.35	0.697	0.16
63	octanal	1044	a	6.396	4.14	1.461	0.33
64	2,4-heptadienal (E,E)	1061	c	tr	–	–	–
65	hexanoic acid	1068	a	4.418	2.86	2.877	0.65
66	BCH	1074	c	–	–	0.164	0.04
67	undecane	1100	a	0.220	0.14	0.855	0.19
68	phenol	1104	a	1.559	1.01	0.856	0.19
69	benzene acetaldehyde	1110	c	0.094	0.06	–	–
70	2-octenal (E)	1116	c	0.297	0.19	0.120	0.03
71	ethyl heptanoate	1125	a	0.933	0.60	0.221	0.05
72	2-nonanone	1142	a	3.549	2.30	0.964	0.22
73	nonanal	1152	a	14.867	9.63	0.957	0.22
74	2,4-Octadienal	1180	c	0.114	0.07	–	–
75	phenylethyl alcohol	1200	c	0.396	0.26	–	–
76	dodecane	1200	a	–	–	0.218	0.05
77	2-nonenal	1215	c	tr	–	–	–
78	ethyl octanoate	1226	a	1.569	1.02	0.397	0.09
79	decanal (70)	1255	a	tr	–	–	–
80	octanoic acid (60)	1257	a	0.275	0.18	0.048	0.01
81	2,4-nonadienal	1287	c	0.221	0.14	–	–
82	tridecane	1300	a	0.194	0.13	tr	–
83	2-decenal (E)	1327	a	0.398	0.26	–	–
84	2-undecanone	1346	a	0.512	0.33	0.202	0.05
85	nonanoic acid	1351	a	0.120	0.08	tr	–
86	2,4-decadienal (E,E)	1392	c	0.079	0.05	–	–
87	tetradecane	1399	a	0.058	0.04	0.064	0.01
88	ethyl decanoate	1421	a	0.330	0.21	0.174	0.04
89	2-undecenal	1428	c	0.082	0.05	–	–
90	decanoic acid	1442	a	0.356	0.23	0.139	0.03

<sup>a</sup> Number of peaks as in Figs. 1 and 2.

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

<sup>c</sup> R: Reliability of identification: a, mass spectrum and retention time identical with an authentic sample; b, mass spectrum and Kovats index from literature in accordance; c, tentative identification by mass spectrum.

<sup>d</sup> Results expressed as means of three replicates of total ion current (TIC) area by GC/MS except those compounds where the ion utilised in the quantification is indicated in parentheses.

<sup>e</sup> Percentage of total area.

<sup>f</sup> tr: compound detected as traces.

<sup>g</sup> BCH: branched chain hydrocarbon.

branched chain aldehydes (2-methyl-propanal, 2- and 3-methyl-butanal) were found in low percentages, while the branched chain alcohols were present in higher quantities (Table 1). However, the nature of the starters employed in dry-fermented sausages has a great influence on the volatile composition and, finally, on the sensory characteristics (Berdagué et al., 1993); but also, very important are the effects of processing parameters (Stahnke, 1994, 1995).

The absorption-time profiles of different groups of volatile compounds (alcohols, aldehydes, ketones, esters and acids) obtained through the usage of both fibre coatings are shown in Figs. 4 and 5. Two main factors affecting the extraction process were: the fibre coating and the extraction time, although the effect of the time of exposure was more marked for the CAR/PDMS fibre

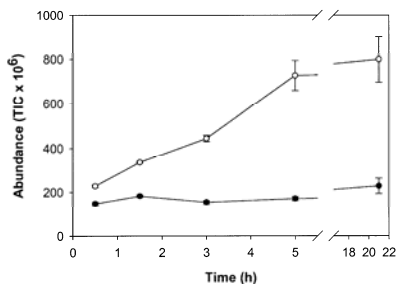


Fig. 3. Absorption-time profiles for total dry-fermented sausage volatiles using different fibre coatings. (●) DVB/Carboxen/PDMS and (○) Carboxen/PDMS coatings.

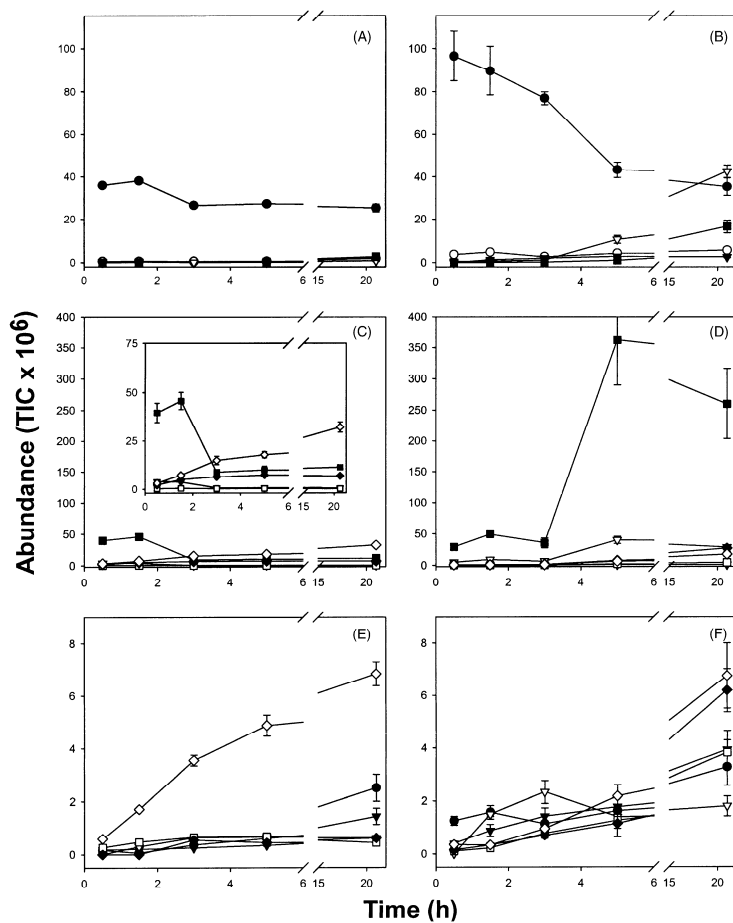


Fig. 4. Absorption-time profiles of volatile compounds using different fibres coatings of SPME: (A) alcohols by DVB/Carboxen/PDMS, (B) alcohols by Carboxen/PDMS, (C) aldehydes by DVB/Carboxen/PDMS, (D) aldehydes by Carboxen/PDMS, (E) ketones by DVB/Carboxen/PDMS and (F) ketones by Carboxen/PDMS. The symbols represent carbon number of compound C2 (●), C3 (○), C4 (▼), C5 (▽), C6 (■), C7 (□), C8 (◆), C9 (◇) and C10 (▲).

than for the DVB/CAR/PDMS fibre (Gianelli et al., 2002), because the peak areas of many compounds increased with increasing time of exposure. This is the case for the ketones, ethyl propanoate and ethyl butanoate, and butanoic acid (Figs. 4F, 5B, 5D) in CAR/PDMS fibre. However, the time of exposure only showed an important effect on the extraction of 2-non-

anone by DVB/CAR/PDMS fibre (Fig. 4E). On the other hand, four compounds (hexanal, ethanol, ethyl acetate and acetic acid) showed surprising behaviour during the time of exposure using the CAR/PDMS fibre. Ethanol showed a decrease in peak area while increasing the time of exposure (Fig. 4B). On the other hand, hexanal showed a slight increase until 3 h of

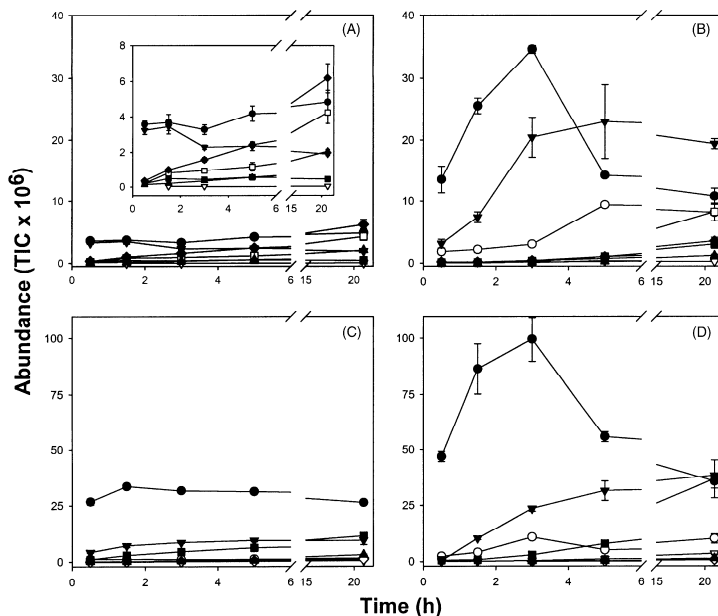


Fig. 5. Absorption-time profiles of volatile compounds using different fibres coatings of SPME: (A) ethyl esters by DVB/Carboxen/PDMS, (B) ethyl esters by Carboxen/PDMS, (C) acids by DVB/Carboxen/PDMS and (D) acids by Carboxen/PDMS. The symbols represent carbon number of compound C2 (●), C3 (○), C4 (▼), C5 (▽), C6 (■), C7 (□), C8 (◆), C9 (◇) and C10 (▲).

exposure and, after 5 h of exposure, its peak area increased seven times (Fig. 4D); at the same time, ethyl acetate (Fig. 5B) and acetic acid (Fig. 5D) showed decreases of one half of their peak areas. The reason for this behaviour could be the existence of competitive effects between hexanal and ethyl acetate and acetic acid (Roberts et al., 2000). The high generation of hexanal, due to the lipid oxidation phenomenon, could be due to the long exposure time (5 h). Therefore, a shorter time of sampling could help avoid this competition effect.

In conclusion, the optimal time of extraction should be the time to reach equilibrium, avoiding the presence of lipid oxidation processes favoured by a long time of exposure. In this case, all the compounds extracted by the DVB/CAR/PDMS fibre except for 2-nonanone reached equilibrium in 90 min, whilst the compounds extracted by the CAR/PDMS coating needed at least 3 h to reach equilibrium, longer times being inappropriate due to oxidation phenomena that can produce competitive effects between compounds. SPME is an appropriate tool for qualitative and quantitative analysis of volatile compounds in the headspace of dry-fermented sausage. However, the extraction yields of dry-fer-

mented sausages volatile compounds varied according to the fibre coating used. Therefore, it is necessary to carefully select the extraction conditions, depending on the objective of the study.

#### Acknowledgements

This work has been supported by an AGL2001-0500 grant from CICYT (SPAIN). The scholarship from Generalitat Valenciana (Spain) to A. Marco, scientific collaboration of Dr. J. Flores and technical assistance of Mr. P. Lorenzo are also fully acknowledged.

#### References

- Berdagué, J. L., Montel, P., Montel, M. C., & Talon, R. (1993). Effects of starter cultures on the formation of flavour compounds in dry sausages. *Meat Science*, *35*, 275–287.
- Bruna, J. M., Fernandez, M., Hierro, E. M., Ordóñez, J. A., & de la Hoz, L. (2000a). Combined use of pronase E and a fungal extract (*Penicillium aurantiogriseum*) to potentiate the sensory characteristics of dry fermented sausages. *Meat Science*, *54*, 135–145.

- Bruna, J. M., Fernandez, M., Hierro, E. M., Ordóñez, J. A., & de la Hoz, L. (2000b). Improvement of the sensory properties of dry fermented sausages by the superficial inoculation and/or the addition of intracellular extracts of *Mucor racemosus*. *Journal of Food Science*, *65*, 731–738.
- Bruna, J. M., Hierro, E. M., de la Hoz, L., Mottram, D. S., Fernández, M., & Ordóñez, J. A. (2001). The contribution of *Penicillium aurantiogriseum* to the volatile composition and sensory quality of dry fermented sausages. *Meat Science*, *59*, 97–107.
- Brunton, N. P., Cronin, D. A., Monahan, F. J., & Durcan, R. (2000). A comparison of solid-phase microextraction (SPME) fibres for measurement of hexanal and pentanal in cooked turkey. *Food Chemistry*, *68*, 339–345.
- Dufour, J. P., Delbecq, P., & Perez Albela, L. (2001). Solid-phase microextraction combined with gas chromatography–olfactometry for analysis of cheese aroma in gas chromatography–olfactometry. In J. V. Leland, P. Schieberle, A. Buettner, & T. E. Acree (Eds.), *The state of the art, ACS Symposium Series* (pp. 123–137). Washington, DC: ACS.
- Edwards, R. A., Ordóñez, J. A., Dainty, R. H., Hierro, E. M., & de la Hoz, L. (1999). Characterization of the headspace volatile compounds of selected Spanish dry fermented sausages. *Food Chemistry*, *64*, 461–465.
- Elmore, J. S., Erbahadir, M. A., & Mottram, D. S. (1997). Comparison of dynamic headspace concentration on tenax with solid phase microextraction for the analysis of aroma volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 2638–2641.
- Elmore, J. S., Mottram, D. S., & Hierro, E. (2000). Two-fibre solid-phase microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry for the analysis of volatile aroma compounds in cooked pork. *Journal of Chromatography*, *A905*, 233–240.
- Frankel, E. N. (1984). Recent advances in the chemistry of rancidity of fats. In A. J. Bailey (Ed.), *Recent advances in the chemistry of meat* (pp. 87–118). Burlington House, London: The Royal Society of Chemistry.
- Gianelli, M. P., Flores, M., & Toldrá, F. (2002). Optimisation of solid phase microextraction (SPME) for the analysis of volatile compounds in dry-cured ham. *Journal Science of Food and Agriculture*, *82*, 1703–1709.
- Kovats, E. Sz. (1965). Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. In J. C. Giddings, & R. A. Keller (Eds.), *Advances in chromatography*, vol. 1 (pp. 229–247). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Marsili, R. T. (1999). Comparison of solid-phase microextraction and dynamic headspace methods for the gas chromatography–mass spectrometric analysis of light-induced lipid oxidation products in milk. *Journal of Chromatographic Science*, *37*, 17–23.
- Meynier, A., Novelli, E., Chizzolini, R., Zanardi, E., & Gandemer, G. (1999). Volatile compounds of commercial Milano salami. *Meat Science*, *51*, 175–183.
- Nielsen, J. H., Sorensen, B., Skibsted, L. H., & Bertelsen, G. (1997). Oxidation of precooked minced pork as influenced by chill storage of raw muscle. *Meat Science*, *46*, 191–197.
- Ordóñez, J. A., Hierro, E. M., Bruna, J. M., & de la Hoz, L. (1999). Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *39*, 329–367.
- Pillonel, L., Bosset, J. O., & Tabacchi, R. (2002). Rapid pre-concentration and enrichment techniques for the analysis of food volatile. A review. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, *35*, 1–14.
- Roberts, D. D., Pollien, P., & Milo, C. (2000). Solid-phase microextraction method development for headspace analysis of volatile flavour compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*, 2430–2437.
- Ruiz, J., Cava, R., Ventanas, J., & Jensen, M. T. (1998). Headspace solid phase microextraction for the analysis of volatiles in a meat product: dry-cured iberian ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 4688–4694.
- Stahnke, L. H. (1994). Aroma components from dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosum*. *Meat Science*, *38*, 39–53.
- Stahnke, L. H. (1995). Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosum* at different temperatures and with different ingredient levels. Part II. Volatile components. *Meat Science*, *41*, 193–209.
- Stahnke, L. H. (1999). Volatiles produced by *Staphylococcus xylosum* and *Staphylococcus carnosus* during growth in sausage minces. Part I. Collection and identification. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, *32*, 357–364.
- Steffen, A., & Pawliszyn, J. (1996). Analysis of flavor volatiles using headspace solid-phase microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*, 2187–2193.
- Sunesen, L. O., Dorigoni, V., Zanardi, E., & Stahnke, L. (2001). Volatile compounds released during ripening in Italian dried sausage. *Meat Science*, *58*, 93–97.
- Vergais, L., Masson, F., Montel, M. C., Berdagué, J. L., & Talon, R. (1998). Evaluation of solid phase microextraction for analysis of volatile metabolites produced by staphylococci. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 228–234.
- Viallon, C., Berdagué, J. L., Montel, M. C., Talon, R., Martín, J. F., Kondjoyan, N., & Denoyer, C. (1996). The effect of stage of ripening and packaging on volatile content and flavour of dry sausage. *Food Research International*, *29*, 667–674.
- Wyllie, S. G., & Fellman, J. K. (2000). Formation of volatile branched chain esters in bananas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*, 3493–3496.
- Zhang, Z., & Pawliszyn, J. (1993). Headspace solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry*, *65*, 1843–1852.



## The influence of nitrite and nitrate on microbial, chemical and sensory parameters of slow dry fermented sausage

Aurora Marco, José Luis Navarro, Mónica Flores\*

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

Received 12 August 2005; received in revised form 8 March 2006; accepted 10 March 2006

### Abstract

Nitrate and/or nitrite are used in the manufacture of dry-fermented sausages. However, research has mainly been focusing on nitrite and its effect on flavour development whereas little attention has been paid to nitrate. The aim of the present work was to study the effect of nitrate and nitrite as curing salts on the quality of a slow fermentation process. Two different batches containing nitrate or nitrite were manufactured. Microbial and chemical parameters were monitored during ripening and after vacuum packed storage, as well as their fatty acid composition and their profile of volatile compounds. The oxidation, measured as TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances), was greater in the samples with added nitrite than in the samples with added nitrate. FFA (free fatty acids) release was higher in the samples containing nitrite throughout the process. Volatile compounds arising from amino acid degradation and carbohydrate fermentation were generated at higher levels in the samples with added nitrate, probably due to the higher population of microorganisms in these samples and the effect of nitrate on their metabolism.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Aroma; Curing; Dry-fermented sausage; Fatty acid composition; Nitrite; Nitrate

### 1. Introduction

Curing is a conservation technique widely used since antiquity to prolong the shelf-life of food products. Presently, rapid curing processes are being used in the manufacture of dry cured sausages allowing the meat industry to reduce the costs associated with a long curing process. However, rapid curing results in the loss of the typical organoleptic characteristics in the final product, especially with regard to the aroma and taste (Flores & Bermell, 1996).

Curing processes are different in the different European regions (Flores, 1997). In Northern Europe, the curing processes are short, using only nitrite as curing agent, coupled with smoking of the products. By contrast, in the Mediterranean area longer curing times are used, involving both nitrite and nitrate as curing agents and without smoking process.

A high intake of nitrite presents a risk to human health due to possible allergenic effects, vasodilator effects, met-myoglobin production in vivo and the production of carcinogenic nitrosamines (Cammack et al., 1999). Due to this biological hazard, some governments have asked the European Food Safety Authority (EFSA, 2003) to reduce the permitted amounts of nitrite and nitrate. No risk is associated with the ingestion of nitrate other than those arising from reduction to nitrite by intestinal bacteria. It should be pointed out that some vegetables have natural quantities of nitrate 10 times higher than the amounts allowed for meat products. Also, due to the low pH and small amounts of nitrite and nitrate added to cured meat products and the lack of heat treatment, the risk of nitrosamines production is minimal (Honikel, 2005).

The effects of nitrite in cured products have been studied for many years and can be summarised as: formation of the characteristic red colour; growth inhibition of spoilage and pathogenic bacteria such as *Clostridium botulinum*; contribution to the development of typical cured meat flavour;

\* Corresponding author. Tel.: +34 96 3900022; fax: +34 96 3636301.  
E-mail address: [mflores@iata.csic.es](mailto:mflores@iata.csic.es) (M. Flores).



and delaying oxidative rancidity (Flores & Toldrá, 1993). On the other hand, nitrate is necessary in a long curing process to act as a source of nitrite (Toldrá, 2005) by the action of the nitrate reductase enzymes present in the staphylococci. Besides, the use of nitrate is interesting because it improves flavour generation compared with nitrite (Wirth, 1991).

Many scientific papers have written about the effect of nitrite alone, however, few studies have focused on the effect of only nitrate. Regarding sausage manufacture, comparisons are usually made between samples manufactured with nitrite with those manufactured with both nitrite and nitrate (Noel, Briand, & Dumont, 1990; Skjelvåle & Tjaberg, 1974; Stahnke, 1995a, 1995b; Zanardi, Ghidini, Battaglia, & Chizzolini, 2004) or just samples manufactured with spices and without nitrogenous salts (Aguirrezábal, Mateo, Domínguez, & Zumalacárregui, 2000). Only a handful of workers (Navarro, Nadal, Nieto, & Flores, 1998; Navarro, Nadal, Nieto, & Flores, 2001; Olesen, Meyer, & Stahnke, 2004a) have produced sausages with only nitrite or nitrate in their formulation thus allowing differentiation between the effects of one or the other.

The aim of this study was to determine the individual effects of sodium nitrite and potassium nitrate and their contribution to flavour generation in dry fermented sausages produced by a long fermentation and ripening process.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Preparation of dry-fermented sausages and sampling

Two batches of fermented sausages were produced, one containing sodium nitrite (N<sub>2</sub>) and another containing potassium nitrate (N<sub>3</sub>). Dry fermented sausages were made with lean pork (80%) and pork back fat (20%). The following additives were added in g per kg quantities to the meat mixture: sodium chloride (27), lactose (20), dextrin (20) (food grade quality), sodium caseinate (20), glucose (7), sodium ascorbate (0.5) and sodium nitrite (0.15) (samples N<sub>2</sub>) or potassium nitrate (0.3) (samples N<sub>3</sub>). The meat was ground through a mincing plate with 6 mm diameter holes, vacuum mixed with the remaining ingredients and inoculated with a commercial starter culture SP-318 (Rhodia Iberia, group Rhône-Poulenc, Madrid, Spain) containing *Lactobacillus sakei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus xylophilus* and *S. carnosus*. The mixture was stuffed into collagen casings (Fibran, S.A., Girona, Spain, 75–80 mm diameter), the final weight for each sausage being 500 g. The sausages were kept in a chamber at 3–5 °C for 24 h, and then dried at 10 °C and 85–75% relative humidity. The total fermentation and drying time was 45 days with a corresponding weight loss of about 40%. The sausages were then vacuum packed and stored at 4 °C for 2 months. Therefore, the total processing time was 105 days.

From each batch, 200 g samples of the minced meat mixture were collected at days 0 and 4 sausages taken at days 14, 31, 45 and 105. From each sample, 20 g were taken

for immediate microbial analysis and 20 g were vacuum packed and frozen at –20 °C for subsequent volatile compound analysis. The remaining sausage was minced, 20 g of this was used for moisture determination and the rest vacuum packed and stored at –20 °C for chemical (TBARS, nitrite and nitrate) and lipid analyses. Sensory analysis was carried out after 60 days of vacuum packed storage (total time 105 days) on the remaining sausages. Results are expressed as the mean of the four replicates per kg of dry matter (DM) at each sampling time.

### 2.2. Microbial analysis

Twenty grams sausage sample was homogenized with 180 ml of peptone water for 1 min in a Stomacher Lab-Blender 400 (Seward Medical, London, UK) and decimal dilutions prepared. The population of lactic acid bacteria was determined by spread plating counting onto MRS agar anaerobically (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain) and the staphylococci population by using Mannitol Salt agar (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain) both agars were incubated at 30 °C for 3 days.

### 2.3. Chemical analyses (pH, moisture, TBARS, nitrate and nitrite)

Moisture content was determined according to the official method for analysis of meat products BOE (1979) by dehydration at 100 °C until constant weight.

The pH was measured by introducing a pH meter FC200B (Hanna Instruments Inc., Hoosonsocket, USA) into the centre of the sausage as described by ISO 2917:1999.

The nitrate and nitrite content was determined using an enzymatic kit (Cat. No. 09050658, Roche, Palo Alto, USA) according to the procedure described by Arneith and Herold (1988).

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were determined according to Bruna, Ordóñez, Fernández, Herranz, and de la Hoz (2001), using trichloroacetic acid instead of perchloric acid as solvent.

### 2.4. Lipid analysis

Total lipids were extracted from 5 g of minced sausage according to the method of Folch, Lees, and Sloane Stanley (1957), using dichloromethane:methanol (2:1) instead of chloroform:methanol (2:1) as solvent. The extracts were dried in a rotating vacuum evaporator and weighed to determine the total quantity of lipids. The phospholipid content was calculated multiplying the phosphorous content by 25, and phosphorous determination was carried out in total lipids following the method of Barlett (1959). Free fatty acids were determined in total lipids as described by Gandemer, Morvan-Mahi, Meynier, and Leperq (1991) using arachidic acid (C20:0) as the internal standard. Total lipids were fractionated into neutral and polar lipids as described by Juaneda and Roquelin (1985) and in each

fraction the fatty acids were methylated according to Berry, Cevallos, and Wade (1965) and Morrison and Smith (1964) for polar lipids and non-polar lipids, respectively. Triglyceride content was calculated as the difference between neutral lipids and free fatty acids.

Analysis of the fatty acid methyl esters (FAME) was carried out as described by Navarro et al. (2001) using a Fisons 816 gas chromatograph (GC) equipped with a flame ionisation detector. The split ratio used was 1:50. The capillary column was a DB-225 (J&W Scientific, Barcelona, Spain; 30 m long, 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu$ m film thickness). Detector and injector temperatures were both set to 240 °C. The individual fatty acids were identified by comparing their retention times with those of standard fatty acid methyl esters. For the quantification, the response factors of the standard FAME with respect to the internal standard were used.

### 2.5. Volatile compound analysis

Extraction of headspace volatile compounds was done using a solid phase microextraction (SPME) device (Supelco, Bellefonte, PA, USA) with a 85  $\mu$ m carboxen/polydimethylsiloxane StableFlex fibre (CAR/PDMS SF) using the extraction conditions previously optimised by Marco, Navarro, and Flores (2004) for its use in fermented sausages. For each experiment, 3 g of minced sausage was weighed into a 10 ml headspace vial, sealed with a PTFE faced silicone septum (Supelco, Bellefonte, PA, USA). The vial was left for 1 h in a thermo block (J.P. Selecta, Barcelona, Spain) at 30 °C for equilibration. The SPME fibre was then exposed to the headspace for 2 h while maintaining the sample at 30 °C. The compounds adsorbed by the fibre were identified and quantified by GC-MS as described by Flores, Durá, Marco, and Toldrá (2004).

The compounds adsorbed by the fibre were desorbed in the gas chromatograph (GC HP 5890 series II) injection port for 6 min at 240 °C in split-less mode. The compounds were separated using a DB-624 capillary column (J&W Scientific, 30 m, 0.25 mm i.d., film thickness 1.4  $\mu$ m). The GC was equipped with a HP 5972 mass selective detector (MS, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA). Compounds were identified by comparison with mass spectra from the library database (NIST'98), Kovats retention indices (Kovacs, Anderson, & Ackman, 1979) and by comparison with authentic standards. Quantification was based on the area of either total or extracted ion chromatogram (TIC or EIC) on an arbitrary scale.

### 2.6. Sensory analysis

After 2 months of storage under vacuum (time 105 days), samples from both batches ( $N_2$  and  $N_3$ ) were subjected to sensory analysis. The sausage casing was removed and the sausage cut in slices approximately 4 mm thick. The slices were equilibrated for 30 min at room temperature before serving. The samples were assessed by a non-trained panel

consisting of 50 members in two different sessions. A preference test (ISO-5495, 1983) was carried out to determine panellist's preference for a sample. Assessors were asked to indicate which sample was preferred with respect to colour, aroma, taste and overall quality. Sensory evaluations were recorded by computer software using Compusense<sup>®</sup> five release 4.6 (Compusense Inc., Guelph, ON, Canada).

### 2.7. Statistical analysis

The effects of nitrite and nitrate and ripening time were tested by two-factor analysis of variance (ANOVA) using the statistic software Statgraphics plus (v 2.0). Significant effects were compared using Fisher's least significant difference (LSD) test.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Microbiological analysis

Growth of lactic acid bacteria and staphylococci during the drying process is presented in Fig. 1. This growth was within the range expected during the fermentation of dry sausages (Sanz, Vila, Toldrá, Nieto, & Flores, 1997). The population of lactic acid bacteria grew more than 2.5 logarithmic cycles during the first 14 days and began to decrease at day 31 in sausages with added nitrite but did not decrease in the sausages with added nitrate until day 45. Significant differences were observed at 31 and 45 days when samples with added nitrate had a higher population than samples with added nitrite ( $p < 0.05$ ). Sanz, Vila, Toldrá, and Flores (1998) also found a higher population of lactic acid bacteria in samples with added nitrate in small diameter sausages produced without the addition of starter cultures and either nitrite or nitrate.

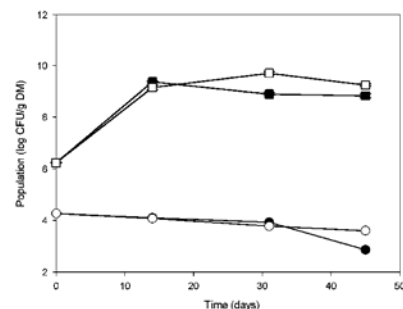


Fig. 1. Levels of staphylococci and lactic acid bacteria during the fermentation and drying process of dry fermented sausages. Staphylococci in sausages with added nitrite (●) and nitrate (□). Lactic acid bacteria in sausages with added nitrite (●) and nitrate (○). Symbols represent the mean and standard error of the mean.

In the case of staphylococci, both batches exhibited a reduction in the population during the drying process, but the decrease was higher in the samples with added nitrite after 45 days of drying. Neubauer and Gotz (1996) observed that the growth rate of staphylococci is improved by the presence of nitrate under anaerobic conditions as nitrate can act as final acceptor in the electronic transport chain.

### 3.2. pH, moisture and TBARS

Results of pH and moisture analyses in the two batches are shown in Fig. 2. pH decreased initially in both batches and then increased after 31 days. No significant differences were found except after 14 days of drying at which point the pH was lower in the samples with added nitrite ( $p < 0.05$ ). Moisture content decreased throughout the ripening process from initial values of 64% to 41%, no significant differences existed between batches.

The level of TBARS in the sausages during processing and storage is shown in Fig. 3. The level of TBARS increased during the fermentation and drying process but decreased significantly in both batches during storage ( $p < 0.05$ ). The concentrations of TBARS were significantly higher ( $p < 0.05$ ) in samples with added nitrite as compared to those with added nitrate during the entire ripening process from day 14, thus fatty acid oxidation was retarded by the presence of nitrite. In contrast, Navarro et al. (1998) and Navarro et al. (2001) reported that the peroxide index and TBARS levels were higher in samples with added nitrate than in samples with nitrite, in dry sausages produced using a rapid fermentation process with an incubation stage and in small diameter non-fermented sausages, respectively. This difference as compared to the current study could be due to the long fermentation process without an incubation stage. In comparison, Zanardi et al. (2004) found that a batch made just with nitrite had a

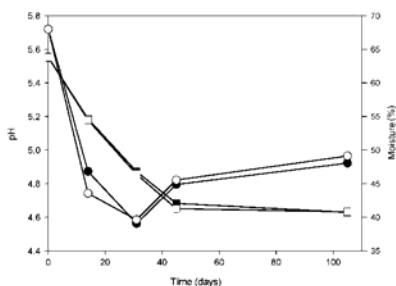


Fig. 2. pH of dry fermented sausages with added nitrite (●) and nitrate (○). Moisture content, in dry fermented sausages with added nitrite (■) and nitrate (□) as monitored during the ripening process of dry fermented sausages. Symbols represent the mean and standard error of the mean.

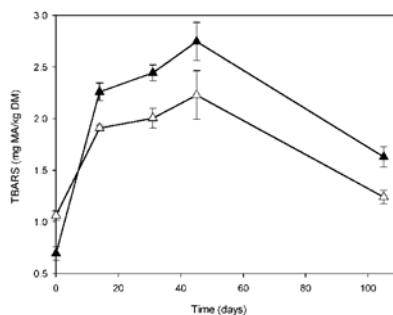


Fig. 3. Levels of TBARS as monitored during the ripening process in dry fermented sausages with added nitrite (▲) and nitrate (△), expressed as mg of malonaldehyde per kg of dry matter (DM). Symbols represent the mean and standard error of the mean.

slightly higher TBARS concentration than another made with both nitrite and nitrate. The antioxidant effect of nitrate has previously been shown by Talón, Walter, Charrier, Barriere, and Montel (1999) in vitro experiments. They found that nitrate in concentrations above 300 ppm activate the production and release of the enzyme catalase in *S. xylosum* and this activity is at its highest during the stationary growth phase.

### 3.3. Nitrite and nitrate

As shown in Fig. 4(a), nitrite content was higher ( $p < 0.05$ ) in the samples with added nitrite than in the samples with added nitrate at day 0. After this point no significant differences in nitrite content between the samples was noted and only residual contents were found in the sausages. The nitrite content decreased very quickly which is most likely due to the high reactivity of nitrite (Cassens, Greaser, Ito, & Lee, 1979). Nitrite formation in the samples with added nitrate was most likely caused by the nitrate reductase activity of the added staphylococci (Flores & Toldrá, 1993; Talón et al., 1999).

In Fig. 4(b) the nitrate content in both batches is shown. In the samples with added nitrate, the concentration decreased slowly from 225 to 140 ppm, while in the samples made with nitrite low concentration from 25 to 50 ppm of nitrate were present, due to the reaction of the added nitrite with various meat components and ingredients (Cassens et al., 1979).

### 3.4. Lipids

The lipid content of the minced mixture was 32.36 g per 100 g DM, with triglycerides making up the largest proportion (30.47 g per 100 g DM). This represents 94% of the total, with phospholipids (1.68 g per 100 g DM) and free

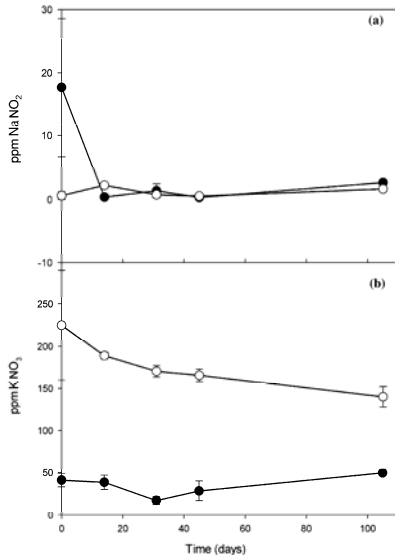


Fig. 4. Concentrations of nitrite (a) and nitrate (b) as measured during the ripening process of dry fermented sausages expressed as ppm of sodium nitrite and potassium nitrate in dry matter (DM), respectively; in sausages with added nitrite (●) and nitrate (○). Symbols represent the mean and standard error of the mean.

fatty acids (0.21 g per 100 g DM) representing 5.26% and 0.67% of the total lipid content, respectively. The results are in agreement with the characteristic composition of dry cured sausages (Navarro et al., 2001).

The total amount of lipids did not differ significantly during processing, however the different lipid fractions did. FFA was the fraction most affected (Table 1), the level of FFA increased significantly both during drying and storage from 0.67% to approximately 5% of total lipids in both batches. The addition of nitrite and nitrate also affected the lipid fractions. FFA were significantly higher ( $p < 0.01$ ) in the samples with added nitrite (Table 1) which was mostly due to a higher release of PUFA ( $p < 0.001$ ) and MUFA ( $p < 0.01$ ), in particular C18:2 ( $p < 0.001$ ) and C18:3 ( $p < 0.001$ ) followed by C18:1 ( $p < 0.05$ ).

PL content was also affected by the processing time (Table 2) but to lesser degree. The proportion of this fraction decreased from 5.26% of total lipids to less than 3%. With respect to the addition of nitrite or nitrate, total phospholipid lipolysis was significantly higher ( $p < 0.001$ ) in the samples with added nitrate during the drying process. However, this tendency was reversed during storage

(Table 2). During the drying process, the hydrolysis of PUFA was higher in the samples with added nitrate and significant differences ( $p < 0.05$ ) were found between samples for C18:2 and C18:3 at 14 days and for C20:2 at 14 and 31 days. For vacuum packed samples, the release of SFA and MUFA was higher in the samples with added nitrite. In particular significant differences ( $p < 0.05$ ) were found for C16:0, C18:0, C18:1 and C20:1 at 105 days.

In the TG fraction, significant differences ( $p < 0.05$ ) appeared in the total amount throughout the processing time (Table 3). The concentration decreased from 94% to 92% of total lipids. With respect to nitrite and nitrate, total release of fatty acids from TG was higher ( $p < 0.001$ ) in the samples with added nitrite (Table 3). Differences were significant ( $p < 0.001$ ) for SFA and MUFA throughout the process, in particular for C16:0, C18:0, C16:1 and C18:1.

The effect of the processing time on the various lipid fractions was mostly as expected. FFA showed an increase in the proportion of PUFA with respect to SFA as previously reported by Navarro, Nadal, Izquierdo, and Flores (1997) and Zanardi et al. (2004). PL decreased during the ripening process as Johansson, Berdagüé, Larsson, Tran, and Borch (1994) and Navarro et al. (1997) previously reported. With respect to TG, this fraction showed a high release of FA because it is the most abundant fraction in the sausage fat. In general, considering the amount of FA released from PL and TG at the end of the process, the majority of FFA were derived from the TG fraction, as previously reported by Molly, Demeyer, Civera, and Verplaetse (1996). Moreover, there is a very high specificity for FA release from the PL compared to TG, when the release is expressed as percentage of the initial amount of the FA present in each fraction, also in agreement with Molly et al. (1996).

The effect of the addition of nitrite and nitrate, without taking into account the storage under vacuum, agree with the results from Navarro et al. (2001). In contrast, our results differ from those reported by Navarro et al. (1998), for rapid fermented sausages where no significant differences were found in the lipolysis between batches with nitrite or nitrate. Also, Stahnke (1995a) and Zanardi et al. (2004) reported no significant differences in the degree of lipolysis of sausages made with different amounts of nitrite and nitrate.

### 3.5. Volatile compounds

The relative proportion of volatile compounds reported in this study is mainly a function of the stationary phase of the SPME fibre used for their extraction. The fibre used was a bipolar fibre, which can extract both polar and non-polar volatile substances and has a high affinity for low molecular weight compounds. The same fibre was also used by Flores et al. (2004) in a previous study.

A total of 102 compounds were identified, some of which were not totally resolved or were found in trace amounts. All of them are listed and quantified in Table 4. The volatile

Table 1

Free fatty acid (FFA) concentrations (in g per kg DM) generated during drying and storage of dry fermented sausages

Fatty acids <sup>A</sup>	0 days N <sub>2</sub> /N <sub>3</sub>	14 days		31 days		45 days		105 days		B <sup>B</sup>	S	B × S
		N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>			
C14:0	0.02d/e	0.04c	0.04d	0.06b	0.06c	0.07b	0.07b	0.1a	0.1a	ns	***	ns
C16:0	0.4d/e	0.9c	1.0d	1.4b	1.3c	1.4b	1.4b	2.3a	2.1a	ns	***	ns
C18:0	0.3e/e	0.7d	0.8d	0.9c	1.0c	1.0b	1.0b	1.3a	1.3a	*	***	ns
SFA	0.7d/e	1.6c	1.7d	2.3b	2.3c	2.4b	2.5b	3.8a	3.5a	ns	***	ns
C16:1	0.04e/e	0.1d	0.1d	0.2c	0.1c	0.2b	0.2d	0.3a	0.3e	ns	***	ns
C18:1	0.7e/e	2.2d	2.1b	3.2c <sup>1</sup>	2.9c <sup>2</sup>	3.7d <sup>1</sup>	3.3b <sup>2</sup>	5.7e	5.0a	**	***	ns
C20:1	0.01e/e	0.05d	0.04d	0.06c	0.06c	0.08b	0.08b	0.1a	0.1a	ns	***	ns
MUFA	0.8e/e	2.4d	2.3d	3.4c <sup>1</sup>	3.1c <sup>2</sup>	4.0b <sup>1</sup>	3.5b <sup>2</sup>	6.1a	5.4a	**	***	ns
C18:2	0.5e/e	1.8d	1.7d	2.6c	2.4c	3.0b <sup>1</sup>	2.6b <sup>2</sup>	4.5a <sup>1</sup>	3.8a <sup>2</sup>	***	***	**
C18:3	0.02e/e	0.08d	0.07d	0.1c <sup>1</sup>	0.1c <sup>2</sup>	0.1b <sup>1</sup>	0.1b <sup>2</sup>	0.3a <sup>1</sup>	0.2a <sup>2</sup>	***	***	*
C20:2	0.2e/e	0.05d	0.05d	0.08c	0.08c	0.1b	0.09b	0.2a	0.1a	ns	***	ns
C20:3	0.01e/e	0.04d	0.04d	0.06c	0.05c	0.06b	0.06b	0.08a	0.08a	ns	***	ns
C20:4	0.07e/e	0.2d	0.3d	0.4c <sup>2</sup>	0.4c <sup>1</sup>	0.4b	0.4b	0.6a	0.6a	*	***	ns
C22:4	0.01e/e	0.03d	0.03d	0.04c	0.05c	0.05b <sup>2</sup>	0.06b <sup>1</sup>	0.08a	0.08a	**	***	ns
PUFA	0.7e/e	2.2d	2.1d	3.3c	3.1c	3.7b <sup>1</sup>	3.4b <sup>2</sup>	5.6a <sup>1</sup>	4.9a <sup>2</sup>	***	***	**
P/S <sup>C</sup>	1.0c/c	1.4b <sup>1</sup>	1.2b <sup>2</sup>	1.4ab <sup>1</sup>	1.3a <sup>2</sup>	1.5a <sup>1</sup>	1.3a <sup>2</sup>	1.5a <sup>1</sup>	1.4a <sup>2</sup>	***	***	ns
Total	2.1e/e	6.2d	6.2d	9.0c	8.5c	10.2b <sup>1</sup>	9.4b <sup>2</sup>	15.5a	13.8a	**	***	ns

N<sub>2</sub>: Samples with added nitrite. N<sub>3</sub>: Samples with added nitrate.<sup>1,2</sup>: Means with different numbers in the same stage indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between treatments.a, e: Means with different letters in the same treatment indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between processing time.<sup>A</sup>: SFA: saturated fatty acids; MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids.<sup>B</sup>: B: batch, S: stage, B × S: interaction between batches and processing time. \* Significant  $p < 0.05$ ; \*\* significant  $p < 0.01$ ; \*\*\* significant  $p < 0.001$ ; ns: no significant.<sup>C</sup>: P/S: Ratio PUFA/SFA.

Table 2

Concentrations (in g per kg of DM) of fatty acids of phospholipid fraction (PL) as monitored during the drying process and storage of dry fermented sausages

Fatty acids <sup>A</sup>	0 days N <sub>2</sub> /N <sub>3</sub>	14 days		31 days		45 days		105 days		B <sup>B</sup>	S	B × S
		N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>			
C14:0	0.1a/a	0.1a	0.1a	0.1b	0.1b	0.1b	0.09b	0.08c	0.09b	ns	***	ns
C16:0	3.1a/a	2.9b	2.8b	2.5c	2.5c	2.3d	2.2d	1.6e <sup>2</sup>	1.8e <sup>1</sup>	ns	***	*
C18:0	2.4a/a	1.6b	1.5b	1.4c	1.6b	1.3d	1.2c	0.8e <sup>2</sup>	1.0d <sup>1</sup>	ns	***	**
SFA	5.6a/a	4.6b <sup>1</sup>	4.4b <sup>2</sup>	4.0c	4.2b	3.7d	3.6c	2.4e <sup>2</sup>	2.9d <sup>1</sup>	ns	***	**
C16:1	0.2b/c	0.3a	0.3a	0.2b	0.1c	0.2b	0.1c	0.1b	0.2b	ns	***	ns
C18:1	3.1b/bc	4.0a	3.7a	3.4b	3.3b	3.2bc	3.1bc	2.5d <sup>2</sup>	2.8d <sup>1</sup>	ns	***	ns
C20:1	0.06a/a	0.06ab	0.05ab	0.06ab	0.06ab	0.05b	0.05ab	0.04c <sup>2</sup>	0.05b <sup>1</sup>	ns	***	ns
MUFA	3.4c/bc	4.3a	4.1a	3.6b	3.5b	3.5bc	3.3bc	2.7d <sup>2</sup>	3.0c <sup>1</sup>	ns	***	ns
C18:2	4.5a/a	4.6a <sup>1</sup>	4.0b <sup>2</sup>	3.1b	3.0c	2.5c	2.5d	1.8d	1.8e	*	***	*
C18:3	0.1b/b	0.2a <sup>1</sup>	0.1a <sup>2</sup>	0.1b	0.09b	0.09c	0.09b	0.08c	0.07c	*	***	*
C20:2	0.1a/a	0.1a <sup>1</sup>	0.09a <sup>2</sup>	0.09b <sup>1</sup>	0.07b <sup>2</sup>	0.07c	0.07b	0.05d	0.05c	*	***	ns
C20:3	0.1a/a	0.1b	0.1b	0.09c	0.09b	0.06d	0.07c	0.04e	0.03d	ns	***	ns
C20:4	1.3a/a	1.1b	1.0b	0.8c	0.9b	0.5d	0.6c	0.3e <sup>1</sup>	0.2d <sup>2</sup>	ns	***	ns
C22:4	0.2a/a	0.1b	0.1bc	0.1b	0.1b	0.1c	0.1c	0.05d	0.04d	ns	***	ns
PUFA	6.2a/a	6.0a <sup>1</sup>	5.3b <sup>2</sup>	4.1b	4.2c	3.2c	3.4d	2.3d	2.2e	ns	***	*
P/S <sup>C</sup>	1.1b/ab	1.3a	1.2a	1.0bc	1.0b	0.9d	1.0b	1.0cd <sup>1</sup>	0.7c <sup>2</sup>	ns	***	*
Total	15.1a/a	14.9b <sup>1</sup>	13.8b <sup>2</sup>	11.8c <sup>1</sup>	11.6c <sup>2</sup>	10.4d <sup>1</sup>	10.3d <sup>2</sup>	7.4e <sup>2</sup>	8.2e <sup>1</sup>	***	***	***

N<sub>2</sub>: Samples with added nitrite. N<sub>3</sub>: Samples with added nitrate.<sup>1,2</sup>: Means with different numbers in the same stage indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between treatments.a, e: Means with different letters in the same treatment indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between processing time.<sup>A</sup>: SFA: saturated fatty acids; MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids.<sup>B</sup>: B: batch, S: stage, B × S: interaction between batches and processing time. \* Significant  $p < 0.05$ ; \*\* significant  $p < 0.01$ ; \*\*\* significant  $p < 0.001$ ; ns: no significant.<sup>C</sup>: P/S: Ratio PUFA/SFA.

Table 3  
Concentration (in g per kg of DM) of fatty acids of triglycerides (TG) as monitored during the drying process and storage of dry fermented sausages

Fatty acids <sup>A</sup>	0 days N <sub>2</sub> /N <sub>3</sub>		14 days		31 days		45 days		105 days		B <sup>B</sup>	S	B × S
	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>			
C14:0	3.8a/a	3.7a	4.2a	3.6a	3.9a	3.21b	3.4b	2.8b <sup>1</sup>	3.2b <sup>1</sup>	***	***	ns	
C16:0	67.0a/b	62.5b <sup>2</sup>	72.2a <sup>1</sup>	62.3b <sup>2</sup>	66.1b <sup>1</sup>	60.21b	65.0b	59.2b <sup>2</sup>	65.2b <sup>1</sup>	***	***	***	
C18:0	34.4a/ab	31.1b <sup>2</sup>	36.2a <sup>1</sup>	31.3b <sup>2</sup>	33.0b <sup>1</sup>	31.54b <sup>2</sup>	35.6ab <sup>1</sup>	31.8b <sup>2</sup>	34.8ab <sup>1</sup>	***	ns	*	
SFA	105.3a/b	97.3b	112.5b	97.2b <sup>2</sup>	103.0b <sup>1</sup>	94.9b <sup>2</sup>	104.1b <sup>1</sup>	93.8b <sup>2</sup>	103.2b <sup>1</sup>	***	***	***	
C16:1	7.2a/ab	6.6ab <sup>2</sup>	7.2a <sup>1</sup>	5.8bc	6.4ab	4.33d <sup>2</sup>	6.1b <sup>1</sup>	4.9cd	6.3ab	***	***	ns	
C18:1	126.3a/ab	115.9b <sup>2</sup>	125.1bc <sup>1</sup>	112.9d	114.1d	117.36b <sup>2</sup>	127.7a <sup>1</sup>	114.6bc <sup>2</sup>	124.1c <sup>1</sup>	***	***	***	
C20:1	2.4a/a	2.1ab	2.2ab	2.0b	2.0b	2.01b	2.2ab	2.0b	2.1b	*	***	ns	
MUFA	135.9a/a	124.6b <sup>2</sup>	134.6ab <sup>1</sup>	120.7c <sup>2</sup>	122.5c <sup>1</sup>	123.30bc <sup>2</sup>	137.0a <sup>1</sup>	121.5bc <sup>2</sup>	132.6b <sup>1</sup>	***	***	***	
C18:2	48.7a/a	45.8ab	44.6b	41.8c <sup>1</sup>	39.5c <sup>2</sup>	43.80bc	43.6b	43.8bc	42.8bc	ns	***	ns	
C18:3	3.2a/a	2.9ab	2.9b	2.6c	2.5c	2.68bc	2.7bc	2.6c	2.6bc	ns	***	ns	
C20:2	2.4a/a	2.1b	2.0b	2.0bc <sup>1</sup>	1.9bc <sup>2</sup>	1.82d	1.8bc	1.9cd	1.8c	ns	***	ns	
C20:3	0.8a/a	0.6b	0.6b	0.6c	0.6b	0.22d	0.2c	0.2d	0.2c	ns	***	ns	
C20:4	0.6a/a	0.1c	0.1c	0.4b	0.2bc	0.42b	0.5a	0.4b	0.3b	ns	***	ns	
C22:4	0.3a/a	0.2bc	0.2bc	0.2c	0.2c	0.24bc	0.3ab	0.3b	0.2bc	ns	***	ns	
PUFA	56.0a/a	51.9ab	50.3b	47.6c <sup>1</sup>	44.8c <sup>2</sup>	49.12bc	49.2b	49.2bc	47.9bc	ns	***	ns	
P/S <sup>C</sup>	0.5/a	0.5 <sup>1</sup>	0.4b <sup>2</sup>	0.5 <sup>1</sup>	0.4b <sup>2</sup>	0.52	0.5b	0.5 <sup>1</sup>	0.4b <sup>2</sup>	***	*	ns	
Total	297.1a/b	273.7b <sup>2</sup>	297.3a <sup>1</sup>	265.5d <sup>2</sup>	270.2e <sup>1</sup>	267.87c <sup>2</sup>	290.2c <sup>1</sup>	264.5e <sup>2</sup>	283.7d <sup>1</sup>	***	***	***	

N<sub>2</sub>: Samples with added nitrite. N<sub>3</sub>: Samples with added nitrate.

<sup>1,2</sup>: Means with different numbers in the same stage indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between treatments.

a, e: Means with different letters in the same treatment indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between processing time.

<sup>A</sup> SFA: saturated fatty acids; MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids.

<sup>B</sup> B: batch; S: stage; B × S: interaction between batches and processing time. \* Significant  $p < 0.05$ ; \*\* significant  $p < 0.01$ ; \*\*\* significant  $p < 0.001$ ; ns: no significant.

<sup>C</sup> P/S: Ratio PUFA/SFA.

compounds listed by their chemical classes were: 18 alcohols, 19 aldehydes, 12 ketones, 10 carboxylic acids, 12 esters, 4 sulphur compounds, 2 furans, 22 hydrocarbons and chloroform. Most of these compounds have previously been identified by Flores et al. (2004) using the same extraction conditions. The remaining compounds have previously been reported in fermented sausages using other techniques (Berdagué, Monteil, Montel, & Talon, 1993; Olesen et al., 2004a; Stahnke, 1999) except methanethiol, 2-methoxy-1-propanol, propyl-benzene and 2-ethyl-4-pentenal. However, those compound were identified by MS alone and not with authentic standards.

The volatile compounds were grouped according to their possible origin as: lipid autooxidation products and products of bacterial metabolism (Table 4). In the last group, 4 subgroups can be named: carbohydrate fermentation, amino acid catabolism, staphylococci esterase activity and lipid  $\beta$ -oxidation. Several of the compounds listed could have had more than one origin, however these compounds have been grouped with respect to the main origin as indicated by Ordóñez, Hierro, Bruna, and de la Hoz (1999). Berdagué et al. (1993) also defined a group originating from animal feedstuff and various contaminants such as chloroform, limonene, toluene and xylene isomers.

Volatile compounds originating from amino acid degradation have different structures depending on whether they come from branched chain, sulphur or aromatic amino acids. Branched chain amino acids (Val, Leu and Ile) generate branched aldehydes, alcohols and acids which are very important contributors to the aroma of dry fermented

sausages (Stahnke, 1994). Volatile compounds originating from amino acid degradation comprised 10% and 14% of the total extracted volatile compounds at 105 days of processing, in the samples with nitrite and nitrate, respectively. The change in the concentration of this group (Fig. 5(a)) was found to increase significantly in both samples throughout the drying process until day 31, and thereafter it increased at a slower rate until the end of the process, day 105. In addition, the level of volatile compounds derived from amino acid catabolism was significantly higher ( $p < 0.05$ ) in the samples with added nitrate. Of this group of compounds, 3-methyl-butanol, 3-methyl-butanal and 3-methyl-butanolic acid were the most abundant at 105 days of processing, they represented 43% and 44% of the total area of this group, in the samples with nitrite and nitrate, respectively. The 3-methyl-butanolic peak area was twice as large ( $p < 0.001$ ) in the samples with added nitrate, from day 14 of the process. This sharp increase in the level of 3-methyl-butanolic acid during the initial stages of processing can greatly affect the initial flavour of the sausages as this branched acid, together with 2-methyl-propanal, are the compounds with the lowest odour detection threshold in this group according to Burdock (2002) and van Gemert and Nettenbreijer (2004). Olesen et al. (2004a) reported, in sausages made with either nitrite or nitrate, that the proportion of branched chain acids and alcohols was higher in sausages with added nitrate than in those with added nitrite. In *in vitro* experiments Olesen, Stahnke, and Talon (2004b) showed that nitrite and nitrate, both, inhibited the generation by staphylococci of 3-methyl-butanolic acid,

Table 4

Volatile compounds quantified as AU  $\times 10^{-6}$  per g dry mater in the headspace of dry fermented sausages during the drying and storage

No. <sup>A</sup>	Compound/origin	K1 <sup>B</sup>	R <sup>C</sup>	0 days		14 days		31 days		45 days		105 days		B <sup>D</sup>	S	B $\times$ S
				N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>			
<i>Lipid autooxidation</i>																
2	Pentane	499	a	17.18b	41.86a	21.17b	23.90b	42.38ab <sup>1</sup>	17.85b <sup>2</sup>	22.84b	19.17b	31.85a <sup>1</sup>	20.53b <sup>2</sup>	ns	ns	**
4	Propanal	521	a	12.08		6.23	6.45	8.57	6.07	8.64	6.59	6.03	4.81	*	**	ns
8	Hexane	599	a	3.85abc	6.74a	2.12b <sup>2</sup>	3.65b <sup>1</sup>	3.24b	2.78b	3.15b	2.84b	5.11a	3.43b	ns	**	*
9	1-Propanol	611	a	2.30b	3.31a	2.68ab	2.22ab	2.97a <sup>1</sup>	1.74b <sup>2</sup>	2.33b <sup>1</sup>	1.41b <sup>2</sup>	2.18b	1.65b	*	ns	*
10	Butanal	621	c	0.86c	2.68	1.37bc	1.18	2.05ab	1.34	2.16a	1.76	1.70ab	1.30	ns	ns	*
19	1-Heptene	694	a			0.37b	0.53b	1.05a	0.89a	1.11a	1.08a			ns	***	ns
20	Heptane	701	a	1.15c <sup>2</sup>	3.18c <sup>1</sup>	5.55b <sup>2</sup>	11.79b <sup>1</sup>	15.93a	13.03ab	16.34a	17.34a	19.19a	14.63ab	ns	***	*
21	2-Ethyl furan (81) <sup>E</sup>	718	a			0.32b	0.37b	0.98ab	1.11a	0.91ab	0.73ab	1.01a	0.50b	ns	*	ns
24	1-Butanol (56)	726	a			0.39		0.41 <sup>1</sup>	0.26 <sup>2</sup>	0.38	0.29	0.35	0.32	*	ns	*
25	1-Penten-3-one (55)	728	a					0.58ab	0.40	0.69a <sup>1</sup>	0.40 <sup>2</sup>	0.32b	0.34	ns	ns	ns
27	Pentanal (44)	736	a	0.65c	2.13c	10.39b	10.69b	18.55a	13.48ab	18.08a	18.11a	13.34ab	11.32ab	ns	***	ns
39	Octane	801	a	2.21c <sup>2</sup>	5.93b <sup>1</sup>	5.87b <sup>2</sup>	14.48a <sup>1</sup>	12.82a	11.82a	11.64a	15.96a	13.14a	13.16a	**	***	*
40	2-Pentenal	805	a			2.80b <sup>2</sup>	5.23b <sup>1</sup>	6.24ab	5.34b	6.38ab	7.42a	9.07a	6.55ab	ns	***	ns
41 + 43	2-octene (Z)	811/821	a		2.41ab <sup>1</sup>	1.23b <sup>2</sup>	2.03b	2.44a	2.41ab	2.41a	3.20a	2.07ab	2.71ab	*	*	*
42	Propanoic acid	815	a	0.26c	0.50d	2.19b <sup>2</sup>	2.86c <sup>1</sup>	4.15a	4.06b	3.94a	4.41ab	4.71a	4.83a	ns	***	ns
44	1-Pentanol	828	a	1.90c	5.54ab	2.86bc	3.67b	8.62a	4.85ab	7.56a	7.43a	5.82ab	4.08b	ns	***	ns
46	Hexanal	842	a	26.95d <sup>2</sup>	52.80c <sup>1</sup>	202.73c	217.70b	360.82a	314.20a	320.20ab	291.51ab	238.03ab	222.29b	ns	***	ns
56	Nonane	901	a			0.39b <sup>2</sup>	0.66 <sup>1</sup>	0.68a <sup>2</sup>	0.88 <sup>1</sup>	0.42b <sup>2</sup>	0.71a <sup>1</sup>		0.67	***	*	*
57	2-Hexenal	904	a			0.63b	0.79b	1.77a	1.24ab	1.66a	1.84a	0.89b	1.12ab	ns	***	ns
61	1-Hexanol	925	a	2.18b <sup>2</sup>	3.92b <sup>1</sup>	5.38b	5.96ab	17.99a <sup>1</sup>	5.72ab <sup>2</sup>	14.54a	8.06a	17.01a <sup>1</sup>	6.24ab <sup>2</sup>	***	***	***
63	Heptanal	941	a	1.06c	3.36b	3.16bc	4.53b	8.05a	6.55ab	7.29a	9.22a	5.97ab	5.25ab	ns	***	ns
68	2,4-Hexadienal	970	a			0.19b	0.24b	0.39a	0.42a	0.21b	0.24b	0.35ab		ns	***	*
70	Pentanoic acid	983	a	0.24c	0.28c	0.78b <sup>2</sup>	0.96b <sup>1</sup>	1.41a <sup>1</sup>	1.15ab <sup>2</sup>	1.03b	1.23a	1.00b	1.08ab	ns	***	*
72	Decane	1000	a	0.49ab	0.54ab	0.41b	0.50b	0.43b	0.43b	0.44ab	0.70a	0.84a	0.55ab	ns	ns	ns
74	2-Ethyl-4-pentenal	1006	c			0.16 <sup>2</sup>	0.50b <sup>1</sup>	0.26 <sup>2</sup>	0.75a <sup>1</sup>	0.25 <sup>2</sup>	0.55b <sup>1</sup>	0.18 <sup>2</sup>	0.55b <sup>1</sup>	***	**	ns
75	2-Pentyl furan (81)	1008	a			0.17b	0.21b	0.44a	0.41ab	0.39a	0.52a	0.29ab	0.27ab	ns	**	ns
76	2-Heptenal (41)	1008	a			0.17ab	0.29ab	0.28a	0.32a	0.26ab	0.15b	0.14b	ns	**	ns	*
78	Butyrolactone	1016	a	0.32d	0.55bc	0.43cd	0.44c	0.64b	0.65bc	0.58bc <sup>2</sup>	0.75b <sup>1</sup>	2.22a	2.32a	ns	***	ns
79	1-Octen-3-one	1018	c	0.23b	0.31b	0.30b	0.40b	1.22a	0.88a	1.26a	0.99a	0.49b	0.73ab	ns	***	ns
80	1-Heptanol	1020	a					0.73		0.58	0.72a	0.57	0.40b	ns	ns	ns
85	Octanal	1042	a	1.67c	2.36b	3.68ab	3.49ab	4.40a	4.76a	2.93bc	3.68ab	2.71bc	2.10b	ns	***	ns
88 + 89 + 90	2,4-Heptadienal (E,E)	158/163/173	a			0.13b	0.17b	0.64a	0.76a	0.62a	0.63a	0.76a	0.78a	ns	***	ns
91	Hexanoic acid	1077	a	1.28c	1.37c	5.60b	5.97b	7.92a	6.72b	6.53ab	8.56a	6.51ab	7.07b	ns	***	ns
92	Undecane	1100	a	0.39a				0.30a	0.13b	0.17	0.19b	0.11	ns	**	ns	*
96	2-Octenal	1114	a	0.48	0.44b	0.59	1.27a	0.90	0.90ab	0.81	0.30b	0.50	ns	**	ns	*
97	1-Octanol	1125	a	0.46b	0.53b	0.56b	0.79a	0.90a	0.38b	0.64ab	0.47b	0.37b	ns	***	ns	*
99	Nonanal	1149	a	1.38	2.14	1.81	1.74	1.96	1.69	1.86	2.35	2.16	1.50	ns	ns	ns
100	Heptanoic acid	1177	a	0.36a						0.065b		0.19a <sup>1</sup>	0.11b <sup>2</sup>	ns	**	ns
102	Dodecane	1200	a					0.062	0.23	0.044	0.077	0.070	ns	**	ns	*
103	2-Nonenal	1225	c	1.17ab		0.14b	0.13b	0.16b	0.27b	0.16b	0.16b	0.35a	0.30a	ns	**	*
105	Octanoic acid	1264	a	0.18c	0.18b	0.42b <sup>2</sup>	0.58a <sup>1</sup>	0.69a	0.65a	0.45b <sup>2</sup>	0.66a <sup>1</sup>	0.41b	0.64a	**	***	ns
<i>Bacterial metabolism</i>																
<i>Lipid <math>\beta</math>-oxidation</i>																
26	2-Pentanone (43)	731	a	1.16bc <sup>1</sup>	0.63a <sup>2</sup>	1.91a <sup>1</sup>	0.71a <sup>2</sup>	0.72cd <sup>1</sup>	0.31b <sup>2</sup>	0.56d	0.46b	1.56ab <sup>1</sup>	0.63a <sup>2</sup>	***	***	**
28	3-Pentanone/1-penten-3-ol	740	c	3.67b	5.14b		5.60b	9.67a <sup>1</sup>	6.66ab <sup>2</sup>	9.56a	7.76a	7.07a	6.17ab	ns	***	*

(continued on next page)

Table 4 (continued)

No. <sup>A</sup>	Compound/origin	KI <sup>B</sup>	R <sup>C</sup>	0 days		14 days		31 days		45 days		105 days		B <sup>D</sup>	S	B × S
				N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>			
31	2-Pentanol	755	a	0.25c		1.07b	0.71b	2.13a <sup>1</sup>	1.36a <sup>2</sup>	2.27a <sup>1</sup>	1.29ab <sup>3</sup>	2.13a	1.64a	***	***	
62	2-Heptanone	935	a	1.03b	1.44b	4.58a <sup>1</sup>	3.02a <sup>2</sup>	4.72a <sup>1</sup>	2.89a <sup>2</sup>	4.06a	3.13a	3.56a	2.97a	***	***	*
65	2-Heptanol	950	a	0.58		0.33	0.43b	0.46 <sup>2</sup>	0.94a <sup>1</sup>	0.48	0.58b		0.54b	**	*	
82	1-Octen-3-ol	1026	a	1.40c	3.02b	2.88bc	3.44b	6.64a	5.40a	4.43b	4.67ab	3.93b	3.76ab	ns	***	ns
83	2-Octanone	1034	a	0.091		0.13	0.15	0.26	0.17	0.25	0.14	0.25 <sup>1</sup>	0.13 <sup>2</sup>	*	ns	
98	2-Nonanone	1140	a			0.81a <sup>1</sup>	0.48 <sup>2</sup>	0.69a <sup>1</sup>	0.48 <sup>2</sup>	0.38b	0.36	0.43b	0.36	***	***	*
<i>Carbohydrate fermentation</i>																
3	Ethanol	506	a	20.90c	21.87c	66.26a	56.56a	54.84ab	55.59a	43.92b	41.98b	61.04ab <sup>1</sup>	31.25c <sup>2</sup>	*	***	*
5	Acetone	526	a	22.67a <sup>1</sup>	14.17a <sup>2</sup>	10.06b <sup>1</sup>	7.52b <sup>2</sup>	7.93b <sup>1</sup>	6.31b <sup>2</sup>	8.13b	6.48b	7.12b	6.33b	***	**	ns
11	2-Butanone	630	a	7.26ab	7.86b	8.72a <sup>2</sup>	22.82a <sup>1</sup>	7.44ab	7.62b	5.37bc	5.61b	4.91c	6.90b	***	***	***
13	2-Butanol	642	c	0.40b	0.39c	1.56b <sup>2</sup>	5.79b <sup>1</sup>	4.14a <sup>2</sup>	10.09a <sup>1</sup>	4.13a <sup>2</sup>	7.80ab <sup>1</sup>	3.04a <sup>2</sup>	9.91ab <sup>1</sup>	***	***	*
22	Acetic acid	720	a	4.44d	6.30c	127.65c <sup>2</sup>	209.54b <sup>1</sup>	166.27b <sup>2</sup>	227.00b <sup>1</sup>	164.39b <sup>2</sup>	212.18b <sup>1</sup>	203.98a <sup>2</sup>	277.31a <sup>1</sup>	***	***	**
33	3-Hydroxy-2-butanone (acetoin)	780	a	15.71a	15.92a	6.40b <sup>2</sup>	18.26a <sup>1</sup>	2.21c <sup>2</sup>	7.73b <sup>1</sup>	2.54c <sup>2</sup>	7.69b <sup>1</sup>	3.19c <sup>2</sup>	18.98a <sup>1</sup>	***	***	***
52 + 54	2,3-Butanediol	885/892	a			1.19c <sup>2</sup>	34.15b <sup>1</sup>	5.22ab <sup>2</sup>	44.77b <sup>1</sup>	4.21b <sup>2</sup>	48.32ab <sup>1</sup>	6.27a <sup>2</sup>	62.98a <sup>1</sup>	***	**	*
55	Butanoic acid	898	a	4.17b	2.78c	21.92a	21.52b	24.15a	23.33ab	23.15a	22.67ab	22.09a	24.88a	ns	***	ns
<i>Amino acid catabolism</i>																
7	2-Methyl-propanal	590	a	2.04	2.3a	1.16	0.93b	1.40	2.17a	1.62	2.04a	1.32	1.84a	ns	ns	ns
16	Benzene	676	a	0.18c	0.22ab	0.21bc	0.18b	0.37a <sup>1</sup>	0.26ab <sup>2</sup>	0.29abc	0.33a	0.30ab	0.29a	ns	**	ns
17	2-Methyl-1-propanol	681	c	0.61c	0.60b	1.97b <sup>1</sup>	0.53b <sup>2</sup>	2.51ab	1.26b	2.98ab <sup>1</sup>	1.17b <sup>2</sup>	3.41a	2.99a	***	***	ns
18	3-Methyl butanol	690	a	1.35c	0.78b	3.65c <sup>2</sup>	5.76b <sup>1</sup>	9.25b	10.46b	8.27b	8.20b	15.20a	21.91a	ns	***	ns
23	1-Methoxy-2-propanol (45)	723	a									2.74 <sup>2</sup>	21.39 <sup>1</sup>	***		
32	Dimethyl disulfide	771	a	0.20b	0.20c <sup>1</sup>	0.06b <sup>2</sup>	0.42bc	0.24b	0.75b <sup>1</sup>	0.38b <sup>2</sup>	1.36a	0.77a	**	***		
34	Toluene (91) <sup>e</sup>	788	a	0.66	1.23a	0.43	0.36b	0.70 <sup>1</sup>	0.49b <sup>2</sup>	0.52	0.63ab	0.44	0.55ab	ns	*	ns
36	3-Methyl-3-buten-1-ol	790	a	2.21ab	1.86	2.03ab	1.65	2.54a <sup>1</sup>	1.72 <sup>2</sup>	2.00ab	1.74	1.74b	1.88	*	ns	ns
37	3-Methyl-1-butanol	795	a	1.86b	2.05c	8.77b <sup>2</sup>	20.16ab <sup>1</sup>	20.17a	24.84ab	20.94a	19.10b	22.01a	26.49a	*	***	ns
38	2-Methyl-1-butanol	797	a	1.23b	0.98d	2.81b <sup>2</sup>	4.62c <sup>1</sup>	6.35a	7.12ab	6.97a	5.59bc	7.53a	9.30a	ns	***	ns
48	2-Methyl-propanoic acid	868	a			1.65c <sup>2</sup>	2.79b <sup>1</sup>	3.37b <sup>2</sup>	5.69a <sup>1</sup>	4.05ab	4.89a	4.60a	4.49a	***	*	
64	3-Methyl-butanoic acid	946	a	0.37c		2.46b <sup>2</sup>	13.06b <sup>1</sup>	4.95a <sup>2</sup>	16.93ab <sup>1</sup>	5.21a <sup>2</sup>	14.24ab <sup>1</sup>	4.31a <sup>2</sup>	17.39a <sup>1</sup>	***	***	
66	2-Methyl-butanoic acid	952	a	0.060d		1.48c <sup>2</sup>	3.07c <sup>1</sup>	3.14a <sup>2</sup>	4.89a <sup>1</sup>	2.02b <sup>2</sup>	3.48bc <sup>1</sup>	2.30b <sup>2</sup>	4.03ab <sup>1</sup>	***	***	
67	3-Methylthio-propanal	968	a	0.18c		0.32bc	0.34b	0.62a	0.59a	0.55a	0.66a	0.43ab	0.57ab	ns	***	ns
77	Benzaldehyde	1013	a	0.33b	0.36b	0.95a	1.15a	1.32a	1.31a	1.05a	1.44a	1.04a	1.57a	*	***	ns
94	Benzemacetaldehyde	1105	a	0.23a	0.16b	0.13bc <sup>2</sup>	0.46a <sup>1</sup>	0.17ab <sup>2</sup>	0.45a <sup>1</sup>	0.09c <sup>2</sup>	0.38ab <sup>1</sup>	0.19ab <sup>2</sup>	0.40a <sup>1</sup>	ns	***	ns
95	Phenol	1112	a	0.22c		1.39a	1.38	1.33ab	1.25	0.97b	1.20	0.86b <sup>2</sup>	1.31 <sup>1</sup>	ns	***	
101	Phenyl ethyl alcohol	1192	a				0.41b	0.23 <sup>c</sup>	0.84a <sup>1</sup>	0.16 <sup>c</sup>	0.67ab <sup>1</sup>	0.16 <sup>c</sup>	0.59ab <sup>1</sup>	***	**	



<i>Staphylococci</i> esterase activity																	
12	Ethyl acetate	634	c			29.68a	37.80a	19.86bc	23.82b	15.57c	14.58c	25.81ab <sup>1</sup>	14.07c <sup>2</sup>	ns	***	*	
29	Ethyl propanoate	742	a			4.48b	4.19	7.64a	6.11	7.05a	6.88	7.15a	6.65	ns	*	ns	
30	Propyl acetate	747	a			1.26	1.21b	1.61	1.37ab	1.74	1.59ab	1.72a	1.72a	ns	*	ns	
35	Ethyl 2-methyl-propanoate (43)	788	a					0.11	0.17a	0.13 <sup>1</sup>	0.075b <sup>2</sup>	0.16 <sup>1</sup>	0.042b <sup>2</sup>	*	ns	**	
45	Ethyl butanoate	832	a	2.52c	3.02b	5.32b	4.81b	9.39a	8.23a	7.27ab	8.21a	7.94ab <sup>1</sup>	4.77b <sup>2</sup>	ns	***	ns	
47	Ethyl 2-hydroxy-propanoate	866	a			1.90b	2.44c	4.71a	6.06a	4.19a	4.49b	6.10a <sup>1</sup>	2.06c <sup>2</sup>	ns	***	***	
49	Ethyl 2-methyl-butanoate	878	a			0.29b <sup>2</sup>	0.65b <sup>1</sup>	0.55a <sup>2</sup>	1.19a <sup>1</sup>	0.44ab <sup>2</sup>	0.68b <sup>1</sup>	0.54a	0.55b	***	***	**	
50	Ethyl 3-methyl-butanoate	882	a			0.47b <sup>2</sup>	1.81b <sup>1</sup>	0.95a <sup>2</sup>	3.46a <sup>1</sup>	0.75ab <sup>2</sup>	2.02b <sup>1</sup>	0.80a <sup>2</sup>	1.18a <sup>1</sup>	***	***	***	
58	3-Methyl-1-butyl acetate	907	a			0.67b <sup>2</sup>	1.27c <sup>1</sup>	1.39a <sup>2</sup>	1.96b <sup>1</sup>	1.44a	1.97b	1.67a <sup>2</sup>	2.52a <sup>1</sup>	***	***	ns	
59	2-Methyl-1-butyl acetate	909	a			0.58b <sup>2</sup>	0.99c <sup>1</sup>	1.25a	1.48b	1.18a <sup>2</sup>	1.64ab <sup>1</sup>	1.42a <sup>2</sup>	1.84a <sup>1</sup>	***	***	ns	
81	Ethyl hexanoate	1024	a			1.00b	0.85b	2.23a	1.85a	1.64ab	1.49ab	2.02ab	1.25ab	ns	*	ns	
104	Ethyl octanoate	1225	a	0.18ab	0.14c	0.26a	0.26ab	0.26a <sup>2</sup>	0.32a <sup>1</sup>	0.14b <sup>2</sup>	0.23b <sup>1</sup>	0.24ab	0.23a	ns	***	ns	
<i>Unknown origin, meat or food contaminants</i>																	
1	Methanethiol	472	c			33.70a	28.62	27.36b	27.47	27.46b	26.29	27.31b	30.56	ns	ns	ns	
6	Carbon disulfide	535	a	440.52a	524.39a	56.80b	93.04b	71.44b	69.05b	67.05b	80.82b	74.09	107.91b	ns	***	ns	
14	Chloroform	646	c	2.39	0.89	1.18						1.57		ns	ns		
15	BCH1	668	c			0.21b		0.14b		0.43a	0.28		0.34	ns	*		
51	<i>m,p</i> -xylene	882	a	0.37	0.48				1.35					ns	ns		
53	<i>o</i> -xylene	890	a	0.58	0.77									ns	ns		
60	Styrene	918	a	0.34				0.42	0.59b	0.34	0.55b	0.422	0.81a1	***	ns		
69	Propyl-benzene	973	a			0.18	0.22b	0.38	0.33ab	0.45	0.40a	0.30	0.35ab	ns	ns	ns	
71	BCH2	994		0.81b	0.28b	2.23a	2.14a	1.81ab	3.36a					ns	**	ns	
73	AH1	1002						0.20a	0.20	013b2	0.221			ns	ns		
84	Limonene	1041	a	0.39a	0.61	0.17b	0.29	0.44a	0.53	0.16b	0.28	0.30ab	0.25	ns	**	ns	
86	BCH3	1051		0.31		0.45	0.45b	0.34 <sup>2</sup>	0.87a <sup>1</sup>			0.29 <sup>1</sup>	0.082b <sup>2</sup>	ns	ns		
87	BCH4	1055				0.48a	0.52b	0.56a <sup>2</sup>	0.97a <sup>1</sup>	0.17b	0.19c	0.089b <sup>2</sup>	0.16c <sup>1</sup>	*	***	ns	
93	Dimethoxybenzene	1102	c			0.23	0.18b		0.38a			0.19		ns	*		
	Total			604b	734b	660b	896ab	1035a	967ab	944a	906ab	935a <sup>2</sup>	1080a <sup>1</sup>		*	***	ns

N<sub>2</sub>: Samples with added nitrite. N<sub>3</sub>: Samples with added nitrate. AU: Area units resulting of counting the total ion chromatogram (TIC) for each compound.

<sup>1,2</sup>: Means with different numbers in the same stage indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between treatments.

a-e: Means with different letters in the same treatment indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between processing time.

<sup>A</sup>: Number of the peak in the chromatogram.

<sup>B</sup>: Kovacs index calculated for DB-624 capillary column (J&W Scientific: 30 m, 0.25 mm i.d., 1.4 µm film thickness) installed on a gas chromatograph equipped with a mass-selective detector.

<sup>C</sup>: Reliability of identification: a, mass spectrum and retention time identical with an authentic standard; b, mass spectrum and KI from the literature in concordance; c, tentative identification by mass spectrum.

<sup>D</sup>: B: batches, S: stage, B×S: interaction between batches and stage. \*Significant  $p < 0.05$ ; \*\*Significant  $p < 0.01$ ; \*\*\*Significant  $p < 0.001$ ; ns, no significance.

<sup>E</sup>: Ratio weight/charge of the characteristic ion used to quantify the compound when the peak have not been completely resolved, resulting of the count of a single extracted ion from the chromatogram (EIC). BCH: Branched chain hydrocarbon. AH: Aromatic hydrocarbon.

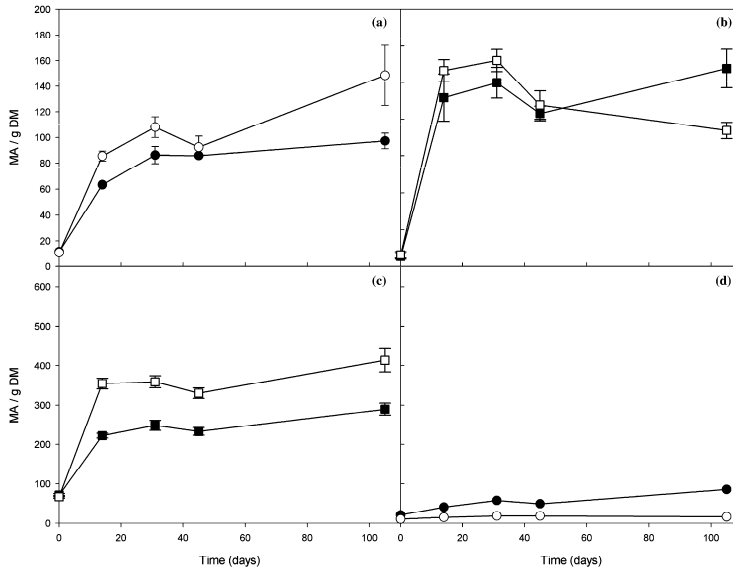


Fig. 5. Levels of total volatile compounds extracted from the headspace of dry fermented sausages coming from bacterial metabolism, grouped according to their origin and quantified as  $AU \times 10^{-6}$  per g of dry mater (DM). Volatile compounds coming from: (a) amino acid catabolism; (b) staphylococci esterase activity; (c) carbohydrate fermentation; (d) lipid  $\beta$ -oxidation. Sausages with added nitrite (●) and nitrate (○). Symbols represent the mean and standard error of the mean.

however, nitrite did it more strongly. These results also agree with Waade and Stahnke (1997), who studied the amino acid profile of dry sausages fermented with *S. xylo-sus* in the presence of nitrite and nitrate, and found that nitrite accelerated amino acid production perhaps by inhibiting their breakdown, whereas nitrate decreased the levels of amino acids.

Esterase activity present in staphylococci acts to esterify alcohols and acids that are present in the microorganisms environment (Talón, Chastagnac, Vergnais, Montel, & Berdagué, 1998). Esters are very fragrant compounds with very low odour detection thresholds, they give fruity notes to the dry fermented sausage flavour (Montel, Reitz, Talon, Berdagué, & Rousset, 1996; Stahnke, 1994). During the sausage drying process, an increase in the concentration of esters in the headspace was produced, which reached a maximum at 31 days and then decreased slowly (Fig. 5(b)). Up to day 45, no significant differences were found between batches on average but a higher level of esters were present in the samples with added nitrite ( $p < 0.05$ ) after storage. At this time, esters represented 6% and 3% of the total amount of volatile compounds in samples with added nitrite and nitrate, respectively. The

change in esters found in this study has been previously described by Talón and Montel (1997) and Talón et al. (1998) who observed in their in vitro experiments that the esterase enzyme of staphylococci acts by esterifying acids and alcohols until the esters arrive at a maximum concentration at which point the enzyme begins to hydrolyse them. The most abundant ester throughout the process was ethyl acetate, which at the end of the process (105 days) represented 48% and 38% of the total peak area for esters in the samples with added nitrite and nitrate, respectively. Of the remaining esters ethyl propanoate, ethyl butanoate, and ethyl lactate (ethyl 2-hydroxy-propanoate) were the most abundant. Most esters normally have a high aromatic impact. In this case, ethyl 2-methyl-propanoate, is the volatile compound with the lowest detection threshold of all the compounds identified in this work (Burdock, 2002; van Gemert & Nettenbreijer, 2004). The esters that follow it in aromatic intensity are: ethyl butanoate, ethyl hexanoate and ethyl 3-methyl-butanoate. In general, at 105 days, the samples with added nitrite showed greater abundance ( $p < 0.05$ ) of ethyl acetate, ethyl 2-methyl-propanoate, ethyl butanoate and ethyl lactate, while in the samples with added nitrate there were higher amounts of

ethyl 3-methyl-butoanoate, 2-methyl-butyl acetate and 3-methyl-butyl acetate. In a previous study made on sausages with nitrite or nitrate, Olesen et al. (2004a) found that the amount of ethyl acetate was higher in the samples with added nitrate than in the samples made with nitrite, however we observed the opposite.

The area of the volatile compounds derived from carbohydrate fermentation by microorganisms in sausages (Fig. 5(c)) was found to increase at a steady rate until day 14, and thereafter at a slower rate. Levels of these compounds were higher in the samples with added nitrate ( $p < 0.05$ ) than in the samples with added nitrite, comprising 38% and 31% of the total volatile compounds, respectively, at day 105. In this group, acetic acid was the most abundant at 105 days, representing 26% and 22% of the total area of extracted compounds in the samples with added nitrate and nitrite, respectively. The most abundant compounds, in decreasing order were ethanol (20%) and butanoic acid (8%) in the samples with added nitrite, and 2,3-butanediol (15%) in the samples with added nitrate. Compounds with the lowest odour detection threshold in that group were butanoic acid, acetic acid and 2-butanol (van Gemert & Nettenbreijer, 2004). Generation of 2-butanol, acetic acid, acetoin and 2, 3-butanediol was higher ( $p < 0.05$ ) throughout the whole process in the samples with added nitrate. In fact, at the end of the process (105 days) 2, 3-butanediol and acetoin presented an area 10 and 6 times larger, respectively, than in the samples with added nitrite. 2,3-butanediol and acetoin are by-products of the metabolism of lactic acid bacteria (Axelsson, 1998). Lactic acid bacteria were the highest population present in both batches during the drying process, and as the population was higher in the samples with added nitrate, they are possibly the most likely source for producing these volatile compounds. However, diacetyl and acetoin are produced in large amounts by staphylococci (Stahnke, 1999). According to Schmidt and Berger (1998), 2,3-butanediol is produced by the reduction of methyl-ketones from the  $\alpha$ -oxidation of fatty acids by staphylococci, and acetoin can be formed through the chemical oxidation of 2,3-butanediol. Olesen et al. (2004a) found that, for sausages made using staphylococci as a starter, the amount of 2,3-butanediol was higher in the samples made using nitrate but the amount of acetoin was higher in the samples with added nitrite.

With respect to the lipid  $\beta$ -oxidation produced mainly by Staphylococci as part of their metabolism, these compounds represent only 2% and 1% of the total extracted volatile compounds from the samples with added nitrite and nitrate, respectively, and their total area was always larger ( $p < 0.001$ ) in the samples with added nitrite (Fig. 5(d)).

Volatile compounds originating from lipid oxidation are considered essential contributors to the characteristic aroma of meat products (Shahidi, Rubin, & Dsouza, 1986). Many of the compounds in this group (aldehydes, unsaturated ketones and pentyl-furans) have a wide variety of aromatic notes and their odours have been described as

oily, tallowy, deep-fried, green, metallic, cucumber, mushroom and fruity (Ullrich & Grosch, 1987). This group of compounds represented the highest proportion throughout the process, representing 45% and 34% of the total extracted volatile compounds at the end of the process, in the samples made with nitrite and nitrate, respectively. For both batches volatile compounds originating from lipid oxidation increased very rapidly up to day 31 of the drying process and then decreased more slowly between 45 and 105 days. No significant differences were found between the two batches during the process. Hexanal is the most abundant product of lipid oxidation in meats and thus it has often been chosen as an index of the level of this lipid oxidation (Brunton, Cronin, Monahan, & Durcan, 2000; Wu & Sheldon, 1988). In the present study, it was the most abundant compound in all batches and stages, and its area increased throughout the drying process, decreasing slightly during vacuum packed storage (Table 4). At no point during the whole process was the hexanal level significantly different between the batches. This could be due to the large variation in peak areas for this compound, which represented 25% and 21% of the total volatile compound area found in the headspace of dry fermented sausages, in the samples with added nitrite and nitrate, respectively. No correlation was found between hexanal area and the level of TBARS, but the results could have been different if an SPME stationary phase, which was more selective for hexanal, had been used for its extraction. Other compounds present in abundance within this group were low weight hydrocarbons such as pentane, hexane and octane, however these compounds are not important contributors to the odour profile due to their high odour thresholds (Shahidi et al., 1986). Stahnke (1995b), in sausages made with different levels of nitrite and nitrate found that nitrate strongly increased the generation of straight aldehydes, but this effect was not observed in this work.

### 3.6. Sensory analysis

Sensory analysis of the sausages at the end of the process (105 days) did not show significant differences with respect to taste, colour or overall quality between batches (Table 5). A small difference ( $p < 0.1$ ) was found in the aroma showing a preference for sausages made with nitrate, and

Table 5  
Sensory analysis (preference test) of the dry fermented sausages at day 105

	Number of preferred samples		<i>p</i> (%) <sup>a</sup>
	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	
Colour	29	21	>65
Aroma	18	32	>90
Taste	20	29	>65
Overall quality	26	24	>10

N<sub>2</sub>: Samples with added nitrite. N<sub>3</sub>: Samples with added nitrate.

<sup>a</sup> *p* = Significant value between both samples. Tendency of the preference of one sample over the other.

that preference could be due to the lower level of oxidation (TBARS) of these samples and also to the higher amounts of volatiles arising from amino acid and carbohydrate catabolism and lower ester levels. This result is in agreement with that reported by Navarro et al. (2001) for small diameter non-fermented sausages where the aroma of sausages made with nitrate was more intense and preferred to the sausages made with nitrite.

#### 4. Conclusions

The addition of either nitrite or nitrate hardly affected the sensory characteristics. However, nitrite and nitrate affect both the oxidative process and the generation of volatile compounds originating from the growth and metabolism of microorganisms.

Levels of oxidation were higher in samples with added nitrite than in samples with added nitrate, as measured by TBARS and volatile compounds originating from  $\beta$ -oxidation of lipids produced by bacteria. Oxidative phenomena were inhibited during vacuum packed storage as both TBARS and volatile compounds originating from lipid oxidation decreased at this point. However, FFA release was not affected by vacuum storage as their level continued to increase after vacuum packing.

Volatile compounds arising from amino acid degradation and carbohydrate fermentation were generated at higher levels in the samples with added nitrate, probably due to the higher population of microorganisms in these samples, and the effect of nitrate on their metabolism.

In summary, the addition of nitrite and nitrate affects aroma generation of dry fermented sausages, however it depends greatly upon the fermentation process.

#### Acknowledgements

Financial support from grants AGL2005-00713 (MEC, Spain) and GV05/067 (Generalitat Valenciana, Spain) are fully acknowledged. The scholarship (I3P program) from CSIC/MEC to A. Marco, is also acknowledged.

#### References

Aguirrezábal, M. M., Mateo, J., Domínguez, M. C., & Zumalacárregui, J. M. (2000). The effect of paprika, garlic and salt on rancidity in dry sausages. *Meat Science*, *54*(1), 77–81.

Arneht, W., & Herold, B. (1988). Nitrat/Nitrit-Bestimmung in Wurstwaren nach enzymatischen Reduktion. *Fleischwirtschaft*, *68*, 761–764.

Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. In: S. Salmier & A. von Wright (Eds.), *Lactic acid bacteria: Microbiology and Functional Aspects* (2nd ed.) (pp. 1–72). New York: Marcel Dekker.

Barlett, G. R. (1959). Phosphorous assay in column chromatography. *Journal of Biological Chemistry*, *234*, 466–468.

Berdagú, J. L., Montiel, P., Montel, M. C., & Talon, R. (1993). Effects of starter cultures on the formation of flavour compounds in dry sausage. *Meat Science*, *35*, 275–287.

Berry, J. F., Cevallos, W. H., & Wade, R. R. J. (1965). Lipid class and fatty acid composition of intact peripheral nerve and during walerian

degeneration. *Journal of American Oil and Chemistry Society*, *42*, 492–495.

BOE (1979). Métodos oficiales de análisis de productos cárnicos. Boletín Oficial del Estado, de 28 de agosto de 1979, Anexo II, págs. 2023–20240. Madrid, Spain.

Bruna, J. M., Ordóñez, J. A., Fernández, M., Herranz, B., & de la Hoz, L. (2001). Microbial and physico-chemical changes during the ripening of dry fermented sausages superficially inoculated with or having added an intracellular cell-free extract of *Penicillium aurantiogriseum*. *Meat Science*, *59*(1), 87–96.

Brunton, N. P., Cronin, D. A., Monahan, F. J., & Durcan, R. (2000). A comparison of solid-phase microextraction (SPME) fibres for measurement of hexanal and pentanal in cooked turkey. *Food Chemistry*, *68*(3), 339–345.

Burdock, G. A. (2002). *Fenaroli's handbook of flavor ingredients* (4th ed.). Boca Raton, FL, USA: CRC Press.

Cammack, R., Joannou, C. L., Cui, X. Y., Martínez, C. T., Maraj, S. R., & Hughes, M. N. (1999). Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1411*(2–3), 475–488.

Cassens, R. G., Gresser, M. L., Ito, T., & Lee, M. (1979). Reactions of nitrite in meat. *Food Technology*, *33*(7), 46–57.

EFSA (2003). Opinion of the scientific panel on biological hazards on a request from the commission related to the effects of nitrites/nitrates on the microbiological safety of meat products. *The EFSA Journal*, *14*, 1–34.

Flores, J. (1997). Mediterranean vs. northern European meat products. Processing technologies and main differences. *Food Chemistry*, *59*(4), 505–510.

Flores, J., & Bermell, S. (1996). Dry-cured sausages: Factors influencing souring and their consequences. *Fleischwirtschaft*, *76*(2), 163–165.

Flores, M., Durá, M. A., Marco, A., & Toldrá, F. (2004). Effect of *Debaromyces* spp. on aroma formation and sensory quality of dry-fermented sausages. *Meat Science*, *68*(3), 439–446.

Flores, J., & Toldrá, F. (1993). Curing. In: R. Macrae, R. K. Robinson, & M. J. Sadler (Eds.), *Encyclopedia of food science, food technology and nutrition* (pp. 1277–1282). New York: Academic Press Inc.

Folch, J., Less, M., & 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.

Gandemer, G., Morvan-Mahi, B., Meynier, A., & Leperq, M. (1991). Quantitative and qualitative analysis of free fatty acids in meat and meat products. *Proceedings of the International Congress of Meat Science and Technology*, *37*(3), 1139–1142.

Honikel, K. O. (2005). Propuesta para el etiquetado y las alegaciones nutricionales en la Unión Europea. Implicancias para los jamones curados. In: III congreso mundial del jamón.

ISO 2917. (1999) Meat and Meat Products. Determination of the pH. Reference method.

Johansson, G., Berdagú, J. L., Larsson, M., Tran, N., & Borch, E. (1994). Lipolysis, proteolysis and formation of volatile components during ripening of a fermented sausage with *Pedococcus pentosaceus* and *Staphylococcus xylosum* as starter cultures. *Meat Science*, *38*, 203–218.

Juaneda, P., & Roquequin, G. (1985). Rapid and convenient separation of phospholipids and non phosphorous lipids from rat heart using silica cartridges. *Lipids*, *20*, 40–41.

Kovacs, M. I. P., Anderson, W. E., & Ackman, R. G. (1979). Simple method for the determination of cholesterol and some plant sterols in fishery-based food-products. *Journal of Food Science*, *44*(5), 1299.

Marco, A., Navarro, J. L., & Flores, M. (2004). Volatile compounds of dry-fermented sausages as affected by solid-phase microextraction (SPME). *Food Chemistry*, *84*(4), 633–641.

Molly, K., Demeyer, D., Civera, T., & Verplaete, A. (1996). Lipolysis in a Belgian sausage: Relative importance of endogenous and bacterial enzymes. *Meat Science*, *43*(3–4), 235–244.

Montiel, M. C., Reitz, J., Talon, R., Berdagú, J. L., & Rousset, A. S. (1996). Biochemical activities of Micrococaceae and their effects on

- the aromatic profiles and odours of a dry sausage model. *Food Microbiology*, 13, 489–499.
- Morrison, W. R., & Smith, L. M. (1964). Preparation of fatty acids methyl esters and dimethyl acetals from lipids with boron fluoride-methanol. *Journal of Lipid Research*, 5, 600–608.
- Navarro, J. L., Nadal, M. L., Izquierdo, L., & Flores, J. (1997). Lipolysis in dry cured sausages as affected by processing conditions. *Meat Science*, 45(2), 161–168.
- Navarro, J. L., Nadal, M. L., Nieto, P., & Flores, J. (1998). Effect of nitrate and nitrite curing salts on lipolysis in dry sausages produced using a rapid fermentation process. *Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung A/Food Research and Technology*, 206, 217–221.
- Navarro, J. L., Nadal, M. L., Nieto, P., & 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*, 212(4), 421–425.
- Neubauer, H., & Gotz, F. (1996). Physiology and interaction of nitrate and nitrite reduction in *Staphylococcus carnosus*. *Journal of Bacteriology*, 178(7), 2005–2009.
- Noel, P., Briand, E., & Dumont, J. P. (1990). Role of nitrite in flavor development in uncured cured meat-products sensory assessment. *Meat Science*, 28(1), 1–8.
- Olesen, P. T., Meyer, A. S., & Stahnke, L. H. (2004a). Generation of flavour compounds in fermented sausages—the influence of curing ingredients, *Staphylococcus* starter culture and ripening time. *Meat Science*, 66(3), 675–687.
- Olesen, P. T., Stahnke, L. H., & Talón, R. (2004b). Effect of ascorbate, nitrate and nitrite on the amount of flavour compounds produced from leucine by *Staphylococcus xylosum* and *Staphylococcus carnosus*. *Meat Science*, 68(2), 193–200.
- Ordóñez, J. A., Hierro, E. M., Bruna, J. M., & de la Hoz, L. (1999). Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39, 329–367.
- Sanz, Y., Vila, R., Toldrá, F., Nieto, P., & Flores, J. (1997). Effect of nitrate and nitrite curing salts on microbial changes and sensory quality of rapid ripened sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 37(2–3), 225–229.
- Sanz, Y., Vila, R., Toldrá, F., & Flores, J. (1998). Effect of nitrate and nitrite curing salts on microbial changes and sensory quality of non-fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 42(3), 213–217.
- Schmidt, S., & Berger, R. G. (1998). Aroma compounds in fermented sausages of different origins. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 31, 559–567.
- Shahidi, F., Rubin, L. J., & Dsouza, L. A. (1986). Meat flavor volatiles: a review of the composition, techniques of analysis, and sensory evaluation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 24(2), 141–243.
- Skjelvåle, R., & Tjøberg, T. B. (1974). Comparison of salami sausage produced with and without addition of sodium nitrite and sodium nitrate. *Journal of Food Science*, 39, 520–524.
- Stahnke, L. H. (1994). Aroma components from dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosum*. *Meat Science*, 38, 39–53.
- Stahnke, L. H. (1995a). Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosum* at different temperatures and with different ingredient levels. I. Chemical and bacteriological data. *Meat Science*, 41, 179–191.
- Stahnke, L. H. (1995b). Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosum* at different temperatures and with different ingredient levels. II. Volatile components. *Meat Science*, 41, 193–209.
- Stahnke, L. H. (1999). Volatiles produced by *Staphylococcus xylosum* and *Staphylococcus carnosus* during growth in sausage minces. I. Collection and identification. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 3(6), 357–364.
- Talón, R., Chastagnac, C., Vergnais, L., Montel, M. C., & Berdagüé, J. L. (1998). Production of esters by *Staphylococci*. *International Journal of Food Microbiology*, 45(2), 143–150.
- Talón, R., & Montel, M. C. (1997). Hydrolysis of esters by staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*, 36(2–3), 207–214.
- Talón, R., Walter, D., Chartier, S., Barriere, C., & Montel, M. C. (1999). Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*, 52(1–2), 47–56.
- Toldrá, F. (2005). Norma Europea de aditivos: implicaciones de la reducción de nitratos y nitritos en el jamón curado. In: III congreso mundial del jamón.
- Ullrich, F., & Grosch, W. (1987). Identification of the most intense volatile flavour compounds formed during autoxidation of linoleic acid. *Lebensm Unters Forsch*, 184, 277–282.
- van Gemert, L. J., & Nettenbreijer, A. (2004). *Compilation of odour threshold values in air, water and other media*. BACIS.
- Waade, C., & Stahnke, L. H. (1997). Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosum* at different temperatures and with different ingredient levels. IV. Amino acid profile. *Meat Science*, 46(1), 101–114.
- Wirth, F. (1991). Restricting and dispensing with curing agents in meat products. *Fleischwirtschaft*, 71(9), 1051–1054.
- Wu, T. C., & Sheldon, B. W. (1988). Flavour components and factors associated with the development of off-flavours in cooked turkey rolls. *Journal of Food Science*, 53(1), 49–54.
- Zanardi, E., Ghidini, S., Battaglia, A., & Chizzolini, R. (2004). Lipolysis and lipid oxidation in fermented sausages depending on different processing conditions and different antioxidants. *Meat Science*, 66(2), 415–423.

## The sensory quality of dry fermented sausages as affected by fermentation stage and curing agents

Aurora Marco · José Luis Navarro · Mónica Flores

Received: 19 September 2006 / Revised: 22 November 2006 / Accepted: 20 December 2006  
© Springer-Verlag 2007

**Abstract** The effects on the quality of dry fermented sausages of applying either a slow or rapid fermentation stage, and the addition of either nitrate or nitrite was studied. In the slow fermentation process, TBARS were higher in the batch made with nitrite than in the batch containing nitrate. For rapid fermentation, both batches, with added nitrate and nitrite, presented intermediate TBARS levels. Volatile compounds coming from lipid oxidation and microbial lipid  $\beta$ -oxidation were more abundant ( $p < 0.05$ ) in the samples submitted to a rapid fermentation stage, whilst compounds coming from amino acid catabolism and carbohydrate fermentation were higher ( $p < 0.05$ ) in samples subjected to a slow fermentation stage. A significant preference ( $p < 0.05$ ) was shown during sensory analysis for the batch made with nitrate and submitted to the slow fermentation process in aroma, taste and overall quality, whilst no differences in sensory analysis were detected among batches in the rapid fermentation process. Therefore, the use of nitrate is only justified in slow fermented processes due to its positive effect on the sensory quality of fermented sausages.

**Keywords** Fermentation · Oxidation · Nitrate · Nitrite · Sausage · Volatile compounds

### Introduction

The manufacture of dry fermented sausages is economically important in many countries; amongst them is Spain, where 6% of the three million tons of annual pork meat production are destined to become dry fermented sausages [1]. The time and energy requirements for the ripening process contribute a great deal to the total cost of fermented sausage manufacture; thus accelerating this process would result in a reduction of the storage time and an increased profit margin and competitiveness of the final product. This is the reason why in the manufacture of large-diameter dry fermented sausages, the traditional method (slow fermentation) has been replaced by a rapid industrial process (rapid fermentation). However, this shorter process causes a loss in the typical sensory characteristics of this meat product, primarily due to an intense acid flavour [2].

The main difference between both kinds of fermentation is the temperature at which pre-ripening takes place [3]. In the traditional method, low amounts of sugar are added and ripening takes place at low temperature, the rate of acid production is low and the activity of acid-sensitive bacteria (micrococaceae and staphylococci) is high. By contrast in the rapid method, higher amounts of sugar and higher temperatures are used allowing the lactic acid bacteria to drop the pH very rapidly, acidifying the sausage and inhibiting the growth of any food spoilage bacteria and staphylococci. The low pH also inhibits the staphylococci nitrate reductase activity which is responsible for the reduction of nitrate to nitrite. This reaction does not take place at pH  $< 5.4$  [4].

In Mediterranean countries, nitrate and/or nitrite are used indistinctly in the manufacture of dry-fermented sausages. According to Wirth [5] dry sausages made with

A. Marco · J. L. Navarro · M. Flores (✉)  
Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC),  
Apartado 73, 46100 Burjassot (Valencia), Spain  
e-mail: mflores@iata.csic.es

nitrate or low amounts of nitrite frequently taste better than those made with the usual amount of nitrite. However, research has mainly been focused on nitrite and its effect on flavour development with little attention paid to nitrate. Numerous scientific papers have studied the effect of the curing salts on different processes, like lipolysis and lipid oxidation or flavour generation. Generally, the studies have been done with a pre-incubation stage, that is, with a rapid fermentation process. In most of the studies comparing the effect of nitrates, the sausages were produced with only added nitrite [6, 7], or only added nitrate [8]. The role of nitrite has also been studied on sausages with both nitrite and nitrate added together [9, 10]. On the other hand, only a few studies have compared the effect of either nitrite or nitrate in a rapid fermentation process [11–16] or without fermentation [17].

In a previous work, Marco et al. [18] demonstrated that the addition of nitrite or nitrate in a slow fermented sausage have different effects on both the oxidative process and the generation of volatile compounds originating from the growth and metabolism of microorganisms. These effects were detected not only during the processing but also after the vacuum storage of the sausages. However, it is essential to confirm the effect of the fermentation stage on the role of nitrite or nitrate. Therefore, the aim of the present work is to study the individual effect of these curing salts on rapid and slow fermentation processes, focusing on the sensory quality and volatile compound generation after the vacuum storage of the sausages.

## Materials and methods

### Preparation of dry fermented sausages and sampling

Two batches of sausages, one containing sodium nitrite (N2) and another containing potassium nitrate (N3), were manufactured following the in-going amounts dictated by the European Parliament and Council Directive 95/2/EC. Then, each batch was split in two and submitted to slow (S) or rapid (E) fermentation process. Approximately, 40 kg of lean pork (80%) and 10 kg of pork back fat (20%) were ground through a plate of 6 mm diameter holes and split in two equal parts. Each part was then mixed under vacuum with the following additives added in g per kg quantities to the meat mixture: sodium chloride (27), lactose (20), dextrin (20) (food grade quality), sodium caseinate (20), glucose (7), sodium ascorbate (0.5) and finally, sodium nitrite (0.15) (N2 batch) or potassium nitrate (0.3) (N3 batch) were added to each part, respectively. The meat mixtures were inoculated with the starter culture SP-318 (Rhodia Iberia, group Rhône-Poulenc, Madrid, Spain) containing *Lactobacillus sakei*, *Pedococcus pentosaceus*, *Staphylococcus xylophilus* and *S.*

*carnosus* and mixed under vacuum for a second time. The mixtures were stuffed into collagen casings (Fibran, S.A., Girona, Spain, 75–80 mm diameter) yielding two groups of approximately 50 sausages of 500 g final weight. Each group of sausages (N2 and N3 batches) was then split into two and submitted to slow (N2S and N3S batches) or rapid (N2E and N3E batches) fermentation process. The sausages submitted to slow fermentation process were kept in a refrigeration chamber at 3–5 °C for 27 h, whilst the sausages submitted to rapid fermentation process were incubated at 24 °C and 60–90% relative humidity (RH), for 27 h. After this time, all sausages were put together in the same refrigeration chamber and dried at 10 °C and 85–75% RH. The total fermentation and drying time was 44 days. The sausages were then vacuum packed and stored at 4 °C for 2 months and the total processing time was 111 days.

In each batch, three sausages were collected at day 0, 8, 23, 44 (dry sausage) and 111 (vacuum-packed storage). From each sausage, 20 g were taken for immediately performing microbial analysis, the remaining sausage was minced, 20 g of this was used for moisture determination and the rest vacuum packaged and stored at –20°C for chemical analyses. At the end of the ripening time (111 days), in addition to the microbial and chemical analyses, a sausage slice was taken, vacuum packaged and stored at –20°C for volatile compound analysis. The remaining sausages obtained at day 111 were used for sensory analysis. All the results were expressed as means of the three replicates per gram of dry matter.

### Microbial analyses

Twenty grams of sausage samples were homogenised with 180 mL of peptone water for 1 min in a Stomacher Lab-Blender 400 (Seward Medical, London, UK) and decimal dilutions prepared. The population of lactic acid bacteria was determined by spread plating and counting onto MRS agar anaerobically (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain) and the staphylococci population by using Mannitol Salt agar (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain) both agars were incubated at 30 °C for 3 days.

### Chemical analyses

Moisture content was determined according to the official method for analysis of meat products [19] by dehydration at 100 °C until constant weight. pH was measured by introducing a pH meter FC200B (Hanna Instruments Inc., Woonsocket, RI, USA) into the centre of the sausage as described by ISO 2917 [20]. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were determined according to Bruna et al. [21], using trichloroacetic acid as the solvent instead of perchloric acid. Nitrate and nitrite content was deter-

mined using an enzymatic kit (Cat. No. 09050658, Roche, Palo Alto, CA, USA) according to the procedure described by Arneht and Herold [22]. For the extraction procedure, 5 g of minced sausage were homogenised in 50 mL of boiling redistilled water by four strokes of 30 s in a Polytron PT-MR 2100 (Kinematica AG, Switzerland). The homogenate was mixed with 3 mL of Carrez-I (150 g  $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$  in 1 L  $H_2O$ ) and 3 mL of Carrez-II (230 g  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  in 1 L  $H_2O$ ) solutions and finally, shaken manually. The mixture was adjusted to pH 8 with NaOH and the separation of fat was done by storage for 20 min at refrigeration temperature. The mixture was filtered and used for the enzymatic assay.

#### Volatile compounds analyses

Extraction of headspace volatile compounds was performed using a solid phase micro-extraction (SPME) device (Supelco, Bellefonte, PA, USA) with a 85  $\mu$ m carboxen/polydimethylsiloxane StableFlex fibre (CAR/PDMS SF) using the extraction conditions previously optimised by Marco et al. [23] for use on fermented sausages. For each experiment, 3 g of minced sausage were weighed into a 10 mL headspace vial, sealed with a PTFE-faced silicone septum (Supelco). The vial was left for 1 h in a thermo block (J.P. Selecta, Barcelona, Spain) at 30 °C for equilibration. The SPME fibre was then exposed to the headspace for 2 h while maintaining the sample at 30 °C. The compounds adsorbed by the fibre were identified and quantified by GC-MS as described by Marco et al. [18]. The results were expressed as area units resulting of counting the total ion chromatogram (TIC) of each compound or single ion chromatogram (EIC) when the peaks were not completely resolved. The volatile compound analysis of each sample was done per duplicate.

#### Sensory analyses

After 2 months of storage under vacuum (time 111 days), samples from each fermentation process (S and E) manufactured with nitrite or nitrate were subjected to sensory analysis. The sausage casing was removed and the sausage cut into slices of approximately 4 mm thickness. The slices were equilibrated for 30 min at room temperature before serving and assessed by a non-trained panel consisting of 50 members in 2 different sessions. A preference test [24] was carried out to determine each panellist's preference for a sample. Assessors were asked to indicate which sample was preferred in each fermentation process between nitrite and nitrate, with respect to colour, aroma, taste and overall quality. Sensory evaluations were recorded by computer software using Compusense<sup>®</sup> five release 4.6 (Compusense Inc., Guelph, ON, Canada).

#### Statistical analyses

The effect of the fermentation stage and the curing agents (nitrite or nitrate) on the variables studied (microbial, chemical and volatile compounds) were tested by two-factor analysis of variance (ANOVA) using the statistic software Statgraphics plus (v 5.1). In those cases where the effect of the factors and their interactions were significant ( $p < 0.05$ ), the means were compared using Fisher's least significant difference (LSD) test ( $p < 0.05$ ). The effect of the curing agents on the sensory data was determined by analysis of variance (ANOVA).

## Results and discussion

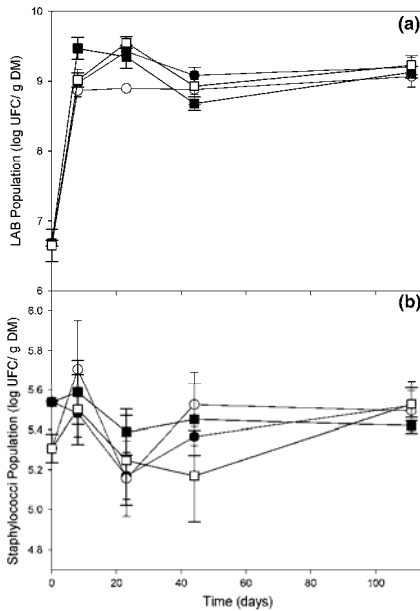
#### Microbiological analyses

Growth of lactic acid bacteria (LAB) and staphylococci during the drying process is presented in Fig. 1. In general, the number of LAB and staphylococci were within the expected range for fermented sausages [25], and the differences were not significant ( $p > 0.05$ ) among the batches at the end of the process (Fig. 1). However, at 23 days there was a significant ( $p < 0.05$ ) lower LAB count in the slow process containing nitrate (N3S) than in the other batches. The higher LAB population in the batches submitted to the rapid fermentation process were as expected and in agreement with the results obtained by Lucke [3]; however, these differences were not obtained throughout all the process.

#### Chemical analyses

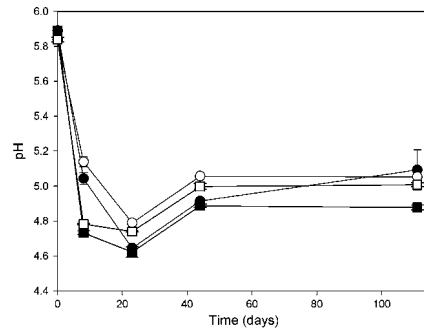
The fermentation process produced significant differences in pH amongst batches (Fig. 2). After 8 days of processing, a higher decrease ( $p < 0.05$ ) in pH was observed in the rapid fermentation batches (N2E and N3E). The higher decrease shown in the rapid fermentation process should have been related to a higher LAB population at 8 days. Although, the differences in LAB population were only significant at 23 days of processing as reported previously. The absence of significant differences in LAB population can be due to an experimental error. The slow fermentation process also reached similar pH values as the rapid fermentation process but after 23 days of processing. A similar behaviour was described by Lücke [3] for rapid and "natural" methods. Thereafter, the pH was significantly higher ( $p < 0.001$ ) in the batches containing nitrate rather than nitrite, although by the end of the process this difference was not detected. Moisture content decreased throughout the ripening process from initial values of 64 to 35%; no significant differences existed between batches





**Fig. 1** Levels of lactic acid bacteria (a) and staphylococci (b) during the processing of dry fermented sausages. Slow fermentation process containing nitrite (N2S, filled circle) and nitrate (N3S, open circle). Rapid fermentation process containing nitrite (N2E, filled square) and nitrate (N3E, open square). Symbols represent the mean and standard error of the mean

(data not shown). In relation to the nitrate and nitrite concentrations (ppm in dry matter), there was a reduction of nitrite concentration in both fermentation processes, with only residual concentrations by the end of the process (Fig. 3a). The reduction of nitrate was significantly ( $p < 0.001$ ) affected by the fermentation process, so that a higher nitrate concentration was found in the rapid fermented batch containing nitrate during the whole process (Fig. 3b). This fact could be due to the inactivation of nitrate-reductase enzyme at the low pH obtained in the N3E batch [4, 26]. This behaviour was previously reported by Marco et al. [18] in fermented sausages containing nitrate. In that work, the batch made with added nitrate presented a higher pH decrease than in the present work, and therefore the conversion of nitrate to nitrite was reduced. In regard to the toxicological risk, the residual concentrations obtained in this study were under the limits of the EC directive when expressed in wet matter.

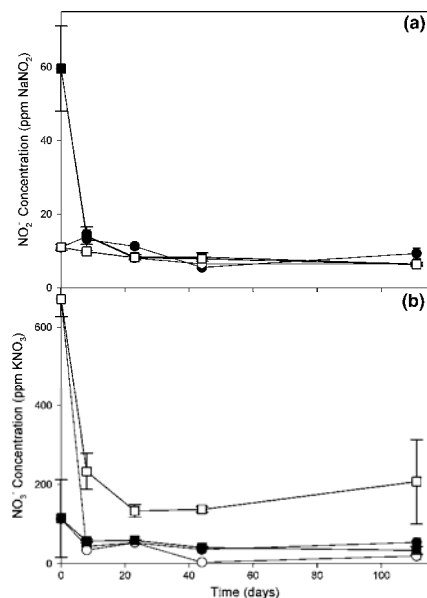


**Fig. 2** pH of dry fermented sausages. Slow fermentation process containing nitrite (N2S, filled circle) and nitrate (N3S, open circle). Rapid fermentation process containing nitrite (N2E, filled square) and nitrate (N3E, open square). Symbols represent the mean and standard error of the mean

The main differences in oxidation were observed in the slow fermentation process where the batch made with added nitrite showed higher TBARS values than the batch with added nitrate throughout the process until 44 days (Fig. 4) although they were only significant ( $p < 0.05$ ) at 23 days. This fact was also observed by Marco et al. [18] in slow fermented sausages. However, in the rapid fermentation process, no differences in TBARS values ( $p > 0.05$ ) were observed between batches with added nitrite or nitrate throughout the process. It was remarkable that the rapid fermented batches presented intermediate TBARS values between the values obtained in slow fermented batches with added nitrites and nitrates. Zanardi et al. [10] also found that a batch made only with nitrite had a slightly higher TBARS concentration than another made with nitrite and nitrate together, despite not showing significant differences. However, these results are not in accordance with Navarro et al. [15] who, in dry sausages produced using a rapid fermentation process, detected higher peroxide index in the nitrate than the nitrite batch. The antioxidant effect of nitrate has previously been shown by Talón et al. [27] in *in vitro* experiments, who found that nitrate activates the production and release of the enzyme catalase in *S. xyloso*. It should be noted that nitrite is also a potent antioxidant [5] although, it seems that the antioxidant activity depends on the fermentation process.

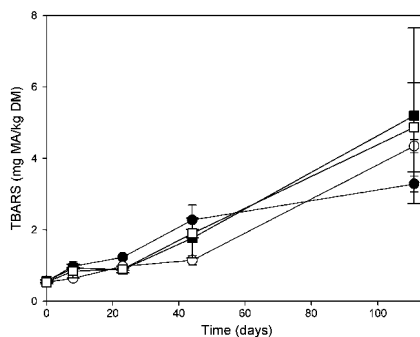
#### Volatile compounds analyses

A total of 97 compounds were identified after 111 days of processing (see Table 1), most of them previously described in dry fermented sausages using the same extrac-



**Fig. 3** Concentrations of nitrite (a) and nitrate (b) as measured during the ripening process of dry fermented sausages expressed as ppm of sodium nitrite and potassium nitrate in dry matter (DM), respectively. Slow fermentation process containing nitrite (N2S, filled circle) and nitrate (N3S, open circle). Rapid fermentation process containing nitrite (N2E, filled square) and nitrate (N3E, open square). Symbols represent the mean and standard error of the mean

tion conditions [18, 28]. The areas of these volatile compounds were quantified where possible using TIC or EIC. The SPME technique is not normally used for absolute quantifications, but does allow comparing relative amounts between samples when exactly the same extraction procedure is used [29]. The volatile compounds were grouped according to their possible origin, in order to understand how generation pathways were affected by the fermentation stage and the addition of nitrite or nitrate. Two major groups were assigned: lipid auto-oxidation products and products of bacterial metabolism. Within the last group, four subgroups can be named: carbohydrate fermentation, amino acid catabolism, staphylococci esterase activity and lipid  $\beta$ -oxidation. Several of the compounds listed may have more than one origin; however these compounds have been grouped according to the main origin as indicated by Ordóñez et al. [30]. Only the compounds which showed significant differences due to the fermentation process or to the addition of different curing salts have been listed in



**Fig. 4** Levels of TBARS as monitored during the ripening process in dry fermented sausages. Slow fermentation process containing nitrite (N2S, filled circle) and nitrate (N3S, open circle). Rapid fermentation process containing nitrite (N2E, filled square) and nitrate (N3E, open square). Symbols represent the mean and standard error of the mean

Table 2. In addition, the total area of each group is also shown in Table 2.

Volatile compounds originating from lipid oxidation are considered essential contributors to the characteristic aroma of meat products [31]. After 111 days of processing in the sausage, this group represented 41, 28, 62 and 45% from the area of the total extracted compounds in the batches N2S, N3S, N2E and N3E, respectively. Several compounds derived from lipid oxidation showed significant ( $p < 0.05$ ) differences due to the fermentation process (see Table 2). The most significant results were the higher ( $p < 0.01$ ) amounts of hexanal, 2-pentyl-furan, 1-octen-3-one, hexanoic acid and octanoic acid observed in the rapid fermentation process when compared with the slow fermentation process. With respect to the use of different curing salts, there was a significant difference for some of the volatile compounds derived from lipid oxidation. Thus, the compounds propanal, butanal, 1-penten-3-one, pentanal, heptanal, pentanoic acid, 2-pentyl-furan, 1-octen-3-one, octanal, hexanoic acid, 2-octenal and 1-octanol presented a higher amount in the samples with added nitrite. These results are not in accordance with those reported by Stahnke [13] who found that in sausages made with different levels of nitrite and nitrate, the addition of nitrate strongly increased the generation of straight aldehydes; and this effect was favoured by increasing the temperature during the incubation stage. On the contrary, our results showed higher amounts of propanal, butanal, pentanal, heptanal, octanal and nonanal in the batch with added nitrite and subjected to the rapid fermentation process where higher temperatures were applied. On the other hand, the results obtained in the slow fermented process confirms the

**Table 1** Volatile compounds identified in the headspace of dry fermented sausages

Compounds	KI	R
<b>Lipid auto-oxidation</b>		
Pentane	500	a
Propanal	520	a
Hexane	600	a
1-Propanol	610	a
Butanal	620	a
1-Heptene	692	b
Heptane	700	a
2-Ethyl-furan	717	a
1-Butanol	720	a
1-Penten-3-one	726	a
Pentanal	735	a
1-Octene	795	b
Octane	800	a
Propanoic acid	810	a
2-Octene, (Z)-	819	b
1-Pentanol	826	a
Hexanal	840	a
Nonane	901	a
2-Hexenal	903	a
2-N-butyl-furan	910	b
1-Hexanol	924	a
Heptanal	940	a
Pentanoic acid	980	a
Decane	1,000	a
2-Heptenal, (Z)-	1,007	a
2-Pentyl-furan	1,007	b
Butyrolactone	1,013	a
1-Octen-3-one	1,017	b
Octanal	1,042	a
2,4-Heptadienal	1,073	a
Hexanoic acid	1,074	a
Undecane	1,099	a
2-Octenal, (E)-	1,112	a
1-Octanol	1,126	a
Nonanal	1,147	a
Heptanoic acid	1,176	a
Dodecane	1,200	a
2-Nonenal	1,218	a
Octanoic acid	1,263	a
<b>Bacterial metabolism</b>		
<i>Carbohydrate fermentation</i>		
Ethanol	505	a
Acetone	526	a
Diacetyl (2,3-butanedione)	624	a
2-Butanone	628	a
2-Butanol	640	a

**Table 1** continued

Compounds	KI	R
Acetic acid	717	a
Acetoin (3-hydroxy-2-butanone)	777	a
2,3-Butanediol	882	a
2,3-Butanediol	889	a
Butanoic acid	896	a
<i>Staphylococci esterase activity</i>		
Ethyl acetate	633	a
Propyl acetate	746	a
Ethyl 2-methyl-propanoate	786	a
Ethyl butanoate	830	a
Ethyl 2-hydroxy-propanoate	864	a
Ethyl 2-methyl-butanoate	877	a
Ethyl 3-methyl-butanoate	881	a
3-Methyl-1-butyl acetate	906	a
2-Methyl-1-butyl acetate	908	a
Ethyl pentanoate	928	a
Ethyl hexanoate	1,024	a
2-Methyl-1-butyl propanoate	1,056	b
Ethyl octanoate	1,227	a
<i>Amino acid catabolism</i>		
2-Methyl-propanal	590	a
Benzene	673	a
2-Methyl-1-propanol	678	a
3-Methyl-butanal	686	a
2-Methyl-butanal	697	a
Dimethyldisulphide	770	a
Toluene	786	a
3-Methyl-3-buten-1-ol	788	b
3-Methyl-1-butanol	793	a
3-Methyl-2-buten-1-ol	833	b
2-Methyl-propanoic acid	865	a
Ethylbenzene	881	b
3-Methyl butanoic acid	942	a
2-Methyl-butanoic acid	948	a
Methional (3-methylthio-propanal)	965	a
Benzaldehyde	1,012	a
Phenylacetaldehyde	1,102	a
Phenol	1,108	a
Phenylethyl alcohol	1,191	a
<i>Lipid <math>\beta</math>-oxidation</i>		
2-Pentanone	730	a
1-Penten-3-ol	738	a
2,3-Pentanedione	741	a
2-Pentanol	753	a
2-Heptanone	934	a
2,3-Octanedione	1,023	b
1-Octen-3-ol	1,025	a
2-Octanone	1,032	a

Table 1 continued

Compounds	KI	R
2-Nonanone	1,128	a
<i>Unknown origin or contamination</i>		
Acetaldehyde	466	a
Carbon disulphide	536	a
Chloroform	647	b
Pentane, 1-chloro-	774	a
m-/p-Xylene	890	a
Styrene	917	b
Phenol, 4-methyl-	1,168	b

KI Kovacs index calculated for DB-624 capillary column (J&W Scientific: 30 m, 0.25 mm inner diameter, 1.4 µm film thickness) installed on a gas chromatograph equipped with a mass-selective detector; R reliability of identification—*a* mass spectrum and retention time identical with an authentic standard, *b* tentative identification by mass spectrum

results of Marco et al. [18] where few significant differences among batches with added nitrite or nitrate were observed in volatile compounds coming from lipid auto-oxidation.

Volatile compounds derived from carbohydrate fermentation represented 41, 51, 27 and 39% from the area of the total extracted compounds in the batches N2S, N3S, N2E and N3E, respectively. Several compounds derived from carbohydrate fermentation showed significant ( $p < 0.05$ ) differences due to the fermentation process (see Table 2). The addition of different curing salts also produced a significant effect. The batch with added nitrate presented a higher proportion ( $p < 0.01$ ) of 2-butanol, acetic acid, acetoin and 2,3-butanediol than in the nitrite added batch (see Table 2). The results for 2,3-butanediol and acetoin agree with those obtained by Marco et al. [18] in slow fermented sausages. In both experiments, the amounts of these compounds were around ten times higher in samples with added nitrate. However, Olesen et al. [16] found that for sausages made using staphylococci as a starter, the amount of 2,3-butanediol was also higher in the samples made using nitrate whilst on the contrary, the amount of acetoin was higher in the samples with added nitrite.

Staphylococci are known to esterify alcohols and acids that are present in the microorganism environment [32]. Esters are very fragrant compounds with low odour detection thresholds, giving fruity notes to the dry fermented sausage flavour [8, 33]. Esters represented 5.4, 4.8, 2.4 and 4.3% from the area of the total extracted compounds in the batches N2S, N3S, N2E and N3E, respectively. In this group, some volatile compounds showed significant ( $p < 0.05$ ) differences due to the fermentation process. The proportion of ethyl 2-methyl-butanoate was

significantly higher ( $p < 0.001$ ) in the slow than in the rapid fermentation process. Moreover, the addition of the curing agents affected ( $p < 0.01$ ) the proportion of ester compounds although its behaviour depended on each individual compound. In both fermentation processes, the batches with added nitrite presented a higher amount of ethyl pentanoate ( $p < 0.05$ ) than the batches with added nitrate whilst ethyl 3-methyl-butanoate ( $p < 0.01$ ) presented the opposite behaviour. The result for ethyl 3-methyl-butanoate agrees with those reported by Marco et al. [18] in slow fermented sausages with added nitrate. In the rapid fermentation process, ester compounds such as ethyl acetate, ethyl-2-hydroxy-propanoate, ethyl 2-methyl-butanoate, ethyl 3-methyl-butanoate and ethyl hexanoate were present in higher amounts ( $p < 0.01$ ) in the batch with added nitrate. These results were also reported by Olesen et al. [16], who found that the amount of esters were higher in sausages with added nitrate rather than those with nitrite. These authors also indicated the positive contribution of nitrate to generate branched-chain flavour compounds and gave support to the theory that staphylococci are important contributors to the aroma in fermented sausages.

The catabolism of branched-chain amino acid generates branched aldehydes, alcohols and acids which are very important contributors to the aroma of dry fermented sausages [33]. Other amino acids that generate interesting volatile compounds are aromatic and sulphur amino acids. The area of volatile compounds coming from amino acid catabolism represented 2.5, 3.1, 2.1 and 2.5% of the total extracted volatile compounds in the batches N2S, N3S, N2E and N3E, respectively. Several compounds derived from amino acids showed significant differences due to the fermentation process (see Table 2). 2-Methyl-propanal presented a higher ( $p < 0.001$ ) proportion in the slow than in the rapid fermented batches while methional was higher ( $p < 0.01$ ) in the rapid fermented batches. On the other hand, the addition of curing agents also produced a significant effect ( $p < 0.05$ ). The volatile compounds 3-methyl-butanol, 2-methyl-propanol, 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-propanoic and phenyl ethyl alcohol were higher ( $p < 0.01$ ) in the batch with added nitrate. However, due to the significant ( $p < 0.05$ ) interaction between factors, the least significance differences were mainly detected in the slow fermentation process. The positive effect of nitrate in the generation of volatile compounds coming from the degradation of amino acids has been also previously reported by several authors [16, 18, 34, 35].

Lipid  $\beta$ -oxidation is mainly produced by lipolytic staphylococci [30]. This group represents only 1.1, 0.8, 1.7 and 1.1% of the total extracted volatile compounds in the batches N2S, N3S, N2E and N3E, respectively. Most of the volatile compounds derived from lipid  $\beta$ -oxidation showed significant differences due to the fermentation process

**Table 2** Volatile compounds (AU  $\times 10^{-6}$  per g dry mater) in the headspace of dry fermented sausages after 111 days of processing

Compounds	KI	Slow fermentation		Rapid fermentation		$p^a$		
		Nitrite	Nitrate	Nitrite	Nitrate	Fermentation	Curing agents	Interaction
<b>Lipid auto-oxidation</b>								
Propanal	520	4.16b	3.01b	7.83a	4.60b	0.0007	0.0022	0.0683
1-Propanol	610	0.59bc	1.44a	0.37c	0.77b	0.0022	0.0002	0.0525
Butanal	620	1.00b	0.71b	2.08a	0.97b	0.0274	0.0234	NS
Heptane	700	9.95a	3.64b	5.45b	5.60b	NS	0.0249	0.0205
1-Penten-3-one (55) <sup>b</sup>	720	0.28b	0.20b	1.08a	0.34b	0.0218	0.0393	0.0832
Pentanal (44) <sup>b</sup>	735	8.74bc	5.80c	13.57a	10.44ab	0.0050	0.0367	NS
1-Octene	795	0.91b	1.40a	0.75b	1.02ab	NS	0.0332	NS
1-Pentanol	826	2.52ab	2.02b	4.27a	3.28ab	0.0207	NS	NS
Hexanal	840	179.03ab	108.67b	295.67a	244.94ab	0.0041	NS	NS
Heptanal	940	4.36b	3.80b	13.50a	7.22b	0.0007	0.0170	0.0351
Pentanoic acid	980	0.93a	0.51c	0.88ab	0.65bc	NS	0.0019	NS
2-Pentyl furan (81) <sup>b</sup>	1.008	0.22c	0.16c	0.49a	0.34b	0.0000	0.0015	0.0441
1-Octen-3-one	1,018	1.22bc	0.84c	2.98a	1.55b	0.0005	0.0027	0.0333
Octanal	1,042	3.74b	2.82c	6.07a	4.21b	0.0006	0.0019	NS
Hexanoic acid	1,074	4.53c	4.38c	6.73a	5.61b	0.0003	0.0350	0.0853
2-Octenal, (E)-	1,112	0.76b	0.20c	2.15a	0.84b	0.0000	0.0000	0.0092
1-Octanol	1,126	0.52a	0.16b	0.57a	0.41a	0.0408	0.0049	NS
Nonanal	1,147	1.76b	2.16b	5.37a	2.78b	0.0002	0.0094	0.0018
Heptanoic acid	1,176	0.12a	0.12a	0.09a	0.06b	0.0058	NS	NS
2-Nonenal	1,218	0.11b	0.18b	0.88a	0.22b	0.0005	0.0032	0.0009
Octanoic acid	1,263	0.37c	0.38c	1.57a	0.81b	0.0001	0.0090	0.0079
Total		293.579b	256.909b	585.42a	372.588b	0.0131	NS	NS
<b>Bacterial metabolism</b>								
<i>Carbohydrate fermentation</i>								
Diacetyl (2,3-butanedione)	624	0.27b	0.70a	0.27b	0.38b	0.0116	0.0005	0.0124
2-Butanone	628	3.12b	4.51a	2.91b	1.93c	0.0000	NS	0.0001
2-Butanol	640	0.75b	1.97a	0.39b	1.56a	NS	0.0004	NS
Acetic acid	717	192.55bc	291.88a	166.17c	234.85b	0.0318	0.0010	NS
Acetoin (3-hydroxy-2-butanone)	777	1.37c	8.73a	0.66c	4.58b	0.0001	0.0000	0.0014
2,3-Butanediol (45) <sup>b</sup>	889	0.41c	7.37a	0.09c	3.25b	0.0002	0.0000	0.0006
Butanoic acid	896	32.95ab	35.06a	27.20c	32.40ab	0.0494	NS	NS
Total		280.01bc	400.92a	229.37c	321.47b	0.0140	0.0011	NS
<i>Staphylococci esterase activity</i>								
Ethyl acetate	633	16.82a	21.93a	7.42b	19.79a	0.0246	0.0030	NS
Ethyl 2-methyl-propanoate (43) <sup>b</sup>	786	0.10b	0.22a	tr	0.06b	0.0040	0.0093	
Ethyl 2-hydroxy-propanoate	864	8.85a	6.30b	3.76c	6.25b	0.0024	NS	0.0026
Ethyl 2-methyl-butanoate	877	0.64a	0.49b	0.22d	0.41c	0.0000	NS	0.0002
Ethyl 3-methyl-butanoate (88) <sup>b</sup>	881	0.15bc	0.27a	0.06c	0.19b	0.0169	0.0037	NS
Ethyl pentanoate	928	0.83ab	0.41b	1.64a	0.47b	NS	0.0181	NS
Ethyl hexanoate (88) <sup>b</sup>	1024	0.20a	0.16ab	0.13b	0.19a	NS	NS	0.0065
Total		38.01a	37.46a	18.95b	35.32a	0.0077	0.0261	0.0201
<i>Amino acid catabolism</i>								
2-Methyl-propanal	590	0.63a	0.71a	0.41b	0.38b	0.0050	NS	NS
2-Methyl-1-propanol	678	0.20b	0.30a	0.12b	0.13b	0.0017	0.0410	NS
3-Methyl-butanal	686	2.10b	3.04a	1.31c	1.76b	0.0001	0.0007	NS
2-Methyl-butanal	697	0.51ab	0.55a	0.47ab	0.42b	0.0393	NS	NS

Table 2 continued

Compounds	KI	Slow fermentation		Rapid fermentation		$p^a$		
		Nitrite	Nitrate	Nitrite	Nitrate	Fermentation	Curing agents	Interaction
3-Methyl-1-butanol	737	1.23b	3.39a	0.69b	1.43b	0.0013	0.0005	0.0244
2-Methyl-propanoic acid (41) <sup>b</sup>	865	0.17b	0.31a	0.11b	0.18b	0.0068	0.0051	NS
3-Methyl-butanoic acid	942	3.66b	7.32a	5.11ab	7.06a	NS	0.0026	NS
2-Methyl-butanoic acid	948	2.08a	2.08a	1.25b	1.80a	0.0011	0.0329	0.0339
Methional (3-methylthio-propanal)	965	0.44bc	0.23c	1.00a	0.71ab	0.0018	NS	NS
Phenylacetaldehyde	1102	0.20b	0.25b	0.33b	0.72a	0.0004	0.0022	0.0068
Phenylethyl alcohol	1191	0.07b	0.17a	0.12ab	0.16a	NS	0.0056	NS
Total		18.90bc	24.57a	14.15c	20.37ab	0.0221	0.0060	NS
<i>Lipid <math>\beta</math>-oxidation</i>								
2-Pentanone (43) <sup>b</sup>	730	0.33bc	0.53a	0.32c	0.45ab	NS	0.0045	NS
2,3-Pentanedione (43) <sup>b</sup>	740	1.17b	0.59b	3.17a	1.66ab	0.0143	NS	NS
2-Pentanol	753	1.43a	1.57a	0.60b	1.18a	0.0044	0.0451	NS
2-Heptanone	934	1.13b	0.93b	2.48a	2.85a	0.0001	NS	NS
2,3-Octanedione (43) <sup>b</sup>	1023	0.86b	0.41b	2.57a	1.42ab	0.0051	NS	NS
1-Octen-3-ol (57) <sup>b</sup>	1026	0.59b	0.32c	1.17a	0.70b	0.0003	0.0013	NS
2-Octanone	1032	0.83a	0.19c	0.55b	0.29c	NS	0.0001	0.0111
2-Nonanone	1138	0.24c	0.23c	0.67b	0.94a	0.0000	NS	0.0450
Total		6.99bc	6.16c	9.84a	9.20ab	0.0053	0.3247	NS

Means with different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) amongst batches

AU area units resulting of counting the total ion chromatogram (TIC) for each compound, KI Kovacs index calculated for DB-624 capillary column (J&W Scientific; 30 m, 0.25 mm inner diameter, 1.4  $\mu$ m film thickness) installed on a gas chromatograph equipped with a mass-selective detector, tr compound detected as traces, NS not significant

<sup>a</sup>  $p$  value for the statistical analysis

<sup>b</sup> Ratio mass/charge of the characteristic ion used to quantify the compound when the peaks have not been completely resolved

( $p < 0.05$ ; see Table 2). The most significant effect was the higher proportion of 2,3-pentanedione, 2-heptanone, 2,3-octanedione and 2-nonanone in the rapid fermented batches. The addition of curing agents also has a significant effect on the volatile compounds derived from lipid  $\beta$ -oxidation. In both processes, a higher proportion ( $p < 0.05$ ) of 1-octen-3-ol and 2-octanone was detected in batches with added nitrite while 2-pentanone was higher ( $p < 0.01$ ) in the batches with added nitrate. These results are partially in accordance with those reported by Marco et al. [18] who showed a higher proportion of lipid  $\beta$ -oxidation compounds in a nitrite slow fermented sausage.

In summary, both the fermentation process and the use of different curing agents produced a significant effect on the generation of volatile compounds and therefore, in the final aroma. Generally, the rapid fermentation process is related to a higher proportion of volatile compounds from lipid auto-oxidation and lipid  $\beta$ -oxidation. On the other hand, the addition of nitrate is responsible for decreasing the proportion of lipid auto-oxidation volatile compounds and for an increase in volatile compounds from carbohydrate fermentation and amino acid catabolism. These results are partially in accordance with those of Olesen et al. [16] and

Stahnke [13], who reported that the main factors affecting aroma development were staphylococci starter culture, curing ingredients and pH. In their results, the nitrate addition produced higher amounts of branched-chain flavour compounds and several lipid auto-oxidation products.

#### Sensory analyses

For the batches subjected to slow fermentation process, the panel preferred the batch with added nitrate in aroma, taste and overall quality (Table 3); this batch also had the lowest oxidation values throughout the ripening process (Fig. 4). However, no differences in sensory analysis were detected among batches in the rapid fermentation process (Table 3), and also no differences were found in the oxidation values for these samples (Fig. 4). Marco et al. [18] also detected a preference in the aroma of slow fermented sausages with added nitrate; however the observed preference was only significant at  $p$  value 0.10. These results also agree with Navarro et al. [17] who found that for small-diameter non-fermented sausages, the aroma of sausages made with nitrate was more intense and preferred to the sausages made with nitrite.

**Table 3** Sensory analysis (paired comparison test) of dry fermented sausages after 111 days of processing

	Paired	Number of preferred samples				<i>p</i>
		Slow fermentation		Rapid fermentation		
		Nitrite	Nitrate	Nitrite	Nitrate	
Colour	N2S–N3S	25	25			NS
	N2E–N3E			28	22	NS
Aroma	N2S–N3S	18	32			<0.05
	N2E–N3E			21	29	NS
Taste	N2S–N3S	18	32			<0.05
	N2E–N3E			22	28	NS
Overall quality	N2S–N3S	15	35			<0.01
	N2E–N3E			22	28	NS

N2S samples with added nitrite and slow fermentation, N3S samples with added nitrate and slow fermentation, N2E samples with added nitrite and rapid fermentation, N3E samples with added nitrites and rapid fermentation

## Conclusions

Curing agents have different effects on the quality of dry fermented sausages depending on the pace of the fermentation process. The consumer preference for the slow fermented batch with added nitrate was probably due to the lower oxidation index found in this batch, and the higher proportion of volatile compounds derived from carbohydrate fermentation and amino acid catabolism. However, when the curing agents were used in the rapid fermentation process, no differences were obtained to the appreciation of consumers, and only a few chemical differences were obtained, such as a higher proportion of volatile compounds coming from lipid oxidation in the batch with added nitrite, although no differences in TBARS values were detected. In summary, this study indicates that nitrate has a positive effect on the sensory quality of sausages submitted to a slow fermentation process, while the use of nitrate in a rapid fermentation process is not justified from the sensory-quality point of view.

**Acknowledgments** Financial support from grants AGL2005-00713 (MEC, Spain) and GV05/067 (Generalitat Valenciana, Spain) are fully acknowledged. The scholarship (13P program) from CSIC/MEC to A. Marco, is also acknowledged.

## References

1. AICE Asociación de Industrias de la Carne de España. (2004) Panorama del sector cárnico. <http://www.aice.es/carne.asp>

2. Flores J, Bermell S (1996) *Fleischwirtschaft* 76:163–165
3. Lücke FK (1985) Fermented sausages. In: Wood BJB (ed) *Microbiology of fermented foods*. Elsevier Applied Science, London, pp 41–83
4. Kröckel L (1995) Bacterial fermentation of meats. In: Campbell-Platt G, Cook PE (eds) *Fermented meats*. Blackie Academic & Professional, Glasgow, pp 39–52
5. Wirth F (1991) *Fleischwirtschaft* 71:1051–1054
6. Skjelvåle R, Tjåberg TB (1974) *J Food Sci* 39:520–524
7. Aguirrezábal MM, Mateo J, Domínguez MC, Zumalacárregui JM (2000) *Meat Sci* 54:77–81
8. Montel MC, Reitz J, Talón R, Berdagué JL, Rousset AS (1996) *Food Microbiol* 13:489–499
9. Noel P, Briand E, Dumont JP (1990) *Meat Sci* 28:1–8
10. Zanardi E, Ghidini S, Battaglia A, Chizzolini R (2004) *Meat Sci* 66:415–423
11. Zaika LL, Zell TE, Smith JL, Palumbo SA, Kissing JC (1976) *J Food Sci* 41:1457–1460
12. Stahnke LH (1995) *Meat Sci* 41:179–191
13. Stahnke LH (1995) *Meat Sci* 41:193–209
14. Stahnke LH (1995) *Meat Sci* 41:211–223
15. Navarro JL, Nadal MI, Nieto P, Flores J (1998) *Eur Food Res Technol* 206:217–221
16. Olesen PT, Meyer AS, Stahnke LH (2004) *Meat Sci* 66:675–687
17. Navarro JL, Nadal MI, Nieto P, Flores J (2001) *Eur Food Res Technol* 212:421–425
18. Marco A, Navarro JL, Flores M (2006) *Meat Sci* 73:660–673
19. BOE (1979) Métodos oficiales de análisis de productos cárnicos. Boletín Oficial del Estado, de 28 de agosto de 1979, Anexo II, Madrid, Spain, pp 20233–20240
20. ISO 2917 (1999) Meat and meat products. Determination of the pH. Reference method
21. Bruna JM, Ordóñez JA, Fernández M, Herranz B, de la Hoz L (2001) *Meat Sci* 59:87–96
22. Arneht W, Herold B (1988) *Fleischwirtschaft* 68:761–764
23. Marco A, Navarro JL, Flores M (2004) *Food Chem* 84:633–641
24. ISO 5495 (1983) Sensory analysis, methodology, paired comparison test
25. Durá MA, Flores M, Toldra F (2004) *Meat Sci* 68:319–328
26. Toldrá F, Sanz Y, Flores M (2001) Meat fermentation technology. In: Hui YH, Nip WK, Rogers RW, Owen AY (eds) *Meat science and applications*. Marcel Dekker, New York, pp 537–561
27. Talón R, Walter D, Chartier S, Barriere C, Montel MC (1999) *Int J Food Microbiol* 52:47–56
28. Flores M, Durá MA, Marco A, Toldrá F (2004) *Meat Sci* 68:439–446
29. Roberts DD, Pollien P, Milo C (2000) *J Agric Food Chem* 48:2430–2437
30. Ordóñez JA, Hierro EM, Bruna JM, de la Hoz L (1999) *Crit Rev Food Sci Nutr* 39:329–367
31. Shahidi F, Rubin LJ, Dsouza LA (1986) *Crit Rev Food Sci Nutr* 24:141–243
32. Talón R, Chastagnac C, Vergnais L, Montel MC, Berdagué JL (1998) *Int J Food Microbiol* 45:143–150
33. Stahnke LH (1994) *Meat Sci* 38:39–53
34. Waade C, Stahnke LH (1997) *Meat Sci* 46:101–114
35. Olesen PT, Stahnke LH, Talón R (2004) *Meat Sci* 68:193–200

## Quantitation of Selected Odor-Active Constituents in Dry Fermented Sausages Prepared with Different Curing Salts

AURORA MARCO, JOSÉ LUIS NAVARRO, AND MÓNICA FLORES\*

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

The odor-active compounds of dry-fermented sausages with added nitrite or nitrate as curing agents were identified by gas chromatography–olfactometry (GC-O) applying the detection frequency (DF) method. The quantification of these compounds in the sausage was determined by multiple headspace solid-phase microextraction (multiple HS-SPME). There were no specific odor-active compounds related to the use of nitrite or nitrate although there were differences in the DF value of several compounds. The nitrite-added sausages presented higher DF values for ethanol, 1-hexanol, propanoic acid, 2-heptenal, and nonanal while the nitrate-added sausages had higher DF values for phenylacetaldehyde and 3-methyl-butanol. Eighteen compounds were quantified by multiple HS-SPME. Most of them were above their air detection thresholds, but only hexanal, heptanal, and 1-octen-3-ol were in a concentration higher than their oil threshold values. These compounds would probably be the main contributors to the aroma of fermented sausages.

**KEYWORDS:** Cured flavor; detection frequency; olfactometry; multiple HS-SPME; nitrate; nitrite; dry fermented sausage

## INTRODUCTION

Aroma is a very important characteristic for the overall quality of dry-fermented sausages. This aroma is completely different from that of thermally processed meats. Generally, the nature and amount of spices (pepper, garlic, and others) used in fermented sausages characterize the aroma (1). However, there are reactions and metabolic pathways that occur in the sausage meat matrix, which play an important role in the overall sausage aroma, as in the case of lipid oxidation and esterification reactions produced by microbial metabolism (2, 3) and even amino acid catabolism and carbohydrate fermentation (4, 5).

The effect of nitrite on the development of the characteristic cured flavor has been widely studied (4, 6) although compounds responsible for this cured flavor have not yet been identified. Furthermore, while in Mediterranean countries nitrite and nitrate are used indistinctly as curing agents, in Northern European countries, only nitrite is used (7). In a previous work (8), a significant effect was reported of either nitrite or nitrate on the hydrolysis and oxidative processes of lipids, volatile compounds generation, and sensory characteristics of fermented sausages.

In the past few years, the use of solid-phase microextraction (SPME) (9) has permitted the isolation and identification of a high number of volatile compounds in fermented sausages (10) and allows one to monitor them throughout the process to study the effect of several factors on their generation (8). However, SPME is not an exhaustive extraction technique and the amount

of extracted compound depends on the equilibrium partition coefficients between the sample and the headspace (HS) volume and also the HS and the fiber coating (11). As with many others HS techniques such as purge and trap, in SPME, the proportion of extracted compounds depends on the experimental conditions such as time, volume, fiber coating, temperature, etc. (12). Therefore, the quantitative profile obtained through these HS techniques cannot be compared with other works obtained under different conditions, as Stahnke (2) previously indicated.

Multiple headspace extraction (MHE) is a procedure originally developed for the quantification of volatile compounds in solid samples (13). The method is based on a stepwise gas extraction at equal time intervals allowing the total area for the compound to be calculated and eliminating the influence of the sample matrix. Multiple HS-SPME has the same aim as MHE, with the benefit of being a solvent-free technique, which provides more sensitivity and selectivity than direct HS sampling (14). The amount of analyte extracted by the fiber is proportional to the initial amount, and it is assumed that the analyte concentration in the sample will decay exponentially with the number of extractions. This method has already been applied in the field of food science to the quantitative determination of volatile compounds in multilayer packaging (14, 15) and red wine (16).

Little information is available on the main odorants responsible for the typical dry-cured aroma in fermented sausages. Gas chromatography (GC) in combination with an olfactometry technique (GC-O) has been used to detect potent aroma-active compounds in fermented sausages (1–3). Only a

\* To whom correspondence should be addressed. Tel: +34.96.3900022. Fax: +34.96.3636301. E-mail: mlflores@iata.csic.es.



few studies have applied flavor dilution techniques to quantify the aroma intensity (17–19). However, there are no reports on other olfactometry techniques used on fermented sausages, despite the fact that it has been demonstrated that the detection frequency (DF) method (20, 21) gives results that are directly related to the aroma intensity (22).

The odor-active compounds present in the HS of fermented sausages have never been quantified as their recovery depends on the extraction technique applied. In this sense, the aim of the present work was to determine the odor-active compounds that contribute to the overall aroma of fermented sausages manufactured with either nitrite or nitrate by the DF method and then to quantitatively determine these compounds by multiple HS-SPME.

## MATERIALS AND METHODS

**Reagents and Standards.** The chemical compounds used for the identification and to prepare the standard solutions were all obtained from Fluka Chemie AG (Buchs, Switzerland) except hexanal (98%), 2,4-heptadienal (*E,E*) (90%), phenylacetaldehyde (90%), 2-octenal (*E*) (94%), nonanal (*≈*97%), 2-nonenal (*E*) (97%), diacetyl (97%), and 2-ethyl-furan (97%), which were obtained from Aldrich (St. Louis, MO).

**Manufacture of Dry Fermented Sausages.** Two batches of sausages, one containing sodium nitrite and another containing potassium nitrate, were manufactured and submitted to slow fermentation, as reported in Marco et al. (8). Dry-fermented sausages were made with lean pork (80%) and pork back fat (20%). The following additives were added in g/kg quantities to the meat mixture: sodium chloride (27), lactose (20), dextrin (20) (food grade quality), sodium caseinate (20), glucose (7), sodium ascorbate (0.5), and either sodium nitrite (0.15) or potassium nitrate (0.3). The meat was ground through a plate of 6 mm diameter holes, vacuum mixed with the remaining ingredients, and inoculated with the starter culture SP-318 (Rhodia Iberia, group Rhône-Poulenc, Madrid, Spain) containing *Lactobacillus sakei*, *Pedococcus pentosaceus*, *Staphylococcus xylophilus*, and *Staphylococcus carnosus*. The mixture was stuffed into collagen casings (Fibran, S.A., Girona, Spain, 75–80 mm diameter), the final weight of each sausage was 500 g. The sausages were kept in a refrigeration chamber at 3–5 °C for 27 h and then dried at 10 °C and 85–75% RH (relative humidity). The total drying time was 44 days. The sausages were then vacuum packed and stored at 4 °C for approximately 2 months, giving a total processing time of 111 days. At the end of the storage stage, three sausages chosen randomly from each batch were used to perform the analyses.

**Extraction and Analysis of Volatile Compounds.** Extraction of HS volatile compounds was performed using a SPME device (Supelco, Bellefonte, PA) with a 85  $\mu$ m carboxen/polydimethylsiloxane StableFlex fiber (CAR/PDMS SF) using the extraction conditions previously optimized for use in fermented sausages by Marco et al. (10). For each experiment, 3 g of minced sausage was weighed into a 10 mL HS vial and sealed with a PTFE-faced silicone septum (Supelco). The vial was left for 1 h in a thermoblock (J. P. Selecta, Barcelona, Spain) at 30 °C for equilibration. The SPME fiber was then exposed to the HS for 3 h while maintaining the sample at 30 °C.

For the identification and confirmation of the volatile compounds, a GC HP 5890 series II (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) equipped with a HP 5972 mass selective detector (Hewlett-Packard) was used with the conditions described by Flores et al. (23). The compounds adsorbed by the fiber were desorbed in the injection port of the GC-mass spectrometry (MS) for 6 min at 240 °C with the purge valve off (splitless mode). The compounds were separated on a DB-624 capillary column (J&W Scientific, 30 m, 0.25 mm i.d., film thickness 1.4  $\mu$ m). The GC oven temperature program began at 38 °C and was held for 13 min, ramped to 110 °C at 3 °C min<sup>-1</sup>, then to 150 °C at 4 °C min<sup>-1</sup>, and to 210 °C at 10 °C min<sup>-1</sup>, and finally, held at 210 °C for 5 min. Mass spectra were obtained by electron impact at 70 eV, and data were acquired across the range of 29–400 amu. The compounds were

identified by comparison with mass spectra from the library database (Nist<sup>98</sup>), Kovats retention index (24), and comparison with authentic standards.

**GC-O.** The compounds adsorbed by the fiber as described above were desorbed in the GC (GC 8000 Top, CE Instruments, Rodano, Milan, Italy) injection port for 6 min at 240 °C in splitless mode, and the split valve was opened after 1 min. The compounds were separated using a DB-624 capillary column (J&W Scientific, 60 m, 0.32 mm i.d., film thickness 1.8  $\mu$ m). The capillary column was split (2:1) into deactivated and uncoated capillary tubing connected with the sniffing port and flame ionization detector (FID), respectively. Helium was used as the carrier gas with a linear velocity of 35.14 cm s<sup>-1</sup>. The initial GC oven temperature was 38 °C and held for 13 min; the temperature was then increased to 100 °C at a rate of 3 °C min<sup>-1</sup> and held for 10 min, then raised to 150 °C at a rate of 3 °C min<sup>-1</sup>, raised to 210 °C at a rate of 5 °C min<sup>-1</sup>, and held for 10 min. The FID detector temperature was set at 240 °C. The sniffing port was equipped with a humidified air make up.

The DF method was used to estimate the aromatic impact of each volatile compound (20, 21) in the different batches. Six trained assessors evaluated the odors from the GC effluent by smelling and recording the retention time and odor descriptors of every perceived odor. A total of 18 assessments per batch were carried out, six individual sniffings for each of the three samples per batch. For each assessment, evaluation of the odor took place over two different time intervals (0–35 and 35–70 min) in order to avoid olfactory fatigue of the assessors. The detection of an odor in the sniffing port by less than three assessors was considered to be noise. The final DF value for each compound was obtained by summation of the 18 sniffings for each batch.

Compounds were identified using the following techniques: comparison with mass spectra and Kovats retention indices (24) obtained for the same samples in the GC-MS, comparison with the retention times of authentic standards injected in the GC-FID, and coincidence of the assessors descriptors with those in the Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients (25).

**Determination of Odor-Active Volatile Compounds by Multiple HS-SPME.** The principle of the MHE procedure was based on stepwise gas extractions at equal time intervals from a single sample (13). The result obtained by this method was an area value that corresponded to the total amount in the sample vial and independently from its distribution between both phases (13). The relation between the area and the corresponding amount of compound could be done either by external or by internal standard method. The external standard had to be prepared and analyzed under the same instrumental conditions; in this case, the vial had to contain the volatile compound only and not the sample matrix. Because no sample matrix had to be present, the vial contained the gas phase only, and consequently, the volatiles were analyzed as a homogeneous gas mixture in the vial (13). In this analysis, a few microliters of the volatile compounds were injected into the empty vial as a solution in a volatile solvent. In this system, to compensate in the calibration vial the missing sample volume, the addition of a similar volume of an inert material such as glass beads was recommended (13).

Multiple HS-SPME was based on the same principle except for the use of SPME for volatile compound extraction (14). In this way, after successive extractions, the concentration of analyte decayed exponentially and the total peak area ( $A_t$ ) corresponding to an exhaustive extraction of the analyte was calculated from the following (14):

$$A_t = \frac{A_1}{1 - e^{-k}}$$
(1)

where  $A_1$  is the peak area in the first extraction and  $k$  is the slope obtained when representing the natural logarithm of the peak area vs the number of extractions minus one.

To calculate the initial mass of the analyte in the sample, a calibration by external standard method was performed. An external standard was prepared and analyzed under the same instrumental conditions.

Finally, the initial mass of the analyte in the sample ( $m_0$ ) was calculated as follows:

$$m_0 = \frac{A_s \cdot m_s}{A_{is}} \quad (2)$$

where  $A_s$  and  $A_{is}$  are the total area of compound in the sample and in the external standard, respectively, calculated using eq 1.  $m_s$  is the initial mass of the external standard added. All of the details, as well as the conditions that must be fulfilled to perform multiple HS-SPME, have been reviewed by Ezquerro et al. (14).

For the extraction procedure, a sausage slice was diced and frozen in liquid nitrogen for mincing, so that the sausage could be finely pulverized. One gram of the minced sausage was weighed in a 30 mL screw top glass vial with 15 mL of double-distilled water added together with 15  $\mu$ L of a 5% solution (w/v) of butylated hydroxytoluene (BHT) in methanol to avoid lipid oxidation. The sample was then homogenized for 1 min in 20 s pulses, using a Polytron PT 1200 (Kinematica AG, Switzerland). One milliliter of the homogenate was placed in a 10 mL HS vial, sealed with a PTFE-faced silicone septum (Supelco) with 0.5 g of NaCl, and equilibrated at 30 °C for 1 h. The sample was then extracted four consecutive times by exposing the SPME fiber CAR/PDMS SF to the HS for 1 h at 30 °C for each extraction. This procedure was done per triplicate on each batch.

After each extraction, the fiber was desorbed in the GC injection port of the GC-MS using the same conditions described above. Data were acquired in selected ion monitoring (SIM) mode using a specific ion for each of the quantified compounds (see ions in Table 1).

For the external standard method used for quantification, stock standard solutions of pure compounds were prepared in methanol. A mixture of these stock solutions was prepared in methanol, then the mixture was diluted several times, and the several dilutions were analyzed by multiple HS-SPME using the same procedure applied to the sample. The concentration of the external standard shown in Table 1 was the one with the highest correlation coefficient in the exponential decay. The concentration of the external standard in Table 1 and the slope obtained in the exponential decay were used for the quantification of the compound in the samples using eq 2. The multiple HS-SPME procedure was applied using similar conditions as for the sausage homogenates. In this case, 5  $\mu$ L of the standard solution was added to 1 mL (1.4 g) of glass beads present in the 10 mL HS vial. The glass beads were used to compensate in the calibration vial for the missing sample volume (13). The same extraction procedure used in the sample homogenate was also applied to the standard calibration vial.

**Statistical Analysis.** The effect of the different curing agents in the quantified odor-active compounds was tested by analysis of variance using the statistic software Statgraphics plus (version 5.1).

## RESULTS

**GC-O Analysis.** Ninety-seven volatile compounds were detected by SPME-GC-MS. From all of these compounds, it is not clear which of them actually contribute to the aroma of dry-fermented sausages and are present in quantities above their detection thresholds.

Among the 97 compounds detected, 55 different aroma-active zones were described in the HS of the dry-fermented sausages (see Table 2). Of them, 26 compounds were identified by matching mass spectra, Kovats indices of an authentic standard, and odor descriptions from bibliographies; another 18 were identified by mass spectra and Kovats indices of an authentic standard; only one compound was tentatively identified by mass spectrum; and finally, 10 compounds were not identified. Of the identified odor-active compounds, 15 were aldehydes, eight were alcohols, seven were organic acids, seven were ketones, six were esters, and two were furans. All of these compounds had already been detected in the HS of dry-fermented sausages (8, 10).

From these 55 odor-active compounds, only 13 presented DF values higher than 17 in at least one of the batches (see Figure 1). Five of these were most likely derived from lipid oxidation: pentanal, hexanal, 2-pentyl-furan, octanal, and 2-nonenal, which

**Table 1.** Ions Used for Quantification in the SIM Method and Concentration of the Standard Solutions Prepared for the External Standard Calibration

KI <sup>a</sup>	compound	quantification ion (m/z)	standard concn ( $\mu$ g/ $\mu$ L)
466	acelone	43	a
473	methanethiol	47	
603	butanal	72	
635	ethyl acetate	43	0.078
697	acetic acid	60	
727	2-pentanone	43	0.772
735	pentanal	58	0.075
730	2,3-pentanedione	57	1.000
824	1-pentanol	55	
829	hexanal	56	1.608
854	2-methyl-propanoic	43	
878	butanoic acid	60	
902	2-hexenal (E)	41	0.006
920	1-hexanol	56	1.600
936	2-heptanone	43	0.006
941	heptanal	70	0.018
970	methional	48	
1016	2-heptenal (E)	41	0.007
1025	1-octen-3-ol	57	1.640
1035	octanal	41	0.007
1057	2,4-heptadienal	81	0.007
1073	2,4-heptadienal (E,E)	81	0.007
1114	phenylacetaldehyde	91	0.006
1116	2-octenal (E)	41	0.033
1128	1-octanol	41	
1140	2-nonanone	58	0.006
1151	nonanal	98	0.013
1199	phenylethyl alcohol	91	
1226	2-nonenal (E)	41	0.006
1289	octanoic acid	60	

<sup>a</sup> Standard solution not prepared as this compound did not follow an exponential decay in the sausage sample. <sup>b</sup> Kovats index of the compounds injected in the GC-MS using a DB-624 capillary column (J&W Scientific; 30 m, 0.25 mm i.d. and film thickness 1.4  $\mu$ m).

contributed with herbal type aromatic notes (Table 2); one compound was derived from lipid  $\beta$ -oxidation, 1-octen-3-ol (mushroom odor); two compounds were derived from carbohydrate fermentation, acetic acid (vinegar odor) and butanoic acid (cheese odor); two compounds were derived from amino acid catabolism, methanethiol (rotten eggs odor) and 3-methylbutanoic acid (cheese and feet odor); and three were esters, ethyl butanoate, ethyl 2-methylpropanoate, and ethyl pentanoate, which were always described as fruity, mainly strawberry notes (Table 2).

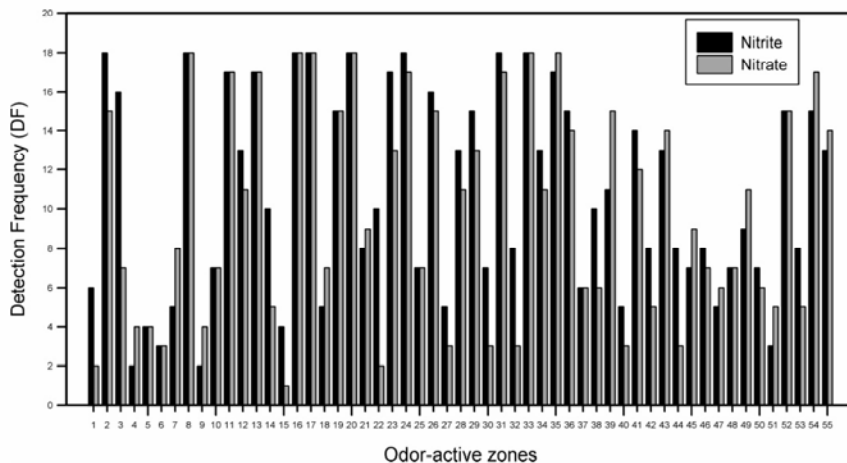
GC-O showed other aroma-active zones (17 compounds) that also contributed to the aroma of fermented sausages with DF values around 10 (Figure 1). This means that the assessors detected these compounds at least half of the times that they appeared. Five of these compounds came from lipid autooxidation: propanoic acid, 1-hexanol, heptanal, 2,4-heptadienal, and octanoic acid; two came from lipid  $\beta$ -oxidation, 2,3-pentanedione and 2-nonanone; one came from carbohydrate fermentation, ethanol; two came from amino acid catabolism, methional and phenylacetaldehyde; two were esters, ethyl 2-methylbutanoate and ethyl hexanoate; limonene was a contaminant from food-stuff; and finally, there were four unidentified compounds (two of which had a nutty odor).

It is worth pointing out that the assessors identified the presence of nine odor-active compounds as meat-related flavors (Table 2). In order of elution, the volatile compounds responsible for these aromas were 3-methylbutanal (rancid, dry-cured ham), 1-pentanol (roasted, roasted meat), 2-hexenal (salty meat, dry-cured ham), heptanal (citrus, soap, rancid cured ham), 2-heptanol (plastic, pork scratchings), methional (brothy, rancid),

Table 2. Odor-Active Compounds Identified in the HS of Slow-Fermented Sausages with Different Curing Salts and Quantified by Multiple HS-SPME

N <sup>a</sup>	GC-O descriptor	K <sub>1000</sub> <sup>b</sup>	compound	K <sub>100</sub> <sup>c</sup>	R <sup>d</sup>	threshold range (mg/kg) <sup>e</sup>		ref	quantity (mg/kg) <sup>f</sup>			
						air	oils		nitrite	nitrate	p <sup>g</sup>	
1	acetone, alcohol	466	acetone	470	a	1–830	100–1768					
2	rotten eggs, cauliflower	473	methanethiol	473	a	0.0002–0.04						
3	bread dough, yeast	523	ethanol	520	b	0.64–840	50–500					
4	sweet, snacks	803	butanal	802	b	0.0084–8.8	0.15					
5	cheese, snacks	833	diacetyl (2,3-butane-dione)	833	b	0.005–0.02	0.0045–0.01	2, 3, 18, 19				
6	fruity, toffees	838	ethyl acetate	834	a	0.34–823	10–100		18, 19	1.30 ± 0.10	0.17 ± 0.03	0.0001
7	rancid, dry cured ham	894	3-methylbutanal	891	b	0.002–0.004	0.013–13	1–3				
8	vinegar	707	acetic acid	707	a	0.025–25	0.124–0.75	3, 18, 19				
9	toasted, garlic	718	2-ethylfuran	719	b		8					
10	roasted, sweet	730	2-pentanone	730	b	6.7–30			2	1.00 ± 0.20	0.98 ± 0.04	ns
11	fresh cut grass, rancid	737	pentanal	737	a	0.12–17.5				4.4 ± 0.6	2.1 ± 0.3	ns
12	butter, cheese	743	2,3-pentanedione	740	a	0.01–0.06			2, 3	17.0 ± 7.0	9.6 ± 0.3	ns
13	strawberry	789	ethyl 2-methylpropanoate	785	a	0.0003–0.038	0.0012	2, 3, 17				
14	cheese	820	propanoic acid	818	b	0.003–3	3.84	3, 18, 19				
15	roasted, roasted meat	824	1-pentanol	820	b	0.02–5	0.85					
16	fresh cut grass, rancid	830	hexanal	830	a	0.02–0.33	0.032–0.2	1–3, 17–19		8.5 ± 1.0	9.5 ± 0.3	ns
17	strawberry	841	ethyl butanoate	841	a	0.0027–0.2	0.028	1–3, 18, 19				
18	fatty, savory snacks	854	2-methylpropanoic acid	853	a	0.005–0.24	0.755	3, 18				
19	strawberry	875	ethyl 2-methylbutanoate	878	a	0.0008–0.01	0.00028	2, 3, 17, 18				
20	cheese	878	butanoic acid	881	a	0.0004–0.04	0.109–0.205	2, 3, 18, 19				
21	salty meat, dry cured ham	902	2-hexenal (E)	903	b	0.05–1.8	0.85	3		0.08 ± 0.02	0.09 ± 0.01	ns
22	green grass, plastic	920	1-hexanol	918	a	0.04–4	0.4			0.14 ± 0.01	0.12 ± 0.02	ns
23	strawberry	927	ethyl pentanoate	924	a	0.0003–0.33		2, 3				
24	cheese, feet, dirty socks	929	3-methylbutanoic acid	928	a	0.00022–0.014	0.022–0.066	2, 3, 18, 19				
25	medicinal, fruity	935	2-heptanone	931	a	0.045–3.3	1.5–392	3		0.55 ± 0.009	0.46 ± 0.002	ns
26	citrus, soap, rancid cured ham	941	heptanal	940	b	0.08–0.26	0.25	1–3		0.6 ± 0.2	1.0 ± 0.3	ns
27	plastic, pork scatchings	944	2-heptanol	944	b	0.1						
28	roasted nuts, fried snacks	966	unknown 1									
29	meat broth, rancid, savory snack	970	methional (3-methylthio-propanal)	970	a	0.00006–0.06	0.0002–0.2	17				
30	rotten, strawberry, sweet	984	unknown 2									
31	onions, savory, rancid	1011	2-pentylfuran	c		0.27	2					
32	rancid, dirty	1016	2-heptenal (E)	1014	b	0.034–2.8	1.5			0.3 ± 0.1	1.3 ± 0.4	ns
33	mushroom	1025	1-octen-3-ol	1028	a	0.012–0.11	0.034–0.9			0.63 ± 0.04	0.75 ± 0.07	ns
34	sweet, fruity, cherry	1031	ethyl hexanoate	1029	a	0.003–0.09	0.04	3, 17				
35	geranium, herbal, floral	1036	octanal	1037	a	0.005–0.02		2, 3, 18		0.6 ± 0.2	1.3 ± 0.1	0.0203
36	citrus, orange	1051	limonene	1048	a			1, 18, 19				
37	roasted, butter, soap	1057	2,4-heptadienal	1060	a							
38	cooked meat, nutty	1081	2,4-heptadienal (E,E) sum of 2,4-heptadienal isomers	1079	a	0.057	10			0.11 ± 0.04	0.25 ± 0.06	0.0258
39	roses	1114	phenylacetaldehyde	1112	b	0.0006–0.002	22			0.16 ± 0.04	0.43 ± 0.06	0.0008
40	dry cured ham, dry cured sausage	1116	2-octenal (E)	1116	b	0.009–0.25	7	3, 17		0.35 ± 0.06	0.40 ± 0.10	ns
41	rancid nuts, woody	1121	unknown 3									
42	mushroom	1128	1-octanol	1128	a	0.05–0.7		f				
43	roasted, burnt	1140	2-nonanone	1140	b	0.075–6.5		2, 18, 19		0.10 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.0000
44	plastic, soap	1151	nonanal	1151	b	0.005–0.23	1	2, 3, 17		0.8 ± 0.4	1.2 ± 0.3	ns
45	waxy, smoke	1152	unknown 4									
46	green, fresh	1156	unknown 5									
47	rotten cheese, rotten orange	1177	unknown 6									
48	rancid, dry cured ham	1178	heptanoic acid	1177	a	0.022–2.6						
49	roasted nuts, fried snacks	1180	unknown 7									
50	burnt plastic, stable	1197	unknown 8									
51	vainery	1199	phenylethyl alcohol	1197	b	0.005–0.16		18				
52	plastic, salty, rancid	1207	unknown 9									
53	herbal, crushed leaves	1223	unknown 10									
54	cucumbers, herbal, woody	1226	2-nonenal (E)	1224	a	0.0001–0.025	0.9	2, 3		0.07 ± 0.02	0.35 ± 0.08	0.0074
55	rancid, woody	1289	octanoic acid	1283	b	0.00006–0.5	161					

<sup>a</sup> Number of the aroma-active zones in order of chromatographic elution. <sup>b</sup> Kovats index of the aroma-active zones eluted from the GC-FID using a DB-624 capillary column (J&W Scientific, 80 m, 0.32 mm ID, and 1.8 µm film thickness). <sup>c</sup> Kovats index of the authentic standards injected in the GC-FID with the same column as above. <sup>d</sup> R, reliability of identification; a, identification by mass spectrum, coincidence with the KI of an authentic standard and by coincidence with odor description (according to cited bibliography or reference (25)); b, identification by mass spectrum and by coincidence with the KI of an authentic standard; and c, tentatively identified by mass spectrum. <sup>e</sup> Threshold values in air and vegetable oils, as according to ref. 31. <sup>f</sup> Cited references. <sup>g</sup> All of the results are given as the mean of three samples with the standard deviation. <sup>h</sup> p value of analysis of variance.



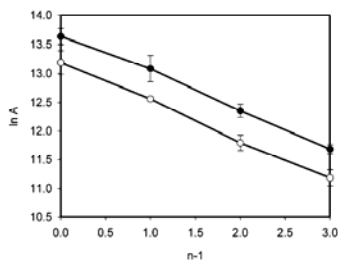
**Figure 1.** Aromagram from the HS of slow-fermented sausages processed using nitrate or nitrite. The DF values were obtained by six assessors and three sausages per batch. The numbers on the x-axis correspond to the aroma descriptors indicated in Table 2.

2,4-heptadienal (*E,E*) (cooked meat, nutty), 2-octenal (cured, dry ham, dry sausage), and heptanoic acid (rancid, dry-cured ham).

The use of the DF method did not show any difference in the odor-active compound profile between nitrite- or nitrate-added batches but only differences in the ratio of some of them. Thirteen compounds presented higher DF values in nitrite-added sausages. Among them, five presented differences higher than five DF units: ethanol, 1-hexanol, propanoic acid, 2-heptenal, and nonanal. Another eight showed differences of three or four DF units: acetone, methanethiol, ethyl pentanoate, 1-pentanol, 2,4-heptadienal (*E,E*), 1-octanol, and unknown 10. On the other hand, in the nitrate-added sausages, phenylacetaldehyde and 3-methylbutanal were four and three DF units higher, respectively.

**Multiple HS-SPME.** After the identification of the odor-active compounds in the HS of fermented sausages, multiple HS-SPME was applied to quantify them. To perform this technique, it is necessary to start with very small amounts of sample, so that the exponential decay of the peak area can be seen from the beginning of the experience (14). Dry-fermented sausages present a very heterogeneous matrix in contrast to wine or packaging. Therefore, weighing a very small amount of minced sausage would not give a representative sample. To avoid this, a minimum sample weight of 1 g was chosen and different dilutions in water were tried. A dilution of 1 g of minced sausage with 15 mL of water was chosen because it presented the maximum number of compounds with exponential area decay. To this dilution, NaCl in saturating amounts was added to promote the salting-out of the compounds to the HS. Also, BHT was added to avoid lipid oxidation phenomena, as from previous experiences during the optimization (data not shown), it was observed that the amount of aldehydes increased during successive extractions.

Area quantification was done using the SIM method to increase the sensitivity, as the yield of volatile compounds extracted was very low due to the low quantity of sausage used



**Figure 2.** Exponential decay of ethyl acetate area (*A*) in the successive extractions (*n*) of slow-fermented sausages. Nitrite added sausage, ●; nitrate added sausage, ○.

in the extraction and to the fact that the SPME fiber was exposed for only 1 h. Therefore, many of the volatile compounds found in the HS of sausages in the GC-O by extraction with the SPME for 3 h were not detected by multiple HS-SPME. Thus, from the 55 odor-active compounds detected by GC-O, only 30 of them were detected in the multiple HS-SPME as indicated in Table 1.

Only 18 odor-active compounds presented exponential area decay when multiple HS-SPME was applied. Because an exponential decay of the peak area with the number of extractions is necessary to quantify the analytes (see Figure 2), the linearity of the plots for each odor compound was studied for sausage batches and standards. Table 3 shows the slopes and correlation coefficients ( $R^2$ ) for each compound with at least a 99% confidence level in the sausages and standards. The other compounds not shown in Table 3 are those for which the area increased during extraction or the correlation coefficients were low; therefore, they cannot be quantified by multiple HS-SPME under the optimized conditions.

**Table 3.** Correlation Coefficient of the Exponential Decay of the Peak Areas Obtained by Multiple HS-SPME from Slow-Fermented Sausages with Different Curing Salts and Standard Solutions

N <sup>a</sup>	compound	nitrite		nitrate		standard	
		slope	R <sup>2</sup>	slope	R <sup>2</sup>	slope	R <sup>2</sup>
6	ethyl acetate	-0.6586	0.9944	-0.6794	0.9935	-0.1226	0.9126
10	2-pentanone	-0.2197	0.9249	-0.2080	0.9170	-0.1011	0.9545
11	pentanal	-0.1463	0.9637	-0.2236	0.9784	-0.0535	0.8675
12	2,3-pentanedione	-0.0959	0.9104	-0.1429	0.9676	-0.2254	0.9264
16	hexanal	-0.3154	0.9105	-0.3553	0.9714	-0.6609	0.9418
21	2-hexenal	-0.3327	0.8851	-0.2850	0.9087	-0.5040	0.9706
22	1-hexanol	-0.3522	0.9848	-0.3229	0.9957	-1.1966	0.8424
25	2-heptanone	-0.3900	0.8870	-0.4589	0.9564	-0.2439	0.7978
26	heptanal	-0.2610	0.9230	-0.2012	0.8364	-0.1958	0.7366
32	2-heptenal	-0.2682	0.9025	-0.1683	0.7293	-0.6816	0.9067
33	1-octen-3-ol	-0.2607	0.9260	-0.2894	0.9802	-2.3968	0.8646
35	octanal	-0.2709	0.9386	-0.1910	0.8356	-0.2598	0.7674
37 + 38	sum of 2,4-heptadienal isomers	-0.1967	0.9541	-0.1080	0.9479	-1.9211	0.8662
39	phenylacetaldehyde	-0.1554	0.9855	-0.1359	0.9779	-0.2436	0.6990
40	2-octenal	-0.2495	0.9443	-0.1676	0.9178	-0.7251	0.9039
43	2-nonanone	-0.3584	0.9077	-0.3343	0.9124	-0.6573	0.9345
44	nonanal	-0.2267	0.9680	-0.1727	0.8573	-0.3639	0.7730
54	2-nonenal	-0.2590	0.9021	-0.0385	0.7919	-1.0813	0.9698

<sup>a</sup> Number of compounds in order of chromatographic elution that correspond to the numbers indicated in Table 2.

The proposed multiple HS-SPME method was applied to the nitrite- and nitrate-added sausages per triplicate, and the quantification of the 18 odor compounds is shown in Table 2. Only a few of them presented significant differences between batches. The content of ethyl acetate and 2-nonanone was higher in the nitrite-added batch, while octanal, 2,4-heptadienal isomers, phenylacetaldehyde, and 2-nonenal were higher in the nitrate-added sausage.

With regards to the detection threshold of the 18 odor-active compounds quantified, most of them were above their air detection threshold; therefore, they could contribute significantly to the aroma of fermented sausages. Other compounds like 2-pentanone, ethyl acetate, and 2-heptanone showed concentrations below or close to their air threshold values; therefore, their contribution to the overall aroma would be lower. Taken into account that dry-fermented sausages contain a high percentage of fat, the oil thresholds were also considered; however, only a few of them were available. In this case, only hexanal, heptanal, and 1-octen-3-ol showed a quantified concentration higher than the oil thresholds. Probably these compounds would be the main contributors to the aroma of fermented sausages.

## DISCUSSION

Around 300 different volatile compounds have been isolated from the HS of dry-fermented sausages using different techniques (26–28). In this work, 97 volatile compounds were detected although only 55 were detected as odor-active compounds by the DF method. As previously stated, the aroma of fermented sausage has been evaluated by GC-O using aroma extract dilution analysis (17–19). The most potent odorants were hexanal, methional, and 2-acetyl-pyrroline (17). On the other hand, without taking into consideration the contribution of aroma compounds derived from spices, the most potent odorants were 3-methyl-butanoic acid, ethyl butanoate, propyl 3-methyl butanoate, and acetic acid (18, 19). However, because of the different regional processing conditions in Spanish-fermented sausages, the main potent odorants were 2,3-butanedione, 3-methyl-butanoic acid, ethyl propanoate, 2-phenylethanol, and acetic acid (18). In accordance with our results, several compounds such as hexanal, 3-methyl-butanoic acid, and acetic acid have generally been reported as potent odorants in

fermented sausages, and probably, they are essential contributors to the overall dry cured aroma, although the contribution of other esters, aldehydes, and acid compounds should be considered.

Generally, an essential role in the dry fermented sausages flavor has been attributed to the branched chain aldehydes (29). In contrast, GC-O studies show that other compounds make a greater contribution to the cured character of dry-fermented sausages (17–19), as was also seen in the present study.

In a previous work, Marco et al. (8) observed that the addition of nitrate or nitrite to slow-fermented sausages produced a significant preference for the aroma of the nitrate-added sausages when compared with the nitrite-added sausages. The DF method was applied to both sausage batches in order to determine the possible differences in aroma-active compounds between them (Figure 1). However, all 55 odor-active compounds were detected simultaneously in both sausage batches. That is, no specific compound was responsible for the differences in aroma due to the curing agent, as was also indicated by Stahnke (3).

The results obtained from the multiple HS-SPME are not completely in accordance with those obtained by the DF method; only the higher phenylacetaldehyde concentration in the nitrate-added batch was detected by both DF and multiple HS-SPME methods. To relate the concentrations determined by multiple HS-SPME with the DF values, the threshold of the compounds should be taken into consideration. However, dry-fermented sausage is a complex matrix with a high content in proteins and fat; therefore, not only the air thresholds but also the oils thresholds that are more similar to the matrix should be taken into account. The presence of oil results in a significant increase of the threshold value as seen in Table 2. In general, those compounds with low thresholds and present at concentrations above their oil threshold should be frequently detected as in the case of 1-octen-3-ol, hexanal, and heptanal. By contrast, odor compounds present at high concentrations but with high detection threshold or compounds that have low DF but are present in low quantities would not be able to give an aromatic sensation, such as ethyl acetate and 2-pentanone (Figure 1).

It should be taken into account that using multiple HS-SPME, the matrix effect is avoided (13, 14); therefore, the concentration detected by this method will be present not only in the HS but

also in the solid matrix sample. In contrast, during the olfactometry analysis, the volatile compounds were extracted from the HS of the sausage and the profile and proportion of these compounds depend on many factors, among them, the partition coefficients between the matrix sample and the HS. Therefore, the comparison between these methods, SPME-GC-O, and multiple HS-SPME cannot be done directly. Furthermore, the results obtained by applying the multiple HS-SPME give new data about the concentration of the odor-active compounds present in a slow-fermented sausage avoiding the matrix effect.

In a previous work (8), the effect of nitrite and nitrate on the sample matrix was reported. In this work, a higher concentration of triglycerides was found in the samples with added nitrate. Taking into consideration that triglycerides constitute 92% of the total lipid concentration (8) and that the volatile compounds have a higher solubility in fat (30), the lower concentration of triglycerides in the sample with added nitrite would favor the release of volatile compounds to the HS. Therefore, a higher proportion of triglycerides in the nitrate-added sausages can dissolve a higher proportion of volatile compounds. This would be the reason for finding a higher volatile compound concentration by multiple HS-SPME in some volatile compounds in the nitrate-added sausages.

In conclusion, this study has shown that the qualitative aroma profile of nitrite- and nitrate-fermented sausages is very similar. The fermented sausage aroma is very complex, and 13 compounds were the main contributors as seen by their high DF values. However, only some of these compounds were quantified by multiple HS-SPME and their concentrations are not comparable with their DF values. This is due to the matrix (lipid-protein) effect, which affects the proportion of these compounds in the HS. Therefore, the concentration of volatile compounds obtained by multiple HS-SPME may not be sufficient to determine the sensory acceptance of dry-fermented sausages.

#### ABBREVIATIONS USED

BHT, butylated hydroxytoluene; CAR/PDMS SF, carboxen/polydimethylsiloxane StableFlex; DF, detection frequency; GC, gas chromatograph; GC-O, gas chromatography-olfactometry; HS, headspace; MS, mass spectrometry; MHE, multiple headspace extraction; SPME, solid-phase microextraction.

#### LITERATURE CITED

- Meynier, A.; Novelli, E.; Chizzolini, R.; Zanardi, E.; Gandemer, G. Volatile compounds of commercial Milano salami. *Meat Sci.* **1999**, *51*, 175–183.
- Stahnke, L. H. Aroma components from dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosum*. *Meat Sci.* **1994**, *35*, 39–53.
- Stahnke, L. H. Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosum* at different temperatures and with different ingredient levels. III. Sensory evaluation. *Meat Sci.* **1995**, *41*, 211–223.
- Ordóñez, J. A.; Hierro, E. M.; Bruna, J. M.; de la Hoz, L. Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1999**, *39*, 329–367.
- Toldrà, F.; Sanz, Y.; Flores, M. Meat fermentation technology. In *Meat Science and Applications*; Hui, Y. H., Nip, W. K., Rogers, R. W., Owen, A. Y., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2001; pp 537–561.
- Ramnarathnam, N. The flavour of cured meat. In *Flavour of Meat, Meat Products and Seafoods*; Shahidi, F., Ed.; Chapman & Hall: London, United Kingdom, 1998; pp 290–319.
- Flores, J. Mediterranean vs northern European meat products. Processing technologies and main differences. *Food Chem.* **1997**, *59*, 505–510.
- Marco, A.; Navarro, J. L.; Flores, M. The influence of nitrite and nitrate on microbial, chemical and sensory parameters of slow dry fermented sausage. *Meat Sci.* **2006**, *73*, 660–673.
- Pawliszyn, J. *Solid Phase Microextraction—Theory and Practice*; Wiley-VCH: New York, 1997.
- Marco, A.; Navarro, J. L.; Flores, M. Volatile compounds of dry-fermented sausages as affected by solid-phase microextraction (SPME). *Food Chem.* **2004**, *84*, 633–641.
- Zhang, Z.; Pawliszyn, J. Headspace solid-phase microextraction. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1843–1852.
- Toldrà, F.; Flores, M. Analysis of meat quality. In *Handbook of Food Analysis*, 2nd ed.; Nollet, L. M. L., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2004; Vol. 3, pp 1961–1977.
- Kolb, B. Multiple headspace extraction—A procedure for eliminating the influence of the sample matrix in quantitative headspace gas-chromatography. *Chromatographia* **1982**, *15*, 587–594.
- Ezquerro, O.; Pons, B.; Tena, M. T. Multiple headspace solid-phase microextraction for the quantitative determination of volatile organic compounds in multilayer packagings. *J. Chromatogr. A* **2003**, *999*, 155–164.
- Ezquerro, O.; Pons, B.; Tena, M. T. Evaluation of multiple solid-phase microextraction as a technique to remove the matrix effect in packaging analysis for determination of volatile organic compounds. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1020*, 189–197.
- Martinez-Urunuela, A.; Gonzalez-Saiz, J. M.; Pizarro, C. Optimisation of a headspace solid-phase microextraction method for the direct determination of chloroanisoles related to cork taint in red wine. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1056*, 49–56.
- Blank, I.; Devaud, S.; Fay, L. B.; Cerny, C.; Steiner, M.; Zurbruggen, B. Odor-active compounds of dry-cured meat: Italian-type salami and Parma ham. In *Aroma-Active Compounds in Foods. Chemistry and Sensory Properties*; Takooka, G. R., Güntert, M., Engel, K. H., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, 2001; pp 9–20.
- Schmidt, S.; Berger, R. G. Aroma compounds in fermented sausages of different origins. *LWT-Food Sci. Technol.* **1998**, *31*, 559–567.
- Schmidt, S.; Berger, R. G. Microbially formed aroma compounds during the maturation of dry fermented sausage (salami). *Adv. Food Sci.* **1998**, *20*, 144–152.
- Linssen, J. P. H.; Janssens, J. L. G. M.; Rozen, J. P.; Posthumus, M. A. Combined gas chromatography and sniffing port analysis of volatile compounds of mineral water packed in polyethylene laminated packages. *Food Chem.* **1993**, *46*, 367–371.
- Pollien, P.; Ott, A.; Montigon, F.; Baumgartner, M.; Muñoz-Box, R.; Chaintreau, A. Hyphenated headspace-gas chromatography-sniffing technique: Screening of impact odorants and quantitative aromagram comparisons. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2630–2637.
- van Ruth, S. M. Methods for gas chromatography-olfactometry: A review. *Biomol. Eng.* **2001**, *17*, 127–128.
- Flores, M.; Durá, M. A.; Marco, A.; Toldrà, F. Effect of *Debaryomyces* spp. on aroma formation and sensory quality of dry-fermented sausages. *Meat Sci.* **2004**, *68*, 439–446.
- Kovats, E. Sz. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. In *Advances in Chromatography*; Giddings, J. C., Keller, R. A., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1965.
- Burdock, G. A. *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*, 4th ed.; CRC Press Inc.: Boca Raton, Florida, 2002.
- Berdagué, J. L.; Montel, P.; Montel, M. C.; Talón, R. Effects of starter cultures on the formation of flavour compounds in dry sausage. *Meat Sci.* **1993**, *35*, 275–287.
- Berger, R. G.; Macck, C.; German, J. B.; Shibamoto, T. Isolation and identification of dry salami volatiles. *J. Food Sci.* **1990**, *55*, 1239–1242.

- (28) Viallón, C.; Berdagué, J. L.; Montel, M. C.; Talón, R.; Martín, J. F.; Kondjoyan, N.; Denoyer, C. The effect of stage of ripening and packaging on volatile content and flavour of dry sausage. *Food Res. Int.* **1996**, *29*, 667–674.
- (29) Stahnke, L. H. Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylophilus* at different temperatures and with different ingredient levels. II. Volatile components. *Meat Sci.* **1995**, *41*, 193–209.
- (30) Mottram, D. S. Meat. In *Volatile Compounds in Food and Beverages*; Maarse, H., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1991; pp 107–177.

- (31) van Gemert, L. J.; Nettenbreijer, A. *Compilation of Odour Threshold Values in Air, Water and Other Media*, BACIS: Zeist, The Netherlands, 2004.

---

Received for review November 6, 2006. Revised manuscript received February 12, 2007. Accepted February 17, 2007. Financial support from Grants AGL2005-00713 (MEC, Spain) and GV05/067 (Generalitat Valenciana, Spain) are fully acknowledged. The scholarship (B3P program) from CSIC/MEC to A.M. is also acknowledged.

JP0631880