



Qualitat i estabilitat dels embotits derivats del porc de producció ecològica

Núria Magrinyà Navarro

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE NUTRICIÓ I BROMATOLOGIA

**QUALITAT I ESTABILITAT DELS EMBOTITS DERIVATS DEL
PORC DE PRODUCCIÓ ECOLÒGICA**

Núria Magrinyà Navarro

2013



FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE NUTRICIÓ I BROMATOLOGIA

PROGRAMA DE DOCTORAT D'ALIMENTACIÓ I NUTRICIÓ

**QUALITAT I ESTABILITAT DELS EMBOTITS DERIVATS DEL
PORC DE PRODUCCIÓ ECOLÒGICA**

Memòria presentada per

Núria Magrinyà Navarro

per optar al títol de doctor per la Universitat de Barcelona

Els directors,

Dr. Francesc Guardiola Ibarz

Dr. Ricard Bou Novensà

La doctoranda,

Núria Magrinyà Navarro

Barcelona, Octubre 2013

Aquest treball ha estat finançat per:

- El “Programa Nacional de Investigación-Programa de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias” (Ministerio de Educación y Ciencia, Espanya) mitjançant la concessió del projecte d’investigació AGL2007-63819/GAN.
- El “Programa Nacional de Profesorado Universitario” (Ministerio de Educación y Ciencia, Espanya) mitjançant la concessió d’una “Beca de Formación de Profesorado Universitario” (FPU) pel període comprès entre Octubre del 2008 i Setembre de 2012.
- El “Programa Nacional de Profesorado Universitario” (Ministerio de Educación, Espanya) mitjançant la concessió d’un ajut per a trasllats temporals a l’estranger per a becaris FPU, realitzada entre setembre de 2011 i abril de 2012 al “Department of Food Science and Biotechnology”, Universität Hohenheim, Stuttgart, Alemanya.

*A la meua família
i, especialment, al meu pare*

Sou molts als qui voldria agrair aquest camí, molts que en petita o gran mesura heu contribuït a que arribi fins on sóc avui. La veritat és que aquesta tesi sense vosaltres ni tindria sentit ni molt probablement s'hagués fet o acabat. Així que us mereixeu un apartat, tot i que curt, de gran valor.

Primerament donar les gràcies als meus directors de tesi, Dr. Francesc Guardiola i Dr. Ricard Bou, per tot el temps que m'han dedicat, els consells, la seva comprensió i manera de fer. Al Francesc, per les classes de bromatologia, per la introducció i el posterior aprofundiment a la ciència exacta i de qualitat, per l'oportunitat, per aquella trucada... (crec que sense ella no estaria ara aquí). Especialment al Ricard, per la classe de validació de mètodes analítics, per totes les hores compartides (botifarres i altres projectes), discussions "apimpinellades", misteris analítics sense resoldre... la veritat és que la llista és interminable, he après moltíssim al vostre costat, moltes gràcies als dos.

També agrair al Dr. Rafael Codony l'oportunitat de formar part del grup, la seva transferència de coneixement i els seus cops de mà en alguna que altra preparació de mostres. Al Dr. Boatella per introduir-me al món dels Aliments al CESNID (em va agradar i molt, ja veus que m'hi he quedat) i per tot el que m'ha ensenyat, inclosa la definició de dietista de la RAE. Agrair també a la Dra. Maria Izquierdo la seva dedicació absoluta a resoldre papers i burocràcia entre secretaria i el programa de doctorat, sense tu això seria sens dubte una de les dotze proves d'Hèrcules. A la Dra. Magdalena Rafecas i als altres professors del departament que d'alguna manera o altre segur que han format part de la meva formació. Per últim, donar les gràcies a la Dra. Núria Rius per ajudar-me amb la microbiologia i estar sempre disponible per qualsevol dubte, i a la Dra. Maribel Farfán per introduir-me, ja fa un temps, al món de la recerca.

Gracias Ana Isabel por tus consejos en la sala de cromatografía, se aprende mucho a tu lado. Gracias Fernando por tus ayudas técnicas cuando más se necesitan. I a tu, Montse, per ajudar en les compres i portar-les en ordre i al dia. Gràcies al personal de la neteja que ha mantingut el nostre "cau" en condicions. Especialmente a ti Ana por cuidarnos durante estos años, por ser la mamá en las horas de trabajo y ponernos jabón en la botella a escondidas para que no confundiéramos nuestras manos con el estropajo de lavar los cacharros.

“Seres del cuarto oscuro”, moltes gràcies. Sense vosaltres no hagués estat el mateix. Jonathan, a part de ser un científic impecable, tens un art especial per fer-me riure, moments com “cangrena”, “así me tiro una hora” o “els botons apm” em recordaran per sempre més a tu. També agrair-te les diverses cates per les quals has passat, els papelotes de secretaria pel dipòsit i que afrontessis amb serenitat cada cop que et desterrava per poder llegir el color a les mostres. Mercedes, gracias por los momentos sanfermineros, por mutar a Maite, por compartir los pollosan y venir al gremio a butifarrear, por salir junto a mí silla y no pelearte por el espacio.... Ja veieu que hi ha motius infinits per agrair, però suposo que tots es resumeixen en...Nois, què hi farem, som rodons!!

A la Dra Alba Tres pels seus consells pre i post-dòc, per la seva força i les ganes de transmetre-la i per la seva forma de tenir un grup unit. A la Marina Diana, tot i que has estat la última en arribar ja has aportat coses importants a G1, com per exemple l'ordre al laboratori i la organització de les capsas del damunt de l'armari d'inflamables, tothom que agafí una capsa d'allà sense que n'hi caiguin 10 t'ho hauria d'agrair. També gràcies pels e-mails que m'escrivies mentre estava d'estança, són importants. A tí Carla, agradecer tus horas dedicadas a enseñarme todo lo que se debe saber para trabajar en un laboratorio y, como no, tus historietas de mamá que nos amenizaban el día. Finalment donar les gràcies a totes les noies que han patit les mostres amb mí (Aida, Anabel, Laura, Claire i Roxana), m'emporto alguna cosa de totes vosaltres.

M'agradaria també donar les gràcies al gremi de carnisers, cansaladers i xarcuters de Barcelona i comarques per deixar-nos les seves instal·lacions i als Sr. Josep Dolcet i Sr. Pere Duran pels seus consells i explicacions.

I thank Professor Weiss for accepting me in his research group. During my staying I learnt a lot and it was a wonderful and important experience for my career. I also have to thank my colleagues there, all of you are really nice: Nino, Ben, Stefan, Johanna, Rebecca, Christiane, Sarisa, Chutima, Anja, Myriam (I'm still waiting for you in Barcelona...),... y en especial a tí, Yudith, mi microbióloga favorita, la reina de la “pegatina”. Gracias por tus consejos en el lab y por esterilizar probetas y demás utensilios. Porque sin tí, comer a las 11.30 hubiera sido un infierno, el spiral plate hubiese sido eterno y rellenar centenares de placas de petri con agar de múltiples colores una tortura! BTW, no te olvides de agarrar sopa de agua en el mensa ¡¡¡Yummy!!!

Es ist sehr schwer, eine Danksagung auf Deutsch zu schreiben. Entschuldigung für die Fehler, aber ich musste es versuchen. Ich bedanke mich bei dir für deine Hilfe. Danke für deine Geduld und für deinen Mut, wenn ich nicht in der Verfassung war, meine Doktorarbeit zu beenden. Danke dass du für mich da bist und bei mir bist.

No puc acabar sense agrair la paciència dels meus amics i demanar disculpes per la relació "virtual" que hem mantingut aquests darrers anys. A partir d'ara, Sheila i Irene, crec que serà diferent. Agrair a tots aquells que alguna vegada m'han "animat" amb un "però encara no acabes?". Doncs sí... ara ja acabo. Ja sabeu que "las cosas de palacio van despacio" y en mi palacio todavía más. I a tu, Fran, per acompanyar-me gran part d'aquest camí, estar al meu costat i preocupar-te, moltíssimes gràcies.

I per últim a la meva família. Al meu germà, pels massatges poc professionals però efectius durant les hores davant l'ordinador. I als meus pares que m'han donat tot el que he necessitat i més. A tu Joan, qui m'ha inculcat moltes coses de les quals destaco l'orgull de pertànyer a Catalunya i la passió per la meva cultura, i per aquest motiu et dedico aquesta tesi en català. A tu Carme, perquè sense tu res d'això s'hagués pogut fer. Gràcies mama per introduir-me a la cultura de l'esforç i les ganes de fer, per lluitar per un objectiu i ser tenaç per aconseguir-lo, pel teu afany i dedicació, per estar allà, per donar ànims, per aguantar estrés, mala gaita i un seguit d'etcèteres que molt poques persones haguessin aguantat. Moltes Gràcies per coses tan "insignificants" com els tapers. Aquesta tesi és bàsicament gràcies a tu.

Amics, companys, professors, família.....Míl gràcies a tots!

...el mirall de la veritat s'esmicolà a l'origen en fragments petitíssims, i cada un dels trossos recull tanmateix una engruna d'autèntica llum...

(Primera història d'Esther, Salvador Espriu)

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	5
2. ANTECEDENTS BIBLIOGRÀFICS	11
2.1. Producció dels productes carnis curats	13
2.2. Paper dels nitrats i nitrits durant el curat dels productes carnis	17
2.2.1. <i>Influència sobre les característiques organolèptiques</i>	18
2.2.2. <i>Propietats antioxidants del nitrit</i>	24
2.2.3. <i>Propietats antimicrobianes del nitrit</i>	29
2.2.4. <i>Formació de nitrosamines</i>	34
2.3. Estratègies per a la reducció o substitució de nitrats i nitrits en productes carnis curats	37
2.3.1. <i>Reducció o substitució dels nitrats i nitrits</i>	37
2.3.2. <i>Fonts naturals de nitrats i nitrits</i>	47
2.3.3. <i>Bacteris iniciadors de la fermentació</i>	49
2.4. Determinació de la qualitat del producte final	52
2.4.1. <i>Característiques microbiològiques del producte final</i>	52
2.4.2. <i>Característiques físiques i químiques del producte final</i>	55
2.4.3. <i>Característiques sensorials del producte final</i>	61
2.5. Els productes ecològics: marc legal	64
3. OBJECTIUS	71

4. DISSENY EXPERIMENTAL I METODOLOGIA	75
4.1. Justificació dels embotits i productes carnis utilitzats	77
4.2. Disseny experimental	78
4.3. Mostres i determinacions realitzades	84
4.4. Anàlisi estadística	94
5. PUBLICACIONS	97
5.1. Effect of Tocopherol Extract, <i>Staphylococcus carnosus</i> Culture, and Celery Concentrate Addition on Quality Parameters of Organic and Conventional Dry-cured Sausages (Primer estudi)	99
5.2. Effect of Fermentation Time and Vegetable Concentrate Addition on Quality Parameters of Organic Botifarra Catalana, a Cured-Cooked Sausage (Segon estudi)	111
5.3. Effect of Fermentation Conditions and Addition of Tocopherol Extract and Vegetable Concentrate on Quality Parameters of Organic Botifarra Catalana, a Cooked Cured Sausage (Tercer estudi)	123
5.4. Influence of Fat Content on the Antimicrobial Activity of Sodium Lactate, Lauric Arginate and Methylparaben in Minced Meat (Quart estudi)	169
6. RESULTATS I DISCUSSIÓ GLOBAL	203
6.1. Concentració de nitrats i nitrits residuals	205
6.2. Color	212
6.3. Eficiència de curat	219
6.4. Oxidació i Estabilitat oxidativa	222
6.5. Característiques sensorials	233
6.6. Utilització d'antimicrobians	235
7.CONCLUSIONS	243

8.BIBLIOGRAFIA	251
9.ANEX	289
9.1. Llistat d'abreviatures utilitzades	291
9.2. Llistat de taules	293
9.3. Llistat de figures	295

1. INTRODUCCIÓ

El consum d'aliments als països desenvolupats ha arribat a un punt de saturació en termes de quantitat, fent que la varietat d'aliments sigui més àmplia que en el passat i el consum més diversificat. Tot i així, en aquest entorn de producció intensiva, alguns consumidors desconfien sobre la seguretat d'aquests productes, i estan cada cop més preocupats per la qualitat dels aliments i la sostenibilitat dels sistemes productius (Gil, Gracia, & Sánchez, 2000).

La creixent importància de la salut i l'impacte que la producció d'aliments pot tenir en el medi ambient ha donat, com a conseqüència, la producció d'aliments ecològics. L'objectiu final de l'agricultura ecològica i l'elaboració d'aquest tipus d'aliments és fomentar el desenvolupament d'un sistema de producció socialment, ecològicament i econòmicament sostenible (Bourn & Prescott, 2002). En conseqüència, els principis fonamentals i les pràctiques de producció d'aliments ecològics tenen com a objectiu fomentar i millorar els cicles biològics dins dels sistemes de cultiu per mantenir i augmentar a llarg termini la fertilitat dels sòls, per reduir al mínim totes les formes de contaminació, per evitar l'ús de fertilitzants i plaguicides sintètics, per mantenir la diversitat genètica del sistema de producció, per examinar l'ampli impacte social i ecològic de la producció i elaboració d'aliments, i per produir aliments d'alta qualitat en quantitat suficient.

Les motivacions per les quals els consumidors escullen els productes ecològics poden variar segons la persona o país. En termes generals els consumidors trien productes ecològics perquè pensen que són millors que els productes convencionals en els següents aspectes: seguretat, frescor, flavor, salubritat, valor nutricional i protecció del medi ambient. Segons aquests aspectes els consumidors de productes ecològics s'han dividit en 4 perfils: els que estan conscienciats pel medi ambient, els que es preocupen pels residus químics en els aliments, els que estan preocupats per les condicions de cria en les granges i els que creuen que el millor i el més important és el sabor del producte (Bourn & Prescott, 2002).

Actualment el sistema d'aliments ecològics és una complexa combinació de petits i grans productors, canals de distribució i petits comerciants. A més, ofereix una gran varietat de productes que inclou pràcticament tots els aliments d'origen vegetal i animal. A nivell mundial es calcula que hi ha més de 37 milions d'hectàrees dedicades a l'agricultura ecològica (Willer & Kilcher, 2012). El continent amb major proporció és

Oceania amb 12,1 milions d'hectàrees, seguit d'Europa (10 milions d'hectàrees) i Amèrica llatina (8,4 milions d'hectàrees). Entre els anys 2009 i 2010 les àrees destinades a l'agricultura ecològica es van incrementar a Europa en un 9%, amb França com a capdavantera en aquest creixement, seguida de Polònia i Espanya. Tot i la crisi financera que va començar al 2008, les vendes globals dels productes ecològics han seguit creixent, arribant al 2010 als 44,26 bilions d'euros. La demanda de productes ecològics es situa principalment en dues regions, Amèrica del Nord i Europa, que comprenen el 96% de les vendes. Al 2010 els països amb les majors vendes van ser Estats Units, Alemanya i França i el consum per càpita més elevat es va donar a Suïssa, Dinamarca i Luxemburg (Willer & Kilcher, 2012).

A Europa la tendència d'augmentar la producció es manté any rere any. El mercat europeu per a l'agricultura ecològica es trobava al voltant de 20 bilions d'euros l'any 2010 i els principals mercats es trobaven a Alemanya, França, Regne Unit i Itàlia. Els majors consumidors europeus de productes ecològics són els països escandinaus i els països alpins. No obstant, el país amb més àrea dedicada a la producció ecològica a Europa és Espanya, que també és el cinquè país del món amb més superfície dedicada a aquesta producció. Espanya presentava unes vendes de 905 milions d'Euros, un consum per càpita de 20€/persona i exportacions de 454 milions d'euros l'any 2009 (Willer & Kilcher, 2012).

A Espanya la producció d'aliments ecològics està en constant creixement, tant pel nombre d'hectàrees dedicades a aquesta producció, com pel nombre de productors, elaboradors i comercialitzadors. Al 2011 a Espanya hi havia 34.935 operadors de productes ecològics, dels quals 32.206 eren productors i 2.729 elaboradors i/o transformadors. Catalunya representa un alt percentatge dins Espanya pel que fa a la producció i transformació de productes ecològics. A l'any 2011 en aquesta comunitat hi havia 92.434,99 hectàrees dedicades a l'agricultura ecològica i un total de 2.312 operadors de productes ecològics. De les 6.074 explotacions ramaderes ecològiques que hi havia a Espanya l'any 2011, 573 es trobaven a Catalunya, de les quals 7 estaven dedicades al sector porcí. A Espanya, l'any 2011 es van recomptar un total de 663 activitats industrials dedicades als productes ecològics relacionades amb la producció animal, de les quals 101 es situaven a Catalunya i d'aquestes 16 es dedicaven a la producció d'embotits i salaons càrnies. Entre aquestes 16, 12 es trobaven a la província

de Barcelona, 3 a la província de Girona i 1 a la de Tarragona (Agricultura ecològica. Estadístiques 2011, 2012).

Durant les últimes dècades, s'han fet assajos per trobar la manera de corregir problemes que pot presentar la producció intensiva de carn de porc, com la seguretat dels productes, el benestar dels animals i la contaminació mediambiental, mitjançant la producció ecològica. L'èxit i la mida del mercat de carn de porc ecològic estan determinats per la percepció que tingui el consumidor cap al producte en qüestió, la qualitat dels productes (aparença, informació sobre l'origen i la producció, etc.) i, sobretot, la disposició dels consumidors a pagar els costos addicionals de producció (Dransfield et al., 2005). Ja que en termes generals hi ha una demanda creixent del consumidor per productes ecològics de qualitat garantida, cal disposar de bases científiques i tècniques que permetin l'elaboració de productes, com poden ser els productes carnis curats de procedència ecològica, amb unes garanties de qualitat i estabilitat comercial suficients.

2. ANTECEDENTS BIBLIOGRÀFICS

2.1. PRODUCCIÓ DELS PRODUCTES CARNIS CURATS

Abans que existís la refrigeració, els aliments, especialment les carns, es conservaven mitjançant el marinat, el confitat, l'addició de sal i/o el fumat. La carn era protegida contra el deteriorament amb aquests mètodes i l'antic procés de tractar la carn amb sal, que disminueix l'activitat de l'aigua, va donar lloc a les pràctiques de curat existents d'avui en dia.

Els productes carnis curats s'obtenen gràcies a l'addició d'agents curants (nitrats i nitrits) a la carn amb l'objectiu d'incrementar la seva capacitat de conservació, així com per conferir-li un color típic i un aroma característic (Price & Schweigert, 1994). Per a l'obtenció d'un bon producte carni curat també pot ser necessari afegir, a part dels agents curants, diferents ingredients com carbohidrats, agents reductors i cultius iniciadors de la fermentació. Els carbohidrats simples afegits exerceixen diferents funcions, com prevenir una pèrdua excessiva d'aigua i proporcionar una font de carboni als cultius iniciadors de la fermentació (Price & Schweigert, 1994). Els agents reductors, com l'ascorbat, s'utilitzen principalment per reduir el nitrit a òxid nítric i afavorir la formació del color. Les formes reactives de les espècies nitrogenades han d'estar en la seva forma protonada, com per exemple l'àcid nítric, per poder reaccionar i proporcionar una coloració al producte carni curat, per això és necessari un pH baix. L'addició de bacteris productors d'àcid làctic disminueix el pH promovent així el desenvolupament del color (Price & Schweigert, 1994) i evitant també el creixement d'altres microorganismes no desitjats (Toldrà, 2002). Altres ingredients com el clorur sòdic i espècies també s'afegeixen per acabar d'influir sobre el flavor, tot i que també compleixen altres funcions tecnològiques (Price & Schweigert, 1994).

Avui en dia les carns curades s'elaboren especialment per satisfer la demanda dels consumidors de productes amb característiques sensorials específiques (Price & Schweigert, 1994). De manera general, hi ha 3 mètodes diferents de curat que s'apliquen depenent el producte. Aquests 3 mètodes són el curat en sec i el curat mitjançant l'ús de salmorra per immersió o bé per injecció, que s'usen per curar peces senceres de carn, i, per últim, la incorporació dels agents curants dins una massa de carn picada o a trossos (Martin, 2012). Els productes carnis curats són una part important dels nostres hàbits dietètics i actualment en podem trobar una gran varietat al mercat.

Els diferents productes carnis curats es diferencien pels seus processos tecnològics de fabricació, com per exemple el mètode de curat o l'aplicació d'un tractament tèrmic.

El pernil curat és un producte carni cru curat i assecat de gran consum a molts països, especialment a l'àrea mediterrània (Toldrà, 2010). El pernil es cura pel mètode en sec caracteritzat per ser el procediment més antic i el qual consisteix en l'aplicació uniforme de la sal, junt amb l'agent curant, per la superfície del producte, que després es col·locarà en un lloc fresc. No s'afegeix aigua i per tant la sal i els agents curants es solubilitzen en l'aigua del propi producte. Amb el temps, la sal i els agents curants van penetrant dins el producte per difusió i certs microorganismes redueixen el nitrat a nitrit per tal d'aconseguir les característiques desitjades. Durant el procés, és necessària l'aplicació constant de sal i agent curant en la superfície del producte, ja que el procediment pot requerir un període més o menys llarg. Un dels pocs inconvenients d'aquesta tècnica és que els bacteris que alteren el producte poden créixer abans que la sal i l'agent curant arribin a totes les parts de la peça.

Després de completar el salat (normalment 1-3 setmanes), l'excés de sal i agent curant s'eliminen del futur pernil i el producte es col·loca en condicions de refrigeració (2-4°C) entre 20 i 60 dies, per permetre la igualació de sal a tot arreu (fase de postsalat). Per últim, es procedeix a l'assecatge final del producte. Per fer-ho, la carn es manté en cambres d'assecatge natural o amb aire condicionat i es deixa madurar durant un cert període en funció del tipus de pernil. La temperatura varia entre 12 i 30°C a humitats relatives compreses entre 70% i 90%. En alguns casos l'assecatge del pernil, va seguir d'un emmagatzematge més o menys llarg en bodega a una temperatura entre 12 i 20°C a humitats relatives que van des de 50% a 80%. Durant aquests períodes de maduració es produeixen reaccions bioquímiques complexes, principalment proteolítiques i lipolítiques, que desenvolupen un sabor i propietats característiques (Bello-Gutiérrez, 2008).

La producció mundial de pernil curat representa un segment important de la indústria de la carn processada pel fet que aquests productes tenen un sabor únic i atributs de textura que no es poden desenvolupar per cap altre mitjà. Hi ha diferents varietats de pernil curat depenent del porc, el tipus d'alimentació, les condicions en les quals ha crescut l'animal, el tipus de processament i la regió d'origen. Per exemple, els pernills de l'àrea Mediterrània es caracteritzen per llargs períodes d'assecatge i es consumeixen

directament després d'aquests, sense fumar o coure; en canvi, a zones del nord d'Europa i dels Estats Units, el període de maduració és molt més curt i es solen fumar després d'aquest període d'assecatge. Com a resultat, es produeixen diferents tipus de pernils arreu (Toldrà, 2010).

El bacó és un producte d'elevat consum originat en l'antiguitat per conservar la carn durant llargs períodes. Antigament, el curat del bacó es feia en sec, de forma similar al pernil, tot i que requeria un període molt més curt, normalment d'entre 10 i 14 dies en total (Xiong & Mikel, 2001). Actualment, la producció industrial de bacó implica l'addició de salmorra a la peça per injecció múltiple. La pràctica de la injecció de salmorra a la carn redueix considerablement el període de temps requerit per curar la carn. Aquest mètode de curat ha esdevingut popular amb el disseny de maquinària que assegura un procés ràpid i continu. La salmorra es prepara i s'injecta a la carn mecànicament sota pressió a través d'agulles. En la tècnica d'injecció amb agulla múltiple, una cinta transportadora porta la peça de carn sota un banc d'agulles a través del qual s'injecta salmorra fins que s'aconsegueix un pes objectiu desitjat. La separació de les agulles, la mida i el temps de permanència són variables importants per assegurar una bona distribució i retenció de la salmorra. D'aquesta manera la salmorra es distribueix d'una forma més ràpida i uniforme. Els principals avantatges d'aquesta tècnica són l'augment del rendiment del producte, la reducció dels costos de mà d'obra i la reducció del temps requerit per a la producció (Pegg & Shahidi, 2006).

Després d'haver injectat la salmorra al futur bacó, la peça de carn es submergeix en salmorra o bé s'envasa al buit conservant-la, en ambdós casos, a temperatures de refrigeració durant aproximadament tres dies. D'aquesta manera s'assegura una distribució correcta per tot el producte dels agents curants, la sal i altres ingredients. Seguidament, el bacó es deixa madurar entre 2 i 4 dies per assecar la superfície. Finalment, el producte pot passar per un procés de fumats per donar aroma i característiques diferents (Toldrà, 2010).

D'altres productes carnis curats crus es sotmeten a una fermentació combinada amb un procés d'assecatge, seguint un dels mètodes de preservació d'aliments més antic que és coneix. Per aquest mètode es pot obtenir una gran varietat d'embotits curats, fermentats i assecats, com per exemple el fuet o el salami. Tot i que la producció d'aquests embotits és actualment mundial, Europa és encara el major productor i el major

consumidor d'aquests productes carnis. Generalitzant, els productes carnis fermentats es poden definir com un producte carni obtingut per la mescla de carn picada, greix, sal, agents curants, hidrats de carboni simples, espècies i bacteris iniciadors de la fermentació. A aquesta mescla se li afegeix el mínim oxigen possible, s'emboteix en tripes permeables i es deixa fermentar i assecar durant un cert període, segons el producte (Toldrà, 2010).

Un altre producte molt consumit és el pernil cuit. Aquest és un producte curat que ha sofert una cocció. La nitrificació tradicional del pernil cuit es realitza mitjançant la immersió de la peça en salmorra. Aquesta es prepara en aigua mitjançant la combinació de la sal, agents curants i espècies. La força d'una solució de salmorra es determina per la quantitat de sal present. Per aquest mètode de curat les peces de carn es submergeixen en la salmorra durant un període de temps determinat. Tot i que la penetració d'ingredients en el teixit muscular és més ràpida que en el curat en sec, aquesta tècnica també requereix d'un cert període de temps. A més, a causa de l'alta activitat d'aigua, pot haver creixement microbià malgrat que hi hagi una concentració de sal apreciable i que el producte estigui refrigerat. Tot això fa que aquest procediment no sigui àmpliament emprat a la indústria (Pegg & Shahidi, 2006) i que el pernil cuit es produeixin per injecció de salmorra (explicada anteriorment), seguida d'un malaxat.

El malaxat és una operació mecànica de massatge per tal d'ablanir les peces de carn a curar. S'empra per accelerar el procés de curat de les carns que se'ls ha injectat la salmorra, ja que facilita l'extracció de proteïnes solubles en sal, i millora la textura, la capacitat de retenció d'aigua, i el rendiment del producte cuit. Els aparells de malaxat són grans unitats d'acer inoxidable que giren de manera circular durant un període de temps. Avui en dia pràcticament totes les unitats tenen sistema de buit. Les pales internes de la maquinària aixequen contínuament peces de carn a la part superior de la màquina i des d'aquí cauen, colpejant la massa de carn, produint una intensa acció mecànica. Les fibres musculars es veuen afectades per aquesta acció mecànica, la qual cosa fa que les membranes cel·lulars siguin més permeables i facilita la distribució i absorció de la salmorra. Quan els trossos de carn llisquen uns sobre dels altres dins l'aparell quan dona voltes, també es produeix un cert grau de massatge a les peces. El pernil cuit és un dels productes adequats per aquesta tècnica, ja que li proporciona uniformitat al producte. L'ús d'aquesta maquinària en el processament de carns curades aconsegueix alts rendiments amb baixos costos de producció (Toldrà, 2010).

Després del malaxat, el pernil es deixa reposar i s'envasa en motlles tot sovint de plàstic per donar forma al producte i afavorir la retenció d'aigua al coure. Després de l'envasament, el producte es cou durant un temps i temperatura determinats. Aquesta cocció s'usa al mateix temps per a la pasteurització del pernil cuit, arribant normalment a una temperatura interna de 68°C. Finalment, el pernil cuit es refreda i seguidament pot ser fumat per adquirir un aroma i color característics (Toldrà, 2010).

En el mercat també podem trobar altres productes carnis curats cuits com poden ser les salsitxes de Frankfurt o la mortadel·la. Per produir-les hi ha un gran nombre de formulacions i formes que deriven en una àmplia gamma de productes arreu. De forma general, aquests productes es produeixen amb carn picada que es barreja amb l'agent curant, espècies i sal, s'emboteixen en tripes, en alguns casos es pot aplicar un procés de fumat, i per últim es couen. El processament d'aquest tipus d'embotit és molt similar a tot el món, però l'àmplia gama de productes s'obté per mitjà de l'ús d'ingredients i formulació diferents, tripes de diferents mides i processos tecnològics diversos (Toldrà, 2010).

A part de la seva presentació tradicional, els productes carnis curats, tan cuits com assecats, també es poden trobar als llocs de venda llescats i envasats. El pernil, embotits cuits (com la mortadel·la) i embotits fermentats (com la llonganissa) s'acostumen a trobar als punts de venda en aquesta presentació. Aquesta forma de venda recau en la demanda dels consumidors per productes llestos per al consum. Normalment, aquests productes llescats requereixen ser emmagatzemats en refrigeració. El principal problema dels productes carnis llescats és la recontaminació amb bacteris psicròtrofs patògens, com *Listeria monocytogenes*, durant el procés de llescat i envasat (Xiong & Mikel, 2001).

2.2. PAPER DELS NITRATS I NITRITS DURANT EL CURAT DELS PRODUCTES CARNIS

Antigament, el principal propòsit del curat era la conservació. Els nostres avantpassats, per preservar la carn del deteriorament, usaven sals que disminuïen l'activitat de l'aigua i inhibien el creixement microbià. No és fins finals del segle XIX que es descobreix que algunes sals preservaven millor els aliments que d'altres. Aquestes sals contenien diferents contaminants, entre ells el nitrat potàssic, que ajudava a conservar el producte alhora que li conferia un color vermellós a la carn. Un cop conegut, els científics van

estudiar els nitrats i les seves reaccions d'oxidació i reducció per poder saber exactament quins compostos i quines reaccions intervenen en la coloració dels productes carnis curats. A més, el nitrit té activitat antibacteriana, sent capaç d'inhibir la formació d'espores i toxines de *Clostridium botulinum*, i actua com a antioxidant, inhibint l'oxidació lipídica i contribuint així al flavor desitjable dels productes carnis .

2.2.1. INFLUÈNCIA SOBRE LES CARACTERÍSTIQUES ORGANOLÈPTIQUES

2.2.1.1. El color

Les 4 característiques determinants perquè el consumidor adquireixi un producte carni són el color, la suculència, el flavor i la tendresa. D'aquests atributs, el color és el més important, ja que és la primera impressió que el comprador té i és per tant el que tindrà una major influència en la decisió dels consumidors en la compra del producte carni.

El color de la carn fresca és degut bàsicament a la concentració i la naturalesa química de les seves hemoproteïnes però també poden influir la temperatura i el pH després del sacrifici. El principal pigment del teixit muscular és la mioglobina, i la concentració d'aquest pigment en la carn és la principal responsable de donar el color vermell. De forma general, quanta més concentració de mioglobina hi hagi, més intensitat de color tindrà la carn. L'hemoglobina també pot ser partícip del color de la carn, tot i que en menor grau, així com les formes que ambdós pigments poden presentar. La mioglobina és una proteïna globular formada per una sola cadena polipeptídica constituïda per aproximadament 153 aminoàcids i un grup prostètic hemo que conté ferro. És aquest grup hemo el que dona a la mioglobina i als seus derivats els colors característics del curat de les carns (Fennema, Parkin, & Damodaran, 2010).

Al centre del grup prostètic hemo hi ha un àtom de ferro el qual pot estar en estat ferrós (Fe^{2+}) o fèrric (Fe^{3+}), depenent de la presència de reductors o oxidants en el medi. Aquest ferro pot acceptar dos lligands, un dels dos llocs està ocupat pel grup imidazol de la histidina terminal de la globina mentre que l'altre lloc està ocupat per un àtom que posseeixi un parell d'electrons lliures, que majoritàriament *in vivo* és l'oxigen i, en carns curades, l'òxid nítric. L'estructura i la química d'aquest grup hemo són claus per entendre les reaccions i els canvis de color de la mioglobina (Livingston & Brown, 1981).

El color vermell brillant de les carns és degut a la unió del grup hemo amb l'oxigen. L'afinitat d'aquest dos compostos és elevada i dona lloc a la formació d'un cromòfor que el consumidor associa amb les carns fresques. L'alta afinitat per l'oxigen fa que la mioglobina reaccioni ràpidament i de forma reversible amb aquest i conseqüentment la superfície de la carn agafi un color vermell brillant en pocs minuts d'exposició a l'aire. Tot i així, l'estabilitat del complex de mioglobina amb l'oxigen depèn d'una continua administració d'oxigen ja que els enzims involucrats en el metabolisme oxidatiu l'usen ràpidament. Amb el temps, la petita capa d'oximioglobina que està a la superfície de la carn es propaga cap a baix, però la profunditat a la qual l'oxigen difon depèn de diversos factors tals com l'activitat d'enzims que utilitzen oxigen, la temperatura, el pH i la pressió d'oxigen externa. L'interior de la carn és de color porpra, color propi de la mioglobina (també anomenada desoximioglobina) i aquest color persisteix tanta estona com agents reductors es vagin produint degut a l'activitat enzimàtica. Quan les substàncies reductores s'esgoten el ferro hemo s'oxida a l'estat fèrric. Aquest canvi d'estat dona lloc a un pigment de color marró, anomenat metamioglobina, que persisteix per un període de temps. La metamioglobina no és capaç d'unir-se a l'oxigen. A les carns fresques aquests 3 pigments (mioglobina, oximioglobina, i metamioglobina) s'interconverteixen i estan en costant equilibri (**Figura 2-1**) (Fennema et al., 2010).

Com s'ha dit anteriorment, el color dels productes carnis curats és degut als pigments de la carn. L'òxid nítric (NO) procedent de la reducció del nitrit afegit estabilitza la mioglobina mitjançant enllaços reversibles, d'igual forma que ho fa l'oxigen en el sistema fisiològic normal. La química de l'òxid nítric és complexa i quan reacciona amb la mioglobina i els seus derivats dona lloc a diversos compostos com la nitrosilmioglobina que quan pateix un tractament tèrmic es transforma en el nitrosilmiocromogen o nitrosilhemocrom (**Figura 2-1**).

El nitrit (NO_2^-) és la base conjugada de l'àcid nítrós (HNO_2), que és un àcid feble el pKa del qual és 3,36. Degut que el pH de la carn (5,5-6,5) està per sobre del pKa de l'àcid nítrós, la concentració d'aquest àcid en carns curades és molt baix (entre 0,1 i 1,0% del nitrit afegit). És per això que es creu que a la carn la principal espècie reactiva és l'anhidre de l'àcid nítrós, el triòxid de dinitrogen (N_2O_3). La presència de reductors, tant endògens com exògens, juga un paper important en la cinètica de reaccions del curat. El triòxid de dinitrogen és reduït per un reductor com podria ser l'àcid ascòrbic, donant

lloc a l'òxid nítric. La molècula d'òxid nítric generada és donant d'electrons i forma complexos molt estables amb metalls de transició, com el ferro (Pegg & Shahidi, 2000).

Quan el nitrit s'afegeix a la carn picada, la carn es torna marró ja que el nitrit actua com a oxidant fort pel grup hemo. La capacitat oxidant del nitrit augmenta a mesura que el pH de la carn disminueix, tot i així, el nitrit per ell mateix també pot ser parcialment oxidat cap a nitrat durant el curat o l'emmagatzematge. La mioglobina i la oximioglobina s'oxiden a metamioglobina degut a l'acció del nitrit. El nitrit per si sol també pot ser reduït a òxid nítric. Aquest darrer es pot combinar amb el grup hemo de la metamioglobina per formar un pigment intermedi, la nitrosilmetamioglobina.

La nitrosilmetamioglobina és inestable i s'autoredueix en el temps i en presència de reductors endògens o exògens a la forma relativament estable del Fe^{2+} , la nitrosilmioglobina. El color vermell característic de les carns curades (sense procés de cocció) es deu a la nitrosilmioglobina (**Figura 2-1**). En aquest cas, l'àtom de ferro reduït està coordinat amb 4 àtoms de nitrogen de la protoporfirina-IX, un àtom de nitrogen corresponent de la histidina de la globina i l'òxid nítric. Durant el tractament tèrmic, la globina es desnatura i és llavors quan es forma el nitrosilhemocrom que dóna el color característic rosat de les carns curades i cuites.

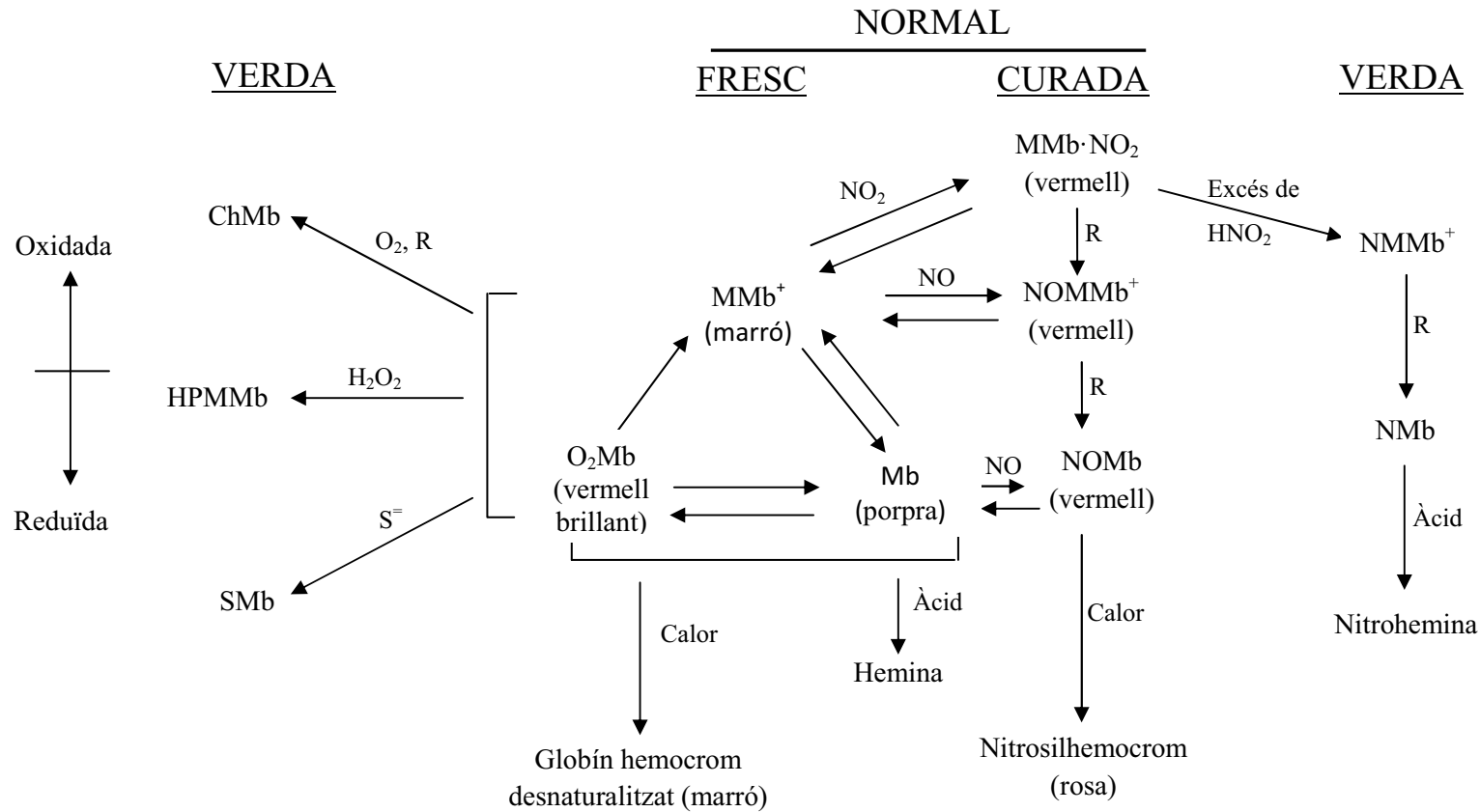


Figura 2-1. Reaccions de la mioglobina en les carns fresques i curades. ChMb, colemioglobina (anell de porfirina oxidat); HPMMb, hidroperoximetamioglobina; Mb, mioglobina/desoximioglobina (Fe²⁺); MMb⁺, metamioglobina (Fe³⁺); MMb·NO₂, metamioglobina-nitrit; NOMMb⁺, nitrosilmetamioglobina; NMb, nitrimioglobina (producte de reacció de l'àcid nítrós i la porció hemo de la molècula); NMMb⁺, nitrimetamioglobina (producte de reacció de l'àcid nítrós i la porció hemo de la molècula); NOMB, nitrosilmioglobina; O₂Mb, oximioglobina (Fe²⁺); R, reductors; SMb, sulfomioglobina; S⁻, compostos sulfurats. Els pigments corresponents també es formen a partir de l'hemoglobina.

(adaptat de Price & Schweigert, 1994 i Fennema et al., 2010)

2.2.1.2. El flavor

El flavor és una característica sensorial important que contribueix a l'acceptació de la carn i derivats. El flavor de la carn és un estímul complex que no només involucra el gust i l'aroma, sinó que també inclou altres aspectes com la textura en boca, la suculència i la temperatura (Gray, MacDonald, Pearson, & Morton, 1981). El flavor dels productes carnis prové de la interacció entre diferents precursors aromàtics originats de les proteïnes, lípids i glúcids i la sal, espècies, nitrats i nitrits afegits. Els compostos no volàtils presents, els quals comprenen principalment pèptids i aminoàcids, són els que donen sabor i contribueixen substancialment al flavor del producte final (Flores, Grimm, Toldra, & Spanier, 1997).

Possiblement el pernil curat és el producte carni cru curat més estudiat i algunes de les reaccions que es donen en aquest producte també es poden donar en altres productes curats. És sabut que l'aroma típica del pernil és deguda a la generació de compostos volàtils, que en la seva majoria provenen de l'oxidació lipídica produïda en les últimes etapes del procés. Els compostos orgànics identificats en pernil curat són els següents: hidrocarburs, provinents majoritàriament de l'oxidació de lípids; aldehids amb 6 o més àtoms de carboni, resultants de l'oxidació d'àcids grassos lliures; alcohols derivats de la descomposició oxidativa dels lípids i dels derivats metilats de la degradació de Strecker dels aminoàcids; cetones, productes de la descarboxilació d'àcids cetònics, o bé, provinents de la β -oxidació d'àcids grassos saturats; àcids grassos lliures de cadena curta derivats de la hidròlisi de triacilglicerols i fosfolípids; lactones producte de la deshidratació i ciclació d'hidroxiàcids; ésters resultants de la interacció entre àcids grassos lliures i alcohols generats per l'oxidació lipídica en el teixit intramuscular; àcids carboxílics i altres compostos com derivats del benzè, amines i amides (Pegg & Shahidi, 2000; Toldrà, 2002).

La majoria d'aquests compostos volàtils són conseqüència de l'acció dels sistemes enzimàtics muscular sobre les proteïnes i els lípids. Per exemple, durant les primeres etapes del procés *post-mortem* alguns enzims trenquen les proteïnes miofibrilars incrementant la tendresa del producte. Aquests enzims proteolítics van produint fragments polipeptídics de baix pes molecular, pèptids i aminoàcids. Aquesta degradació peptídica contribueix directament al flavor característic del pernil curat, ja que aquests compostos provinents de la degradació peptídica estan associats a diferents

gustos, com l'amargor, el gust umami o el salat (Aristoy & Toldrà, 1995). A més, els aminoàcids poden generar compostos flavoritzants volàtils mitjançant la reacció de Maillard i la degradació de Strecker (Rodríguez-Nuñez, Aristoy, & Toldra, 1995).

La lipòlisi també té una gran influència en el desenvolupament del flavor dels productes carnis crus curats. Les lipases i les fosfolipases són actives sobretot durant els cinc primers mesos de processament i hidrolitzen àcids grassos del teixit adipós i el teixit intramuscular (Motilva, Toldra, Aristoy, & Flores, 1993; Motilva, Toldra, Nieto, & Flores, 1993). Posteriorment, l'oxidació lipídica s'inicia i els compostos resultants de l'oxidació dels àcids grassos acaben donant un gran nombre de compostos volàtils relacionats amb el flavor del productes carnis curats com el pernil salat.

Durant el processament tèrmic dels productes curats cuits es produeixen tant els precursors com tota una sèrie de compostos volàtils. El flavor final del producte apareix de la combinació de productes de baix pes molecular que han estat degradats per la temperatura, on s'inclouen sucres, vitamines, aminoàcids, pèptids i nucleòtids, així com també productes procedents de la reacció de Maillard i de l'oxidació de lípids (Batzer, Landmann, & Santoro, 1962; Mottram, Edwards, & MacFie, 1982; Mottram & Edwards, 1983; Wasserman & Gray, 1965). Els aminoàcids lliures presents a la carn, com la cisteïna, que s'han alliberat de les proteïnes per mitjà d'enzims proteolítics durant el període *post-mortem*, reaccionen amb sucres reduïts, productes de la glicòlisi, i vitamines com la tiamina durant el tractament tèrmic (Pegg & Shahidi, 2000). Tot sovint, els productes d'una reacció poden ser precursors per a d'altres reaccions. La interacció d'aquests compostos volàtils amb productes derivats dels lípids poden produir flavors desitjables. Tanmateix, el procés d'oxidació pot emascarar els flavors naturals sorgits del tractament tèrmic i a vegades conduir a la deterioració del flavor carni. Hidrocarburs, alcohols, aldehids, cetones, àcids carboxílics, ésters, lactones, éters, furans, piridines, piracines, pirrols, oxazols i oxazolines, tiazols i tiazolines, i altres compostos que contenen halògens o bé un grup sulfur són compostos volàtils que s'han trobat habitualment en carnis vermelles cuites (Mottram, 1998).

El nitrit és un dels responsables de la producció del flavor de les carnis curades. Tots els canvis químics que es produeixen per tal d'aconseguir el flavor característic de les carnis curades no estan clarament descrits i es creu que poden ser un conjunt de sensacions derivades d'un nombre molt ample de compostos odorífers. En el bacó es va veure com

la quantitat de nitrit afegida feia variar el gust característic del producte. D'altra banda, l'origen de la carn marca en gran mesura la quantitat d'agent curant necessària per aconseguir un producte amb un flavor adequat (MacDougall, Mottram, & Rhodes, 1975). Altres ingredients usats en el curat de carns, com la sal o els sucres, juguen també un paper primordial en l'apreciació del flavor característic de les carns curades, així com les condicions de processament (temperatura i temps) i d'emmagatzematge (Kemp, Langlois, Fox, & Varney, 1975; MacDougall et al., 1975). També s'han involucrat alguns bacteris iniciadors de la fermentació en la formació del flavor característic dels productes curats (Hinrichsen & Andersen, 1994).

El paper del nitrit en el flavor de les carns curades implica també la seva capacitat antioxidant que és descrita detalladament en l'apartat següent. En termes generals, la introducció dels nitrits per curar la carn evita l'oxidació, fent que la presència de compostos volàtils com hexanal o pentanal responsables del deteriorament del flavor de la carn sigui mínima (Thomas, Mercier, Tournayre, Martin, & Berdague, 2013).

2.2.2. PROPIETATS ANTIOXIDANTS DEL NITRIT

L'oxidació lipídica és una de les causes per les quals un producte carni pot perdre qualitat. Els canvis en la qualitat de la carn es manifesten per canvis en el flavor, el color, el valor nutritiu, la pèrdua de la funcionalitat de les proteïnes i la possible generació de compostos potencialment tòxics

A la carn coexisteixen dos tipus de greixos segons la seva localització, el que es troba en el teixit adipós i el greix que forma part del teixit intramuscular. El teixit adipós està compost principalment per triacilglicerols, mentre que el greix intramuscular es compon de triacilglicerols i lípids de membrana, com fosfolípids o lipoproteïnes. Els àcids grassos associats a aquests teixits tan poden ser saturats com insaturats. Els lípids insaturats del múscul estan relacionats amb la deterioració oxidativa d'aquests, amb la producció de compostos desitjables i/o indesitjables derivats de l'oxidació i amb nombroses reaccions relacionades amb altres constituents de l'aliment .

L'autooxidació és la principal via per a la deterioració lipídica en carns. La dimensió de l'autooxidació depèn de diversos factors incloent la pressió parcial d'oxigen, el grau de lípids insaturats, la presència i/o contingut d'antioxidants i prooxidants, els materials d'embalatge, l'exposició a la llum i la temperatura d'emmagatzematge. Lògicament la

naturalesa dels àcids grassos a la carn i la seva concentració també tenen un gran efecte en l'autooxidació (Pegg & Shahidi, 2000).

El procés d'autooxidació, per mitjà de radicals lliures, involucra tres passos: la iniciació, la propagació i la terminació (**Figura 2-2**). A l'autooxidació, un iniciador causa la pèrdua d'un àtom d'hidrogen d'alguna molècula. En molts casos es tracta d'un hidrogen enllaçat covalentment al carboni veí a un doble enllaç d'un àcid gras insaturat. El radical lliure lipídic format inicialment (R° , radical alquil) reacciona amb oxigen molecular (O_2) per formar un radical peroxil (ROO°). Aquest radical alhora lleva un àtom d'hidrogen d'un segon lípid insaturat produint un hidroperòxid ($ROOH$) i un nou radical alquil el qual pot reaccionar també amb l'oxigen. Aquesta cadena de reaccions es va alimentant sola mentre oxigen i lípids hi siguin presents. Finalment, es poden donar reaccions intermoleculares entre radicals formant espècies no radicalàries (reaccions de terminació) com per exemple dímers o polímers.

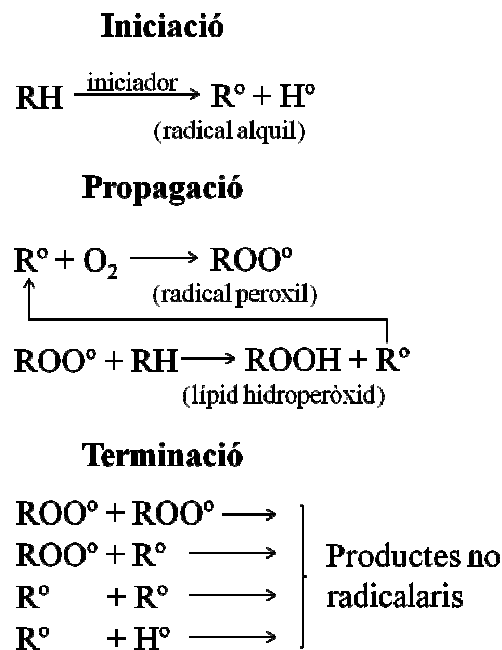


Figura 2-2. Mecanisme d'autooxidació en carns.

Els hidroperòxids, compostos primaris de l'oxidació, estan considerats com els productes de reacció inicial més importants obtinguts per autooxidació. Els hidroperòxids lipídics no contribueixen al flavor característic resultant de l'oxidació dels greixos. Tanmateix, aquests hidroperòxids es descomponen fàcilment i donen lloc a la formació dels anomenats productes d'oxidació secundària com aldehids, cetones,

alcohols, hidrocarburs, lactones i 2-alkilfurà que tenen una elevada volatilitat. Aquests productes secundaris d'oxidació lipídica no contribueixen al gust desitjable de la carn ja que són els majors contribuents al flavor desagradable a la carn i productes carnis. Aquests compostos imparteixen atributs de ranciessa, gust acre i altres característiques no desitjades a la carn (Chang & Peterson, 1977).

Una de les majors preocupacions de les empreses càrnies és l'oxidació lipídica i la formació de *warmed-over flavor* (WOF). A mitjans del segle XX es va observar que en carns cuites refrigerades l'oxidació era més elevada que en carns fresques o congelades sense coure (Tims & Watts, 1958). Arrel d'això, es va crear un nou terme per descriure el ràpid desenvolupament d'aquest flavor de deteriorament anomenat *warmed-over flavor* (WOF). Aquest particular sabor i aroma ranci esdevé ràpidament al voltant de les 48 hores en carns cuinades, en canvi en carns refrigerades aquest flavor és evident només després de llargs períodes d'emmagatzematge en fred (Pearson, Love, & Shorland, 1977), o bé, més ràpidament si la carn s'ha sotmès a un procés de picat i ha estat en contacte amb l'aire (Spanier, Vercellotti, & James, 1992). Per tant, qualsevol procés que impliqui un trencament de la integritat del múscul, com el cuinat o el picat, promourà el desenvolupament de WOF.

Avui dia es coneix que el WOF no solament és degut a l'oxidació lipídica sinó també a una degradació de les proteïnes (Spanier, Edwards, & Dupuy, 1988; St. Angelo, Vercellotti, Dupuy, & Spanier, 1988; Vercellotti et al., 1987). Per aquesta raó i per millorar la descripció de la sèrie de reaccions complexes que contribueixen en general a incrementar els flavors indesitjables i disminuir el desitjable sabor carni, es va proposar un nou terme conegut com *meat flavor deterioration* (MFD). Des d'un punt de vista sensorial, aquestes reaccions químiques causen increments en gustos indesitjables, com a cartolina o pintura, i disminueixen el desitjable flavor carni (Love, 1988; St. Angelo et al., 1987). La intensitat d'aquestes apreciacions sensorials indesitjables s'ha relacionat amb el contingut de compostos carbonílics formats en les reaccions d'autooxidació lipídica (Drumm & Spanier, 1991). A més, la disminució de les percepcions sensorials desitjables podria ser deguda a la reducció del contingut d'aquests compostos que contribueixen al desitjable sabor carni o degut a l'emascarament de flavors desitjables per un increment en el contingut de compostos aromàtics indesitjables (St. Angelo et al., 1987).

Entre els lípids de la carn, els fosfolípids són els més susceptibles a l'oxidació, degut al seu alt contingut en àcids grassos insaturats, a més aquesta susceptibilitat és pot incrementar amb els processos tèrmics. S'ha demostrat que en greix subcutani es produeixen fins a 4 vegades menys compostos volàtils durant el deteriorament de la carn que en greix intramuscular. És per això que part del MFD i dels flavors indesitjables es podrien atribuir directament als fosfolípids (Spanier et al., 1992). L'oxidació dels àcids grassos insaturats de 18 carbonis (C_{18}), anomenats àcid oleic, linoleic i linolènic, ha sigut descrita com la principal responsable de l'aparició d'aldehids de baix pes molecular (C_3 - C_{12}) com el pentanal, hexanal i 2,4-decadienal els quals son coneguts per ser els principals responsables del WOF i del desenvolupament de la ranciessa en carns cuites emmagatzemades.

En carns la presència de prooxidants com els ions metàl·lics de transició i les porfirines que contenen ferro exerceixen un efecte catalític promovent l'oxidació lipídica (Baron & Andersen, 2002; Grunwald & Richards, 2006; Grunwald & Richards, 2006). Si bé el ferro no hèmic que contenen les carns ha tingut sempre un paper important en l'oxidació d'aquestes (Sato & Hegarty, 1971), fa temps que les hemoproteïnes s'han implicat majoritàriament com a prooxidants en la peroxidació lipídica en carns (Love & Pearson, 1974). Tanmateix, en carns cuites s'ha descrit que, degut al processament tèrmic de les carns, s'allibera ferro lliure de la porfirina el qual accelera l'oxidació lipídica explicant la major susceptibilitat de la carn cuita cap a l'oxidació (Chen, Pearson, Gray, Fooladi, & Ku, 1984; Igene, King, Pearson, & Gray, 1979; Schrickler & Miller, 1983). D'altra banda, s'ha vist que el grup hemo pot resistir certs tractaments tèrmics i que també podria presentar per si mateix certa activitat catalítica en la carn cuita (Berisha, Yasushi, & Fujimoto, 2003; Bou et al., 2008; Bou, Hanquet, Codony, Guardiola, & Decker, 2010). Tant si es tracta de ferro hèmic com no hèmic, ambdós casos poden donar reaccions d'oxidació-reducció. El cas més senzill d'aquestes reaccions d'oxidació-reducció comprèn l'ió ferrós (Fe^{2+}) i el fèrric (Fe^{3+}) que donen lloc a la formació de diferents radicals (**Figura 2-3**). L'ió ferrós descompon ràpidament els hidroperòxids lipídics formant radicals alcoxil molt reactius, mentre que l'ió ferric (Fe^{3+}) produeix més lentament radicals peroxil menys reactius (Min & Ahn, 2005).

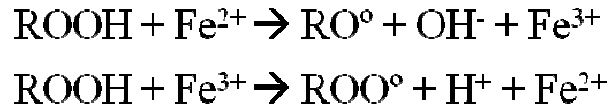


Figura 2-3. Reaccions de l'ió ferrós (Fe^{2+}) i fèrric (Fe^{3+}) amb els hidroperòxids lipídics.

A mitjans del segle XX es va observar que l'addició de nitrats en carns endarrerria la deterioració oxidativa de la carn i que inhibia el desenvolupament de WOF fins i tot quan aquests s'afegien a concentracions inferiors a 50 ppm (Sato & Hegarty, 1971). A partir de llavors es van dur a terme més estudis per tal d'esbrinar el paper i la funció del nitrit en la prevenció del desenvolupament de WOF.

Tot i que segueix en constant discussió, s'han proposat 4 mecanismes pels quals el nitrit duu a terme el seu efecte antioxidant. El primer, es relaciona amb la formació d'un complex estable entre els pigments hemo i el nitrit que evita l'alliberació i l'acció catalítica, anteriorment comentada, de l'ió ferro de la molècula porfirínica (Morrissey & Tichivangana, 1985). La prevenció de l'alliberament del Fe^{2+} durant el procés tèrmic per l'estabilització de l'anell porfirínic és possiblement el mecanisme proposat més important. El segon mecanisme tindria a veure amb la capacitat del nitrit en estabilitzar els lípids insaturats en les membranes dels teixits evitant així la seva oxidació (Sato & Hegarty, 1971). A més, s'ha vist que el nitrit o el triòxid de dinitrogen reacciona amb els lípids insaturats per formar altres derivats nitrosats els quals estabilitzen els lípids davant de canvis peroxidatius (Freybler et al., 1993). Un altre mecanisme proposa la interacció amb metalls traça de la carn, com per exemple el ferro que prové dels pigments hemo desnaturalitzats, funcionant com a quelant. L'últim mecanisme s'ha relacionat amb la formació de compostos nitroso i nitrosil en carns els quals tindrien propietats antioxidants per la seva acció sobre els radicals lliures. Per exemple, la nitrosilmioglobina podria tenir un efecte antioxidant, actuant com a finalitzador en la cadena radicalària (Morrissey & Tichivangana, 1985). La S-Nitrosocisteïna, un possible producte de reacció generat durant el curat, també podria ser antioxidant (Kanner & Juven, 1980).

Per altra banda, l'òxid nítric, que prové de la reducció del nitrit, pot reaccionar amb metalls, grups hemo i altres biomolècules en matrius càrnies evitant així un procés d'oxidació, a més com a donador d'electrons també podria eliminar radicals lliures. El

ferro del grup porfirínic nitrosilat podria actuar quelant radicals lliures i per tant inhibint la seva propagació a l'inici de l'autooxidació lipídica (Pegg & Shahidi, 2000). Per tant, el nitrit i els seus derivats poden funcionar com a antioxidants per diversos mecanismes incloent la formació de complexos amb els lípids insaturats (per exemple, els fosfolípids) i la estabilització dels lípids de les membranes, que finalment condueix a la minimització del desenvolupament del MFD en carns curades crues i cuites.

2.2.3. PROPIETATS ANTIMICROBIANES DEL NITRIT

Per a la salut pública l'activitat antibotulínica del nitrit en carns curades té una importància major que el desenvolupament del color o el flavor. L'efecte antibotulínic consisteix en la inhibició del creixement de les cèl·lules vegetatives i la prevenció de la germinació i el creixement de les espores que sobreviuen al tractament tèrmic o altres processos industrials durant l'emmagatzematge. La germinació i el creixement de les espores bacterianes inclouen 5 passos: la germinació, el creixement de l'espóra germinada, l'aparició d'una nova cèl·lula vegetativa, l'elongació i la divisió cel·lular (Duncan & Foster, 1968). L'efecte inhibitori del nitrit sobre les espores bacterianes és aparentment degut a la inhibició del creixement i de la divisió cel·lular (Cook & Pierson, 1983).

Des de l'antiguitat s'han utilitzat sals riques en nitrats i nitrits per tal de conservar els productes carnis peribles i tenir disponibilitat de productes proteics durant un període més llarg de temps. Tot i així, no va ser fins a principis del segle XX que l'absència gairebé total de botulisme en carns curades, enllaunades o envasades al buit portà als investigadors a buscar els motius pels quals tot i que aquests productes poguessin contenir espores viables no esdevenien tòxics. Tot i que la seva activitat en la conservació de carns curades estava qüestionada, és en aquest període que es proposen els nitrits com antimicrobians.

Més endavant, durant la dècada dels anys 50-60, les investigacions avancen i el nitrit es relaciona directament amb la durada de l'estabilitat dels productes carnis peribles, suposant l'àcid nítrós com a responsable de l'efecte bacteriostàtic, i s'observà un augment de l'eficiència de l'antimicrobià en presència d'ascorbat (Tompkin, 2005). Silliker i els seus col·laboradors (1958) van demostrar que el nitrat directament no tenia cap paper en endarrerir el deteriorament de carn cuada curada enllaunada. Els autors de la investigació van descobrir que la clau per evitar el deteriorament era l'addició de

nitrit sòdic al producte i posteriorment coure el producte per tal de disminuir el nombre d'espores viables. El resultat de combinar l'efecte del nitrit, la sal i el tractament tèrmic per tal de danyar les espores juntament amb un baix nombre d'espores inicials, allargava la vida útil del producte. Com que les espores viables romanents podien germinar durant l'emmagatzematge del producte, el principal efecte atribuït al nitrit va ser prevenir el desenvolupament d'aquestes espores supervivents al tractament tèrmic.

L'any 1962, es va involucrar el nitrit en la inhibició dels bacteris Gram positius, i es va proposar la teoria que l'àcid nítrós era el responsable de reaccionar amb les cèl·lules o bé amb constituents del medi, fent que el metabolisme del bacteri quedés impedit (Shank, Harper, & Silliker, 1962). Paral·lelament, Perigo i els seus col·laboradors (1967) van demostrar que es necessitava fins a deu vegades més nitrit per inhibir els bacteris del gènere clostridi quan s'usaven medis de cultiu on se'ls afegia el nitrit després del procés d'esterilització que usant medis on el nitrit s'afegia abans d'aquest procés. Es va concloure que escalfant el medi amb el nitrit es produïa una substància o agent 10 cops més inhibidora que el mateix nitrit. Aquesta substància o barreja de substàncies es va anomenar factor Perigo. L'existència d'aquest factor va ser confirmada per alguns autors (Pivnick, Barnett, Nordin, & Rubin, 1969) i qüestionada per altres (Johnston, Pivnick, & Samson, 1969). Per aquelles dates, la inhibició de clostridis també es va demostrar en carns curades, a més, a mida que s'augmentava la concentració de nitrit en el producte semblava ser més efectiu. Com que el factor Perigo només es podia contemplar en carns cuites curades, el poder inhibitori en carns curades seguia atribuint-se a l'àcid nítrós dissociat (Tompkin, 2005).

Entre el 1970 i el 1980 la formació de nitrosamines va esdevenir un problema de salut pública important, i des d'aleshores ençà s'ha intentat reduir o eliminar l'ús de nitrit en productes alimentaris. Els descobriments realitzats fins llavors i els futurs van fer entendre una mica més el procés antimicrobià que envolta el nitrit i la possible recerca d'alternatives amb igual activitat antimicrobiana. Va ser durant aquesta època que es va verificar que l'addició de nitrit prevenia el creixement de les espores que havien sobreviscut als tractaments tèrmics als quals els productes carnis curats es poden sotmetre (Pivnick, Johnston, Thacker, & Loynes, 1970). A més, també es va descobrir que el nitrit residual del producte podia inhibir el creixement de clostridis (Ashworth & Spencer, 1972).

A finals de la dècada dels 70, diversos investigadors van comprovar que el ferro present en productes carnis podia disminuir l'efecte antimicrobià del nitrit. Gràcies a aquesta troballa, es va descobrir el mecanisme d'acció del nitrit (Oleary & Solberg, 1976; Riha & Solberg, 1975a; Tompkin, Christiansen, & Shaparis, 1978; Tompkin, Christiansen, & Shaparis, 1979). L'òxid nítric pot reaccionar amb components essencials de la cèl·lula que continguin ferro, com per exemple la ferredoxina, proteïna que es troba dins la cèl·lula germinada dels bacteris del gènere clostridi. Aquest tipus de proteïnes no hèmiques que contenen ferro i sofre són presents en el gènere dels clostridis i són essencials pel transport d'electrons, la producció d'energia i l'activitat enzimàtica. La ferredoxina dels clostridis té dos centres actius independents cadascun dels quals transfereix un sol electró. Cada centre actiu es compon de quatre àtoms de ferro units a sofre i cisteïna. L'òxid nítric pot reaccionar amb el ferro d'aquestes proteïnes essencials, de forma similar a com ho fa amb el ferro de les proteïnes hemo, inutilitzant la proteïna i inhibint així la proliferació dels clostridis (Reddy, Lancaster, & Cornforth, 1983).

Paral·lelament, Woods i el seus col·laboradors (1981) van trobar que l'addició d'una suspensió de nitrit a un cultiu de *C. sporogenes* en un medi amb glucosa causà una disminució ràpida de la concentració intracel·lular d'ATP i una acumulació de piruvat al medi. Aquesta acumulació de piruvat va ser el resultat de la inhibició del sistema enzimàtic piruvat-ferredoxina oxidoreductasa que catalitza la reacció de ruptura fosforoclàstica del piruvat. L'enzim oxidoreductasa d'aquest sistema que s'inhibeix consisteix en una sola proteïna que conté pirofosfat de tiamina i un cromòfor no hèmic. El nitrit no va reaccionar directament amb la ferredoxina, però hi va haver una disminució de la activitat de la ferredoxina en les cèl·lules preincubades amb nitrit, concloent que probablement el mecanisme d'inhibició a nivell cel·lular és la reacció directa de l'òxid nítric amb l'enzim piruvat-ferredoxina oxidoreductasa. Sembla ser que tant la ferredoxina com la piruvat-ferredoxina oxidoreductasa són els dos llocs diana que resulten en la inhibició de la proliferació dels clostridis en productes carnis (Carpenter, Reddy, & Cornforth, 1987). El nitrit sembla que també podria inhibir enzims de la fermentació de la glucosa, com el gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa i l'aldolasa en *C. perfringens* (Oleary & Solberg, 1976).

D'altra banda, el nitrit també pot estar involucrat en la inhibició d'altres sistemes enzimàtics de microorganismes d'altres gèneres. Yarbrough i els seus col·laboradors (1980) van descriure que el mecanisme d'acció del nitrit contra *E. coli* i altres bacteris

pot ser dut a terme per tres mecanismes diferents. El primer mecanisme és atribuït a què el nitrit pot interferir en la conservació d'energia mitjançant la inhibició de l'absorció d'oxigen, de la fosforilació oxidativa i del transport actiu protó dependent. El segon mecanisme està relacionat amb el fet que el nitrit pot causar un col·lapse en el gradient de protons a la membrana cel·lular. El tercer mecanisme pot ser atribuït a què el nitrit inhibeix diversos enzims, com les aldolases. La inhibició de *S. aureus* per nitrit s'ha atribuït a la inhibició del transport i a l'acumulació de glucosa i 2-deoxiglucosa, només sota estrictes condicions anaeròbiques. Si les condicions anaeròbiques no es donen *S. aureus* és més resistent a l'acció del nitrit i inclús podria disminuir la seva concentració més ràpidament degut a la seva activitat nitrit reductasa (Fang, Post, & Solberg, 1985). Buchanan i Solberg (1972) van suggerir també que el nitrit podia inhibir el creixement de *S. aureus* bloquejant els llocs sulfhidril del coenzim A o l'àcid α -lipoic, bloquejant així el metabolisme normal del piruvat, sempre i quan es donessin condicions d'anaerobiosi (Buchanan et al., 1993). El nitrit també pot inhibir l'aldolasa de *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Streptococcus faecalis* (Yarbrough et al., 1980).

A pH àcid, el nitrit de sodi està majoritàriament en forma d'àcid nítrós, que és una molècula altament reactiva capaç d'interaccionar amb una gran varietat de substàncies, com la mioglobina, l'àcid ascòrbic, els fenols, les amines secundàries i grups amino o tiol (Rahman, 2007). De fet, s'ha observat que a pH àcids el nitrit presenta més inhibició en el creixement bacterià. Aquest pH àcid comporta una sèrie de reaccions cícliques involucrant el nitrit principalment. La producció dinàmica d'àcid nítrós pot ser visualitzada en un cicle de reaccions (**Figura 2-4**) on el nitrit mitjançant reaccions d'oxidació i reducció pot formar nitrat, òxid nítric i diòxid de nitrogen. El diòxid de nitrogen pot reaccionar amb l'aigua formant ió nitrat i ió nitrit el qual tornaria a entrar al cicle per a la producció d'àcid nítrós. D'aquesta manera la presència d'àcid nítrós es perllonga aconseguint un nivell màxim bactericida (Rahman, 2007). La presència de l'àcid nítrós pot ser la responsable de la inhibició de *C. perfringens* per la reacció d'aquest amb constituents de la cèl·lula bacteriana que contenen grups tiol (Riha & Solberg, 1975b). També s'ha vist que l'òxid nítric podria inhibir la nitrogenasa de *C. pasteurianum*, sistema que comprèn dos proteïnes que contenen ferro no hemo (Meyer, 1981).

A part del pH, hi ha altres factors que influencien l'activitat antimicrobiana del nitrit en carns: la concentració de sal, el nitrit residual i la velocitat de pèrdua d'aquest, el

nombre d'espores viables i cèl·lules en estat vegetatiu que romanen després del tractament tèrmic, la temperatura d'emmagatzematge del producte, la quantitat d'àcid ascòrbic afegit al producte, el tractament tèrmic aplicat, i el creixement de la microbiota competidora (Rahman, 2007; Tompkin, 2005).

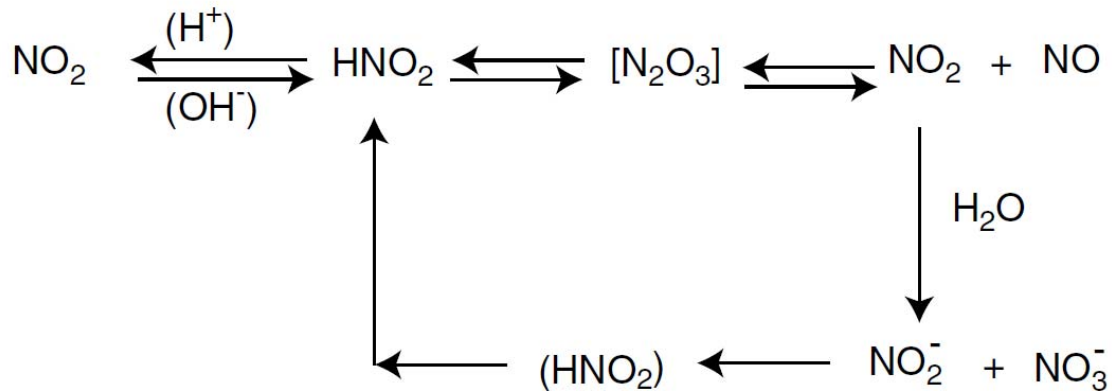


Figura 2-4. Producció dinàmica de l'àcid nítrós en una reacció cíclica (Font: Rahman, 2007)

Quant a l'efecte de la sal, s'ha descrit que el clorur sòdic aplicat sol a concentracions entre 9 i 10,5% al producte és capaç d'inhibir el creixement i la producció de toxina de *C. botulinum*, mentre que quan el nitrit es va aplicar al producte en concentracions entre 75 i 150 ppm, només es van necessitar concentracions de 4,9% i 5,8% de clorur sòdic per inhibir la formació de la toxina. Així doncs la combinació de sal, nitrit i pH pot produir un efecte sinèrgic que afavoreixi la inhibició del creixement de bacteris en productes carnis curats (Pierson & Smoot, 1982).

En referència a la diferent susceptibilitat de les espècies enfront del nitrit, Nielsen (Nielsen, 1983), en productes carnis envasats al buit, va observar que bacteris de la família enterobacteriaceae, així com del gènere *Moraxella* i *B. thermosphacta*, són inhibits en major proporció i això resulta en que els bacteris productors d'àcid làctic siguin els majoritaris, i per tant, responsables del deteriorament d'aquests productes. La resistència al nitrit dels bacteris productors d'àcid làctic és ben coneguda (Gibson & Roberts, 1986). Dels 25 diferents tipus de bacteris productors d'àcid làctic analitzats provinents de carnis curades, 21 van ser capaços de créixer en presència de nitrit. Això pot ajudar a explicar la dominància dels lactobacils com a microorganismes en

productes carnis curats (Brownlie, 1966). Tot i així, en productes cuits i curats, llescats i envasats, l'emmagatzematge a baixes temperatures i/o la utilització d'envasos amb poca permeabilitat a l'oxigen poden augmentar la vida útil d'aquests productes (Tompkin, 2005). D'igual manera, *Listeria monocytogenes* sembla prou resistent front l'activitat antimicrobiana del nitrit (Buchanan, Stahl, & Whiting, 1989; Juntilla, Hirn, Hill, & Nurmi, 1989), sent més efectiva l'aplicació de baixa temperatura durant l'emmagatzematge per a la inhibició del seu creixement (Duffy, Vanderlinde, & Grau, 1994; Farber, McKellar, & Ross, 1995). En productes curats, el factor dominant per evitar la proliferació de *Clostridium botulinum* és la disminució de pH degut als bacteris productors d'àcid làctic (Christiansen, Tompkin, Shaparis, Johnston, & Kautter, 1975), així com també la disminució d'activitat d'aigua deguda a l'assecatge (Tompkin, 2005).

Finalment, s'han fet molts estudi científics per buscar un substitut acceptable per al nitrit. Si bé això encara no ha estat possible, al 1983 alguns investigadors (Nelson, Busta, Sofas, & Wagner, 1983; Wagner & Busta, 1983) realitzen un dels primers intents per intentar reduir la quantitat de nitrats afegits a productes carnis cuits curats (salsitxes de Frankfurt de pollastre, porc i vedella). Tots dos grups investigadors van demostrar que la proliferació de *Clostridium botulinum* es podia inhibir amb tant sols 40 µg/g de nitrats afegits si s'utilitzava conjuntament 0,26% de sorbat potàssic i 0,4% pirofosfat àcid de sodi i es controlava el pH de les emulsions càrnies.

2.2.4. FORMACIÓ DE NITROSAMINES

A finals dels anys 60 i principis dels 70, el nitrit va esdevenir un problema per a les autoritats dels Estats Units degut a la seva relació amb la formació de nitrosamines. Les nitrosamines són compostos potencialment carcinogènics que poden ser formats en carns curades per la reacció entre el nitrit o el triòxid de dinitrogen i amines o aminoàcids del múscul en determinades condicions. La *N*-nitrosodimetilamina i la *N*-nitrosopirrolidina són algunes de les nitrosamines que s'han trobat en carns i que han demostrat ser carcinogèniques, mutagèniques i/o teratogèniques en animals d'experimentació (Rath & Reyes, 2010).

Les nitrosamines poden afectar diversos òrgans com el fetge, el ronyó i el tracte gastrointestinal, entre d'altres (Genkinger & Koushik, 2007). De forma experimental s'ha demostrat que les nitrosamines semblen més eficients en la producció de tumors quan s'apliquen a petites dosis repetides. Aquesta situació és important ja que els

humans estan sotmesos a dosis traça de forma continuada (Walters, 1992). És per aquesta possible relació entre les nitrosamines i la incidència de diversos càncers en humans que s'ha prestat força atenció a la presència d'aquestes en productes carnis curats.

En productes carnis curats es poden trobar i produir nivells traça de *N*-nitrosamines. Les nitrosamines que es troben de forma més habitual en productes carnis curats són *N*-nitrosodimetilamina, *N*-nitrosopirrolidina, *N*-nitrosodietilamina i 1-nitrosopiperidina. Hi ha diferents factors que poden afectar la formació de *N*-nitrosamines en productes carnis curats. Aquests factors inclouen els nivells de nitrit, tant afegit al producte com residual, els procediments i condicions de processament (mètode de cocció, temperatura i temps), el pH, la relació entre el teixit magre i el greixós, i la presència de catalitzadors i/o inhibidors (Hotchkiss & Vecchio, 1985; Sen, Seaman, & Miles, 1979; Sen, Tessier, Seaman, & Baddoo, 1985). Les nitrosamines apareixen principalment en productes que es sotmeten a altes temperatures com és el cas del bacó després del procés de fritura (Sen et al., 1979).

És ben conegut que la quantitat de nitrosamines formades en carnis és directament proporcional a la concentració residual de nitrit. Per això, s'ha eliminat el nitrat en la majoria d'aplicacions de curat per tal de tenir un millor control en les reaccions de curat (BOE número 221, 2007). D'altra banda, l'eliminació total del nitrit en els processos de curat, que seria un mètode infal·lible per evitar el problema de les nitrosamines, no és possible ja que sorgirien altres inconvenients en el producte que ja han estat comentats com, per exemple, un alt risc de botulisme i canvis organolèptics importants. Per això, en aquest sentit, s'ha proposat disminuir la quantitat de nitrit afegit per curar els productes carnis per evitar la formació de nitrosamines, que tot i que no s'eliminaria completament, seria menor (Pegg & Shahidi, 2000).

S'ha de tenir en compte que una gran part de les nitrosamines a les que estem exposats es generen dins del cos humà, aquesta formació es situa entre el 45% i el 75% de l'exposició total a nitrosocompostos (Jakszyn, 2006). La formació endògena de nitrosamines prové principalment de la ingesta de nitrats i nitrits mitjançant la dieta. La majoria de nitrats que ingerim provenen del consum de vegetals. Un cop aquests nitrats entren dins l'organisme, poden ser reduïts a nitrit mitjançant els bacteris presents al tracte gastrointestinal, i posteriorment en medi àcid els nitrits poden produir triòxid de

dinitrogen capaç d'unir-se amb una amina procedent també de la dieta. És per aquesta sèrie de reaccions que la reducció de nitrats i nitrits residuals en productes carnis també limita la formació endògena de nitrosamines.

En aquest marc, els òrgans de govern (BOE número 221, 2007; EFSA, 2010) i, consegüentment, les indústries càrnies estan fent esforços considerables per tal de frenar la formació d'aquests compostos en aliments. Aquesta situació ha portat a la introducció de canvis tecnològics en els processos industrials. Una acció que s'està utilitzant actualment per tal de disminuir la formació de nitrosamines en productes carnis curats és la incorporació d'inhibidors. Un inhibidor de la formació de nitrosamines hauria de complir els següents requisits: ser capaç de reaccionar amb el nitrit, òxids de nitrogen o els seus derivats; ser soluble en greix; no ser volàtil, i ser estable fins a temperatures de 175°C (Bharucha, Cross, & Rrubin, 1980). L'àcid ascòrbic, l'ascorbat o l'eritorbat sòdic poden actuar com a inhibidors de la formació de nitrosamines, i per això la seva addició en productes carnis curats pot ser una bona estratègia. L'àcid ascòrbic inhibeix la formació de nitrosamines mitjançant la reducció de l'àcid nítrós (donant àcid dehidroascòrbic i òxid nítric) i evitant així la reacció entre amines i aquest àcid. L'addició d'àcid làctic, o la seva producció per mitjà de microorganismes, disminueix el pH en el producte i per tant afavoreix les reaccions de reducció del nitrit (Pegg & Shahidi, 2000). *In vitro*, també s'ha demostrat la inhibició de la formació de *N*-nitrosodimetilamina per part de l'àcid sòrbic, el qual reacciona ràpidament amb l'àcid nítrós evitant així la formació d'aquesta nitrosamina (Tanaka, Chung, Hayatsu, & Kada, 1978).

La vitamina E és capaç d'inhibir la formació tan endògena com exògena de *N*-nitrosocompostos. Els tocoferols ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) tenen un grup fenòlic en l'anell aromàtic fent-los capaçs de reduir agents nitrosants com l'àcid nítrós a productes innocus com el nitrogen o l'òxid nítric. Per exemple, a la **figura 2-5** es pot observar la reacció del α -tocoferol amb l'àcid nítrós donant lloc a la formació d'òxid nítric i d' α -tocoferilquinona (Lathia & Blum, 1989).

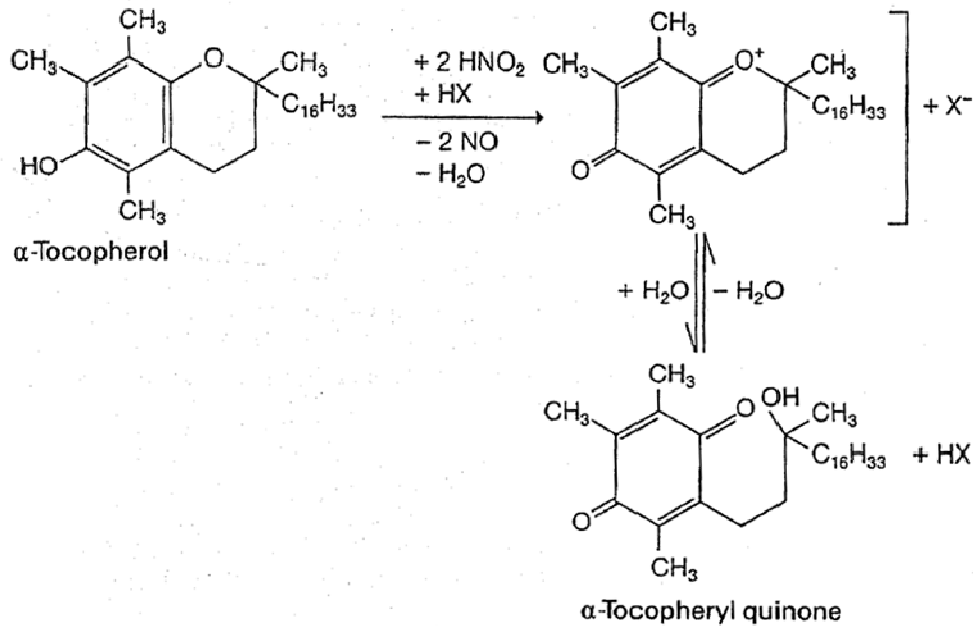


Figura 2-5. Reacció entre α -tocoferol i l'àcid nítrós (font: Lathia & Blum, 1989)

2.3. ESTRATÈGIES PER A LA REDUCCIÓ O SUBSTITUCIÓ DE NITRATS I NITRITS EN PRODUCTES CARNIS CURATS

Recentment, l'interès dels consumidors per aliments naturals, ecològics, sense conservants i saludables s'està incrementant. Això provoca que aquests consumidors vulguin tenir a l'abast productes carnis sense addició de nitrats ni nitrits. Actualment, no s'ha descobert encara cap substància que pugui reemplaçar de forma efectiva els efectes característics dels nitrats i nitrits en carns curades, i l'eliminació completa no és possible ja que, a més del risc microbiològic, s'obtidrien productes carnis amb canvis organolèptics importants i costaria molt que el consumidor els acceptés. Tot i així, cada cop hi ha més possibilitats de restringir la quantitat d'agent curant afegida i disminuir la concentració residual en el producte per tal d'aconseguir un producte de característiques similars als convencionals i acceptat per part dels consumidors.

2.3.1. REDUCCIÓ O SUBSTITUCIÓ DELS NITRATS I NITRITS

2.3.1.1 Manteniment de les característiques de color

Els nitrats i els nitrits són essencials per al desenvolupament del color, el factor de qualitat de la carn més important, ja que si el producte no és atractiu en aparença, els

consumidors no el comprarien o escollirien mai per a gaudir del seu flavor o textura. Ha estat comprovat que actualment els consumidors rebutjarien un producte curat sense les seves característiques típiques de color. En proves sensorials realitzades per comparar productes curats amb o sense addició de nitrits, els tastadors van manifestar la seva preferència per les mostres amb additiu i un rebuig per a les mostres que no contenien agent curant (Sindelar, Cordray, Sebranek, Love, & Ahn, 2007a). Malgrat això, l'ús del nitrit en productes carnis s'està intentant reduir per mitjà d'ingredients que simulin l'activitat que el nitrit exerceix dins el producte carni, tant pel color, com per l'efecte antioxidant i antimicrobià. Això permetria disminuir la formació de nitrosamines i oferir al consumidor productes lliures d'aquest additiu.

S'han provat diversos compostos nitrogenats heterocíclics i compostos aromàtics els quals preserven o estableixen el color vermell de les carnis fresques o curades i hi ha un nombre elevat de patents per a la seva aplicació en sistemes carnis (Pegg & Shahidi, 2000). Entre aquests compostos s'inclouen l'àcid nicotínic, derivats de la piridina, tetrazols i compostos heterocíclics com les purines, pirimidines, imidazols, pirazines i triazines, així com derivats d'aquests. El problema per a totes aquestes substàncies és que el producte resultant de cadascuna de les substàncies és menys estable a la oxidació que el produït pel nitrit. Per això es va proposar (Brown, 1973) que un compost substitutiu havia de ser aquell que reaccionés de manera similar a l'òxid nítric amb la mioglobina per produir un pigment semblant a la nitrosilmioglobina. Es van provar diversos compostos heterocíclics que contenien nitrogen, i van trobar que el metil i l'hexil nicotinat i la N,N-dietilnicotinamida eren capaços de reaccionar amb la mioglobina i formar un color vermell acceptable, el problema era que aquests compostos eren menys estables que la nitrosilmioglobina després del processament tèrmic (Howard, Duffy, Else, & Brown, 1973). En altres casos s'ha vist que varis d'aquests compostos nitrogenats heterocíclics són capaços de formar hemocroms, de colors diversos que anaven del beix al lila (Dymicky, Fox, & Wasserman, 1975; Fox, Dymicky, Keyser, & Wasserman, 1975). A més, durant aquests experiments no es va estudiar la toxicitat d'aquests substitutius ni els seus efectes sobre el flavor del producte final.

L'ús de pigments naturals per tal de reduir la quantitat de nitrit afegida als productes carnis també s'ha considerat. Les betalaines, pigments naturals provinents de la remolatxa, s'han utilitzat per simular el color característic de la carn curada tan en

productes cuits, fumats com assecats (von Elbe, Klement, Amundson, Cassens, & Lindsay, 1974). El color resultant d'aquests productes carnis va ser comparable a aquells produïts amb nitrat o nitrit i també va ser estable durant el temps, però tastadors experts van ser capaços de detectar el sabor diferent de les betalaines i discernir els diferents colors. Altres pigments naturals usats com a colorant en productes carnis han estat l'*angkak* (pigment de l'arròs vermell fermentat) (Shehata, Buckenhuskes, & El-Zoghbi, 1998), l'extracte sec del rave (Sugita, Yamauchi, Ohashi, Suiko, & Miura, 1993), pigments del pebrot, β -carotè o la cúrcuma. Bloukas i col·laboradors (1999) van provar de disminuir la quantitat de nitrit i alhora afegir una quantitat de pigment vermell natural en salsitxes de Frankfurts, aconseguint bones puntuacions en proves sensorials.

Una altra opció per tal de reduir l'addició de nitrats i nitrits és utilitzar aliments o ingredients que continguin colorants naturals ja que poden millorar o mantenir el color dels productes carnis processats. Bazán-Lugo i els seus col·laboradors (2012) van incorporar pebre vermell (1,5 i 2,0 g/kg) i engrut de tomàquet liofilitzat (2,5 i 3,0 g/kg) a embotits cuits els quals se'ls havia reduït la quantitat de nitrit afegit (0,1 g/kg). Quant al color, aquests dos compostos naturals van donar lloc a embotits de coloracions més vermelloses mitjançant la mesura instrumental de l'espai de color CIE $L^*a^*b^*$ i, en l'avaluació sensorial, els embotits que contenien pebre vermell van obtenir en la prova d'ordenament segons el color puntuacions significativament superiors. A més, aquests compostos naturals semblarien ser també antioxidants, ja que poden contenir quantitats de polifenols, àcid ascòrbic i carotenoides, entre d'altres compostos amb activitat antioxidant. No obstant, un únic compost semblaria no ser eficient per tal de suplir totes les accions que el nitrit fa sobre els productes carnis curats cuits i/o fermentats.

Al 1975, Sweet (1975) va patentar una mescla de compostos per substituir el nitrit que consistia en un colorant vermell (eritrosina), un antioxidant, un antimicrobià i altres compostos auxiliars. Més endavant, aquesta mescla va ser modificada i es va canviar l'eritrosina per la nitrosilhemoglobina. Aquest és un pigment natural de característiques similars al pigment majoritari de les carns curades, la nitrosilmioglobina. Aquesta nitrosilhemoglobina es manufacturava fora de la matriu càrnia mitjançant la unió de glòbuls vermells provinents de la sang d'animals d'escorxador i un agent nitrosant en presència d'un reductor. Aquest pigment es va utilitzar en productes carnis i l'anàlisi del color de les mostres càrnies no va mostrar cap diferència entre la carn tractada convencionalment amb nitrit i la carn tractada amb aquest nou pigment. El problema

d'aquest pigment és que la formació de color típic del curat depèn proporcionalment de la quantitat de mioglobina que conté la carn, i és per això que la quantitat usada d'aquest pigment en els productes ha de ser mesurada respecte a la quantitat de mioglobina que conté la carn, per tal d'obtenir el color òptim per a cada producte. Tot i que un panell de tastadors no van ser capaços de diferenciar aquelles mostres que portaven addicionat el pigment preformat d'aquelles carns que havien estat curades de forma tradicional (addició de nitrts), el pigment es descompon ràpidament en presència d'aire i llum (Pegg & Shahidi, 2006; Pegg & Shahidi, 2000).

2.3.1.2. Manteniment de les propietats antioxidants

El nitrit funciona com a potent antioxidant en carns curades i per això protegeix enfront de l'oxidació. Aquesta prevenció de l'oxidació influeix en el flavor dels productes carnis curats. Per això en productes curats amb baixa concentració de nitrts afegits podria ser necessari inhibir l'oxidació lipídica per mitjà de l'addició d'antioxidants i d'aquesta manera mantenir en cert grau el flavor de les carns curades. També l'eliminació de l'oxigen durant l'envasament i evitar l'exposició a la llum durant l'emmagatzematge dels productes podria ajudar a reduir l'oxidació (Weiss, Gibis, Schuh, & Salminen, 2010).

Al llarg dels anys, s'han provat nombrosos antioxidants, quelants i les seves combinacions per tal de reproduir l'activitat antioxidant del nitrit. L'addició d'antioxidants a la carn i als productes carnis resulta en la conservació de la qualitat de la carn endarrerint l'autooxidació i el desenvolupament de la ranciesa, com també minimitzant el descoloriment i la pèrdua de nutrients. El butilhidroxianisol i la monoterbutil hidroquinona van resultar ser altament efectius retardant la oxidació en productes carnis durant més de cinc setmanes d'emmagatzematge a 4°C. Entre els quelants, s'ha vist que el pirofosfat àcid de sodi, el pirofosfat tetrasòdic, tripolifosfat de sodi i l'àcid etilendiamintetraacètic (EDTA) són els més efectius (Pegg & Shahidi, 2006). L'inconvenient és que el nitrit és inclús a baixes concentracions un potent antioxidant. Sato i Hegarty (1971) van provar diferents antioxidants i cap d'ells era comparable al nitrit. Mentre que el nitrit a 50 mg/kg tenia capacitat per inhibir la oxidació lipídica en carns mesurada amb l'anàlisi del TBA, per a l'àcid cítric se'n necessitava una concentració de 1000 mg/kg i de 200 mg/kg per al BHT.

A més, la tendència d'avui en dia per part de la indústria alimentària és usar ingredients naturals degut a la desconfiança per part dels consumidors cap als additius sintètics. És per això que es prefereixen antioxidants provinents d'ingredients naturals, com per exemple les espècies. Les espècies ofereixen una solució potencial ja que poden ser usades també com a condiments, i a més contenen altres substàncies tan antioxidants com antimicrobianes. Tot i que els compostos antioxidants de les espècies poden inhibir l'oxidació lipídica, aquesta activitat depèn de l'aliment on s'apliqui, de la quantitat d'espècie que s'afegeixi i de l'estabilitat d'aquestes substàncies sotmeses als tractaments de processament. Malgrat que algunes espècies puguin tenir una alta activitat antioxidant, el seu ús en carns i productes carnis és restringit degut al flavor impartit per l'espècie en el producte.

La farina de mostassa s'ha aplicat com antioxidant en productes carnis, com salsitxes de Frankfurt i mortadella. Aquesta farina és capaç d'inhibir l'oxidació lipídica, tot i que la seva activitat antioxidant depèn de la concentració. Sembla que la capacitat antioxidant d'aquesta farina es pot atribuir a compostos fenòlics com l'àcid sinàptic i trihidroxifenòlics com les flavones o flavanones, i a l'àcid *p*-hidroxibenzoic (Shahidi, Wanasundara, & Amarowicz, 1994).

D'altra banda, els compostos actius d'olis essencials de romaní, orenga, borraja i sàlvia són diterpens fenòlics, àcid hidroxicinàmic, flavonoids i triterpens. Les substàncies antioxidants més actives en el romaní, la sàlvia i l'orenga són l'àcid carnòsic, el carnosol i l'àcid rosmarínic (Weiss et al., 2010). Recentment, els compostos polifenòlics, com per exemple les catequines, s'han investigat pel seu potencial en inhibir l'oxidació lipídica en productes carnis (Tang et al., 2006). En un estudi realitzat per Fernández-Lopez i col·laboradors (2003) es van provar extractes de romaní i d'herbes aromàtiques del gènere *Hyssopus* per inhibir l'oxidació lipídica en carn de porc cuïta emmagatzemada a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ durant 6 dies. Aquests dos extractes van disminuir l'oxidació en un percentatge superior al 90% en comparació amb la mostra control. A més, els extractes van evitar la degradació dels pigments hemo causant una estabilització del color en el producte carni.

Els diferents anàlegs de tocoferol, i especialment l' α -tocoferol, són el principal antioxidant actiu en carnis. Els tocoferols protegeixen a la carn i als productes carnis dels canvis oxidatius i milloren l'estabilitat durant l'emmagatzematge (Asghar et al., 1991;

Jensen, Lauridsen, & Bertelsen, 1998). Jensen i col·laboradors (1998) van obtenir valors més baixos d'oxidació i major control en l'estabilitat oxidativa durant el temps d'emmagatzematge en aquelles carns obtingudes de porcs d'experimentació que havien estat alimentats amb pinso fortificat amb acetat d' α -tocoferol. En un altre estudi realitzat en pernil cuit, es va observar que els pernills que provenien de porcs alimentats amb pinso fortificat amb acetat d' α -tocoferol tenien valors d'oxidació menors, tot i disminuir la quantitat de nitrit afegit, en comparació amb pernills elaborats amb carn de porc el qual havia estat alimentat amb pinso sense fortificar (Dineen et al., 2000).

2.3.1.3. Manteniment de les propietats antimicrobianes

El nitrit també fa d'antimicrobià en productes carnis curats, essent capaç d'inhibir el creixement d'espores de bacteris putrefactius o patògens, com el *C. botulinum*. El substitutiu del nitrit per aquest aspecte hauria de ser una substància adequada per usar en productes carnis, capaç de controlar el creixement microbià d'espècies significatives per la salut pública, evitar el deteriorament del producte i no interferir amb els microorganismes beneficiosos com els bacteris productors d'àcid làctic. A més, la substància substitutiva hauria de ser com a mínim igual d'efectiva que el nitrit, segura, tèrmicament estable, sense sabor i efectiva a baixes concentracions (Sofos & Busta, 1980). L'ús de la tecnologia de barrera, la qual consisteix en la combinació de processos o substàncies antimicrobianes, pot resultar en una millor estabilitat microbiana, degut a la possible sinèrgia entre els diferents mètodes usats sense que això influeixi en la qualitat final del producte (Leistner, 2000).

S'han provat diversos antimicrobians com a substitutius del nitrit. Per exemple, es va proposar l'ús de parabens ja que en medis de cultiu inhibien el desenvolupament de la toxina botulínica (Reddy, Pierson, & Lechowich, 1982), tot i així aquest efecte antibotulínic en carnis no s'ha acabat de demostrar (Draughon, Sung, Mount, & Davidson, 1982).

Tompkin i col·laboradors (1974) van descriure que el sorbat potàssic inhibia la producció de la toxina botulínica en productes carnis que no se'ls havia afegit nitrit. A més, l'àcid sòrbic i la seva sal potàssica inhibeixen el creixement de fongs i llevats. El sorbat potàssic és una pols blanca cristal·lina i està classificat com a substància generalment reconeguda com a segura (GRAS) amb referència 21 CFR 182.3640,

aprovat per l'ús en certs productes carnis curats per tal de retardar el creixement de fongs en la seva superfície (BOE número 221, 2007).

Les herbes aromàtiques i les espècies contenen un gran nombre de substàncies que inhibeixen diferents activitats metabòliques de bacteris, llevats i fongs, disminuint així el creixement microbià per un efecte letal o bé inhibint la producció d'un metabòlit vital. Aquests compostos antimicrobians, com per exemple l'eugenol, compresos en els vegetals solen estar continguts en els olis essencials extrets de diferents parts com fulles (romaní, sàlvia), flors i capolls (clau), bulbs (all, ceba), rizomes (asafètida), fruits (pebre, cardamom) o altres parts de la planta (Palou, Alzamora, & Lopez-Malo Vigil, 2005). L'ús d'antimicrobians naturals provinents d'extractes vegetals representa una bona alternativa als antimicrobians sintètics degut a la preferència dels consumidors pels productes naturals.

S'ha demostrat que els olis essencials són capaços d'inhibir el creixement de diversos bacteris *in vitro*, incloent els del gènere *Clostridium*. Tot i així, l'ús d'aquests antimicrobians està compromès ja que presenten una reducció d'efectivitat quan són aplicats en aliments. És per això que l'ús d'olis essencials com agents antimicrobians presenta una important limitació deguda a la interacció d'aquests compostos amb activitat antimicrobiana amb proteïnes, lípids o altres components de l'aliment. La concentració d'oli essencial aplicada a un producte alimentari per causar el mateix nivell d'inhibició microbiana que en un medi de cultiu és bastant superior. Aquestes concentracions elevades poden causar canvis sensorials al producte fent-lo inacceptable (Palou et al., 2005). Tot i aquests desavantatges, s'han provat diferents olis essencials en productes carnis per tal de disminuir la dosi de nitrit, i cobrir la demanda dels consumidors per productes naturals sense nitrat o nitrit afegit.

En productes carnis provinents de gall d'indi es van provar olis essencials per tal d'evitar el creixement de *C. perfringens* (Juneja & Friedman, 2007). Els olis essencials provats (carvacrol, timol, cinamaldehyd i oli essencial d'orenga) van inhibir el creixement microbià durant el temps d'emmagatzematge del producte. En mortadel·la (Coutinho de Oliveira et al., 2011) es va avaluar la inhibició del creixement de *Clostridium perfringens* deguda a un oli essencial provinent de sajolida per disminuir la dosi de nitrit afegit. Les mortadel·les estaven formulades amb diferents concentracions de nitrit de sodi (0 ppm, 100 ppm i 200 ppm) i diferents concentracions de l'oli

essencial (0,0%; 0,78%; 1,56%, i 3,125%). Els principis actius majoritaris en aquest oli essencial son el timol, el cimol, el linalol i el carvacrol. Es va trobar un efecte sinèrgic entre els dos antimicrobians, i per tant la combinació de tots dos podria fer possible una disminució del nitrit afegit. Aquesta sinèrgia entre un oli essencial amb propietats antimicrobianes i el nitrit també va ser observada per Cui i col·laboradors (2010), i això podria tenir una repercussió en el control antibacterià sense comprometre les característiques organolèptiques del producte.

De forma similar a la utilització d'olis essencials, Xi i col·laboradors (2011) van usar un concentrat de nabius, considerat un antimicrobià natural. Les concentracions emprades van ser al 1%, 2% i 3% conjuntament amb 50 o 150 ppm de nitrit de sodi. Van trobar que aquest concentrat de nabiu disminuïa el creixement microbià de *Listeria monocytogenes*, aplicat a un embotit cuit i curat. A més, també van combinar aquest concentrat de nabius amb concentrat de cirera o concentrat de llima o extracte de llavor de raïm, i van observar que també s'inhibia el creixement d'aquest bacteri.

Una manera efectiva per limitar el creixement de microorganismes en un aliment és augmentar l'acidesa del medi creant així un medi poc favorable per al seu desenvolupament (Doores, 2005). Per això alguns autors han usat en productes carnis ingredients com el vinagre, que conté àcid acètic, o bé, una mescla de vinagre i suc de llimona (font natural d'àcid cítric) degut a la seva activitat antimicrobiana. Tots dos ingredients van ser capaços d'inhibir el creixement de *C. perfringens* i el desenvolupament de les seves espores en carn picada (Valenzuela-Martinez et al., 2010).

Un altre àcid orgànic usat com antimicrobià en carnis i productes carnis ha estat l'àcid làctic. *In vitro*, l'àcid làctic ha demostrat ser un excel·lent inhibidor de bacteris formadors d'espores, tot i que sembla que no és efectiu contra fongs i llevats (Woolford, 1975). En aliments fermentats, l'àcid làctic conjuntament amb altres factors anti-creixement excretats pels bacteris productors d'aquest àcid inhibeixen els microorganismes competidors (Doores, 2005). Una protecció excel·lent contra la formació de la toxina botulínica s'ha aconseguit mitjançant la utilització de bacteris productors d'àcid làctic en bacó produït amb baixes concentracions de nitrit (Pegg & Shahidi, 2000).

La sal sòdica de l'àcid làctic ha estat usada amb èxit com antimicrobià en carns perquè proporciona un lleu sabor salat que realça el gust de carn, conserva el color, contribueix a la capacitat de retenció d'aigua, millora la suculència, apareix de forma natural en els productes carnis, i allarga la vida útil dels productes. Mentre que l'activitat antimicrobiana de l'àcid làctic està associada principalment a la disminució de pH, el lactat de sodi té un efecte marcat en l'activitat d'aigua que resulta en una prolongació de la vida útil (Chirife & Ferrofontan, 1980). En medis de cultiu s'ha comprovat l'efecte del lactat de sodi sobre la producció de la toxina botulínica, la germinació d'espores, i la resistència al tractament tèrmic (Doores, 2005). En productes carnis, Maas i col·laboradors (1989) van demostrar que el lactat de sodi en concentracions compreses entre 2 i 3,5% va retardar la formació de la toxina botulínica en carn picada.

L'éster d'etil de l'arginat làuric és un surfactant catiònic compost d'àcid làuric i L-arginina, la fórmula del qual és $C_{20}H_{41}N_4O_3Cl$ (**Figura 2-6**) i que va ser acceptat com a nova substància, acord a la Directiva Europea 67/548/EEC, sota el número de registre 00-11-0173 i el número EC assignat 434-630-6 de l'ELINCS (*European list of notified chemical substances*). S'ha demostrat a més que aquesta substància té activitat antimicrobiana contra bacteris, tant Gram positius com negatius, fongs i llevats. El sistema d'acció de l'éster d'etil de l'arginat làuric es fonamenta en afectar els compostos carregats negativament com per exemple proteïnes presents en la membrana cel·lular, o bé, sistemes enzimàtics. Això resulta en la desnaturalització de les proteïnes i l'increment de la permeabilitat de la membrana, produint la inhibició del creixement o bé la mort del microorganisme afectat (Rodriguez, Seguer, Rocabayera, & Manresa, 2004). L'any 2005 va ser acceptat com a substància GRAS (GRN No. 164) per la FDA (*Food and Drug Administration*). Aquesta substància es va proposar l'any 2007 a la EFSA (*European Food Safety Authority*) per ser usada en productes carnis a una concentració màxima de 225 mg/kg. El panell d'experts de la EFSA va establir una IDA (ingesta diària admissible) de 0,5 mg d'éster d'etil de l'arginat làuric/kg de pes corporal. Amb aquesta IDA, l'exposició potencial diària resultant de tots els usos i quantitats proposades en aliments era superior per tots els grups d'edat (EFSA, 2007). L'any 2012, l'EFSA va dur a terme una avaluació de l'exposició d'éster d'etil de l'arginat làuric per a l'ús com a additiu alimentari, ja que amb els usos i les quantitats proposades fins aquell moment la substància no era segura per als consumidors. En conseqüència, es va disminuir els nivells proposats d'utilització, de 225 a 160 mg/kg en productes carnis.

Després de la revisió, l'exposició diària a l'èster d'etil de l'arginat làuric seguia sent superior a la IDA en alguns grups de població, com els nens (EFSA, 2012). Tot i així, la legislació europea encara no ha acceptat aquesta substància com a additiu per a ser usada en aliments.

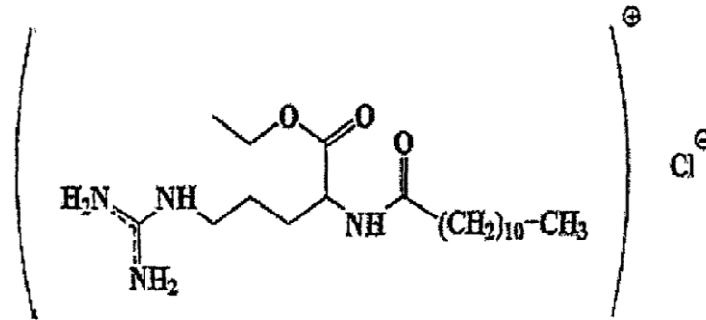


Figura 2-6. Estructura molecular de l'èster d'etil de l'arginat làuric.

D'altra banda, es poden usar tractaments físics per suplir l'activitat antimicrobiana del nitrit. Per exemple, la pasteurització és un procés que pot ser usat per reduir *L. monocytogenes* de forma efectiva en la superfície del producte i pot ser aplicat abans o després d'envasar (Sebranek, Jackson-Davis, Myers, & Lavieri, 2012). No obstant, la pasteurització no és un tractament efectiu per eliminar els bacteris formadors d'espores i, per tant, no seria indicat per inhibir *C. botulinum*. Altres tècniques com l'escalfament per alta freqüència, on s'inclouen les microones i l'energia de radiofreqüència, també han estat usades per evitar el creixement microbià en productes carnis (Aymerich, Picouet, & Monfort, 2008). D'igual manera, la llum ultravioleta es pot aplicar per evitar el creixement de *L. monocytogenes* (Sommers, Cooke, Fan, & Sites, 2009) i els processos d'altres pressions hidrostàtiques a 600 MPa poden ser aplicats a productes carnis per a la inactivació d'*E. coli*, *L. monocytogenes* o *Salmonella* (Jofre, Aymerich, Grebol, & Garriga, 2009). Per exemple, Myers i col·laboradors (2013) van sotmetre pernil cuït llescat a tractament d'altres pressions hidrostàtiques per inhibir el creixement de *L. monocytogenes*. Els autors, després de la utilització de les altres pressions, no van observar diferències en la inhibició d'aquest bacteri, en comparació a quan s'utilitzava un agent convencional (200 ppm de nitrit).

La irradiació també ofereix la possibilitat de processar productes carnis envasats en grans quantitats i implica l'exposició d'aquests a radiacions ionitzants per eliminar els

microorganismes presents. En general, els virus són els més resistents a aquestes radiacions, seguit de les espores i els llevats; contràriament, els bacteris Gram negatius són els més susceptibles (Aymerich et al., 2008).

Finalment, en els últims anys envasaments nous han contribuït a allargar la vida útil dels productes carnis. L'envasament actiu és un concepte innovador que es podria definir com un sistema d'envasament on l'envàs i l'aliment interaccionen estenent la vida útil i millorant la seguretat dels aliments o les propietats sensorials del producte per preservar així la seva qualitat. En aquest sistema, per exemple, la substància microbiana pot migrar gradualment des de l'envàs cap al producte durant l'emmagatzematge i la distribució, sent així capaç de reduir el creixement de microorganismes durant el post-processament a la superfície del producte carni (Aymerich et al., 2008).

2.3.2. FONTS NATURALS DE NITRATS I NITRITS

Com que els ingredients individuals semblen no ser suficients per aconseguir el mateix efecte en productes carnis que el nitrit, la indústria càrnia ha buscat ingredients que siguin font natural de nitrats i nitrits, però que alhora siguin acceptats pels consumidors.

De fet, molt abans d'afegir-se nitrats i nitrits a les carns, la sal marina ja s'usava per conservar les carns i va ser a partir d'aquesta pràctica que es va descobrir el poder curant dels nitrats i nitrits. La sal marina s'aconsegueix evaporant l'aigua de mar i no se li afegixen additius, i per tant romanen els minerals que contenia l'aigua originàriament. Hi ha diferents varietats de sal, depenent de l'origen geogràfic de l'aigua usada i el contingut en minerals. Malgrat que la sal marina ha estat usada des de l'antiguitat per conservar la carn, la quantitat de nitrats i nitrits que conté és relativament baixa, 0,3-1,7 ppm i 0-0,45 ppm, respectivament. Això comporta afegir una alta quantitat de sal per aconseguir l'efecte curant desitjat (Sebranek & Bacus, 2007).

Els vegetals són coneguts per contenir altes quantitats de nitrats, fins a màxims d'entre 1500 i 2800 ppm, en api, enciam i remolatxa. És per aquest motiu, que estan disponibles al mercat concentrats, extractes o sucus vegetals com ingredients substitutius del nitrat que a més són vàlids per a productes ecològics. L'anàlisi d'alguns sucus vegetals disponibles al mercat van revelar que aquests contenien 171 mg/kg, 2114 mg/kg, 2273 mg/kg y 3227 mg/kg de nitrat, en sucus de pastanaga, api, remolatxa o espinaçs,

respectivament (Sebranek & Bacus, 2007). Com a conseqüència de la reducció bacteriana dels nitrats, la concentració de nitrats d'aquests suc i concentrats pot anar disminuint amb el temps d'emmagatzematge donant lloc a un augment en la concentració de nitrits. Els productes vegetals tenen un gran potencial com a font natural de nitrats en les carns processades, sobretot si s'afegeixen en forma de concentrats (Sindelar, Cordray, Olson, Sebranek, & Love, 2007b). Els concentrats en pols d'api, o també la mescla d'api i remolatxa, podrien ser un bon substituït dels nitrats convencionals ja que contenen quantitats de nitrats iguals o superiors a 30.000 ppm (Sindelar & Houser, 2009). Els concentrats d'api tenen poc pigment vegetal i no haurien d'afectar a la coloració del producte. D'altra banda, el concentrat amb remolatxa podria presentar un color vermellós que podria beneficiar la coloració típica de curat. A més, ambdós presenten un sabor suau que no afectaria en gran mesura al producte final (Sebranek & Bacus, 2007). Actualment, alguns productors redueixen el nitrat d'aquests concentrats vegetals abans de ser introduïts al producte, per tal de disminuir el temps d'elaboració dels productes carnis curats amb aquest producte vegetal (Krause, Sebranek, Rust, & Mendonca, 2011). Aquests concentrats vegetals en què s'ha reduït el nitrat contenen altes concentracions de nitrit, d'entre 10.000 i 15.000 mg/kg. Això comporta un millor control de les concentracions afegides i residuals de nitrit i facilita obtenir productes carnis curats amb una qualitat i seguretat adequades.

Fins l'actualitat s'han produït diversos productes carnis curats, tan cuïts com assecats, afegint concentrats vegetals com a única font de nitrats i nitrits. Sindelar i col·laboradors (2007b) van determinar si hi havia diferències sensorials i de qualitat entre els productes curats amb aquest tipus d'ingredients i els curats de forma tradicional. Aquest grup de recerca va aconseguir mostres comercials de pernil dolç, salsitxes de Frankfurt i bacó en les quals s'aplicaven concentrats vegetals i les va comparar amb una mostra curada amb nitrit. Els autors van trobar que totes les mostres curades amb l'ingredient vegetal tenien les mateixes característiques de color, aroma i flavor que la mostra curada de forma tradicional. Malgrat això, en un altre estudi, un panell de tastadors entrenats va indicar que l'aroma vegetal del concentrat es podia detectar quan el producte carni, en aquest cas pernil cuït, contenia una quantitat de 0,35% de concentrat d'api (Sindelar et al., 2007a). Tanmateix, en un estudi realitzat més endavant (Terns, Milkowski, Rankin, & Sindelar, 2011a) els tastadors no van trobar diferències d'aroma entre unes salsitxes (emulsionades, curades i cuïtes) produïdes amb

el concentrat d'api (0,2%) ric en nitrat i les mateixes salsitxes curades de manera convencional amb nitrit. Quant al color d'aquestes salsitxes, tant les elaborades amb el concentrat d'api com les curades de forma tradicional presentaven el mateix color característic (Terns et al., 2011a). A més, en el test d'acceptació global del producte no es van observar diferències entre les diferents salsitxes.

Conjuntament amb els concentrats vegetals, també s'han afegit altres extractes naturals rics en àcid ascòrbic, com per exemple concentrat de cirera, que podrien ajudar a reduir el nitrit cap a òxid nítric promovent la formació del pigment característic dels productes curats (Terns et al., 2011a).

2.3.3. BACTERIS INICIADORS DE LA FERMENTACIÓ

La fermentació és un procés clau en la producció d'embotits, ja que la major part de les transformacions físiques, bioquímiques i microbiològiques ocorren durant aquest procés, i són aquestes transformacions les que conjuntament amb les condicions de producció influenciaran la qualitat sensorial del producte carni fermentat. Els canvis que es duen a terme en un producte curat es poden resumir en una disminució del pH, canvis en la població microbiana, reducció de nitrats i nitrits, formació de la nitrosilmioglobina i altres derivats de la mioglobina, solubilització i gelificació de les proteïnes miofibrilars i del sarcoplasma, proteòlisi, lipòlisi, oxidació i deshidratació (Casaburi et al., 2007).

El coneixement i control dels bacteris presents en la matriu càrnia i involucrats en la fermentació són essencials per assegurar una qualitat microbiològica, unes característiques sensorials adequades i en general la seguretat del producte. En els últims anys nombrosos estudis han demostrat la presència habitual en carns fermentades de bacteris productors d'àcid làctic, com *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* o *Lactobacillus plantarum*, i de cocs Gram positius catalasa positius, com *Staphylococcus xylosum*. La millora de la qualitat i la seguretat de productes carnis fermentats es pot aconseguir mitjançant l'addició de bacteris iniciadors de la fermentació seleccionats per tal de conduir el procés de fermentació (Toldrà, 2010).

Els bacteris iniciadors de la fermentació són preparacions que contenen microorganismes vius o en estat de repòs que un cop addicionats en el producte durant el seu processament desenvolupen una activitat metabòlica desitjada a la carn. Així doncs, inocular una massa càrnia amb un cultiu iniciador de la fermentació compost per

bacteris productors d'àcid làctic i per cocs Gram positius catalasa positius millorarà la qualitat i la seguretat del producte final i estandarditzarà el procés. Avui en dia, el que més s'usa en productes carnis és una barreja de bacteris iniciadors de la fermentació que inclou bacteris productors d'àcid làctic, com *L. sakei*, i estafilococs coagulasa negatius. (Toldrà, 2010).

Els bacteris productors d'àcid làctic són fonamentals en la fermentació i el curat de les carns, ja que la producció de l'àcid provoca una disminució del pH de la carn a valors situats entre 4,6 i 5,9. En aquestes condicions, la formació del color es veu afavorida i les proteïnes musculars coagulen, afavorint alhora la maduració. El resultat global es una millora en la facilitat de llescar i una millor fermesa i cohesió del producte final. *L. sakei* és el bacteri predominant en els productes carnis curats i el seu ús com a bacteri iniciador de la fermentació és molt estès (Toldrà, 2010).

A més dels beneficis de la reducció del pH, els bacteris productors d'àcid làctic inhibeixen el creixement de microorganismes patògens i de degradació mitjançant la competitivitat entre espècies i la producció de metabòlits antimicrobians com el peròxid d'hidrogen, els àcids orgànics i les bacteriocines (Daly, Lachance, Sandine, & Elliker, 1973). Una bacteriocina és una toxina proteica sintetitzada per un bacteri per tal d'inhibir el creixement de bacteris similars o pertanyents a soques properes. Tot i així, en els últims anys s'ha demostrat que les bacteriocines també poden inhibir el creixement de bacteris no similars al productor (Scannell, Ross, Hill, & Arendt, 2000). La bacteriocina més estudiada és la nisina que la produeix *Lactococcus* spp. La nisina té un ampli espectre d'actuació i és bactericida contra molts bacteris Gram positius, i a més evita el desenvolupament d'espores bacterianes, especialment les de *C. botulinum* (McMullen & Stiles, 1996). L'activitat de la nisina en contra dels clostridis ha estat provada en medis de cultiu, però degut a la seva baixa solubilitat a pH 6 i la difusió incompleta a través del bacó, limita l'efecte en contra dels clostridis en aquest producte (Taylor & Somers, 1985). Tot i així, l'efecte antibacterià de combinar nisina (100-250 mg/kg) i nitrit (120mg/kg) al bacó va ser superior que l'addició únicament de nitrit (156 mg/kg).

Els cocs Gram positius catalasa positius també tenen un paper rellevant en la producció de productes carnis fermentats. Aquests bacteris milloren l'estabilitat del color del producte, eviten l'enranciment, disminueixen la degradació, disminueixen el temps de

processament i contribueixen al desenvolupament del flavor. A aquest grup pertanyen bacteris del gènere *Staphylococcus*, com per exemple *S. xylosus*, *S. carnosus*, *S. equorum* i *S. saprophyticus*. Tots aquests són bacteris anaeròbics facultatius capaços de metabolitzar un gran nombre de sucres. *S. xylosus* i *S. carnosus* són els més utilitzats com a cultius iniciadors de la fermentació ja que, a part de ser altament competitiu en la fermentació de la carn, tenen propietats tecnològiques importants. A més, aquests microorganismes sobreviuen sota condicions d'estrès, alta concentració de sal i baixes temperatures, situacions que es donen en la fermentació de carns (Toldrà, 2010). Els bacteris iniciadors que pertanyen al gènere *Staphylococcus* contribueixen al desenvolupament de les característiques organolèptiques, com la textura i el flavor, degut a la intervenció d'enzims involucrats en el metabolisme de proteïnes i lípids. Tot i així, la principal característica d'aquests bacteris és que contribueixen directament al desenvolupament i l'estabilitat del color vermell de les carns fermentades per mitjà de la seva activitat nitrat reductasa (Miralles, Flores, & Perez-Martinez, 1996).

Els estafilococs coagulasa negatius redueixen el nitrat a nitrit, el qual és important per la formació de nitrosilmioglobina. *S. carnosus* és àmpliament usat com a cultiu iniciador de la fermentació. Aquest bacteri té una alta activitat nitrat reductasa, sobretot en la seva fase exponencial de creixement i en un medi amb alta concentració de nitrat (Gøtterup et al., 2007; Sanz, Vila, Toldrà, Nieto, & Flores, 1997). A més, *S. carnosus* té activitat catalasa positiva, que es important per prevenir la decoloració i l'enranciment dels productes carnis fermentats degut a l'acumulació del peròxid d'hidrogen com conseqüència del creixement de bacteris productors d'àcid làctic (Gøtterup et al., 2007). La necessitat d'aquest tipus de bacteris fa molt de temps que es coneix i per això s'han comercialitzat durant anys. La majoria de les aplicacions per aquestes soques s'han relacionat amb embotits assecats els quals necessiten un reservori de nitrats durant un llarg període de temps. Aquestes soques podrien ser ingredients necessaris en l'elaboració de carns curades amb fonts naturals de nitrat, com per exemple els concentrats vegetals, ja que és necessari reduir el nitrat a nitrit per la posterior formació del color (Sebranek & Bacus, 2007). Aquests microorganismes tenen una temperatura òptima d'activitat situada entre 38-42°C, però també poden reduir els nitrats a temperatures entre 15 i 20°C (Casaburi, Blaiotta, Mauriello, Pepe, & Villani, 2005). A més, aquests bacteris iniciadors de la fermentació també asseguren que el nitrat o el

nitrit afegit sigui disminuït, i que per tant, els nitrats i nitrats residuals al producte siguin més baixos (Hammes, 2012).

2.4. DETERMINACIÓ DE LA QUALITAT DEL PRODUCTE FINAL

2.4.1. CARACTERÍSTIQUES MICROBIOLÒGIQUES DEL PRODUCTE FINAL

La vida útil de la carn i dels productes carnis es descriu com el temps d'emmagatzematge fins el seu deteriorament. El deteriorament es pot definir com l'aparició d'aromes, flavors i altres característiques sensorials indesitjables. Tanmateix, la vida útil de la carn també depèn del tipus de microorganismes inicialment presents a la carn, principalment bacteris, i el seu posterior creixement. El número màxim de bacteris permesos en el producte depèn de la legislació de la zona. A Europa aquests màxims venen reglats pel Reglament (CE) No 1441/2007 de la Comissió de 5 de desembre de 2007 que modifica el Reglament (CE) No 2073/2005 relatiu als criteris microbiològics aplicables als productes alimentosos (DOUE, 2007b). Segons aquest reglament els preparats carnis han de tenir absència del gènere *Salmonella* i en el recompte d'*E. coli* (com indicador de contaminador fecal), de cada cinc mostres analitzades només dues poden tenir entre 500 i 5000 ufc/g i les altres tres restants no haurien de superar les 500 ufc/g.

La carn i molts derivats carnis són un substrat ideal per al creixement microbià ja que la carn és rica en proteïnes, vitamines i minerals i té un contingut reduït en hidrats de carboni. El creixement bacterià és influenciat per diferents condicions ambientals: l'embalatge, la temperatura d'emmagatzematge, la composició del producte i la presència de substàncies antimicrobianes (Borch, Kant-Muermans, & Blixt, 1996). Normalment, els productes carnis curats cuits s'emmagatzemen a temperatures de refrigeració envasats al buit o en atmosfera modificada (CO₂ i N₂, normalment 20%:80%). En aquests tipus d'envasaments, la presència d'agents curants i de sal conjuntament amb les condicions microaeròfiles afavoreixen el creixement de bacteris psicròtrofs productors d'àcid làctic (Borch et al., 1996). D'altra banda, s'ha vist que en atmosferes modificades (CO₂ i N₂) el creixement d'enterobacteris, *B. thermosphacta* i llevats està restringit.

La microbiota làctica que es troba freqüentment en productes carnis curats i cuits envasats al buit o en atmosfera modificada consisteix en *Lactobacillus* spp.,

predominantment *L. sake* i *L. curvatus*. També es poden trobar bacteris del gènere *Leuconostoc*, com *L. gelidium*, *L. carnosum* i *L. mesenteroides*. Com que aquests bacteris són els majoritaris en aquests productes, s'han relacionat directament amb el deteriorament (Borch et al., 1996).

Aquest deteriorament està relacionat amb el desenvolupament de sabors àcids o agres que són els principals defectes relacionats amb el flavor produïts al llarg de l'emmagatzematge dels productes carnis envasats al buit o en atmosfera modificada. Aquests són deguts a la producció de l'àcid làctic i fòrmic per part dels bacteris. Els bacteris responsables del deteriorament també poden causar la pèrdua del color típic dels productes carnis curats i cuits. Aquesta decoloració resulta de la reacció del peròxid d'hidrogen, produït per lactobacils heterofermentatius, amb el pigment del curat. Aquesta reacció dona una coloració verdosa al producte, no desitjada pel consumidor. A més, *Lactobacillus* spp. i *Leuconostoc* spp. s'han associat amb la producció d'una substància viscosa composta de monosacàrids com glucosa o galactosa (Korkeala, Suortti, & Makela, 1988) sobre la superfície de productes curats i cuits envasats al buit que indica el principi del deteriorament (Borch et al., 1996).

En els productes carnis curats, l'acció antimicrobiana del nitrit ha estat àmpliament demostrada (Borch et al., 1996). Tant la quantitat afegida de nitrit com la quantitat residual que queda al producte són importants per a la protecció antibotulínica. En les carns curades amb fonts naturals de nitrats el problema recau en el fet que la quantitat exacta formada de nitrit és molt difícil de saber i molt difícil de mesurar, perquè el nitrit reacciona ràpidament amb altres components (Sebranek & Bacus, 2007). Jackson i col·laboradors (2011) va fer un anàlisi comparatiu entre carns curades de forma tradicional i carns curades amb fonts de nitrats naturals quantificant el creixement potencial de *C. perfringens* en aquests productes. Van observar que les carns curades amb fonts naturals de nitrat tenien més potencial de creixement que les curades de forma tradicional amb nitrit de sodi. Per això, les carns curades amb fonts de nitrats naturals podrien necessitar l'addició d'altres mesures de protecció per tal d'estar convenientment protegides enfront dels bacteris patògens. El mateix pot ocórrer si els nivells de nitrats i nitrits addicionats o residuals en el producte són insuficients.

El risc d'intoxicacions alimentàries produïdes degut al consum de carn i productes carnis és elevat. A la carn fresca picada podem trobar bacteris del deteriorament, com

per exemple del gènere *Pseudomonas*, com també bacteris patògens, per exemple enterobacteris (Marshall & Bal'a, 2001). La presència d'aquests bacteris en productes que han estat sotmesos a un tractament tèrmic és conseqüència d'una contaminació posterior, generalment produïda durant la manipulació del producte ja sigui al treure la tripa del producte, tallar-lo o inclús durant l'envasament (Marshall & Bal'a, 2001).

Els productes carnis llescats es poden emmagatzemar en refrigeració durant un cert període de temps, considerant-se aliments processats refrigerats de durabilitat determinada. Per això, les preocupacions microbiològiques principals associades a aquests productes són els microorganismes patògens, tant psicròtrofs com mesòfils, que poden créixer durant l'emmagatzematge prolongat en refrigeració, o bé, si són sotmesos durant l'emmagatzematge o distribució a temperatures superiors a les de refrigeració (Marth, 1998). *Listeria monocytogenes* és un bacil Gram positiu psicròtrof capaç de créixer a temperatures d'entre 2,5° i 44°C. Aquest bacteri ha estat aïllat en diversos productes alimentaris, entre ells, productes carnis curats i també s'ha trobat en tota mena de maquinària i instal·lacions per elaborar aquests productes, causant en els últims anys diversos casos de listeriosi. Per aquest motiu als Estats Units hi ha tolerància zero enfront d'aquest bacteri, tant en productes llestos per al consum com a la maquinària i a les instal·lacions de processament (Toldrà, 2010). Els enterobacteris són anaeròbics facultatius i com a tals poden predominar en productes envasats al buit o bé en atmosferes modificades, i emmagatzemats a temperatures per damunt dels 10°C. No obstant, aquest gènere presenta competitivitat amb bacteris productors de l'àcid làctic, tenint un creixement reduït en temperatures adequades de refrigeració (Marshall & Bal'a, 2001).

Els avenços tecnològics en el processament d'aliments han comportat una major consciència dels problemes relacionats amb la conservació d'aliments i, conjuntament amb l'expansió del comerç mundial d'aliments, la seguretat alimentària s'ha convertit en un problema global. L'anàlisi de perills i punts de control crític (APPCC o HACCP, del nom en anglès *Hazard analysis and critical control points*) és acceptat mundialment com el mètode per assegurar la seguretat dels aliments. De fet l'organització mundial de la salut (OMS o WHO, del nom en anglès *World Health Organization*), ha reconegut la importància d'aquest sistema per a la prevenció d'intoxicacions alimentàries. Amb l'aplicació d'aquest sistema APPCC per part de les indústries alimentàries es poden identificar els perills potencials del procés de producció assegurant així la seguretat dels

productes alimentaris mitjançant mesures preventives. Entre d'altres coses, aquest sistema vetlla per una neteja i sanejament dels equips i instal·lacions i per una higiene personal dels treballadors (de Silva, 2007). Així doncs, mitjançant l'aplicació d'un sistema APPCC es pot reduir aquest risc ja que es duen a terme mesures de prevenció i correctives adequades i factibles a cada etapa de la producció on els perills potencials poden aparèixer. És per això que l'aplicació del sistema APPCC és obligatori en molts països per minimitzar el risc d'intoxicacions alimentàries (Toldrà, 2010).

2.4.2. CARACTERÍSTIQUES FÍSIQUES I QUÍMIQUES DEL PRODUCTE FINAL

2.4.2.1. Color

El color de les carns és degut principalment a la mioglobina i a les formes que aquesta pot prendre durant els processos tecnològics. En general, els pigments produïts durant el curat són estables, però enfront de la llum o la presència d'oxigen poden perdre aquesta estabilitat. Aquest efecte és important sobretot durant l'emmagatzematge i l'exposició als llocs de venda, ja que si les carns estan exposades sota una llum fluorescent potent, o bé, a l'aire, la superfície del producte carni perd color. A la superfície d'aquestes carns curades exposades a l'aire o a la llum es desenvolupa un color marronós. El color i la uniformitat són criteris importants per l'acceptació i compra dels productes carnis, tant frescos com processats (Pegg & Shahidi, 2000).

L'avaluació objectiva del color per reflectància espectrofotomètrica es fa mitjançant el càlcul dels valors triestímuls de la CIE (X, Y, Z) que poden ser matemàticament transformats en coordenades que descriu el color d'una forma més intuïtiva i fàcil. Aquestes coordenades determinen la brillantor i la cromaticitat en els diferents sistemes de mesura (CIE $L^*a^*b^*$, CIE $L^*u^*v^*$, Hunter Lab i XYY). L'avaluació del color de forma instrumental en diferents carnis i productes carnis és econòmica, consumeix poc temps i a més pot permetre al sector industrial l'estandardització del color dels productes (Garcia-Esteban, Ansorena, Gimeno, & Astiasaran, 2003).

En productes carnis s'ha provat el sistema CIE $L^*a^*b^*$, en el que L^* determina la coordenada de brillantor i a^* i b^* la cromaticitat, on a^* pot prendre valors positius (vermell) o negatius (verd) i b^* també pot prendre valors positius (groc) o negatius (blau). La brillantor va ser considerada un dels principals paràmetres per avaluar la qualitat del producte (Ferreira, Fernandes, & Yotsuyanagi, 1994) i el millor predictor de

la intensitat visual del color de curat (Brewer, Zhu, Bidner, Meisinger, & McKeith, 2001). La coordenada de color a^* és el paràmetre més sensible de la mesura de color en carns, ja que caracteritza el color vermell i la seva estabilitat en els productes carnis. L'espai de color CIE $L^*a^*b^*$ pot ser transformat a l'espai de color L^*C^*h , mitjançant les fórmules de la **figura 2-7** els valors del qual són més fàcils de comprendre.

$$h = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \qquad C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$$

Figura 2-7. Fórmules emprades per transformar l'espai de color CIE $L^*a^*b^*$ a l'espai de color L^*C^*h

En l'espai de color L^*C^*h , la L^* representa la lluminositat, la C^* representa la saturació del color i la h l'angle (la tonalitat del color) (**Figura 2-8**). L'eix L^* , que representa la lluminositat, pot prendre valors entre 0, on no hi ha lluminositat (negre), i 100, on hi ha la màxima lluminositat (blanc). L'eix C^* , que representa la saturació del color, pot prendre valors entre 0, que representa al centre del cercle on no hi ha saturació de color (gris neutral, negre o blanc), i 100 on hi ha la saturació completa del color. L'eix h representa l'angle, les unitats del qual estan en graus. El valor de h oscil·la entre valors de 0° que correspondria al vermell, 90° que correspondria al color groc, 180° que correspondria al verd i 270° que correspondria al blau.

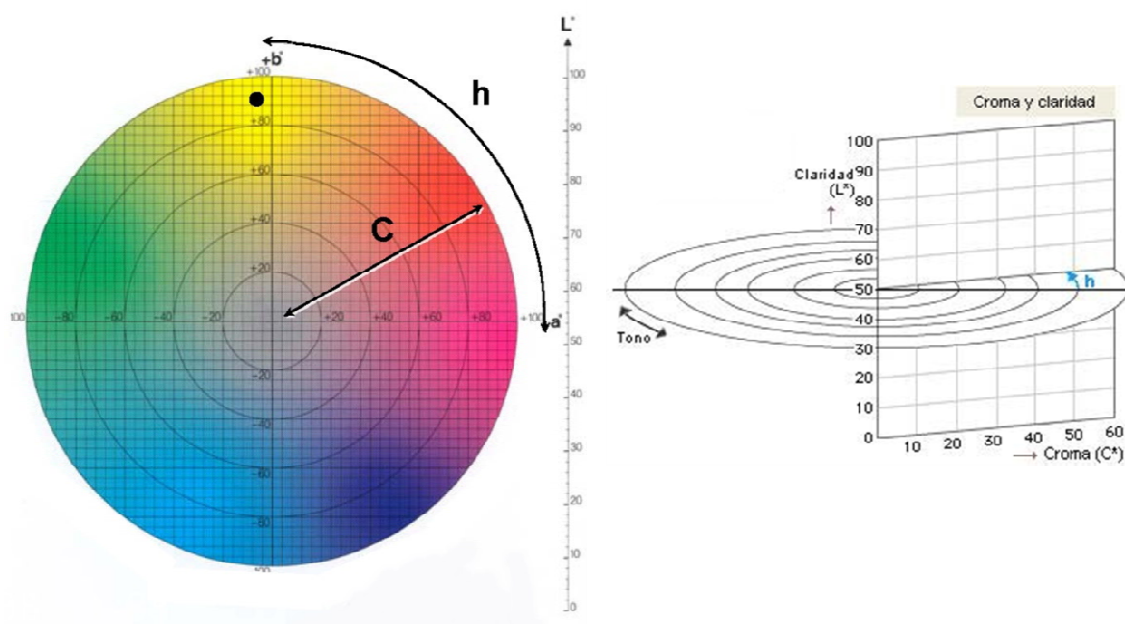


Figura 2-8. Espai de color L^*C^*h (fonts: http://www.lfrivera-itgt.com/2010/05/el-color-en-lch_04.html; Konica Minolta Sensing, INC)

El color vermell de la carn o la quantitat de compostos hemínics (hemoglobina i mioglobina) que presenta una carn o derivat carni curat es pot mesurar per mitjà del mètode de Hornsey (Hornsey, 1956). L'autor va descriure un mètode simple i ràpid per a l'extracció i quantificació de la concentració de pigments hemo presents en productes carnis processats tèrmicament. L'autor va aconseguir una extracció selectiva dels pigments usant una mescla 4:1 d'acetona i aigua on el pigment nitrosohemo tenia una absorció màxima a unes longituds d'ona de 476, 535 i 563 nm. Per quantificar, l'absorbància de l'extracte es va mesurar espectrofotomètricament a 540 nm, i basant-se en el coeficient d'extinció molar ($11,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) es va determinar la concentració del pigment nitrosilhemocrom. Anys després, al 1983, es va comprovar que el mètode era capaç d'extreure tant la nitrosilmioglobina com el nitrosilhemocrom (Pegg & Shahidi, 2000; Wrolstad, 2005). Actualment el mètode de Hornsey es duu a terme per a la quantificació del pigment nitrosilmioglobina i nitrosilhemocrom mitjançant l'extracció amb una solució aquosa d'acetona al 80%, i també per a la determinació de l'eficiència del curat. Per determinar l'eficiència del curat, és necessària la determinació espectrofotomètrica a 640 nm dels pigments hemo totals mitjançant l'extracció amb una solució d'acetona acidificada. L'eficiència del curat es pot calcular utilitzant la fórmula

de la **figura 2-9**. Es considera que un producte carni cuit està ben curat quan aquesta eficiència es troba entre el 80-90% (Wrolstad, 2005).

$$\text{Eficiència de curat (\%)} = \frac{\text{ppm NO - heme}}{\text{ppm hemina total}} \times 100$$

Figura 2-9. Fórmula per al càlcul de l'eficiència del curat en productes carnis curats. On NO-heme és la quantitat de compostos que tenen un grup hemo que ha reaccionat amb l'òxid nítric (nitrosilmioglobina, nitrosilhemocrom) i l'hemina total és el total de compostos amb un grup de ferro hemo.

2.4.2.2. Oxidació

Els processos oxidatius afecten als lípids, als pigments, a les proteïnes, als hidrats de carboni i a les vitamines, és a dir, afecten a la qualitat d'un producte alimentós en general. Tot i així, l'oxidació dels lípids té més repercussió en les característiques de l'aliment i dona lloc a l'aparició de la ranciessa. Per tant, el greix dels productes carnis és susceptible a l'oxidació i per això es requereixen protocols analítics per mesurar la seva qualitat. Hi ha molts mètodes analítics per mesurar l'estat oxidatiu de la carn i els seu contingut en compostos d'oxidació, que van des d'avaluacions sensorials simples a mètodes químics molt més complexos. Els mètodes químics poden ser classificats en dos grups d'acord a si mesuren productes d'oxidació primària o productes d'oxidació secundària.

En les etapes inicials de l'oxidació lipídica es formen hidroperòxids raó per la qual és interessant determinar la quantitat d'aquests en la carn i productes carnis per avaluar-ne l'estat oxidatiu i, per tant, la seva qualitat. Existeixen diversos mètodes per determinar el contingut d'hidroperòxids lipídics en una mostra càrnia. D'entre tots ells, les iodometries tenen poca sensibilitat i importants interferències. La determinació espectrofotomètrica de diens i triens també és senzilla, però presenta problemes d'especificitat, ja que determina qualsevol tipus d'enllaços conjugats independentment de si son hidroperòxids o no.

Una altra manera de determinar els compostos primaris d'oxidació és mitjançant la mesura de l'oxidació del ferro (II) en presència del taronja de xilenol o del tiocianat (Estévez, Morcuende, & Ventanas, 2009). Aquests mètodes són força similars i es basen

en la formació d'un complex cromòfor amb l'ió ferric que resulta de la reducció de l'hidroperòxid (Bou, Codony, Tres, Decker, & Guardiola, 2008). En el cas del mètode del taronja de xilenol es forma un complex de color violeta que pot ser mesurat espectrofotomètricament, amb un màxim d'absorbància comprès entre 550 i 600 nm. El mètode del taronja de xilenol té una alta sensibilitat que fa que sigui àmpliament usat en productes carnis (Grau, Codony, Rafecas, Barroeta, & Guardiola, 2000). La sensibilitat i en especial la selectivitat d'aquests mètodes pot ser millorada per mitjà de tècniques de separació. Actualment hi ha diversos mètodes descrits per la determinació d'hidroperòxids per cromatografia líquida d'alta eficàcia i cromatografia de gasos (Barriuso, Astiasaran, & Ansorena, 2013; Dobarganes & Velasco, 2002). També s'han desenvolupat mètodes cromatogràfics i espectroscòpics, amb alta reproductibilitat, sensibilitat i selectivitat (Dobarganes & Velasco, 2002). No obstant, aquests mètodes no es poden adaptar fàcilment als anàlisis de rutina de productes carnis perquè són costosos i requereixen personal amb molta experiència i un control de les condicions de treball.

Els hidroperòxids són inestables i es poden descompondre en altres compostos d'oxidació secundària, com aldehids o cetones, de pes molecular més baix o reaccionar mitjançant la formació de radicals amb altres compostos i donar lloc a la formació d'oligòmers i polímers. El mètode més freqüentment usat per mesurar l'oxidació lipídica secundària en carns i derivats carnis es basa en la determinació del malondialdehid (MDA), el marcador d'oxidació lipídica més comú en carns, per mitjà de la reacció d'aquest amb l'àcid 2-tiobarbituric (TBA) (Barriuso et al., 2013; Guillen-Sans & Guzman-Chozas, 1998; Hoyland & Taylor, 1991). El malondialdehid, dialdehid compost per 3 carbonis amb els grups carbonils situats a les posicions C₁ i C₃, és un compost d'oxidació secundària present en aliments i en mostres biològiques. El mètode del TBA es basa en la quantificació espectrofotomètrica del complex rosa format després de la reacció del MDA amb dues molècules de TBA (Botsoglou et al., 1994). Existeixen variants d'aquest mètode que, en general, han estat criticades per la seva falta d'especificitat ja que compostos que no són MDA i que són presents a la mostra també poden reaccionar amb el TBA resultant amb un cromòfor amb una banda d'absorció que es pot sobreposar al pic del complex MDA-TBA. És per aquesta raó que molts cops es parla d'índex de TBARS per indicar que el valor es producte de totes les substàncies que reaccionen amb l'àcid 2-tiobarbituric i que poden tenir el seu origen en l'oxidació o no. Per superar aquestes interferències, Botsoglou i els seus col·laboradors

(1994) van proposar un mètode utilitzant la derivada de la lectura espectrofotomètrica. Amb la utilització de la tercera derivada de l'espectre d'absorció s'evita la interferència d'altres complexos que no siguin el complex MDA-TBA. Alhora, amb la tercera derivada de l'espectre d'absorció es minimitza la interferència deguda a possibles terboleses que poden donar mostres amb alt contingut de greix. En aquest mètode és d'utilitat afegir BHT i EDTA durant la preparació de la mostra per evitar la formació de MDA durant l'anàlisi (Grau, Guardiola, Boatella, Barroeta, & Codony, 2000). A més, malgrat totes les limitacions i inconvenients descrits, aquest mètode és àmpliament usat per la seva senzillesa i validesa de resultats.

Hi ha altres aldehids resultants de l'oxidació lipídica que també poden ser usats com a marcadors d'aquesta i ser determinats espectrofotomètricament per mitjà de la seva reacció amb la *p*-anisidina. La falta d'especificitat i la diferent resposta depenent del grau d'insaturació de l'aldehid, fa que la determinació de l'índex de *p*-anisidina pràcticament no sigui usada en carns i els seus derivats. A fi d'evitar aquests inconvenients, s'han usat tècniques cromatogràfiques per millorar l'exactitud, sensibilitat i especificitat en la quantificació d'aquests i d'altres compostos d'oxidació (Barriuso et al., 2013; Estévez et al., 2009; Guardiola, Bou, Boatella, & Codony, 2004).

Durant el transcurs de l'oxidació es produeixen diversos compostos d'elevada volatilitat que són capaços de donar un aroma característic relacionat amb la ranciessa. Per tant, la mesura d'aquests compostos és força important perquè es pot relacionar amb el flavor. Aquests compostos volàtils prèviament s'extreuen de la mostra per mitjà d'extracció amb solvents o per tècniques de partició en l'espai lliure de cap (*head space*) i seguidament es poden determinar per cromatografia de gasos (GC) acoblada a diversos detectors com el d'espectrometria de masses o d'ionització de flama (FID). Els majors inconvenients són les despeses de l'anàlisi i el treball requerit en funció de la tècnica escollida. A més, en alguns casos s'ha descrit una major exactitud i sensibilitat amb el mètode del TBA que extraient els volàtils per mitjà de microextracció en fase sòlida i determinant-los mitjançant GC-FID (Pignoli, Bou, Rodríguez-Estrada, & Decker, 2009).

Més recentment s'han proposat altres mètodes per a l'anàlisi de compostos d'oxidació primaris i secundaris. Alguns d'aquestes mètodes es basen en tècniques espectroscòpiques, com per exemple l'espectroscòpia infraroja amb transformada de

Fourier, la espectroscòpia Raman o bé d'altres que mesuren propietats com la quimioluminescència (Barriuso et al., 2013; Szerk, Stefaniuk, Waszkiewicz-Robak, & Roszko, 2011).

2.4.2.3. Nitrat i nitrit residual

La formació endògena de nitrosamines i el subseqüent impacte negatiu en la salut humana comporta que el control de nitrats i nitrits residuals sigui de gran importància. S'han descrit nombroses tècniques per a la determinació de nitrats i nitrits, que inclouen mètodes de quimioluminescència, anàlisis electroquímics, espectrometria d'absorció atòmica de flama, fluorimetria, espectrofotometria i procediments que usen anàlisi d'injecció de flux amb detecció espectrofotomètrica (Merusi, Corradini, Cavazza, Borromei, & Salvadeo, 2010; Moorcroft, Davis, & Compton, 2001; D. Thomas, Rajith, Lonappan, Issac, & Kumar, 2012).

El mètode més simple i el més usat es basa en la reacció de Griess i la seva detecció espectrofotomètrica. Aquest mètode es basa en la reacció del nitrit en medi àcid per formar una sal de diazoni que acoblada a una amina aromàtica produeix un cromòfor azo (procés anomenat diazotació de Griess). Aquest compost acolorit es determina mitjançant espectrofotometria i d'aquesta manera es pot determinar la concentració de nitrit a la mostra. L'absorció màxima d'aquest cromòfor es situa entre 500 i 600 nm (depenent dels reactius utilitzats). La sulfanilamida, com amina aromàtica, i la naftiletilendiamina, com acoblador, són els reactius majoritàriament utilitzats, els quals donen un producte de reacció amb absorbància a 540 nm. Degut a què el mètode de Griess només és capaç de determinar la quantitat de nitrit, es necessita un pas previ per reduir el nitrat present a la mostra a nitrit i d'aquesta manera poder-lo quantificar. Aquesta reducció es pot dur a terme, per exemple, amb una columna de reducció de Coure-Cadmi. Després de la reducció, el nitrit resultant és determinat pel mètode de Griess (tant el nitrit de la mostra com el nitrit procedent de la reducció del nitrat). La diferència entre aquesta quantificació de nitrit i el nitrit real de la mostra permet calcular la concentració de nitrat present (Moorcroft et al., 2001).

2.4.3. CARACTERÍSTIQUES SENSORIALS DEL PRODUCTE FINAL

La gran varietat de productes carnis existents recau en l'ús de diferents ingredients i additius en la seva formulació, així com en el tipus de processament. Per exemple, les

característiques sensorials desenvolupades en els productes carnis curats produïts únicament amb sal i nitrit de sodi són completament diferents depenent del procés aplicat (cuit, fumat o assecat). L'acceptació per part del consumidor d'un producte carni depèn de les seves característiques sensorials, que inclouen l'aroma, l'aparença, el flavor, la textura, el gust en boca i el so al mastegar. Les diferències entre aquestes característiques permeten distingir els diferents productes entre ells. Aquests aspectes poden ser quantificats mitjançant l'anàlisi sensorial, una eina important per avaluar la qualitat de la carn (Nute, 2002).

L'anàlisi sensorial d'un aliment recau en l'avaluació d'aquest mitjançant l'ús dels sentits (olfacte, vista, tacte, gust, oïda), és a dir, és la tècnica que posa de relleu i descriu les propietats organolèptiques d'un producte mitjançant els òrgans dels sentits, i per tant, introdueix l'ésser humà per a l'avaluació de la qualitat d'un aliment. L'anàlisi sensorial es pot dividir en dues categories principals, l'analític i el de consum o hedònic. El mètode analític, realitzat per un panell de tastadors entrenat, descriu les característiques d'un producte, les quals explicaran l'elecció del consumidor. La prova hedònica pot descriure l'acceptació per part del consumidor cap a un producte, la preferència dels consumidors per a un producte específic sobre els altres, i a vegades el grau de plaer causat pel producte (Meilgaard, Civille, & Carr, 1991; Zawirska-Wojtasiak, 2012).

Les proves sensorials analítiques es duen a terme mitjançant un grup de persones, anomenat panell de tastadors entrenats, que determinaran les característiques sensorials del producte alimentari a analitzar. Per tant, el primer pas en aquest tipus d'anàlisi és organitzar aquest panell de tastadors. Per escollir les persones que en formaran part, aquestes es sotmeten a proves per determinar l'habilitat individual per descriure i avaluar sabors, olors i textures (Nute, 2002). Un cop escollides aquelles persones adequades per formar part del panell de tastadors, s'han d'entrenar en aquelles característiques desitjades a diferenciar en el producte. El panell de tastadors serà entrenat per a familiaritzar-se amb els procediments de les proves, per millorar les habilitats individuals alhora de reconèixer i identificar característiques sensorials, i millorar la sensibilitat i la memòria per les característiques sensorials (Cross, Moen, & Stanfield, 1978). D'aquesta manera el panell de tastadors serà precís i exacte.

L'entrenament es duu a terme mitjançant sessions individuals i de grup en les quals diferents mostres del producte són subministrades per tal d'avaluar-les i discutir els

resultats obtinguts. Aquesta discussió s'usa per evitar malentesos en l'avaluació de mostres i arribar a un consens. Cada sessió d'entrenament, que dura entre una hora i una hora i trenta minuts, s'usa per descriure la qualitat d'un sol atribut. Per exemple, una sessió podria servir per situar tres carns amb diferent tendresa dins una escala de 8 punts (Cross et al., 1978). Després de l'entrenament, el número de sessions del qual pot ser variable (Cross et al., 1978), el panell es sotmet a avaluacions perquè el líder d'aquest panell determini els resultats de l'entrenament i identifiqui si hi ha problemes específics individuals en discernir les qualitats sensorials (Cross et al., 1978).

L'avaluació sensorial de l'aliment es pot iniciar immediatament després d'acabar l'entrenament. Durant l'avaluació, el panell ha d'estar aïllat de qualsevol distracció i per tant s'ha de dur a terme en sales especials on cada tastador està assegut separatament dels altres, i a més, es controlen la llum i la ventilació. Les mostres oferides han de ser uniformes, s'han de servir a la mateixa temperatura i en envasos nets i sense olor. És recomanable també que aquestes mostres estiguin codificades amb tres dígitos aleatoris (Nute, 2002).

Tot i així, quan es desenvolupa un nou producte el primer que s'hauria de plantejar el productor és si agradarà al consumidor. Per respondre aquesta pregunta cal realitzar una prova de consumidors (Zawirska-Wojtasiak, 2012). La prova requereix d'un panell de consumidors que representi la població a la qual anirà destinat el producte, per exemple persones que el consumeixin de forma freqüent, o que representin un segment del seu mercat potencial. El coneixement de la resposta dels consumidors en relació a les característiques sensorials d'un producte alimentós és de vital importància per entendre la tria d'un producte concret. Els resultats d'aquesta prova s'haurien de poder relacionar amb els atributs sensorials del producte avaluat per un panell de tastadors entrenat. L'èxit del producte depèn molts cops de les proves sensorials (Zawirska-Wojtasiak, 2012).

Hi ha diferents mètodes per dur a terme les proves de consumidors, també anomenades d'avaluació sensorial afectiva, que es poden dividir en dues grans categories: proves de preferència i proves d'acceptabilitat o amb escales hedòniques. Les proves per a consumidors haurien de ser simples, comprensibles i que no requereixin coneixements especials en proves sensorials. La prova de consumidors més simple és la comparació de parelles per estimar quina seria la seva preferència. En aquesta prova al consumidor

se li presenten dues mostres i ha d'escollir quina de les dues li agrada més. En la prova de classificació, el consumidor classifica diverses mostres (més de dues), d'acord amb el grau de preferència. Les proves d'acceptabilitat utilitzen habitualment una escala de nou punts per estimar el grau d'agradabilitat d'un producte, sense requerir un entrenament previ. El punt número 1 d'aquesta escala correspondria a l'avaluació "no m'agrada gens", i el punt número 9 de l'escala correspondria a l'avaluació "m'agrada molt" (Zawirska-Wojtasiak, 2012).

L'acceptació o la preferència del consumidor depèn de diversos motius tan relacionats amb el producte com amb el consumidor (fisiològic, psicològic, econòmic). Tanmateix, les característiques que un producte ha de tenir per entrar al mercat venen tot sovint determinades pels hàbits de consum d'aliments. És per això que les actituds dels consumidors cap als productes i l'elecció d'aquests són de gran importància i s'han de tenir en compte alhora d'establir relacions entre la informació extreta dels potencials compradors i la qualitat sensorial de l'aliment. Per això, el nombre de tastadors utilitzats en una prova per a consumidors és important, així com també ho són les seves característiques (edat, sexe, etc.) (Zawirska-Wojtasiak, 2012).

2.5. ELS PRODUCTES ECOLÒGICS: MARC LEGAL

L'agricultura ecològica es pot definir d'una forma senzilla com un compendi de tècniques agràries que normalment exclouen l'ús, tant en l'agricultura com en la ramaderia, de productes químics de síntesi, com fertilitzants, plaguicides o antibiòtics, amb l'objectiu de preservar el medi ambient, mantenir o augmentar la fertilitat del sòl i proporcionar aliments amb totes les seves propietats naturals (DOUE, 2007a).

L'agricultura ecològica és regulada legalment a Espanya des de l'any 1989 amb l'aprovació del Reglament de la Denominació Genèrica "Agricultura Ecològica", que va ser d'aplicació fins l'entrada en vigor del Reglament (CEE) 2092/91 sobre la producció agrícola ecològica i la seva indicació en els productes agraris i alimentosos. Actualment, des de l'1 de gener de 2009, la producció ecològica es regula mitjançant el Reglament (CE) 834/2007 del Consell sobre producció i etiquetatge dels productes ecològics que deroga el Reglament (CEE) número 2092/91, en aquest reglament s'inclou també la normativa per les importacions de productes ecològics procedents de tercers països. A més, les disposicions d'aplicació del Reglament (CE) 834/2007 sobre producció,

etiquetatge i control dels productes ecològics es regulen mitjançant el Reglament (CE) 889/2008 de la Comissió.

Segons el Reglament (CE) No 834/2007 (DOUE, 2007a) l'agricultura ecològica té tres objectius fonamentals. El primer és assegurar un sistema viable de gestió agrària que respecti els sistemes i els cicles naturals i preservi i millori la salut del sòl, l'aigua, les plantes i els animals i l'equilibri entre ells; que contribueixi a assolir un alt grau de biodiversitat; que faci un ús responsable de l'energia i dels recursos naturals com l'aigua, el sòl, les matèries orgàniques i l'aire, i que compleixi rigoroses normes de benestar animal i respongui a les necessitats de comportament pròpies de cada espècie. El segon objectiu de l'agricultura ecològica és obtenir productes d'alta qualitat. Per últim, l'agricultura ecològica vol obtenir una àmplia varietat d'aliments i altres productes agrícoles que responguin a la demanda dels consumidors de productes obtinguts mitjançant processos que no danyin el medi ambient, la salut humana, la salut i el benestar dels animals i la salut de les plantes.

Per assolir aquests objectius, s'han establert principis i normativa per l'agricultura, la ramaderia i els productes ecològics processats. Quant als productes ecològics processats, aquests han de ser sotmesos a mètodes que garanteixin la integritat ecològica i les qualitats essencials del producte durant totes les etapes de la cadena de producció. Aquests productes només podran ser etiquetats com ecològics quan tots o la majoria dels ingredients que en formin part siguin ecològics (com a mínim el 95% dels ingredients agraris han de ser ecològics).

Amb la finalitat de garantir als consumidors la transparència en el mercat comunitari, el logotip de la Unió Europea (UE) és obligatori a tots els aliments ecològics envasats produïts a la comunitat. D'altra banda, per evitar pràctiques fraudulentess i qualsevol possible confusió dels consumidors sobre l'origen comunitari o no comunitari del producte, sempre que s'utilitzi el logotip UE s'informarà als consumidors del lloc on es van obtenir les matèries primeres agràries que componen els productes .

L'article 6 del Reglament (CE) No 834/2007 (DOUE, 2007a) anomena uns principis específics en els quals es basa la transformació d'aliments per a la denominació ecològica. Segons aquest article, la producció d'aliments ecològics es fa a partir d'ingredients agraris ecològics, excepte quan al mercat no es disposi d'ingredients en la seva variant ecològica. A més es restringeix al mínim l'ús d'additius alimentaris i

d'ingredients no ecològics que tinguin funcions fonamentalment tècniques i sensorials, així com d'oligoelements i coadjuvants tecnològics, de manera que s'utilitzin en la menor mesura possible i únicament en cas de necessitat tecnològica essencial o amb fins nutricionals concrets. També és requerida per a la denominació ecològica l'exclusió de substàncies i de mètodes de transformació que puguin induir a error sobre el veritable origen del producte.

Segons l'article 19 del Reglament CE No 834/2007 (DOUE, 2007a) els productes ecològics s'han d'obtenir principalment a partir d'ingredients d'origen agrari ecològic, tot i que la sal i l'aigua que es puguin afegir al producte no es tindran en compte. A més, no hi podrà haver simultàniament un ingredient ecològic i el mateix ingredient obtingut de forma no ecològica o procedent d'una explotació en fase de conversió. En els productes ecològics transformats únicament es podran utilitzar additius, coadjuvants tecnològics, agents aromatitzants, aigua, sal, preparats de microorganismes i enzims, minerals, oligoelements, vitamines, aminoàcids i altres micronutrients si tenen un ús nutricional específic, o bé, que sense recórrer a ells, és impossible produir o conservar els aliments o complir determinades exigències dietètiques establertes a partir de la legislació comunitària i no es disposen alternatives autoritzades. Cal tenir en compte que totes aquestes substàncies no es consideren substàncies d'origen agrari. A més, l'ús d'aquestes està restringit i podran ser utilitzades quan hagin estat trobades a la natura i hagin patit només processos mecànics, físics (inclosa la destil·lació i l'extracció per dissolvent), biològics, enzimàtics o microbians, llevat que en el mercat no hi hagi quantitats suficients d'aquests productes o substàncies procedents d'aquestes fonts o si la seva qualitat no és adequada (DOUE, 2008). D'igual manera, només es podran utilitzar ingredients agrícoles no ecològics si han estat autoritzats per al seu ús en la producció ecològica.

Tots els aliments transformats han de complir amb la normativa de producció ecològica. Per això els fabricants adoptaran mesures de precaució per evitar el risc de contaminació per substàncies o productes no autoritzats. També aplicaran mesures de neteja adequades, vigilaran la seva eficàcia i garantiran que no es comercialitzaran productes no ecològics que portin denominació que faci referència a un mètode de producció ecològica (DOUE, 2008).

En els productes ecològics, l'ús de determinats productes i substàncies està regulat pel Reglament (CE) 889/2008. A l'annex VIII d'aquest reglament hi ha el llistat de substàncies que poden ser utilitzades en la transformació d'aliments (a excepció del vi). En el cas de la carn i els productes carnis, està autoritzat afegir nitrats i nitrits per produir aliments carnis curats, però amb una concentració límit d'addició. D'igual manera també està regulat el nitrat i nitrit residual en el producte final (**Taula 2-1**).

Taula 2-1. Quantitats de nitrats i nitrits permeses als productes carnis amb denominació ecològica (DOUE, 2008)

Quantitat afegida indicativa expressada com NaNO_2	80 mg/kg
Quantitat afegida indicativa expressada com NaNO_3	80 mg/kg
Quantitat residual màxima expressada com NaNO_2	50 mg/kg
Quantitat residual màxima expressada com NaNO_3	50 mg/kg

El Reglament (CE) 889/2008 contempla l'esforç que han de fer els Estats membre per trobar alternatives segures als nitrats i nitrits i per l'elaboració de programes educatius en matèria de mètodes de transformació i higiene alternatius dirigits als transformadors i fabricants de carn ecològica.

Altres additius permesos en la producció d'aliments ecològics són l'àcid làctic (E270) i el lactat de sodi (E325), usats com a conservants. Aquest últim es pot emprar només en la preparació d'aliments d'origen animal en els quals s'inclouen els productes carnis. L'àcid ascòrbic (E300) i l'ascorbat de sodi (E301) també estan admesos per a la producció ecològica. L'últim s'usa especialment per a productes carnis en combinació amb nitrats i nitrits i sempre i quan no es demostrï que no existeix una altra alternativa tecnològica que ofereixi les mateixes garanties i/o permeti mantenir les característiques específiques del producte.

Finalment en la producció d'aliments processats ecològics està permès l'ús d'extractes vegetals rics en tocoferols, els quals es considerarien ingredients d'origen agrari, per al seu ús com antioxidants en olis i greixos. L'extracte de romaní (E 392), únicament quan derivi de la producció ecològica i només si s'utilitza etanol per a la seva extracció, podrà ser afegit a productes transformats amb denominació ecològica, tan d'origen

animal com vegetal, segons el Reglament d'Execució (UE) No 344/2011 de la Comissió (DOUE, 2011), considerant-se també un ingredient d'origen agrari.

En els aliments ecològics envasats és obligatori l'ús del logotip de la producció ecològica de la Unió Europea que ha de servir als consumidors per identificar de forma ràpida els productes ecològics. El logotip actual de producció ecològica de la Unió Europea (**Figura 2-10**) es regeix pel Reglament (UE) No 271/2010 de la Comissió (DOUE, 2010), i es presenta en dos formats, verd i blanc i negre i blanc. Sempre i quan sigui possible, s'utilitzarà el model verd i blanc. La normativa estableix les mides que ha de tenir el logotip. D'altra banda, el logotip ecològic de la UE es podrà acompanyar d'elements gràfics o texturals referits a l'agricultura ecològica, sempre que aquests elements no modifiquin o canviïn la naturalesa del logotip.

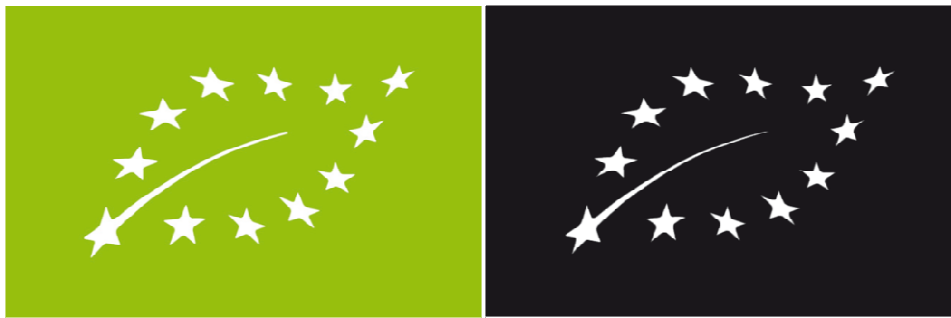


Figura 2-10. Logotip de producció ecològica de la Unió Europea

A Espanya, el control i la certificació de la producció agrària ecològica és competència de les Comunitats Autònomes i es duu a terme majoritàriament per autoritats de control públiques, a través de consells o comitès d'agricultura ecològica territorials que són organismes dependents de les corresponents Conselleries o departaments d'agricultura o directament per direccions generals adscrites a aquests. No obstant, les Comunitats Autònomes d'Andalusia i Castella la Manxa, han autoritzat organismes privats per a la realització d'aquestes funcions i, en el cas d'Aragó, les autoritats competents han designat una autoritat de control pública i han autoritzat alhora organismes de control privats.

Com distintiu perquè el consumidor pugui distingir en el mercat els productes de l'agricultura ecològica, totes les unitats envasades, a més de la seva pròpia marca i alguna de les mencions específiques de l'agricultura ecològica, porten imprès el codi de l'autoritat i organisme de control o un logotip específic, amb el nom i el codi de l'entitat

de control. Tot això significa que la finca o indústria on s'ha produït o elaborat el producte està sotmesa als controls i inspeccions corresponents de la autoritat o de l'organisme establert en la respectiva Comunitat Autònoma. Constitueix, al seu torn, l'única garantia oficial que el producte respon a la qualitat suposada pel consumidor i compleix les normes establertes en el Reglament (CE) 834/2007 i les seves disposicions d'aplicació.

A Catalunya l'organisme de control de l'agricultura ecològica és el Consell Català de la Producció Agrària Ecològica (CCPAE). El CCPAE realitza controls exhaustius als operadors mitjançant auditories dels sistemes de producció i elaboració, i pren mostres dels productes per ser analitzats. D'aquesta manera es garanteix la qualitat d'aquests productes. A Catalunya, el CCPAE és l'únic organisme públic de control i certificació dels productes agraris i alimentaris ecològics, el segell del qual es troba a la **figura 2-11**.



Figura 2-11. Segell per a la certificació del Consell Català de la Producció Agrària Ecològica

3. OBJECTIUS

Un dels aspectes interessants del projecte rau en l'escassetat de treballs d'investigació relacionats amb la qualitat de productes ecològics elaborats a partir de carn de porc com és el cas dels productes carnis curats. Entre aquests darrers, hi ha alguns productes curats i secs d'elevat valor comercial i molt apreciats pel consumidor, com és el pernil, el llom, el xoriço o la llonganissa, o bé curats i cuits molt consumits, com el pernil cuit. A més, la demanda creixent de productes ecològics de qualitat garantida per part del consumidor europeu, fa plantejar al sector productor la necessitat de disposar de bases científicotècniques que permetin una elaboració de productes curats de procedència ecològica amb una estabilitat comercial suficient. Per aquesta raó es planteja l'estudi d'alternatives que, estant autoritzades, incideixin en una millora dels processos i de la qualitat i durabilitat dels productes carnis de procedència ecològica.

Tradicionalment, Espanya és un país eminentment productor de derivats del porc, però el seu naixent i encara poc desenvolupat sector de producció ecològica planteja dificultats i nous reptes per als productors. Un dels principals problemes en l'elaboració de productes carnis de procedència ecològica es deu a la restricció en l'addició de nitrats i nitrits (en ambdós casos, 80 mg/kg) i altres additius no autoritzats (DOUE, 2008). Les restriccions normatives a què es sotmeten els productes amb denominació ecològica podrien afavorir l'aparició de defectes de qualitat no gaire habituals en embotits elaborats de manera convencional en què la quantitat màxima permessa de nitrats/nitrits pot arribar als 150-250 mg expressats en forma de NaNO_2/kg o NaNO_3/kg depenent del tipus de producte (BOE número 221, 2007). Aquest fet comporta la necessitat de dissenyar estudis específics centrats en l'efecte de diverses formulacions i processos d'elaboració que poden incidir en la qualitat dels embotits curats elaborats amb carn de porc ecològica. D'aquesta manera, els resultats obtinguts poden servir per obtenir productes ecològics que tinguin una vida comercial prou llarga i mantinguin unes característiques de qualitat adequades durant tot aquest període.

Tanmateix, al mercat trobem els embotits de producció ecològica en diferents formes i presentacions. És per aquesta raó que l'estudi té en compte quines són les presentacions i condicions d'emmagatzematge més habituals. Pel seu alt valor afegit, és habitual trobar els productes carnis derivats de porc de procedència ecològica envasats al buit o en atmosferes protectores per tal d'allargar-ne la vida útil. Per altra banda, l'ús d'altres estratègies com l'addició d'antimicrobians pot ser una alternativa a tenir en compte. A

més, pot ajudar en la disminució d'algun dels riscos que pot comportar la reducció de nitrats i/o nitrits en els productes derivats de la carn de porc de producció ecològica.

De conformitat amb el que s'ha comentat anteriorment, es van proposar els següents objectius per aquesta tesi doctoral:

- Determinar si concentracions iguals o lleugerament inferiors a les concentracions màximes de nitrats o nitrits permises en la producció de productes carnis ecològics donen lloc a deficiències en els paràmetres de qualitat en el producte.
- Estudiar la possibilitat de substituir els nitrats i nitrits afegits en forma d'additius per fonts alternatives, com els concentrats vegetals rics en nitrats, que poden ser aptes per a la producció de productes ecològics.
- Determinar en quins casos pot ser necessària l'addició de cultius iniciadors de la fermentació amb activitat nitrat reductasa elevada (*S. carnosus*) per, posteriorment, establir les condicions idònies de fermentació d'aquests cultius a fi de reduir substancialment els continguts en nitrats i nitrits residuals i, alhora, obtenir un bon curat de la carn.
- Determinar l'efecte de l'emmagatzematge en els paràmetres de qualitat dels productes curats ecològicament.
- Estudiar l'efecte de l'addició d'un extracte de tocoferols sobre aspectes de qualitat dels productes ecològics curats, particularment sobre el color i el grau d'oxidació.

En el transcurs d'aquesta tesi es va realitzar una estança a l'estranger durant 7 mesos al Departament de Ciència dels Aliments i Biotecnologia de la Universitat de Hohenheim (Stuttgart, Alemanya) al grup liderat pel professor Jochen Weiss. Aquesta estança va servir per a la consecució del següent objectiu:

- Estudiar i comparar l'efecte de certs antimicrobians amb diferent grau d'hidrosolubilitat sobre la microbiota natural de la carn de porc picada amb diferents quantitats de greix.

***4. DISSENY EXPERIMENTAL I
METODOLOGIA***

4.1. JUSTIFICACIÓ DELS EMBOTITS I PRODUCTES CARNIS ESTUDIATS

Catalunya ha estat des de molt antic una zona de producció d'embotits. Aquesta podria ser la raó per la qual hi hagi una gran varietat de productes tan cuits com crus, com curats i sense curar. Alhora, molts d'aquests productes són típics de la gastronomia catalana fet que explica que els menys coneguts fora del nostre àmbit hagin estat poc o gens estudiats.

Tanmateix, dins d'aquesta diversitat tenim productes força coneguts i amb un consum elevat com pot ser la llonganissa. La llonganissa és un embotit cru, curat i fermentat, elaborat amb carn magra de porc i cansalada. Com que es tracta d'un embotit amb un procés de curat llarg, es requereix l'addició de nitrats a la massa càrnia. Independentment del procés, si es vol elaborar una llonganissa de producció ecològica els nivells d'addició de nitrats i nitrits són menors que en la producció convencional (DOUE, 2008) i, en conseqüència, augmenta el risc de pèrdua d'algunes característiques organolèptiques desitjades com pot ser el color vermell característic de la carn curada.

Un altre producte típic de la gastronomia de Catalunya és la botifarra catalana. Es tracta d'un embotit curat i cuit, elaborat a base de carn magra i cansalada viada, a la qual també se li afegeix un agent curant, en aquest cas actualment només està permès el nitrit (BOE número 221, 2007; Dolcet & Pons i Argimon, 2010). Si bé el seu consum no és tan habitual com l'anterior, amb l'elecció d'aquests dos embotits s'intenta abastar el coneixement en el camp dels productes carnis curats, tant crus com cuits. D'altra banda, l'estratègia d'afegir concentrats vegetals rics en nitrat en la formulació d'aquest i d'altres productes pot permetre l'eliminació de fonts de nitrat i/o nitrit en forma d'additius en el seu etiquetatge i, per tant, aconseguir que el producte final sigui més apreciat pel consumidor. A més, anteriorment en el cas particular de la botifarra catalana s'afegien nitrats durant la seva elaboració la qual cosa no està permesa avui en dia (BOE número 221, 2007). Per tant, l'addició de nitrats per mitjà de concentrats vegetals podria permetre a més la recuperació d'algunes pràctiques antigues del processament d'aquest producte i que aquestes conduïssin, finalment, a canvis organolèptics i a la recuperació del flavor més tradicional d'aquest embotit.

Per últim, el consum de carn picada ha crescut molt en les darreres dècades i avui dia és molt habitual. Aquest producte carni és més perible que la carn fresca gràcies a la major

disponibilitat d'aigua i perquè els bacteris que es troben a la superfície de la carn estan distribuïts per tot arreu degut al procés de picat. A més, la carn picada presenta un ràpid deteriorament microbiològic degut a la manca d'antimicrobians a la massa. Aquestes condicions idònies per al creixement de microorganismes fan que la carn picada sigui un bon model per a l'estudi dels antimicrobians en carns i productes carnis.

4.2. DISSENY EXPERIMENTAL

Per poder assolir els objectius establerts es van dissenyar 4 estudis que van ser realitzats durant el transcurs de la tesi. En ells es van produir diferents productes carnis d'acord als dissenys experimentals que s'expliquen a continuació.

4.2.1. PRIMER ESTUDI

El primer estudi es va dur a terme amb llonganisses que es van elaborar a les instal·lacions del gremi de Carnissers, Xarcuters, Cansaladers de Barcelona i Comarques. En aquest estudi es va avaluar la influència de l'addició d'un extracte de tocoferols a la formulació de l'embotit (0 i 200 mg de tocoferols/kg de carn), de dos cultius iniciadors (un cultiu convencional i el mateix cultiu afegit conjuntament amb un cultiu d'*Staphylococcus carnosus* amb activitat nitrata reductasa elevada) i de 4 diferents fonts de nitrat (nitrat de potassi pur o un concentrat d'api, proporcionant ambdós una quantitat equivalent a 70 i 140 mg de NaNO₃/kg) sobre diferents paràmetres de qualitat dels productes carnis curats. Segons aquest disseny factorial 2x2x4 es van elaborar un total de 16 tipus de llonganisses (**Taula 4-1**).

La carn i la resta d'ingredients afegits corresponents es van embotir en tripes naturals i es van deixar madurar i assecat durant 48 dies. Després d'aquest període, les llonganisses es van tallar a llesques i es van envasar en atmosfera modificada (20% CO₂:80% N₂). Les llonganisses es van analitzar a dos temps de conservació diferents (acabades d'elaborar i després de ser conservades a 4 °C durant 45 dies). En conseqüència, el temps d'emmagatzematge es va incloure com a últim factor d'aquest disseny experimental.

Taula 4-1. Disseny experimental del primer estudi.

Tractament	Tocoferols (mg/kg) ^a	Cultiu iniciador ^b	Font de nitrat (origen i dosi en mg/kg) ^c
1	0	Convencional	Concentrat vegetal, 70
2	0	Convencional	Concentrat vegetal, 140
3	0	Convencional	Nitrat de potassi pur, 70
4	0	Convencional	Nitrat de potassi pur, 140
5	0	<i>S. carnosus</i>	Concentrat vegetal, 70
6	0	<i>S. carnosus</i>	Concentrat vegetal, 140
7	0	<i>S. carnosus</i>	Nitrat de potassi pur, 70
8	0	<i>S. carnosus</i>	Nitrat de potassi pur, 140
9	200	Convencional	Concentrat vegetal, 70
10	200	Convencional	Concentrat vegetal, 140
11	200	Convencional	Nitrat de potassi pur, 70
12	200	Convencional	Nitrat de potassi pur, 140
13	200	<i>S. carnosus</i>	Concentrat vegetal, 70
14	200	<i>S. carnosus</i>	Concentrat vegetal, 140
15	200	<i>S. carnosus</i>	Nitrat de potassi pur, 70
16	200	<i>S. carnosus</i>	Nitrat de potassi pur, 140

^a Suma dels diferents tocoferols en mg/kg de massa càrnia. L'extracte de tocoferols conté α -, β -, γ - i δ -tocoferol a les concentracions de 82 ± 2 , $8,2\pm 0,3$, 293 ± 9 i 110 ± 2 g/kg d'extracte, respectivament.

^b El cultiu iniciador convencional inclou *Lactobacillus sakei* i *Staphylococcus xylosus*. El cultiu iniciador convencional també va ser afegit a tots els tractaments que contenen *Staphylococcus carnosus*.

^c Addició de nitrat de potassi pur o del concentrat d'api ric en nitrats proporcionant en ambdós casos dosis equivalents a 70 o 140 mg de NaNO_3/kg .

4.2.2. SEGON ESTUDI

El segon estudi es va dur a terme amb botifarra catalana que es va elaborar a les instal·lacions del gremi de Carnissers, Xarcuters, Cansaladers de Barcelona i Comarques. En aquest estudi es va avaluar l'efecte de la font de nitrit (nitrit de sodi pur o un concentrat vegetal a base d'api i pastanaga, ric en nitrats, proporcionant ambdós una quantitat equivalent a 80 mg de NaNO_2/kg) i el temps de fermentació requerit per *S. carnosus* (6 hores, 12 hores i 24 hores, a 16 °C) per reduir suficientment el nitrat a nitrit sobre diferents paràmetres de qualitat dels productes carnis curats i cuits. Segons aquest

disseny factorial 2x3 es van elaborar un total de 6 tipus de botifarres catalanes (**Taula 4-2**).

Taula 4-2. Disseny experimental del segon estudi.

Tractament	Font de nitrit (80 mg/kg) ^a	Temps de Fermentació ^b
1	Nitrit de sodi pur	6
2	Nitrit de sodi pur	12
3	Nitrit de sodi pur	24
4	Concentrat vegetal	6
5	Concentrat vegetal	12
6	Concentrat vegetal	24

^a Addició de nitrit de sodi pur (NaNO₂) o concentrat vegetal a base d'api i pastanaga, ric en nitrats, proporcionant una dosi equivalent a 80 mg NaNO₂/kg.

^b Indica el temps (6, 12 o 24 hores) a 16 °C que s'ha deixat fermentar la botifarra en presència de *Staphylococcus carnosus* i d'un cultiu iniciador bioprotector (*Lactobacillus sakei* i *Staphylococcus xylosus*) abans de coure.

Un cop cuites, aquestes botifarres van ser dividides en diferents peces que en acabat van ser envasades al buit, pasteuritzades i emmagatzemades a 4 °C durant 0, 60, 120 i 180 dies per la seva posterior anàlisi, afegint d'aquesta manera un tercer factor al disseny experimental.

4.2.3. TERCER ESTUDI

En aquest estudi es va elaborar de nou botifarra catalana a les instal·lacions del gremi de Carnissers, Xarcuters, Cansaladers de Barcelona i Comarques per tal de continuar i ampliar l'estudi anterior. L'objectiu d'aquest estudi va ser avaluar l'efecte de l'addició d'un extracte de tocoferols (0 i 200 mg de tocoferols/kg), 3 tipus diferents de fermentació (tipus A: 12 hores a 16 °C amb un cultiu iniciador bioprotector i un altre amb activitat nitrat reductasa elevada; tipus B: 12 hores a 4 °C amb un cultiu iniciador amb activitat nitrat reductasa elevada; tipus C: 12 hores a 4 °C sense cultius iniciadors afegits) i dos fonts diferents de nitrit (nitrit de sodi pur o bé un concentrat vegetal a base d'api i pastanaga, ric en nitrats, ambdós proporcionant una quantitat equivalent a 70 mg NaNO₂/kg) sobre els paràmetres de qualitat d'un producte carni curat i cuit, com és la botifarra catalana. D'acord amb aquest disseny factorial 2x3x2 es van elaborar un total de 12 tipus de botifarres catalanes (**Taula 4-3**).

Aquestes botifarres van ser envasades al buit, cuites senceres i en acabat emmagatzemades a 4 °C durant 0, 60 i 120 dies per la seva posterior anàlisi, afegint així un factor més al disseny experimental (temps d'emmagatzematge).

Taula 4-3. Disseny experimental del tercer estudi.

Tractament	Tocoferols (mg/kg) ^a	Tipus de fermentació ^b	Font de nitrit ^c
1	200	A	Nitrit de sodi pur
2	200	A	Concentrat vegetal
3	200	B	Nitrit de sodi pur
4	200	B	Concentrat vegetal
5	200	C	Nitrit de sodi pur
6	200	C	Concentrat vegetal
7	0	A	Nitrit de sodi pur
8	0	A	Concentrat vegetal
9	0	B	Nitrit de sodi pur
10	0	B	Concentrat vegetal
11	0	C	Nitrit de sodi pur
12	0	C	Concentrat vegetal

^a Suma dels diferents tocoferols en mg/kg de massa càrnia. L'extracte de tocoferols contenia: α -, β -, γ - i δ -tocoferol a les concentracions de 82±2, 8.2±0.3, 293±9, i 110±2 g/kg d'extracte, respectivament.

^b Tres tipus diferents de fermentació, on A significa 12 hores a 16 °C contenint un cultiu iniciador bioprotector (*Lactobacillus sakei* i *Staphylococcus xylosus*), i un cultiu amb activitat nitrat reductasa (*Staphylococcus carnosus*); B significa 12 hores a 4 °C amb cultiu iniciador amb activitat nitrat reductasa (*Staphylococcus carnosus*), i C significa 12 hores a 4 °C sense bacteris iniciadors de la fermentació.

^c Addició de nitrit de sodi pur o bé concentrat vegetal a base d'api i pastanaga, ric en nitrats, proporcionant una dosi equivalent a 70 mg NaNO₂/kg.

4.2.4. QUART ESTUDI

L'últim estudi realitzat en carn picada de porc es va dur a terme a les instal·lacions que disposa la Universitat de Hohenheim (Stuttgart, Alemanya) per a la producció de productes carnis. L'objectiu d'aquest estudi va ser avaluar l'activitat antimicrobiana de tres antimicrobians diferents que presenten diversa hidrosolubilitat (metilparabè, lactat de sodi i l'éster d'etil de l'arginat làuric) en carn picada amb diferents quantitats de greix afegit (0, 15 i 50%). Per fer-ho es van addicionar diferents concentracions dels antimicrobians a les masses càrnies, que tenien la microbiota natural de la carn, i

aquestes es van emmagatzemar a 12 °C durant 8 dies en atmosfera modificada (70% O₂ : 30% CO₂) prenent mostra cada dia per tenir l'evolució diària del creixement bacterià. En total es van elaborar un total de 45 tipus de masses càrnies corresponents als dissenys factorials (combinació de la dosi d'antimicrobià amb nivell d'addició de greix) de cada antimicrobià estudiat (**Taules 4-4, 4-5, 4-6**).

Taula 4-4. Disseny experimental del quart estudi realitzat amb metilparabè.

Tractament	Concentració d'antimicrobià (%)^a	Proporció de greix afegit (%)^b
1	0	0
2	0	15
3	0	50
4	0,1	0
5	0,1	15
6	0,1	50
7	0,5	0
8	0,5	15
9	0,5	50
10	1	0
11	1	15
12	1	50
13	2	0
14	2	15
15	2	50

^a Concentració de metilparabè a la massa càrnia en percentatge (p/p).

^b Proporció de greix de porc afegit a la massa càrnia en percentatge (p/p)

Taula 4-5. Disseny experimental del quart estudi realitzat amb lactat de sodi.

Tractament	Concentració d'antimicrobià (%)^a	Proporció de greix afegit (%)^b
1	0	0
2	0	15
3	0	50
4	2	0
5	2	15
6	2	50
7	4	0
8	4	15
9	4	50
10	6	0
11	6	15
12	6	50

^a Concentració de lactat de sodi a la massa càrnia en percentatge (p/p).

^b Proporció de greix de porc afegit a la massa càrnia en percentatge (p/p)

Taula 4-6. Disseny experimental del quart estudi realitzat amb éster d'etil de l'arginat làuric.

Tractament	Concentració d'antimicrobià (%)^a	Proporció de greix afegit (%)^b
1	0	0
2	0	15
3	0	50
4	0,05	0
5	0,05	15
6	0,05	50
7	0,1	0
8	0,1	15
9	0,1	50
10	0,15	0
11	0,15	15
12	0,15	50
13	0,20	0
14	0,20	15
15	0,20	50
16	0,25	0
17	0,25	15
18	0,25	50

^a Concentració d'éster d'etil de l'arginat làuric a la massa càrnia en percentatge (p/p).

^b Proporció de greix de porc afegit a la massa càrnia en percentatge (p/p)

4.3. MOSTRES I DETERMINACIONS REALITZADES

4.3.1. PRIMER ESTUDI

Les llonganisses es van elaborar segons una recepta tradicional del gremi de Carnissers, Xarcuters, Cansaladers de Barcelona i Comarques. Per fer-les es va utilitzar carn del llom (91,7%) i greix dorsal (8,3%) de porc de producció ecològica que es van picar, barrejar i dividir en dues parts iguals. A aquestes dues parts es van afegir 100 mL d'oli de gira-sol, amb o sense extracte de tocoferols (DANISCO, Copenhagen, Dinamarca), corresponent al primer factor del disseny experimental, juntament amb la resta d'ingredients habituals que són: ascorbat de sodi, dextrosa, lactosa, sal, pebre negre

mòlt i un cultiu iniciador convencional (SM-181 Bactoferm que conté *Lactobacillus sakei* i *Staphylococcus xylosum*; CHR Hansen, Hørsholm, Dinamarca). D'aquestes dues masses càrnies (amb i sense extracte de tocoferols) es van obtenir mostres que es van picar (Blixer 3 Robot Coupe, Vincennes, França) i envasar al buit (envasadora Tecnotrip, Terrassa, Espanya) en bosses multicapa d'alta barrera a l'oxigen (Cryovac BB325; 180x200 mm; permeabilitat a l'oxigen $25\text{cm}^3\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{bar}^{-1}$ a 23 °C i 0% d'humitat relativa, DIN 53380) que contenien aproximadament 20 g de carn i aquestes es van emmagatzemar a -25 °C fins a la seva anàlisi.

Les dues masses (amb i sense extracte de tocoferols) es van dividir novament per la meitat, el que va resultar en quatre masses de 12 kg cadascuna, a les quals es van afegir 100 mL d'aigua mineral natural amb o sense el cultiu d'elevada activitat nitrat reductasa (1,33 g de CS 299 Bactoferm que conté *Staphylococcus carnosus*; CHR Hansen, Hørsholm, Dinamarca). Seguidament, les 4 masses van ser subdividides en 4 parts de 3 kg. A cadascuna de les 4 parts, es van afegir 6,9 o 13,8 g del concentrat d'api (CHR Hansen, Hørsholm, Dinamarca) o bé 253 mg o 506 mg de nitrat potàssic pur (99,995%, Suprapur, Merck, Darmstadt, Alemanya), d'acord al disseny experimental (**Taula 4-1**) dissolts prèviament en 50 mL d'aigua doblement desionitzada. Finalment les 16 masses càrnies diferents es van embotir en tripes naturals (40-45 mm de diàmetre). Per comprovar la dosi de nitrat, una mostra de cadascuna de les 16 masses es va picar i envasar al buit en bosses multicapa d'alta barrera a l'oxigen (Cryovac BB325), que contenien aproximadament 20 g de carn i aquestes es van emmagatzemar a -25 °C fins a l'anàlisi de nitrats i nitrits. A més, també es va agafar asèpticament una mostra de cadascuna de les 16 masses per a l'anàlisi microbiològica, i es va mantenir a 4 °C fins a l'anàlisi que va ser iniciat el mateix dia.

Les masses càrnies embotides es van deixar madurar en una cambra a 14 ± 2 °C amb 75-85% d'humitat durant 48 dies. Just després de la maduració i assecat, la meitat de les llonganisses elaborades es van picar i envasar al buit en bosses multicapa d'alta barrera a l'oxigen (Cryovac BB325) que contenien aproximadament 20 g de carn i aquestes es van conservar a -25 °C fins a la seva anàlisi, excepte una part de mostra que es va agafar asèpticament per a l'anàlisi microbiològica i es va mantenir a 4 °C fins a l'anàlisi que va ser iniciat el mateix dia. La resta de llonganisses es van tallar a llesques (de 2 mm de gruix) amb una màquina llescadora i es van envasar en atmosfera modificada (80%N₂ i 20% CO₂; envasadora Tecnotrip, Terrassa, Espanya) durant 45 dies a 4 °C en bosses de

poliester/polietilè metal·litzades (Termopack PETM/PE; 300x200 mm; permeabilitat a l'oxigen, nitrogen i diòxid de carboni era de 50, 10, and 150 $\text{cm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{bar}^{-1}$ a 23 °C i 0% d'humitat relativa, DIN 53380, respectivament) les quals contenien aproximadament 20 llesques per bossa. Transcorreguts els 45 dies, les llesques es van picar, envasar al buit en bosses multicapa d'alta barrera i es van conservar a -25 °C fins a la seva anàlisi. Una part de mostra també es va agafar asèpticament i es va conservar a 4 °C per tal de dur a terme les anàlisis microbiològiques, realitzades el mateix dia.

Les determinacions dutes a terme a les mostres de llonganissa van ser les següents:

- Anàlisis microbiològiques, on s'inclou el recompte de: *Escherichia coli*, clostridis sulfat reductors, *Salmonella*, bacteris productors d'àcid làctic i estafilococs (Bell, Neaves, & Williams, 2005; DOUE, 2007b; Pascual Anderson & Calderón y Pascual, 2000).
- Determinació de la humitat segons el procediment ISO 1442 (ISO, 1997).
- Determinació de la concentració residual de nitrats i nitrits (basat en el mètode de Griess) (Magrinya et al., 2009).
- Determinació del color (*CIE L*a*b**)
- Determinació dels tocoferols i tocotrienols (Nuchi et al., 2009).
- Determinació de l'estat oxidatiu i de la susceptibilitat a la oxidació del producte carni mitjançant el mètode del taronja de xilenol (adaptat de Grau, Codony, Rafecas, Barroeta, & Guardiola, 2000; Tres, Daniela Nuchi, Bou, Codony, & Guardiola, 2009) i la prova de l'àcid tiobarbitúric (TBA) (Grau, Guardiola, Boatella, Barroeta, & Codony, 2000)
- Anàlisis sensorials on s'inclou una prova d'acceptabilitat global, una prova triangular per al color i una darrera prova de classificació de la intensitat del color (Bou et al., 2001; Jellinek, 1985)

D'altra banda, també es van dur a terme diverses determinacions per caracteritzar les masses càrnies:

En les dues masses inicials (amb i sense extracte de tocoferols):

- Determinació de la humitat segons el procediment ISO 1442 (ISO, 1997).
- Determinació del contingut en greix segons el mètode oficial 991.36 de l'AOAC (AOAC International, 2000).

- Determinació de la composició en àcids grassos mitjançant cromatografia de gasos acoblada a un detector d'ionització de flama (CG-FID; adaptat de Bou, Codony, Tres, Baucells, & Guardiola, 2005; Guardiola, Bou, Boatella, & Codony, 2004).
- Determinació dels tocoferols i tocotrienols (Nuchi et al., 2009).

En les 16 masses finals:

- Anàlisis microbiològiques, on s'inclou el recompte de: *Escherichia coli*, clostridis sulfat reductors, *Salmonella*, bacteris productors d'àcid làctic i estafilococs (Bell et al., 2005; DOUE, 2007; Pascual Anderson & Calderón y Pascual, 2000).
- Determinació de la concentració residual de nitrats i nitrits (basat en el mètode de Griess) (Magrinya et al., 2009).

4.3.2. SEGON ESTUDI

Per a l'elaboració de les botifarres catalanes, es van preparar primerament les dues masses càrnies, una per a cadascuna de les fonts de nitrit emprades: nitrit de sodi (99,6% de puresa; Merck, Darmstadt, Alemanya), o bé concentrat vegetal ric en nitrats a base d'api i pastanaga (Natasy CC227; CHR Hansen, Hørsholm, Dinamarca). En cadascuna d'aquestes masses la quantitat de nitrit de sodi o de concentrat vegetal afegit equivalia a 80 mg de NaNO_2/kg . Les quantitats de carn i greix ecològics que contenien les masses estaven d'acord a la recepta tradicional emprada (50 g/kg de carn magra de porc, espatlla, i 100 g/kg de greix de porc, papada sense corna). Quan la carn i el greix estaven picats i homogeneïtzats, es van afegir a la massa càrnia la sal, el pebre negre mòlt i la dextrosa, i després d'homogeneïtzar aquests ingredients dins la massa càrnia, es va addicionar la font de nitrit corresponent. Posteriorment, es van afegir els cultius iniciadors de la fermentació B-FM Safe Pro (*Staphylococcus xylosus* i *Lactobacillus sakei*) i CS-300 (*Staphylococcus carnosus*) de CHR Hansen (Hørsholm, Dinamarca) conjuntament amb l'ascorbat de sodi. Per a la caracterització de la carn utilitzada, es va prendre mostra de les dues masses preparades, es van picar (Blixer 3 Robot Coupe, Vincennes, França), es van envasar al buit (envasadora Tecnotrip, Terrassa, Espanya) en

bosses multicapa d'alta barrera a l'oxigen (Cryovac BB325) que contenen aproximadament 20 g de carn i es van conservar a -25 °C fins al moment de l'anàlisi.

Les masses elaborades es van dividir en tres parts i es van embotir en tripes naturals de 50-55 mm de diàmetre. De cada part, es van elaborar 2 botifarres d'aproximadament 1200 g per l'anàlisi química i física (tractades com a duplicats) i 5 botifarres de 500 g cadascuna destinades a l'anàlisi microbiològica i sensorial. Les 7 botifarres elaborades per a cada tractament es van deixar fermentar 6, 12 o 24 hores en una cambra a 16 °C amb una humitat del 95% d'acord amb el disseny experimental (**Taula 4-2**). Transcorregut el temps de fermentació, es va prendre mostra asèpticament i es va guardar a 4 °C per fer l'anàlisi microbiològica l'endemà. Paral·lelament, les botifarres es van coure en una marmita amb 50 L d'aigua, 200 g de sal i 1 L de caldo vegetal comercial. El programa de temperatura seguit per a la cocció va ser el següent: primer, es van escalfar les botifarres a 40 °C durant dues hores, passades aquestes dues hores, es va pujar la temperatura a 60 °C i aquesta temperatura es va mantenir durant dues hores més, i per últim, es va pujar la temperatura de l'aigua de la marmita fins aconseguir una temperatura interna del producte de 68 °C.

Després de la cocció de les botifarres catalanes, destinades a determinacions químiques i del color es van dividir en quatre parts d'aproximadament 300 g. Aquestes 4 parts i les botifarres destinades a l'anàlisi sensorial es van envasar al buit individualment en bosses d'alta barrera a l'oxigen (Cryovac HT3050; 325 x 550 mm; permeabilitat a l'oxigen, $15\text{cm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{dia}^{-1} \cdot \text{bar}^{-1}$ a 23 °C i 0% d'humitat relativa) que contenen aproximadament 500 g de botifarra i aquestes es van pasteuritzar a 80 °C durant 25 minuts amb una humitat relativa del 99% (Convotherm OSP; Eglfing, Alemanya). Finalment, les botifarres catalanes pasteuritzades destinades a l'anàlisi sensorial es van emmagatzemar a 4 °C durant 60 dies, i aquelles per a dur a terme les determinacions químiques i físiques es van emmagatzemar a 4 °C durant 0, 60, 120 i 180 dies. Aquestes últimes botifarres, i després de passar el període d'emmagatzematge corresponent, es van picar i envasar al buit en bosses multicapa d'alta barrera (Cryovac BB325) que contenen aproximadament 20 g de carn i aquestes es van emmagatzemar a -25 °C fins a la seva anàlisi.

Les determinacions dutes a terme en les mostres de botifarres catalanes van ser les següents:

- Determinació de la humitat segons el procediment ISO 1442 (ISO, 1997).
- Determinació de la concentració residual de nitrats i nitrits (basat en el mètode de Griess) (Magrinya et al., 2009).
- Determinació del color (*CIE L*a*b** i *L*C*h*)
- Determinació dels pigments del curat i els pigments totals mitjançant el mètode de Hornsey (Wrolstad, 2005).
- Determinació dels tocoferols i tocotrienols (Nuchi et al., 2009)
- Determinació de l'estat oxidatiu i de la susceptibilitat a la oxidació del producte carni mitjançant el mètode del taronja de xilenol (adaptat de Grau et al., 2000; Tres et al., 2009) i la prova de l'àcid tiobarbitúric (TBA) (Grau, Guardiola et al., 2000).
- Anàlisis sensorials on s'inclou una prova d'acceptabilitat global (Bou et al., 2001; Jellinek, 1985).

D'altra banda, també es van dur a terme varies determinacions per caracteritzar les masses càrnies:

En les dues masses inicials:

- Determinació de la humitat segons el procediment ISO 1442 (ISO, 1997).
- Determinació del contingut en greix segons el mètode oficial 991.36 de l'AOAC (AOAC International, 2000)
- Determinació de la composició en àcids grassos mitjançant CG-FID (adaptat de Bou et al., 2005; Guardiola et al., 2004).
- Determinació de la concentració residual de nitrats i nitrits (basat en el mètode de Griess) (Magrinya et al., 2009).
- Determinació dels tocoferols i tocotrienols (Nuchi et al., 2009).
- Determinació del pH.

En les 6 masses fermentades abans de coure:

- Anàlisis microbiològiques, on s'inclou el recompte de bacteris productors d'àcid làctic i estafilococs (Bell et al., 2005; DOUE, 2007; Pascual Anderson & Calderón y Pascual, 2000).

- Determinació del pH.

4.3.3. TERCER ESTUDI

L'elaboració de les botifarres catalanes del tercer estudi es va dur a terme seguint una recepta tradicional proporcionada pel gremi de Carnissers, Xarcuters, Cansaladers de Barcelona i Comarques. Primerament, la carn magra picada (40,8 kg d'espalla) i el greix picat (4,8 kg de papada sense corna), ambdós procedents de porc ecològic, es van barrejar, homogeneïtzar i dividir en dues parts de 22,8 kg cadascuna. D'aquestes dues masses càrnies es van agafar asèpticament 50 g de cada part i es van guardar a 4° C per fer les anàlisis microbiològiques l'endemà. Posteriorment, a cada part es van afegir els ingredients comuns (sal, pebre blanc mòlt i dextrosa) i 100 mL d'oli de gira-sol amb o sense extracte de tocoferols (DANISCO, Copenhagen, Dinamarca). Per a la caracterització química de les masses càrnies inicials es van agafar mostres d'aquestes, es van picar finament (Blixer 3 Robot Coupe, Vincennes, França), es van envasar al buit (envasadora Tecnotrip, Terrassa, Espanya) en bosses multicapa d'alta barrera a l'oxigen (Cryovac BB325) que contenien aproximadament 20 g de carn i aquestes es van conservar a -25 °C fins al moment de l'anàlisi.

Cada part de 22,8 kg es va subdividir en tres, resultant en 6 parts de 7,8 kg cadascuna. A aquestes parts es van afegir 0,25 g/kg del cultiu iniciador de la fermentació bioprotector que contenia *Staphylococcus xylosus* i *Lactobacillus sakei* (B-FM SafePro; CHR Hansen, Hørshom, Dinamarca) i 0,25 g/kg del cultiu iniciador de la fermentació, *Staphylococcus carnosus*, amb activitat nitrat reductasa elevada (CS-300 BactoFerm; CHR Hansen, Hørshom, Dinamarca) d'acord al disseny experimental (**Taula 4-3**). Cadascuna de les sis parts van ser finalment dividides en dues, resultant en 12 masses càrnies de 3,88 kg. D'aquestes 12 parts es van prendre mostres asèpticament i es van guardar a 4°C per fer l'anàlisi microbiològica al dia següent.

A les 12 masses càrnies es va afegir 50 mL d'una dissolució de nitrit de sodi pur (5,66 mg NaNO₂/mL; 99,6%, Merck, Darmstadt Alemanya) o bé de concentrat vegetal ric en nitrats a base d'api i pastanaga (0.26 g/mL; Natasy CC 227, CHR Hansen, Hørshom, Dinamarca) i l'àcid ascòrbic. Es van agafar mostres d'aquestes masses càrnies i es van picar finament, envasar al buit en bosses multicapa d'alta barrera a

l'oxigen (Cryovac BB325) que contenen aproximadament 20 g de carn i conservar en congelació per a l'anàlisi de nitrats i nitrits residuals. Les dotze masses càrnies es van embotir en tripes naturals de 50-55 mm de diàmetre, pesant cada botifarra uns 500 g, i es van fermentar a diferents temperatures (16 °C o 4 °C) durant 12 hores segons el disseny experimental (**Taula 4-3**). Després d'aquest període, es van prendre mostres asèpticament i es van guardar a 4 °C per fer l'anàlisi microbiològica l'endemà. Seguidament les botifarres es van envasar al buit (Cryovac® HT3050; 325 x 550 mm; permeabilitat a l'oxigen, $15\text{cm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{dia}^{-1} \cdot \text{bar}^{-1}$ a 23 °C i 0% d'humitat relativa) i es van coure en una marmita amb 50 L d'aigua. El programa de temperatura per coure les botifarres catalanes va ser el següent: primer, es van escalfar les botifarres a 40 °C durant dues hores, passades aquestes dues hores, es va pujar la temperatura a 60 °C i a aquesta temperatura es va mantenir dues hores més, i per últim, es va pujar la temperatura de l'aigua de la marmita fins aconseguir una temperatura interna del producte de 72 °C. Després de la cocció les botifarres catalanes es van refredar i es van emmagatzemar a 4 °C durant 0, 60 i 120 dies. Després del període d'emmagatzematge corresponent les botifarres catalanes es van picar i envasar al buit en bosses multicapa d'alta barrera (Cryovac BB325; aproximadament 20 g de carn/bossa) i es van emmagatzemar a -25 °C fins a la seva anàlisi. A més, es va realitzar una prova d'acceptabilitat global amb les botifarres catalanes envasades al buit emmagatzemades durant 60 dies a 4 °C.

Les determinacions dutes a terme en les mostres de botifarra catalanes van ser les següents:

- Determinació de la humitat segons el procediment ISO 1442 (ISO, 1997).
- Determinació de la concentració residual de nitrats i nitrits (basat en el mètode de Griess) (Magrinya et al., 2009).
- Determinació del color (*CIE L*a*b** i *L*C*h*)
- Determinació dels pigments del curat i els pigments totals mitjançant el mètode de Hornsey (Wrolstad, 2005).
- Determinació dels tocoferols i tocotrienols (Nuchi et al., 2009).
- Determinació de l'estat oxidatiu i de la susceptibilitat a la oxidació del producte carni mitjançant el mètode del taronja de xilenol (adaptat de Grau et al., 2000; Tres et al., 2009) i la prova de l'àcid tiobarbitúric (TBA) (Grau, Guardiola et al., 2000).

- Anàlisis sensorials on s'inclou una prova d'acceptabilitat global (Bou et al., 2001; Jellinek, 1985).

D'altra banda, també es van dur a terme diverses determinacions per caracteritzar les masses càrnies:

En les dues masses de carn i greix picades:

- Anàlisis microbiològiques, on s'inclou el recompte de: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, clostridis sulfat reductors, *Salmonella*, bacteris productors d'àcid làctic i estafilococs. A més, també es van utilitzar sistemes d'identificació API (Bell et al., 2005; DOUE, 2007; Pascual Anderson & Calderón y Pascual, 2000).

En les dues masses càrnies un cop afegits tot els ingredients comuns i l'oli de gira-sol, amb o sense extracte de tocoferols:

- Determinació de la humitat segons el procediment ISO 1442 (ISO, 1997).
- Determinació del contingut en greix segons el mètode oficial 991.36 de l'AOAC (AOAC International, 2000).
- Determinació de la composició en àcids grassos mitjançant CG-FID (adaptat de Bou et al., 2005; Guardiola et al., 2004).
- Determinació dels tocoferols i tocotrienols (Nuchi et al., 2009)
- Determinació del pH.

En les 12 masses càrnies abans d'afegir les diferents fonts de nitrit:

- Anàlisis microbiològiques, on s'inclou el recompte de bacteris productors d'àcid làctic i estafilococs (Bell et al., 2005; DOUE, 2007; Pascual Anderson & Calderón y Pascual, 2000).

En les 12 masses càrnies un cop afegits tots els ingredients:

- Determinació de la concentració residual de nitrats i nitrits (basat en el mètode de Griess) (Magrinya et al., 2009).
- Determinació del pH.

En les 12 masses càrnies un cop afegits tots els ingredients i fermentades durant 12 h:

- Anàlisis microbiològiques, on s'inclou el recompte de: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, clostridis sulfat reductors, *Salmonella*, bacteris productors d'àcid làctic i estafilococs. A més, també es van utilitzar sistemes d'identificació API (Bell et al., 2005; DOUE, 2007; Pascual Anderson & Calderón y Pascual, 2000).
- Determinació del pH.

4.3.4. QUART ESTUDI

La carn magra i el greix (ambdós de l'espatlla) d'aquest estudi es van picar separadament a un gruix de 3 mm. Posteriorment es van barrejar en les proporcions adequades seguint el disseny experimental esmentat anteriorment (0% de greix; 15% de greix i 85% de carn magra; 50% de greix i 50% de carn magra), per obtenir els diferents tractaments. Seguidament totes les masses càrnies es van dividir de forma proporcional per obtenir porcions de 240 g de carn a les quals es va afegir l'antimicrobià a les concentracions desitjades, d'acord al disseny experimental (**Taules 4-4, 4-5, 4-6**).

Després de l'addició de l'antimicrobià, els 240 g de massa càrnia de cada tractament es va subdividir en 20 parts de 10 g cadascuna. Aquests 10 g es van envasar (bosses de poliamida/polietilè, 135 x 180 mm) en atmosfera modificada (70% O₂ : 30% CO₂) i es van emmagatzemar durant 8 dies a 12 °C fins la seva anàlisi.

En les mostres de carn picada es van realitzar els següents recomptes microbiològics (Bell et al., 2005; Pascual Anderson & Calderón y Pascual, 2000):

- Bacteris mesòfils aerobis totals en agar nutritiu estàndard I (Merck, Darmstadt Alemanya), incubats a 30 °C durant 24-48 hores
- *Enterobacteriaceae* lactosa-positives (coliforms) en agar vermell bilis violeta lactosa (VRBL; Carl-Roth, Karlsruhe, Alemanya), incubats a 37°C durant 24 hores.
- Bacteris productors d'àcid làctic en agar MRS (Merck, Darmstadt, Alemanya), incubats a 35 °C durant 72 hores en anaerobiosi.

4.4. ANÀLISI ESTADÍSTICA

L'anàlisi estadística dels resultats obtinguts es va dur a terme amb el programa SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL). Amb aquest programa es van realitzar les següents proves estadístiques:

- ANOVA multifactorial per determinar si els factors estudiats del primer estudi, l'addició de tocoferols, l'addició d'un cultiu iniciador amb activitat nitrato reductasa, la font de nitrat i la seva concentració i el temps d'emmagatzematge influenciaven sobre el percentatge d'humitat, el recompte microbiològic, el contingut en nitrat i nitrit residual, els valors de color *CIE L*a*b**, el contingut en tocoferols i tocotrienols, el valor de TBA, el contingut en hidroperòxids lipídics i la susceptibilitat de les llonganisses a l'oxidació i l'anàlisi sensorial del producte.
- Correlació d'Spearman entre els valors de TBA i de color *CIE L*a*b** de les llonganisses i entre el contingut en tocoferols i la susceptibilitat a la oxidació obtinguts en el transcurs del primer estudi
- ANOVA multifactorial per determinar si els factors experimentals del segon estudi (font de nitrit, temps de fermentació i temps d'emmagatzematge) influïen sobre el recompte de microorganismes, el pH, el contingut en nitrats i nitrats residuals, el pigment de curat i la eficiència de curat, els valors de color *CIE L*a*b** i *L*C*h*, la concentració de tocoferols i tocotrienols, el contingut en hidroperòxids lipídics i la susceptibilitat a la oxidació, els valors de TBA i l'acceptabilitat global de les botifarres catalanes.
- ANOVA multifactorial per determinar si els factors experimentals del tercer estudi (addició de tocoferols, condicions de fermentació, font de nitrit i temps d'emmagatzematge) tenien influència sobre la humitat, el recompte de microorganismes, el pH, el nitrat i nitrit residual, el pigment de curat i la eficiència de curat, els valors de color *CIE L*a*b** i *L*C*h*, la concentració de tocoferols i tocotrienols, el contingut en hidroperòxids lipídics i la susceptibilitat a la oxidació, els valors de TBA i l'acceptabilitat global de les botifarres catalanes.

- ANOVA multifactorial per determinar si la concentració dels antimicrobians usats (metilparabè, lactat de sodi i l'èster d'etil de l'arginat làuric) i la quantitat de greix afegit a la carn picada (0, 15 i 50%) influenciaven sobre el creixement de bacteris mesòfils aeròbics totals, bacteris coliforms i bacteris productors de l'àcid làctic en carn picada.
- Prova no paramètrica de Kruskal-Wallis per determinar si la proporció de greix afegida a la carn picada (0, 15, 50%) té influència en el creixement de la microbiota natural de la carn.

En tots els casos es va considerar una diferència significativa quan $\alpha \leq 0,05$. Les interaccions de més de dos factors no van ser considerades en el model de l'ANOVA multifactorial. Per separar les mitjanes quadràtiques d'aquells factors principals que presentaven un efecte significatiu es va dur a terme una prova *post-hoc* de Scheffé. A més, quan l'anàlisi de la variància va mostrar un efecte significatiu en fer l'estudi de les interaccions entre dos factors es va realitzar una prova *t* (per factors que presentaven dos nivells), o bé, una ANOVA univariant (per factors que presentaven més de dos nivells) per cada factor i fixant l'altre amb el qual hi havia interacció. D'aquesta manera es va comprovar a quin nivell del factor era significativa la interacció.

5. PUBLICACIONES

5.1. EFFECT OF TOCOPHEROL EXTRACT, *STAPHYLOCOCCUS CARNOSUS* CULTURE, AND CELERY CONCENTRATE ADDITION ON QUALITY PARAMETERS OF ORGANIC AND CONVENTIONAL DRY-CURED SAUSAGES (Primer estudi)

Títol: Efecte de l'addició d'un extracte de tocoferols, del cultiu iniciador *Staphylococcus carnosus* i d'un concentrat d'api en els paràmetres de qualitat d'un embotit curat i sec ecològic o convencional.

Revista: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57, 8963-8972

Índex d'impacte: 2,906; posició 15/124 dins la categoria de ciència i tecnologia d'aliments (Journal Citation Reports, 2012)

Resum: En aquest estudi es va avaluar l'efecte de l'addició d'una sèrie d'ingredients sobre la qualitat de les llonganisses, un embotit curat i sec. Aquests ingredients van ser: un extracte de tocoferols (200 mg de tocoferols/kg de carn), un cultiu iniciador de la fermentació amb activitat nitrata reductasa elevada (*Staphylococcus carnosus*) i una font de nitrats (nitrat de potassi pur o bé concentrat d'api ric en nitrats) ambdós proporcionant dues concentracions diferents, equivalents a 70 i 140 mg de NaNO₃/kg. Les diferències en la qualitat entre les llonganisses obtingudes es van avaluar mitjançant la determinació dels nitrats i nitrits residuals, el color en l'espai CIE $L^*a^*b^*$, el contingut en tocoferols i tocotrienols, el grau d'oxidació, la susceptibilitat a l'oxidació i l'acceptabilitat global del producte, després de l'elaboració i l'emmagatzematge. De manera general, els resultats de l'estudi indiquen que l'addició de l'extracte de tocoferols va protegir a l'embotit de l'oxidació. En canvi, la concentració de nitrata afegida, la forma en què aquesta va ser afegida i l'addició d'un cultiu iniciador de la fermentació addicional amb activitat nitrata reductasa elevada (*S. carnosus*) van tenir poca influència sobre els compostos secundaris d'oxidació. Quant als nitrats i nitrits residuals dels embotits, aquestes concentracions es trobaven per sota dels límits permesos per productes ecològics a la Unió Europea, sobretot en aquells embotits als quals se'ls havia afegit la concentració més baixa de nitrata (70 mg NaNO₃/kg) amb independència de la font de nitrata utilitzada. A més, la presència de *S. carnosus* a les llonganisses va aconseguir disminuir els nitrats residuals a nivell traça. D'altra banda, el color de les llonganisses no es va veure afectat per la font de nitrata utilitzada i els consumidors no van mostrar preferències per cap dels diferents ingredients utilitzats.

Com que les dos fonts de nitrat van donar valors similars en els paràmetres de qualitat, l'addició de concentrat d'api com a font de nitrat pot ser una bona estratègia per la producció d'embotits ecològics curats i assecats.

Effect of Tocopherol Extract, *Staphylococcus carnosus* Culture, and Celery Concentrate Addition on Quality Parameters of Organic and Conventional Dry-Cured Sausages

NÚRIA MAGRINYÀ,[†] RICARD BOU,^{*,†} ALBA TRES,[†] NÚRIA RIUS,[‡] RAFAEL CODONY,[†]
 AND FRANCESC GUARDIOLA[†]

[†]Nutrition and Food Science Department-XaRTA-INSA, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain, and [‡]Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

The effects of the addition to sausage mix of tocopherols (200 mg/kg), a conventional starter culture with or without *Staphylococcus carnosus*, celery concentrate (CP) (0.23% and 0.46%), and two doses of nitrate (70 and 140 mg/kg expressed as NaNO₃) on residual nitrate and nitrite amounts, instrumental CIE Lab color, tocol content, oxidative stability, and overall acceptability were studied in fermented dry-cured sausages after ripening and after storage. Nitrate doses were provided by nitrate-rich CP or a chemical grade source. The lower dose complies with the EU requirements governing the maximum for ingoing amounts in organic meat products. Tocopherol addition protected against oxidation, whereas the nitrate dose, nitrate source, or starter culture had little influence on secondary oxidation values. The residual nitrate and nitrite amounts found in the sausages with the lower nitrate dose were within EU-permitted limits for organic meat products and residual nitrate can be further reduced by the presence of the *S. carnosus* culture. Color measurements were not affected by the CP dose. Product consumer acceptability was not affected negatively by any of the factors studied. As the two nitrate sources behaved similarly for the parameters studied, CP is a useful alternative to chemical ingredients for organic dry-cured sausage production.

KEYWORDS: Dry-cured sausages; organic production; nitrate and nitrite reduction; celery concentrate; *Staphylococcus carnosus*

INTRODUCTION

Ancient Greeks and Romans used salt to preserve fish and meat through curing, and these kinds of food products are still present in our diets. Though salt was historically believed to be responsible for obtaining cured meat products, it has now been demonstrated that nitrate impurities were crucial to the curing process (1).

Nowadays, it is understood that sausages like Spanish salchichón or Italian salame are dry-fermented cured meat products requiring several ingredients, such as salt, a nitrate or nitrite source, and a bacterial culture to develop their distinctive color, flavor, and texture (2). The addition of nitrate, which is reduced to nitrite, or the direct addition of nitrite is necessary to develop their characteristic color and flavor. In addition, it acts as an antimicrobial to control *Clostridium botulinum* and helps to prevent oxidation (1).

However, the formation of carcinogenic nitrosamines from nitrate and nitrite sources is a health concern. It has led to the reduction of their content in cured meats since the mid-1970s

(3,4) and to regulations on the amounts of nitrate and nitrite that can be added to, or found in, the cured product (5). The endogenous and/or exogenous microbiota present in the sausage mix are very relevant to the industry since nitrate and nitrite amounts can be reduced by the action of certain specific bacteria, while allowing the curing process. In relation to this, many starter cultures include *Staphylococcus* sp., since nitrate reductase activity is present in *Micrococcaceae* (2). The formation of nitrite exerts an antioxidative effect by preventing the release of iron from the porphyrin molecule, protecting unsaturated lipids within membranes against oxidation, interaction of nitrite as a metal chelator, and formation of nitroso and nitrosyl compounds acting as radical scavengers (1). Therefore, the reduction of nitrite levels may increase the susceptibility of sausages to oxidation, which would make it necessary to protect these meat products with antioxidants.

However, most of the nitrite formed is reduced to nitric oxide which reacts with myoglobin to produce nitrosylmyoglobin, but this can also be formed indirectly by nitrites oxidizing myoglobin into metmyoglobin and, subsequently, reacting with nitric oxide to produce nitrosylmetmyoglobin (1, 6). In the presence of exogenous and endogenous reductants, nitrosylmetmyoglobin

*Corresponding author. Tel: 34-934024508. Fax: 34-934035931. E-mail: ricard_bou@ub.edu.

reduces to the more stable form, nitrosylmyoglobin (*I*). The formation of this heme complex gives dry-cured meat products their characteristic color.

Nowadays, there is increased demand for healthier and organic food products, without chemical preservatives. In traditional cured meat products, however, consumers tend to dislike those to which nitrite has not been added (7). Consequently, the EU has regulated the maximum amounts of nitrate and nitrite to be added and the maximum residual amounts to be found in organic meat foods (8). An alternative to the addition of chemical grade nitrates or nitrites is the addition of natural sources containing nitrates or nitrites, which act like the curing salts used in ancient times. Some vegetable sources such as celery powder concentrates (CP) are known to be rich in nitrate (9), which means that they can be used instead of nitrate or nitrite in the manufacture of cured sausages (10, 11).

The aim of this study was to assess the possibility of reducing nitrate and nitrite amounts, by examining how various quality parameters of sausages produced under differing conventional and organic strategies are affected.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and Standards. Tocopherol extract (Guardian, 70% of mixed tocopherols) was obtained from DANISCO (Copenhagen, Denmark). Conventional starter culture containing *Lactobacillus sakei* and *Staphylococcus xylosus* (SM-181 Bactoferm), a nitrate reductase-active culture containing *Staphylococcus carnosus* (CS 299 Bactoferm) and CP, was obtained from CHR Hansen (Hørsholm, Denmark). Potassium nitrate (Suprapur), cadmium (coarse powder), copper(II) sulfate pentahydrate, sodium nitrite, and *N*-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Sulphanilamide was obtained from Carlo Erba (Milan, Italy). Sodium ascorbate, dextrose, and lactose were obtained from Espècies Teixidor (Manresa, Spain). Tocopherol standards were obtained from Calbiochem (San Diego, CA). All chemicals used were of ACS grade except the solvents used in the induced ferrous oxidation–xylenol orange (FOX) method and the tocol determination, which were of HPLC grade.

Experimental Design. Sixteen treatments resulted from a $2 \times 2 \times 4$ factorial design (Table 1) to study the effects of the addition of a tocopherols extract to the sausage mix formula (0 and 200 mg of mixed tocopherols/kg meat), of two starter cultures (conventional and conventional plus *Staphylococcus carnosus*), and of 4 different sources of nitrate (either KNO_3 or CP sources providing 70 and 140 mg of nitrate/kg expressed as NaNO_3) on several cured meat quality parameters. These two nitrate levels were at the maximum level of ingoing sodium nitrate allowed in conventional and organic meat products (5, 8). Meat with the ingredients was stuffed into natural casing and dry-cured for 48 days. Finally, the storage time factor of the dry-cured sausage, sliced and packed in modified atmosphere for 0 or 45 days, was added to this design, thus resulting in 32 treatments.

Sausage Preparation. A meat mix consisting of 91.7% diced pork loin meat plus 8.3% diced back fat from organic pigs was used to prepare the ground meat. After homogenization, the raw mix batter was then divided into 2 batches of 24 kg. Then, the following common ingredients were added to each batch: 0.5 g/kg of sodium ascorbate, 3 g/kg of dextrose, 5 g/kg of lactose, 3 g/kg ground black pepper, 22 g/kg of salt, and 0.25 g/kg of a conventional starter culture. Natural spring water was used to deliver the sodium ascorbate (100 mL) and the starter culture (100 mL) to the mix. In each batch, 100 mL of sunflower oil with or without tocopherol extract supplementation were added. After the addition of all these ingredients, samples were mixed for 4 min. Samples from these 2 mixes, with and without tocopherols extract, were finely ground and vacuum-packed in high-barrier multilayer bags (Cryovac BB325; approximately 20 g of meat/bag) and stored at -25°C until analysis.

Each batch was divided again into two more subsets, resulting in four different batches of 12 kg of meat, to which 100 mL of natural spring water with or without the *Staphylococcus carnosus* culture (1.33 g) was added according to the experimental design (Table 1). The resulting mixes were

Table 1. Sausage Formula Treatments

treatments	tocopherols (mg/kg) ^a	starter culture ^b	nitrate source ^c (origin and dose in mg/kg)
1	0	conventional	celery conc. powder 70
2	0	conventional	celery conc. powder 140
3	0	conventional	chemical grade 70
4	0	conventional	chemical grade 140
5	0	<i>S. carnosus</i>	celery conc. powder 70
6	0	<i>S. carnosus</i>	celery conc. powder 140
7	0	<i>S. carnosus</i>	chemical grade 70
8	0	<i>S. carnosus</i>	chemical grade 140
9	200	conventional	celery conc. powder 70
10	200	conventional	celery conc. powder 140
11	200	conventional	chemical grade 70
12	200	conventional	chemical grade 140
13	200	<i>S. carnosus</i>	celery conc. powder 70
14	200	<i>S. carnosus</i>	celery conc. powder 140
15	200	<i>S. carnosus</i>	chemical grade 70
16	200	<i>S. carnosus</i>	chemical grade 140

^a Expressed as average sum of tocopherol analogues. The tocopherol extract contains α -, β -, γ -, and δ -tocopherol analogues at the concentrations of 109 ± 4 , 12.7 ± 0.3 , 476 ± 12 , and 189 ± 5 g/kg, respectively. ^b Conventional starter culture includes *Lactobacillus sakei* and *Staphylococcus xylosus*. The conventional starter culture was also added in the *Staphylococcus carnosus* treatments. ^c Addition of chemically pure KNO_3 or celery concentrate powder providing different doses of nitrate, 70 or 140 mg, expressed as NaNO_3/kg .

homogenized for 2 min. According to the experimental design, mixes were subdivided into 16 batters of 3 kg in which CP (added at the following amounts: 6.9 or 13.8 g) or chemically pure KNO_3 (>99.99%) (added at the following amounts: 253 mg or 506 mg) were added after being dissolved previously in 50 mL of double deionized water. These amounts were added to provide the doses of 70 and 140 mg of nitrate/kg, respectively, expressed as NaNO_3 . The resulting 16 different raw mix batters were mixed manually for 2 min and stuffed into natural casings (40–45 mm diameter). To check the nitrate dose, samples from these 16 mix batters were finely ground and vacuum-packed in high-barrier multilayer bags (Cryovac BB325; approximately 20 g of meat/bag) and stored at -25°C until nitrate and nitrite analysis. In addition, samples from these mix batters were aseptically taken for microbiological analysis and stored at 4°C until the analysis, which was started the same day.

Sausage Dry-Curing and Sample Preparation. Sausages were hung for 48 days in a ripening chamber at $14 \pm 2^\circ\text{C}$ and 75–85% moisture. At this time (storage time 0), half of the sausages were ground and vacuum-packed in high-barrier multilayer bags (Cryovac BB325; 180×200 mm; permeability to oxygen, $25 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{bar}^{-1}$ at 23°C and 0% RH, DIN 53380; approximately 20 g of meat/bag) and stored at -25°C until analysis. The remaining sausages were sliced (2 mm thick) and packaged in sealed metallized polyester/polyethylene bags (Termopack PETM/PE; 300×200 mm; permeability to oxygen, nitrogen and carbon dioxide was 50, 10, and $150 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{bar}^{-1}$ at 23°C and 0% RH, DIN 53380, respectively; approximately 20 slices/bag) containing 80% N_2 and 20% CO_2 for 45 days at 4°C (storage time 45). After this period, samples were ground, vacuum-packed in high-barrier multilayer bags, and stored until analysis, the same as at time 0. For the microbiological analysis, samples were aseptically taken at the different storage times, 0 and 45 days, and stored at 4°C before analysis, which was started the same day.

Moisture Determination. The ISO 1442 procedure (12) was used to determine the moisture of the samples. Moisture was used to express results as dry weight unless otherwise specified.

Determination of Crude Fat Content and Fatty Acid Composition. The fat content of the raw mix batters was measured according to AOAC Official Method 991.36 (13), whereas fatty acid composition was as described elsewhere (14). Fat content was expressed on a fresh weight basis, whereas fatty acid composition was expressed as a percentage of area normalization.

Nitrite and Nitrate Determination. Ten grams of sample was weighed in a 250 mL beaker, and approximately 80 mL of distilled water was added. Then, Carrez I and Carrez II solutions (3 mL each) were added, and the solution was filled up to 100 g. Subsequently, this solution was

homogenized with a high speed homogenizer (Ultraturrax T25 basic with a dispersing tool S25N-18G, IKA-Werke GmbH, Germany) at 3500 rpm for 75 s. The homogenate was then centrifuged at 4350g for 20 min, and the supernatant was used for nitrate and nitrite analyses.

Sum of nitrate plus nitrite and nitrite analyses were performed on two segmented continuous flow systems (AutoAnalyzer 3 model, SEAL Analytical, UK). Nitrate plus nitrite content of the clarified samples was found by first reducing nitrate to nitrite with a copperized cadmium reduction column. Subsequently, the pre-existing nitrite plus the nitrite formed after the reduction step reacted with sulfanilamide for diazotization and coupling with NED formed a purple azo dye. The dye absorbance was then read at 550 nm. With an independent continuous flow system, only nitrite was determined, using the same reaction of nitrate but omitting the previous reduction step. Nitrate amounts were calculated by the difference between the two analyses. Results for raw mix batter were expressed as NaNO₃ or NaNO₂ per kg on a fresh weight basis.

Microbiological Analyses. Twenty-five grams of either raw batter or sausage samples, the latter previously diced in small pieces, was aseptically taken and homogenized with 75 mL of buffered peptone water (BPW; OXOID, Basingstoke, UK) for 2 min in an IUL masticator (IUL S.A., Barcelona, Spain). Serial decimal dilutions were made in sterile Ringer 1/4 solution (Scharlau, Barcelona, Spain). The following food-borne pathogens were determined in raw sausages. *Escherichia coli* was enumerated on McConkey agar (OXOID, Basingstoke, UK) and the population of sulfite-reducing clostridia by counting in SPS agar (Scharlau, Barcelona, Spain) anaerobically. Both agars were incubated at 37 °C for 48 h. The absence of *Salmonella* was determined by pre-enrichment in BPW for 16 h at 37 °C, enrichment in Selenite Cystine broth (OXOID, Basingstoke, UK) for 24 h at 37 °C, and in Rappaport Vassiliadis broth (OXOID, Basingstoke, UK) for 24 h at 42 °C, and isolation on SS agar (OXOID, Basingstoke, UK) and DCLS agar (OXOID, Basingstoke, UK). Both agars were incubated for 48 h at 37 °C. Kligler Iron agar (OXOID, Basingstoke, UK), Lysine Iron agar (OXOID, Basingstoke, UK), urease broth (OXOID, Basingstoke, UK) and API 20E system (bioMérieux España, Madrid, Spain) were used to identify colonies grown on SS agar and/or DCLS agar. Starter bacteria were analyzed by spread plating on MRS agar (OXOID, Basingstoke, UK) for lactic acid bacteria and on Mannitol Salt agar (Cultimed, Barcelona, Spain) for staphylococci. Both cultures were incubated at 30 °C for 3 days.

Color Measurements. Color was measured by a Konica Minolta Chroma-meter (model CR-410; Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan) based on the CIE L*a*b* color space. CIE (Commission Internationale de L'Eclairage) lightness L*, redness a*, and yellowness b* values were determined from four different random surfaces of the ground samples. The instrument was set for illuminant D-65 and at a 10° observer angle, and standardized using a standard white plate.

Oxidative Status and Susceptibility to Oxidation. As reviewed elsewhere, the ferrous oxidation–xylenol orange (FOX) method measures lipid hydroperoxides (LHP) (15). Using this method and with the same assay both the content in these primary oxidation compounds and the susceptibility to oxidation by means of different parameters can be determined (15).

The time course of lipid hydroperoxides formed after incubation over 210 h was used to calculate the susceptibility to oxidation parameters of the induced FOX assay as well as the content in LHP (LHPC), which was determined after 30 min of incubation. These oxidation parameters were maximum lipid hydroperoxide value (MAXLHP), the time in which the maximum lipid hydroperoxide value was achieved (TMAX), oxidation rate (OR), the lipid hydroperoxide value obtained at the end of the incubation period (Final LHP), and the area under the curve (AUC), and were calculated as described elsewhere (16).

Secondary oxidation compounds were determined by means of the thiobarbituric acid (TBA) values through third-derivative spectrophotometry after acid aqueous extraction (17).

Tocopherol and Tocotrienol Analogue Determination. Tocopherol and tocotrienol analogues were determined as described elsewhere (18). Results for raw mix batter were expressed as mg of each tocol per kg on a fresh weight basis, whereas results for sausages were expressed as mg of each tocol per kg.

Sensory Analyses. The following tests were carried out on different days in single sessions:

Table 2. Effect of Sausage Formulation Factors and Processing Points (after Inoculation in the Raw Mix Batter, after Curing at 0 Days and after 45 Days Storage) on Microbial Counts^a

	Microbial counts (log CFU/g)	
	Lactobacilli ^b	Staphylococci ^c
Tocopherols ^d		
0	8.4	6.9
200	8.2	7.0
SEM ^e	0.085	0.082
Starter Culture ^f		
conventional	8.2	6.9
<i>S. carnosus</i>	8.4	7.1
SEM	0.085	0.082
Nitrate Source (Origin and Dose) ^g		
chemical 70	8.3	7.0
chemical 140	8.3	7.1
celery 70	8.2	6.9
celery 140	8.3	6.9
SEM	0.12	0.12
Time		
raw mix batter	8.2 x	7.5 y
0 days	8.6 y	7.2 y
45 days	8.1 x	6.2 x
SEM	0.10	0.10

^a Values given in this table correspond to least-squares means obtained from multifactor ANOVA ($n = 48$, 48 for lactobacilli and staphylococci). Least-squares means within the same column with different letters differ significantly ($P \leq 0.05$).

^b Microbial counts expressed as the logarithm of lactobacilli colony-forming units per g of dried sample. Significant interactions between tocopherols \times storage time for lactobacilli ($P = 0.005$) were found. ^c Microbial counts expressed as the logarithm of staphylococci colony-forming units per g of dried sample. A significant interaction between starter culture \times nitrate source ($P = 0.001$) for staphylococci was found. ^d Tocopherol dose expressed in mg of tocopherol analogues/kg meat. ^e SEM means standard error of the mean. ^f Conventional starter culture includes *Lactobacillus sakei* and *Staphylococcus xylosum*. The *Staphylococcus carnosus* starter culture also includes the conventional starter culture. ^g Origin of nitrate and dose of nitrate expressed in mg NaNO₃/kg meat.

Overall Acceptability. The 16 treatments were randomly presented to the consumers in a balanced incomplete block design (19): 16 blocks, 6 samples per block and 6 replicates for each treatment. This design was duplicated by using 32 consumers to evaluate the overall acceptability of the product. In addition, each panelist evaluated the acceptability of a blind control (total samples given to each panelist = 7), which was treatment number 4. Consumer panelists were asked to rank the overall acceptability of the product on a 9-point scale (1 = very bad; 9 = very good). The scores of the blind control given by each panelist were subtracted from their respective sample acceptability scores.

Color Triangle Test. Samples of treatments 3 and 14 (see Table 1 for sausage formula factors) were used to perform this test to assess whether a difference existed in the color of the samples (20). Twenty-four panelists were used to perform this test.

Color Intensity Ranking Test. Samples of treatments 1, 2, 3, 4, 8, 12, and 16 (Table 1) were randomly presented to the panelists, who were asked to rank color intensity (20). Thirty panelists were used to perform this test. Along with this test, panelists were asked to select their preferred sample.

In each test, several slices of sample sausages were placed in white plastic dishes, identified by random three-digit numbers and served to the consumer panel at room temperature. Water and unsalted crackers were provided to panelists to cleanse their palates between samples.

Statistical Analyses. A multifactor ANOVA determined significant differences produced by the different factors on sample moisture, microbial determinations, nitrate and nitrite content, color measurements, tocopherol and tocotrienol analogues, TBA values, LHPC, and induced

Table 3. Effect of Formula Factors and Storage Time on Sausage Moisture, Residual Nitrate, Residual Nitrite, and CIE L* a* b* Color Values^a

	moisture (%) ^b	residual nitrate (mg/kg) ^c	residual nitrite (mg/kg) ^d	L* ^e	a* ^f	b* ^g
Tocopherols ^h						
0	25.3 x	27	0.36	37.52 x	15.38 x	8.32 x
200	26.0 y	26	0.33	38.36 y	16.21 y	8.61 y
SEM ⁱ	0.19	1.5	0.012	0.063	0.054	0.019
Starter Culture ^j						
conventional	25.8	53 y	0.35	37.85 x	15.71 x	8.43 x
<i>S. carnosus</i>	25.6	Tr ^k x	0.34	38.00 y	15.88 y	8.50 y
SEM	0.19	1.5	0.012	0.063	0.054	0.019
Nitrate Source (Origin and Dose) ^k						
chemical 70	25.6	9 x	0.36	37.18 x	15.78 x	8.36 x
chemical 140	25.3	48 y	0.35	37.85 x	15.77 x	8.43 x
celery 70	25.7	Tr x	0.34	37.82 x	15.70 x	8.43 x
celery 140	26.0	49 y	0.33	38.34 y	15.93 x	8.66 y
SEM	0.27	2.1	0.017	0.091	0.077	0.027
Storage Time						
0 days	25.8	25	0.38 y	38.17 y	16.30 y	8.52 y
45 days	25.6	28	0.31 x	37.71 x	15.29 x	8.42 x
SEM	0.19	1.5	0.012	0.063	0.054	0.019

^a Values given in this table correspond to least-squares means obtained from multifactor ANOVA ($n = 32, 32, 32,$ and 128 for moisture, nitrate, and nitrite analyses and color measurements, respectively). Least-squares means within the same column for the same factor with different letters differ significantly ($P \leq 0.05$). ^b Significant interactions between nitrate source \times starter culture ($P = 0.005$) and between nitrate source \times tocopherols ($P = 0.007$) for moisture were found. ^c Residual nitrate is expressed as mg of NaNO_3 per kg of sausage as dry weight. A significant interaction between starter culture \times nitrate source ($P \leq 0.001$) for residual nitrate was found. ^d Residual nitrite is expressed as mg of NaNO_2 per kg of sausage as dry weight. A significant interaction between nitrate source \times storage time ($P = 0.0042$) for residual nitrite was found. ^e Significant interactions between starter culture \times nitrate source ($P \leq 0.001$), starter culture \times storage time ($P = 0.002$), nitrate source \times tocopherols ($P \leq 0.001$), and nitrate source and storage time ($P \leq 0.001$) for L* values were found. ^f Significant interactions between starter culture \times tocopherols ($P = 0.003$), starter culture \times nitrate source ($P \leq 0.001$), starter culture \times storage time ($P = 0.014$), nitrate source \times tocopherols ($P \leq 0.001$), and nitrate source \times storage time ($P = 0.001$) for a* values were found. ^g Significant interactions between starter culture \times tocopherols ($P = 0.002$), starter culture \times nitrate source ($P \leq 0.001$), nitrate source \times tocopherols ($P \leq 0.001$), and nitrate source \times storage time ($P \leq 0.001$) for b* values were found. ^h Tocopherol dose expressed in mg of tocopherol analogues/kg meat. ⁱ SEM means standard error of the mean. ^j Conventional starter cultures include *Lactobacillus sakei* and *Staphylococcus xylosum*. The *Staphylococcus carnosus* starter culture also includes the conventional starter culture. ^k Origin of nitrate and dose of nitrate expressed in mg NaNO_3 /kg meat. ^l Tr stands for traces. The analyte amounts were found between the limits of detection and quantification of the method used.

FOX assay parameters. Factors were tocopherols extract addition (0 and 200 mg of tocopherol analogues/kg), starter culture (conventional and conventional plus *S. carnosus*), nitrate source (70 mg of NaNO_3 /kg and 140 mg NaNO_3 /kg, each dose provided by the addition of CP or chemical grade KNO_3), and time (after ripening, hereafter referred to as day 0 or time 0, and after 45 days of storage under a modified atmosphere). Because microbiological determinations were carried out at three different periods (after starter culture inoculation in raw mix batter and at 0 and 45 days), these periods were included for the time factor. Interactions between more than two factors were ignored. When main effects were significant, the least-squares means were separated using the Scheffé test ($\alpha = 0.05$).

The storage time factor was not studied in the consumers' sensory analysis of acceptability. The significance estimation in triangle and ranking tests was analyzed using tables (21, 22).

Interactions were examined, and whenever the interaction involving the nitrate source was present, we ran an ANOVA in which the dose of nitrate added (70 and 140 mg/kg) and the origin of nitrate (chemical and CP) were taken into account separately, instead of as a combination. In addition, storage time can also be a confounding factor in various interactions. Therefore, to understand the interactions better, the data file was split into two groups, and an ANOVA was run to study the interactions' effects on each storage time.

Spearman correlation coefficients between sausage TBA values and color measurements, and between tocol analogues and FOX parameters, were calculated. In all cases, $P \leq 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Moisture, Crude Fat Content, and Fatty Acid Composition of Raw Mix Batters. The moisture averages of the raw mix batters with and without the tocopherol extract were $61.86\% \pm 0.13$ and $62.19\% \pm 0.07$, respectively. The crude fat content averages of the

raw mix batters with and without the tocopherols extract were $17.2\% \pm 0.29$ and $16.7\% \pm 0.27$, respectively. The relative percentages of saturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, and polyunsaturated fatty acids of the raw mix batter without the addition of the tocopherol extract were 40.2%, 40.8%, and 19.0%, respectively, whereas for the raw mix batter with the addition of the tocopherols extract, they were 40.5%, 40.7%, and 18.8%, respectively. A table including all of the quantified fatty acids in these mixes is available as Supporting Information. These results demonstrate the homogeneity of these two mixes.

Microbiological Analyses. The 16 raw mix batter samples were checked for presence of food poisoning bacteria. *E. coli* was less than 100 CFU/g; *Salmonella* sp. was absent in 25 g; and sulfite-reducing clostridia were less than 10 CFU/g for the 16 sausages. All samples met microbiological standards for raw minced meat.

Lactobacilli and total staphylococci were analyzed in raw mix batter samples just before stuffing as well as after curing (0 days) and after 45 days of storage in sealed bags (Table 2).

The study of the interactions showed that they were only present at the initial time (data not shown). Provided that several factors affect the initial microbiota rather than just the factors studied, these interactions were considered not relevant.

The lactobacilli and staphylococci were only affected by time. During fermentation, the population of lactic acid bacteria increased at the initial stages and then began to drop slowly as the fermented meat product was processed (2, 23), which explains why at time 0 the levels of *Lactobacillus* sp. were higher than that in raw mix batter samples. In both cases, a reduction in

Table 4. Effect of Formula Factors and Storage Time on Sausage Tocol Analogues^a

	α -tocopherol (mg/kg) ^b	β -tocopherol (mg/kg) ^c	γ -tocopherol (mg/kg) ^d	δ -tocopherol (mg/kg) ^e	α -tocotrienol (m/kg) ^f
Tocopherols ^g					
0	18.8 x	0.3 x	1 x	Tr ^h x	0.77 x
200	74.5 y	7.3 y	260 y	47.3 y	1.22 y
SEM ⁱ	0.91	0.08	3.0	0.38	0.04
Starter Culture ^j					
conventional	45.0 x	3.7 x	126 x	23.0 x	0.96
<i>S. carnosus</i>	48.2 y	3.9 y	136 y	24.3 y	1.04
SEM	0.91	0.08	3.0	0.38	0.04
Nitrate Source (Origin and Dose) ^k					
chemical 70	43.3 x	3.5 x	123	22.4	0.83 x
chemical 140	47.4 xy	3.9 xy	132	24.0	1.10 y
celery 70	47.2 xy	3.8 xy	130	23.7	1.00 xy
celery 140	48.7 y	4.0 x	139	24.6	1.06 xy
SEM	1.3	0.11	4.3	0.54	0.06
Storage Time					
0 days	52.6 y	4.1 y	140 y	24.8 y	1.16 x
45 days	40.7 x	3.5 x	122 x	22.5 x	0.83 x
SEM	0.91	0.08	3.0	0.38	0.04

^a Values given in this table correspond to least-squares means obtained from multifactor ANOVA (each analogue $n = 64$). Least-squares means within the same column for the same factor with different letters differ significantly ($P \leq 0.05$). Since β -, γ -, and δ -tocotrienols were normally below the quantification limits, they were not reported. ^b Results are expressed as mg of α -tocopherol per kg of sausage as dry weight. Significant interactions between starter culture \times nitrate source ($P = 0.030$), starter culture \times storage time ($P = 0.023$), and storage time \times tocopherols ($P = 0.015$) for α -tocopherol were found. ^c Results are expressed as mg of β -tocopherol per kg of sausage as dry weight. Significant interactions between starter culture \times tocopherols ($P = 0.046$), starter culture \times nitrate source ($P \leq 0.001$), tocopherols \times nitrate source ($P = 0.045$), and tocopherols \times storage time ($P \leq 0.001$) for β -tocopherol were found. ^d Results are expressed as mg of γ -tocopherol per kg of sausage as dry weight. Significant interactions between starter culture \times nitrate source ($P = 0.021$), starter culture \times tocopherols ($P = 0.031$), and storage time \times tocopherols ($P \leq 0.001$) for γ -tocopherol were found. ^e Results are expressed as mg of δ -tocopherol per kg of sausage as dry weight. Significant interactions between starter culture \times tocopherols ($P = 0.032$), starter culture \times nitrate source ($P \leq 0.001$), and storage time \times tocopherols ($P \leq 0.001$) for δ -tocopherol were found. ^f Results are expressed as mg of α -tocotrienol per kg of sausage as dry weight. Significant interactions between starter culture \times nitrate source ($P = 0.003$) and starter culture \times storage time ($P = 0.043$) were found for α -tocotrienol. ^g Tocopherol dose expressed in mg of tocopherol analogues/kg meat. ^h Tr stands for traces. The analyte amounts were found between the limits of detection and quantification of the method used. ⁱ SEM means standard error of the mean. ^j Conventional starter cultures include *Lactobacillus sakei* and *Staphylococcus xylosus*. The *Staphylococcus carnosus* starter culture also includes the conventional starter culture. ^k Origin of nitrate and dose of nitrate expressed in mg NaNO₃/kg meat.

population during storage time was observed. These results corroborate those reported by Marco et al. (24). The environmental conditions during storage, such as low temperature, moisture, nitrate concentration, and a reducing atmosphere, could have enhanced the decrease from the starter population.

Nitrate and Nitrite Residual Amounts. Nitrate amounts in raw mix batters, expressed as fresh weight, averaged 127 ± 13 mg NO₃/kg and 66 ± 5.8 mg NO₃/kg for those treatments containing the higher and lower doses of nitrate, respectively. Therefore, the nitrate dosage was appropriate. Raw mix batters contained trace amounts of nitrite.

A significant interaction was found between nitrate source and starter culture for nitrate content in sausages ($P \leq 0.001$). This interaction was examined and was due to the dose of nitrate added in the sausage formula since the origin of nitrate had no effect.

This fact explained why the higher dose of nitrate added to the raw mix batters led to sausages with higher residual nitrate content (Table 3). In addition, *S. carnosus* decreased the residual nitrate content in sausages because of its reported nitrate reductase activity (2). As expected, tocopherol addition had no effect on residual nitrate content. Likewise, storage time under modified atmosphere did not affect the residual nitrate content (Table 3).

Neither the various ingredients added in the raw mix batter formula nor the storage under modified atmosphere affected the residual nitrite content (Table 3).

Sausage Color. Several interactions were found between various factors for L*, a*, and b* values (Table 3). An ANOVA examining dose of nitrate added and origin of nitrate separately,

instead of together, was run to check whether these two new factors were responsible for the interaction. This seemed to be the case for L* and b* values which were affected significantly by the dose and the origin of nitrate. Conversely, neither the dose nor the origin explained the interactions found for a* values, although they were affected by the tocopherol extract, the nitrate source, and, only at 0 days, also the starter culture. Therefore, the combination of these latter significant factors at the same time explained the multiple interactions found.

Meat lightness (L*), redness (a*), and yellowness (b*) were increased by the addition of tocopherols (Table 3). Lightness and yellowness also increased in those sausages in which the higher dose of CP had been added to the sausage formula. In addition, the presence of *S. carnosus* led to sausages with increased L*, a*, and b* values, whereas these values decreased after 45 days of storage under a modified atmosphere at 4 °C.

Tocol Content. The tocol content was determined in those raw mix batters with and without the tocopherol extract. The α -tocopherol, β -tocopherol, γ -tocopherol, and α -tocotrienol content in the mix without the addition of the tocopherol extract averaged 7.8 ± 0.93 , 0.069 ± 0.011 , 0.18 ± 0.015 , and 0.36 ± 0.051 mg/kg, expressed as fresh weight, respectively. However, the α -tocopherol, β -tocopherol, γ -tocopherol, δ -tocopherol, and α -tocotrienol in the mix containing the tocopherol extract averaged 26.2 ± 2.9 , 1.8 ± 0.23 , 61.3 ± 2.0 , 9.2 ± 0.69 , and 0.4 ± 0.28 mg/kg, expressed as fresh weight, respectively. In both cases, those tocols below the quantification limits were not reported.

Several interactions were found between different factors for the content of the different tocopherol and tocotrienol analogues

in sausages (Table 4). The study of the interactions showed that the factor dose of nitrate was significant, leading to higher content in tocol analogues when the nitrate dose was 140 mg/kg, whereas there were no differences between origins. In addition, various factors showed significant effects at 0 days but not at 45 days, explaining the interactions involving storage time.

The addition of the tocopherol extract to the formula led to significant changes in the content of the different analogues found in sausages (Table 4). This extract was rich in γ -tocopherol (Table 1 footnote), which explained the high content of this analogue in sausages. The β -, γ -, and δ -tocotrienol analogue amounts were normally below the quantification limits and, as a result, were not reported. The content of α -tocopherol, β -tocopherol, and α -tocotrienol was lower in those sausages with the lower dose of chemical nitrate added. There was decreased content in all tocopherol analogues because of either the addition of conventional starter culture or storage time under modified atmosphere (Table 4).

Oxidative Status and Susceptibility to Oxidation. TBA determination measures malondialdehyde, which is a typical secondary oxidation product derived from lipid oxidation (25), whereas the FOX method measures LHP, which are primary oxidation products (15). However, it should be noted that this method was used to measure the LHPC but was also used to assess the susceptibility of samples to oxidation by means of various parameters described elsewhere (15, 16).

Interactions between tocopherols \times nitrate source ($P = 0.006$), tocopherols \times storage time ($P = 0.007$), and nitrate source \times storage time ($P = 0.047$) were found for the LHPC (Table 5). These interactions were examined, and we found that the origin of nitrate was a significant factor ($P = 0.005$). The LHPC of sausages containing chemical and CP origin of nitrate were 293 and 132 mmol cumene hydroperoxide eq/kg, respectively, which indicated that CP may have some antioxidant properties. In addition, this antioxidant activity was only exhibited after 45 days. Despite the fact that the presence of all of these significant factors acting together may confound some main effects and explain some interactions, the addition of the tocopherol extract reduced the LHPC because of its antioxidant activity, whereas the storage time caused an increase in the LHPC (Table 5).

As for secondary oxidation, TBA values showed significant interactions between storage time \times tocopherols ($P \leq 0.001$), storage time \times starter culture ($P = 0.013$), and starter culture \times nitrate source ($P = 0.002$). Interactions were examined, and results indicated that the *S. carnosus* culture reduced TBA values after 0 days, but with further storage, it promoted oxidation. This can be due to the fact that tocopherol extract ($P = 0.007$), nitrate source ($P = 0.011$), and the starter culture ($P = 0.033$) were significant factors after 0 days storage, whereas only the tocopherol extract ($P \leq 0.001$) and starter culture ($P = 0.042$) showed to be significant factors after 45 days storage.

The combination of these effects that were taken together in the ANOVA explained several interactions but, as expected, the addition of the tocopherols led to sausages with an overall lower secondary oxidation values because of their antioxidant activity (Table 5). In addition, lipid oxidation increased during storage, and thus, higher TBA values were recorded when samples had been stored for 45 days (Table 5). Neither the starter culture nor the different nitrate sources had any effect on TBA values.

Several significant interactions were found between the different factors for the induced FOX parameters (Table 6). These interactions were examined, and higher doses of nitrate and CP addition reduced the susceptibility to oxidation. In addition, all of the factors studied were significant for all of the FOX assay parameters at both storage times, with the exception of the starter

Table 5. Effect of Formula Factors and Storage Time on Sausage Lipid Hydroperoxide Content (LHPC), Thiobarbituric Acid (TBA) Values, and Overall Acceptability to Consumers^a

	LHPC (mmol CHP eq/kg) ^b	TBA (μ g MDA/kg) ^c	overall acceptability
Tocopherols^d			
0	352 y	300 y	-0.3
200	73 x	30 x	0.1
SEM ^e	38	22	0.33
Starter Culture^f			
conventional	203	170	-0.3
<i>S. carnosus</i>	222	170	0.1
SEM	38	22	0.33
Nitrate Source (Origin and Dose)^g			
chemical 70	348 x	220	-0.5
chemical 140	237 x	130	0.4
celery 70	129 x	140	0.4
celery 140	134 x	180	-0.7
SEM	54	32	0.46
Storage Time			
0 days	138 x	90 x	N.A. ^h
45 days	287 y	240 y	
SEM	38	22	

^a Values given in this table correspond to least-squares means obtained from multifactor ANOVA ($n = 64, 64,$ and 192 for LHPC, TBA values, and acceptability, respectively). Least-squares means within the same column for the same factor with different letters differ significantly ($P \leq 0.05$). ^b Results are expressed as mmol of cumene hydroperoxide equivalents per kg of sausage as dry weight. Significant interactions between tocopherols \times nitrate source ($P = 0.006$), tocopherols \times storage time ($P = 0.007$) and nitrate source \times storage time ($P = 0.047$) for LHPC were found. ^c Results are expressed as μ g of malondialdehyde per kg of sausage as dry weight. Significant interactions between storage time \times tocopherols ($P \leq 0.001$), storage time \times starter culture ($P = 0.013$), and starter culture \times nitrate source ($P = 0.002$) for TBA were found. ^d Tocopherol dose expressed in mg of tocopherol analogues/kg meat. ^e SEM means standard error of the mean. ^f Conventional starter cultures include *Lactobacillus sakei* and *Staphylococcus xylosum*. The *Staphylococcus carnosus* starter culture also includes the conventional starter culture. ^g Origin of nitrate and dose of nitrate expressed in mg NaNO_3 /kg meat. ^h N.A. means not analyzed at 0 days.

culture at 0 days of storage. All of these significant effects taken together explain why we found many interactions.

The results in Table 6 indicate that tocopherols were efficient in delaying lipid oxidation onset. In addition, the lower dose of chemical nitrate showed significant differences with other nitrate sources for all of the defined FOX parameters, whereas no differences were observed between the other 3 nitrate source combinations. The addition of *S. carnosus* showed increased values for MAXLHP, final LHP, and AUC, thus showing that sausages to which this culture had been added were more prone to oxidation. All of the induced FOX parameters increased after 45 days of storage under modified atmosphere at 4 °C.

Sensory Characteristics. The results for the overall acceptability test carried out after 45 days storage under a modified atmosphere in sealed bags are shown in Table 5. Consumers found no significant differences between sausage formulas.

In addition to this sensory test, a triangle test was carried out to examine whether there were significant differences in color between samples 3 and 14 (see Table 1 for formula factors) since these two samples showed the maximum differences in the data obtained through the colorimeter. In this triangle test, 14 out of 24 panelists ($P \leq 0.05$) matched the similar samples. When these panelists were also asked which overall color they preferred, 11 out of 14 indicated the sample without the tocopherols added. On

Table 6. Effect of Formula Factors and Storage Time on Sausage Maximum Lipid Hydroperoxide Value (MAXLHP), Time to Reach the Maximum Lipid Hydroperoxide Value (TMAX), Oxidation Rate (OR), Final Lipid Hydroperoxide Value (Final LHP), and Area under the Curve (AUC)^a

	MAXLHP (mmol CHP eq kg ⁻¹) ^b	TMAX (h) ^c	OR (μmol CHP eq kg ⁻¹ h ⁻¹) ^d	final LHP (mmol CHP eq kg ⁻¹) ^e	AUC (mol CHP eq kg ⁻¹ h) ^f
Tocopherols ^g					
0	2900 y	48	86 y	2190 y	500 y
200	1500 x	54	26 x	980 x	251 x
SEM ^h	104	2.2	6.6	90	19
Starter Culture ⁱ					
conventional	2100 x	50	54	1390 x	343 x
<i>S. carnosus</i>	2400 y	53	59	1790 y	402 y
SEM	104	2.2	6.6	90	19
Nitrate Source (Origin and Dose) ^j					
chemical 70	2900 y	39 x	105 x	1900 y	478 y
chemical 140	2000 x	54 y	51 y	1500 xy	344 x
celery 70	1900 x	56 y	31 y	1400 x	312 x
celery 140	2200 x	56 y	38 y	1600 xy	357 x
SEM	147	3.2	9.4	127	28
Storage Time					
0 days	1700 x	44 x	39 x	1120 x	296 x
45 days	2700 y	59 y	74 y	2050 y	450 y
SEM	104	2.2	6.6	90	19

^a Values given in this table correspond to least-squares means obtained from multifactor ANOVA (each parameter $n = 64$). Least-squares means within the same column for the same factor with different letters differ significantly ($P \leq 0.05$). ^b Results are expressed as mmol of cumene hydroperoxide equivalents per kg of sausage as dry weight. Significant interactions between tocopherols \times starter culture ($P = 0.040$), tocopherols \times nitrate source ($P = 0.005$), tocopherols \times storage time ($P \leq 0.001$), starter culture \times nitrate source ($P = 0.004$), starter culture \times storage time ($P = 0.006$), and storage time \times nitrate source ($P = 0.007$) for MAXLHP were found. ^c Significant interactions between nitrate source \times tocopherols ($P = 0.001$), nitrate source \times storage time ($P = 0.015$), and storage time \times tocopherols ($P = 0.017$) for TMAX were found. ^d Results are expressed as μmol of cumene hydroperoxide equivalents per h and kg of sausage as dry weight. Significant interactions between nitrate source \times tocopherols ($P \leq 0.001$), nitrate source \times starter culture ($P = 0.008$), nitrate source \times storage time ($P = 0.007$), and storage time \times tocopherols ($P \leq 0.001$) for OR were found. ^e Results are expressed as mmol of cumene hydroperoxide equivalents per kg of sausage as dry weight. Significant interactions between starter culture \times tocopherols ($P \leq 0.001$), starter culture \times nitrate source ($P = 0.030$) and starter culture \times storage time ($P = 0.001$) for Final LHP were found. ^f Results are expressed as mol of cumene hydroperoxide equivalents and h per kg of sausage as dry weight. Significant interactions between tocopherols \times nitrate source ($P = 0.009$), tocopherols \times starter culture ($P = 0.039$), tocopherols \times storage time ($P \leq 0.001$), starter culture \times nitrate source ($P = 0.009$), and starter culture \times storage time ($P = 0.009$) for AUC were found. ^g Tocopherol dose expressed in mg of tocopherol analogues/kg meat. ^h SEM means standard error of the mean. ⁱ Conventional starter cultures include *Lactobacillus sakei* and *Staphylococcus xylosum*. The *Staphylococcus carnosus* starter culture also includes the conventional starter culture. ^j Origin of nitrate and dose of nitrate expressed in mg NaNO₃/kg meat.

a different day, in a sensory test panelists were asked to rank samples by overall color intensity using sausages from the following treatments: 1, 2, 3, 4, 8, 12, and 16 (see **Table 1** for formula factors). Treatment 12 was ranked in the first position as the least dark one, followed by treatment 16 in second position, treatments 3 and 4 in third and fourth positions indistinctly, treatment 8 in fifth position, treatment 1 in sixth position, and finally treatment 2 as the darkest sample. With the exception of positions 3 and 4, the other positions were significant at $P \leq 0.05$. Thus, the addition of tocopherols to the formula led to sausages with lower color intensity, which was consistent with colorimeter values. Nevertheless, the addition of *S. carnosus* led to darker sausages when tocopherols had not been added. Finally, according to the panelists, the presence of CP in the sausage formula led to a darker color. Along with this test, panelists were also asked to indicate their preferred sample by appearance (30% of panelists preferred sample 3, whereas 23%, 17%, and 13% preferred samples 12, 1, and 4, respectively), which was not related to the darkness ranking.

DISCUSSION

The results showed that, when the dose added to the sausage raw mix batter met the EU regulation for organic meat products (8), the residual nitrate and nitrite amounts were far below the limits (each at 50 mg/kg expressed as NaNO₃ and NaNO₂, respectively) (**Table 3**). In addition, no differences were observed

in the residual content of nitrate or nitrite when comparing the CP or the chemical origin.

S. xylosum possesses nitrate and nitrite reductase activity, but this is not as intense as that of *S. carnosus* (26). Therefore, the addition of *S. carnosus* culture to the mix caused a very efficient reduction of nitrate to nitrite, which ensured optimal color formation during initial fermentation stages (10, 27). This activity seems to disappear with storage time, which may be due to the environmental conditions after the curing process (**Table 3**). The nitrite formed is a reactive compound that can be further reduced after reacting with the heme moiety and various endogenous and exogenous reductants such as ascorbate (1, 6). This reactivity explains the recorded residual nitrite decrease after 45 days of storage. Alternatively, Ahn et al. (28) found lower residual nitrite in vacuum-packed sausages than those stored under aerobic conditions: they argued that the reducing environment allowed the conversion of nitrite to nitric oxide.

Among various functions, nitrite contributes to the characteristic color of cured meat (1, 29). This seems to be ensured at the dose of 70 mg/kg regardless of the nitrate source because measurement of the sausage color was not significantly different from those sausages that received conventional doses (chemical at 140 mg/kg) of nitrate (**Table 3**). These results corroborate other studies on CP in cooked ham processing (10). However, in the present study, the addition of CP at high doses led to sausages with greater lightness and yellowness, which could be due to the intrinsic color of the concentrate powder.

Table 7. Spearman Correlation Coefficients between Lipid Hydroperoxide Content, Induced FOX Parameters and Tocol Content in Sausages, after Storage for 45 Days^a

	LHPC	MAXLHP	TMAX	OR	Final LHP	AUC	α -T	β -T	γ -T	δ -T	α -T3
LHPC	1 ^b	0.75	-0.43	0.73	0.78	0.77	-0.77	-0.75	-0.78	-0.81	-0.69
		0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
MAXLHP		1.00	-0.37	0.97	0.98	0.97	-0.79	-0.74	-0.78	-0.69	-0.83
			0.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
TMAX			1.00	-0.50	-0.42	-0.45	0.45	0.14	0.41	0.33	0.49
				0.05	0.10	0.08	0.08	0.61	0.11	0.21	0.05
			16	16	16	16	16	16	16	16	16
OR				1.00	0.97	0.97	-0.82	-0.75	-0.82	-0.73	-0.86
					0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
				16	16	16	16	16	16	16	16
final LHP					1.00	1.00	-0.80	-0.78	-0.84	-0.72	-0.83
						0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
					16	16	16	16	16	16	16
AUC						1.00	-0.80	-0.77	-0.84	-0.72	-0.84
							0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
						16	16	16	16	16	16
α -T							1.00	0.87	0.91	0.90	0.84
								0.00	0.00	0.00	0.00
							16	16	16	16	16
β -T								1.00	0.95	0.93	0.78
									0.00	0.00	0.00
								16	16	16	16
γ -T									1.00	0.93	0.86
										0.00	0.00
									16	16	16
δ -T										1.00	0.82
											0.00
										16	16
α -T3											1.00
											16

^a LHPC = lipid hydroperoxide content, MAXLHP = maximum lipid hydroperoxide value, TMAX = time the maximum lipid hydroperoxide value was achieved, OR = oxidation rate, final LHP = the final lipid hydroperoxide value, AUC = area under the curve, α -T = α -tocopherol, β -T = β -tocopherol, γ -T = γ -tocopherol, δ -T = δ -tocopherol, and α -T3 = α -tocotrienol. ^b Spearman correlation coefficient, *P* value, and number of samples are given in order one below the other.

Isabel et al. (30) found that a higher α -tocopherol concentration in dry-cured hams reduced color fading and weight loss, thus explaining the greater moisture content found in those sausages receiving the tocopherol extract. Therefore, it is possible that the higher water content found in those sausages enriched with tocopherols provoked the increase in L^* , a^* , and b^* values (Table 3) since the addition of 200 mg/kg of tocopherol extract in a sunflower oil matrix did not significantly increase these instrumental color values (data not shown). Although other authors reported no effect on the color stability of cured pork products from animals that received diets rich in tocopherol (31, 32), the latter's addition may protect from oxidation, thus maintaining color properties during fermented sausage ripening. Meat discoloration because of oxidation and lipid oxidation is a major drawback (33, 34), and the protective effect of tocopherols against lipid oxidation during ripening is clearly observed by looking at primary and secondary oxidation values (Table 5).

The decrease in redness values and the increase in yellowness values are often related to increased lipid oxidation (32, 35). After 45 days of storage under a modified atmosphere, all color parameters (L^* , a^* , and b^*) were lower than those found after ripening (Table 3). Rubio et al. (35) studied the effect of storage time on color stability in a conventional dry-cured sausage stored under the same modified atmosphere (20% CO₂ and 80% N₂). These authors found that, on comparing instrumental color values after 0 and 120 days of storage, L^* and a^* values increased,

whereas yellowness decreased. However, they also found that these trends changed with different storage periods. In addition, the recorded interactions we found between nitrate source and storage time (Table 3) probably confuse some effects on color since significant Spearman correlations between TBA values and yellowness ($r_s = 0.500$, $P = 0.049$), and between TBA values and redness ($r_s = -0.724$, $P = 0.002$) were found only when using the data obtained from samples stored for 45 days.

Redness is used as an indicator of color stability since oxidative discoloration of cured meats converts nitrosylmyoglobin to nitrate and metmyoglobin (36, 37). This phenomenon explains the recorded decrease in redness during storage (Table 3). Red was more stable over a storage period, and lipid oxidation was lower when low nitrite-cured pork products (50 mg/kg) came from animals that received 500 mg α -tocopheryl acetate/kg feed supplement (38).

Color influences consumers' decisions: differences in sausage color are associated with the product's quality and freshness (39). In a triangle test, panelists were able to differentiate a sausage to which neither tocopherols nor *S. carnosus* had been added from another sausage to which both were added. This suggests that consumers were able to find differences in color between samples. To confirm this, a ranking test was also carried out. The results of this test confirmed that there were differences between samples when assessing the sausages' overall darkness. However, consumers' preferences seemed to be neither positively nor negatively correlated with darker-colored sausages.

Overall acceptability was studied after 45 days of storage, and consumers showed no differences in preference between treatments for any of the factors studied (Table 5). It should be taken into account that Catalan consumers because of the big quantity of small- and large-scale producers are used to a broad variability in these types of dry-cured sausages in their local markets. This indicates that the panelists differ in their color preferences and/or appreciate other characteristics apart from color. Consumers did not show differences in their acceptability scores when CP was added at 0.23% and 0.46% (Table 5). In cured cooked ham produced using the same vegetable extract, the addition of CP at 0.2% had no effect on sensory attributes, whereas at 0.3%, the panel described an increased vegetable aroma (10).

The addition of the tocopherols extract reduced the oxidative status (LHPC and TBA values) of the sausages but also their susceptibility to oxidation (Tables 5 and 6). Therefore, the addition of tocopherols to the formula could be a useful strategy for preventing lipid oxidation in dry-fermented sausages since lipid oxidation increased with storage time (Table 5). The LHPC and the induced FOX parameters correlated closely with each other. In addition, LHPC, final LHP, MAXLHP, and AUC correlated closely with the tocol amounts found in sausages after 0 (data not shown) and after 45 days of storage (Table 7), which supports the finding that these parameters are good markers of lipid oxidation.

Studying the addition of nitrite instead of nitrate, Walsh et al. (38) found that the dose of 100 mg of nitrite/kg meat in cured pork products reduced TBA values from values in products with only 50 mg/kg. The interaction between starter culture and nitrate source found for TBA values ($P = 0.002$) could explain why we found no differences between TBA values for nitrate source in our study. The nitrate reductase activity of *S. carnosus* caused a rapid formation of nitrite, which because of its antioxidant properties may have protected all tocol analogues from oxidation from the early stages of the curing process (Tables 3 and 4). Besides, interactions involving tocol analogues may also be explained by the dose of nitrate added since it may affect the nitrite supply during curing.

The presence of carotenoids in the CP, which may act as radical scavengers during storage, reduced these oxidation parameters, whereas the low tocopherol content when conventional starter cultures were combined with low ingoing nitrate amounts caused their increase. The nitrate reductase activity of *S. carnosus* exhausted nitrate rapidly, which explains that this culture showed greater susceptibility to oxidation. In fact, this indicates the protective role of residual amounts of nitrate and/or nitrite against oxidation rather than the pro-oxidative activity of *S. carnosus* (Table 6). This reasoning involves a reduced nitrite supply during long-term ripening and/or storage, which is consistent with the significant interactions involving starter culture and nitrate source found when assessing oxidation.

Taken together, these results indicate that organic sausages can be produced without significantly affecting quality or consumer acceptability. Moreover, the addition of *S. carnosus* reduces the residual levels of nitrate without affecting TBA values after 45 days of storage in an atmosphere containing 20% CO₂ plus 80% N₂ at refrigeration. However, according to the induced FOX values, the combination of low doses of nitrate with the addition of *S. carnosus* may lead to increased susceptibility to oxidation. The replacement of chemical grade nitrate source by CP is a useful strategy for organic production and, at the lower dose, does not affect color formation or any other parameter, when compared with the conventional procedures.

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to Josep Dolcet and Pere Durán from the Gremi de Carnissers-Cansaladers-Xarcuters de Barcelona i Comarques for their technical advice during the preparation of the dry-cured sausages. We thank GARTE ganadera for kindly providing organic pork. We thank DANISCO and Espècies Teixidor for kindly providing some additives and ingredients. We thank CHR Hansen for kindly providing the starter cultures and the celery concentrate and, in particular, Albert Vila for giving us scientific information about CHR Hansen's products. We thank José Antonio León from the laboratory of the Agència de Salut Pública de Barcelona for his technical help in the analysis of residual nitrates and nitrites.

Supporting Information Available: All of the quantified fatty acids in the raw mix batter. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

LITERATURE CITED

- (1) Pegg, R. B. Shahidi, F. *Nitrite Curing of Meat. The N-Nitrosamine Problem and Nitrite Alternatives*; Food & Nutrition Press, Inc.: Trumbull, CT, 2000.
- (2) Toldra, F. *Dry-Cured Meat Products*; Food & Nutrition Press, Inc.: Trumbull, CT, 2002.
- (3) Cassens, R. G. Residual nitrite in cured meat. *Food Technol.* **1997**, *51*, 53–55.
- (4) Gray, J. I.; Reddy, S. K.; Price, J. F.; Mandagere, A.; Wilkens, W. F. Inhibition of N-nitrosamines in bacon. *Food Technol.* **1982**, *36*, 39–45.
- (5) European Commission (EC). Directive 2006/52/EC of the European Parliament and of the Council of 5 July 2006 amending Directive 95/2/EC on food additives other than colours and sweeteners and Directive 94/35/EC on sweeteners for use in foodstuffs. *Off. J. Eur. Commun.* **2006**, *L 204*, 10–22.
- (6) Chasco, J.; Lizaso, G.; Beriain, M. J. Cured colour development during sausage processing. *Meat Sci.* **1996**, *44*, 203–211.
- (7) Froehlich, D. A.; Gullett, E. A.; Osborne, W. R. Effect of nitrite and salt on the color, flavor and overall acceptability of ham. *J. Food Sci.* **1983**, *48*, 152–154.
- (8) European Commission. Commission Regulation (EC) 889/2008 of 5 September 2008 laying down detailed rules for the implementation of Council Regulation (EC) No 834/2007 on organic production and labelling of organic products with regard to organic production, labelling, and control. *Off. J. Eur. Commun.* **2008**, *L 250*, 1–84.
- (9) Walker, R. Nitrates, nitrites and N-nitrosocompounds - a review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. *Food Addit. Contam.* **1990**, *7*, 717–768.
- (10) Sindelar, J. J.; Cordray, J. C.; Sebranek, J. G.; Love, J. A.; Ahn, D. U. Effects of varying levels of vegetable juice powder and incubation time on color, residual nitrate and nitrite, pigment, pH, and trained sensory attributes of ready-to-eat uncured ham. *J. Food Sci.* **2007**, *72*, S388–S395.
- (11) Sindelar, J. J.; Cordray, J. C.; Olson, D. G.; Sebranek, J. G.; Love, J. A. Investigating quality attributes and consumer acceptance of uncured, no-nitrate. *J. Food Sci.* **2007**, *72*, S551–S559.
- (12) International Organization for Standardization. *Meat and Meat Products: Determination of moisture (Reference Method)*; ISO 1442:1997; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 1997.
- (13) AOAC Official Method 991.36. In *Official Methods of AOAC International*, 17th ed.; AOAC International: Gaithersburg, MD, 2000.
- (14) Bou, R.; Codony, R.; Baucells, M. D.; Guardiola, F. Effect of heated sunflower oil and dietary supplements on the composition, oxidative stability, and sensory quality of dark chicken meat. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 7792–7801.
- (15) Bou, R.; Codony, R.; Tres, A.; Decker, E. A.; Guardiola, F. Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation-xylenol orange method: A review of the

- factors that influence the method's performance. *Anal. Biochem.* **2008**, *377*, 1–15.
- (16) Tres, A.; Nuchi, C.; Bou, R.; Codony, R.; Guardiola, F. Assessing the susceptibility of tissues to oxidation through the ferrous oxidation-xylenol orange (FOX) method. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2009**, *111*, 563–573.
- (17) Grau, A.; Guardiola, F.; Boatella, J.; Barroeta, A.; Codony, R. Measurement of 2-thiobarbituric acid values in dark chicken meat through derivative spectrophotometry: Influence of various parameters. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1155–1159.
- (18) Nuchi, C.; Guardiola, F.; Bou, R.; Bondioli, P.; Della Bella, P.; Codony, R. Assessment of the levels of degradation in fat co- and by-products for feed uses and their relationships with some lipid composition parameters. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1952–1959.
- (19) Cochran, W. G.; Cox, G. M. In *Experimental Designs*; John Wiley & Sons: New York, NY, 1957.
- (20) Jellinek, G. In *Sensory Evaluation of Food: Theory and Practice*; Ellis Horwood Ltd. and VCH: Chichester, U.K., 1985.
- (21) Kramer, A.; Kahan, G.; Cooper, D.; Papavasi, A. Nonparametric ranking method for statistical evaluation of sensory data. *Chem. Senses Flavor* **1974**, *1*, 121–133.
- (22) Roessler, E. B.; Pangborn, R. M.; Sidel, J. L.; Stone, H. Expanded statistical tables for estimating significance in paired-preference, paired-difference, duo-trio and triangle tests. *J. Food Sci.* **1978**, *43*, 940–947.
- (23) Sanz, Y.; Vila, R.; Toldra, F.; Nieto, P.; Flores, J. Effect of nitrate and nitrite curing salts on microbial changes and sensory quality of rapid ripened sausages. *Int. J. Food Microbiol.* **1997**, *37*, 225–229.
- (24) 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.
- (25) Fernandez, J.; Perez Alvarez, J. A.; Fernandez Lopez, J. A. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chem.* **1997**, *59*, 345–353.
- (26) Gotterup, J.; Olsen, K.; Knochel, S.; Tjener, K.; Stahnke, L. H.; Moller, J. K. S. Relationship between nitrate/nitrite reductase activities in meat associated staphylococci and nitrosylmyoglobin formation in a cured meat model system. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *120*, 303–310.
- (27) Gotterup, J.; Olsen, K.; Knochel, S.; Tjener, K.; Stahnke, L. H.; Moller, J. K. S. Colour formation in fermented sausages by meat-associated staphylococci with different nitrite- and nitrate-reductase activities. *Meat Sci.* **2008**, *78*, 492–501.
- (28) Ahn, H. J.; Kim, J. H.; Jo, C.; Lee, C. H.; Byun, M. W. Reduction of carcinogenic N-nitrosamines and residual nitrite in model system sausage by irradiation. *J. Food Sci.* **2002**, *67*, 1370–1373.
- (29) Cammack, R.; Joannou, C. L.; Cui, X. Y.; Martinez, C. T.; Maraj, S. R.; Hughes, M. N. Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1411*, 475–488.
- (30) Isabel, B.; Lopez-Bote, C. J.; Rey, A. I.; Arias, R. S. Influence of dietary alpha-tocopheryl acetate supplementation of pigs on oxidative deterioration and weight loss in sliced dry-cured ham. *Meat Sci.* **1999**, *51*, 227–232.
- (31) Santos, C.; Hoz, L.; Cambero, M. I.; Cabeza, M. C.; Ordonez, J. A. Enrichment of dry-cured ham with alpha-linolenic acid and alpha-tocopherol by the use of linseed oil and alpha-tocopheryl acetate in pig diets. *Meat Sci.* **2008**, *80*, 668–674.
- (32) Zanardi, E.; Novelli, E.; Ghiretti, G. P.; Dorigoni, V.; Chizzolini, R. Colour stability and vitamin E content of fresh and processed pork. *Food Chem.* **1999**, *67*, 163–171.
- (33) Morrissey, P. A.; Sheehy, P. J. A.; Galvin, K.; Kerry, J. P.; Buckley, D. J. Lipid stability in meat and meat products. *Meat Sci.* **1998**, *49*, S73–S86.
- (34) Faustman, C.; Cassens, R. G.; Schaefer, D. M.; Buege, D. R.; Williams, S. N.; Scheller, K. K. Improvement of pigment and lipid stability in Holstein steer beef by dietary supplementation with vitamin-E. *J. Food Sci.* **1989**, *54*, 858–862.
- (35) Rubio, B.; Martinez, B.; Garcia-Cachan, M. D.; Rovira, J.; Jaime, I. Effect of the packaging method and the storage time on lipid oxidation and colour stability on dry fermented sausage salchichon manufactured with raw material with a high level of mono and polyunsaturated fatty acids. *Meat Sci.* **2008**, *80*, 1182–1187.
- (36) Moller, J. K. S.; Skibsted, L. H. Myoglobins. The link between discoloration and lipid oxidation in muscle and meat. *Quim. Nova* **2006**, *29*, 1270–1278.
- (37) Nannerup, L. D.; Jakobsen, M.; van den Berg, F.; Jensen, J. S.; Moller, J. K. S.; Bertelsen, G. Optimizing colour quality of modified atmosphere packed sliced meat products by control of critical packaging parameters. *Meat Sci.* **2004**, *68*, 577–585.
- (38) Walsh, M. M.; Kerry, J. F.; Buckley, D. J.; Morrissey, P. A.; Lynch, P. B.; Arendt, E. The effect of dietary supplementation with alpha-tocopheryl acetate on the stability of low nitrite cured pork products. *Food Res. Int.* **1998**, *31*, 59–63.
- (39) Lanari, M. C.; Schaefer, D. M.; Scheller, K. K. Dietary vitamin-E supplementation and discoloration of pork bone and muscle following modified atmosphere packaging. *Meat Sci.* **1995**, *41*, 237–250.

Received April 2, 2009. Revised manuscript received July 13, 2009. Accepted August 2, 2009. This research was funded by Spain's Ministry of Education and Science (AGL2007-63819/GAN) and by a FPU research grant from the Ministry of Science and Innovation to Núria Magrinyà.

5.2. EFFECT OF FERMENTATION TIME AND VEGETABLE CONCENTRATE ADDITION ON QUALITY PARAMETERS OF ORGANIC BOTIFARRA CATALANA, A CURED-COOKED SAUSAGE (Segon estudi)

Títol: Efecte de la durada de la fermentació i de l'addició d'un concentrat vegetal en els paràmetres de qualitat de la botifarra catalana ecològica, un embotit curat i cuit.

Revista: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60, 6882-6890

Índex d'impacte: 2,906; posició 15/124 dins la categoria de ciència i tecnologia d'aliments (Journal Citation Reports, 2012)

Resum: En aquesta prova es va estudiar l'efecte de l'addició de dos fonts de nitrit (nitrit de sodi pur o concentrat vegetal ric en nitrat) i tres temps diferents de fermentació (6, 12, o 24 hores a 16 °C) amb cultius iniciadors de la fermentació amb activitat nitrato reductasa elevada (*S. carnosus*) sobre els paràmetres de qualitat de botifarra catalana envasada al buit durant 180 dies d'emmagatzematge a 4 °C. En conjunt, es va determinar el número de microorganismes (bacteris productors d'àcid làctic i estafilococs) i el pH de les botifarres abans de coure; i el contingut residual de nitrats i nitrits, la susceptibilitat a l'oxidació, l'eficiència de curat, el contingut en tocoferols i tocotrienols, el grau d'oxidació, la susceptibilitat a l'oxidació i l'acceptació global del producte. Quant als resultats d'aquest estudi, els nitrats i nitrits residuals trobats a les botifarres catalanes eren més baixos que els permesos per la Unió Europea en productes ecològics curats. D'altra banda, després de 6 h de fermentació l'eficiència de curat era inferior a la de botifarres catalanes produïdes amb períodes més llargs de fermentació (12 o 24 hores) i les quals eren similars entre elles. L'estudi d'acceptabilitat global del producte va mostrar que els consumidors preferien aquelles botifarres catalanes elaborades amb el concentrat vegetal. En global, els resultats indiquen que l'addició d'un concentrat vegetal ric en nitrats és una bona alternativa als agents curants convencionals en la producció d'embotit curat i cuit ecològic.

Effect of Fermentation Time and Vegetable Concentrate Addition on Quality Parameters of Organic *Botifarra Catalana*, a Cured–Cooked Sausage

Núria Magrinyà,[†] Ricard Bou,^{*,†} Núria Rius,[‡] Rafael Codony,[†] and Francesc Guardiola[†]

[†]Nutrition and Food Science Department–XaRTA-INSA and [‡]Department of Health Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Avinguda Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

ABSTRACT: The effects of the addition of two different sources of nitrite (pure NaNO₂ or a nitrate-rich vegetable concentrate) and three different fermentation times with nitrate-reducing cultures (6, 12, or 24 h at 16 °C) on microbial counts, pH, residual nitrate and nitrite amounts, and susceptibility to oxidation of *botifarra catalana* sausage were studied. Moreover, curing efficiency, color, tocopherol and tocotrienol contents, oxidative status, and consumer acceptability of these sausages were assessed after vacuum packaging and storage at 4 °C for up to 180 days. Residual nitrate and nitrite amounts were lower than the limits established by the European Union for organic meat products. Longer periods of fermentation produced higher meat curing efficiency ratios, whereas consumer acceptability scores were highest for sausages with added vegetable concentrate. Storage of the sausages caused small quality changes. Therefore, these results indicate that vegetable concentrate is a useful alternative for organic cured–cooked meat products.

KEYWORDS: *botifarra catalana* sausage, cured-cooked meat, organic meat, nitrate and nitrite reduction, *Staphylococcus carnosus*

■ INTRODUCTION

Botifarra catalana is a cured–cooked meat product typical of Catalonia (northeastern Spain); its process of manufacturing resembles that of cooked–cured ham. In August 2008, European Union (EU) and Spanish regulations prohibited the trade in and use of heat-treated meat products containing nitrate additives. Therefore, the only chemical curing agent currently permitted is nitrite.^{1,2} Before that, pork butchers traditionally mixed diced or coarse ground pork meat with jowl fat, salt, pepper, and nitrate and nitrite as curing agents to produce *botifarra catalana*. This mixture was stored in a cool place for a period of time and, thereafter, stuffed into natural casings and finally cooked.³

The past practice of storing the mixed ingredients in a cool place allowed the fermentation and reduction of nitrate to nitrite. This resulted in the development of the typical cooked–cured meat pigment, as well as the characteristic aroma and flavors of this sausage. The current conventional production of *botifarra catalana* does not require a period of fermentation to reduce nitrate to nitrite. Therefore, the time needed to produce *botifarra catalana* has been considerably shortened, although some sensory differences may exist between the products obtained by the different procedures.

The addition of either nitrite or nitrate prevents the growth of spoilage and pathogenic bacteria, such as *Clostridium botulinum*, and prevents lipid oxidation.⁴ However, nitrate and nitrite must be used with caution because they can produce nitroso compounds under certain conditions, some of which are specific and potent carcinogens.⁴ For this reason, the EU has established the maximum amount of nitrite that can be added to organic and conventional cooked–cured meat products, as well as the maximum amounts of residual nitrate and nitrite that organic cooked–cured meat products can contain.^{1,5}

Traditional and organic products are more expensive than their conventional counterparts. Moreover, organic food is one of the fastest growing areas of the food market in Europe, North America, Australia, and Japan. Some consumers are willing to pay more for organic food because they perceive these products to be healthier and of higher quality. Moreover, animal welfare, better taste, and food free of additives are other reasons for buying organic meat products.^{6,7} However, the withdrawal or reduction of nitrite sources as chemical additives from cooked–cured meats may result in products with a beige color, thus possibly lowering consumer acceptance.^{8,9} Therefore, it is important to find a substitute for nitrite that reproduces the characteristic cured-meat color while still providing clean-label products without chemical additives. Vegetables and their concentrates contain high amounts of nitrate. Once they are added to sausages, nitrate can be reduced to nitrite, and they offer the greatest potential of introducing natural sources of nitrite into processed meats.¹⁰

Thus, not only do nitrate-rich vegetable concentrates represent an alternative to conventional production but their use also mimics the former production of *botifarra catalana*. This enables the recovery of old practices as well as the traditional aromas and flavors. However, regardless of the nitrate source, it has to be first reduced to nitrite and then reduced again to nitric oxide to form the coordinate–covalent complex with heme pigments that produces the pink color of cooked–cured meats.¹¹ Therefore, it is necessary for nitrate-reducing cultures, which have been commercially available for several years, to reduce nitrate to nitrite for meat curing.

Received: March 20, 2012

Revised: May 21, 2012

Accepted: June 13, 2012

Published: June 13, 2012

Staphylococcus species with nitrate reductase activity are commonly used as starter cultures for dry-fermented sausages.^{10,12}

The ripening of dry-fermented sausages ensures the complete reduction of nitrate, but for this conversion to take place in cooked–cured products, an incubation period is required, normally achieved immediately before thermal processing.¹⁰ Hence, it is important to determine the proper conditions of early and rapid fermentation for the correct development of the cured color and sensory properties.

Thus, the objective of this study was to determine the effects of a nitrate-rich vegetable concentrate compared to the conventional nitrite addition on various quality characteristics of botifarra catalana sausages over an extended storage period. Different cultures, including *Staphylococcus carnosus*, which possess intense nitrate reductase activity, were added to the sausage formulation to allow the reduction of nitrate to nitrite. Due to this, different fermentation times were also studied to determine the optimum time for this conversion to take place.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and Standards. A meat starter culture for bioprotection containing *Lactobacillus sakei* and *Staphylococcus xyloso* (B-FM SafePro), a starter culture containing *S. carnosus* with intense nitrate reductase activity (CS-300 BactoFerm), and a vegetable concentrate (celery and carrot) rich in nitrates (NATASY CC 227) were obtained from CHR Hansen (Hørsholm, Denmark). Sodium nitrite used as pure sodium nitrite source (99.6%) was from Merck (Darmstadt, Germany). Sodium ascorbate and dextrose were obtained from Espècies Teixidor (Manresa, Spain). Tocopherol standards were obtained from Calbiochem (San Diego, CA, USA). All chemicals used were of ACS grade except the solvents used in the induced ferrous oxidation–xynol orange (FOX) method, Hornsey's method, and tocopherol plus tocotrienol determination, which were all of HPLC grade.

Experimental Design. Six treatments resulted from a 2 × 3 factorial design to study the effects of two different sources of nitrite (either pure NaNO₂ or a nitrate-rich vegetable concentrate providing the equivalent of 80 mg of NaNO₂/kg) and three different times of fermentation (6, 12, or 24 h at 16 °C) on various cooked–cured meat quality parameters. The amount of nitrite used was the maximum level of ingoing sodium nitrite allowed in organic meat products.⁵ Two different batters (one for each nitrite source) were prepared from the same homogenized common ingredients. After storage at 4 °C for 72 h, mixed batters were stuffed into natural casings, fermented (6, 12, or 24 h at 16 °C and 95% humidity), cooked, vacuum-packed, and pasteurized as described later. For each treatment, two sausages from different casings were subjected to chemical analyses, treated as replicates, and stored at 4 °C for 0, 60, 120, and 180 days, thus resulting in 48 samples. The remaining sausages were subjected to sensory analysis and stored under the same conditions for 60 days, with sausages corresponding to each treatment being treated as a single sample.

Sausage Preparation and Sampling. Sausages were manufactured according to a traditional formula: 850 g/kg of lean organic pork meat; 100 g/kg of organic pork jowl fat; 50 g/kg of cold spring water; 0.25 g/kg of each starter culture; 0.5 g/kg of sodium ascorbate; 3 g/kg of dextrose; 18 g/kg of salt; 3 g/kg of ground black pepper, and 80 mg/kg of pure NaNO₂ or 3.345 g/kg of vegetable concentrate rich in nitrates. Salt, black pepper, dextrose, each nitrite source, the two starter cultures, and sodium ascorbate were mixed in cold spring water before being added to improve ingredient homogenization.

To prepare each of the two batters (one for each nitrite source), a mixture of diced pork meat plus diced jowl fat was first minced (8 mm in diameter). After mixing, salt, ground black pepper, and dextrose were added to the batter. Then, the nitrite source was added to the mixture and homogenized for 1 min. After homogenization, the meat

starter culture for bioprotection (B-FM SafePro) and the culture with intense nitrate reductase activity (CS-300 BactoFerm) were added before homogenization for 2 min. Finally, sodium ascorbate was added to the mixture, which was further homogenized for 4 min. As for batter characterization, a 275 g sample was collected and finely ground (Retsch knife mill model Grindomix GM200; Haan, Germany) and vacuum-packed into high-barrier multilayer bags (Cryovac BB325; approximately 20 g of meat/bag) and stored at –25 °C until chemical analyses. Unless specified, batter samples were analyzed twice.

The remaining two batters containing different sources of nitrite were stored for 72 h at 4 ± 2 °C. After storage, each batter was subdivided into three batters, which were then stuffed into seven different natural casings (50–55 mm in diameter) and string-tied. Five sausages were made to weigh about 500 g and were subjected to sensory and microbiological analyses. Two more sausages, treated as duplicates, were made to weigh about 1200 g to analyze chemically. The seven resulting sausages from each batter corresponded to a single period of fermentation (6, 12, or 24 h) at 16 °C and 95% humidity. After this fermentation period, a sample of about half of the weight of one 500 g sausage was aseptically taken for microbiological analysis and the casing string tied again. The seven sausages of each treatment were cooked in a cooking pot containing 50 L of tap water, 200 g of salt, and 1 L of commercial vegetable broth and heated as follows: first, heating at 40 °C for 2 h, then at 60 °C for 2 h, and, finally, at 75 °C until a temperature of 68 °C was reached inside the sausage. After cooking and cooling, the sausages undergoing chemical analyses were cut into four pieces, and these plus the ones for sensory analyses were then individually placed in a barrier bag (Cryovac HT3050; 325 × 550 mm; permeability to oxygen = 15 cm³·m⁻²·day⁻¹·bar⁻¹ at 23 °C and 0% RH; approximately 500 g of sausage/bag), vacuum-packaged, and pasteurized at 80 °C for 25 min. Finally, pasteurized sausages destined for sensory analysis were stored at 4 °C for 60 days, and those for chemical analyses were stored at 4 °C for 0, 60, 120, and 180 days. Following the storage period, the sausages were finely ground (Robot Coupe mixer model BX3; Jackson, MS, USA), vacuum-packed in high-barrier multilayer bags (Cryovac BB325; 130 × 180 mm; permeability to oxygen = 25 cm³·m⁻²·day⁻¹·bar⁻¹ at 23 °C and 0% RH; approximately 15 g of meat/bag), and stored at –25 °C until chemical analysis. Unless otherwise specified, each replicate was analyzed twice.

Moisture Determination. The ISO 1442 procedure was used to determine the level of moisture of the samples.¹³ Moisture was used to express some results on a dry weight basis.

Determination of Crude Fat Content and Fatty Acid Composition. The fat content of the raw mix batters was measured according to AOAC Official Method 991.36.¹⁴ The fatty acid composition of the raw mix batters was determined by gas chromatography. First, lipid extraction was carried out with 20 mL of chloroform/methanol (2:1, v/v) in 1.5 g of raw meat, which was subsequently re-extracted twice by using 10 mL of the same solvent mixture each time. Then, fatty acid methyl esters were prepared from the lipid fraction using sodium methoxide and BF₃.¹⁵ Fat content was expressed on a fresh weight basis, whereas fatty acid composition was expressed as a percentage of area normalization.

Microbiological Analysis and pH Determination. From one sausage weighing approximately 500 g, half of the weight was aseptically collected from the casing after each fermentation period. Only about 50 g was stored at 4 °C until the analysis, which was started the day after and analyzed as described elsewhere.¹⁶ Microbiota is destroyed by cooking and hence, lactobacilli and total staphylococci were not analyzed at the different storage time points. After fermentation, the leftovers of the aseptically collected samples were used to measure pH in quintuplicate using a Crison pH 25 model pH-meter, and the average was treated as a single measurement (Crison Instruments, S.A., Alella, Barcelona, Spain). The pH of the raw mix batters before fermentation was also measured in quintuplicate.

Nitrate and Nitrite Determination. The determination of the nitrate and nitrite contents in raw mix batters and sausages was made as described elsewhere.¹⁶ Results were expressed on a fresh weight basis.

Total and Cured Pigment Analysis. Mononitrosylhemochrome and total pigment concentrations were measured after extraction in 80% acetone and acidified acetone, respectively, using Hornsey's method.¹⁷

Color Measurements. Color was measured by a Konica Minolta Chroma-meter (model CR-410; Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan) based on the CIE $L^*a^*b^*$ color space. CIE (Commission International de l'Eclairage) L^* (lightness), a^* (redness/greenness), and b^* (yellowness/blueness) were determined from five different random surfaces of the ground samples, and the average of each parameter was treated as a single measurement. The CIE $L^*a^*b^*$ color space was transformed into the L^*C^*h color space, where L^* represents lightness, C^* represents chroma, and h represents the hue angle, by the following formulas:

$$h = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right)$$

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$$

The instrument was set at illuminant D-65 and a 2° observer angle and standardized using a standard white plate.

Tocopherol and Tocotrienol Determination. Four grams of vegetable concentrate or 2 g of raw mix batters or sausages samples were weighed and saponified at 70 °C for 30 min with methanolic KOH.¹⁸ The unsaponifiable matter was subsequently extracted with petroleum ether, filtered, evaporated, and dissolved in *n*-hexane prior to HPLC determination.¹⁹ Results for the vegetable concentrate were expressed as milligrams of each tocopherol and tocotrienol per kilogram on a fresh weight basis. In raw mix batters and sausages, α -tocopherol was the only analyte found above the limit of quantification. Results for raw mix batters were expressed as milligrams of α -tocopherol per kilogram on a fresh weight basis, whereas results for sausages were expressed on a dry weight basis.

Oxidative Status and Susceptibility to Oxidation. Lipid hydroperoxide (LHP) levels were determined by means of the ferrous oxidation–xylenol orange (FOX) method.²⁰ This method is useful for measuring LHP content and the susceptibility of samples to oxidation. The LHP content was determined after 30 min of incubation, whereas the time course of LHP formed after incubation over 378.5 h was used to calculate susceptibility to oxidation by using various parameters described elsewhere.²¹ The induced FOX assay to measure oxidation susceptibility was carried out only once.

Secondary oxidation was determined by means of thiobarbituric acid (TBA) values through third-derivative spectrophotometry after acid aqueous extraction.²²

Sensory Analysis. A consumer test was carried out to measure the overall acceptability of sausages after storage for 60 days at 4 °C in vacuum packaging. All treatments were randomly presented to an untrained panel of 34 consumers aged between 20 and 60 years who regularly consumed cooked–cured meat products (≥ 1 per week), botifarra catalana being one of them. Consumer panelists were asked to rank the overall acceptability of the product on a 9-point scale (1 = very bad; 9 = very good). Each consumer had several slices of sample sausage that were placed on white plastic dishes, identified by random three-digit numbers and served to the consumer panel at room temperature. Water and unsalted crackers were provided to panelists to cleanse their palates between tasting the samples.

Statistical Analysis. A multifactor ANOVA determined significant differences produced by the different factors on microbiological counts, pH, residual nitrate and nitrite contents, mononitrosylhemochrome and total pigment concentrations, color measurements, tocopherol and tocotrienol concentrations, LHP content, induced FOX assay parameters, TBA values, and overall acceptability. The studied factors were nitrite source (pure NaNO_2 or a vegetable concentrate rich in nitrates), fermentation time (6, 12, or 24 h), and storage time (0, 60, 120, and 180 days), except for microbiological analyses, pH, residual nitrate and nitrite contents, induced FOX assay parameters, and overall acceptability, where only the nitrite source and fermentation time were the studied factors. Interactions between more

than two factors were ignored. When significant interactions were found between two factors, series of one-way ANOVAs (for factors with more than two levels) or *t* tests (for factors with two levels) were performed for each factor by fixing the other factor at each specific level. In all cases, $P \leq 0.05$ was considered to be significant. When significant differences were found through the multifactor or one-way ANOVAs, the least-squares means and means were separated using Scheffé's test ($\alpha = 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Moisture, Crude Fat, Fatty Acid Composition, and pH of Raw Mix Batters. The average moisture level of the raw mix batters containing pure sodium nitrite and vegetable concentrate were 68.61 ± 0.08 and $68.18 \pm 0.06\%$, respectively. The crude fat contents of the raw mix batter with pure sodium nitrite was $10.1 \pm 0.20\%$ and that of the vegetable concentrate, $10.6 \pm 0.25\%$. The relative percentages of saturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, and polyunsaturated fatty acids of the raw mix batter containing pure sodium nitrite were 35.72, 48.94, and 15.34%, respectively, and 34.93, 48.83, and 16.24%, respectively, for the batter with vegetable concentrate. The average pH values of the raw mix batters containing pure sodium nitrite and vegetable concentrate were 5.88 ± 0.05 and 5.92 ± 0.06 , respectively. Therefore, the moisture level, crude fat content, fatty acid composition, and pH were similar in both raw mix batters.

Microbiological Analyses and pH Determination. Lactobacilli and total staphylococci were analyzed in sausages just after fermentation, and the results are shown in Table 1.

Table 1. Effect of Fermentation Time and Nitrite Source on Microbial Counts and pH in Fermented Botifarra Catalana before Cooking^a

	lactobacilli (CFU/g)	staphylococci (CFU/g)	pH
fermentation time (h)			
6	1.28×10^9	3.19×10^7	5.72 z
12	6.76×10^8	2.24×10^7	5.50 y
24	7.49×10^8	2.03×10^7	5.33 x
SEM ^b	7.15×10^8	1.19×10^7	0.014
nitrite source ^c			
pure NaNO_2	1.16×10^9	2.98×10^7	5.51
vegetable concentrate	6.42×10^8	1.99×10^7	5.52
SEM	5.11×10^8	8.48×10^6	0.012

^aValues given in this table correspond to the least-squares means obtained from multifactor ANOVA ($n = 6$). Least-squares means within the same column for the same factor with different letters differ significantly ($P \leq 0.05$). ^bSEM, standard error of the mean. ^cBoth the pure NaNO_2 and the vegetable concentrate were used at a concentration equivalent to 80 mg of NaNO_2/kg raw mix batter.

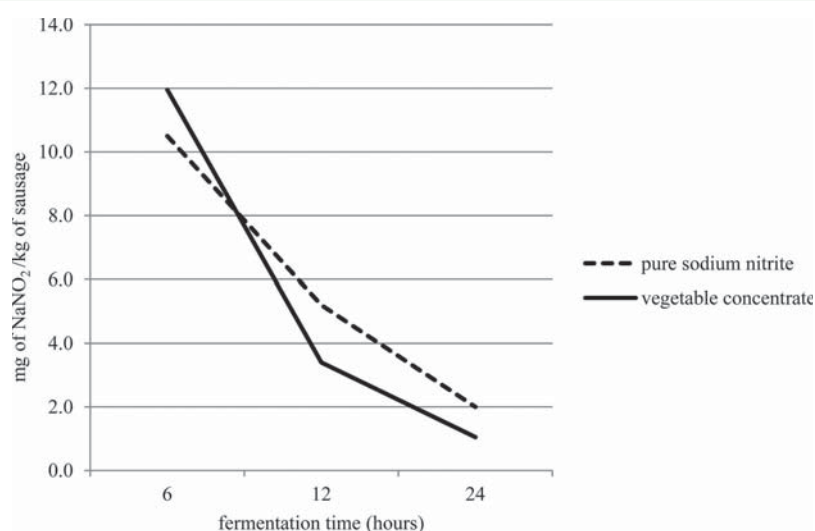
There were no differences in the levels of lactobacilli and total staphylococci between treatments. The recorded microbial growths were in agreement with those reported by Scannell et al.²³ in hams to which *L. sake* and *S. carnosus* cultures had been added followed by incubation at 18 °C for either 3 or 7 days. Moreover, the pH drop compared to raw mix batters indicated that these microorganisms participated in the fermentation.

Nitrate and Nitrite Amounts. Nitrate and nitrite amounts were analyzed in both nitrite sources (the pure NaNO_2 and the vegetable concentrate). The pure sodium nitrite source contained a $99.6 \pm 0.85\%$ of NaNO_2 , whereas the vegetable concentrate contained $21493 \pm 63 \text{ mg NO}_3^-/\text{kg}$ and 3.2 ± 1.8

Table 2. Effect of Fermentation Time and Nitrite Source on Residual Nitrate and Nitrite Amounts, Susceptibility to Oxidation (AUC), and Consumer's Overall Acceptability of Cured–Cooked Botifarra Catalana^a

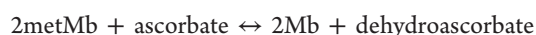
	residual nitrate ^b (mg/kg)	residual nitrite ^c (mg/kg)	AUC ^d ((mmol CHP equiv kg ⁻¹) × h)	overall acceptability ^e
fermentation time (h)				
6	5.1	11.2 z	930	5.5
12	5.2	4.3 y	920	5.5
24	4.5	1.5 x	990	5.2
SEM ^f	0.86	0.24	44	0.24
nitrite source ^g				
pure NaNO ₂	5.6	5.9	880 x	5.1 x
vegetable concentrate	4.3	5.5	1010 y	5.7 y
SEM	0.70	0.20	36	0.20

^aValues given in this table correspond to the least-squares means obtained from multifactor ANOVA ($n = 12, 12, 204,$ and 12 for residual nitrate, residual nitrite, overall acceptability, and AUC, respectively). Least-squares means within the same column for the same factor with different letters differ significantly ($P \leq 0.05$). ^bResidual nitrate is expressed as mg of NaNO₃ per kg of sausage. Storage time = 0 days. ^cResidual nitrite is expressed as mg of NaNO₂ per kg of sausage. Storage time = 0 days. ^dResults are the area under the curve (AUC) of lipid hydroperoxide formation determined by means of the induced ferrous oxidation–xylenol orange (FOX) assay (incubation for 378.5 h) and expressed as mmol of cumene hydroperoxide equivalents per kg of sausage as dry weight × hours. Storage time = 0 days. ^eOverall acceptability was ranked using a 9-point scale (where 1 = very bad and 9 = very good). Storage time = 60 days at 4 °C. ^fSEM, standard error of the mean. ^gBoth the pure NaNO₂ and the vegetable concentrate were used at a concentration equivalent to 80 mg NaNO₂/kg raw mix batter.

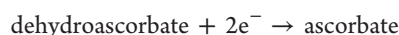
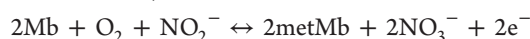
**Figure 1.** Interaction between fermentation time and nitrite source for the residual nitrite content in sausages.

mg NO₂⁻/kg. After the addition of 3.345 g/kg of vegetable concentrate, the raw mix batter, expressing the content of NO₃⁻ and NO₂⁻ as sodium salts, contained 97 ± 1 mg sodium nitrate/kg and 1 ± 0.1 mg sodium nitrite/kg. Therefore, the sum of NO₃⁻ and NO₂⁻ in this raw mix batter, expressed as sodium nitrite, is equivalent to the intended dose of 80 mg NaNO₂/kg/kg. The other raw mix batter, after the addition of 80 mg of pure NaNO₂/kg, contained 61.7 ± 0.6 mg sodium nitrate/kg and 20.5 ± 0.4 mg sodium nitrite/kg. Nitrite is very reactive and is quickly reduced to NO and also oxidized to NO₃⁻. In fact, various authors have found residual nitrate contents in fermented sausages formulated with nitrite.^{24–26} This oxidative reaction has been attributed to the presence of various compounds in the meat.^{9,27–31} First, the presence of endogenous enzymatic (i.e., catalase and xanthin oxidase) or nonenzymatic oxidizing (hydrogen peroxide) agents can convert nitrite into nitrate. Second, the presence of oxy-myoglobin has also been reported to play a role in forming nitrate from nitrite in a simultaneous redox reaction. Finally, the most convincing explanation involves the participation of myoglobin (Mb), ascorbate, and oxygen.⁹ In this reaction,

metmyoglobin (metMb) in the presence of ascorbate is reduced as follows:



Mb and nitrite are then simultaneously oxidized to metMb and nitrate, respectively. Finally, ascorbate is regenerated from the reduction of dehydroascorbate as shown below:



Residual nitrate amounts in sausages were determined after pasteurization, and the results are given in Table 2. Nitrate residual amounts were far below the limit established for organic production in all cases.⁵ Despite the vegetable concentrate being rich in nitrate, this content was reduced most likely due to the intense nitrate reductase activity of *S. carnosus*.³² Provided that this activity increases at higher temperatures, the microorganism, during the cooking procedure in which the temperature is initially held for 2 h at 40 °C, may be responsible for the almost complete nitrate reduction.^{12,33} These results were in agreement with other

Table 3. Effect of Fermentation Time, Nitrite Source, and Storage Time on Mononitrosylhemochrome, Curing Efficiency, Instrumental Color, Tocopherol Content, LHP Content, and TBA Values on Cured–Cooked Botifarra Catalana^a

	mononitrosylhemochrome ^b (mg/kg)	curing efficiency ^c (%)	instrumental color ^d				α -tocopherol ^e (mg/kg)	LHP ^f (μ mol CHP kg ⁻¹)	TBA ^g (μ g MDA/kg)
			L*	a*	C*	h			
fermentation time (h)									
6	197.3 x	78.2 x	60.52 x	15.96 y	17.98 y	27.22	11.8	234	343
12	204.6 y	80.6 y	61.12 y	15.76 x	17.72 x	27.01	12.0	225	354
24	202.5 y	81.5 y	61.56 y	15.77 x	17.77 x	27.25	11.5	217	313
SEM ^h	1.11	0.41	0.141	0.051	0.045	0.128	0.16	7.0	28
nitrite source ⁱ									
pure NaNO ₂	200.1 x	79.8	60.63 x	15.94 y	17.83	26.44 x	10.4 x	229	316
vegetable concentrate	202.8 y	80.4	61.49 y	15.72 x	17.81	27.88 y	13.1 y	221	358
SEM	0.90	0.34	0.115	0.042	0.037	0.105	0.13	5.7	23
storage time (days)									
0	201.5	79.7	60.00 x	15.77 xy	18.47 z	31.39 y	11.64	263 z	273 x
60	203.4	80.6	61.30 y	15.94 y	17.67 y	25.52 x	11.93	233 y	288 x
120	200.6	79.4	61.14 y	15.96 y	17.74 y	25.85 x	11.74	198 x	332 xy
180	200.4	80.6	61.81 y	15.67 x	17.42 x	25.89 x	11.70	208 x	452 y
SEM	1.28	0.48	0.162	0.059	0.052	0.148	0.19	8.1	32

^aValues given in this table correspond to the least-squares means obtained from multifactor ANOVA ($n = 48$). Least-squares means within the same column for the same factor with different letters differ significantly ($P \leq 0.05$). ^bResults are expressed as mg of mononitrosylhemochrome per kg of sausage as dry weight. ^cCuring efficiency expressed as the percentage of the concentration of mononitrosylhemochrome divided by the concentration of total heme pigments; both concentrations are expressed per kg as dry weight. ^dL*, lightness; a*, redness; b*, yellowness; chroma (C*), root of the sum of the squares of a* and b* used to express color saturation; hue angle (h), arctangent of the quotient of b*/a* used to express color hue ($h = 0$, true red; $h = 90$, true yellow). ^eResults are expressed as mg of α -tocopherol per kg of sausage as dry weight. ^fResults are expressed as μ mol of cumene hydroperoxide equivalents per kg of sausage as dry weight. ^gResults are expressed as μ g of malondialdehyde per kg of sausage as dry weight. ^hSEM, standard error of the mean. ⁱBoth the pure NaNO₂ and the vegetable concentrate were used at a concentration equivalent to 80 mg NaNO₂/kg raw mix batter.

studies using this microorganism^{16,34,35} and also explained why the nitrite source had no effect on the residual nitrate content.

Residual nitrite amounts in sausages were determined after pasteurization, and the results are shown in Table 2. Similar to nitrate, nitrite residual amounts were also far below the limit established for organic production.⁵ The addition of pure sodium nitrite or vegetable concentrate had no influence on residual nitrite content. However, longer fermentation times led to lower residual nitrite contents because of the complete reaction of nitrite into nitric oxide, which subsequently reacted with the heme moiety to form colored nitrosylheme complexes characteristic of cured meat pigments.⁹

A significant interaction between fermentation time and nitrite source was found for the residual nitrite content in sausages. A higher reduction of residual nitrite was observed in sausages to which vegetable concentrate was added (Figure 1). In fact, by statistically analyzing each factor separately, it was found that fermentation time decreased residual nitrite content for both nitrite sources and that there were no differences between the nitrite sources at 6 or 24 h of fermentation, whereas at 12 h the pure sodium nitrite addition produced sausages with higher residual nitrite amounts. The formation of nitric oxide from nitrite is facilitated by reductants such as ascorbate, but other factors such as pH or the redox potential could be modified by the vegetable concentrate, thus governing the reaction and explaining this interaction.^{10,36}

Total and Cured Pigment Analyses. The mononitrosylhemochrome concentrations of the sausages are given in Table 3. This table also shows the efficiency of meat curing

expressed as follows: curing efficiency (%) = (mg/kg mononitrosylhemochrome)/(mg/kg total heme pigments) \times 100. The majority of cured meat products are considered to be acceptable when the pigment conversion ratio is 80% or higher.¹⁷ Increasing the time of fermentation generated sausages with higher concentrations of mononitrosylhemochrome and, as a consequence, higher curing efficiencies. Cured pigment concentrations increasing with fermentation time have also been observed by other authors.^{35,37} The relatively high residual nitrite amounts found after 6 h of fermentation may partly explain the lower mononitrosylhemochrome level and curing efficiency. Overall, after 12 h of fermentation, pigment conversion can be considered as acceptable because the curing efficiency obtained at that time was not different from that after 24 h of fermentation.

In relation to the nitrite source, analysis of mononitrosylhemochrome concentration revealed that concentrations were higher in sausages with vegetable concentrate. Although there were no differences for this factor in the curing efficiency, an acceptable curing efficiency of 80% was observed when vegetable concentrate was added. Vegetable concentrate may slightly change the pH and/or redox potential, thus positively affecting the conversion of nitrite into nitric oxide and, consequently, nitrosylhemochrome content (Table 3). Accordingly, Terns et al.³⁸ suggested that the presence of ascorbic acid or any other reductant in frankfurter-style-cooked sausages with nitrate-rich vegetable juice powder (0.2%) favored the formation of the cured meat pigment.

Neither the nitrosylhemochrome concentration nor the curing efficiency changed in vacuum-packaged sausages stored at 4 °C for up to 180 days (Table 3). Terns et al.³⁸ studied nitrosylhemochrome content in frankfurters, which were immediately vacuum-packaged after being cooked and stored for 84 days at 2 °C. They found that both the cured pigment concentration and the conversion percentage of total to cured pigment decreased with increased storage times. Conversely, in a preceding study using nitrate-rich vegetable juice powder (0.2–0.4%) in frankfurters, cured pigment concentrations increased over time (stored vacuum-packaged for 90 days at 0–2 °C). The authors explained that the maintenance of residual nitrates and nitrites could have been used as a reservoir for nitrite-related reactions during storage,³⁵ whereas the depletion of the nitrite source would explain the pigment decrease over the storage period.³⁸ In both studies, residual nitrite levels on day 0 of storage were much higher than those reported here. However, in our conditions, in which the initial levels of residual nitrate and nitrite amounts were low, the lack of changes in these parameters suggests that this pigment was relatively stable during storage (vacuum-packaged for 180 days at 4 °C).

Color Measurements. Instrumental color was measured in cooked–cured sausages (Table 3). Overall, sausages presented minimal color differences between treatments. However, fermentation time influenced lightness (L^*), redness (a^*), and chroma (C^*), with higher fermentation times producing sausages with higher lightness (L^*) and lower chroma (C^*).

Although lightness has been reported to be affected by various factors in raw meat, cooked–cured, and dry-cured meat products,^{39–44} there are few publications reporting the effect of fermentation conditions on the final color of the product. However, the general trend in raw meat indicates that decreased moisture content and water-holding capacity correlate with increased lightness and decreased pH. Thus, the decrease in pH with longer fermentation times of raw sausages (Table 1) may explain the L^* increase in cooked–cured sausages with longer fermentation times (Table 3).

Sausages fermented for 6 h were redder and had higher chroma than those fermented for 12 or 24 h. The addition of vegetable concentrate produced significantly lighter and yellower sausages compared to those made with pure sodium nitrite. Several authors^{16,26,38} have found similar results in fermented sausages produced with vegetable concentrate as an indirect source of nitrate and nitrite. These authors reported the intrinsic color of the powder as responsible for these changes in color.

For the study of changes in color values during storage, the literature gives inconsistent results. Overall, in cooked–cured meat products such as ham, bologna sausage, frankfurters, and other emulsified sausages, Hunter's a and CIE a^* values have been reported to decrease with longer storage times.^{34,38,45–47} A reasonable explanation involves the nitrosylhemochrome formed during curing, which has been reported to be lost during storage, causing color fading.^{38,48} Indeed, Sindelar et al.³⁴ reported decreased a^* values with increased storage times in a comparable work in which cured ham had been cooked, vacuum-packaged, and stored at 2 °C for up to 90 days. Conversely, the same authors found that in vacuum-packaged frankfurter type sausages, a^* increased with storage time.³⁵ Despite this, the authors in the latter study found significant interactions that were attributed to the residual nitrate and/or nitrite that served as a reservoir for nitrite-related reactions. In

the present study, the highest a^* values were found after 60 or 120 days of storage and the lowest at 0 and 180 days of storage (Table 3).

The sausages that had been stored for 0 days were also significantly darker and had a higher color intensity (C^*) than those stored for longer periods (Table 3). Various authors^{34,35,37,38} have also observed an increase in L^* values with storage time in cooked–cured sausages. This increase could result from small decreases in the concentrations of the darkish pigmented myoglobin. Consistent with our results, other authors⁴⁹ have also reported a decrease in the C^* value of vacuum-packaged bologna sausages stored at 4 °C for 28 days.

Tocopherol and Tocotrienol Contents. In raw mix batters and sausages, the quantification was possible for only the α -tocopherol analogue, whereas the other tocopherol and tocotrienol analogues were not detected or were at trace levels. Sausage α -tocopherol contents are shown in Table 3 and, ranging from 9.3 to 14.1 mg/kg on a dry weight basis, were slightly lower than reported for dry-cured sausages produced from organic pig meat without tocopherol addition (18 mg/kg dry weight),¹⁶ but similar to or slightly higher than reported for cooked ham and frankfurters (10 mg/kg dry weight) produced from pigs fed conventional diets.^{49,50} Although various factors (i.e., the amount of this antioxidant provided by the feed, the amount of fat added to the meat product, and processing) may have important effects on meat product α -tocopherol content, the results seem to be consistent with those of other authors.

The addition of vegetable concentrate increased α -tocopherol content (Table 3), which could be caused by the intrinsic α -tocopherol content of the mix batters used (2.5 and 3.6 mg of α -tocopherol/kg for the pure sodium nitrite and vegetable concentrate batters, respectively). The different times of fermentation had no effect on sausage α -tocopherol content. In relation to the storage time, the α -tocopherol content was stable, thus suggesting that after 180 days of storage, there were few losses of this antioxidant during vacuum packing and refrigeration.

Oxidative Status and Susceptibility to Oxidation. The LHP contents are given in Table 3. Overall, LHP contents were low compared to other meat products.^{16,51} Neither the fermentation time nor the nitrite source affected the content of primary oxidation products. However, LHP content decreased with longer storage times, which may be explained by the predominance of LHP breakdown over formation in sausages that had been vacuum-packed and stored at 4 °C for a long time. Moreover, the lack of oxygen may have been responsible for the relatively low LHP formation, thus explaining the unchanging α -tocopherol content during storage. In addition, nitrite is an efficient antioxidant, which could have contributed to the low levels of LHP found.⁹

Susceptibility to oxidation was measured according to the same method used to determine LHP content but after a period of incubation, as described elsewhere.²¹ The time of fermentation did not affect susceptibility to oxidation when assessed through the different parameters described by Tres et al.²¹ The most useful of these parameters was the area under the curve that described LHP formation during the incubation time (AUC); the results of this parameter are shown in Table 2. The addition of vegetable concentrate increased susceptibility to oxidation (Table 2). As reported above, this ingredient was rich in nitrate. However, the composition of the vegetable concentrate is complex. For instance, it was found to contain 4.54 ± 0.18 mg/kg of α -tocopherol, 1.57 ± 0.05 mg/kg of β -

tocotrienol, and 0.44 ± 0.02 mg/kg of γ -tocotrienol, but other antioxidants (i.e., carotenoids, ascorbic acid) and prooxidants (i.e., transition metals) are also likely to be present. Therefore, the vegetable concentrate composition may be responsible for the increased susceptibility to oxidation. However, it is noteworthy to comment that different vegetable concentrates may have different compositions and, therefore, behave differently. This explains why a citrus fiber byproduct, associated with bioactive compounds such as flavonoids, polyphenols, and carotenes, prevented oxidation in bologna sausages,⁴⁷ whereas a vegetable concentrate similar to the one used in the present study, in which celery was the only ingredient, did not increase susceptibility to oxidation in dry-cured sausages.¹⁶

In line with the reported LHP content, TBA values of cooked–cured sausages did not change with either fermentation time or nitrite source (Table 3). However, TBA values increased with storage time, and those sausages that had been stored for 180 days had the highest malondialdehyde concentration (Table 3). This may be explained by the action of various prooxidants such as heme species, which are important contributors to lipid oxidation.^{52,53} Despite this, the formation of stable heme proteins through the reaction with nitric oxide, thus tying up catalytically active trace metals present in meat,^{9,54} could explain why the levels of oxidation were low in food products with added nitrite or nitrate.

Sensory Analysis. Conventional botifarra catalana and other similar products present in retail markets have an average shelf life of 90 days under the storage conditions assayed. The sausages' overall acceptability test was carried out after they had been stored for 60 days at 4 °C under vacuum conditions to determine whether trading of this product was possible (Table 2). In general, consumers gave scores above 5, suggesting that these sausages may be accepted by regular consumers even after a relatively long storage time.

Consumer scores for overall acceptability were similar for the different times of fermentation, indicating that there is no need for relatively long fermentation periods to produce this sausage. However, consumers gave higher acceptability scores for those with the vegetable concentrate (3.34 g/kg) (Table 2). In hams, Sindelar et al.³⁴ reported that the vegetable aroma of celery powder at 3.5 g/kg could be detected. Because botifarra catalana is sometimes cooked with a kind of natural broth, consumers might prefer sausages using vegetable concentrate. Therefore, the addition of vegetable concentrate not only produces more acceptable sausages but is also a useful alternative for producing cooked–cured meat products with a “clean label”, without chemical nitrite.

Overall, the addition of vegetable concentrates can be a useful strategy for producing organic meat products with low residual nitrate and nitrite amounts that are accepted by consumers. However, the addition of starter cultures with intense nitrate reductase activity is necessary to reduce the large amounts of nitrates present in these vegetable concentrates. In relation to this, a fermentation period of 12 h at 16 °C can be enough for the appropriate development of the characteristic pink color of cooked–cured meat products. It is also remarkable that this concentrate showed minimal effects on oxidative stability. Moreover, sausages stored under the studied storage conditions (4 °C and vacuum packaged) showed only minor changes in their oxidative status, even for extended periods of storage.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: (+34) 93 402 4508. Fax: (+34) 93 403 5931. E-mail: ricard_bou@ub.edu.

Funding

N.M. obtained financial support from an FPU research grant from the Ministry of Science and Innovation.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the Gremi de Carnissers-Cansaladers-Xarcuters de Barcelona i Comarques for the use of their facilities and to Josep Dolcet and Pere Durán for their technical advice during preparation of the sausages. We thank CHR-Hansen and Espècies Teixidor for kindly providing the starter cultures and vegetable concentrate and some additives and ingredients, respectively.

ABBREVIATIONS USED

FOX, ferrous oxidation–xylenol orange; LHP, lipid hydroperoxide; TBA, thiobarbituric acid; Mb, myoglobin; metMb, metmyoglobin; AUC, lipid hydroperoxide formation area under the curve.

REFERENCES

- (1) European Commission Directive 2006/52/EC of the European Parliament and of the Council of 5 July 2006 amending Directive 95/2/EC on food additives other than colours and sweeteners and Directive 94/35/EC on sweeteners for use in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* **2006**, L204, 10–22.
- (2) Real Decreto 1118/2007, de 24 de agosto, por el que se modifica el Real Decreto 142/2002, de 1 de febrero, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. *BOE* **2007**, 221, 37533–37544.
- (3) Dolcet, J.; Pons i Argimon, I. *Els Embotits de Catalunya*; Generalitat de Catalunya, Departament d'Agricultura i Acció Rural: Barcelona, Spain, 2010.
- (4) Cassens, R. G. Composition and safety of cured meats in the USA. *Food Chem.* **1997**, 59, 561–566.
- (5) European Commission Commission Regulation (EC) No 889/2008 of 5 September 2008 laying down detailed rules for the implementation of Council Regulation (EC) No 834/2007 on organic production and labelling of organic products with regard to organic production, labelling and control. *Off. J. Eur. Union* **2008**, L250, 1–84.
- (6) Makatouni, A. What motivates consumers to buy organic food in the UK? Results from a qualitative study. *Br. Food J.* **2002**, 104, 345–352.
- (7) Krystallis, A.; Chrysosoidis, G. Consumers' willingness to pay for organic food – factors that affect it and variation per organic product type. *Br. Food J.* **2005**, 107, 320–343.
- (8) Froehlich, D. A.; Gullett, E. A.; Osborne, W. R. Effect of nitrite and salt on the color, flavor and overall acceptability of ham. *J. Food Sci.* **1983**, 48, 152–154.
- (9) Pegg, R. B.; Shahidi, F. *Nitrite Curing of Meat: The N-Nitrosamine Problem and Nitrite Alternatives*; Food and Nutrition Press: Trumbull, CT, 2000.
- (10) Sebranek, J. G.; Bacus, J. N. Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? *Meat Sci.* **2007**, 77, 136–147.
- (11) Fox, J. B. Chemistry of meat pigments. *J. Agric. Food Chem.* **1966**, 14, 207–210.
- (12) Casaburi, A.; Blaiotta, G.; Mauriello, G.; Pepe, I.; Villani, F. Technological activities of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus*

simulans strains isolated from fermented sausages. *Meat Sci.* **2005**, *71*, 643–650.

(13) *Meat and Meat Products: Determination of Moisture Content (Reference Method; ISO 1442:1997)*; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 1997.

(14) AOAC Official Method 991.36. In *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17th ed.; AOAC International: Gaithersburg, MD, 2000.

(15) Bou, R.; Codony, R.; Tres, A.; Baucells, M. D.; Guardiola, F. Increase of geometrical and positional fatty acid isomers in dark meat from broilers fed heated oils. *Poult. Sci.* **2005**, *84*, 1942–1954.

(16) Magrinya, N.; Bou, R.; Tres, A.; Rius, N.; Codony, R.; Guardiola, F. Effect of tocopherol extract, *Staphylococcus carnosus* culture, and celery concentrate addition on quality parameters of organic and conventional dry-cured sausages. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 8963–8972.

(17) Wrolstad, R. E. *Handbook of Food Analytical Chemistry: Pigments, Colorants, Flavors, Texture, And Bioactive Food Components*; Wiley-Interscience: Hoboken, NJ, 2005.

(18) Bou, R.; Guardiola, F.; Tres, A.; Barroeta, A. C.; Codony, R. Effect of dietary fish oil, α -tocopheryl acetate, and zinc supplementation on the composition and consumer acceptability of chicken meat. *Poult. Sci.* **2004**, *83*, 282–292.

(19) Nuchi, C.; Guardiola, F.; Bou, R.; Bondioli, P.; Della Bella, L.; Codony, R. Assessment of the levels of degradation in fat co-and byproducts for feed uses and their relationships with some lipid composition parameters. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1952–1959.

(20) Bou, R.; Codony, R.; Tres, A.; Decker, E. A.; Guardiola, F. Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation–xylenol orange method: a review of the factors that influence the method's performance. *Anal. Biochem.* **2008**, *377*, 1–15.

(21) Tres, A.; Daniela Nuchi, C.; Bou, R.; Codony, R.; Guardiola, F. Assessing rabbit and chicken tissue susceptibility to oxidation through the ferrous oxidation-xylenol orange method. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2009**, *111*, 563–573.

(22) Grau, A.; Guardiola, F.; Boatella, J.; Barroeta, A.; Codony, R. Measurement of 2-thiobarbituric acid values in dark chicken meat through derivative spectrophotometry: influence of various parameters. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1155–1159.

(23) Scannell, A.; Kenneally, P.; McCarthy, D.; Schwarz, G.; Arendt, E. Optimisation of fermentation conditions for the production of a novel cooked fermented ham product. *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, *215*, 183–188.

(24) 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.

(25) Sindelar, J. J.; Terns, M. J.; Meyn, E.; Boles, J. A. Development of a method to manufacture uncured, no-nitrate/nitrite-added whole muscle jerky. *Meat Sci.* **2010**, *86*, 298–303.

(26) Tsoukalas, D. S.; Katsanidis, E.; Marantidou, S.; Bloukas, J. G. Effect of freeze-dried leek powder (FDLP) and nitrite level on processing and quality characteristics of fermented sausages. *Meat Sci.* **2011**, *87*, 140–145.

(27) Heppel, L. A.; Porterfield, V. T. Metabolism of inorganic nitrite and nitrate esters. 1. The coupled oxidation of nitrite by peroxide-forming systems and catalase. *J. Biol. Chem.* **1949**, *178*, 549–556.

(28) Chance, B. On the reaction of catalase peroxides with acceptors. *J. Biol. Chem.* **1950**, *182*, 649–658.

(29) Cassens, R. G.; Greaser, M. L.; Ito, T.; Lee, M. Reactions of nitrite in meat. *Food Technol.* **1979**, *33*, 46–57.

(30) Honikel, K. O. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Sci.* **2008**, *78*, 68–76.

(31) Silanikove, N.; Shapiro, F.; Silanikove, M.; Merin, U.; Leitner, G. Hydrogen peroxide-dependent conversion of nitrite to nitrate as a crucial feature of bovine milk catalase. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 8018–8025.

(32) Götterup, J.; Olsen, K.; Knöchel, S.; Tjener, K.; Stahnke, L. H.; Møller, J. K. S. Relationship between nitrate/nitrite reductase activities

in meat associated staphylococci and nitrosylmyoglobin formation in a cured meat model system. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *120*, 303–310.

(33) Krause, B. L.; Sebranek, J. G.; Rust, R. E.; Mendonca, A. Incubation of curing brines for the production of ready-to-eat, uncured, no-nitrite-or-nitrate-added, ground, cooked and sliced ham. *Meat Sci.* **2011**, *89*, 507–513.

(34) Sindelar, J. J.; Cordray, J. C.; Sebranek, J. G.; Love, J. A.; Ahn, D. U. Effects of varying levels of vegetable juice powder and incubation time on color, residual nitrate and nitrite, pigment, pH, and trained sensory attributes of ready-to-eat uncured ham. *J. Food Sci.* **2007**, *72*, S388–S395.

(35) Sindelar, J. J.; Cordray, J. C.; Sebranek, J. G.; Love, J. A.; Ahn, D. U. Effects of vegetable juice powder concentration and storage time on some chemical and sensory quality attributes of uncured, emulsified cooked sausages. *J. Food Sci.* **2007**, *72*, S324–S332.

(36) Chasco, J.; Lizaso, G.; Beriain, M. J. Cured colour development during sausage processing. *Meat Sci.* **1996**, *44*, 203–211.

(37) Terns, M. J.; Milkowski, A. L.; Claus, J. R.; Sindelar, J. J. Investigating the effect of incubation time and starter culture addition level on quality attributes of indirectly cured, emulsified cooked sausages. *Meat Sci.* **2011**, *88*, 454–461.

(38) Terns, M. J.; Milkowski, A. L.; Rankin, S. A.; Sindelar, J. J. Determining the impact of varying levels of cherry powder and starter culture on quality and sensory attributes of indirectly cured, emulsified cooked sausages. *Meat Sci.* **2011**, *88*, 311–318.

(39) Perez-Alvarez, J. A.; Sayas-Barbera, M. E.; Fernandez-Lopez, J.; Aranda-Catala, V. Physicochemical characteristics of Spanish-type dry-cured sausage. *Food Res. Int.* **1999**, *32*, 599–607.

(40) Brewer, M. S.; Zhu, L. G.; Bidner, B.; Meisinger, D. J.; McKeith, F. K. Measuring pork color: effects of bloom time, muscle, pH and relationship to instrumental parameters. *Meat Sci.* **2001**, *57*, 169–176.

(41) Freise, K.; Brewer, S.; Novakofski, J. Duplication of the pale, soft, and exudative condition starting with normal postmortem pork. *J. Anim. Sci.* **2005**, *83*, 2843–2852.

(42) Schilling, M. W.; Marriott, N. G.; Acton, J. C.; Anderson-Cook, C.; Alvarado, C. Z.; Wang, H. Utilization of response surface modeling to evaluate the effects of non-meat adjuncts and combinations of PSE and RFN pork on water holding capacity and cooked color in the production of boneless cured pork. *Meat Sci.* **2004**, *66*, 371–381.

(43) Sanabria, C.; Martin-Alvarez, P. J.; Carrascosa, A. Colour and moisture changes during the manufacture of Iberian dry-cured ham caused by some biotic and abiotic factors. *Food Sci. Technol. Int.* **2004**, *10*, 269–275.

(44) Olivares, A.; Luis Navarro, J.; Salvador, A.; Flores, M. Sensory acceptability of slow fermented sausages based on fat content and ripening time. *Meat Sci.* **2010**, *86*, 251–257.

(45) Villegas, R.; O'Connor, T. P.; Kerry, J. P.; Buckley, D. Effect of gelatin dip on the oxidative and colour stability of cooked ham and bacon pieces during frozen storage. *Int. J. Food Sci. Technol.* **1999**, *34*, 385–389.

(46) Dineen, N. M.; Kerry, J. P.; Lynch, P. B.; Buckley, D. J.; Morrissey, P. A.; Arendt, E. K. Reduced nitrite levels and dietary α -tocopheryl acetate supplementation: effects on the colour and oxidative stability of cooked hams. *Meat Sci.* **2000**, *55*, 475–482.

(47) Fernandez-Gines, J. M.; Fernandez-Lopez, J.; Sayas-Barbera, E.; Sendra, E.; Perez-Alvarez, J. A. Effect of storage conditions on quality characteristics of bologna sausages made with citrus fiber. *J. Food Sci.* **2003**, *68*, 710–715.

(48) Sindelar, J. J.; Cordray, J. C.; Olson, D. G.; Sebranek, J. G.; Love, J. A. Investigating quality attributes and consumer acceptance of uncured, no-nitrate/nitrite-added commercial hams, bacons, and frankfurters. *J. Food Sci.* **2007**, *72*, S551–S559.

(49) Sarraga, C.; Guardia, M. D.; Diaz, I.; Guerrero, L.; Garcia Regueiro, J. A.; Arnau, J. Nutritional and sensory quality of porcine raw meat, cooked ham and dry-cured shoulder as affected by dietary enrichment with docosahexaenoic acid (DHA) and α -tocopheryl acetate. *Meat Sci.* **2007**, *76*, 377–384.

(50) Estevez, M.; Ventanas, S.; Ramirez, R.; Cava, R. Influence of the addition of rosemary essential oil on the volatiles pattern of porcine frankfurters. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8317–8324.

(51) Bou, R.; Codony, R.; Baucells, M. D.; Guardiola, F. Effect of heated sunflower oil and dietary supplements on the composition, oxidative stability, and sensory quality of dark chicken meat. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 7792–7801.

(52) Bou, R.; Hanquet, N.; Codony, R.; Guardiola, F.; Decker, E. A. Effect of heating oxyhemoglobin and methemoglobin on microsomes oxidation. *Meat Sci.* **2010**, *85*, 47–53.

(53) Bou, R.; Guardiola, F.; Codony, R.; Faustman, C.; Elias, R. J.; Decker, E. A. Effect of heating oxymyoglobin and metmyoglobin on the oxidation of muscle microsomes. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 9612–9620.

(54) MacDonald, B.; Gray, J. I.; Gibbins, L. N. Role of nitrite in cured meat flavor: antioxidant role of nitrite. *J. Food Sci.* **1980**, *45*, 893–897.

5.3. EFFECT OF FERMENTATION CONDITIONS AND ADDITION OF TOCOPHEROL EXTRACT AND VEGETABLE CONCENTRATE ON QUALITY PARAMETERS OF ORGANIC BOTIFARRA CATALANA, A COOKED CURED SAUSAGE (Tercer estudi)

Títol: Efecte de les condicions de fermentació i l'addició d'un extracte de tocoferols i un concentrat vegetal en la qualitat de la botifarra catalana ecològica, un embotit curat i cuit.

Revista: Meat Science (en revisió)

Índex d'impacte: 2,754; posició 17/124 dins la categoria de ciència i tecnologia d'aliments (Journal Citation Reports, 2012)

Resum: En aquest estudi es va avaluar l'efecte de l'addició d'un extracte de tocoferols (200 mg de tocoferols/kg de carn) i dos fonts de nitrit (nitrit de sodi pur i un concentrat vegetal ric en nitrats) conjuntament amb tres tipus diferents de fermentació que combinaven diferents temperatures (12 hores a 4 °C o 16 °C) i l'ús d'un cultiu iniciador de la fermentació amb activitat nitrat reductasa elevada (*S. carnosus*) conjuntament o no amb un cultiu convencional sobre els paràmetres de qualitat de la botifarra catalana envasada al buit i emmagatzemada a 4°C durant 120 dies. Per establir la qualitat de les botifarres catalanes es van dur a terme les determinacions següents: recompte de microorganismes i pH de les botifarres abans de coure; i la quantitat residual de nitrats i nitrits, eficiència de curat, color, contingut en tocoferols i tocotrienols, el grau d'oxidació, la susceptibilitat a la oxidació i acceptació global del producte. Quant als factors d'estudi i la seva relació amb la qualitat de la botifarra catalana, la fermentació a 16 °C durant 12 hores amb la utilització d'un cultiu iniciador de la fermentació convencional junt amb un altre amb activitat nitrat reductasa elevada (*S. carnosus*) va resultar en botifarres amb un contingut de nitrats i nitrits residuals inferior i una eficiència de curat superior. En general, el temps d'emmagatzematge no va causar cap canvi important en la qualitat del producte. A grans trets, els paràmetres de qualitat analitzats mostren que el concentrat vegetal pot ser usat com a agent curant en embotits curats i cuits, sempre i quan bacteris amb activitat nitrat reductasa siguin presents al producte i es deixi fermentar la botifarra a les condicions adequades.

**Effect of Fermentation Conditions and Addition of Tocopherol Extract
and Vegetable Concentrate on Quality Parameters of Organic
Botifarra Catalana, a Cooked Cured Sausage**

Núria Magrinyà¹, Ricard Bou^{1,2*}, Núria Rius³, Rafael Codony¹, Francesc Guardiola¹

¹ Nutrition and Food Science Department- XaRTA-INSA, Faculty of Pharmacy,
University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

² Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN), Spanish National
Research Council, C. Jose Antonio Novais 10, 28040 Madrid, Spain

³ Department of Health Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy,
University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

Corresponding author: Ricard Bou. Tel.: (+34) 93 402 4508; fax: (+34) 93 403 5931; e-

mail: ricard_bou@ub.edu

ABSTRACT

This research evaluates the effects of adding a mix of tocopherols (200 mg/kg) and two nitrite sources (pure sodium nitrite or a nitrate-rich vegetable concentrate) together with three fermentation types that combine temperature (12 h at 4 °C or 16 °C) and the use of a nitrate-reducing starter culture (*Staphylococcus carnosus*) on microbial counts, pH, residual nitrate and nitrite levels, curing efficiency, color, tocopherol and tocotrienol content, oxidative status and susceptibility to oxidation, and consumer acceptability of organic cooked cured sausages after vacuum packaging and storage at 4 °C for up to 120 days. Fermentation at 16 °C for 12 h using *Staphylococcus carnosus* resulted in the lowest nitrate and residual nitrite levels and the highest curing efficiency. In general, storage did not cause quality changes in the sausages. The quality parameters show that the vegetable concentrate can be used as a curing agent, as long as a nitrate-reducing starter culture is added to the sausages and allowed to ferment.

KEYWORDS: cooked cured meat; organic meat products; nitrate and nitrite reduction; nitrate-reducing starter culture; vegetable concentrate

1. Introduction

Fermented meat products such as sausages and ham have their roots in an age-old tradition and are mainly produced in the Western world (Hammes, 2012). Several types of cured meat products are produced in Spain, some of which are specialties from different regions. In Catalonia (Northeastern Spain), *botifarra catalana*, a traditional cooked cured sausage, is produced using a manufacturing process similar to that of cooked cured ham. The only curing agent permitted in the production of *botifarra catalana* is nitrite (BOE, 2007; European Commission, 2006) which provides the distinctive color of cooked cured meat. Nitrite also acts as an antimicrobial controlling *Clostridium botulinum*, prevents oxidation and gives the sausage a cured flavor (Pegg & Shahidi, 2000; Toldrá, 2002). Despite all of these desirable effects, under certain conditions, nitrite can react with amines and amino acids in meat and produce *N*-nitrosamines, which play a role in human carcinogenesis. Therefore, the amount of curing agent that can be added to or contained in the cured product is regulated (BOE, 2007; European Commission, 2006).

Organic food is currently one of the fastest growing areas of the food industry in Europe, North America, Australia and Japan. Consumers are willing to pay more for organic food because they perceive these products to be healthier, tastier and of higher quality, produced with animal welfare in mind and free of additives (Krystallis & Chryssohoidis, 2005; Makatouni, 2002). However, the omission of curing agents without sufficient technological knowledge and modification of processes results in poor sensory and microbiological quality (Hammes, 2012). Vegetables and vegetable concentrates, which have naturally occurring nitrates, have been used to circumvent the addition of curing salts to prevent the loss of the typical sensory characteristics of classical curing. Once added to sausages, nitrate needs to be reduced to nitrite to

maximize the potential for introducing natural sources of nitrite into the processed meat (Sebranek & Bacus, 2007).

At the beginning of the 20th century, studies on fermentation in meat were carried out. The introduction of starter cultures allowed the meat industry to control the fermentation process to ensure high standards of sensory quality and hygiene while reducing production times and costs. Some starter cultures also ensure that the added nitrate or nitrite is reduced to safe low limits (Hammes, 2012). The most efficient nitrate-reducing organisms are staphylococci and micrococci and these are therefore crucial for meats cured using nitrate sources (Sebranek & Bacus, 2007).

Lipid oxidation promotes rancidity changes and also has been correlated with meat discoloration (Parra et al., 2010; Wood et al., 2008). Nitrite exerts an antioxidative effect by preventing the release of iron from the porphyrin molecule, protecting unsaturated lipids in membranes against oxidation, interacting as a metal chelator and forming nitroso and nitrosyl compounds, which, in turn, act as radical scavengers (Pegg & Shahidi, 2000). Therefore, reducing nitrite levels may increase the susceptibility of sausages to oxidation, thereby making it necessary to protect these meat products with antioxidants. Vitamin E can be used as an antioxidant because it stabilizes the desired color and inhibits lipid oxidation in meat products (Dineen et al., 2000). Furthermore, some studies have revealed that it minimizes the formation of *N*-nitrosamines (Fennema, Parkin, & Damodaran, 2007).

The objective of the present study was to examine the effects of producing organic *botifarra catalana* using various methods, including the addition of tocopherol extract and vegetable concentrates to the sausage formula, and a combination of starter cultures and fermentation temperatures, on various quality parameters.

2. Materials and methods

2.1. Reagents, standards and ingredients

Tocopherol extract (Guardian™ Toco 50, 50% mixed tocopherols) was obtained from Danisco (Copenhagen, Denmark). A bioprotective starter culture containing *Lactobacillus sakei* and *Staphylococcus xylosus* (B-FM SafePro™), a culture with intense nitrate reductase activity that contains *Staphylococcus carnosus* (CS-300 BactoFerm®) and a vegetable concentrate (Natasy CC 227) were obtained from CHR Hansen (Hørsholm, Denmark). Sodium nitrite, used as a pure sodium-nitrite source (99.6%), was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Sodium ascorbate, dextrose and salt were obtained from Espècies Teixidor (Manresa, Spain). Ground white pepper was obtained from Gewürzmüller (Korntal-Münchingen, Germany). Tocopherol standards were obtained from Calbiochem (San Diego, CA, USA). All chemicals used were of ACS grade except the solvents used in the induced ferrous oxidation–xylenol orange (FOX) method, the Hornsey method and the tocopherol plus tocotrienol determination, which were of HPLC grade.

2.2. Experimental design

Twelve treatments resulted from a 2x3x2 factorial design (Table 1), which aimed to study the effects of adding a tocopherol extract (0 and 200 mg of mixed tocopherols/kg of raw mixture), of three different fermentation types (12 h at 16 °C with bioprotective and nitrate-reducing cultures, type A; at 4 °C with only a nitrate-reducing culture, type B, or; at 4 °C without starter cultures, type C), and of two different sources of nitrite (pure sodium nitrite or a vegetable concentrate, each providing the equivalent of 70 mg of NaNO₂/kg raw mixture), on several quality parameters of cooked cured meat. The concentration of nitrite added was below the maximum level of ingoing sodium nitrite

allowed in organic meat products (European Commission, 2008). A previous study (Magrinyà, Bou, Rius, Codony, & Guardiola, 2012) that examined different fermentation times at 16 °C demonstrated that type A yielded *botifarra catalana* with acceptable quality parameters. Type B was included because the nitrate-reducing culture used is, according to the producer, effective at low temperatures (10 °C) and the progressive cooking procedure, including an initial step at 40 °C for 2 h, favors its activity (Magrinyà et al., 2012). Sausages resulting from the treatments were cooked and thereafter stored at 4 °C for 0, 60 or 120 days. Consequently, the inclusion of the storage time as a factor resulted in 36 different samples.

2.3. Sausage preparation and sampling

A mixture consisting of 40.8 kg of lean back meat plus 4.8 kg of jowl fat from organic pigs was used to prepare the ground meat. After homogenization, raw mixture was divided into two batches of 22.8 kg. For microbiological quality control of the meat mixture, 50 g of each batch was taken aseptically and analyzed as described below. Afterwards, 100 mL of sunflower oil with or without tocopherol extract was added to each batch. In each batch, the common ingredients (432 g salt, 72 g white pepper and 72 g dextrose) were added following dispersal in 300 mL of cold spring water. After the addition of these ingredients, each batch was mixed for 90 seconds. To characterize these initial raw mixtures (moisture, crude fat, fatty acid composition, pH, and tocopherol and tocotrienol content), samples from these two mixtures, with and without tocopherol extract, were finely ground (Retsch knife mill, model Grindomix GM200; Haan, Germany) and vacuum packed in high-barrier multilayer bags (Cryovac® BB325; 130 x 180 mm; permeability to oxygen, $25 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{bar}^{-1}$ at 23 °C and 0% RH; approximately 20 g of meat/bag) and stored at -25 °C until analysis.

Each batch was further divided in three, resulting in six different batches of 7.8 kg of raw mixture. The starter cultures, 0.25g/kg of *Staphylococcus carnosus* and 0.25 g/kg of the bioprotective culture, were added to the raw mixtures dispersed in 28 mL of cold spring water, in accordance with the experimental design (Table 1). Also, 28 mL of cold spring water was added to the raw mixtures without starter cultures. After this addition, each batch was manually mixed for five minutes. The six batches were then divided in two, resulting in 12 batches of 3.88 kg, and samples of each batch were taken aseptically for microbiological analysis. The meat was then stored at 4 ± 2 °C until the following day.

After storage, the nitrite source, 50 mL of a dilution of pure NaNO₂ (5.66 mg NaNO₂/mL) or vegetable concentrate (0.26 g vegetable concentrate/mL), was added to the batches in accordance with the experimental design (Table 1). Ascorbic acid (0.5 g/kg) was added together with the nitrite sources. Subsequently, the raw mixtures were manually mixed for two minutes and stuffed into natural casings (50-55 mm in diameter). To check nitrite dose, samples from these 12 mixtures were finely ground (Retsch knife mill, model Grindomix GM200; Haan, Germany), vacuum packed in high-barrier multilayer bags (Cryovac® BB325; approximately 20 g meat/bag) and stored at -25 °C until nitrate and nitrite analysis. The pH was also determined on the 12 raw mixtures. Five sausages per treatment weighing around 500 g were fermented for 12 h at 16 °C or 4 °C in accordance with the experimental design (Table 1).

After this period, samples were taken aseptically for microbiological analysis and the pH was measured again. Sausages were then vacuum packed (Cryovac® HT3050; 325 x 550 mm; permeability to oxygen, $15 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{bar}^{-1}$ at 23 °C and 0% RH) and cooked in a cooking pot containing 50 L of tap water in the following order: first, they were heated at 40 °C for 2 h, then risen up to 60 °C and maintained for 2 h at this

temperature, and finally, risen up to 78 °C and maintained at this temperature until the interior of the sausage reached a temperature of 72 °C. The sausages were then removed from the cooking pot and allowed to cool at room temperature. Those sausages intended for chemical analyses were then stored for 0, 60 and 120 days at 4 °C, whereas those intended for sensory analysis were stored for 60 days at 4 °C. Following the storage period, sausages were finely ground (Robot Coupe mixer, model BX3; Jackson, MS, USA), vacuum packed in high-barrier multilayer bags (Cryovac® BB325; approximately 15 g meat/bag) and stored at -25 °C until analysis. Unless otherwise specified, each sample was analyzed twice and the average of obtained results was treated as a single measurement.

2.4. Moisture and pH determination

The moisture of the samples (initial raw mixtures and cooked sausages) was determined using the ISO 1442 procedure (International Organization for Standardization, 1997) and used to express some results on a dry-weight basis. The measurement of pH in the samples (initial raw mixtures and final raw mixtures before and after each fermentation type) was carried out in quintuplicate using a pH meter (Crison pH 25 model; Crison Instruments, S.A., Alella, Spain), calibrated with standard buffers at pH 4.0 and pH 7.0, and the average was treated as a single measurement.

2.5. Determination of crude fat content and fatty acid composition

The fat content of the raw mixtures was measured in accordance with the AOAC Official Method 991.36 (AOAC International, 2000). Fatty acid composition of raw mixtures was determined by gas chromatography (Bou, Codony, Tres, Baucells, & Guardiola, 2005). First, lipid extraction was carried out with 20 mL chloroform/methanol (2:1, v/v) in 1.5 g raw mixture, which was subsequently re-

extracted twice using 10 mL of the same solvent mixture each time. Fatty acid methyl esters were then prepared from this fraction using sodium methoxide and BF₃. Fat content was expressed on a fresh-weight basis, whereas fatty acid composition was expressed as a percentage of area normalization.

2.6. Microbiological analysis

Twenty-five grams of either raw mixtures or fermented sausages were taken aseptically and homogenized with 75 mL of buffered peptone water (BPW; OXOID, Basingstoke, UK) for 2 min in an IUL masticator (IUL S.A., Barcelona, Spain). Serial decimal dilutions were made in sterile Ringer ¼ solution (Scharlau, Barcelona, Spain). The following food-borne pathogens were determined in the raw sausages: *Escherichia coli* was enumerated on MacConkey agar (OXOID) and *Staphylococcus aureus* on Mannitol salt agar (MSA; OXOID); and the population of sulfite-reducing clostridia was determined by counting on SPS agar (Scharlau) anaerobically. All agars were incubated at 37 °C for 48 h. After counting, lactose-positive colonies from MacConkey agar were randomly selected, picked up and transferred to Trypticase soy agar plates (TSA; OXOID). After incubation at 37 °C for 24 h, they were subjected to the oxidase test, growth on Eosin Methylene Blue agar (EMB; OXOID) and the indole test (Bell, Neaves, & Williams, 2005). Other biochemical properties were studied using API 20E identification strips (bioMérieux España, Madrid, Spain), DNase agar (OXOID), the catalase production and the coagulase test (Bell et al., 2005). API STAPH identification strips (bioMérieux España) were used to identify mannitol-positive colonies on MSA. The absence of *Salmonella* was determined by pre-enrichment in BPW for 16 h at 37 °C, enrichment in Selenite Cystine Broth (OXOID) for 24 h at 37 °C and in Rappaport Vassiliadis Broth (OXOID) for 24 h at 42 °C, and isolation on SS agar (OXOID) and DCLS agar (OXOID). Both agars were incubated for 48 h at 37 °C. Kligler Iron agar

(OXOID), Lysine Iron agar (OXOID), Urease Broth (OXOID) and API 20E system (bioMérieux España) were used to identify colonies grown on SS agar and/or DCLS agar. Starter bacteria were analyzed before and after fermentation by spread plating on MRS agar (OXOID) for lactic acid bacteria and on MSA (OXOID) for staphylococci. Both cultures were incubated at 30 °C for three days. Colonies from countable plates were initially tested for morphology, Gram stain, catalase production and nitrate reductase activity (Bell et al., 2005). The API STAPH system (bioMérieux España) was used to identify *Micrococcaceae*. Gram stain and API 20C AUX identification strips (bioMérieux España) were used to identify yeasts grown on MRS agar plates. Microbiota is destroyed by cooking, and therefore lactobacilli and total staphylococci were not analyzed at the different storage time points.

2.7. Nitrate and nitrite determination

Determination of the residual nitrate and nitrite contents was carried out as described elsewhere (Magrinya et al., 2009). Nitrate and nitrite determination was carried out in the raw mixtures after the addition of nitrite sources and in the sausages at the different storage time periods.

2.8. Total and cured pigment analysis

Mononitrosylhemochrome and total pigment concentrations of the cooked sausages were measured after extraction in 80% acetone and acidified acetone, respectively, using the Hornsey's method (Wrolstad, 2005).

2.9. Color measurements

Color was measured using a Konica Minolta Chroma-Meter (model CR-410; Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan) based on the CIE $L^*a^*b^*$ color space. CIE

(Commission Internationale de l'Eclairage) L^* (lightness), a^* (redness/greenness) and b^* (yellowness/blueness) were determined from five different random surfaces of the ground cooked sausages and the average of each parameter was treated as a single measurement. The instrument was set for illuminant D-65 and at a 2° observer angle and standardized using a standard white plate. The CIE $L^*a^*b^*$ color space was transformed into the L^*C^*h color space, where L^* represents lightness, C^* represents chroma, and h represents the hue angle, as described elsewhere (Magrinyà et al., 2012).

2.10. Tocopherol and tocotrienol determination

Tocopherol and tocotrienol analogues were determined by HPLC (Nuchi et al., 2009). Two grams of ground raw mixture or sausage samples were saponified at 70°C for 30 minutes with methanolic KOH. Then, the unsaponifiable matter was extracted with petroleum ether. The extract was filtered, evaporated and dissolved in n-hexane prior to HPLC determination. Results were expressed as mg of each tocopherol or tocotrienol per kg on a dry-weight basis.

2.11. Oxidative status and susceptibility to oxidation

The ferrous oxidation-xylenol orange (FOX) method was used to measure the lipid hydroperoxide (LHP) content and the susceptibility to oxidation of the samples (Bou, Codony, Tres, Decker, & Guardiola, 2008). The LHP content was determined after 30 minutes of incubation, whereas the time course of LHP formed after incubation over 144 hours was used to calculate the area under the curve (AUC) parameter of the induced FOX assay to assess the samples' susceptibility to oxidation, as described elsewhere (Tres, Daniela Nuchi, Bou, Codony, & Guardiola, 2009). The induced FOX assay to measure susceptibility to oxidation was carried out only once in the non-stored cooked sausages.

Thiobarbituric acid (TBA) values were determined to assess secondary oxidation. The determination was carried out after the acid aqueous extraction of the samples through third-derivative spectrophotometry (Grau, Guardiola, Boatella, Barroeta, & Codony, 2000). After the reaction of the extract with the TBA, the third derivative of the spectra was used to improve the selectivity and sensitivity of the determination in comparison to other spectrophotometric methods (Botsoglou et al., 1994). LHP content and TBA values were determined in all cooked sausages.

2.12. Sensory analysis

Samples stored at 4 °C for 60 days were randomly presented to the consumers in a balanced incomplete block design (Cochran & Cox, 1957): twelve blocks, five samples per block and five replicates for each sample treatment. This design was made in triplicate by using thirty-six consumers to evaluate overall acceptability of the product. In addition, each panelist evaluated the acceptability of a blind control (in total six samples were given to each panelist), which was a commercial sausage. Each consumer had several slices of the samples and the blind control sausage, which were placed on white plastic dishes, identified by random three-digit numbers and served to the consumer panel at room temperature. Water and unsalted crackers were provided to panelists to cleanse their palates between each sample. Consumer panelists were asked to rank the overall acceptability of the product on a nine-point scale (1 = very bad; 9 = very good). The scores given by each panelist for the blind control were subtracted from their respective sample acceptability scores.

2.13. Statistical analyses

A multifactor ANOVA determined significant differences produced by the different factors on sample moisture, microbial determinations, pH, residual nitrate and nitrite

content, mononitrosylhemochrome and total pigment concentrations, color measurements, tocopherol and tocotrienol analogues, TBA values, LHP content, susceptibility to oxidation (induced FOX assay, AUC) and overall acceptability. The factors studied were tocopherol extract addition (0 and 200 mg of tocopherol analogues/kg), fermentation conditions for 12 h (at 16 °C with bioprotective and nitrate-reducing cultures, at 4 °C with nitrate-reducing culture and at 4 °C without starter cultures), nitrite source (pure sodium nitrite or vegetable concentrate) and storage time (0, 60 and 120 days at 4 °C), except for microbiological analyses, pH and induced FOX assay, which were only determined before the storage, and overall acceptability, which was evaluated only after 60 days of storage. Interactions between more than two factors were ignored. When significant interactions were found between two factors, series of one-way ANOVAs (for factors with more than two levels) or *t*-tests (for factors with two levels) were performed for each factor by fixing the other factor at each specific level. In all cases, $P \leq 0.05$ was considered significant. When significant differences were found through the multifactor or one-way ANOVAs, the least-squares means and means were separated using Scheffé's test ($\alpha=0.05$).

3. Results and discussion

3.1. Moisture, crude fat, fatty acid composition and pH of raw mixtures

The moisture of both raw mixtures, with and without tocopherol extract, was $65.5 \pm 0.4\%$. The crude fat content of the raw mixture with tocopherol extract was $12.9 \pm 0.24\%$ and $13.4 \pm 0.28\%$ for that without tocopherol extract. The relative percentages of saturated fatty acids, monounsaturated fatty acids and polyunsaturated fatty acids of the raw mixture with the addition of the tocopherol extract were 38.29, 49.56, and 12.15%, respectively, whereas for the raw mixture without the addition of

the tocopherol extract, they were 38.70, 49.26, and 12.04%, respectively. The pHs of raw mixtures with and without tocopherol extract were 5.72 ± 0.06 and 5.72 ± 0.07 , respectively. Therefore, the moisture, crude fat content, fatty acid composition and pH were not significantly different for both raw mixtures.

3.2. Microbiological analyses and pH determination

The raw mixtures were checked for the presence of food poisoning bacteria. *E. coli* and *S. aureus* were less than 4×10^2 cfu/g; *Salmonella* sp. was absent in 25 g; and sulfite-reducing clostridia were less than 10 cfu/g. Raw mixtures met microbiological standards for raw minced meat.

Lactobacilli and total staphylococci were analyzed in raw mixtures after the addition of the starters and in sausages after the three types of fermentation. In type A, a mixture of *Lactobacillus sakei* and *S. xylosus*, and *S. carnosus* were added to the raw mixtures at 6 log cfu/g, as recommended by the manufacturer, and sausages were fermented at 16°C for 12 h. In type B, only *S. carnosus* starter culture was added and fermentation was conducted at 4°C for 12 h. In type C, the sausages were fermented at 4°C for 12 h without the addition of starter cultures. Table 2 summarizes the results obtained from the fermented sausages. The lactobacilli and staphylococci were affected by the fermentation type used. The higher counts of lactobacilli on MRS agar were found in type A of fermentation which allowed these bacteria to grow. Before fermentation the pH was 5.66 for all treatments. A clear drop in pH (from 5.66 to 5.30) occurred after 12 hours in those sausages produced using type A of fermentation (Table 2). *Lactobacillus sakei* produces lactic acid and increases acidification during fermentation. Therefore, the pH drop was due to the lactic acid produced by the starter culture used (Vermeiren, Devlieghere, & Debevere, 2004).

There were no significant differences between the concentration of total staphylococci before and after the fermentation process (data not shown). This suggests that mild temperatures are not sufficient to promote growth of these bacteria because the sausages fermented at 4 °C (type B) had the same cfu/g as those fermented at 16 °C (type A). However, staphylococcal strains belonging to *S. xylosus* and *S. carnosus* were reported to reduce nitrate to nitrite at 15 °C, 20 °C and 30 °C (Casaburi, Blaiotta, Mauriello, Pepe, & Villani, 2005; Mauriello, Casaburi, Blaiotta, & Villani, 2004; Miralles, Flores, & Perez-Martinez, 1996). Thus, residual nitrite concentration after fermentation was higher in sausages fermented only with *S. carnosus* at 4 °C (type B), than in those fermented with two nitrate-reductase active staphylococci (*S. carnosus* and *S. xylosus*) at 16 °C (type A) (Table 3).

In the type C sausages, the initial counts on the MRS were estimated at 5.9 log cfu/g. The overgrowth of yeasts on the MRS plates and the fact that no LAB were retrieved from any of the MRS plates led us to estimate LAB counts at less than 2.6 log cfu/g, which was the detection limit of the agar plate method. Yeast species found in our samples identified as *Candida zeylanoides*, *C. lipolytica* and *C. famata*, are considered psychrotrophic. *C. parapsilosis* was also detected in the sausage mixture. The presence of these yeast species has been reported in salami, fresh sausages and Spanish fermented sausages (Coppola, Mauriello, Aponte, Moschetti, & Villani, 2000; Encinas, Lopez-Diaz, Garcia-Lopez, Otero, & Moreno, 2000; Gardini et al., 2001; Romano, Capece, & Jespersen, 2006). Initial content of staphylococci was 4.7 log cfu/g; 12 of the isolates belonged to *S. xylosus* and three isolates were identified as *S. sciuri* or *S. capitis*. *S. sciuri* and *S. capitis* have been isolated from dried fermented sausage (Papamanoli, Kotzekidou, Tzanetakis, & Litopoulou-Tzanetaki, 2002) and from the salt used in Spanish dry-cured ham (Cordero & Zumalacarregui, 2000). These species are usually

isolated from the skin of humans and animals and their presence in the meat mixture suggests that human isolates were transmitted to the mixtures (Kloos, Schleifer, & Gütz, 1992). Nitrate reductase activity was observed for 10 isolated *S. xylosus* strains. Our results are similar to those reported by Janssens, Myter, De Vuyst, & Leroy (2012), Casaburi et al. (2005), Mauriello et al. (2004), Garcia-Varona, Santos, Jaime, & Rovira (2000) and Miralles et al. (1996). Total counts on the MRS agar plates increased by less than one log cfu/g after 12 h of fermentation. The cell number increase on the MRS was due to yeasts, and the final number of lactobacilli was 2.6 log cfu/g (Table 2). The number of total staphylococci found after fermentation is in line with that reported by (Miralles et al., 1996) in naturally fermented sausages produced without the addition of starter cultures. Yeasts and nitrate-reductase active staphylococci found in these sausages may affect product quality, although to a much lesser extent than starter cultures (Mauriello et al., 2004; Sorensen & Samuelsen, 1996).

Sausages in which pure sodium nitrite was added had significantly more lactobacilli than sausages made with the vegetable concentrate (Table 2). Plants, herbs and spices have been reported as sources of natural antimicrobials, and therefore the lower concentration of lactobacilli could be due to antimicrobial properties of the vegetable concentrate, which is made from celery and carrot (Beuchat, 2007; Palou, Alzamora, & Lopez-Malo Vigil, 2005).

3.3. Nitrate and nitrite residual amounts

The residual nitrate and nitrite levels in sausages are presented in Table 3. In all cases, sausages fermented with *S. carnosus* (type A and B) were far below the limit established for organic production (European Commission, 2008).

Significant differences were observed for residual nitrate and nitrite content depending on fermentation type, nitrite source and storage time. The type C of fermentation and the use of vegetable concentrate as a curing agent led to higher residual nitrate levels (Table 3). There was significant interaction between the nitrite source and fermentation type for the residual nitrate amount (Figure 1). As expected, sausages without starter cultures (type C) had higher amounts of residual nitrate, especially in those sausages formulated with the nitrate-rich vegetable concentrate. It is well known that nitrite is the true curing agent, which after several reduction reactions combines with myoglobin or metmyoglobin to form cured meat pigments and cured color. Therefore, when nitrate-rich vegetable concentrates are used, a nitrate-reducing bacterial culture is required for the curing process (Sebranek & Bacus, 2007; Sindelar, Cordray, Sebranek, Love, & Ahn, 2007b).

Sausages produced with type B of fermentation and sausages produced with pure sodium nitrite instead of vegetable concentrate as a curing agent showed higher amounts of residual nitrite (Table 3). This is because the interaction between nitrite source and fermentation type significantly influenced residual nitrite levels (Figure 1). Sausages formulated with vegetable concentrate and subjected to the type C of fermentation had much lower residual nitrite amounts than the corresponding sausages formulated with pure NaNO_2 . This is due to the fact that the reduction reaction from nitrate to nitrite is very low when fermentation is conducted at 4 °C for 12 h without starter cultures, which is consistent with the high residual nitrate amounts found in those sausages formulated with vegetable concentrate and fermented in these conditions (Figure 1). On the other hand, residual nitrite amounts found in type A and type B sausages, fermented with a nitrate-reducing starter culture (*Staphylococcus carnosus*), did not differ significantly between nitrite sources (Figure 1). This result is in agreement with a previous

experiment (Magrinyà et al., 2012), showing that it is possible to use a vegetable concentrate in combination with a nitrate-reducing starter culture to obtain a cooked cured sausage with the same residual nitrite level than that obtained by adding pure sodium nitrite.

The depletion of nitrite throughout the storage time of cooked cured meat products is a widely recognized phenomenon (Hustad et al., 1973; Jantawat, Runglerdkriangkrai, Thunpithayakul, & Sanguandeekul, 1993; Krause, Sebranek, Rust, & Mendonca, 2011; Sindelar, Cordray, Sebranek, Love, & Ahn, 2007a; Sindelar, Cordray, Sebranek, Love, & Ahn, 2007b; Terns, Milkowski, Rankin, & Sindelar, 2011a; Terns, Milkowski, Claus, & Sindelar, 2011b) that agrees with the reduction in residual nitrite amounts found throughout the duration of storage (Table 3). On the other hand, residual nitrate levels showed a different behavior during storage (Table 3). The regeneration of nitrate from nitrite is not uncommon in meats (Marco, Navarro, & Flores, 2006; Sindelar, Cordray, Sebranek, Love, & Ahn, 2007a; Sindelar, Terns, Meyn, & Boles, 2010; Terns et al., 2011a; Terns et al., 2011b; Tsoukalas, Katsanidis, Marantidou, & Bloukas, 2011), and it is attributed to an oxidative reaction between the added nitrite and various compounds present in the food matrix (Magrinyà et al., 2012). Therefore, under our conditions a portion of nitrite may have been continually converted to nitrate, helping to maintain nitrate levels or even increasing them over time. Despite this increase in residual nitrate over time, the sum of the residual nitrate and nitrite levels, expressed as nitrate ion, decreased with storage time, which indicates that the curing agents could be involved in curing reactions during storage of the cooked sausages.

3.4. Total and cured pigment analyses

The mononitrosylhemochrome concentration of the sausages is given in Table 3. This table also shows the efficiency of meat curing expressed as follows: curing efficiency (%) = (mg/kg mononitrosylhemochrome / mg/kg total heme pigments) x 100. Cured meat products are considered acceptable when the pigment conversion ratio is 80% or higher (Wrolstad, 2005), although lower ratios have also been reported as normal in other cooked sausages (Carballo, Cavestany, & Jimenez-Colmenero, 1991; Terns et al., 2011a). The main effects of fermentation type and nitrite source were observed as significant for nitrosylhemochrome concentration and curing efficiency (Table 3). The lowest concentration of the characteristic cured pigment was found in type C sausages to which no starter cultures were added. Moreover, type A sausages (fermented at 16 °C for 12 h with starter cultures) showed the highest curing efficiency. Although the curing efficiency for sausages subjected to type B of fermentation was lower than that of sausages fermented according to type A of fermentation, the curing efficiency was acceptable (above 80%).

The results in Table 3 show that the use of vegetable concentrate affected the curing process, because those sausages in which this nitrite source was used seemed to have lower nitrosylhemochrome concentration and lower curing efficiency. However, these misleading results can be explained by the interaction between the fermentation type and nitrite source factors (Figure 2). Those sausages formulated with the vegetable concentrate in combination with type C of fermentation recorded much lower concentrations of nitrosylhemochrome and much lower curing efficiency, but no differences were found between the three fermentation conditions when pure sodium nitrite was used (Figure 2). As expected, when the sausages were formulated with a nitrate-rich vegetable concentrate as a source of nitrite, the lack of a starter culture with

nitrate reductase activity resulted in sausages with much lower levels of cured pigment, which demonstrates the crucial role of *Staphylococcus carnosus* during fermentation in producing cooked cured sausages when this source of nitrite is used (Casaburi et al., 2005).

3.5. Color measurements

Lightness (L^*), redness (a^*), chroma (C^*) and hue angle (h) of the sausages are listed in Table 3. The fermentation type and the nitrite source factors influenced all of the studied parameters. Lightness (L^*) was higher in type A sausages fermented at 16 °C for 12 h with the bioprotective starter culture (*Lactobacillus sakei* and *Staphylococcus xylosum*) and the nitrate-reducing culture (*Staphylococcus carnosus*). The color and texture of the sausages depended on protein denaturation caused by the pH drop and heat treatments. With respect to the pH drop, it has been reported that salami fermented with lactic acid bacteria resulted in higher L^* and a^* values (Barbut, 2010). The author also found that cooking led to cooked sausages with higher L^* values compared to raw meat mixtures. Therefore, it is reasonable that those sausages initially fermented at 16 °C for 12 h and with lower pH values (Table 2) resulted in higher L^* after cooking when compared with other sausages in which the pH drop was not evident. Increased redness was found in those sausages fermented with *Staphylococcus carnosus*, regardless of fermentation temperature. The a^* value is related to visible redness in meat (Mancini & Hunt, 2005) and the content of nitrosylhemochrome (Barbut, 2010; Li, Li, Xu, & Zhou, 2012). Therefore, the lower a^* value in sausages without starter cultures (type C) could be explained by the lack of nitrate-to-nitrite conversion and the inhibition of the subsequent curing process involving the formation of nitrosyl heme pigments.

According to the results shown in Table 3, the addition of pure sodium nitrite to the sausage formula as a curing agent produced darker and redder sausages with higher color saturation. This is in agreement with Krause et al. (2011) who found that hams formulated with pure sodium nitrite presented a more intense cured color than those cured with vegetable juice powder. Besides, a significant interaction between the fermentation type and nitrite source was found in the color parameters (Figure 3). Therefore, as mentioned above, when sausages are formulated with vegetable concentrate, nitrate is efficiently reduced to nitrite by the nitrate-reducing starter culture and consequently the cured pigment is efficiently formed in these sausages (Figures 1 and 2). Therefore, these sausages had the same a^* values as those sausages produced using pure sodium nitrite (Figure 3). Terns et al. (2011a) reported similar results in cooked cured sausages. The interactions found for the hue angle and chroma values are probably also a consequence of the intense nitrate reductase activity of the *Staphylococcus carnosus* culture. Conversely, several authors (Magrinya et al., 2009; Magrinyà et al., 2012; Terns et al., 2011a; Terns et al., 2011b; Tsoukalas et al., 2011) have found that similar vegetable concentrates produced lighter and yellower sausages compared to those made with pure sodium nitrite, and this was also attributed to the intrinsic color of the powder.

The color of the sausages was constant throughout the storage time. Likewise, lightness and yellowness have been reported to show no consistent variations in vacuum-packaged bologna sausages (Carballo et al., 1991) and sliced ham (Krause et al., 2011) stored for 42 or more days in the dark at chilling temperatures. However, Terns et al. (2011a, 2011b) found that the L^* values and b^* values of vacuum-packaged cooked cured sausages increased throughout storage (at 2 °C up to 84 days) due to the decrease in darkish pigmented myoglobin concentrations. In fact, Terns et al., (2011a) and

Fernandez-Gines, Fernandez-Lopez, Sayas-Barbera, Sendra, & Perez-Alvarez (2003) observed a decrease in a^* values throughout storage associated with the cured pigment degradation. In other studies a^* values increased over storage time and this was explained by the fact that residual nitrite reacted with myoglobin during storage and produced colored pigments (Sindelar, Cordray, Sebranek, Love, & Ahn, 2007b; Terns et al., 2011b). The fact that the cured sausage pigment in the present study was constant over storage time (Table 3) could explain the color stability of *botifarra catalana* during vacuum-packaged storage at chilling temperatures. This could also be related to the decrease of the sum of residual nitrate and nitrite amounts observed over the storage time of the cooked sausages.

3.6. Tocopherol and tocotrienol content

The tocopherol and tocotrienol content was determined in the raw mixtures with and without the tocopherol extract. The α -tocopherol, β -tocopherol, γ -tocopherol, and α -tocotrienol content in the mixture without the addition of the tocopherol extract averaged 10.7 ± 0.73 , 0.33 ± 0.038 , 0.31 ± 0.031 and 0.40 ± 0.010 mg/kg, expressed as dry weight, respectively, whereas in the mixture containing the tocopherol extract they averaged 81.5 ± 6.31 , 8.1 ± 2.58 , 209 ± 10.6 and 31.1 ± 2.08 mg/kg.

The tocopherol analogue contents of the sausages are reported in Table 4. As Magrinya et al. (2009) also observed, the addition of the tocopherol extract to the formula led to significant changes in the different analogue contents in the sausages. This extract is particularly rich in γ -tocopherol (Table 1 footnote), which explains the high content of this analogue in sausages and the raw mixture containing this tocopherol extract. It is interesting to note that the cooking procedure had no significant effect on the tocopherol content provided there were no differences between the tocopherol content in the raw

mixtures and sausages, as described by other authors (Liu, Scheller, Schaefer, Arp, & Williams, 1994; Santos, Ordonez, Cambero, D'Arrigo, & Hoz, 2004). Therefore, it is possible to add a tocopherol extract to raw meat mixtures to produce cooked cured sausages enriched with tocopherols. The interactions in the other studied factors did not show significant effects on the tocopherol and tocotrienol content of the sausages.

3.7. Oxidative status and susceptibility to oxidation

The LHP content of the sausages is given in Table 4. In comparison with other studies (Magrinya et al., 2009; Magrinyà et al., 2012), the LHP content was low, but significant enough to show differences based on fermentation type and storage time. Those sausages subjected to type C of fermentation showed the higher contents of LHP. It is well known that nitrite acts as an antioxidant in cured meats (Pegg & Shahidi, 2000). Therefore, the absence of nitrate-reducing starter cultures in samples containing nitrate, provided by means of the vegetable concentrate, decreased the formation of nitrite which in turn explains the higher LHP content. The increase in LHP content during storage has also been reported in vacuum-packaged dry-cured sausages (Magrinya et al., 2009).

With respect to secondary oxidation, no significant differences were found in TBA values of sausages for the main factors studied (Table 4). Although TBA values were higher than those found in a previous study (Magrinyà et al., 2012), they are in agreement with other studies dealing with other cooked cured meat products (Parra et al., 2010; Vossen et al., 2012). The addition of tocopherol extract was assessed to avoid lipid oxidation in sausages, but under our conditions its effect was not significant. However, various authors have reported that hams manufactured from pigs whose diet was supplemented with α -tocopheryl acetate exhibited the greatest degree of oxidative

stability during retail storage (DeWinne & Dirinck, 1997; Dineen et al., 2000). This could be related to the fact that the dietary supplementation with tocopheryl acetate has already been shown to be more effective against oxidation than the post mortem addition of tocopherol to meat (Jensen, Lauridsen, & Bertelsen, 1998).

TBA values did not significantly increase during storage time, as others authors have also found for vacuum-packed cured meat products (Carballo et al., 1991; Dineen et al., 2000; Parra et al., 2010). One explanation could be the higher oxidative stability of vacuum-packed cured products (Cilla, Martinez, Beltran, & Roncales, 2006). Furthermore, sodium nitrite has shown to be an effective antioxidant at levels as low as 50 mg/kg of ingoing nitrite (Pegg & Shahidi, 2000). On the same subject, the susceptibility to oxidation of *botifarra catalana* can be evaluated through the area under the curve (AUC) value (Table 4), which has shown to be the most useful parameter for estimating the susceptibility of samples by means of the induced FOX assay (Tres et al., 2009). The AUC values showed no differences for the main factors studied, in agreement with the fact that sausages were highly stable to oxidation during storage. This is probably due to a combination of vacuum packaging, refrigeration and nitrite content.

3.8. Sensory analysis

The results for the overall acceptability test carried out after 60 days storage at 4 ± 2 °C under vacuum packaging in sealed bags are shown in Table 4. There were no differences in the overall acceptability of the sausages containing the tocopherol extract (Table 4). In hams, De Winne & Dirinck (1997) found differences between the control and those with a higher content of α -tocopherol using a triangle test and a paired comparison. The results indicated that the supplemented ham had a fresher odor and

taste and these attributes were related to the lipid oxidation. TBARS values of 0.5 to 1.0 mg/kg have been suggested as the threshold for oxidized odor and 1.0 to 2.0 mg/kg for oxidized flavor (Tarladgis, Watts, Younathan, & Dugan, 1960). Therefore, the fact that all of TBA values were within the oxidized odor level and they did not differ between treatments (Table 4) could explain why consumers found no differences between the sausages with and without the tocopherol extract.

Meat-purchasing decisions are influenced by color more than any other quality factor since consumers use discoloration as an indicator of freshness and wholesomeness (Mancini & Hunt, 2005). This may explain why those sausages with the lowest scores presented less redness and chroma and a higher hue angle (Table 3). With respect to this, the lack of nitrate-reducing culture is crucial for color development and thus negatively affects overall acceptability.

Therefore, the use of nitrate reductase cultures not only helps develop a cured color but also may influence consumers' overall acceptability. In fact, in a previous study, consumers preferred *botifarra catalana* made with the same vegetable concentrate at 0.33%, even though sausages made with pure sodium nitrite were slightly redder (Magrinyà et al., 2012). In addition, trained panelists indicated that a vegetable aroma from vegetable concentrate, at concentrations about 0.3%, can be detected in hams (Sindelar, Cordray, Sebranek, Love, & Ahn, 2007a). Moreover, in comparison with the addition of pure sodium nitrite, consumers did not show any preference for overall acceptability in emulsified cooked sausages with added vegetable juice powder at 0.2% (Terns et al., 2011a). Thus, it is not clear whether consumers could detect the presence of vegetable concentrates and whether they had a preference for these sausages, but no dislike was expressed as long as the color was sufficiently red.

To conclude, it is possible to manufacture organic cooked cured sausages without the addition of pure sodium nitrite. Instead, nitrate-rich vegetable concentrates can be used as curing agents in fermented meat products. However, residual nitrate and nitrite should be minimized to avoid nitrosamine formation. The use of nitrate-reducing bacteria is an interesting approach to reduce these residual amounts and control curing reactions, even when the only curing agent used is nitrite. Therefore, it is advisable to produce organic *botifarra catalana* using vegetable concentrate in combination with cultures with an intense nitrate reductase activity.

Acknowledgments

N. Magrinyà obtained financial support from a FPU research grant from the Ministry of Science and Innovation. We thank Josep Dolcet and Pere Durán for their technical advice during preparation of the sausages and the *Gremi de Carnissers-Cansaladers-Xarcuters de Barcelona i Comarques* for using its facilities. We thank DANISCO and *Espècies Teixidor* for kindly providing some of the additives and ingredients. We also thank CHR-Hansen, particularly Albert Vila, for kindly providing the starter cultures and vegetable concentrate and giving us scientific information about CHR Hansen's products. We thank José Antonio León from the laboratory of the *Agència de Salut Pública de Barcelona* for his technical help in the analysis of residual nitrates and nitrites.

Table 1. Sausage treatments

Tocopherols (mg/kg)^a	Fermentation^b	Nitrite source^c
200	Type A	Pure sodium nitrite
200	Type A	Vegetable concentrate
200	Type B	Pure sodium nitrite
200	Type B	Vegetable concentrate
200	Type C	Pure sodium nitrite
200	Type C	Vegetable concentrate
0	Type A	Pure sodium nitrite
0	Type A	Vegetable concentrate
0	Type B	Pure sodium nitrite
0	Type B	Vegetable concentrate
0	Type C	Pure sodium nitrite
0	Type C	Vegetable concentrate

^a Expressed as a average sum of tocopherol analogues in mg/ kg of raw mixture. The tocopherol extract contains α -, β -, γ -, and δ -tocopherol analogues at the concentrations of 82 ± 2 , 8.2 ± 0.3 , 293 ± 9 , and 110 ± 2 g/kg, respectively.

^b Three different fermentation types, where A involves 12 h at 16 °C and contains a bioprotective starter culture, which includes *Lactobacillus sakei* and *Staphylococcus xylosus*, and a nitrate-reducing culture, which includes *Staphylococcus carnosus*; B involves 12 h at 4 °C and contains a nitrate-reducing culture, which includes *Staphylococcus carnosus*, and C involves 12 h at 4 °C and no starter cultures.

^c Addition of pure NaNO₂ or vegetable concentrate, each providing the equivalent to 70 mg NaNO₂/kg raw mixture.

Table 2. Effect of addition of tocopherol extract, fermentation type and nitrite source on microbial counts and pH of fermented *botifarra catalana* before cooking.^a

	Lactobacilli (log cfu/g) ^b	Staphylococci (log cfu/g) ^c	pH after fermentation
Tocopherol^d			
0	5.38	5.94	5.52
200	5.45	5.76	5.55
SEM ^e	0.021	0.108	0.010
Fermentation^f			
Type A	7.68 z	6.30 y	5.30 x
Type B	5.95 y	6.35 y	5.62 y
Type C	2.60 x	4.90 x	5.68 y
SEM	0.026	0.132	0.013
Nitrite source^g			
Pure sodium nitrite	5.55 y	5.89	5.51
Vegetable concentrate	5.28 x	5.81	5.55
SEM	0.210	0.108	0.010

^a Values given in this table correspond to least-squares means obtained from multifactor ANOVA (n = 12 for lactobacilli, staphylococci, and pH). Least-squares means within the same column for the same factor with different letters differ significantly (P ≤ 0.05).

^b Microbial counts expressed as the logarithm of lactobacilli colony-forming units per g of dried sample.

^c Microbial counts expressed as the logarithm of staphylococci colony-forming units per g of dried sample.

^d Tocopherol dose expressed in mg of tocopherol analogues/kg raw mixture.

^e SEM, standard error of the mean.

^f Three different fermentation types: A involves 12 h at 16 °C and contains a bioprotective starter culture, which includes *Lactobacillus sakei* and *Staphylococcus xylosus*, and a nitrate-reducing culture, which includes *Staphylococcus carnosus*; B involves 12 h at 4 °C and contains a nitrate-reducing culture, which includes *Staphylococcus carnosus*, and C involves 12 h at 4 °C and no starter cultures.

^g Pure NaNO₂ and the vegetable concentrate provided the equivalent to 70 mg NaNO₂/kg raw mixture.

1 **Table 3. Effect of addition of tocopherol extract, fermentation type, nitrite source, and storage time on residual nitrate and nitrite,**
2 **mononitrosylhemochrome, curing efficiency and instrumental color of cooked cured *boitfarra catalana*^a.**

	Residual nitrate ^b (mg/kg)	Residual nitrite ^c (mg/kg)	Mononitrosyl-hemochrome ^d (mg/kg)	Curing efficiency ^e (%)	Instrumental color ^f			
					L*	a*	C* h	
Tocopherol^g								
0	10.3 x	2.3	179	77.8	63.47	15.73	17.92	28.70
200	11.2 y	2.5	174	77.4	63.51	15.64	17.84	28.81
SEM ^h	0.32	0.40	2.0	0.56	0.094	0.058	0.042	0.156
Fermentationⁱ								
Type A	1.7 x	0.4 x	198 y	86.2 z	63.73 y	16.31 y	18.36 y	27.31 x
Type B	2.5 x	4.5 y	189 y	83.2 y	63.23 x	16.34 y	18.37 y	27.18 x
Type C	28.0 y	2.3 x	142 x	63.3 x	63.47 xy	14.04 x	16.92 x	31.78 y
SEM	0.39	0.49	2.5	0.69	0.115	0.071	0.051	0.192
Nitrite source^j								
Pure Sodium Nitrite	5.0 x	3.2 y	191 y	83.6 y	63.24 x	16.47 y	18.44y	26.71 x
Vegetable concentrate	16.6 y	1.7 x	162 x	71.5 x	63.74 y	14.90 x	17.33 x	30.79 y
SEM	0.32	0.40	2.0	0.56	0.094	0.058	0.042	0.156
Storage time (days)								

0	9.9 x	5.4 y	177	78.0	63.26	15.74	17.91	28.60
60	11.5 y	1.3 x	173	76.7	63.54	15.68	17.89	28.83
120	10.6 xy	0.5 x	180	78.0	63.68	15.64	17.85	28.83
SEM	0.39	0.49	2.5	0.69	0.115	0.071	0.051	0.192

^a Values given in this table correspond to least-squares means obtained from multifactor ANOVA (each determination has a n = 36). Least-squares means within the same column for the same factor with different letters differ significantly ($P \leq 0.05$).

^b Residual nitrate is expressed as mg of NaNO₃ per kg of sausage.

^c Residual nitrite is expressed as mg of NaNO₂ per kg of sausage.

^d Results are expressed as mg mononitrosylhemochrome per kg of sausage as dry weight.

^e Curing efficiency expressed as the percentage of the concentration of mononitrosylhemochrome divided by the concentration of total heme pigments, both concentrations expressed per kg of sausage as dry weight.

^f L*, lightness; a*, redness; b*, yellowness; chroma (C*) is the root of the sum of the squares of a* and b* and it is used to express color saturation; hue angle (h) is the arctangent of the quotient of b*/a* and is used to express color hue (h = 0, true red; h = 90, true yellow).

^g Tocopherol dose expressed in mg of tocopherol analogues/kg of raw mixture.

^h SEM, standard error of the mean.

ⁱ Three different fermentation types, where A involves 12 h at 16 °C and contains a bioprotective starter culture, which includes *Lactobacillus sakei* and *Staphylococcus xylosois*, and a nitrate-reducing culture, which includes *Staphylococcus carnosus*; B involves 12 h at 4 °C and contains a nitrate-reducing culture, which includes *Staphylococcus carnosus* and C involves 12 h at 4 °C and no starter cultures.

^j Pure NaNO₂ and the vegetable concentrate provided the equivalent to 70 mg NaNO₂/kg raw mixture.

19 **Table 4. Effect of addition of tocopherol extract, fermentation type, nitrite source, and storage time on tocopherol analogues, lipid**
 20 **hydroperoxide (LHP) content, thiobarbituric acid (TBA) values, susceptibility to oxidation (AUC) and consumers' overall acceptability**
 21 **of cooked cured *botifarra catalana*^a.**

	Tocopherol (mg/kg) ^b				LHP (µmol CHP eq/kg) ^c	TBA(µg MDA/kg) ^d	AUC ^e (mmol CHP eq kg ⁻¹ h)	Overall acceptability ^f
	α	β	γ	δ				
Tocopherol^g								
0	10.3x	0.3x	0.4x	ND ^h	18	669	30	-0.9
200	80.1y	12.7y	210.7y	28.5	19	558	30	-0.9
SEM ⁱ	0.72	0.13	1.67	0.26	1.3	3.4	6.3	0.31
Fermentation^j								
Type A	46.0	6.5	104.7	13.8	14 x	623	27	-1.1xy
Type B	44.7	6.5	106.0	14.4	15x	579	30	0.0y
Type C	45.0	6.5	106.0	14.4	26y	640	32	-1.6x
SEM	0.88	0.16	2.05	0.32	1.6	53.1	7.7	0.37
Nitrite source^k								
Pure Sodium Nitrite	45.2	6.3	105.9	14.1	16.9	589	29.6	-0.4y
Vegetable concentrate	45.2	6.7	105.2	14.4	20.6	638	30.0	-1.5x
SEM	0.72	0.13	1.67	0.26	1.32	43.4	6.30	0.31

Storage time (days)						
0	45.1	6.5	107.1	14.5	11.7x	570
60	45.0	6.5	104.7	14.1	18.4y	613
120	45.6	6.5	104.9	14.1	26.1z	659
SEM	0.88	0.16	2.05	0.32	1.61	53.1

22

23 ^a Values given in this table correspond to least-squares means obtained from multifactor ANOVA (n = 36, 36, 36, 12, and 180 for tocopherol and tocotrienol analogues, LHP,
 24 TBA values, AUC and overall acceptability, respectively). Least-squares means within the same column for the same factor with different letters differ significantly (P ≤
 25 0.05).

26 ^b Results are expressed as mg of each tocol analogue per kg of sausage as dry weight.

27 ^c Results are expressed as μmol of cumene hydroperoxide equivalents per kg of sausage as dry weight.

28 ^d Results are expressed as μg of malondialdehyde per kg of sausage as dry weight.

^e Results are the area under the curve (AUC) of lipid hydroperoxide formation determined by means of the induced ferrous oxidation-xylene orange (FOX) assay (incubation
 for 144 hours) and expressed as nmol of cumene hydroperoxide equivalents per kg of sausage as dry weight x hours. Only determined in freshly produced samples.

^f The results for acceptability are the difference between the scores for the experimental samples and the score for a commercial blind control. Only determined after storage
 for 60 days.

29 ^g Tocopherol dose expressed in mg of tocopherol analogues/kg raw mixture.

30 ^h ND, not detected.

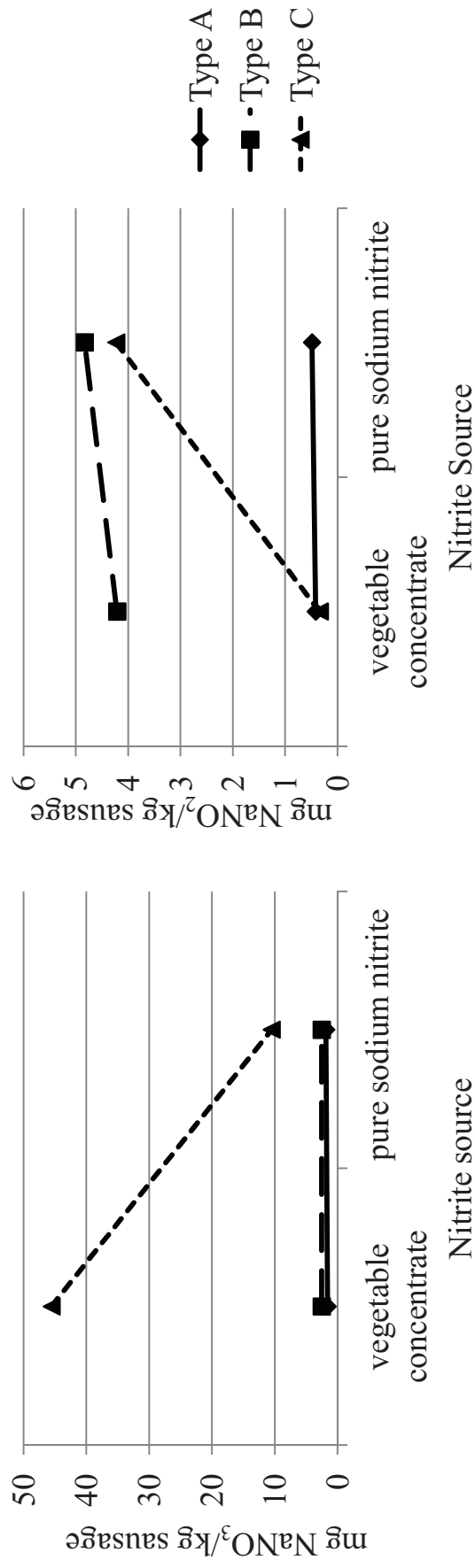
31 ⁱ SEM, standard error of the mean.

32 ^j Three different fermentation types, where A involves 12 h at 16 °C and contains a bioprotective starter culture, which includes *Lactobacillus sakei* and *Staphylococcus*
 33 *xylosus*, and a nitrate-reducing culture, which includes *Staphylococcus carnosus*; B involves 12 h at 4 °C and contains a nitrate-reducing culture, which includes
 34 *Staphylococcus carnosus*, and C involves 12 h at 4 °C and no starter cultures.

35 ^k Pure NaNO₂ and the vegetable concentrate provided the equivalent to 70 mg NaNO₂/kg raw mixture.

36

37 **Figure 1. Interaction between fermentation type and nitrite source for the residual nitrate and nitrite content in cooked sausages.**



38

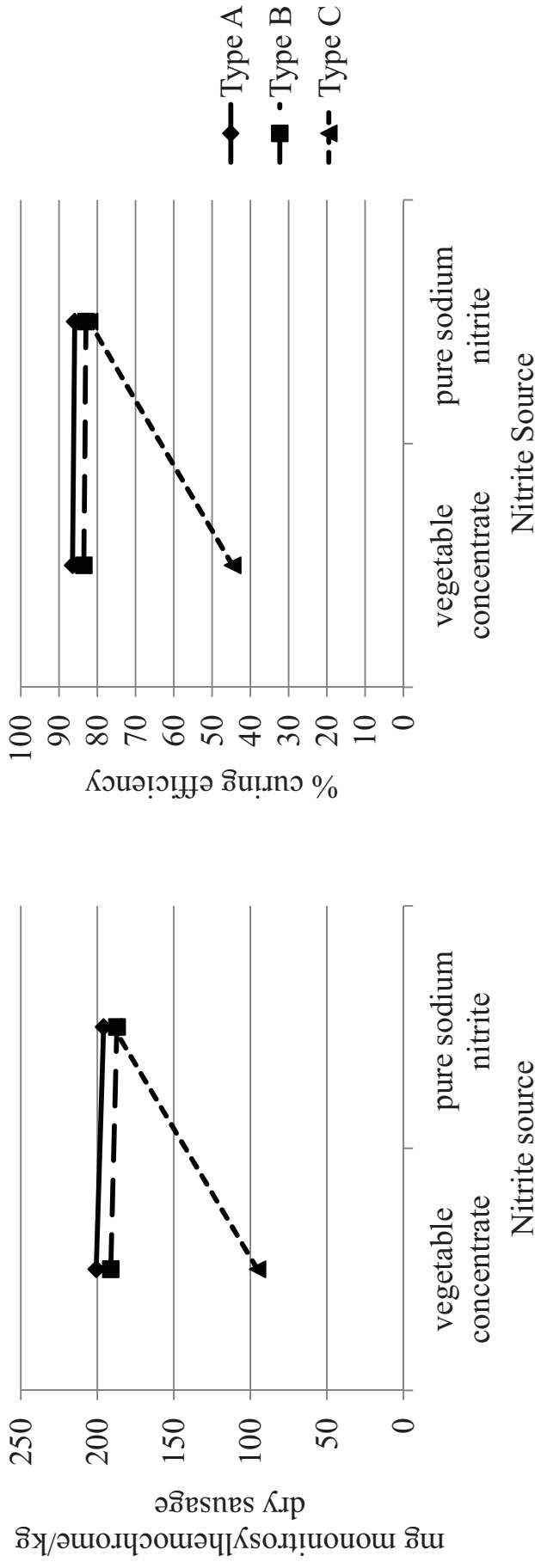
39 Type A: 12 h at 16 °C with a bioprotective starter culture, which includes *Lactobacillus sakei* and *Staphylococcus xylosum*, and a nitrate-reducing activity culture, which
 40 includes *Staphylococcus carnosus*.

41 Type B: 12 h at 4 °C with a nitrate-reducing culture, which includes *Staphylococcus carnosus*.

42 Type C: 12 h at 4 °C without starter cultures.

43

44 **Figure 2. Interaction between fermentation type and nitrite source for nitrosylhemochrome concentration and curing efficiency in**
 45 **cooked sausages.**



46

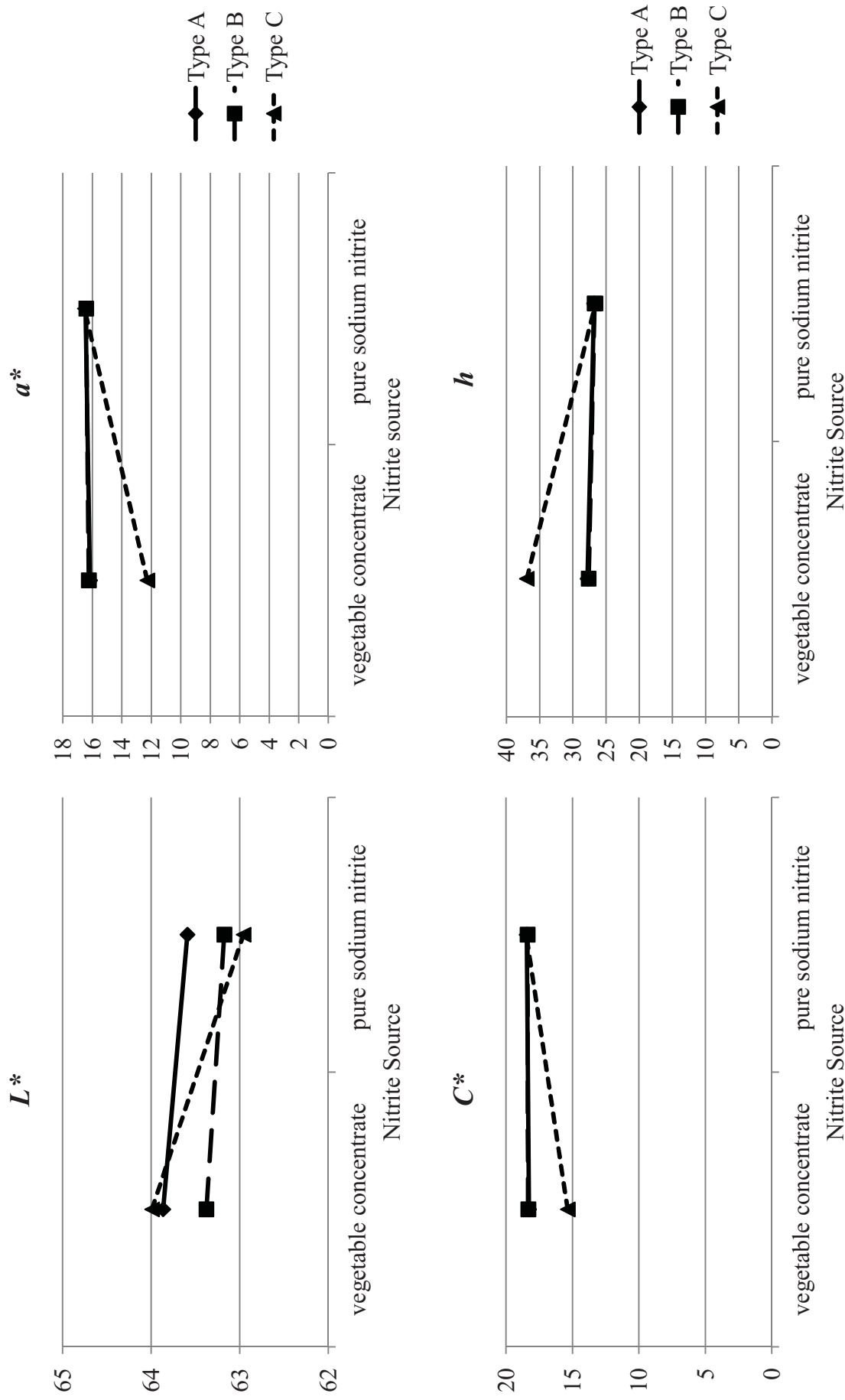
47 Type A: 12 h at 16 °C with a bioprotective starter culture, which includes *Lactobacillus sakei* and *Staphylococcus xylosum*, and a nitrate-reducing culture, which includes
 48 *Staphylococcus carnosus*.

49 Type B: 12 h at 4 °C with a nitrate-reducing culture, which includes *Staphylococcus carnosus*.

50 Type C: 12 h at 4 °C without starter cultures.

51

52 **Figure 3. Interaction between fermentation type and nitrite source for lightness (L^*), redness (a^*), chroma (C^*) and hue angle (h) in cooked sausages.**



53

54 Type A: 12 h at 16 °C with a bioprotective starter culture, which includes *Lactobacillus sakei* and *Staphylococcus xylosus*, and a nitrate-reducing activity culture, which includes
 55 *Staphylococcus carnosus*.
 56 Type B: 12 h at 4 °C with a nitrate-reducing culture, which includes *Staphylococcus carnosus*.
 57 Type C: 12 h at 4 °C without starter cultures.
 58

60 AOAC International (2000). Official Method 991.36. In *Official methods of analysis of*
61 *AOAC international* (17th ed.). Gaithersburg Md.: AOAC International.

62 Barbut, S. (2010). Color development during natural fermentation and chemical
63 acidification of salami-type products. *Journal of Muscle Foods*, 21(3), 499-508.

64 Bell, C., Neaves, P., & Williams, A. P. (2005). *Food microbiology and laboratory*
65 *practice*. Oxford: Blackwell Science.

66 Beuchat, L. R. (2007). Control of foodborne pathogens and spoilage microorganisms by
67 naturally occurring antimicrobials. In C. L. Wilson (Ed.), *Microbial food*
68 *contamination* (2nd ed., pp. 319). CRC Press.

69 BOE número 221. REAL DECRETO 1118/2007, de 24 de agosto, por el que se
70 modifica el real decreto 142/2002, de 1 de febrero, por el que se aprueba la lista
71 positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la
72 elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización.
73 (2007).

74 Botsoglou, N. A., Fletouris, D. J., Papageorgiou, G. E., Vassilopoulos, V. N., Mantis, A.
75 J., & Trakatellis, A. G. (1994). Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid
76 method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff
77 samples. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 42(9), 1931-1937.

78 Bou, R., Codony, R., Tres, A., Baucells, M. D., & Guardiola, F. (2005). Increase of
79 geometrical and positional fatty acid isomers in dark meat from broilers fed heated
80 oils. *Poultry Science*, 84(12), 1942-1954.

- 81 Bou, R., Codony, R., Tres, A., Decker, E. A., & Guardiola, F. (2008). Determination of
82 hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation–xylenol
83 orange method: A review of the factors that influence the method's performance.
84 *Analytical Biochemistry*, 377(1), 1-15.
- 85 Carballo, J., Cavestany, M., & Jimenez-Colmenero, F. (1991). Effect of light on color
86 and reaction of nitrite in sliced pork bologna under different chilled storage
87 temperatures. *Meat Science*, 30(3), 235-244.
- 88 Casaburi, A., Blaiotta, G., Mauriello, G., Pepe, I., & Villani, F. (2005). Technological
89 activities of staphylococcus carnosus and staphylococcus simulans strains isolated
90 from fermented sausages. *Meat Science*, 71(4), 643-650.
- 91 Cilla, I., Martinez, L., Beltran, J. A., & Roncales, P. (2006). Dry-cured ham quality and
92 acceptability as affected by the preservation system used for retail sale. *Meat*
93 *Science*, 73(4), 581-589.
- 94 Cochran, W. G., & Cox, G. M. (1957). *Experimental designs*. New York, NY.: John
95 Wiley & Sons.
- 96 Coppola, S., Mauriello, G., Aponte, M., Moschetti, G., & Villani, F. (2000). Microbial
97 succession during ripening of naples-type salami, a southern italian fermented
98 sausage. *Meat Science*, 56(4), 321-329.
- 99 Cordero, M., & Zumalacarregui, J. (2000). Characterization of micrococcaceae isolated
100 from salt used for spanish dry-cured ham. *Letters in Applied Microbiology*, 31(4),
101 303-306.

102 DeWinne, A., & Dirinck, P. (1997). Studies on vitamin E and meat quality .3. effect of
103 feeding high vitamin E levels to pigs on the sensory and keeping quality of cooked
104 ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(11), 4309-4317.

105 Dineen, N. M., Kerry, J. P., Lynch, P. B., Buckley, D. J., Morrissey, P. A., & Arendt, E.
106 K. (2000). Reduced nitrite levels and dietary α -tocopheryl acetate supplementation:
107 Effects on the colour and oxidative stability of cooked hams. *Meat Science*, 55(4),
108 475-482.

109 Encinas, J., Lopez-Diaz, T., Garcia-Lopez, M., Otero, A., & Moreno, B. (2000). Yeast
110 populations on spanish fermented sausages. *Meat Science*, 54(3), 203-208.

111 European Commission, 2006. Directive 2006/52/EC of the european parliament and of the
112 council of 5 july 2006 amending directive 95/2/EC on food additives other than
113 colours and sweeteners and directive 94/35/EC on sweeteners for use in foodstuffs,
114 10 (2006).

115 European commission, 2008. Commission regulation (EC) no 889/2008 of 5 september
116 2008 laying down detailed rules for the implementation of council regulation (EC)
117 no 834/2007 on organic production and labelling of organic products with regard to
118 organic production, labelling and control, 1 (2008).

119 Fennema, O. R., Parkin, K. L., & Damodaran, S. (2007). *Fennema's food chemistry* (4th
120 Ed. ed.). Boca Raton, Florida: CRC Press.

121 Fernandez-Gines, J. M., Fernandez-Lopez, J., Sayas-Barbera, E., Sendra, E., & Perez-
122 Alvarez, J. A. (2003). Effect of storage conditions on quality characteristics of
123 bologna sausages made with citrus fiber. *Journal of Food Science*, 68(2), 710-715.

- 124 Garcia-Varona, M., Santos, E. M., Jaime, I., & Rovira, J. (2000). Characterisation of
125 micrococcaceae isolated from different varieties of chorizo. *International Journal*
126 *of Food Microbiology*, 54(3), 189-195.
- 127 Gardini, F., Suzzi, G., Lombardi, A., Galgano, F., Crudele, M. A., Andrighetto, C.,
128 Schirone, M., & Tofalo, R. (2001). A survey of yeasts in traditional sausages of
129 southern italy. *Fems Yeast Research*, 1(2), 161-167.
- 130 Grau, A., Guardiola, F., Boatella, J., Barroeta, A., & Codony, R. (2000). Measurement
131 of 2-thiobarbituric acid values in dark chicken meat through derivative
132 spectrophotometry: Influence of various parameters. *Journal of Agricultural and*
133 *Food Chemistry*, 48(4), 1155-1159.
- 134 Hammes, W. P. (2012). Metabolism of nitrate in fermented meats: The characteristic
135 feature of a specific group of fermented foods. *Food Microbiology*, 29(2), 151-156.
- 136 Hustad, G. O., Cervený, J. G., Trenk, H., Deibel, R. H., Kautter, D. A., Fazio, T.,
137 Johnston, R.W., & Kolari, O. E. (1973). Effect of sodium nitrite and sodium-nitrate
138 on botulinal toxin production and nitrosamine formation in wieners. *Applied*
139 *Microbiology*, 26(1), 22-26.
- 140 International Organization for Standardization, 1997. Meat and meat products:
141 Determination of moisture content (reference method); ISO 1442:1997. Geneva,
142 Switzerland.
- 143 Janssens, M., Myter, N., De Vuyst, L., & Leroy, F. (2012). Species diversity and
144 metabolic impact of the microbiota are low in spontaneously acidified belgian

145 sausages with an added starter culture of *staphylococcus carnosus*. *Food*
146 *Microbiology*, 29(2), 167-177.

147 Jantawat, P., Runglerdkriangkrai, J., Thunpithayakul, C., & Sanguandeeikul, R. (1993).
148 Effects of initial nitrite level, heating and storage on residual nitrite and spoilage of
149 canned ham roll. *Journal of Food Quality*, 16(1), 1-11.

150 Jensen, C., Lauridsen, C., & Bertelsen, G. (1998). Dietary vitamin E: Quality and
151 storage stability of pork and poultry. *Trends in Food Science & Technology*, 9(2),
152 62-72.

153 Kloos, W. E., Schleifer, K. H., & Gütz, F. (1992). The genus *staphylococcus*. In A.
154 Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K. H. Schleifer (Eds.), *The*
155 *procaryotes: A handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, isolation,*
156 *identification, applications* (pp. 1369-1420). New York: Springer-Verlag.

157 Krause, B. L., Sebranek, J. G., Rust, R. E., & Mendonca, A. (2011). Incubation of
158 curing brines for the production of ready-to-eat, uncured, no-nitrite-or-nitrate-
159 added, ground, cooked and sliced ham. *Meat Science*, 89(4), 507-513.

160 Krystallis, A., & Chryssohoidis, G. (2005). Consumers' willingness to pay for organic
161 food - factors that affect it and variation per organic product type. *British Food*
162 *Journal*, 107(4-5), 320-343.

163 Li, H., Li, C. B., Xu, X. L., & Zhou, G. H. (2012). Effects of illumination and
164 packaging on non-heme iron and color attributes of sliced ham. *Meat Science*,
165 91(4), 521-526.

- 166 Liu, Q., Scheller, K. K., Schaefer, D. M., Arp, S. C., & Williams, S. N. (1994). Dietary
167 alpha-tocopheryl acetate contributes to lipid stability in cooked beef. *Journal of*
168 *Food Science*, 59(2), 288-290.
- 169 Magrinyà, N., Bou, R., Rius, N., Codony, R., & Guardiola, F. (2012). Effect of
170 fermentation time and vegetable concentrate addition on quality parameters of
171 organic botifarra catalana, a cured-cooked sausage. *Journal of Agricultural and*
172 *Food Chemistry*, 60(27), 6882-6890.
- 173 Magrinya, N., Bou, R., Tres, A., Rius, N., Codony, R., & Guardiola, F. (2009). Effect of
174 tocopherol extract, staphylococcus carnosus culture, and celery concentrate
175 addition on quality parameters of organic and conventional dry-cured sausages.
176 *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19), 8963-8972.
- 177 Makatouni, A. (2002). What motivates consumers to buy organic food in the UK?
178 results from a qualitative study. *British Food Journal*, 104(3/5), 345-352.
- 179 Mancini, R. A., & Hunt, M. C. (2005). Current research in meat color. *Meat Science*,
180 71(1), 100-121.
- 181 Marco, A., Navarro, J. L., & Flores, M. (2006). The influence of nitrite and nitrate on
182 microbial, chemical and sensory parameters of slow dry fermented sausage. *Meat*
183 *Science*, 73(4), 660-673.
- 184 Mauriello, G., Casaburi, A., Blaiotta, G., & Villani, F. (2004). Isolation and
185 technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented
186 sausages of southern italy. *Meat Science*, 67(1), 149-158.

- 187 Miralles, M. C., Flores, J., & Perez-Martinez, G. (1996). Biochemical tests for the
188 selection of staphylococcus strains as potential meat starter cultures. *Food*
189 *Microbiology*, 13(3), 227-236.
- 190 Nuchi, C., Guardiola, F., Bou, R., Bondioli, P., Della Bella, L., & Codony, R. (2009).
191 Assessment of the levels of degradation in fat co-and byproducts for feed uses and
192 their relationships with some lipid composition parameters. *Journal of Agricultural*
193 *and Food Chemistry*, 57(5), 1952-1959.
- 194 Palou, E., Alzamora, S. M., & Lopez-Malo Vigil, A. (2005). Naturally occurring
195 compounds - plant sources. In P. M. Davidson, J. N. Sofos & A. L. Branen (Eds.),
196 *Antimicrobials in food* (3rd ed., pp. 429-451). Boca Raton: CRC Press Taylor &
197 Francis Group.
- 198 Papamanoli, E., Kotzekidou, P., Tzanetakis, N., & Litopoulou-Tzanetaki, E. (2002).
199 Characterization of micrococcaceae isolated from dry fermented sausage. *Food*
200 *Microbiology*, 19(5), 441-449.
- 201 Parra, V., Viguera, J., Sanchez, J., Peinado, J., Esparrago, F., Gutierrez, J. I., & Andres,
202 A. I. (2010). Modified atmosphere packaging and vacuum packaging for long
203 period chilled storage of dry-cured iberian ham. *Meat Science*, 84(4), 760-768.
- 204 Pegg, R. B., & Shahidi, F. (2000). *Nitrite curing of meat :The N-nitrosamine problem*
205 *and nitrite alternatives*. Trumbull, Conn.: Food & Nutrition Press.
- 206 Romano, P., Capece, A., & Jespersen, L. (2006). Taxonomic and ecological diversity of
207 food and beverage yeasts. In A. Querol, & G. Fleet (Eds.), *Yeasts in food and*
208 *beverages* (pp. 13-53) Springer.

209 Santos, C., Ordonez, J. A., Cambero, I., D'Arrigo, M., & Hoz, L. (2004).
210 Physicochemical characteristics of an alpha-linolenic acid and alpha-tocopherol-
211 enriched cooked ham. *Food Chemistry*, 88(1), 123-128.

212 Sebranek, J. G., & Bacus, J. N. (2007). Cured meat products without direct addition of
213 nitrate or nitrite: What are the issues? *Meat Science*, 77(1), 136-147.

214 Sindelar, J. J., Cordray, J. C., Sebranek, J. G., Love, J. A., & Ahn, D. U. (2007a).
215 Effects of varying levels of vegetable juice powder and incubation time on color,
216 residual nitrate and nitrite, pigment, pH, and trained sensory attributes of ready-to-
217 eat uncured ham. *Journal of Food Science*, 72(6), S388-S395.

218 Sindelar, J. J., Cordray, J. C., Sebranek, J. G., Love, J. A., & Ahn, D. U. (2007b).
219 Effects of vegetable juice powder concentration and storage time on some chemical
220 and sensory quality attributes of uncured, emulsified cooked sausages. *Journal of*
221 *Food Science*, 72(5), S324-S332.

222 Sindelar, J. J., Terns, M. J., Meyn, E., & Boles, J. A. (2010). Development of a method
223 to manufacture uncured, no-nitrate/nitrite-added whole muscle jerky. *Meat Science*,
224 86(2), 298-303.

225 Sorensen, B., & Samuelsen, H. (1996). The combined effects of environmental
226 conditions on lipolysis of pork fat by lipases of the meat starter culture organisms
227 staphylococcus xylosus and debaryomyces hansenii. *International Journal of Food*
228 *Microbiology*, 32(1-2), 59-71.

- 229 Tarladgis, B. G., Watts, B. M., Younathan, M. T., & Dugan, L. (1960). A distillation
230 method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods.
231 *Journal of the American Oil Chemists Society*, 37(1), 44-48.
- 232 Terns, M. J., Milkowski, A. L., Rankin, S. A., & Sindelar, J. J. (2011a). Determining the
233 impact of varying levels of cherry powder and starter culture on quality and
234 sensory attributes of indirectly cured, emulsified cooked sausages. *Meat Science*,
235 88(2), 311-318.
- 236 Terns, M. J., Milkowski, A. L., Claus, J. R., & Sindelar, J. J. (2011b). Investigating the
237 effect of incubation time and starter culture addition level on quality attributes of
238 indirectly cured, emulsified cooked sausages. *Meat Science*, 88(3), 454-461.
- 239 Toldrá, F. (2002). *Dry-cured meat products*. Trumbull Conn.: Food & Nutrition Press.
- 240 Tres, A., Daniela Nuchi, C., Bou, R., Codony, R., & Guardiola, F. (2009). Assessing
241 rabbit and chicken tissue susceptibility to oxidation through the ferrous oxidation-
242 xylenol orange method. *European Journal of Lipid Science and Technology*,
243 111(6), 563-573.
- 244 Tsoukalas, D. S., Katsanidis, E., Marantidou, S., & Bloukas, J. G. (2011). Effect of
245 freeze-dried leek powder (FDLP) and nitrite level on processing and quality
246 characteristics of fermented sausages. *Meat Science*, 87(2), 140-145.
- 247 Vermeiren, L., Devlieghere, F., & Debevere, J. (2004). Evaluation of meat born lactic
248 acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products.
249 *International Journal of Food Microbiology*, 96(2), 149-164.

- 250 Vossen, E., Doolaage, E. H. A., Moges, H. D., De Meulenaer, B., Szczepaniak, S.,
251 Raes, K., & De Smet, S. (2012). Effect of sodium ascorbate dose on the shelf life
252 stability of reduced nitrite liver pates. *Meat Science*, 91(1), 29-35.
- 253 Wood, J. D., Enser, M., Fisher, A. V., Nute, G. R., Sheard, P. R., Richardson, R. I.,
254 Hughes, S.I., & Whittington, F. M. (2008). Fat deposition, fatty acid composition
255 and meat quality: A review. *Meat Science*, 78(4), 343-358.
- 256 Wrolstad, R. E. (2005). *Handbook of food analytical chemistry :Pigments, colorants,*
257 *flavors, texture, and bioactive food components*. Hoboken N.J.: Wiley-Interscience.
- 258

5.4. INFLUENCE OF FAT CONTENT ON THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SODIUM LACTATE, LAURIC ARGINATE AND METHYLPARABEN IN MINCED MEAT (Quart estudi)

Títol: Influència del contingut en greix sobre l'activitat antimicrobiana del lactat de sodi, l'éster d'etil de l'arginat làuric i el metilparabè en carn picada.

Revista: Per ser enviat a Journal of Food Protection

Resum: La indústria càrnia té molt d'interès en la seguretat de la carn i la dels seus derivats i per tant en reduir els nivells inicials de microorganismes presents en aquests així com retardant-ne el seu creixement. En aquest sentit, la utilització d'antimicrobians és una estratègia útil si bé la seva activitat i efectivitat depèn de varis factors com la mateixa composició de la carn. Per analitzar l'efecte del contingut gras sobre l'activitat antimicrobiana, es van estudiar tres antimicrobians amb diferent hidrosolubilitat que van ser afegits a una carn picada de porc amb diferents concentracions de greix (0, 15 i 50%). En l'estudi, tres concentracions diferents de lactat sòdic (2, 4 i 6%), sis concentracions d'éster d'etil de l'arginat làuric (0,05, 0,10, 0,15, 0,20 i 0,25%) i quatre de metilparabè (0,1, 0,5, 1,0 i 2,0%) van ser usades per avaluar l'activitat antimicrobiana sobre la microbiota natural de la carn (microorganismes aerobis mesòfils, bacteris coliformes i bacteris productors d'àcid làctic). Després de l'addició de l'antimicrobià a la carn picada, les mostres es van envasar en atmosfera modificada (70% O₂: 30% CO₂) i es van emmagatzemar durant 8 dies a 12 °C. El lactat sòdic utilitzat a una concentració del 2% va mostrar una alta eficiència en totes les masses càrnies elaborades contra el creixement de bacteris coliformes. La mateixa concentració de lactat sòdic també va ser capaç de reduir el creixement de bacteris aerobis mesòfils en un 50% tant en la carn picada que no contenia greix afegit com en la que contenia un 50% de greix. L'efectivitat de l'éster d'etil de l'arginat làuric es va incrementar en les masses càrnies que contenien un 50% de greix i amb concentracions superiors al 0,10%, per tots els grups de bacteris estudiats. La concentració més baixa de metilparabè va inhibir el creixement de bacteris coliformes en més d'un 50% en tots els tipus de masses càrnies. No obstant això, en les carns amb més contingut de greix afegit es va obtenir la menor inhibició. Quant als bacteris productors d'àcid làctic, es va observar un elevat creixement en la carn picada més magra. En general, aquests resultats indiquen que la hidrosolubilitat dels antimicrobians i la quantitat de greix dels productes carnis són

característiques a tenir en compte per controlar el creixement dels microorganismes de forma eficaç.

**Influence of Fat Content on the Antimicrobial Activity of Sodium
Lactate, Lauric Arginate and Methylparaben in Minced Meat**

NÚRIA MAGRINYÀ¹, NINO TERJUNG², MYRIAM LOEFFLER², RICARD BOU^{1,3}, AND
JOCHEN WEISS^{2*}

¹ Nutrition and Food Science Department- XaRTA-INSA, Faculty of Pharmacy,
University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

² Department of Food Physics and Meat Science, Institute of Food Science and
Biotechnology, University of Hohenheim, Garbenstrasse 21/25, 70599 Stuttgart,
Germany.

³ Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN) formerly Instituto del
Frío CSIC, C. Jose Antonio Novais, 10, 28040, Madrid, Spain

Submitted to *J. of Food Protection*

Running Title:

Impact of Fat content on the Antimicrobial Activity of Sodium Lactate, Lauric Arginate
and Methylparaben in Minced Meat

Corresponding author: Jochen Weiss. Tel.: (+49) 711 4592 4415; fax: (+49) 711 4592
4446; e-mail: J.weiss@uni-hohenheim.de

KEYWORDS: Fat content, minced meat, antimicrobial effect, natural meat microbiota

ABSTRACT

A minced meat model system containing three different fat levels of addition (0, 15 and 50%) was used to evaluate the effect of various antimicrobials with different solubility (sodium lactate, lauric arginate, and methylparaben). Various concentrations of sodium lactate (2, 4, and 6%), lauric arginate (0.05, 0.10, 0.15, 0.20, and 0.25%) and methylparaben (0.1, 0.5, 1 and 2%) were used to evaluate the antimicrobial activity on natural meat microbiota (total aerobic mesophilic colony counts, coliform bacteria and lactic acid bacteria). After the addition of the suitable antimicrobial, minced meat samples were packaged under a modified atmosphere (70% O₂ : 30% CO₂) and stored at 12°C for 8 days. Sodium lactate supplied at 2% was highly efficient against coliform bacteria in all minced meat systems. The same concentration of sodium lactate was able to reduce the total aerobic mesophilic colony counts and the lactic acid bacteria growth by 50% on lean minced meat and minced meat containing 50% fat. For all the studied bacteria groups, the effectiveness of lauric arginate increased when 50% of fat were added to the minced meat as well as with concentrations higher than 0.10%. The lowest concentration of methylparaben suppressed the growth of coliforms by more than 50% in all minced meat systems. However, the lowest inhibition was found at the highest fat level of addition. As for the lactic acid bacteria, the greatest growth was observed in lean minced meat. Overall, these results indicate that the water solubility of antimicrobial and the amount of fat of the meat products are properties which play a significant role in the antimicrobial activity.

Meat is a major part of the human diet as well as being the basis of a big industry in many developed countries. As a consequence, the safety of meat is of major concern to consumers, processors, retailers, food service industry, government agencies, educational institutions, public health professionals, researchers, and the general public locally, regionally, nationally, and internationally (12). The shelf-life of meat and meat products is the storage time until their spoilage and, according to regulations, this is defined by an unacceptable appearance or off-odour/off-flavour formation and mainly by a certain maximum acceptable level of initially present bacteria responsible of those undesired organoleptic changes (4).

Meat is rich in proteins, vitamins and minerals and low in carbohydrates what means that it is an ideal substrate for microbial growth. Although the spoilage of meat is largely dependent on initial microbiota, the numbers and types of microorganisms (pathogenic and/or spoilage) found on meats are determined by the environment under which the animals were raised and processed, and the meat packaged and stored. Over the years, efforts to preserve meats have focused on retarding microbial growth or killing selected microorganisms by applying chemical, physical, or biological treatments whose net outcome should slow or prevent the growth of spoilers. In either case, successful treatments extend product shelf life and allow its delivery from farm/processor to remote consumption areas (11).

According to the FDA, antimicrobial agents are substances used to preserve food by preventing growth of microorganisms and subsequent spoilage to prolong shelf life and preserve quality in foods. This organism approved and classified as GRAS (Generally Recognized as Safe) different preservatives such as sodium lactate (21 CFR 184.1768, E325), lauric arginate (GRN No. 164) and methylparaben (21 CFR 184.1490, E218). Despite that, the overall microbial spectrum, the mode of action, and the efficacy of the

compounds are largely dependent on the chemical and physical properties of the antimicrobial. Furthermore the chemical reactivity of the antimicrobial with other food components has a dramatic influence on the antimicrobial activity. Hence, the partitioning of food preservatives in a food system, in particular with the lipid fraction, is one of the most important properties in the use of preservatives. As all microorganisms survive only in a water environment, the concentration of a preservative in the water phase is directly related to the microorganism control in the food system and the amount of a preservative dissolved in the lipid phase could be treated as a “loss” for the preservative (8).

Sodium lactate, the sodium salt of lactic acid, is a water soluble food additive that has been used successfully to inhibit several microorganisms such as *Salmonella* species, *Pseudomonas* spp or lactic acid bacteria (10). While the antimicrobial activity of lactic acid is primarily ascribed to the pH lowering effect and to the undissociated form of the acid (13, 14), sodium lactate has a marked effect on water activity which can result in shelf life prolongation (6). The antimicrobial effect of lactates has been also attributed to cellular response of anion accumulation (9).

Lauric arginate (N^{α} -lauroyl-L-arginine ethyl ester monohydrichloride), commonly abbreviated as LAE, is derived from lauric acid and L-arginine HCl. It is an amphiphilic molecule because it contains one amino acid residue as the hydrophilic part and one long chain as the hydrophobic part. Therefore, lauric arginate can be used as a cationic surfactant (18) and at the same time it has been tested as a preservative against several microorganisms such as *Listeria monocytogenes* (19) or *Salmonella* (33) in meat matrices. Lauric arginate acts at different levels, cell membranes and/or cytoplasm, but it do not cause the cell lysis (27).

Methylparaben is an antimicrobial agent widely used in foods, cosmetics and pharmaceutical products. It is an ester of *p*-hydroxybenzoic acid, produced by the methanol esterification of *p*-hydroxybenzoic acid in the presence of sulfuric acid. Although it is slightly soluble in water, this solubility can be sufficient to produce the effective antimicrobial concentration in aqueous phase (29). An exact cause-and-effect relation for the mode of action of parabens has not been established; however, various studies have shown that these compounds may be most active at the cytoplasmic membrane (7). Antimicrobial studies showed that methylparaben is effective in low concentrations, between 0.05 to 2%, against microorganisms, especially fungi (1).

Comminuted meat is more perishable than intact meat because of the greater availability of water and because surface microbes are distributed throughout the mass during mincing. For these reasons and based on the above cited literature we hypothesize that the effectiveness of antimicrobials with different water solubility depends on the amount of fat in the meat product. The objective of this study was to test this hypothesis by assessing the activity of sodium lactate, lauric arginate and methylparaben in minced meat containing different percentages of fat on natural meat microbiota.

MATERIALS AND METHODS

Antimicrobial agents

Sodium DL-lactate solution (50% in water) was obtained from Sigma-Aldrich Co. (Steinheim, Germany). Lauric arginate was supplied by Vedeqsa (Terrassa, Spain). Methylparaben was purchased from Meat Cracks Technologie GmbH (Mühlen, Germany). Stock solutions of antimicrobials were prepared in sterile distilled water.

Experimental design

Sodium lactate, lauric arginate and methylparaben were added at different levels into pork minced meat with three different percentages of fat (0% fat, 15% fat and 50% fat) to test their antimicrobial effects on natural meat microbiota. Three concentrations of sodium lactate (2%, 4% and 6%), five different concentrations of the lauric arginate (0.05, 0.1, 0.15, 0.2, and 0.25%) and four concentrations of methylparaben (0.1, 0.5, 1, and 2%) were studied thus resulting in nine, fifteen and twelve treatments, respectively. Minced meat was stored at 12°C under modified atmosphere (70% O₂ : 30% CO₂) for eight consecutive days. Microbiological analysis (total aerobic mesophilic colony counts, coliform bacteria, and acid lactic bacteria) were carried out daily.

Minced meat preparation and sampling

Fresh lean pork meat and pork fat were purchased in a local market in Stuttgart . Meat and fat were minced separately using a meat grinder (W114T82 487-1 Seydelmann KG, Aalen, Germany) at room temperature to a particle size of 3 mm. After mincing, meat and fat were mixed together in the suitable proportion according to the experimental design, to obtain different treatments.

All of meat batters were subdivided into equal portions of 240 g to add the suitable concentration of each antimicrobial agent on them. Regarding sodium lactate, the purchased solution was added directly to the meat thus obtaining nine treatments containing 2%, 4% and 6% of sodium lactate. A 5% (w/w) water solution of lauric arginate was added to the meat batters to obtain fifteen different treatments at 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 and 0.25% of lauric arginate. The suitable amount of methylparaben powder was dispersed in 12 mL of sterile distilled water and added directly to the minced meat to obtain twelve treatments containing 0.1, 0.5, 1.0 and 2.0% of methylparaben. The

different volumes of antimicrobial solution were compensated with sterile distilled water in each case. A control for each treatment was done using the same volume of sterile distilled water instead of the antimicrobial solution. After the addition of each antimicrobial agent, the meat batter treatments were manually mixed for two minutes.

When the meat batter treatments were mixed, 20 meat balls of 10 g each were done. Meat balls samples were packaged in commercially available bags (PA/PE, 90 my, 135 x 180 mm; MEGA eG, Stuttgart, Germany). Modified atmosphere (70% O₂ : 30% CO₂) was used to package the samples using a Vacuum Sealer (BOSS RC 63, Bad Homburg, Germany). The samples were stored for eight days inside a room chamber at 12°C and two samples for each treatment were randomly selected for analysis every day. The initial bacterial level was checked analyzing the control in quadruplicate after the preparation of meat balls.

Microbiological analysis

For microbiological analysis 10 g of minced meat sample were added to 90 mL of sterile buffered peptone water (Carl-Roth, Karlsruhe, Germany) in a filter stomacher bag (190mm x 300mm; BBAG-03, Carl-Roth, Karlsruhe, Germany) and homogenized in a stomacher 400C Lab Blender (Seward, Worthing West Sussex, UK) for 30 s at 100 rpm at room temperature. Serial decimal dilutions were prepared in the same medium. Three different kinds of bacterial counts were analyzed: total aerobic mesophilic colony counts, coliform bacteria, and acid lactic bacteria.

Total aerobic mesophilic colony counts is the method used to assess the shelf-life of food products because provides a general information on the numbers of organisms present in a product that grow under the conditions of the test (3). Total aerobic mesophilic colony were determined on standard I nutrient agar (Merck, Darmstadt,

Germany). Sample aliquots (0.1 mL) of appropriate dilution were spirally plated in duplicate onto the agar using a spiral plater (Don Whitley Scientific Limited, West Yorkshire, United Kingdom). Plates were incubated at 30°C for 24-48 h.

Coliforms are members of the Enterobacteriaceae. These bacteria are commonly used as indicators in food tests because their presence indicates that disease-causing organisms (pathogens) could also be in the food (3). Violet red bile lactose agar (Carl-Roth, Karlsruhe, Germany) was used for Coliforms in order to have a selective count at 37°C for 24h. Sample aliquots (0.2 mL) of appropriate dilution were spirally plated in duplicate onto the agar using a spiral plater (Don Whitley Scientific Limited, West Yorkshire, United Kingdom).

Lactic acid bacteria are widely used as starter cultures for fermented meats. However, they are also very common spoilage organisms, especially in modified atmosphere packaged meats. Lactic acid bacteria were determined on MRS agar (Merck, Darmstadt, Germany) and incubated at 35°C for 72h in an anaerobic jar (Merck, Darmstadt, Germany). Sample aliquots (1 mL) of appropriate dilution were poured in duplicate on the selective agar plate.

Incubation conditions for each medium were adjusted according to the instructions provided by the manufacturers. Colonies on the plates were counted using a colony counter (Synbiosis Frederick, USA).

Calculation of net growth behavior

To determine the net growth behavior (32), the number of colony forming units (CFU) from each microorganism group (total aerobic mesophilic colony counts, coliform bacteria, and acid lactic bacteria) were obtained over time. The area under the curve of the net growth behavior ($\log_{10} \text{CFU g}^{-1} \text{d}$) was defined as the integral of the $\log_{10} \text{CFU}$

overtime relative to the initial microorganism level (analyzed on the meat control, after purchasing). To standardize the results and compare the treatments, a relationship between the area under the curve of the meat without antimicrobial (control) and treatments was done (Equation 1). In this way, three regimes could be identified: (I) if the relationship of the area under the curve is above 0, it means a net growth behavior; (II) if the relationship of the area under the curve is 0, it means a net static behavior, and (III) if the relationship of the area under the curve is below 0, it means a net kill behavior.

Equation 1: $AUCR = \frac{AUC_{treatment}}{AUC_{control}}$, where AUCR is the relationship of the area under the curve; AUC treatment is the area under the curve for each minced meat subjected to the presence of an antimicrobial agent, and AUC control is the area under the curve for the meat without antimicrobial agent.

Statistical analysis

A multifactor ANOVA determined significant differences produced by the different factors on the relationship of the area under the curves for total aerobic mesophilic colony counts, coliform bacteria, and acid lactic bacteria. The studied factors were the concentration of antimicrobial (sodium lactate: 2, 4, and 6%; lauric arginate: 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, and 0.25%; methylparaben: 0.1, 0.5, 1 and 2%) and the concentration of fat in minced meat (0, 15, and 50%). When significant interactions were found between these two factors, series of one-way ANOVAs were performed. Significance levels were determined at $p < 0.05$. When significant differences were found through the multifactor or one-way ANOVAs, the least-squares means were separated using Scheffé's test ($\alpha = 0.05$).

RESULTS

System with Sodium Lactate

The relationship between the area under the curves of the meat without antimicrobial compound (control) and the meat containing sodium lactate for total aerobic mesophilic colony counts (**Table 1**) showed an interaction between the concentration of sodium lactate and the amount of fat added into minced meat (**Table 2**). **Table 2** shows that the addition of 15% fat caused a lower efficiency of the antimicrobial when 2 and 4% sodium lactate were added to the meat. However, the addition of sodium lactate at the highest concentration controlled microbial growth efficiently regardless of the level of fat. By fixing each concentration of sodium lactate, series of one-way ANOVA were determined to confirm this trend (**data not shown**). In general, the higher concentration of sodium lactate was added, the higher reduction of total aerobic mesophilic bacteria was found. However, the abovementioned interaction explained that the presence of 15% fat in minced meat resulted in a lower antimicrobial activity of sodium lactate (**Table 1**).

In relation to coliform bacteria, the addition of sodium lactate was highly efficient in controlling the bacterial growth even when the lowest concentration of the antimicrobial was used (**Table 1**). Moreover, the addition of 4% or 6% of sodium lactate caused a net static behavior. On the other hand, the amount of fat added into minced meat showed no effect on coliform antimicrobial activity of sodium lactate (**Table 1**).

Similarly to aerobic mesophilic bacteria, an interaction was found (**Table 2**) between the concentration of sodium lactate and the amount of fat for the relationship between the area under the curves of the meat without antimicrobial agent (control) and the meat containing sodium lactate for lactic acid bacteria (**Table 1**). **Table 2** shows that the addition of 2 or 4% of sodium lactate in minced meat containing 15% fat caused a lower

efficiency in controlling lactic acid bacteria growth. However, when the antimicrobial is added at 6% in the presence of 15% fat, sodium lactate caused a net kill behavior. By disregarding the interaction, the global results found in **Table 1** indicate that the highest antimicrobial activity was found in lean minced meat. Moreover, the higher concentration of sodium lactate the more efficient control of lactic acid bacteria growth.

System with Lauric Arginate (LAE)

The efficiency of lauric arginate on the growth of mesophilic microorganisms under the conditions of this study was determined. An interaction was found (**Table 3**) between the amount of fat added in meat batter and the concentration of lauric arginate for the relationship between the area under the curves of the meat without antimicrobial agent (control) and the meat containing lauric arginate for total aerobic mesophilic colony counts (**Table 1**). **Table 3** shows that the amount of fat added had no effect on the total aerobic mesophilic bacteria up to 0.10% lauric arginate. However, higher concentrations of the antimicrobial caused higher growth reductions when adding 50% fat into minced meat. This fact was confirmed by doing series of one-way ANOVA in which each concentration of the antimicrobial was fixed (**data not shown**). As a consequence, the growth of mesophilic bacteria was better controlled when 50% fat was present in minced meat (**Table 1**). On the other hand, the concentration of lauric arginate at 0.05% showed no growth reduction for mesophilic bacteria whereas higher concentrations of the antimicrobial reduced growth in a dose dependent manner (**Table 1**).

In respect to coliform bacteria, the amount of fat added in meat batter and the concentration of lauric arginate used affected the microbial growth measured by means of the relationship between the area under the curves of the meat without antimicrobial agent (control) and the meat containing lauric arginate (**Table 1**). Moreover, it was

found an interaction between of these two factors (**Table 3**). **Table 3** shows that, similarly to total aerobic mesophilic bacteria, the addition of lauric arginate at 0.15% or higher concentrations was much more efficient in controlling microbial growth when minced meat contained 50% fat. Lower concentrations of the antimicrobial were less affected by the amount of fat. By fixing the concentrations of lauric arginate, series of one-way ANOVA confirmed this behavior (**data not shown**). This explained the reduced coliform growth when 50% fat was added into minced meat (**Table 1**). In addition, coliform growth was reduced with increased concentration of lauric arginate. Despite that, the reduction was about 40% when the highest concentration of this antimicrobial was used.

As regards the antimicrobial activity of lauric arginate against lactic acid bacteria, it was found an interaction between the amount of fat and the concentration of the antimicrobial (**Table 3**). This interaction can be explained by the fact that concentrations of lauric arginate at 0.20 and 0.25% caused a net static behavior regardless of the amount of added fat (**Table 3**). However, lower concentrations of the antimicrobial were affected by the amount of fat. By fixing each concentration of the antimicrobial, it was found that low concentrations of the antimicrobial (0.05 and 0.10%) were more efficient in minced meat containing 15% fat (**data not shown**). This fact explained the higher reduction of lactic acid bacteria when 15% fat was added (**Table 1**). Lauric arginate was found to be very efficient in controlling lactic acid bacteria growth at concentrations higher than 0.05%.

System with Methylparaben

The relationship between the area under the curves of the meat without antimicrobial agent (control) and the meat subjected to the presence of methylparaben (**Table 1**)

showed an interaction between the amount of fat added in meat batter and the concentration of methylparaben (**Table 4**). **Table 4** shows that the efficiency of methylparaben was higher when minced meat contained 50% fat, with the exception of the concentration of methylparaben at 0.5% which showed a similar antimicrobial activity regardless of the amount of fat. Series of one-way ANOVA confirmed that this concentration of antimicrobial showed similar activity in all minced meats whereas at the other studied concentrations this activity was more intense when meat contained 50% fat (**data not shown**). As for this, meat with the highest amount of fat recorded an overall decrease of the least squares means for the relationship between the area under the curves of the meat without antimicrobial agent (control) and the meat subjected to the presence of methylparaben in comparison to all other minced meats (**Table 1**). In addition, it explained there were no differences between the concentrations of 0.1 and 0.5% of methylparaben. Higher amounts of the antimicrobial caused increased growth reductions in total aerobic mesophilic microorganisms.

Methylparaben was highly effective against coliform bacteria (**Table 1**). An interaction was found between the amount of fat added in meat batter and the concentration of methylparaben (**Table 4**). **Table 4** shows that 0.1% methylparaben was sufficient to produce net static behavior for coliform bacteria in lean minced meat and in minced meat containing 15% of fat. However, this concentration only reduced 60% of the growth for this bacteria group when minced meat contained 50% of fat. Net static behavior was observed for all meat systems when concentrations above 0.1% of methylparaben were used. This fact explained that the addition of methylparaben at 0.1% recorded a higher least squares means for the relationship between the area under the curves of the meat without antimicrobial agent (control) and the meat containing methylparaben in comparison to other concentrations of the antimicrobial as well as the

higher relationship between the area under the curves of the meat without antimicrobial agent (control) and the meat containing methylparaben recorded when comparing minced meats containing 50% added fat with either lean or 15% added fat minced meats (**Table 1**).

Regarding lactic acid bacteria, an interaction was found for the studied factors (**Table 1**). The addition of methylparaben was not very efficient in controlling lactic acid bacteria. However, this antimicrobial seemed to be unaffected by the amount of fat present in minced meat when this is added at concentrations below 2.0% (**Table 4**). At higher concentrations of this antimicrobial, the efficiency is higher with increased amounts of fat. Series of one-way ANOVA confirmed this behavior (**data not shown**). This fact caused the decrease of the least squares means of the relationship between the area under the curves of the meat without antimicrobial agent (control) and the meat containing methylparaben with increased amounts of fat (**Table 1**). The addition of methylparaben at 0.1% showed almost no antimicrobial effect but at higher concentrations caused reductions in lactic acid bacteria in a dose dependent manner.

DISCUSSION

Different microbial growth behaviors were observed when antimicrobials were added to minced meats. Regarding sodium lactate, several studies carried out in meat products described the efficiency of this antimicrobial on mesophilic species, such as *Listeria monocytogenes* (2, 21, 22). Therefore, the inhibition of mesophilic microorganisms during the storage period (8 days at 12°C in modified atmosphere packaging) was expected. Nevertheless, the lowest sodium lactate concentration (2%) was able to control the growth of coliform bacteria (**Table 1**). These results are in agreement with other authors who reported a limited proliferation of *E. coli* when 3% sodium lactate

was added to ground beef (17), cooked beef (24), and liver sausages (24, 28). Sodium lactate showed also antibacterial activity against lactic acid bacteria, decreasing the growth by 50% when the concentration of 2% was used. Similarly, Cegielska-Radziejewska and Pikul (5) observed that 2% sodium lactate added to poultry sausages inhibited the development of lactic acid bacteria.

Sodium lactate seemed to be more efficient when either no fat or 50% fat was added to minced meat. A similar behavior was observed by Hu and Shelef in beaker sausages (16). These authors detected that the inhibitory activity of sodium lactate, at a concentration of 1.8%, was higher when the fat content increased. This could be caused by the increase of water soluble salts in the water phase of the food. The same authors also observed a lower growth of *L. monocytogenes* when high amounts of fat (67%) were added to sausages which were stored at 10°C for 14 days without the addition of antimicrobials. Therefore, fat content could have a significant effect on the antimicrobial activity in minced meat but also include another hurdle for microbial growth due to the reduction of available water. Alternatively, the medium fat content may counteract the antimicrobial activity of sodium lactate provided that the highest growth in mesophilic microorganisms and lactic acid bacteria was observed when 15% fat was added. Fat content in meat may exert a physical protection of the bacterial cell or produce some interaction between the fat in the meat and bacterial cell wall lipids and, as a result, it allows that microorganisms can grow (23).

Lauric arginate showed an antimicrobial activity against mesophilic microorganisms, coliform bacteria and acid lactic bacteria. Similarly to sodium lactate, the use of higher concentrations of lauric arginate in minced meat led to higher microbial growth reductions (**Table 1**). Contrary to our results, some authors (19, 20, 26, 30, 31) found that the efficacy of lauric arginate did not appear to be significantly affected by the

concentration of the antimicrobial. These authors studied the activity of lauric arginate through surface treatment on meat products, such as frankfurters or ham, against *Listeria monocytogenes* (19, 20, 26, 30, 31). From the best of our knowledge, there are no relevant studies reporting the antimicrobial activity of lauric arginate when this is added in the formula of a meat product. The manner to add the antimicrobial, applied on the product surface, and the lower concentrations of lauric arginate used could explain these controversial results for this antimicrobial. Moreover, these studies were carried out in meat products which their formula contains nitrite, a well-established antimicrobial agent (25), and, therefore, this may influence in the activity of lauric arginate.

It is important to note that the same authors reported that this surface treatment with lauric arginate of meat products caused an initial lethality of *L. monocytogenes*, but it did not suppress the microbial growth during extended storage (19, 20, 26, 30, 31). Despite applying lauric arginate in the product and not only on the surface, we observed a similar behavior for the antimicrobial activity (**Figure 1**). It can be observed that the highest concentration of lauric arginate used (0.25%) reduced the initial level of the total aerobic microbial count during the first day of storage (12°C, modified atmosphere packaging). Thereafter, total aerobic microbial counts increased within 8 days. This initial reduction of microbial growth was clearly observed when 15% of fat was added or when lean minced meat was used (**Figure 1**). Lactic acid bacteria seemed to be more susceptible to lauric arginate than the others species studied because the higher concentration of lauric arginate used was able to inhibit the proliferation of lactic acid bacteria in all minced meat systems during the storage time (**Figure 2**). Lower concentrations of the antimicrobial also recorded initial growth reductions of lactic acid bacteria.

The amount of fat added to the minced meat also influenced the antimicrobial behavior of lauric arginate. Microbial growth reductions above 50% were only reached for mesophilic microorganisms and coliform bacteria when the high amount of fat (50%) was added to the minced meat (**Table 1**). Lauric arginate is an amphiphilic compound and the inclusion of fat in minced meat could produce the partitioning of this antimicrobial between the water and the fat phase. For this reason, higher amounts of fat (50%) in minced meat may cause a displacement of the antimicrobial to the fat phase, letting the microorganisms grow in the water phase. This reasoning may also explain that the lowest concentration of lauric arginate (0.05%) was not enough to be in both phases explaining the lack of effect for any of the microbial groups studied (**Table 1**). However, higher concentrations of lauric arginate may allow the antimicrobial to be in sufficient amount to exert its activity in the water phase. Additionally, the inclusion of fat could reduce the available water for microbial growth. This combined effect may help to keep the initial microorganism level or decrease it, as explained above.

Methylparaben was able to inhibit the proliferation of total aerobic microorganisms and it was highly efficient against coliform bacteria (**Table 1**). However, the concentrations of methylparaben used (0.1%, 0.5%, 1% and 2%) were not enough to reduce the growth of lactic acid bacteria above 50% in any minced meat system (**Table 1**). Concerning the antimicrobial activity of methylparaben, gram-positive bacteria are generally more susceptible to non-polar phenolic compounds than gram-negative bacteria because the latter have the ability to screen that antimicrobial due to the outer membrane lipopolysaccharide layer (7). Conversely, the lowest concentration of methylparaben used was able to produce net static behavior for coliform bacteria (except when 50% of fat was added to minced meat), but the same concentration was not able to suppress the lactic acid bacteria growth in any minced meat system (**Table 4**).

The fat added to minced meat also influenced the antimicrobial activity of methylparaben, higher microbial growth reductions were reached in minced meat containing high amounts of fat. Parabens are described as lipophilic compounds due to the chemical structure, and their water solubility is inversely related to alkyl chain length (7). Methylparaben, the paraben used in this study, is the one with the shortest alkyl chain and its partition coefficient is 1.96 (15). This low hydrophobicity could allow the distribution of the methylparaben into the water and the fat phase. For that reason, the overall positive effect of high amounts of fat in controlling microbial growth by itself, as commented likely due to the reduction of water activity, combined with sufficient amounts of the antimicrobial in the water phase, which depends on the concentration added, explained the higher growth reductions in the meat system containing 50% fat.

Overall, this study presents data supporting that the polarity of an antimicrobial is probably the most important physical property. As for that, the amount of fat in the product interacts with the antimicrobial and, in consequence, affects antimicrobial activity. In general, minced meat containing 50% of fat showed the lowest microbial growth for the three antimicrobials studied, regardless of their water solubility. However, lower concentrations of non-polar antimicrobials, (lauric arginate and methylparaben) did not suppress the growth of microorganisms in high fat meat systems but, at the same time, these antimicrobials showed the greatest antimicrobial activity when higher concentrations were used in high fat meat systems. Therefore, water solubility of antimicrobial and the amount of fat of the meat products are properties which should be taken into account for the selection of the proper antimicrobial. Finally, combinations of these antimicrobials depending on the amount of fat added to

the meat products should be tested to provide better shelf stability and safety of minced meat products.

ACKNOWLEDGMENTS

N. Magrinyà obtained financial support from a FPU research grant from the Spanish Ministry of Science and Innovation. This project was financed by a grant awarded by the German Industrial-Academic Research Alliance (AiF) and the German Food & Nutrition Research Council (“Forschungskreis der Ernährungsindustrie–FEI”) under the Grant Award Number 16969N. We thank Kurt Herrmann for his technical advice during preparation of the minced meat samples.

References

1. Aalto, T. R., M. C. Firman, and N. E. Rigler. 1953. p-Hydroxybenzoic Acid Esters as Preservatives. I. Uses, Antibacterial and Antifungal Studies, Properties and Determination. *J Am Pharm Assoc* 42:449-457.
2. Barmpalia, I., I. Geornaras, K. Belk, J. Scanga, P. Kendall, G. Smith, and J. Sofos. 2004. Control of *Listeria monocytogenes* on frankfurters with antimicrobials in the formulation and by dipping in organic acid solutions. *J. Food Prot.* 67:2456-2464.
3. Bell, C., P. Neaves, and A. P. Williams. 2005. Food microbiology and laboratory practice. Blackwell Science, Oxford.
4. Borch, E., M. L. Kant-Muermans, and Y. Blixt. 1996. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 33:.
5. Cegielska-Radziejewska, R., J. Pikul. 2004. Sodium lactate addition on the quality and shelf life of refrigerated sliced poultry sausage packaged in air or nitrogen atmosphere. *J. Food Prot.* 67:601-606.
6. Chirife, J., C. Ferrofontan. 1980. Prediction of Water Activity of Aqueous-Solutions in Connection with Intermediate Moisture Foods - Experimental Investigation of the Aw Lowering Behavior of Sodium Lactate and some Related-Compounds. *J. Food Sci.* 45:802-804.
7. Davidson, P. M. 2005. Chapter 9 Parabens, p. 291-303. *In:* P. M. Davidson, J. N. Sofos and A. L. Branen (eds), Antimicrobials in Food, Third Edition. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton.
8. Davidson, P. M., A. L. Branen. 2005. Chapter 1. Food Antimicrobials - An Introduction, p. 1-10. *In:* P. M. Davidson, J. N. Sofos and A. L. Branen (eds), Antimicrobials in Food, Third Edition. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton.
9. de Wit, J. C., F. M. Rombouts. 1990. Antimicrobial Activity of Sodium Lactate. *Food Microbiol.* 7:113-120.
10. Doores, S. 2005. Chapter 4. Organic Acids, p. 91-142. *In:* P. M. Davidson, J. N. Sofos and A. L. Branen (eds), Antimicrobials in Food, Third Edition. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton.
11. Farid, M., A. Bal'a, and D. L. Marshall. 2001. Chapter 7 Microbiology of meats, p. 149-169. *In:* O. A. Young, et al (eds), Meat Science and Applications. CRC Press Marcel Dekker, Inc., New York.
12. Fung, D. Y., J. J. Kastner, C. L. Kastner, M. A. Vanier, M. N. Hajmeer, R. K. Phebus, J. S. Smith, K. P. Penner, and J. L. Marsden. 2001. Meat Safety (chapter

- 8), p. 171-205. *In*: O. A. Young, et al (eds), Meat Science and Applications. CRC Press Marcel Dekker Inc., New York.
13. Gill, C. O., K. G. Newton. 1982. Effect of Lactic-Acid Concentration on Growth on Meat of Gram-Negative Psychrotrophs from a Meatworks. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:284-288.
 14. Grau, F. H. 1981. Role of Ph Lactate and Anaerobiosis in Controlling the Growth of some Fermentative Gram Negative Bacteria on Beef. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:1043-1050.
 15. Hansch, C., A. Leo, and D. Hoekman. 1995. Exploring QSAR - Hydrophobic, electronic and steric constants. American Chemical Society, Washington, DC.
 16. Hu, A., L. Shelef. 1996. Influence of fat content and preservatives on the behavior of *Listeria monocytogenes* in beaker sausage. *J. Food Saf.* 16:175-181.
 17. Hwang, C., V. Juneja. 2011. Effects of Salt, Sodium Pyrophosphate, and Sodium Lactate on the Probability of Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in Ground Beef. *J. Food Prot.* 74:622-626.
 18. Infante, M., A. Pinazo, and J. Seguer. 1997. Non-conventional surfactants from amino acids and glycolipids: Structure, preparation and properties. *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.* 123:49-70.
 19. Luchansky, J., J. Call, B. Hristova, L. Rumery, L. Yoder, and A. Oser. 2005. Viability of *Listeria monocytogenes* on commercially-prepared hams surface treated with acidic calcium sulfate and lauric arginate and stored at 4 degrees C. *Meat Sci.* 71:92-99.
 20. Martin, E. M., C. L. Griffis, K. L. S. Vaughn, C. A. O'Bryan, E. C. Friedly, J. A. Marcy, S. C. Ricke, P. G. Crandall, and R. Y. Lary Jr. 2009. Control of *Listeria Monocytogenes* by Lauric Arginate on Frankfurters Formulated with or without Lactate/Diacetate. *J. Food Sci.* 74:M237-M241.
 21. Mbandi, E., L. Shelef. 2002. Enhanced antimicrobial effects of combination of lactate and diacetate on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in beef bologna. *Int. J. Food Microbiol.* 76:191-198.
 22. Mbandi, E., L. Shelef. 2001. Enhanced inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* in meat by combinations of sodium lactate and diacetate. *J. Food Prot.* 64:640-644.
 23. Mehta, A., S. R. Tatini. 1994. An Evaluation of the Microbiological Safety of Reduced-Fat Cheddar-Like Cheese. *J. Food Prot.* 57:.
 24. Miller, R. K., G. R. Acuff. 1994. Sodium Lactate Affects Pathogens in Cooked Beef. *J. Food Sci.* 59:15-19.

25. Pegg, R. B., F. Shahidi. 2000. Nitrite curing of meat :the N-nitrosamine problem and nitrite alternatives. Food & Nutrition Press, Trumbull, Conn.
26. Porto-Fett, A. C. S., S. G. Campano, J. L. Smith, A. Oser, B. Shoyer, J. E. Call, and J. B. Luchansky. 2010. Control of *Listeria monocytogenes* on commercially-produced frankfurters prepared with and without potassium lactate and sodium diacetate and surface treated with lauric arginate using the Sprayed Lethality in Container (SLIC (R)) delivery method. *Meat Sci.* 85:312-318.
27. Rodriguez, E., J. Seguer, X. Rocabayera, and A. Manresa. 2004. Cellular effects of monohydrochloride of L-arginine, N-alpha-lauroyl ethylester (LAE) on exposure to *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.* 96:903-912.
28. Shelef, L. A., V. Potluri. 1995. Behavior of Foodborne Pathogens in Cooked Liver Sausage Containing Lactates. *Food Microbiol.* 12:221-227.
29. Soni, M., S. Taylor, N. Greenberg, and G. Burdock. 2002. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. *Food Chem. Toxicol.* 40:1335-1373.
30. Stopforth, J. D., D. Visser, R. Zumbrink, L. van Dijk, and E. W. Bontenbal. 2010. Control of *Listeria monocytogenes* on Cooked Cured Ham by Formulation with a Lactate-Diacetate Blend and Surface Treatment with Lauric Arginate. *J. Food Prot.* 73:552-555.
31. Taormina, P. J., W. J. Dorsa. 2009. Short-Term Bactericidal Efficacy of Lauric Arginate against *Listeria monocytogenes* Present on the Surface of Frankfurters. *J. Food Prot.* 72:1216-1224.
32. Terjung, N., M. Loeffler, M. Gibis, J. Hinrichs, and J. Weiss. 2012. Influence of droplet size on the efficacy of oil-in-water emulsions loaded with phenolic antimicrobials. *Food Funct.* 3:290-301.
33. Theinsathid, P., W. Visessanguan, J. Kruenate, Y. Kingcha, and S. Keeratipibul. 2012. Antimicrobial Activity of Lauric Arginate-Coated Polylactic Acid Films against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* on Cooked Sliced Ham. *J. Food Sci.* 77:M142-M149.

Table 1. Least squares means^a for the main effects of amount of fat (0%, 15% and 50%) and the concentration of the antimicrobial (Sodium Lactate; Lauric Arginate; and, Methylparaben) for the relationship between the area under the curve (AUCR)^b of the meat control and treatments for total aerobic mesophilic colony counts (TAMCC), coliform bacteria, and lactic acid bacteria (LAB) in minced meat.

	Sodium Lactate			Lauric Arginate			Methylparaben		
	TAMCC	Coliform Bacteria	LAB	TAMCC	Coliform bacteria	LAB	TAMCC	Coliform bacteria	LAB
Fat^c				Fat^c			Fat^c		
0%	0.35 ^y	0.26 ^z	0.25 ^x	0.78 ^z	0.72 ^z	0.54 ^z	0.73 ^z	0.22 ^y	0.87 ^z
15%	0.45 ^z	0.30 ^z	0.42 ^z	0.77 ^z	0.77 ^z	0.38 ^y	0.73 ^z	0.20 ^y	0.82 ^y
50%	0.35 ^y	0.30 ^z	0.38 ^y	0.43 ^y	0.47 ^y	0.53 ^z	0.65 ^y	0.28 ^z	0.80 ^y
SEM ^d	0.004	0.016	0.005	0.007	0.024	0.008	0.002	0.006	0.011
Concentration^e				Concentration^f			Concentration^g		
0%	1.00 ^z	1.00 ^z	1.00 ^z	1.00 ^z	1.00 ^z	1.00 ^z	1.00 ^z	1.00 ^z	1.00 ^z
2%	0.49 ^y	0.12 ^y	0.45 ^y	0.97 ^z	0.85 ^{zy}	0.95 ^z	0.75 ^y	0.17 ^y	0.96 ^z
4%	0.06 ^x	0.01 ^x	0.04 ^x	0.75 ^y	0.70 ^{yx}	0.74 ^y	0.74 ^y	0.00 ^x	0.83 ^y
6%	-0.01 ^w	0.01 ^x	-0.09 ^w	0.56 ^x	0.53 ^{xw}	0.42 ^x	0.65 ^x	0.00 ^x	0.73 ^x
SEM ^d	0.005	0.018	0.006	0.38 ^w	0.44 ^w	0.00 ^w	0.39 ^w	0.00 ^x	0.64 ^w
				0.32 ^v	0.43 ^w	-0.20 ^v	0.003	0.008	0.014
				0.010	0.034	0.011			

^a Values given in this table correspond to least-squares means obtained from multifactor ANOVA. Least-squares means within the same column for the same factor with different letters differ significantly ($P \leq 0.05$).

^b Relationship between the area under the curve of the net growth behavior (AUC) of the meat control and treatments (AUCR= AUC treatment/AUC control).

^c Percentage of fat added to minced meat: 0%, 15% and 50%.

^d SEM, standard error of the mean for minced meat.

^e concentration of sodium lactate used in minced meat: 0% (control), 2%, 4% and 6%.

^f concentration of lauric arginate used in minced meat: 0.00% (control), 0.05%, 0.10%, 0.15%, 0.20% and 0.25%.

^g concentration of methylparaben used in minced meat: 0.0% (control), 0.1%, 0.5%, 1.0% and 2.0%.

Table 2. Least squares means^a for the interaction between the amount of fat (0%, 15% and 50%) and the concentration of sodium Lactate (SL; 0%, 2%, 4%, and 6%) for the relationship^b between the area under the curve of the meat control and treatments for total aerobic mesophilic colony counts (TAMCC), and lactic acid bacteria (LAB) in minced meat.

Antimicrobial concentration ^c	TAMCC			LAB		
	Fat concentration ^d			Fat concentration ^d		
	0%	15%	50%	0%	15%	50%
0% SL	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
2% SL	0.42	0.67	0.39	0.29	0.67	0.41
4% SL	-0.04	0.18	0.03	-0.15	0.23	0.04
6% SL	0.03	-0.04	-0.02	-0.13	-0.20	0.05
SEM ^e	0.008	0.008	0.008	0.010	0.010	0.010

^a Values given in this table correspond to least-squares means obtained from multifactor ANOVA.

^b Relationship between the area under the curve (AUCR) of the net growth behavior of the meat without antimicrobial (control) and the meat containing antimicrobial (treatments; $AUCR = AUC \text{ treatment} / AUC \text{ control}$).

^c Concentration of sodium lactate (SL) used in minced meat: 0% (control), 2%, 4% and 6%.

^d Percentage of fat added to minced meat: 0%, 15% and 50%

^e SEM, standard error of the mean for minced meat.

Table 3. Least squares means^a for the interaction between the amount of fat (0%, 15% and 50%) and the concentration of lauric arginate (LAE; 0.00%, 0.05%, 0.10%, 0.15%, 0.20% and 0.25%) for the relationship^b between the area under the curve of the meat control and treatments for total aerobic mesophilic colony counts (TAMCC), coliform bacteria, and lactic acid bacteria (LAB) in minced meat.

Antimicrobial concentration ^c	TAMCC			Coliform bacteria			LAB		
	Fat concentration ^d			Fat concentration ^d			Fat concentration ^d		
	0%	15%	50%	0%	15%	50%	0%	15%	50%
0.00% LAE	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
0.05% LAE	0.95	0.94	1.03	0.76	0.94	0.85	0.96	0.85	1.04
0.10% LAE	0.76	0.77	0.71	0.55	0.77	0.77	0.76	0.61	0.85
0.15% LAE	0.71	0.75	0.21	0.70	0.75	0.15	0.63	0.36	0.26
0.20% LAE	0.69	0.61	-0.17	0.69	0.61	0.01	-0.03	-0.04	0.06
0.25% LAE	0.59	0.58	-0.20	0.64	0.58	0.07	-0.06	-0.51	-0.04
SEM ^e	0.017	0.017	0.017	0.059	0.059	0.059	0.019	0.019	0.019

^a Values given in this table correspond to least-squares means obtained from multifactor ANOVA.

^b Relationship between the area under the curve (AUCR) of the net growth behavior of the meat without antimicrobial (control) and the meat containing antimicrobial (treatments; $AUCR = AUC \text{ treatment} / AUC \text{ control}$).

^c Concentration of lauric arginate (LAE) used in minced meat: 0.00% (control), 0.05%, 0.10%, 0.15%, 0.20% and 0.25%.

^d Percentage of fat added to minced meat: 0%, 15% and 50%

^e SEM, standard error of the mean for minced meat.

Table 4. Least squares means^a for the interaction between the amount of fat (0%, 15% and 50%) and the concentration of methylparaben (MHB; 0.0%, 0.1%, 0.5%, 1.0% and 2.0%) for the relationship^b between the area under the curve of the meat control and treatments for total aerobic mesophilic colony counts (TAMCC), coliform bacteria, and lactic acid bacteria (LAB) in minced meat.

Antimicrobial concentration ^c	TAMCC			Coliform bacteria			LAB		
	Fat concentration ^d			Fat concentration ^d			Fat concentration ^d		
	0%	15%	50%	0%	15%	50%	0%	15%	50%
0.0% MHB	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
0.1% MHB	0.79	0.81	0.65	0.09	0.02	0.40	0.98	1.00	0.90
0.5% MHB	0.72	0.75	0.75	0.00	0.00	0.00	0.84	0.80	0.84
1.0% MHB	0.69	0.69	0.59	0.00	0.00	0.00	0.80	0.66	0.73
2.0% MHB	0.47	0.42	0.29	0.00	0.00	0.00	0.74	0.65	0.52
SEM ^e	0.006	0.006	0.006	0.014	0.014	0.014	0.025	0.025	0.025

^a Values given in this table correspond to least-squares means obtained from multifactor ANOVA.

^b Relationship between the area under the curve (AUCR) of the net growth behavior of the meat without antimicrobial (control) and the meat containing antimicrobial (treatments; $AUCR = AUC \text{ treatment} / AUC \text{ control}$).

^c Concentration of methylparaben (MHB) used in minced meat: 0.0% (control), 0.1%, 0.5%, 1.0%, and 2.0%.

^d Percentage of fat added to minced meat: 0%, 15% and 50%

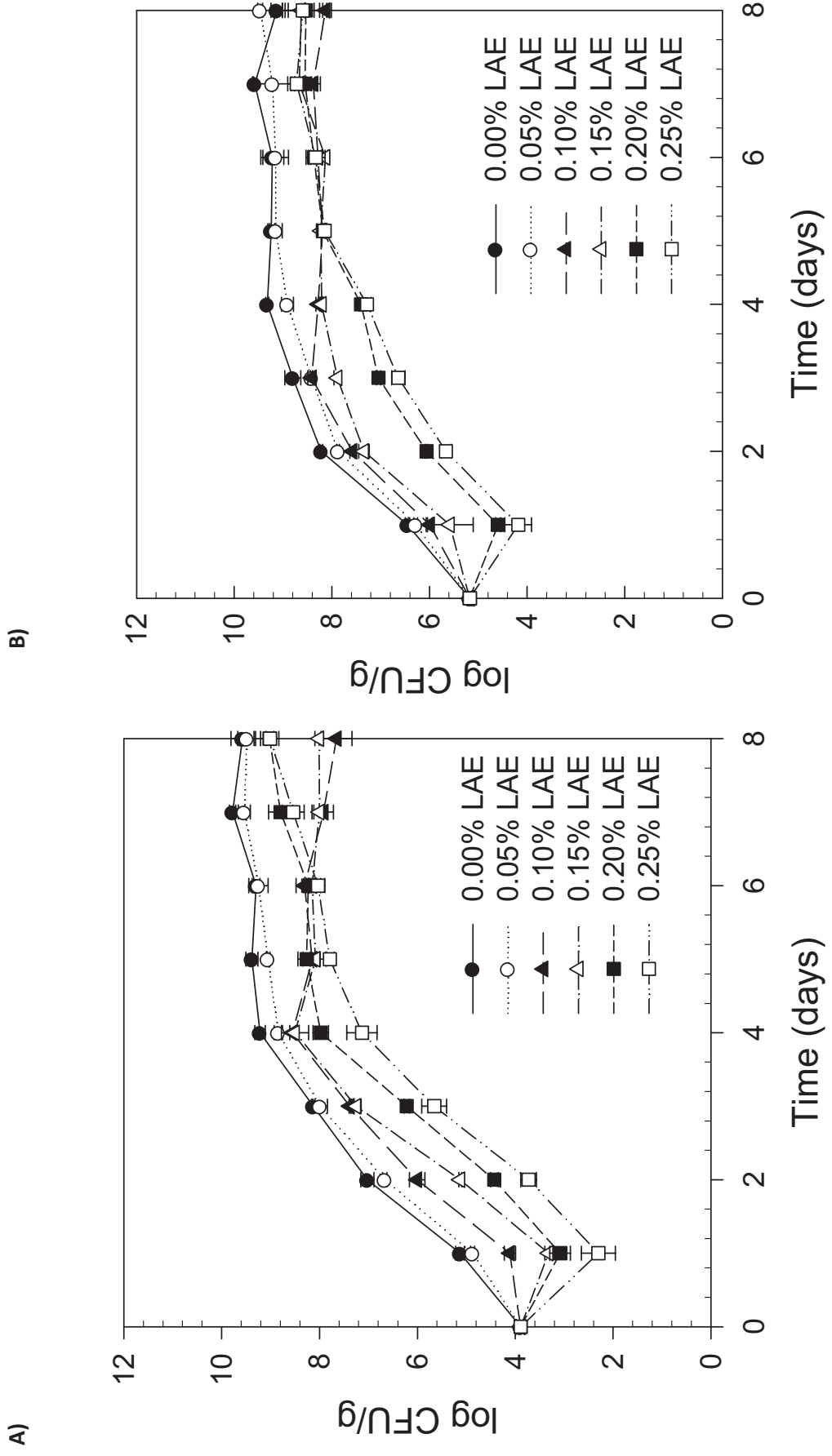
^e SEM, standard error of the mean for minced meat.

Figure caption

Figure 1. Mean populations of total aerobic mesophilic colony count on minced meat containing 0% fat (A), 15% fat (B) and 50% (C) treated with Lauric Arginate (LAE) as antimicrobial at different concentrations (0.00%, 0.05%, 0.10%, 0.15%, 0.20%, and 0.25%), atmosphere modified packaged and stored at 12°C for 8 days.

Figure 2. Mean populations of lactic acid bacteria on minced meat containing 0% fat (A), 15% fat (B) and 50% (C) treated with Lauric Arginate (LAE) as antimicrobial at different concentrations (0.00%, 0.05%, 0.10%, 0.15%, 0.20%, and 0.25%), atmosphere modified packaged and stored at 12°C for 8 days.

Figure 1



c)

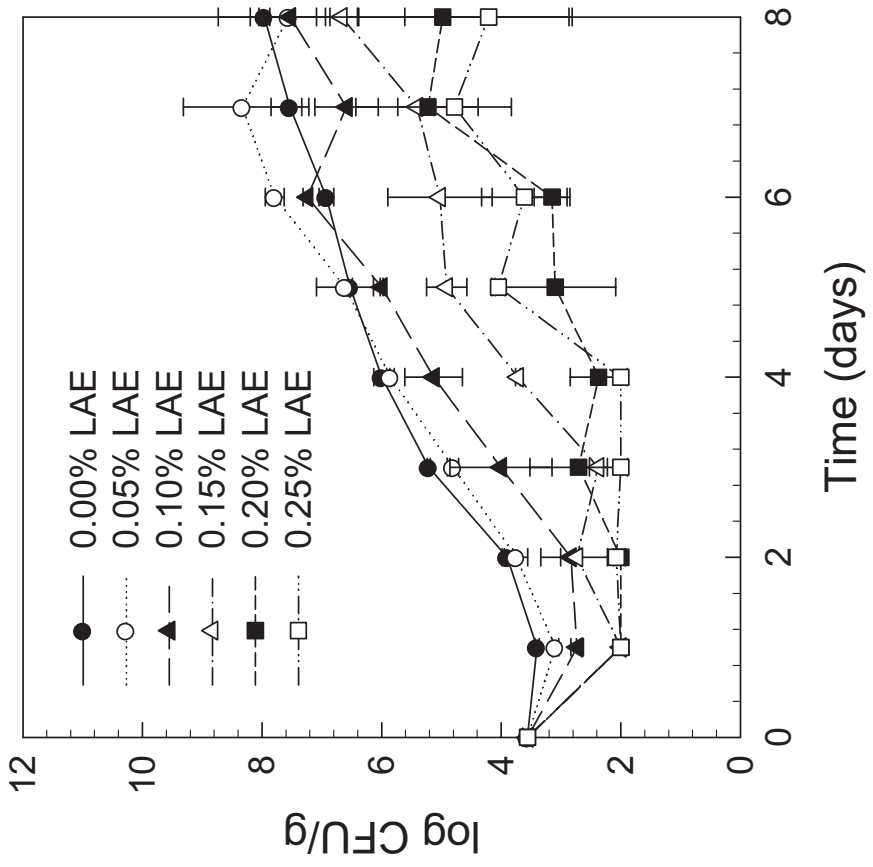
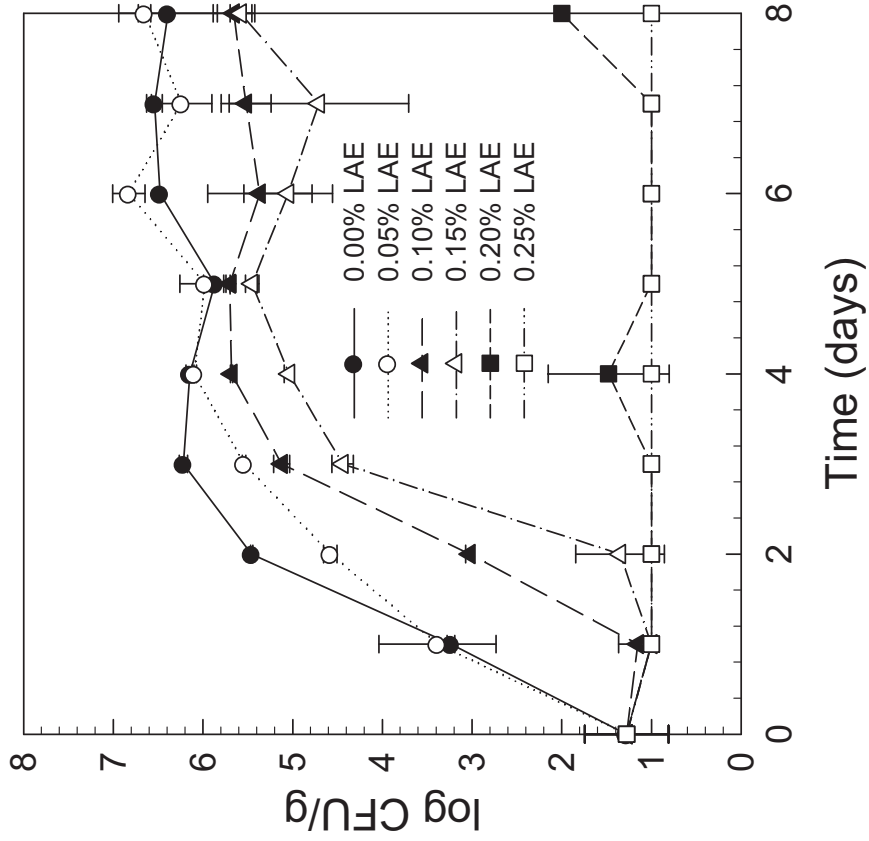
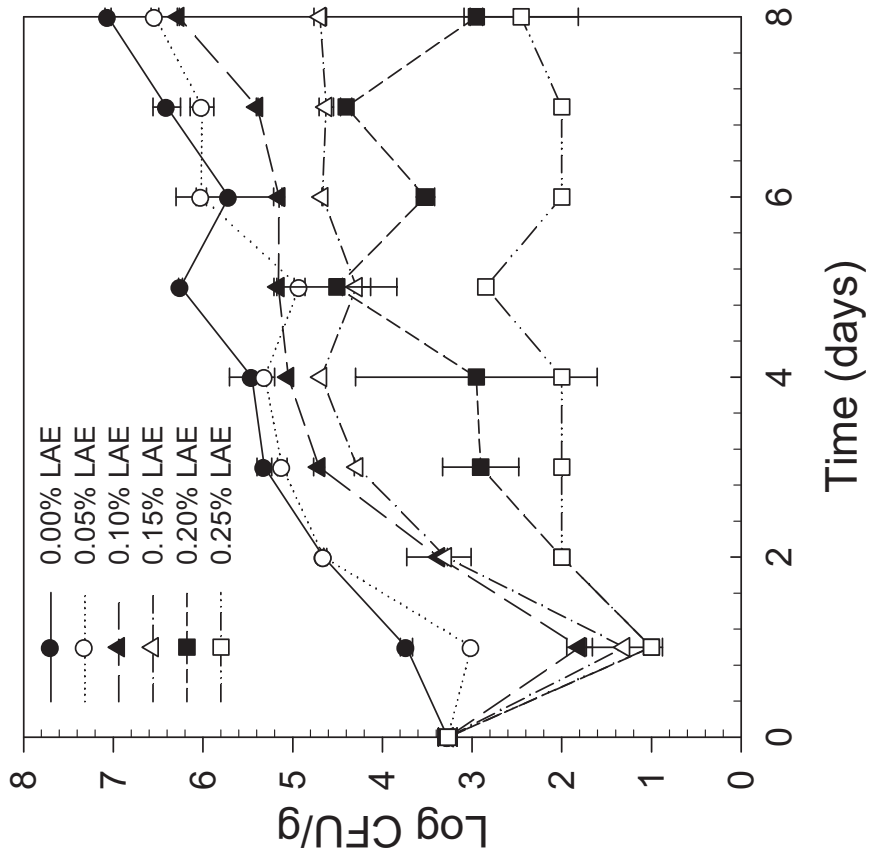


Figure 2

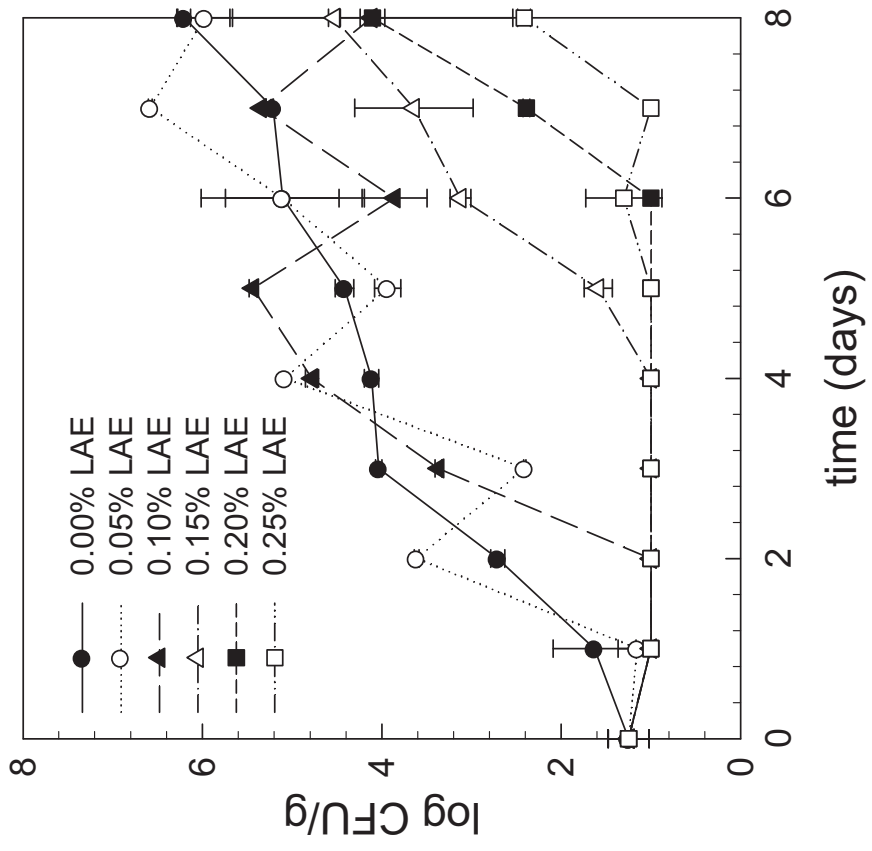
A)



B)



c)



6. RESULTATS I DISCUSSIÓ GLOBAL

6.1. CONCENTRACIÓ DE NITRATS I NITRITS RESIDUALS

En el primer estudi, dut a terme en llonganisses, un embotit curat i assecat, la determinació de nitrats i nitrits residuals va mostrar com l'addició de quantitats més grans de nitrat en les masses càrnies provocava concentracions de nitrats residuals més elevades en el producte mentre que les concentracions de nitrits residuals eren similars (**Figura 6-1**). No obstant, la font de nitrats utilitzada, ja sigui de manera convencional amb l'addició d'una sal químicament pura (en concret KNO_3) o bé en forma de concentrat vegetal ric en nitrats (concentrat d'api), no va influir, globalment, en aquestes concentracions residuals (**Figura 6-1**). D'igual manera, en el segon estudi, realitzat en botifarres catalanes, un embotit curat i cuit, es van obtenir resultats de nitrats i nitrits residuals similars en el producte, tant si s'usava un agent curant convencional (en aquest cas NaNO_2) com una font natural de nitrats (concentrat d'api i pastanaga) (**Figura 6-2**). Per tant, d'acord a aquests resultats seria possible utilitzar concentrats vegetals rics en nitrats per l'elaboració de productes carnis curats ja siguin crus o cuits sense que la quantitat residual de nitrats i nitrits en el producte acabat es vegi afectada.

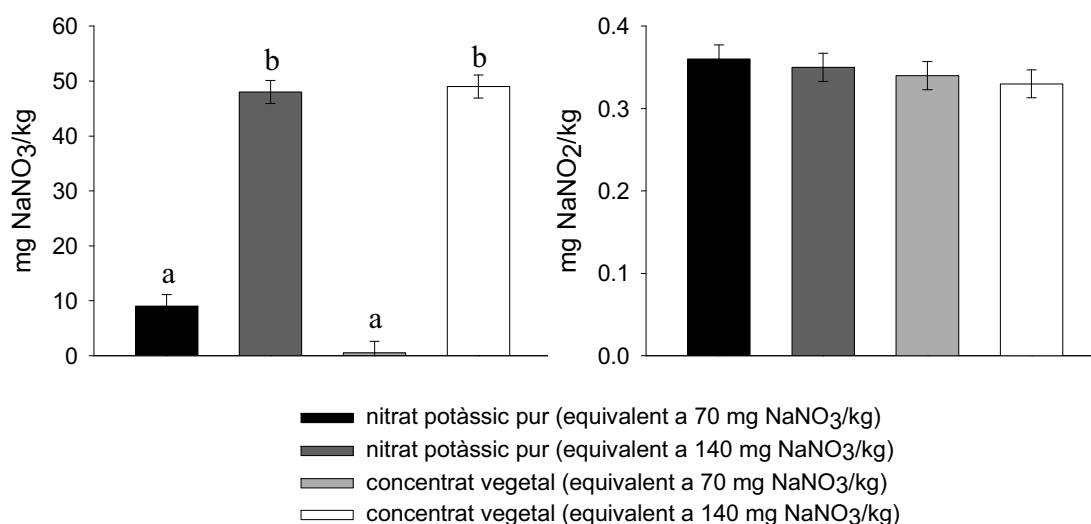


Figura 6-1. Efecte de la font de nitrat (nitrat potàssic pur o concentrat vegetal a base d'api), ambdós proporcionant dues concentracions equivalents en nitrats (70 o 140 mg NaNO_3/kg), sobre el contingut en nitrats i nitrits residuals de les llonganisses del primer estudi. Els resultats presentats són les mitjanes quadràtiques provinents d'una ANOVA multifactorial (n=32).

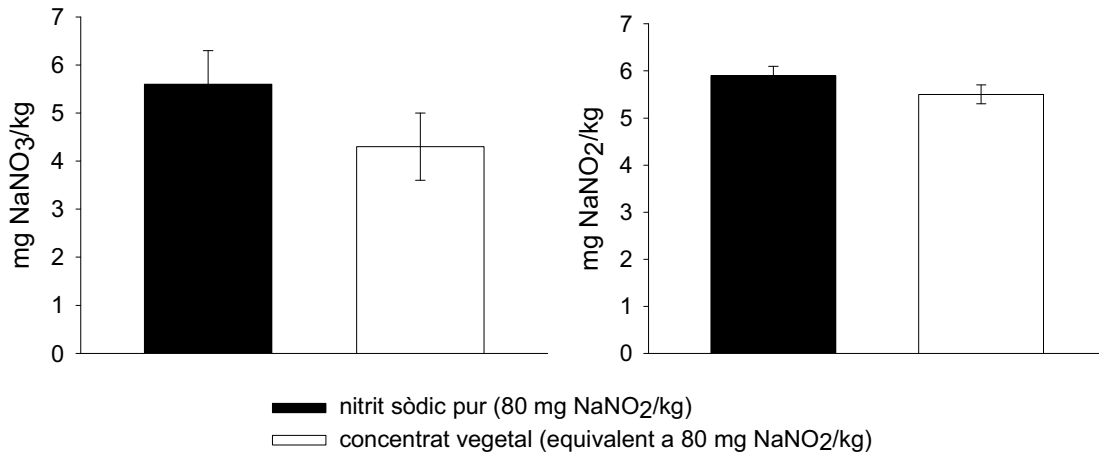


Figura 6-2. Efecte de la font de nitrit (nitrit de sodi pur o concentrat vegetal ric en nitrats a base d'api i pastanaga) sobre el contingut en nitrats i nitrits residuals de les botifarres catalanes del segon estudi. Els resultats presentats són les mitjanes quadràtiques provinents d'una ANOVA multifactorial (n=12).

D'altra banda, en el tercer estudi realitzat en botifarres catalanes es van observar diferències en la quantitat de nitrit i nitrat residual del producte si s'usaven diferents fonts per a l'agent curant (**Figura 6-3**). En aquest estudi, el contingut en nitrat residual era superior en aquelles botifarres catalanes elaborades amb un concentrat vegetal ric en nitrats, especialment en aquelles que no se'ls havia afegit un cultiu iniciador (**Figura 6-4**). De manera global, aquests resultats podrien semblar contradictoris amb els observats en el primer estudi en el qual no es van veure diferències en la concentració de nitrats residuals segons la font de nitrats utilitzada (**Figura 6-1**), tot i que hi havia llonganisses que tampoc comptaven amb la presència de *S. carnosus* (cultiu iniciador d'elevada activitat nitrat reductasa). S'ha de tenir en compte que totes les llonganisses es van elaborar amb nitrat ja que està permès en els productes carnis assecats i el seu ús és necessari per mantenir un nivell adequat d'agent curant durant tot el període d'assecatge (Toldrà, 2010). En aquest tipus de productes, el llarg període d'assecatge dona lloc a una disminució de pH, gràcies a l'addició de bacteris productors d'àcid làctic com *Lactobacillus sakei* (Chasco, Lizaso, & Beriain, 1996), i que conjuntament amb la presència de bacteris com *Staphylococcus xylosus* que tenen una baixa activitat nitrat reductasa (Gøtterup et al., 2007) permeten que el nitrat afegit es redueixi paulatinament per formar el nitrit.

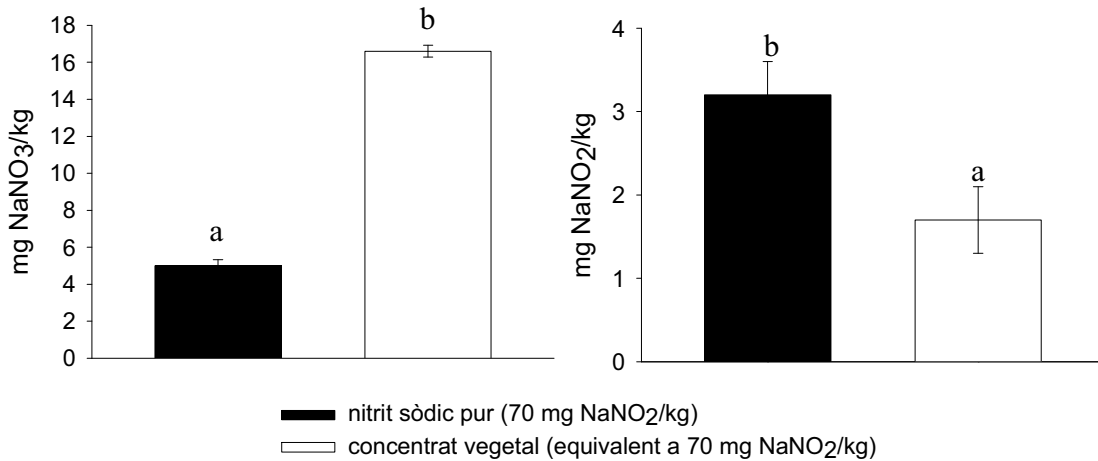


Figura 6-3. Efecte de la font de nitrit (nitrit de sodi pur o concentrat vegetal ric en nitrats a base d'api i pastanaga) sobre el contingut en nitrats i nitrits residuals de les botifarres catalanes del tercer estudi. Els resultats presentats són les mitjanes quadràtiques provinents d'una ANOVA multifactorial (n=36).

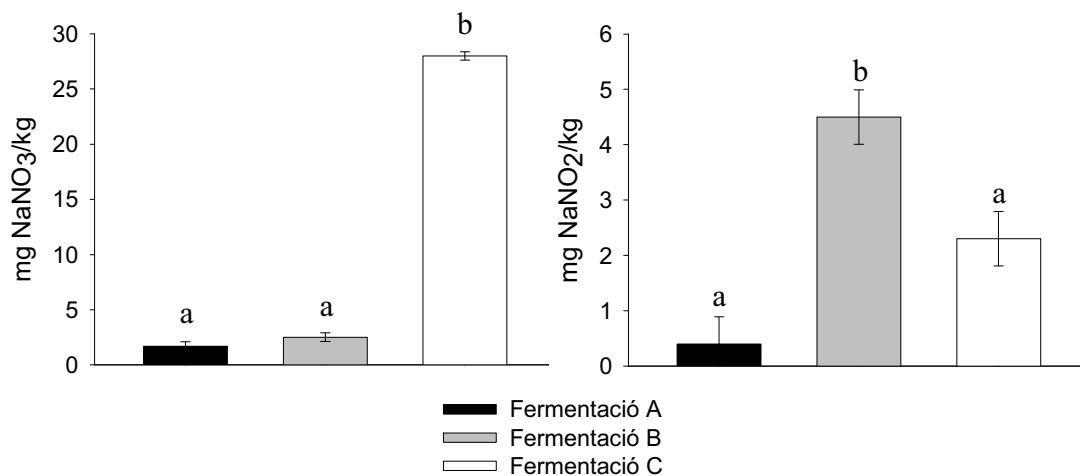


Figura 6-4. Efecte de les condicions de fermentació (Fermentació A: producte fermentat durant 12 hores a 16 °C i amb la presència de *Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus xylosum* i *Staphylococcus carnosus*; Fermentació B: producte fermentat durant 12 hores a 4 °C i amb la presència de *S. carnosus*; Fermentació C: producte fermentat durant 12 hores a 4 °C sense cap cultiu iniciador) sobre el contingut en nitrats i nitrits residuals de les botifarres catalanes del tercer estudi. Els resultats presentats són les mitjanes quadràtiques provinents d'una ANOVA multifactorial (n=36).

La reducció del contingut residual de nitrats i nitrits als productes carnis curats pot tenir efectes beneficiosos per la salut, ja que disminueix la possibilitat de la formació de nitrosamines (Fernandez-Gines, Fernandez-Lopez, Sayas-Barbera, Sendra, & Perez-

Alvarez, 2003; Sebranek & Bacus, 2007). Tanmateix, aquesta reducció en els nitrats i nitrits residuals es pot aconseguir mitjançant la diferent activitat nitrat reductasa de cultius iniciadors de la fermentació. En aquest sentit, la diferent activitat dels cultius explica que les llonganisses elaborades en presència de *S. carnosus* presentessin uns nivells de nitrats residuals molt més baixos que aquelles llonganisses en què no es va addicionar aquest cultiu (**Figura 6-5**). A més, com es va veure en les botifarres catalanes del segon estudi, l'addició d'aquests cultius permet la reducció de nitrats a nitrits en períodes relativament curts (**Figura 6-6**). Tot i així, després de la reducció del nitrat a nitrit sembla necessari deixar un temps perquè el nitrit format pugui reaccionar. Aquest temps conduiria a continguts de nitrits residuals menors (**Figura 6-6**). Per tant, per a la reducció de nitrats i nitrits, també són importants les condicions de fermentació.

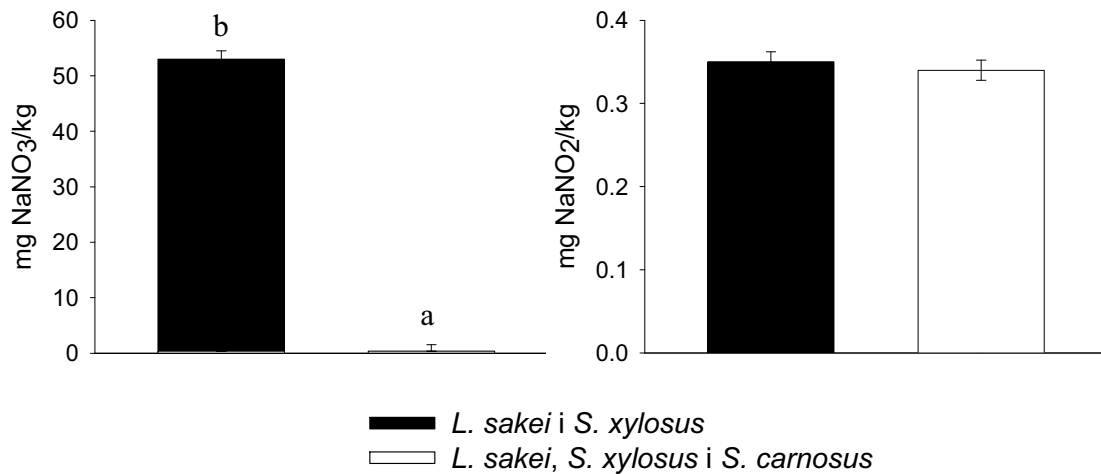


Figura 6-5. Efecte de l'addició d'un cultiu iniciador amb activitat nitrat reductasa (*Staphylococcus carnosus*) sobre el contingut en nitrats i nitrits residuals de les llonganisses del primer estudi. Els resultats presentats són les mitjanes quadràtiques provinents d'una ANOVA multifactorial (n=32).

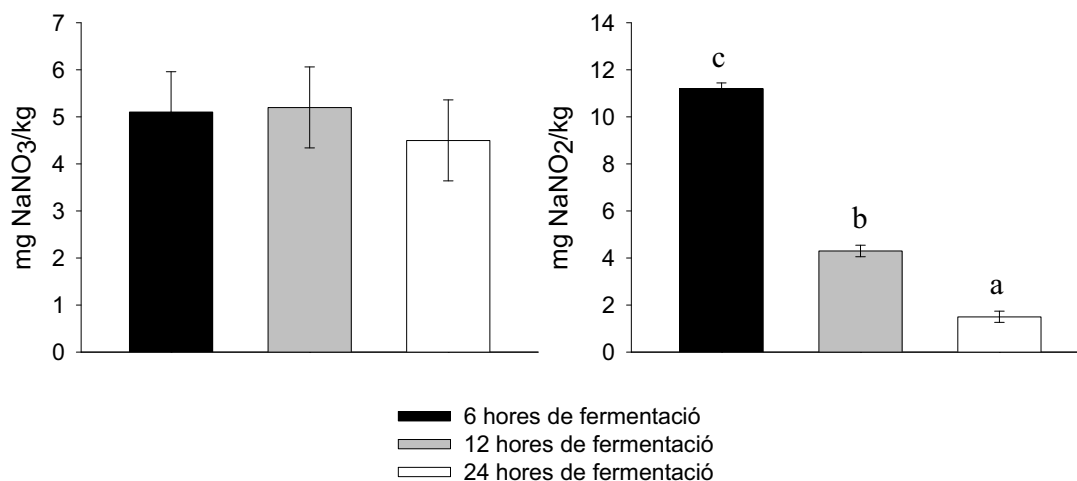


Figura 6-6. Efecte del temps de fermentació (6, 12 o 24 hores a 16 °C) dels cultius iniciadors de la fermentació (*Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus xylosus* i *Staphylococcus carnosus*) sobre el contingut en nitrats i nitrits residuals de les botifarres catalanes del segon estudi. Els resultats presentats són les mitjanes quadràtiques provinents d'una ANOVA multifactorial (n=12).

És per aquesta raó que en el tercer estudi fet amb botifarra catalana es van estudiar les condicions de fermentació. En aquest estudi, les interaccions entre la font de nitrit utilitzada (convencional o concentrat vegetal ric en nitrat a base d'api i pastanaga) i les condicions de fermentació (a 16 °C durant 12 hores amb cultius iniciadors amb activitat nitrat reductasa; a 4 °C durant 12 hores amb cultiu iniciador amb activitat nitrat reductasa; a 4 °C durant 12 hores sense cultius iniciadors) van mostrar la importància de sotmetre al bacteri nitrat reductor a un temps i a una temperatura determinats en cada cas a fi d'obtenir un producte carni curat (**Figura 6-7**). Així doncs, com altres autors també han assenyalat (Sebranek & Bacus, 2007; Sindelar, Cordray, Sebranek, Love, & Ahn, 2007c), els cultius iniciadors amb activitat nitrat reductasa que són afegits a la massa càrnia són indispensables pel procés de curat del producte, però també cal tenir en compte les condicions d'elaboració d'aquest producte per a la reducció de nitrats i nitrits residuals i la consecució d'un procés de curat correcte.

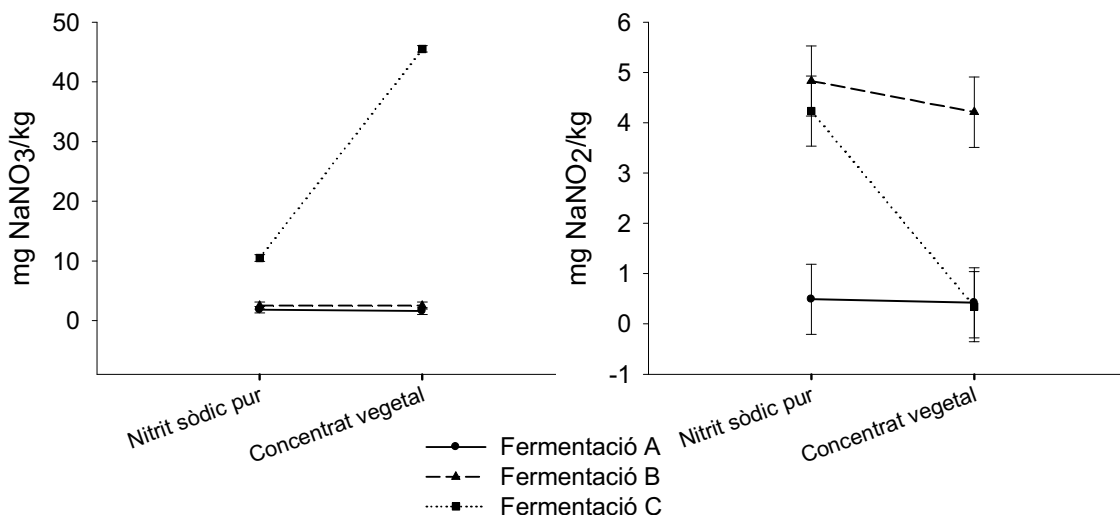


Figura 6-7. Interacció entre les condicions de fermentació (Fermentació A: producte fermentat durant 12 hores a 16 °C i amb la presència de *L. sakei*, *S. xylosus* i *S. carnosus*; fermentació B: producte fermentat durant 12 hores a 4 °C i amb la presència de *S. carnosus*; i, fermentació C: producte fermentat durant 12 hores a 4 °C sense cap cultiu iniciador) i la font de nitrit (nitrit de sodi pur o concentrat vegetal ric en nitrats a base d'api i pastanaga, ambdós proporcionant l'equivalent a 70 mg NaNO₂/kg) pels continguts en nitrats i nitrats residuals de les botifarres catalanes del tercer estudi.

En conjunt, els embotits elaborats que contenien *S. carnosus* en la seva formulació van presentar nivells de nitrats i nitrats residuals molt més baixos que els límits permesos per a productes ecològics (DOUE, 2008). L'addició del bacteri *S. carnosus* a les masses càrnies per a l'elaboració d'embotit va causar una reducció eficient del nitrat afegit (Figures 6-4 i 6-5), degut a la seva alta activitat nitrat reductasa (Casaburi et al., 2005; Gotterup et al., 2008; Sindelar et al., 2007b). Per això, l'ús de concentrats vegetals com a fonts naturals de nitrats és possible, però, a fi de reduir les concentracions de nitrats afegides i obtenir un producte final amb baixos nitrats residuals es requereix també de l'addició conjunta a la massa càrnia d'un cultiu que presenti activitat nitrat reductasa i d'unes condicions de fermentació adequades.

Durant el temps d'emmagatzematge, els nitrats residuals van disminuir en les botifarres catalanes elaborades segons el tercer estudi (Figura 6-8). El decreixement del contingut en nitrit en productes cuits i curats durant el període d'emmagatzemament és ben conegut (Hustad et al., 1973; Jantawat, Runglerdkriangkrai, Thunpithayakul, & Sanguandekul, 1993; Krause, et al., 2011; Sindelar, et al., 2007a; Sindelar, et al., 2007c; Tahmouzi, Razavi, Safari, & Emam-Djomeh, 2013; Terns, et al., 2011a; Terns,

Milkowski, Claus, & Sindelar, 2011b). A les llonganisses elaborades segons el primer estudi experimental, també es va observar aquest decreixement en el nitrit residual al llarg del temps d'emmagatzematge (**Figura 6-9**). Tot i que el nitrit residual en productes curats no hauria de ser excessivament alt per tal d'evitar la formació de nitrosamines, són importants petites quantitats de nitrats residuals per mantenir les propietats típiques dels productes curats durant tot el període d'emmagatzematge (Fernandez-Lopez, Sendra, Sayas-Barbera, Navarro, & Perez-Alvarez, 2008). D'altra banda en ambdós casos, els nitrats residuals no van variar o bé van augmentar lleugerament amb el temps d'emmagatzematge. L'augment dels nitrats residuals es deu a l'oxidació dels nitrats per formar nitrats essent un fenomen comú en carns curades (Marco, Navarro, & Flores, 2006; Sindelar, et al., 2007a; Sindelar, Terns, Meyn, & Boles, 2010; Terns et al., 2011a; Terns et al., 2011b; Tsoukalas, Katsanidis, Marantidou, & Bloukas, 2011). Per tant, nitrats i nitrats estan involucrats conjuntament en reaccions de curat durant l'emmagatzemament d'aquests productes.

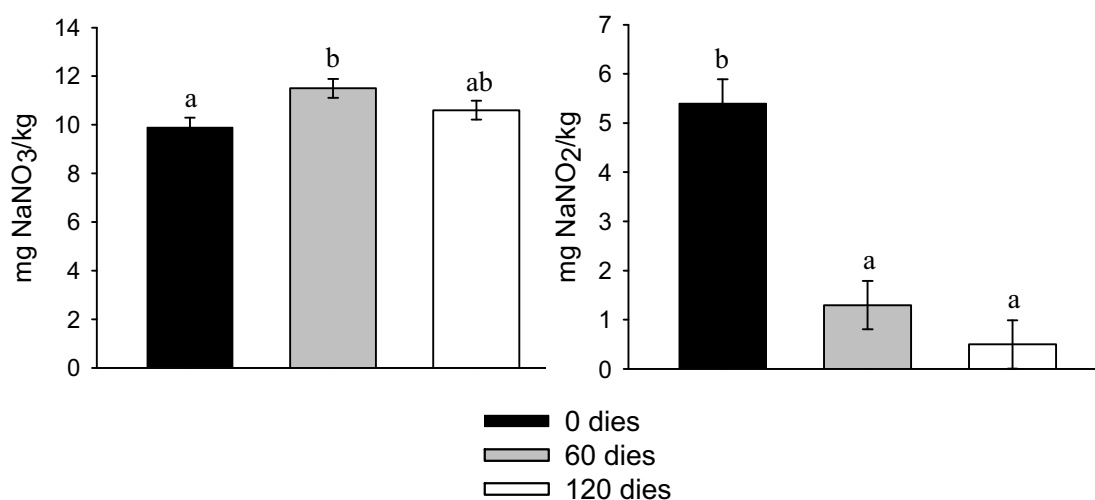


Figura 6-8. Efecte del temps d'emmagatzematge (0, 60 i 120 dies a 4 °C, envasades al buit) sobre el contingut en nitrats i nitrats residuals de les botifarres catalanes del tercer estudi. Els resultats presentats són les mitjanes quadràtiques provinents d'una ANOVA multifactorial (n=36).

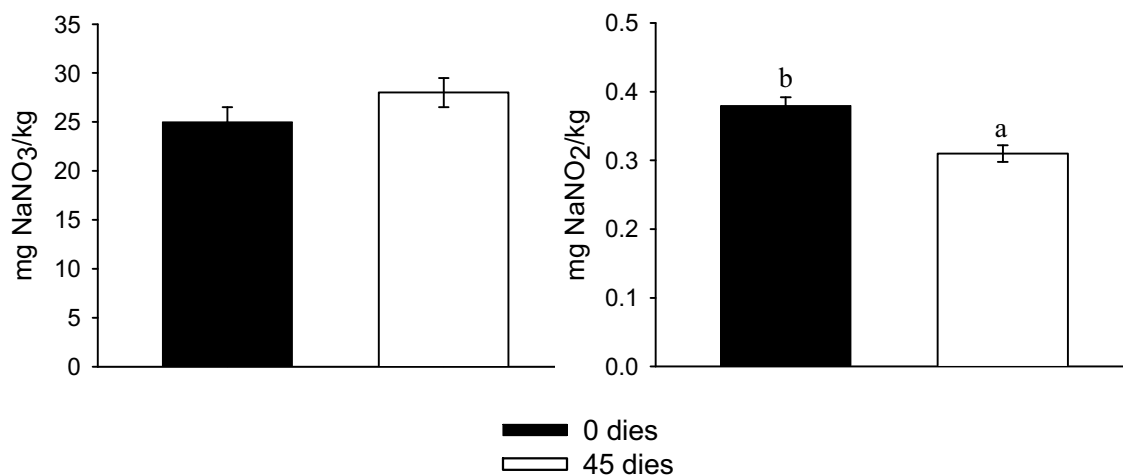


Figura 6-9. Efecte del temps d'emmagatzematge (0 i 45 dies a 4 °C envasades en 80% N₂ i 20% CO₂) sobre el contingut en nitrats i nitrits residuals de les llonganisses del primer estudi. Els resultats presentats són les mitjanes quadràtiques provinents d'una ANOVA multifactorial (n=32).

6.2. COLOR

La reducció de nitrats a nitrits i els continguts residuals d'aquests en el producte carni curat tenen relació amb una formació òptima del color de l'embotit (Sebranek & Bacus, 2007; Sindelar et al., 2007c; Terns et al., 2011b). El valor de a^* (espai de color CIE $L^*a^*b^*$), indicatiu del color vermellós, dels embotits curats tant assecats com cuïts està relacionat directament amb el contingut de pigments nitrosilats com la nitrosilmioglobina o el nitrosilhemocrom (Barbut, 2010; Li, Li, Xu, & Zhou, 2012; Mancini & Hunt, 2005). Per tant, el nitrit contribueix a donar el color característic de les carns curades gràcies a la formació d'aquests compostos. En el primer estudi, la concentració més alta de nitrat afegit (140 mg NaNO₃/kg) no va mostrar diferències amb la concentració més baixa (70 mg NaNO₃/kg) pel valor de a^* . A les llonganisses elaborades amb 140 mg NaNO₃/kg es van obtenir valors de a^* de 15,77 i 15,93, respectivament, per a l'agent curant convencional i el concentrat vegetal ric en nitrats. Paral·lelament, a les llonganisses elaborades amb 70 mg NaNO₃/kg, els valors de a^* per a l'agent curant convencional i el concentrat vegetal van ser 15,78 i 15,70, respectivament. En conseqüència, el color vermell característic de les carns curades sembla estar assegurat a les dosis màximes de nitrat i nitrit permeses per a productes ecològics (80 mg nitrat de sodi/kg; 80 mg nitrit de sodi/kg) (DOUE, 2008).

Els cultius iniciadors amb activitat nitrat reductasa són de gran importància en el desenvolupament del color de productes carnis fermentats ja que redueixen el nitrat a nitrit que posteriorment es torna a reduir a òxid nítric que a la vegada acabarà formant els compostos responsables del color característics de les carnis curades (Gøtterup et al., 2007). Els estudis realitzats en aquesta tesi posen de manifest la importància d'aquest fet i on, per exemple, es pot veure que l'addició de *S. carnosus* a la formulació de les llonganisses va conduir a una vermellor més elevada (**Figura 6-10**).

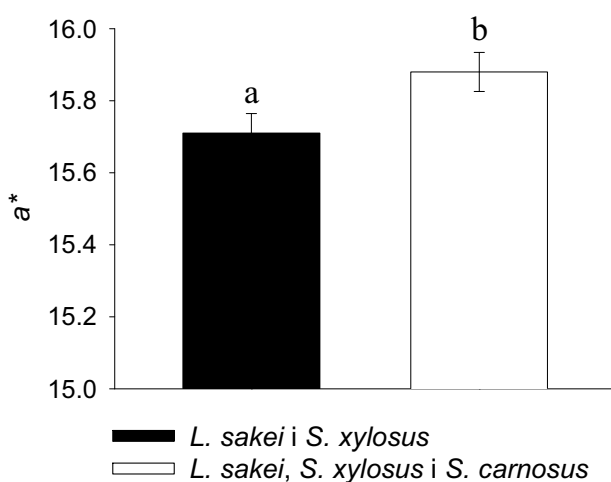


Figura 6-10. Efecte de l'addició d'un cultiu iniciador de la fermentació amb activitat nitrat reductasa elevada (*S. carnosus*) sobre el valor de a^* (vermellor) de la llonganissa del primer estudi. Els resultats presentats són les mitjanes quadràtiques provinents d'una ANOVA multifactorial (n=32).

També es va observar que la botifarra catalana sotmesa a una fermentació de 12 hores a 4 °C sense cultiu iniciador i que contenia una font natural de nitrats com agent curant va mostrar un color vermell (valor de a^* ; espai de color CIE $L^*a^*b^*$) de menor intensitat i alhora una tonalitat més groga (valor de h significativament més elevat; espai de color L^*C^*h) (**Figura 6-11**). El baix valor de a^* pot ser, per tant, atribuïble a la manca d'un cultiu iniciador capaç de facilitar la reducció de nitrats cap a nitrits, fet que comporta que la formació dels pigments hemo nitrosilats sigui limitada.

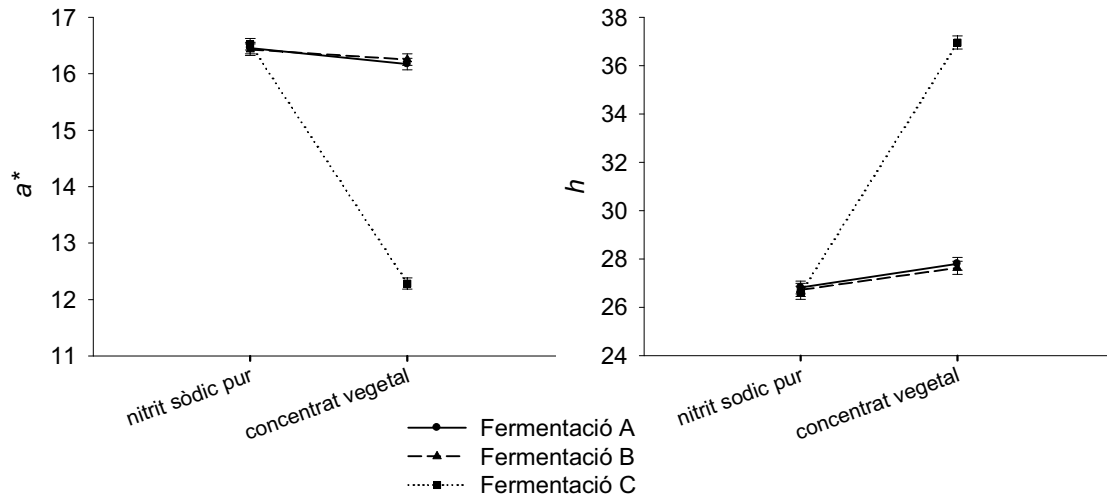


Figura 6-11. Interacció entre les condicions de fermentació (Fermentació A: producte fermentat durant 12 hores a 16 °C i amb la presència de *L. sakei*, *S. xylosus* i *S. carnosus*; Fermentació B: producte fermentat durant 12 hores a 4 °C i amb la presència de *S. carnosus*; Fermentació C: producte fermentat durant 12 hores a 4 °C sense cap cultiu iniciador) i la font de nitrit (nitrit sòdic pur o concentrat vegetal ric en nitrats a base d'api i pastanaga, ambdós proporcionant l'equivalent a 70 mg NaNO₂/kg) pels valors de color *a** i *h* de la botifarra catalana del tercer estudi.

Les botifarres catalanes en les quals es va addicionar el concentrat vegetal a base d'api i pastanaga van presentar una brillantor més elevada i un color més groguenc. Aquest últim fet va ser coincident amb l'efecte que va tenir l'addició del concentrat d'api sobre el color de les llonganisses (**Figura 6-12**). Aquest fenomen ja ha estat observat per diferents autors en diversos productes carnis curats elaborats amb fonts naturals de nitrats i tot sovint ha estat atribuït al color intrínsec del producte vegetal (Krause et al., 2011; Terns et al., 2011a; Terns et al., 2011b; Tsoukalas et al., 2011).

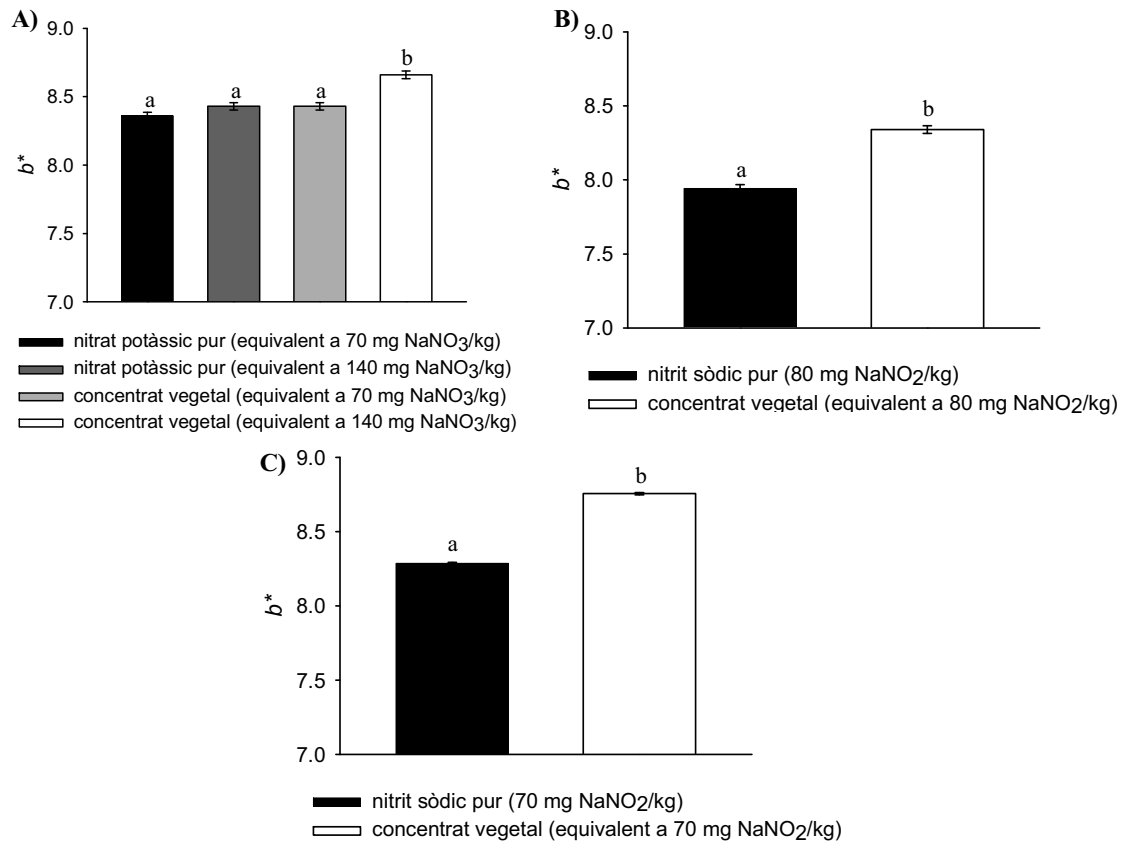


Figura 6-12. Efecte de la font de nitrat o nitrit sobre el color groc (b^*) de les llonganisses del primer estudi (A), de les botifarres catalanes del segon estudi (B) i de les botifarres catalanes del tercer estudi (C). Els resultats presentats són les mitjanes quadràtiques provinents d'una ANOVA multifactorial ($n=128$, 48 i 36, respectivament).

Un altre ingredient de les fórmules dels embotits que va ser objecte d'estudi va ser l'addició d'un extracte de tocoferols. L'efecte que va tenir l'extracte sobre el color de les llonganisses va ser diferent al de les botifarres catalanes. En aquest darrer embotit curat i cuit, l'addició de 200 mg de tocoferols/kg no va tenir cap repercussió sobre les mesures de color (espai de color L^*C^*h) (**Figura 6-13**). En canvi, l'addició de la mateixa quantitat de tocoferols a la formulació de les llonganisses va provocar que aquestes tinguessin una brillantor, una vermellor i una grogor més elevades en comparació amb aquelles llonganisses que no se'ls havia afegit l'extracte (**Figura 6-14**). Dineen i col·laboradors (2000) van observar que pernills cuits elaborats amb carn procedent de porcs alimentats amb un pinso fortificat amb acetat de α -tocoferol presentaven una vermellor més elevada i eren més estables en el temps que els elaborats amb carn procedent de porcs alimentats amb pinso basal. Els autors van demostrar la influència del contingut de tocoferol dels pernills en el color. Tanmateix, els canvis de

color en un producte carni podrien estar relacionats amb processos oxidatius a l'embotit (Morrissey, Sheehy, Galvin, Kerry, & Buckley, 1998). Per tant, tot i que l'ús d'un extracte de tocoferols pot repercutir en el color, observant els nostres resultats sembla que aquest pot ser més indicat en el cas de les llonganisses i per extensió en l'elaboració d'altres productes carnis crus curats. Aquests requereixen d'una llarga maduració i assecatge, i, per tant, l'efecte que té l'addició d'aquest extracte sobre el color podria estar relacionat amb la prevenció contra l'oxidació durant aquests processos i, en conseqüència, evitar canvis en el color del producte.

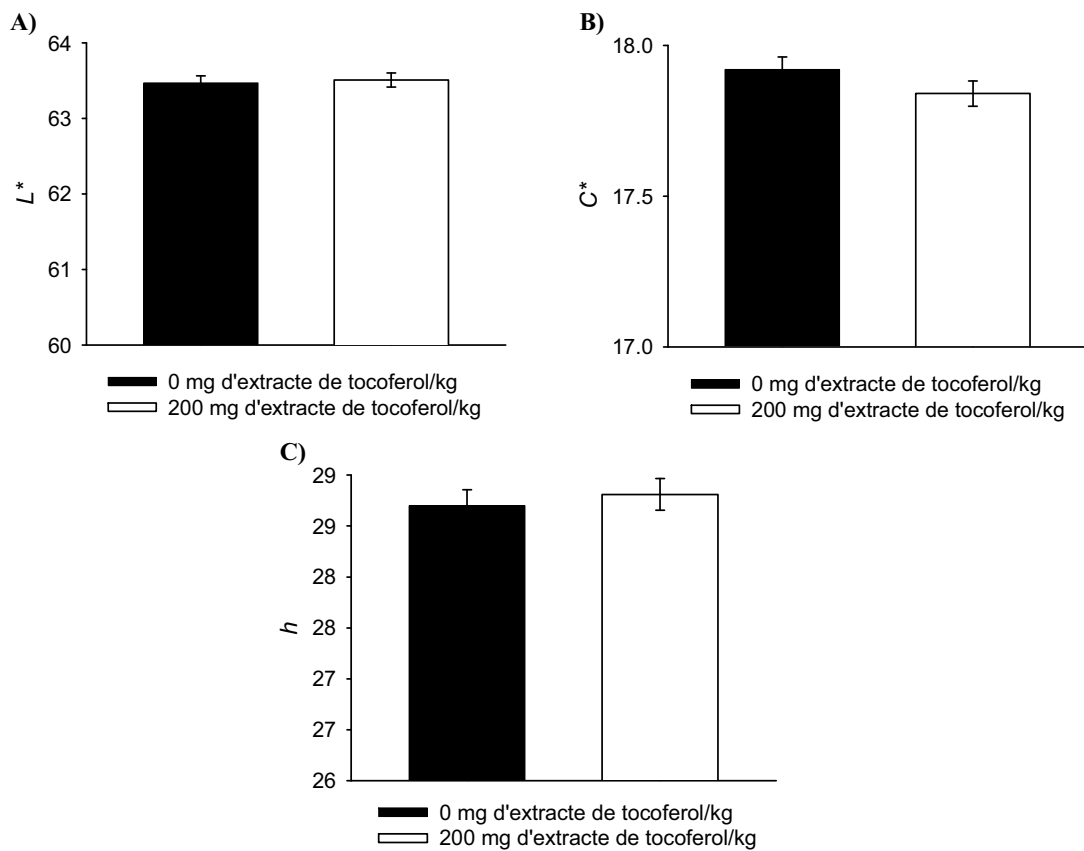


Figura 6-13. Efecte de l'addició d'un extracte de tocoferols (200 mg de tocoferols/kg) sobre la brillantor (A; L^*), la intensitat de color (B; C^*) i l'angle o tonalitat (C; h) de l'espai de color L^*C^*h en les botifarres catalanes del tercer estudi. Els resultats presentats són les mitjanes quadràtiques provinents d'una ANOVA multifactorial (n=36).

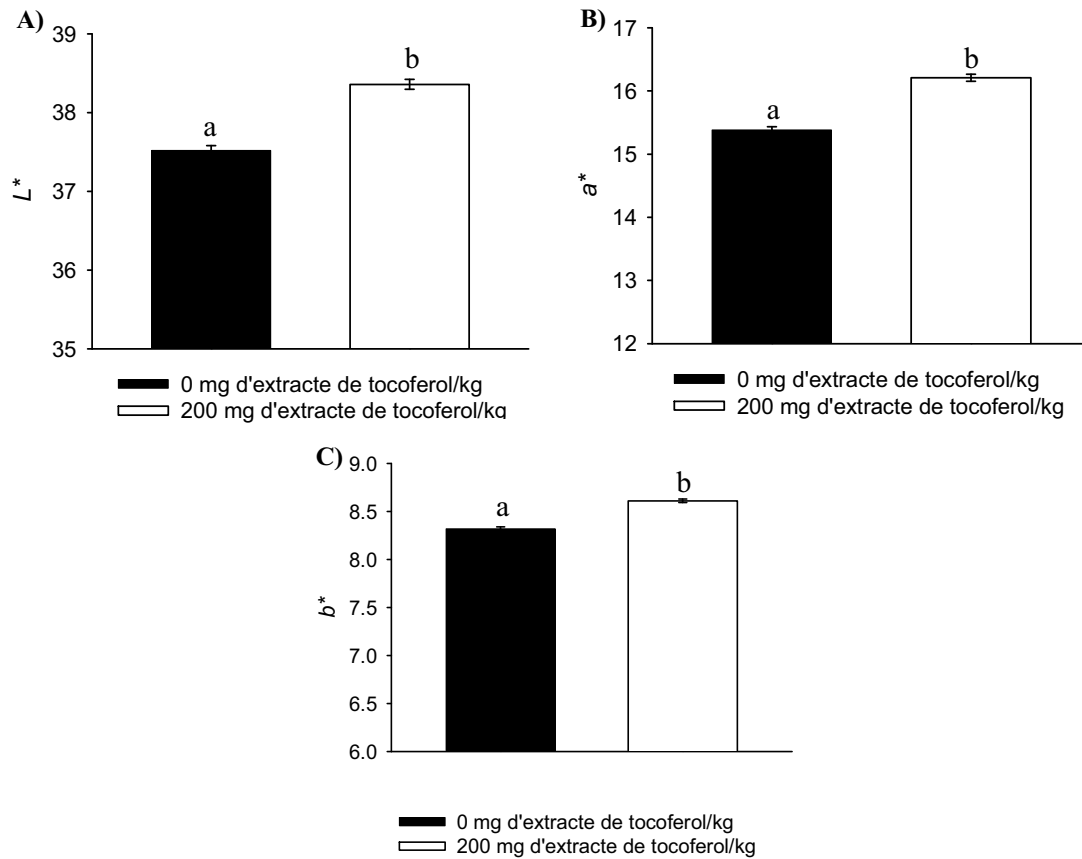


Figura 6-14. Efecte de l'addició d'un extracte de tocoferols (200 mg de tocoferols/kg) sobre la brillantor (A; L^*), la vermellor (B; a^*) i la grogor (C; b^*) de l'espai de color CIE $L^*a^*b^*$ en les llonganisses del primer estudi. Els resultats presentats són les mitjanes quadràtiques provinents d'una ANOVA multifactorial ($n=128$).

D'altra banda, el color dels embotits (CIE $L^*a^*b^*$ i L^*C^*h) es pot veure afectat pel temps d'emmagatzematge degut als processos oxidatius que hi tenen lloc. La disminució del valor de a^* s'ha relacionat amb processos oxidatius els quals podrien degradar la nitrosilmioglobina i, per tant, disminuir al llarg del temps la vermellor del producte (Moller & Skibsted, 2006; Nannerup et al., 2004). En el primer estudi es va veure que el valor de a^* de les llonganisses llescades i envasades en atmosfera modificada (80% N_2 :20% CO_2) va disminuir amb el temps d'emmagatzematge a 4 °C (**Figura 6-15 A**). Aquest fet també s'ha observat en altres embotits curats i assecats independentment del tipus d'envasament emprat (Martin, Andres, & Sanabria, 2012). En les botifarres catalanes elaborades segons el segon estudi i envasades al buit sense llescar a 4 °C, el valor de a^* també va ser menor al final del període d'emmagatzematge (**Figura 6-15 B**). Altres autors (Dineen et al., 2000; Fernandez-Gines et al., 2003;

Sindelar et al., 2007a; Terns et al., 2011a; Villegas, O'Connor, Kerry, & Buckley, 1999) també han observat una disminució en la vermellor dels productes carnis curats i cuits elaborats, com pernil cuit, mortadella o salsitxes de Frankfurt. No obstant, altres estudis sobre els canvis de color en embotits donen resultats controvertits (Sindelar et al., 2007c; Terns et al., 2011b). De fet, en el tercer estudi d'aquesta tesi el color de les botifarres catalanes envasades al buit senceres es va mantenir constant durant tot el període d'emmagatzematge a 4 °C (**Figura 6-15 C**). En d'altres estudis (Sindelar et al., 2007c; Terns et al., 2011b) fins i tot s'han obtingut valors de a^* més elevats al final del període d'emmagatzematge. Així doncs, sembla que l'estabilitat del color pot estar afectada per diversos factors, com el tipus d'envàs, les condicions d'emmagatzematge o els nivells residuals de nitrats i nitrits que poden reaccionar amb pigments hemo de la carn i augmentar el color vermell (Sindelar et al., 2007c). És per això que la barreja d'aquests factors poden donar lloc a un augment o una disminució del color, o bé, mantenir l'estabilitat del color al llarg del temps.

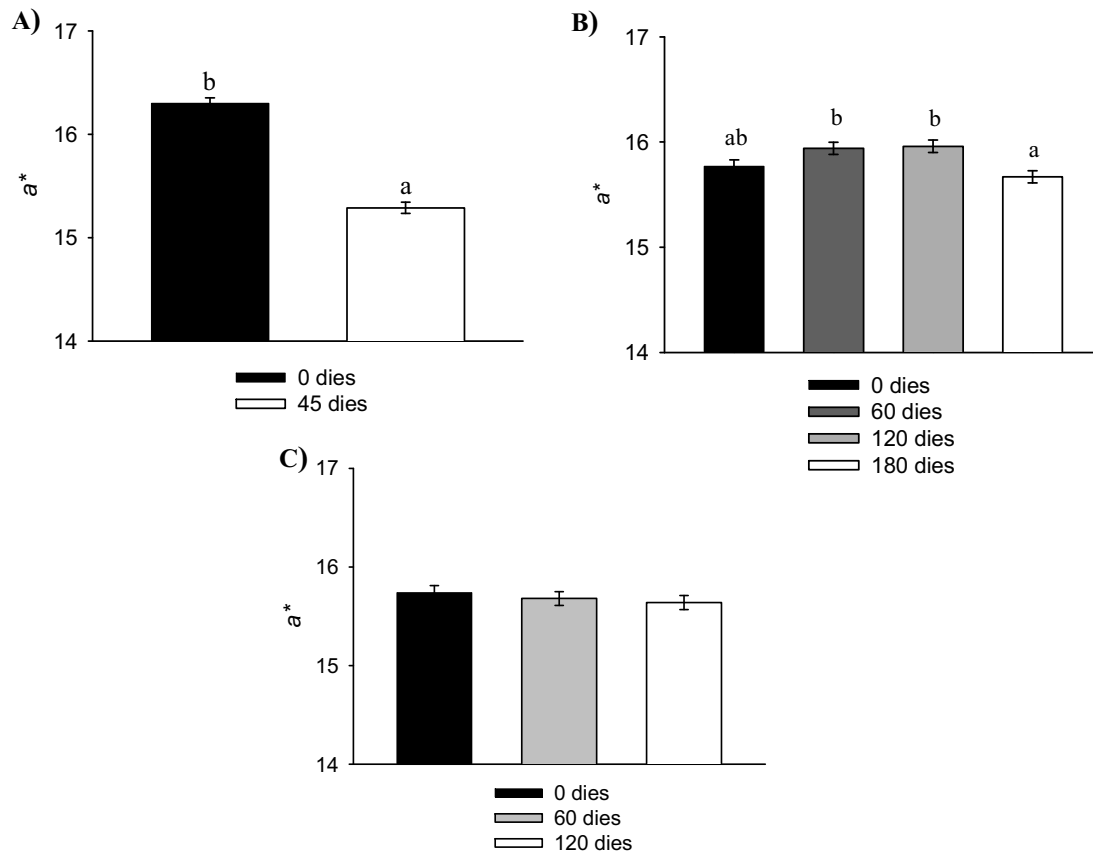


Figura 6-15. Efecte del temps d'emmagatzematge sobre el valor de a^* en les llonganisses (A), les botifarres catalanes del segon estudi (B) i les botifarres catalanes del tercer estudi (C). Les llonganisses es van emmagatzemar llescades en atmosfera modificada (80% N_2 : 20% CO_2) a 4 °C fins a 45 dies. Les botifarres catalanes del segon estudi es van coure senceres, després es van tallar en quatre parts de 300g, envasar al buit, pasteuritzar i emmagatzemar a 4 °C fins a 180 dies. Les botifarres catalanes del tercer estudi es van coure envasades al buit i seguidament es van emmagatzemar a 4 °C fins a 120 dies. Els resultats presentats són les mitjanes quadràtiques provinents d'una ANOVA multifactorial (n=128, 48 i 36, respectivament).

6.3. EFICIÈNCIA DE CURAT

La maduració i assecatge d'embotits sol garantir una bona formació de color durant el curat, sempre i quan les quantitats de nitrat o nitrit afegits siguin suficients. El problema esdevé en productes carnis curats i cuits on és necessari que el curat del producte es faci de forma ràpida, ja que no es dona aquest procés de maduració i assecatge, i per tant es pot donar el cas de coure l'embotit abans d'un procés de curat suficient. Per esbrinar si això podria ser un problema depenent de les fonts de nitrit usades en els dos estudis realitzats amb embotits cuits i curats es van determinar la concentració

nitrosilhemocrom i l'eficiència de curat (eficiència de curat (%) = (mg/kg de nitrosilhemocrom / mg/kg de pigments hemo total) x 100).

En les botifarres catalanes realitzades segons el disseny experimental del segon estudi, el temps de fermentació al qual les botifarres es van sotmetre va tenir influència sobre l'eficiència del curat (**Figura 6-16 A**). Les botifarres que es van fermentar menys hores van presentar una eficiència de curat menor que, fins i tot, es podria considerar inacceptable (Wrolstad, 2005). Els altres dos temps de fermentació (12 i 24 hores) van demostrar ser suficients per tal d'obtenir una conversió del pigment adequat (superior al 80%). A més, la utilització del concentrat vegetal ric en nitrats com a font d'agent curant no va tenir cap repercussió sobre aquest paràmetre (**Figura 6-16 B**). L'augment de la concentració del nitrosilhemocrom amb llargs temps de fermentació també ha estat observat per altres autors (Sindelar et al., 2007b; Terns et al., 2011b). Per tant, per a l'obtenció d'un embotit de qualitat acceptable l'addició de cultiu iniciador de la fermentació amb activitat nitrat reductasa és important però també ho són les condicions per deixar-lo fermentar (Gøtterup et al., 2007; Sanz, Vila, Toldrà, Nieto, & Flores, 1997). Si aquests condicionants són coberts, el curat del producte és eficient i, en conseqüència, es compleixen els requisits de qualitat.

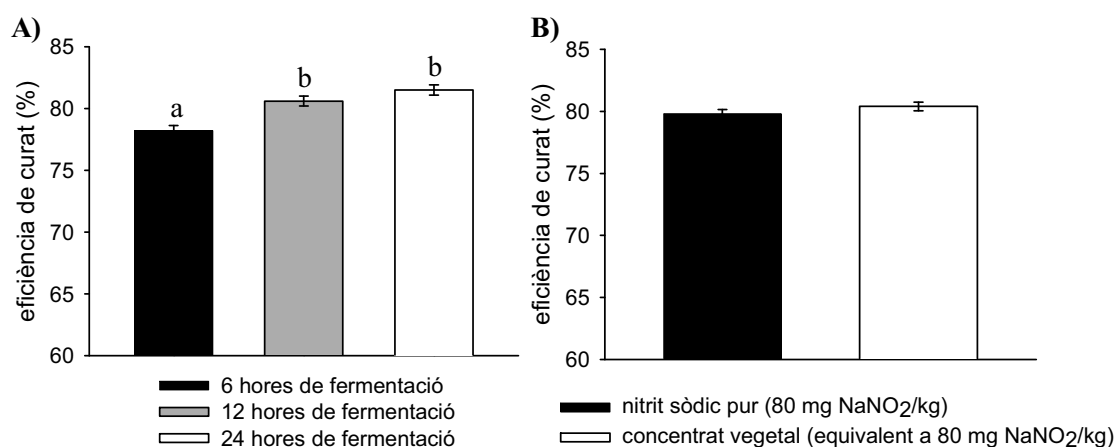


Figura 6-16. Efecte del temps de fermentació (A; 6, 12 o 24 hores) i de la font de nitrit utilitzada (B; nitrit de sodi pur o concentrat vegetal ric en nitrats a base d'api i pastanaga, ambdós proporcionant l'equivalent a 80 mg NaNO₂/kg) sobre l'eficiència de curat de les botifarres catalanes del segon estudi. Els resultats presentats són les mitjanes quadràtiques provinents d'una ANOVA multifactorial (n=48).

A fi d'aprofundir més en com aconseguir una eficiència òptima de curat, en l'experiment de les botifarres catalanes elaborades segons el disseny experimental del tercer estudi es van comparar diferents condicions de fermentació i el tipus de font de nitrit afegida. En aquest estudi es va observar que ambdós factors afectaven significativament a l'eficiència de curat (**Figura 6-17 A i B**). Les botifarres fermentades a 4 °C durant 12 hores sense l'addició de cap cultiu iniciador de la fermentació van presentar les concentracions de nitrosilhemocrom més baixes, i per tant, pitjors eficiències de curat. A més, la utilització del concentrat vegetal com a font de nitrit va afectar al procés de curat donant lloc a una disminució de l'eficiència.

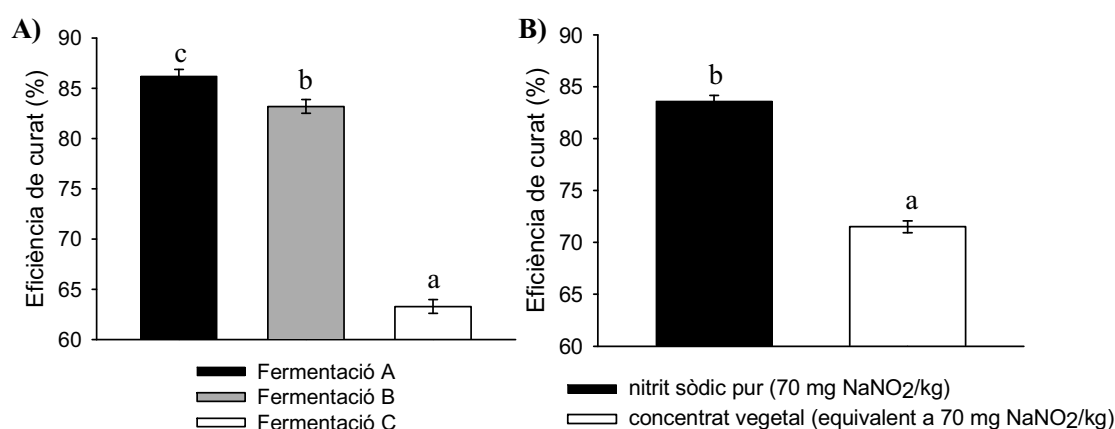


Figura 6-17. Efecte de les condicions de fermentació (A; Fermentació A: producte fermentat durant 12 hores a 16 °C i amb la presència de *Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus xylosus* i *Staphylococcus carnosus*; Fermentació B: producte fermentat durant 12 hores a 4 °C i amb la presència de *Staphylococcus carnosus*; i, Fermentació C: producte fermentat durant 12 hores a 4 °C sense cap cultiu iniciador) i de la font de nitrit utilitzada (B; nitrit de sodi pur o concentrat vegetal ric en nitrat a base d'api i pastanaga, ambdós proporcionant l'equivalent a 70 mg NaNO₂/kg) sobre l'eficiència de curat de les catalanes del tercer estudi. Els resultats presentats són les mitjanes quadràtiques provinents d'una ANOVA multifactorial (n=36).

Aquests resultats aparentment es contradiuen amb els trobats en el segon estudi realitzat, en el qual la font de nitrit no va tenir cap influència en l'eficiència de curat (**Figura 6-16 B**). No obstant, les interaccions trobades entre el tipus de fermentació i la font de nitrit utilitzada en el tercer estudi poden explicar aquestes diferències (**Figura 6-18**). Les botifarres catalanes a les quals s'hi va afegir el concentrat vegetal en combinació amb un procés de fermentació a 4 °C sense l'addició de cultius iniciadors de la fermentació presentaven valors d'eficiència molt més reduïts. Per contra, si en aquestes botifarres s'hi addicionava nitrit, no s'observaven diferències entre els tres

tipus de fermentació. Per això, quan un embotit cuit i curat s'elabora amb un concentrat vegetal ric en nitrats com a font d'agent curant, la manca d'un cultiu iniciador de la fermentació amb activitat nitrat reductasa elevada resulta en un embotit amb concentracions molt baixes de nitrosilhemocrom. Fet que demostra que *S. carnosus* juga un paper clau durant la fermentació i en la producció d'embotits curats (Casaburi et al., 2005) i, en especial, quan s'usa un concentrat vegetal ric en nitrats com a font de nitrit.

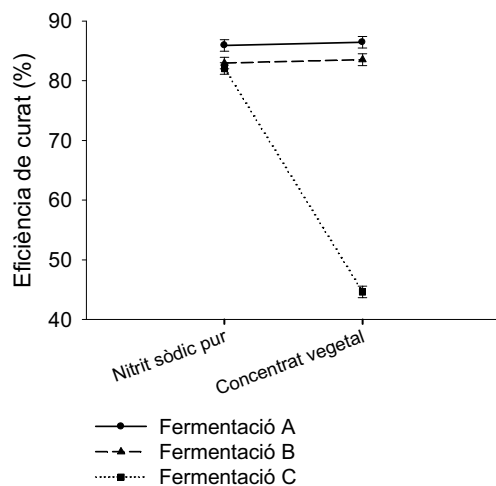


Figura 6-18. Interacció entre la font de nitrit utilitzada (nitrit de sodi pur o concentrat vegetal ric en nitrats a base d'api i pastanaga, ambdós proporcionant l'equivalent a 70 mg NaNO₂/kg) i les condicions de fermentació (Fermentació A: producte fermentat durant 12 hores a 16 °C i amb la presència de *Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus xylosus* i *Staphylococcus carnosus*; Fermentació B: producte fermentat durant 12 hores a 4 °C i amb la presència de *Staphylococcus carnosus*; i, Fermentació C: producte fermentat durant 12 hores a 4 °C sense cap cultiu iniciador) per l'eficiència de curat de la botifarra catalana del tercer estudi.

6.4. OXIDACIÓ I ESTABILITAT OXIDATIVA

El nitrit té una alta activitat antioxidant en carns curades inhibint el processos oxidatius mitjançant diferents vies (Morrissey & Tichivangana, 1985). Tot i així, l'addició de l'agent curant convencional o del concentrat vegetal ric en nitrats no va tenir repercussió en cap dels tres estudis realitzats durant el transcurs d'aquesta tesi ja que no es van observar diferències en la concentració de compostos primaris i/o secundaris d'oxidació en els embotits (**Figures 6-19 i 6-20**). Altres estudis realitzats en productes carnis curats en els quals s'havia afegit en la seva formulació un agent curant convencional, o bé, una font natural de nitrats (concentrat d'api) tampoc van observar diferències en l'oxidació lipídica (Krause et al., 2011; Sindelar et al., 2007a; Sindelar et

al., 2007c). Per tant, sembla que la utilització d'un concentrat vegetal ric en nitrats és capaç d'evitar els processos oxidatius produïts en els productes carnis curats d'igual manera que un agent curant convencional.

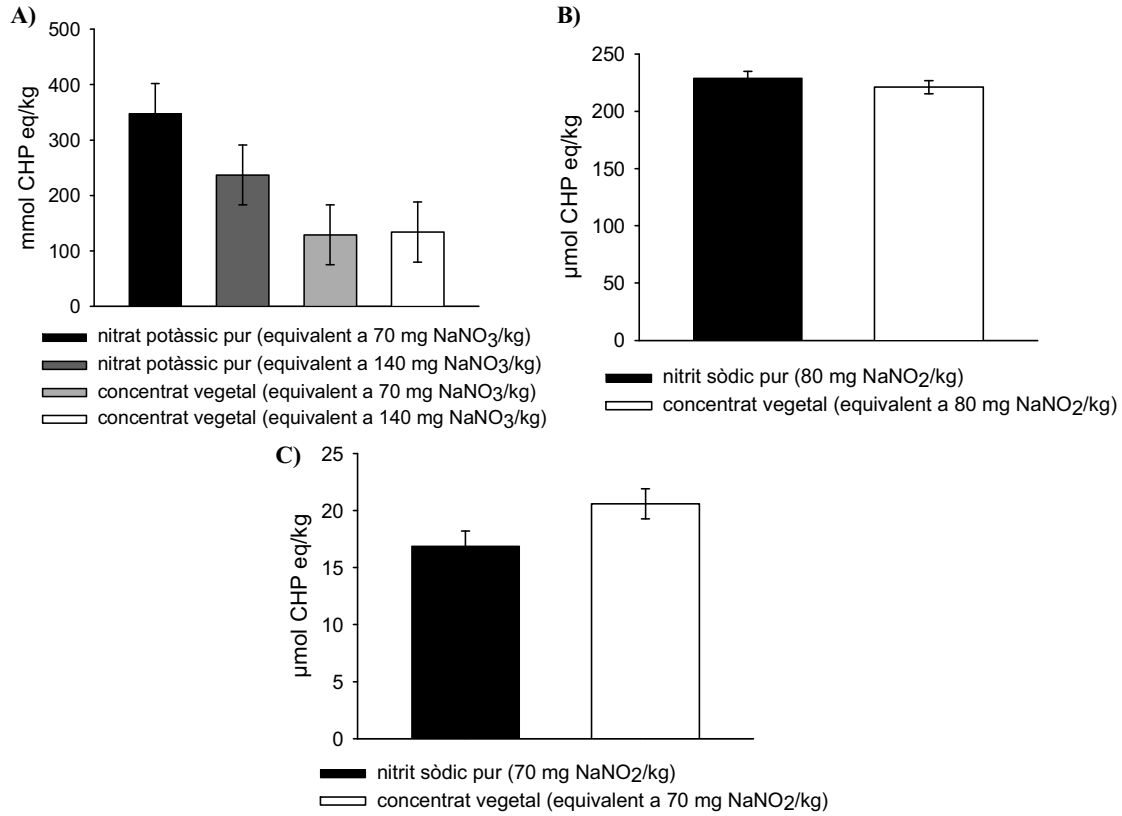


Figura 6-19. Efecte de la font de nitrat/nitrit sobre el contingut en hidroperòxids lipídics expressats com equivalents d'hidroperòxid de cumè (CHP)/kg sec en les llonganisses elaborades d'acord al primer estudi (A) i a les botifarres catalanes elaborades d'acord al segon (B) i tercer (C) estudis. Els resultats presentats són les mitjanes quadràtiques provinents d'una ANOVA multifactorial (n=64, 48 i 36, respectivament).

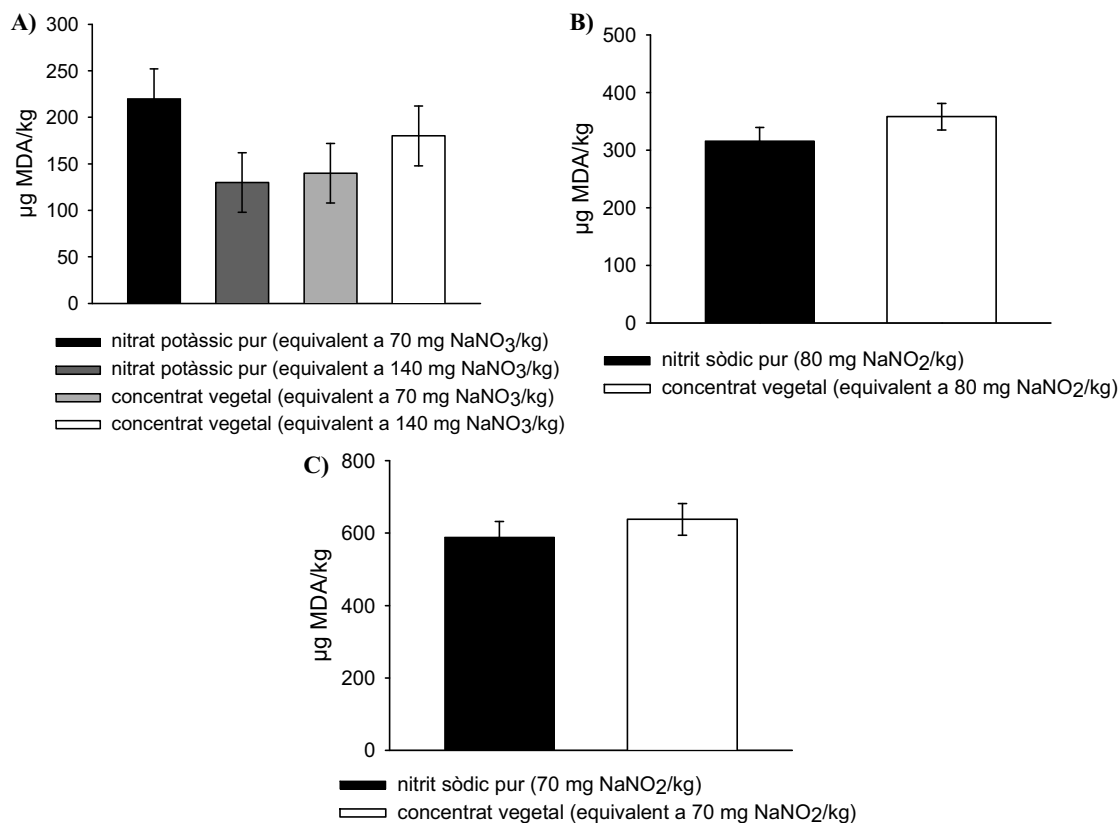


Figura 6-20. Efecte de la font de nitrat/nitrit sobre els valors obtinguts per a la prova de l'àcid tiobarbitúric (expressat com a μg de malondialdehid/kg sec) en les llonganisses elaborades d'acord al primer estudi (A) i a les botifarres catalanes elaborades d'acord al segon (B) i tercer (C) estudis. Els resultats presentats són les mitjanes quadràtiques provinents d'una ANOVA multifactorial ($n=64$, 48 i 36 , respectivament).

Caldria tenir en compte, però, que el tipus de fermentació aplicada a les botifarres, elaborades segons el tercer estudi, va tenir influència sobre la concentració d'hidroperòxids en el producte. En aquest estudi es va trobar una concentració de 14 i $15 \mu\text{mol}$ d'equivalents d'hidroperòxid de cumè/kg en les botifarres catalanes fermentades 12 hores a 16°C amb *Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus xylosus* i *Staphylococcus carnosus* i en les fermentades a 4°C amb *Staphylococcus carnosus*, respectivament. En canvi, en les botifarres catalanes fermentades 12 hores a 4°C sense cap cultiu iniciador de la fermentació es va trobar una concentració de $26 \mu\text{mol}$ d'equivalents d'hidroperòxid de cumè/kg que va ser significativament major a les concentracions trobades en les dues condicions de fermentació anteriors. Degut a què en les botifarres del segon estudi no hi va haver diferències entre el temps de fermentació, ni tampoc en la font de nitrit emprada, aquest fet només podria ser atribuïble a la manca

de cultiu iniciador de la fermentació. Aquesta manca d'activitat nitrat reductasa dóna lloc a l'acumulació de nitrat residual en el producte (comentada en el punt 6.1) i a la manca de nitrit com agent antioxidant en el producte.

Els tocoferols protegeixen a la carn i als productes carnis dels canvis oxidatius i milloren la seva estabilitat durant l'emmagatzematge (Asghar et al., 1991; Jensen, Lauridsen, & Bertelsen, 1998). Alguns autors han demostrat l'eficiència del tocoferol contra l'oxidació en productes carnis amb reduït contingut de nitrit (Dineen et al., 2000; Walsh et al., 1998). En aquests treballs el tocoferol és afegit a les dietes dels animals i per tant és incorporat a les membranes cel·lulars del teixit muscular. Aquí és on comença l'oxidació lipídica en carns, i per això l'addició de tocoferol *post-mortem* podria ser menys efectiva que l'addició de l'antioxidant en la dieta de l'animal (Jensen et al., 1998). Tot i així, l'addició de tocoferols a les masses de les llonganisses (200 mg/kg) va tenir un efecte beneficiós en la prevenció de l'oxidació del producte (**Figura 6-21**). Per tant, l'addició de l'extracte de tocoferols en la formulació dels productes va resultar en menors concentracions de compostos d'oxidació primària i secundària i en una disminució de la susceptibilitat a l'oxidació del producte acabat.

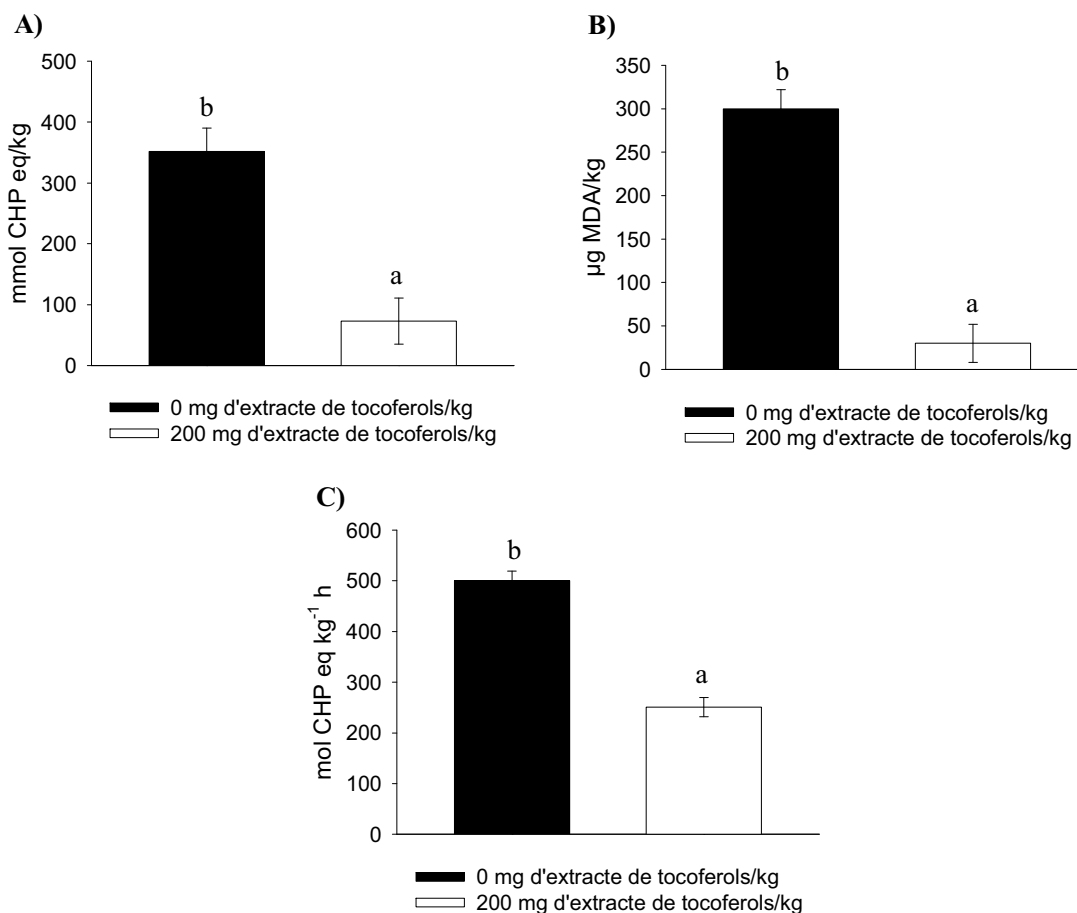


Figura 6-21. Efecte de l'addició de tocoferols (200 mg de tocoferols/kg) sobre el contingut en hidroperòxids (A; expressat com a mmol d'equivalents d'hidroperòxid de cumè/kg sec), els valors de TBA obtinguts (B; expressat com a µg de malondialdehid/kg sec) i la susceptibilitat a la oxidació (C; AUC, area sota la corba, expressat com mol d'equivalents d'hidroperòxid de cumè per hora/kg sec) de les llonganisses elaborades segons el primer estudi. Els resultats presentats són les mitjanes quadràtiques provinents d'una ANOVA multifactorial (n=64).

No obstant, en les botifarres catalanes elaborades segons el disseny experimental del tercer estudi no es van observar diferències entre aquelles que van ser formulades amb l'extracte de tocoferols (200 mg/kg) i les que no (**Figura 6-22**). Els processos de producció de productes carnis curats poden ser a vegades molt diferents. Això pot explicar que tant les botifarres catalanes elaborades d'acord al segon estudi com les del tercer, presentessin concentracions de productes primaris d'oxidació molt més baixos (de l'ordre de 1000-10000 vegades) en comparació a les llonganisses ja que aquest últim és un producte cru, que es va assecar i curar durant 48 dies en una cambra a 14 °C, mentre que la botifarra catalana és un producte curat i cuit. Per tant, els hidroperòxids que s'hagin pogut formar i que són altament reactius es podrien haver descompost

durant la llarga cocció de la botifarra catalana donada la seva termolabilitat (Bou, Codony, Tres, Decker, & Guardiola, 2008; Frankel, 1993). A més d'això, hi ha altres diferències entre els estudis que poden ser força rellevants a nivell oxidatiu com pot ser que a diferència de les botifarres catalanes les llonganisses es van llescar abans d'envasar en atmosfera modificada (80% N₂ : 20% CO₂) i emmagatzemar a 4°C fins a 45 dies. En canvi, les botifarres catalanes del segon estudi es van coure senceres fins arribar a una temperatura interna de 68 °C, després es van tallar en quatre parts de 300g, envasar al buit, pasteuritzar i emmagatzemar a 4°C fins a 180 dies; mentre que les botifarres catalanes del tercer estudi es van coure envasades al buit fins a una temperatura interna de 72 °C i seguidament es van emmagatzemar a 4°C fins a 120 dies. Per tant, en el tercer estudi la disponibilitat d'oxigen es redueix just abans de la cocció de l'embotit i segurament degut a això els tocoferols no tenen temps de manifestar clarament la seva activitat antioxidant en el producte, cosa que si poden fer durant el llarg període d'assecatge i maduració de les llonganisses. Aquesta observació està d'acord amb el fet que en aquests dos estudis es mesuren paràmetres d'oxidació que es troben clarament relacionats amb la disponibilitat d'oxigen.

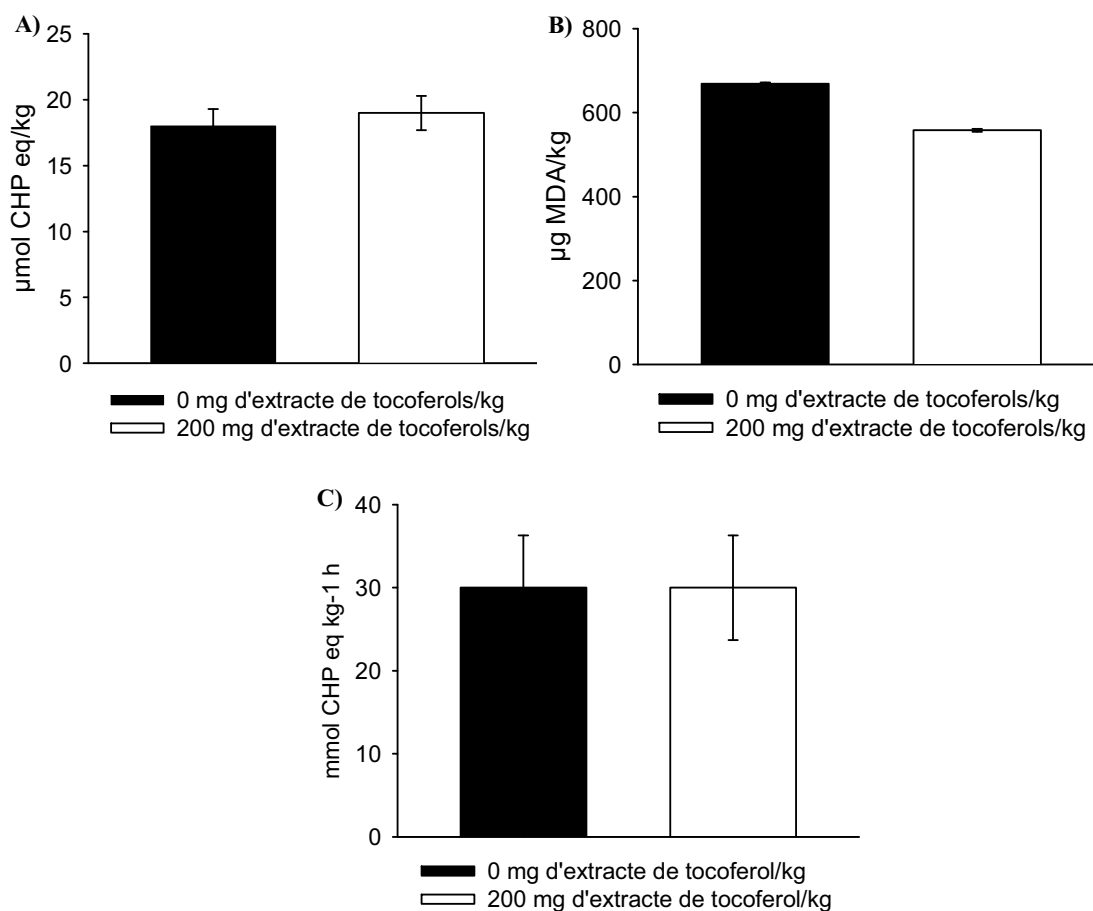


Figura 6-22. Efecte de l'addició d'un extracte de tocoferols (200 mg de tocoferols/kg) sobre el contingut en hidroperòxids (A; expressat com a μmol d'equivalents d'hidroperòxid de cumè/kg sec), els valors de TBA obtinguts (B; expressat com a μg de malondialdehid/kg sec) i la susceptibilitat a la oxidació (C; AUC, area sota la corba, expressat com mmol d'equivalents d'hidroperòxid de cumè per hora/kg sec) de les botifarres catalanes elaborades segons el tercer estudi. Els resultats presentats són les mitjanes quadràtiques provinents d'una ANOVA multifactorial ($n=36$, 36 i 12, respectivament).

D'altra banda, les botifarres catalanes elaborades d'acord al tercer estudi presentaven valors de TBA més elevats que els trobats a les llonganisses. Això podria ser atribuïble a diferències en l'estat oxidatiu de la carn de partida i al procés de cuinat, ja que quan més elevat és el tractament tèrmic més s'acceleren els processos oxidatius i la descomposició de peròxids en compostos d'oxidació secundària (Ladikos & Lougovois, 1990). D'altra banda, l'efectivitat d'un antioxidant depèn de la temperatura i, normalment, un mateix antioxidant és més efectiu a baixes temperatures (Frankel, 1993). Haak i els seus col·laboradors (2006; 2008) van observar que la fortificació de les dietes amb acetat de α -tocoferol protegia la carn crua en contra de l'oxidació durant

l'emmagatzematge però no aquella carn que havia passat per un procés de cocció. Així doncs, probablement el major increment de l'índex de TBA en les botifarres catalanes es dona durant el cuinat mentre que durant l'emmagatzematge l'augment és menor. Per tant, podria ser que l'addició d'un extracte de tocoferols en aquest tipus de producte no fos una bona solució donat el seu processat i en les condicions d'emmagatzematge estudiades.

Les diferències entre els processos de fabricació i l'efecte que aquestes poden tenir sobre l'oxidació també es poden veure en productes del mateix tipus. El segon i tercer estudis són el mateix tipus de producte, curat i cuit, malgrat això els productes primaris i secundaris d'oxidació van presentar diferències (**Figures 6-19 i 6-20**). Les botifarres catalanes elaborades segons el segon estudi es van coure senceres en una marmita i no es varen envasar al buit fins al dia següent, que es van pasteuritzar. En canvi, les botifarres catalanes del tercer estudi es van envasar al buit just després de la fermentació i posteriorment es van coure dins una marmita senceres. L'exposició a l'oxigen augmenta l'oxidació primària i pot conduir a concentracions superiors d'hidroperòxids (Kim & Min, 2008), podria ser per aquest motiu que les botifarres catalanes del segon estudi que no van estar envasades al buit durant la cocció tinguin una concentració superior en productes d'oxidació primària.

D'altra banda, els hidroperòxids lipídics són termolàbils i es descomponen en major proporció quan més alta és la temperatura o bé quant més temps roman el producte a una temperatura elevada, conduint a una formació major de productes secundaris d'oxidació (Kingston, Monahan, Buckley, & Lynch, 1998). Aquesta podria ser la causa per la qual les botifarres catalanes realitzades d'acord al tercer estudi presentessin una concentració més elevada de malondialdehid que les botifarres catalanes del segon estudi. Les botifarres catalanes del tercer estudi es van pasteuritzar directament durant la cocció del producte, i per això la temperatura de l'aigua de cocció va ser més elevada (78°C) i la temperatura interna del producte també (72°C), per la qual cosa es va necessitar un període més llarg de cocció que podria afavorir la descomposició dels hidroperòxids i augmentar els valors obtinguts a la prova de TBA.

A més de les diferències degudes al processat, l'oxidació lipídica de les carns i productes carnis depèn del balanç entre els factors anti- i prooxidants i de la concentració de substrats de la reacció (oxigen i lípids). En aquest sentit, les botifarres

catalanes del tercer estudi tenien una concentració basal de tocoferols menor (10,3 mg/kg sec front a 11,8 mg/kg sec en les botifarres catalanes del segon estudi), i degut al disseny experimental també presentaven una concentració menor de nitrts (70 mg/kg front a 80 mg/kg). Complementàriament, els resultats de la determinació del greix total i la composició en àcids grassos mostren com les catalanes elaborades segons el tercer estudi presentaven una quantitat lleugerament superior de lípids insaturats, però pràcticament idèntica de lípids poliinsaturats. Les botifarres catalanes del segon estudi contenien aproximadament un 10,3% de greix, del qual un 48,9% eren àcids grassos monoinsaturats i un 15,8% poliinsaturats. En canvi, les botifarres catalanes del tercer estudi contenien una quantitat de greix total al voltant del 13,1%, del qual 49,4% eren àcids grassos monoinsaturats i 12,1% àcids grassos poliinsaturats. Aquests tres factors també podrien haver influït en el fet que les botifarres catalanes del tercer estudi presentessin valors en la prova de TBA superiors a les de la segona prova.

Quant a l'emmagatzematge, la durada i les condicions en què tenim el producte són factors determinants per al grau de desenvolupament de l'oxidació en aquest i els possibles efectes en el seu deteriorament (Ladikos & Lougovois, 1990). En les llonganisses elaborades, la concentració de compostos primaris i secundaris d'oxidació van augmentar després de 45 dies d'emmagatzematge (**Figura 6-23**). Per tant, el temps d'emmagatzematge en les condicions estudiades pot ser un factor determinant en la qualitat del producte ja que aquest es pot enrancir en el temps i necessitar protecció contra la oxidació. Tot i així, les concentracions de malondialdehid obtingudes en aquest estudi eren força més baixes que els límits proposats per Tarladgis i els seus col·laboradors (1960) per establir olor o flavor a ranci en productes carnis provinents del porc.

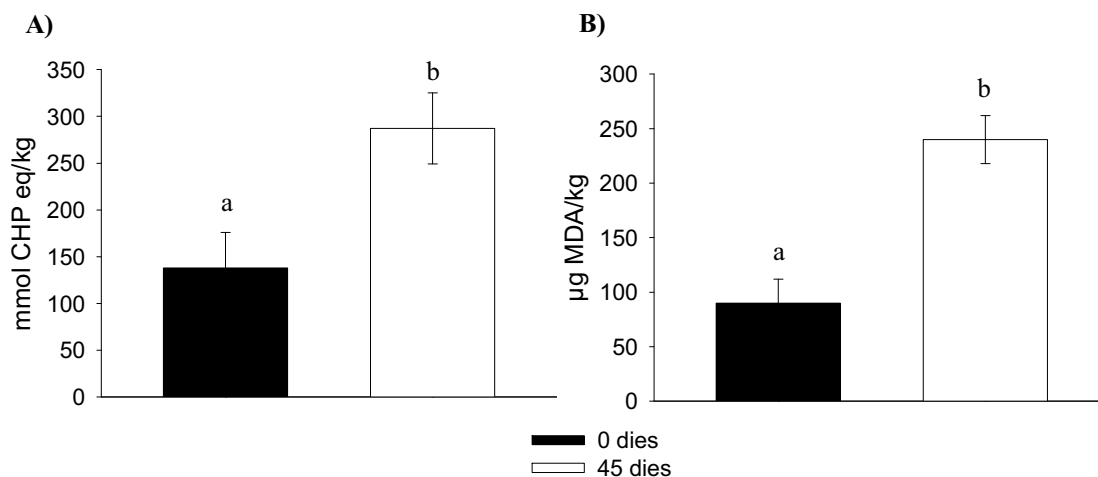


Figura 6-23. Efecte del temps d'emmagatzematge a 4 °C sobre el contingut en hidroperòxids lipídics (A) expressats com a mmol d'equivalents d'hidroperòxid de cumè (CHP) per kg pes sec i els valors de la prova de l'àcid tiobarbitúric (B) expressats com µg d'equivalents de malondialdehid per kg pes sec en les llonganisses del primer estudi llescades i envasades en atmosfera modificada (80% N₂: 20% CO₂). Els resultats presentats són les mitjanes quadràtiques provinents d'una ANOVA multifactorial (n=64).

Per altra banda, en les botifarres catalanes del segon estudi experimental es va observar que la concentració de compostos primaris d'oxidació no va augmentar amb el temps, sinó que va disminuir (**Figura 6-24**). Aquesta disminució en el temps podria explicar-se per la baixa quantitat d'oxigen que, degut a les condicions de conservació, pot disposar el producte durant tot l'emmagatzematge. Malgrat això, es va observar un augment dels valors de TBA al llarg del temps d'emmagatzematge fet que suggereix que la baixa disponibilitat d'oxigen disminueix la formació de nous hidroperòxids però no la seva descomposició.

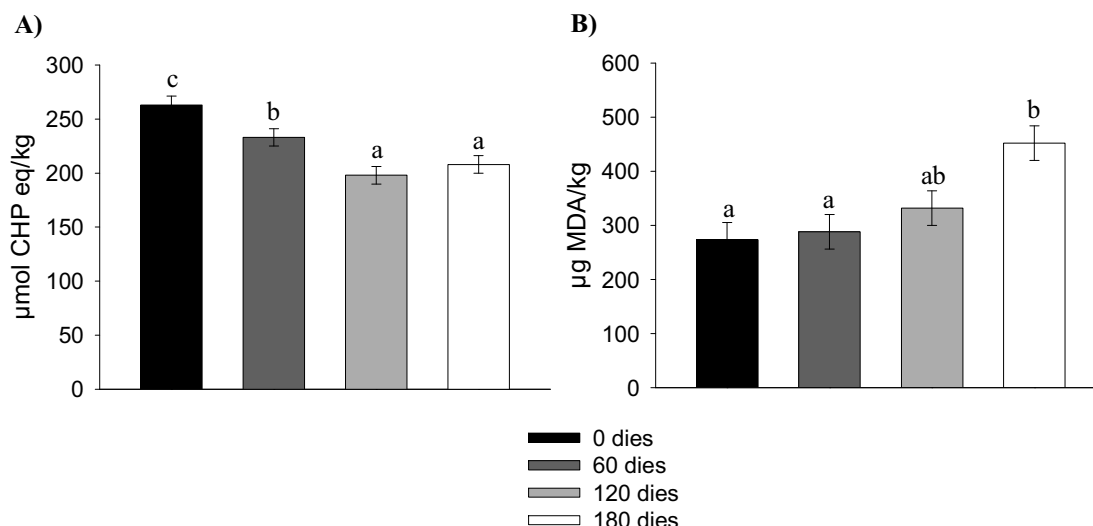


Figura 6-24. Efecte del temps d'emmagatzematge (a 4 °C) sobre el contingut en hidroperòxids lipídics (A) expressats com a μmol d'equivalents d'hidroperòxid de cumè (CHP) per kg pes sec i els valors de la prova de l'àcid tiobarbitúric (B) expressats com μg d'equivalents de malondialdehid per kg pes sec en les botifarres catalanes del segon estudi envasades al buit. Els resultats presentats són les mitjanes quadràtiques provinents d'una ANOVA multifactorial (n=48).

En aquest sentit, en el darrer estudi amb botifarres catalanes es va poder observar un contingut molt baix en hidroperòxids lipídics, però en aquest cas es va produir un augment en els compostos d'oxidació primària en el transcurs de l'emmagatzematge (**Figura 6-25**). Per tant, també semblaria raonable l'ús d'antioxidants en productes carnis curats i cuits si hi ha risc d'enranciment, tot i que en les condicions que hem assajat durant la vida comercial donada als productes d'aquest tipus els nivells d'oxidació trobats van ser baixos fins i tot quan no es van afegir tocoferols.

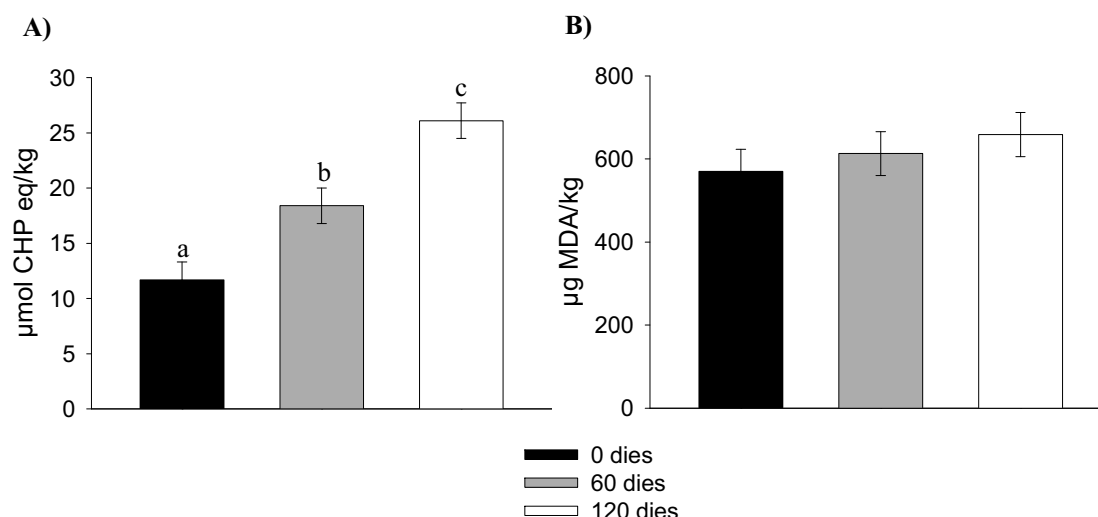


Figura 6-25. Efecte del temps d'emmagatzematge (a 4°C) sobre el contingut en hidroperòxids lipídics (A) expressats com a μmol d'equivalents d'hidroperòxid de cumè i els valors de la prova de l'àcid tiobarbitúric (B) expressats com μg d'equivalents de malondialdehid per kg pes sec en les botifarres catalanes del tercer estudi envasades al buit. Els resultats presentats són les mitjanes quadràtiques provinents d'una ANOVA multifactorial (n=36).

6.5. CARACTERÍSTIQUES SENSORIALS

L'acceptabilitat dels productes carnis elaborats en els tres estudis va ser avaluada mitjançant una prova sensorial amb escala hedònica. En el cas de les llonganisses, els consumidors que es van sotmetre a la prova no van mostrar preferència per cap llonganissa elaborada, posant de manifest que tant els agradava una llonganissa elaborada de forma convencional com una elaborada amb una font natural de nitrats. A Catalunya, hi ha una gran quantitat de productors d'embotits assecats, fermentats i curats, donant lloc a una gran varietat de productes amb diferent sabor i diversa tonalitat de vermells. Donada aquesta diversitat, aquest podria ser el motiu pel qual els consumidors d'aquests productes no mostressin preferència per cap mostra ja que possiblement els tastadors tinguin gustos i preferències diferents.

Contràriament, en el segon estudi els consumidors que formaven el panell de tastadors van mostrar preferència per les botifarres catalanes elaborades amb el concentrat vegetal ric en nitrats a base d'api i pastanaga usat al 0.33% (**Figura 6-26 A**). Sindelar i col·laboradors (2007a) van observar en un estudi amb pernil cuit elaborat amb un extracte d'api ric en nitrats que un panell de tastadors entrenat era capaç de detectar l'aroma vegetal quan aquest extracte d'api s'afegia a concentracions superiors de 0,3%.

De forma tradicional, la botifarra catalana es cou en un brou de carn que pot contenir una certa proporció de verdures, entre elles l'api. Com que el panell de tastadors estava format per consumidors habituals d'aquest tipus de producte, el flavor proporcionat pel concentrat podria ser responsable de la preferència per les botifarres en què s'hi havia afegit el concentrat vegetal ric en nitrats.

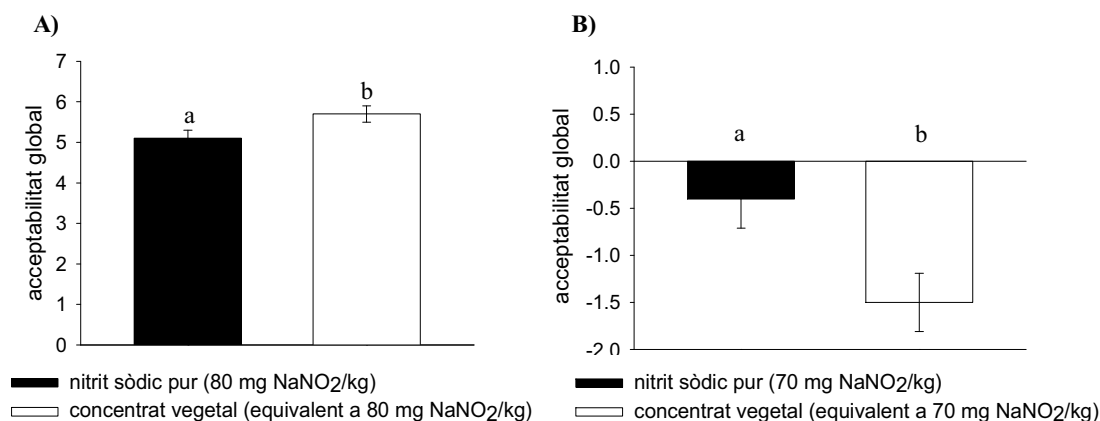


Figura 6-26. Efecte de la font de nitrit (nitrit de sodi pur o concentrat vegetal a base d'api i pastanaga) sobre l'acceptabilitat global de les catalanes elaborades segons el segon (A) i tercer (B) estudis. Els resultats presentats són les mitjanes quadràtiques provinents d'una ANOVA multifactorial (n=204 i 180, respectivament). L'acceptabilitat global del segon estudi (A) es va avaluar mitjançant els valors absoluts obtinguts dels tastadors. L'acceptabilitat global del tercer estudi (B) es va avaluar mitjançant la diferència entre la puntuació de la botifarra catalana control i la puntuació que cada tastador li donava a les mostres.

D'altra banda, en el tercer estudi, les botifarres que contenien concentrat vegetal com a font natural de nitrit van ser valorades més negativament que les que havien estat curades amb nitrit sòdic (**Figura 6-26 B**). En aquest cas, però, això es pot explicar per la manca de vermellor i saturació de color que presentaven alguns tractaments degut a la falta de *S. carnosus* en la massa càrnia (**Figura 6-11**). El color influeix la decisió dels consumidors més que qualsevol altre factor de qualitat, ja que la pèrdua de color en carns s'usa com a indicador de frescor (Mancini & Hunt, 2005). Aquests resultats i els obtinguts en les llonganisses (**Figura 6-10**) fan palès que l'ús de bacteris iniciadors de la fermentació amb activitat nitrat reductasa (*S. carnosus*) és crucial per al desenvolupament del color i, per tant, per a l'acceptabilitat del producte, sobretot si s'usen fonts naturals riques en nitrat.

En general, els resultats indiquen que els consumidors acceptarien un producte carni produït amb un concentrat vegetal ric en nitrat, sempre i quan s'afegeixi un bacteri amb activitat nitrat reductasa per a la correcta formació de color fet que coincideix amb estudis similars (Terns et al., 2011a; Tsoukalas et al., 2011). Tot i que el paladar humà pugui detectar la presència del concentrat vegetal (Sindelar et al., 2007a; Tsoukalas et al., 2011), sembla que aquest sabor no tingui una importància determinant en l'acceptabilitat del producte, sent més important aconseguir un color adequat per aquest.

6.6. UTILITZACIÓ D'ANTIMICROBIANS

La reducció de la quantitat de nitrat o nitrit afegida a la formulació dels productes o qualsevol mesura que afecti a la disponibilitat del nitrit en el producte podria incrementar el risc de botulisme (Sebranek & Bacus, 2007). Per tant, la progressiva disminució de la quantitat d'agents curants afegits a les masses càrnies pot fer que es requereixi l'ús d'altres mesures protectores per tal d'aconseguir un nivell de seguretat adequat d'aquests productes carnis curats contra patògens i bacteris del deteriorament i, en conseqüència, allargar-los la vida útil.

La combinació de diferents mètodes antimicrobians, ja siguin en forma d'ingredient o condicions de processat, pot ser efectiva per inhibir patògens i minimitzar la pèrdua de qualitat al producte (Sebranek et al., 2012). Així doncs, en l'últim estudi d'aquesta tesi es van provar tres antimicrobians diferents en carn picada de porc amb diferents proporcions de greix. Un dels antimicrobians és qualificat per usar en productes ecològics (lactat de sodi) mentre que els altres dos (l'éster d'etil de l'arginat làuric i el metilparabè) no estan permesos. El metilparabè és un antimicrobià de síntesi força eficaç, l'ús del qual està restringit a alguns productes carnis, com per exemple a la superfície d'embotits secs i curats per evitar el creixement de fongs i llevats (BOE número 44, 2002). L'éster d'etil de l'arginat làuric és un antimicrobià novell que podria representar una bona alternativa com antimicrobià en certs tipus de productes. Tots tres presenten diferent hidrosolubilitat i per tant la seva eficiència pot estar supeditada als diferents continguts de greix dels productes carnis en què s'afegeixen.

L'estudi amb metilparabè va mostrar com aquest antimicrobià va ser capaç d'inhibir la proliferació de microorganismes mesòfils i va ser altament eficaç contra els bacteris coliforms. D'altra banda, les concentracions de metilparabè usades (0,1%, 0,5%, 1% i 2%) no van ser suficients per disminuir el creixement de bacteris productors d'àcid

làctic en una proporció major al 50% (**Figura 6-27**). Per tant, es podria utilitzar aquest antimicrobià en productes carnis elaborats a fi d'evitar el creixement de microorganismes indesitjables. També sembla possible la seva utilització durant la fermentació doncs els microorganismes productors de l'àcid làctic són els menys afectats.

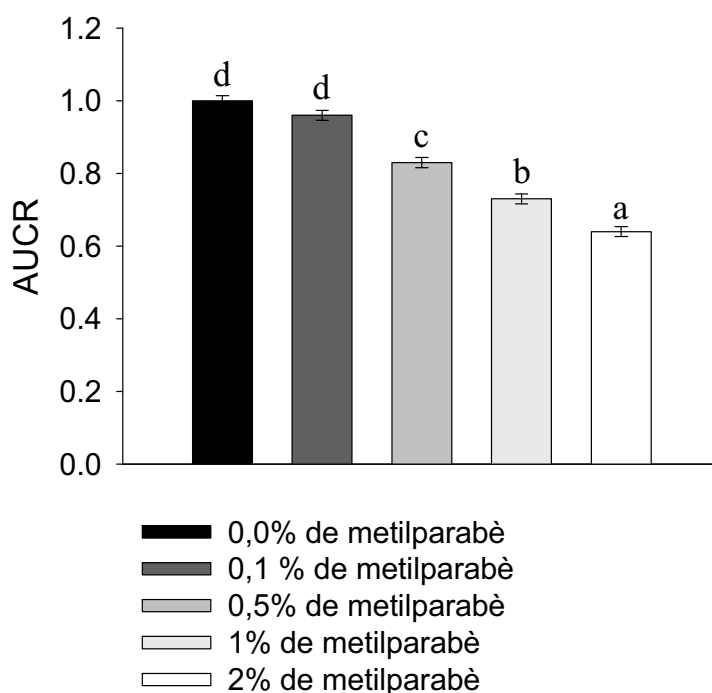


Figura 6-27. Efecte antimicrobià de les concentracions usades de metilparabè (0%; 0,1%; 0,5%; 1,0%, i 2,0%) sobre el creixement de bacteris productors d'àcid làctic en carn de porc picada.

AUCR és la relació entre l'àrea sota la corba (AUC) del creixement de bacteris en la carn control (sense cap antimicrobià) i els diferents tractaments ($AUCR = AUC \text{ tractament} / AUC \text{ control}$). Els resultats presentats són les mitjanes quadràtiques provinents d'una ANOVA multifactorial ($n=30$).

En la carn de porc picada, la inhibició del creixement microbià a causa de l'addició del lactat de sodi va ser elevada, superant el 50% d'inhibició de creixement en la dosi més baixa utilitzada (2%) (**Figura 6-28**). Aquests resultats estan d'acord amb altres autors que demostren que el lactat de sodi és un antimicrobià eficaç contra bacteris mesòfils (Barmpalia et al., 2004; Mbandi & Shelef, 2001; Mbandi & Shelef, 2002), bacteris coliforms (Hwang & Juneja, 2011; Miller & Acuff, 1994; Shelef & Potluri, 1995) i bacteris productors d'àcid làctic (Cegielska-Radziejewska & Pikul, 2004) quan aquest és afegit en diversos productes carnis. Xi i els seus col·laboradors (2011) van demostrar

com l'addició de lactat de sodi podia inhibir totalment el creixement de *L. monocytogenes* en carns curades amb 200 ppm de nitrit afegit durant tot el període d'emmagatzematge (12 dies a 10 °C). En aquest estudi, el nitrit afegit a 200 ppm de concentració va endarrerir el creixement del bacteri però no el va inhibir totalment. En canvi, quan s'afegia al sistema carni 2% o 4,8% de lactat de sodi, el creixement de *L. monocytogenes* quedava totalment inhibit. D'altra banda, un estudi (Sullivan et al., 2012) realitzat per comparar el creixement de *L. monocytogenes* en productes curats de forma tradicional i en d'altres curats amb un concentrat vegetal va observar que aquelles salsitxes de Frankfurt que incloïen concentrat vegetal per a la curació del producte i alhora contenien lactat de sodi, tenien un creixement menor de *L. monocytogenes* durant tot el període d'emmagatzematge que aquelles que no en contenien. Per tant, l'addició de lactat sòdic podria ajudar a aturar el creixement microbià en productes carnis de producció ecològica com poden ser els productes curats amb concentrats vegetals rics en nitrat.

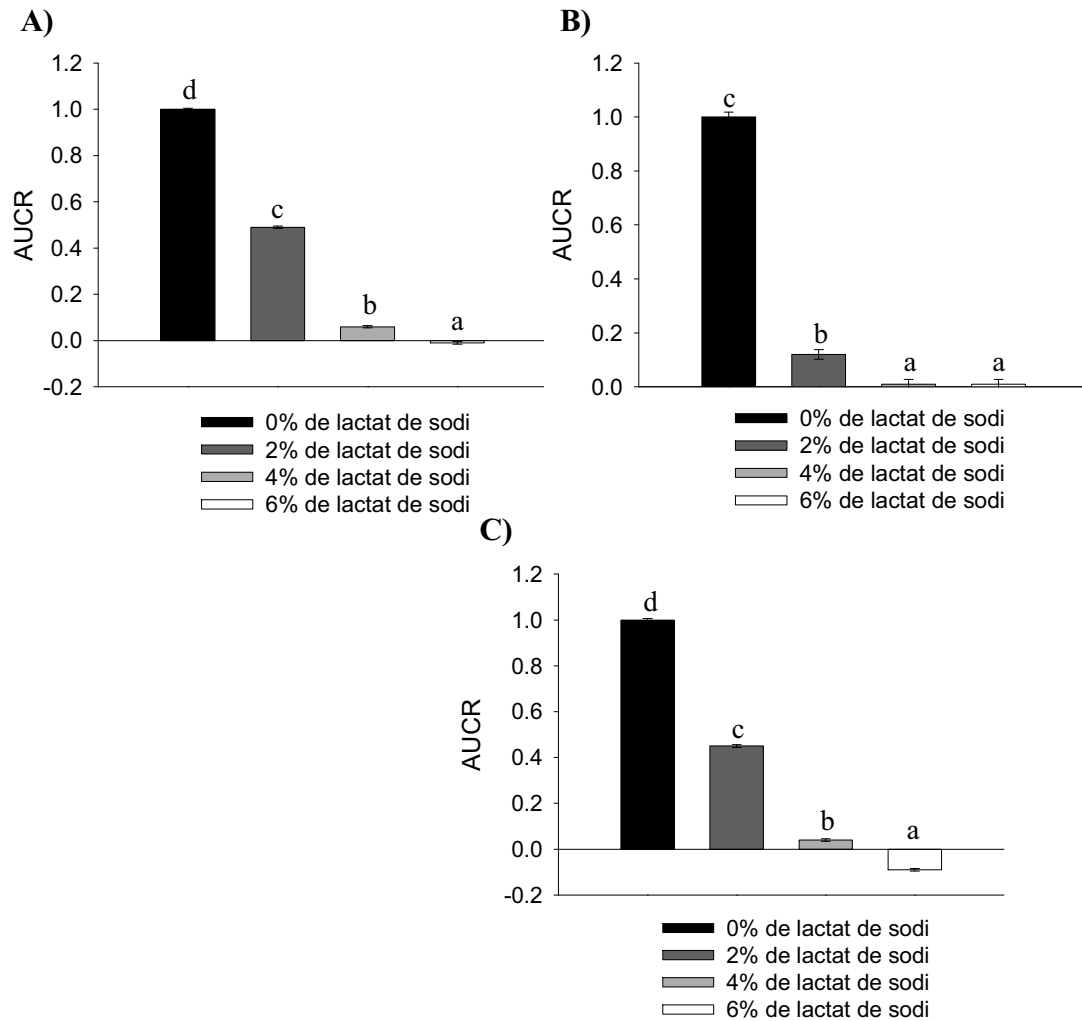


Figura 6-28. Efecte antimicrobià de les concentracions usades de lactat de sodi (0%; 2%; 4%, i 6%) sobre el creixement de bacteris aerobis mesòfils totals (A), bacteris coliforms (B) i bacteris productors d'àcid làctic (C) en carn de porc picada. AUCR és la relació entre l'àrea sota la corba (AUC) del creixement de bacteris en la carn control (sense cap antimicrobià) i els diferents tractaments (AUCR= AUC tractament/AUC control). Els resultats presentats són les mitjanes quadràtiques provinents d'una ANOVA multifactorial (n=48, 48 i 24, respectivament).

Finalment l'èster d'etil de l'arginat làuric va mostrar activitat antimicrobiana contra els bacteris mesòfils, els coliforms i els productors d'àcid làctic (**Figura 6-29**). Tot i així, les concentracions emprades en aquest estudi van ser superiors a les emprades per altres grups de recerca on l'èster d'etil de l'arginat làuric va ser usat només en la superfície del producte per a prevenir la recontaminació d'aquest amb *L. monocytogenes* (Luchansky et al., 2005; Martin et al., 2009; Porto-Fett et al., 2010; Stopforth, Visser, Zumbrink, van Dijk, & Bontenbal, 2010; Taormina & Dorsa, 2009). Els resultats també mostren que aquest antimicrobià és molt eficient per reduir el nombre de bacteris en el producte

immediatament després de la seva adició (**Figura 6-30**), efecte que també ha estat observat per altres investigadors (Luchansky et al., 2005; Martin et al., 2009; Porto-Fett et al., 2010; Stopforth et al., 2010; Taormina & Dorsa, 2009). D'aquesta manera, per intentar perllongar la vida útil del producte seria necessari combinar l'addició d'aquest amb un altre antimicrobià per mantenir el baix nombre de microorganismes al llarg del temps (Sebranek et al., 2012). Per tant, l'éster d'etil de l'arginat làuric podria ser afegit al producte just després de l'elaboració per evitar la proliferació de microorganismes provinents d'una recontaminació i, en combinació amb un altre antimicrobià, allargar la seva vida útil.

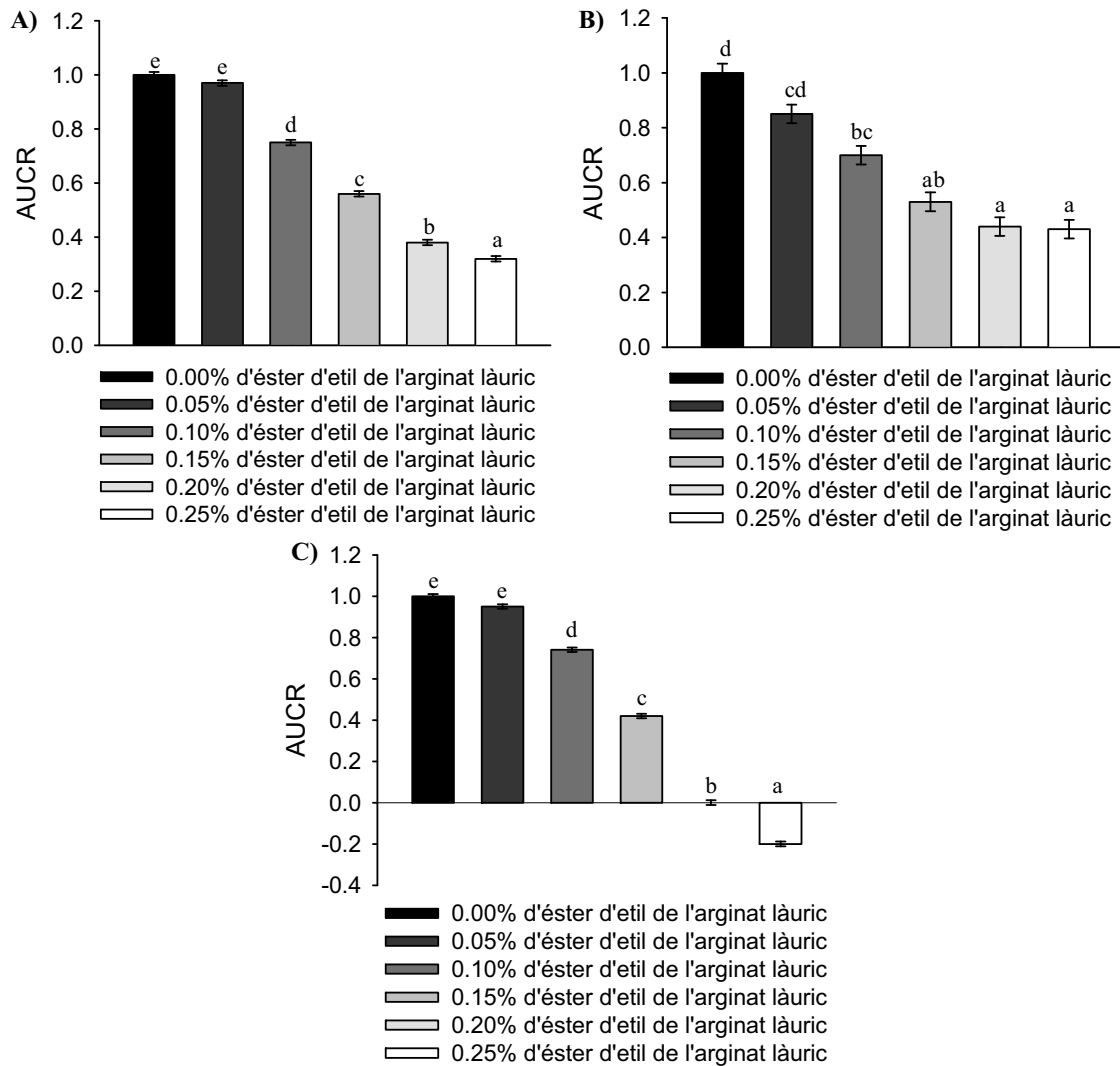


Figura 6-29. Efecte antimicrobià de les concentracions usades d'èster d'etil de l'arginat làuric (0,00%; 0,05%; 0,10%; 0,15%; 0,20%, i 0,25%) sobre el creixement de bacteris aerobis mesòfils totals (A), bacteris coliforms (B) i bacteris productors d'àcid làctic (C) en carn de porc picada. AUCR és la relació entre l'àrea sota la corba (AUC) del creixement de bacteris en la carn control (sense cap antimicrobià) i els diferents tractaments (AUCR= AUC tractament/AUC control). Els resultats presentats són les mitjanes quadràtiques provinents d'una ANOVA multifactorial (n=72, 72 i 36, respectivament).

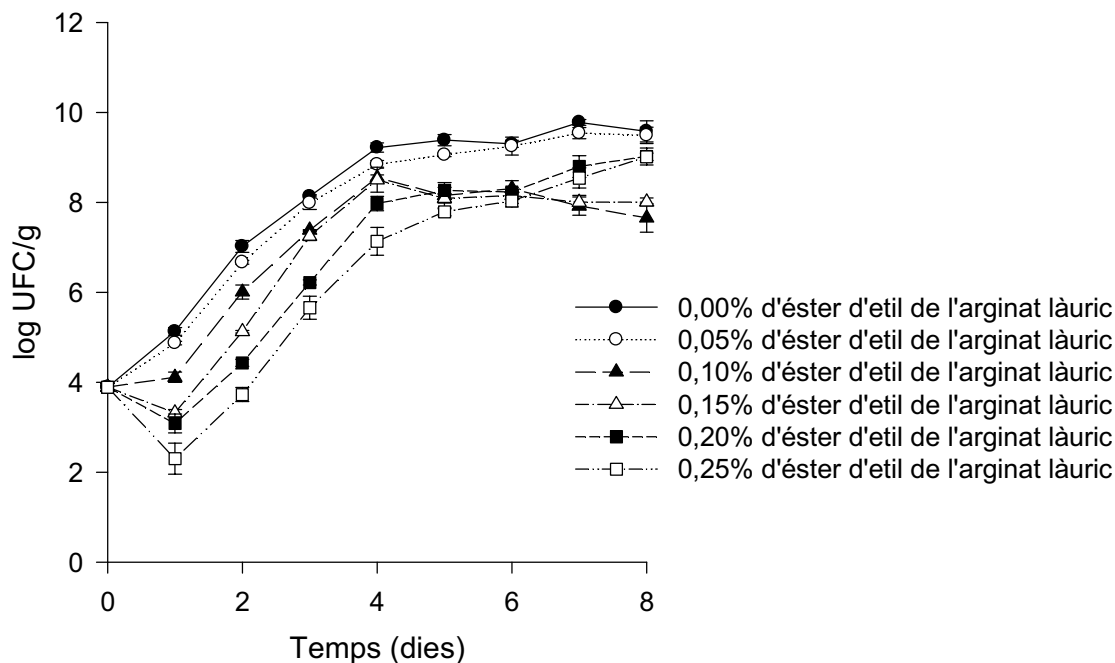


Figura 6-30. Mitjana de la població dels bacteris aerobis mesòfils a la carn de porc picada amb 0% de greix, tractada amb éster d'etil de l'arginat làuric a diferents concentracions (0,00%; 0,05%; 0,10%; 0,15%; 0,20%, i 0,25%), envasada en atmosfera modificada (70% O₂ : 30% CO₂) a 12 °C durant 8 dies.

Paral·lelament a l'efecte antimicrobià d'aquestes substàncies, també es va avaluar com aquest es veia afectat per la quantitat de greix afegida al producte i la relació que hi podia haver amb la hidrofobicitat dels antimicrobians usats. D'acord als resultats obtinguts (**Figura 6-31**) sembla que el greix per si sol aplicat a una proporció màxima de 50% no tindria efecte antimicrobià en la microbiota natural de la carn picada. Tot i així, altres investigadors han obtingut resultats diferents (Hu & Shelef, 1996; Sullivan et al., 2012). Sullivan i col·laboradors (2012) van observar com salsitxes de Frankfurt que contenien menys quantitat de greix en la seva formulació tenien creixements majors de *C. perfringens*. Aquest fet es va relacionar amb l'augment de l'activitat de l'aigua i el contingut de proteïnes, factors que poden propiciar el creixement microbià. Un comportament similar va ser observat també per *L. monocytogenes* en sistemes carnis curats convencionalment (Hu & Shelef, 1996). En aquest estudi, les altes concentracions de greix (45%) als productes van causar menors creixements al final del període d'emmagatzematge, atribuït a un increment de les sals solubles en aigua a la fase aquosa de l'aliment. A part del possible efecte barrera del greix, aquest també podria interaccionar amb l'activitat dels antimicrobians, ja que en el nostre estudi es van

trobar nombroses interaccions entre el tipus d'antimicrobià, la concentració usada d'aquest i la quantitat de greix afegit al producte. En conjunt aquestes interaccions suggereixen que l'éster d'etil de l'arginat làuric i el metilparabé aplicats a altes concentracions conjuntament amb altes quantitats de greix en la carn són més eficaços. Per tant, la quantitat de greix afegida pot tenir un efecte sobre el creixement dels microorganismes i afectar a l'activitat antimicrobiana del compost addicionat.

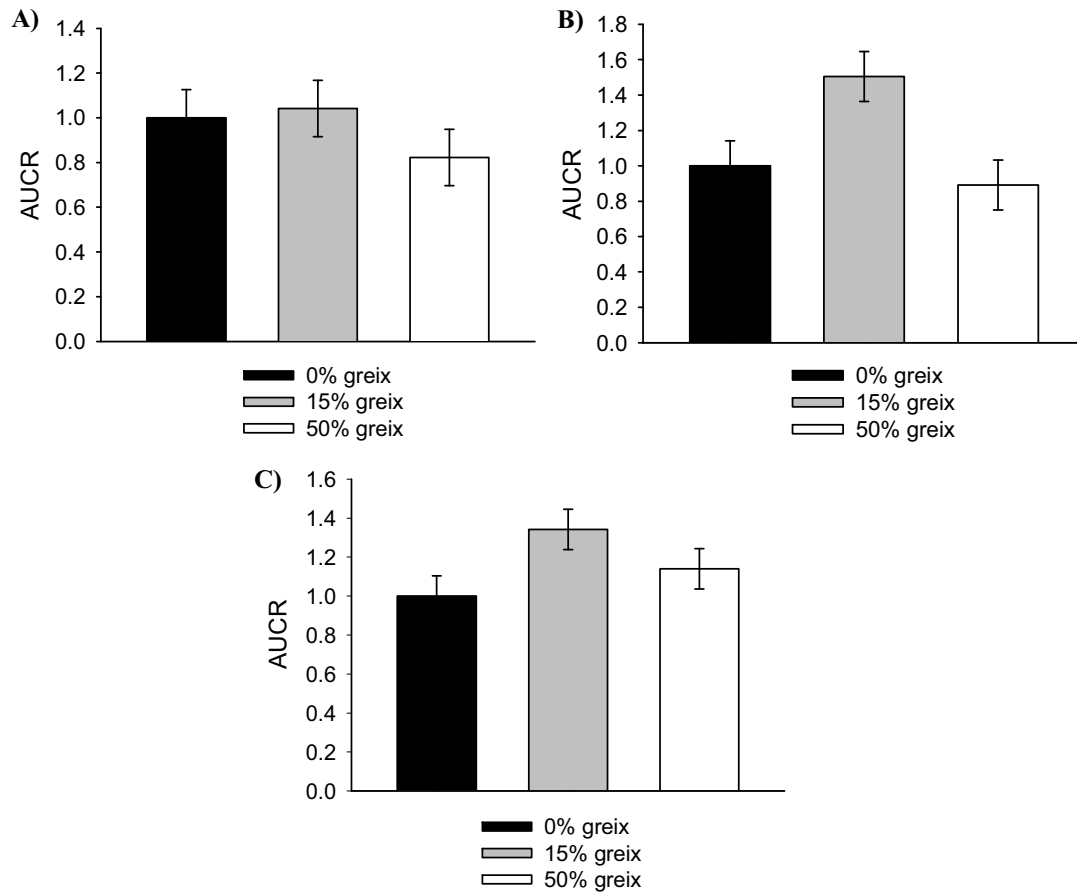


Figura 6-31. Efecte del greix (0, 15 i 50%) sobre el creixement de microorganismes aerobis mesòfils (A), bacteris coliforms (B) i bacteris productors d'àcid làctic (C) a la carn de porc picada. El valor de AUCR és el resultat de la divisió de les àrees sota la corba de la carn picada amb 0, 15 i 50% de greix entre la d'aquella corresponent al 0% de greix, dels tractaments del disseny experimental que no contenen antimicrobià. Els resultats provenen de la prova no paramètrica de Kruskal-wallis.

7.CONCLUSIONS

Les conclusions despreses d'aquesta tesi doctoral són les següents.

- Quant a l'addició de nitrats i nitrits en productes carnis curats ecològics restringida segons normativa a 80 mg NaNO₃ o NaNO₂/kg:

- En un embotit cru i curat l'addició de 70 mg de NaNO₃/kg dóna lloc a una menor quantitat de nitrat residual mentre que les quantitats de nitrit residuals no presenten diferències entre les dues concentracions assajades (70 o 140 mg de NaNO₃/kg).
- El color vermell, l'estabilitat oxidativa i el grau d'acceptació d'un embotit cru i curat no són significativament diferents quan s'afegeixen 70 o 140 mg de NaNO₃/kg.
- En general, les concentracions de nitrats i nitrits permeses en productes carnis crus i cuits de procedència ecològica donen lloc a productes amb un curat i unes característiques sensorials acceptades pels consumidors.

- Quant a la substitució dels additius E249 (nitrit de potassi), E250 (nitrit de sodi), E251 (nitrat de sodi) i E252 (nitrat de potassi) per fonts alternatives naturals riques en nitrats:

- La utilització de concentrats vegetals rics en nitrats, combinada amb cultius amb activitat nitrat reductasa de forma convenient, no influeix en la quantitat residual de nitrats i nitrits dels embotits curats amb aquestes fonts. A més, aquests concentrats eviten els processos oxidatius que es poden produir en els productes carnis curats igual com ho fan els additius.
- La inclusió d'un concentrat vegetal ric en nitrats a un producte carni curat en substitució de les fonts de nitrats i nitrits convencionals és ben acceptada per part del consumidor. No obstant, si aquests concentrats vegetals s'utilitzen com a font de nitrit, per exemple en productes on només l'addició de nitrit és permesa, cal utilitzar un cultiu iniciador de la fermentació amb activitat nitrat reductasa per reduir el nitrat a nitrit a fi d'aconseguir un color i una acceptabilitat comparables i adequats

- La determinació instrumental del color mostra que els concentrats vegetals rics en nitrats poden proporcionar un color groc més elevat i una brillantor major al producte carni curat. Malgrat això, aquest canvi de color no té efecte en l'acceptabilitat del producte.
- Quant a la inclusió d'un cultiu iniciador de la fermentació amb activitat nitrat reductasa i l'establiment de les condicions de fermentació:
- L'addició de cultius iniciadors de la fermentació amb activitat nitrat reductasa és necessària en productes carnis curats elaborats amb nitrats a fi de reduir els nitrats a nitrits i que aquests últims estiguin disponibles per al curat i per a les altres funcions del nitrit.
 - L'addició de cultius iniciadors de la fermentació d'elevada activitat nitrat reductasa (*S. carnosus*) provoca la reducció de la majoria del nitrat afegit per a la preparació de l'embotit curat. En conseqüència, els nitrats residuals del producte carni queden molt per sota dels límits establerts per a productes ecològics (50 mg NaNO₃/kg) i el producte carni curat presenta tonalitats vermelloses més elevades.
 - El temps i la temperatura de fermentació dels cultius iniciadors d'elevada activitat nitrat reductasa (*S. carnosus*) influencien els paràmetres de qualitat dels embotits cuits i curats amb un concentrat vegetal ric en nitrats. Quan la temperatura de fermentació és de 16 °C i en presència de bacteris productors de l'àcid làctic, es necessiten com a mínim 12 hores per tal d'aconseguir una eficiència de curat adequada per al producte. Tot i així, a temperatures de refrigeració (4 °C) i sense un bacteri productor d'àcid làctic, l'eficiència de curat pot ser també acceptable (≥80%).
- Quant a la influència de l'emmagatzematge (4 °C) en els paràmetres de qualitat dels productes ecològics curats:
- El color vermell disminueix amb el temps en productes carnis curats i assecats, emmagatzemats a llesques en atmosfera modificada (80% N₂:20% CO₂). En canvi, en productes curats cuits i envasats al buit sencers es manté constant dins un període de 120 dies. Paral·lelament, l'eficiència de curat en aquests darrers productes també es manté constant al llarg del temps d'emmagatzematge.

- Quant a l'addició d'un extracte de tocoferols.

- L'addició de tocoferols minimitza els processos oxidatius durant la maduració i assecatge dels embotits crus i curats. A més, l'addició d'un extracte de tocoferols influeix en el color del producte augmentant-ne la brillantor i la vermellor.

- Quant a la utilització de diferents antimicrobians en productes carnis i l'efecte del seu contingut en greix sobre l'activitat antimicrobiana.

- L'addició de lactat de sodi pot ser una bona estratègia per prevenir el creixement de microorganismes en productes carnis curats de producció ecològica, ja que disminueix eficientment el creixement de microorganismes mesòfils, bacteris coliforms i bacteris productors d'àcid làctic.
- L'éster d'etil de l'arginat làuric redueix de manera eficient el nombre inicial de bacteris immediatament després de ser afegit al producte. Per això, el seu ús podria ser indicat per evitar el creixement microbià degut a les contaminacions post-processament en productes curats i llescats.
- El contingut en greix d'un producte carni influeix en l'activitat dels antimicrobians i de manera general un major contingut en greix contribueix a un menor creixement dels microorganismes.

The conclusions that can be drawn from the present thesis are as follows.

- Concerning the addition of nitrate and nitrite to organic cured meat products, restricted to 80 mg/kg of NaNO₃ or NaNO₂:

- The residual amount of nitrate in dry-cured meat products is reduced when 70 mg/kg of NaNO₃ is added; whereas the residual amount of nitrite is not affected by the two concentrations tested (70 and 140 mg/kg of NaNO₃).
- The redness, oxidative stability status and acceptability of a dry-cured meat product are not significantly altered when 70 or 140 mg/kg of NaNO₃ is added.
- Overall, the concentrations of nitrate and nitrite permitted in organic dry-cured and cured-cooked meat products lead to meats with acceptable curing and sensory characteristics according to consumer opinion.

- Concerning the replacement of E249 (potassium nitrite), E250 (sodium nitrite), E251 (sodium nitrate) and E252 (potassium nitrate) by natural sources rich in nitrates:

- The use of vegetable concentrates rich in nitrates, combined with starter cultures with nitrate reductase activity, does not influence the residual nitrate and nitrite levels in cured sausages containing these ingredients. In addition, such vegetable concentrates avert oxidative processes in cured meat products in the same way as additives would.
- The use of a vegetable concentrate rich in nitrates in cured meat products to replace conventional nitrite and nitrate sources is accepted well by consumers. However, the inclusion of a starter culture with nitrate reductase activity is necessary when these vegetable concentrates are used as a nitrite source, to reduce nitrate to nitrite and obtain an adequate and similar cured colour, which is an important factor in determining cured meat product acceptability.
- Colour determination shows that vegetable concentrates rich in nitrates may provide lighter and more yellow cured meat products. Such a change in colour does not, however, affect product acceptability.

- Concerning the addition of starter cultures with nitrate reductase activity and the establishing of fermentation conditions:

- The addition of starter cultures with nitrate reductase activity is required when nitrate is used in meat products as a curing agent. This addition reduces nitrate levels and consequently nitrite is available for curing and for the other functions in which it is involved.
- The addition of starter cultures with intense nitrate reductase activity (*S. carnosus*) causes the reduction of the majority of the nitrate added to produce cured sausages. Consequently, residual amounts of nitrate in the meat product are below the limits established for organic meat products (50 mg/kg of NaNO₃) and the cured meat product has a more intense reddish colour.
- The time and temperature of fermentation of starter cultures with intense nitrate reductase activity (*S. carnosus*) influence quality parameters of cured-cooked meat products produced using a vegetable concentrate rich in nitrate. When fermentation is conducted at 16°C in the presence of lactic acid bacteria, a minimum period of 12 hours is necessary to obtain a product with an appropriate curing efficiency. In spite of this, at a chilled temperature (4°C) and without lactic acid bacteria, the curing may also be acceptably efficient (≥80%).

- Concerning the influence of storage time (at 4°C) on quality parameters of organic cured meat products:

- Redness decreases with storage time in dry-cured meat products stored in slices and packaged in a modified atmosphere (80% N₂:20% CO₂). Conversely, redness is maintained in vacuum packaged cured-cooked meat products over a 120-day period. Furthermore, the curing efficiency of products receiving the latter treatment is constant during the storage period.

- Concerning the addition of tocopherol extract:

- The addition of tocopherols minimizes oxidation processes during the ripening of dry-cured meat products. Moreover, the addition of tocopherol extract influences the colour of the products by increasing lightness and redness.

- Concerning the use of antimicrobials in meat products and the influence of fat content on the antimicrobial activity:

- The use of sodium lactate could be a good strategy to prevent microorganism growth in organic cured meat products, as it decreases the growth of mesophile bacteria, coliform bacteria and lactic acid bacteria.
- Lauric arginate initially efficiently causes microorganisms to die on being added to the product. Therefore, its use may be indicated to reduce microbial growth due to post-processing contamination in cured ready-to-eat meat products.
- The fat content of meat products influences antimicrobial activity and, in general, an increased fat content contributes to decreased microorganism growth.

8.BIBLIOGRAFIA

- Agricultura ecológica. Estadísticas 2011. (2012). Madrid: Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente. Gobierno de España.
- AOAC International. (2000). *Official methods of analysis of AOAC international* (17th ed.). Gaithersburg Md.
- Aristoy, M., & Toldrá, F. (1995). Isolation of flavor peptides from raw pork meat and dry-cured ham. *Developments in Food Science*, 37, 1323-1344.
- Asghar, A., Gray, J., Booren, A., Gomaa, E., Abouzied, M., Miller, E., & Buckley, D. (1991). Effects of supranutritional dietary vitamin-E levels on subcellular deposition of alpha-tocopherol in the muscle and on pork quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 57(1), 31-41.
- Ashworth, J., & Spencer, R. (1972). The perigo effect in pork. *International Journal of Food Science & Technology*, 7(2), 111-124.
- Aymerich, T., Picouet, P. A., & Monfort, J. M. (2008). Decontamination technologies for meat products. *Meat Science*, 78(1-2), 114-129.
- Barbut, S. (2010). Color development during natural fermentation and chemical acidification of salami-type products. *Journal of Muscle Foods*, 21(3), 499-508.
- Barmpalia, I., Geornaras, I., Belk, K., Scanga, J., Kendall, P., Smith, G., & Sofos, J. (2004). Control of listeria monocytogenes on frankfurters with antimicrobials in the formulation and by dipping in organic acid solutions. *Journal of Food Protection*, 67(11), 2456-2464.

- Baron, C., & Andersen, H. (2002). Myoglobin-induced lipid oxidation. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(14), 3887-3897.
- Barriuso, B., Astiasaran, I., & Ansorena, D. (2013). A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: A challenging task. *European Food Research and Technology*, 236(1), 1-15.
- Batzer, O., Landmann, W., & Santoro, A. (1962). Beef flavor - identification of some beef flavor precursors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 10(2), 94.
- Bázan-Lugo, E., García-Martínez, I., Alfaro-Rodríguez, R. H., & Totosaus, A. (2012). Color compensation in nitrite-reduced meat batters incorporating paprika or tomato paste. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(8), 1627-1632.
- Bell, C., Neaves, P., & Williams, A. P. (2005). *Food microbiology and laboratory practice*. Oxford: Blackwell Science.
- Bello Gutiérrez, J. (2008). *Jamón curado :Aspectos científicos y tecnológicos*. Madrid: Díaz de Santos.
- Berisha, A., Yasushi, E., & Fujimoto, K. (2003). The effect of heat-induced structural changes on the prooxidant activity of myoglobin. *Italian Journal of Food Science*, 15(1), 85-94.
- Bharucha, K., Cross, C., & Rrubin, L. (1980). Long-chain acetals of ascorbic and erythorbic acids as anti-nitrosamine agents for bacon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(6), 1274-1281.

- Bloukas, J., Arvanitoyannis, I., & Siopi, A. (1999). Effect of natural colourants and nitrites on colour attributes of frankfurters. *Meat Science*, 52(3), 257-265.
- BOE número 44. (2002). Rear Decreto 142/2002, de 1 de febrero, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización.
- BOE número 221. (2007). Real Decreto 1118/2007, de 24 de agosto, por el que se modifica el real decreto 142/2002, de 1 de febrero, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización.
- Borch, E., Kant-Muermans, M. L., & Blixt, Y. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1)
- Botsoglou, N. A., Fletouris, D. J., Papageorgiou, G. E., Vassilopoulos, V. N., Mantis, A. J., & Trakatellis, A. G. (1994). Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 42(9), 1931-1937.
- Bou, R., Codony, R., Tres, A., Baucells, M. D., & Guardiola, F. (2005). Increase of geometrical and positional fatty acid isomers in dark meat from broilers fed heated oils. *Poultry Science*, 84(12), 1942-1954.
- Bou, R., Guardiola, F., Grau, A., Grimpa, S., Manich, A., Barroeta, A., & Codony, R. (2001). Influence of dietary fat source, alpha-tocopherol, and ascorbic acid supplementation on sensory quality of dark chicken meat. *Poultry Science*, 80(6), 800-807.

- Bou, R., Codony, R., Tres, A., Decker, E. A., & Guardiola, F. (2008). Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation–xylenol orange method: A review of the factors that influence the method's performance. *Analytical Biochemistry*, 377(1), 1-15.
- Bou, R., Guardiola, F., Codony, R., Faustman, C., Elias, R. J., & Decker, E. A. (2008). Effect of heating oxymyoglobin and metmyoglobin on the oxidation of muscle microsomes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(20), 9612-9620.
- Bou, R., Hanquet, N., Codony, R., Guardiola, F., & Decker, E. A. (2010). Effect of heating oxyhemoglobin and methemoglobin on microsomes oxidation. *Meat Science*, 85(1), 47-53.
- Bourn, D., & Prescott, J. (2002). A comparison of the nutritional value, sensory qualities, and food safety of organically and conventionally produced foods. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 42(1), 1-34.
- Brewer, M. S., Zhu, L. G., Bidner, B., Meisinger, D. J., & McKeith, F. K. (2001). Measuring pork color: Effects of bloom time, muscle, pH and relationship to instrumental parameters. *Meat Science*, 57(2), 169-176.
- Brown, W. D. (1973). Possible substitutes for nitrite in cured foods. *Proceedings of the meat industry reasearch conference* (pp. 21-27). Arlington, VA: American Meat Institute Foundation.
- Brownlie, L. E. (1966). Effect of some environmental factors on psychrophilic microbacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 29(3), 447-454.

- Buchanan, R. L., Smith, J. L., McColgan, C., Marmer, B. S., Golden, M., & Dell, B. (1993). Response-surface models for the effects of temperature, pH, sodium-chloride, and sodium-nitrite on the aerobic and anaerobic growth of *staphylococcus-aureus* 196e. *Journal of Food Safety*, 13(3), 159-175.
- Buchanan, R. L., Stahl, H. G., & Whiting, R. C. (1989). Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium-chloride, and sodium-nitrite on the growth of *listeria-monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 52(12), 844-851.
- Buchanan, R. L., & Solberg, M. (1972). Interaction of sodium nitrate oxygen and pH on growth of *staphylococcus-aureus*. *Journal of Food Science*, 37(1), 81-86.
- Carpenter, C. E., Reddy, D. S. A., & Cornforth, D. P. (1987). Inactivation of clostridial ferredoxin and pyruvate-ferredoxin oxidoreductase by sodium-nitrite. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(3), 549-552.
- Casaburi, A., Aristoy, M. C., Cavella, S., Di Monaco, R., Ercolini, D., Toldra, F., & Villani, F. (2007). Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of vallo di diano (southern italy) as affected by the use of starter cultures. *Meat Science*, 76(2), 295-307.
- Casaburi, A., Blaiotta, G., Mauriello, G., Pepe, I., & Villani, F. (2005). Technological activities of *staphylococcus carnosus* and *staphylococcus simulans* strains isolated from fermented sausages. *Meat Science*, 71(4), 643-650.
- Cegielska-Radziejewska, R., & Pikul, J. (2004). Sodium lactate addition on the quality and shelf life of refrigerated sliced poultry sausage packaged in air or nitrogen atmosphere. *Journal of Food Protection*, 67(3), 601-606.

- Chang, S., & Peterson, R. (1977). The basis of quality in muscle foods. recent developments in the flavor of meat. *Journal of Food Science*, 42(2), 298-305.
- Chasco, J., Lizaso, G., & Beriain, M. J. (1996). Cured colour development during sausage processing. *Meat Science*, 44(3), 203-211.
- Chen, C., Pearson, A., Gray, J., Fooladi, M., & Ku, P. (1984). Some factors influencing the nonheme iron content of meat and its implications in oxidation. *Journal of Food Science*, 49(2), 581-584.
- Chirife, J., & Ferrofontan, C. (1980). Prediction of water activity of aqueous-solutions in connection with intermediate moisture foods - experimental investigation of the aw lowering behavior of sodium lactate and some related-compounds. *Journal of Food Science*, 45(4), 802-804.
- Christiansen, L. N., Tompkin, R. B., Shaparis, A. B., Johnston, R. W., & Kautter, D. A. (1975). Effect of sodium nitrite and nitrate on clostridium-botulinum growth and toxin production in a summer style sausage. *Journal of Food Science*, 40(3), 488-490.
- Cook, F. K., & Pierson, M. D. (1983). Inhibition of bacterial spores by antimicrobials. *Food Technol.*, 37(11), 115-126.
- Coutinho de Oliveira, T. L., Soares, R. d. A., Ramos, E. M., Cardoso, M. d. G., Alves, E., & Piccoli, R. H. (2011). Antimicrobial activity of satureja montana L. essential oil against clostridium perfringens type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. *International Journal of Food Microbiology*, 144(3), 546-555.

- Cross, H., Moen, R., & Stanfield, M. (1978). Training and testing of judges for sensory analysis of meat quality. *Food Technology*, 32(7), 48.
- Cui, H., Gabriel, A. A., & Nakano, H. (2010). Antimicrobial efficacies of plant extracts and sodium nitrite against clostridium botulinum. *Food Control*, 21(7), 1030-1036.
- Daly, C., Lachance, M., Sandine, W., & Elliker, P. (1973). Control of staphylococcus aureus in sausage by starter cultures and chemical acidulation. *Journal of Food Science*, 38(3), 426-430.
- de Silva, T. (2007). Hazard analysis and critical control point (HACCP). In M. S. Rahman (Ed.), *Handbook of food preservation, second edition* (2nd ed., pp. 969-1010). Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group CRC Press.
- Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE). (2007a). Council regulation (EC) no 834/2007 of 28 June 2007 on organic production and labelling of organic products and repealing regulation (EEC) no 2092/91.
- Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE). (2007b). Reglamento (CE) No 1441/2007 de la Comisión de 5 de diciembre de 2007 que modifica el reglamento (CE) no 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.
- Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE). (2008). Commission regulation (EC) no 889/2008 of 5 September 2008 laying down detailed rules for the implementation of council regulation (EC) no 834/2007 on organic production and labelling of organic products with regard to organic production, labelling and control.

Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE). (2010). Reglamento (UE) No 271/2010 de la Comisión de 24 de marzo de 2010 que modifica el reglamento (CE) No 889/2008 por el que se establecen disposiciones de aplicación del reglamento (CE) n o 834/2007 del consejo, en lo que atañe al logotipo de producción ecológica de la unión europea.

Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE). (2011). Reglamento de ejecución (UE) No 344/2011 de la comisión de 8 de abril de 2011 que modifica el reglamento (CE) No 889/2008, por el que se establecen disposiciones de aplicación del reglamento (CE) n o 834/2007 del consejo, sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos, con respecto a la producción ecológica, su etiquetado y su control.

Dineen, N. M., Kerry, J. P., Lynch, P. B., Buckley, D. J., Morrissey, P. A., & Arendt, E. K. (2000). Reduced nitrite levels and dietary α -tocopheryl acetate supplementation: Effects on the colour and oxidative stability of cooked hams. *Meat Science*, 55(4), 475-482.

Dobarganes, M., & Velasco, J. (2002). Analysis of lipid hydroperoxides. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(7), 420-428.

Dolcet, J., & Pons i Argimon, I. (2010). *Els embotits de catalunya*. Barcelona: Generalitat de Catalunya, Departament d'Agricultura i Acció Rural.

Doores, S. (2005). Chapter 4. organic acids. In P. M. Davidson, J. N. Sofos & A. L. Branen (Eds.), *Antimicrobials in food, third edition* (pp. 91-142). Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group.

- Dransfield, E., Ngapo, T. M., Nielsen, N. A., Bredahl, L., Sjöden, P. O., Magnusson, M., Campo, M. M., & Nute, G. R. (2005). Consumer choice and suggested price for pork as influenced by its appearance, taste and information concerning country of origin and organic pig production. *Meat Science*, *69*(1), 61-70.
- Draughon, F. A., Sung, S. C., Mount, J. R., & Davidson, P. M. (1982). Effect of the parabens with and without nitrite on clostridium botulinum and toxin production in canned pork slurry. *Journal of Food Science*, *47*(5), 1635-1642.
- Drumm, T., & Spanier, A. (1991). Changes in the content of lipid autoxidation and sulfur-containing-compounds in cooked beef during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *39*(2), 336-343.
- Duffy, L., Vanderlinde, P., & Grau, F. (1994). Growth of listeria-monocytogenes on vacuum-packed cooked meats - effects of ph, aw, nitrite and ascorbate. *International Journal of Food Microbiology*, *23*(3-4), 377-390.
- Duncan, C., & Foster, E. (1968). Effect of sodium nitrite sodium chloride and sodium nitrate on germination and outgrowth of anaerobic spores. *Applied Microbiology*, *16*(2), 406.
- Dymicky, M., Fox, J., & Wasserman, A. (1975). Color formation in cooked model and meat systems with organic and inorganic-compounds. *Journal of Food Science*, *40*(2), 306-309.

Estévez, M., Morcuende, D., & Ventanas, S. (2009). Chapter 8. determination of oxidation. In L. M. L. Nollet, & F. Toldrà (Eds.), *Handbook of processed meats and poultry analysis* (pp. 141-162). Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group CRC Press.

European Food Safety Authority (EFSA). (2007). Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the commission related to an application on the use of ethyl lauroyl arginate as a food additive. *EFSA Journal*, 5(1), 1-27.

European Food Safety Authority (EFSA). (2010). EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). Statement on nitrites in meat products. *EFSA Journal*, 8(5), 1538.

European Food Safety Authority (EFSA). (2012). Revised exposure assessment for ethyl lauroyl arginate for the proposed uses as a food additive. *EFSA Journal*, 10(4), 2652.

Fang, C. S., Post, L. S., & Solberg, M. (1985). Antimicrobial effect and disappearance of sodium-nitrite in staphylococcus-aureus cultures. *Journal of Food Science*, 50(5), 1412-&.

Farber, J., McKellar, R., & Ross, W. (1995). Modelling the effects of various parameters on the growth of listeria monocytogenes on liver pate. *Food Microbiology*, 12(6), 447-453.

Fennema, O. R., Parkin, K. L., & Damodaran, S. (2010). *Fennema química de los alimentos* (3a ed.). Zaragoza: Acribia.

- Fernandez-Gines, J. M., Fernandez-Lopez, J., Sayas-Barbera, E., Sendra, E., & Perez-Alvarez, J. A. (2003). Effect of storage conditions on quality characteristics of bologna sausages made with citrus fiber. *Journal of Food Science*, 68(2), 710-715.
- Fernandez-Lopez, J., Sendra, E., Sayas-Barbera, E., Navarro, C., & Perez-Alvarez, J. A. (2008). Physico-chemical and microbiological profiles of "salchichon" (spanish dry-fermented sausage) enriched with orange fiber. *Meat Science*, 80(2), 410-417.
- Fernandez-Lopez, J., Sevilla, L., Sayas-Barbera, E., Navarro, C., Marin, F., & Perez-Alvarez, J. (2003). Evaluation of the antioxidant potential of hyssop (*hyssopus officinalis* L.) and rosemary (*rosmarinus officinalis* L.) extracts in cooked pork meat. *Journal of Food Science*, 68(2), 660-664.
- Ferreira, V. L. P., Fernandes, S. V., & Yotsuyanagi, K. (1994). The colour of chicken and pork meat loaf with added cured bovine blood as evaluated by the rab, hunter lab, L* a* b* and XYZ CIE systems. *Revista Española De Ciencia y Tecnologia De Alimentos*, 34(3), 311-322.
- Flores, M., Grimm, C., Toldra, F., & Spanier, A. (1997). Correlations of sensory and volatile compounds of spanish "serrano" dry-cured ham as a function of two processing times. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(6), 2178-2186.
- Fox, J., Dymicky, M., Keyser, S., & Wasserman, A. (1975). Reflectance spectrophotometry of pyridine hemochromes in frankfurters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23(2), 322-325.

- Frankel, E. (1993). In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends in Food Science & Technology*, 4(7), 220-225.
- Freybler, L., Gray, J., Asghar, A., Booren, A., Pearson, A., & Buckley, D. (1993). Nitrite stabilization of lipids in cured pork. *Meat Science*, 33(1), 85-96.
- GarciaEsteban, M., Ansorena, D., Gimeno, O., & Astiasaran, I. (2003). Optimization of instrumental colour analysis in dry-cured ham. *Meat Science*, 63(3), 287-292.
- Genkinger, J. M., & Koushik, A. (2007). Meat consumption and cancer risk. *PLoS Medicine*, 4(12), e345.
- Gibson, A. M., & Roberts, T. A. (1986). The effect of pH, sodium-chloride, sodium-nitrite and storage-temperature on the growth of clostridium-perfringens and fecal streptococci in laboratory media. *International Journal of Food Microbiology*, 3(4), 195-210.
- Gil, J. M., Gracia, A., & Sánchez, M. (2000). Market segmentation and willingness to pay for organic products in Spain. *The International Food and Agribusiness Management Review*, 3(2), 207-226.
- Gotterup, J., Olsen, K., Knochel, S., Tjener, K., Stahnke, L. H., & Moller, J. K. S. (2008). Colour formation in fermented sausages by meat-associated staphylococci with different nitrite- and nitrate-reductase activities. *Meat Science*, 78(4), 492-501.

- Gøtterup, J., Olsen, K., Knöchel, S., Tjener, K., Stahnke, L. H., & Møller, J. K. S. (2007). Relationship between nitrate/nitrite reductase activities in meat associated staphylococci and nitrosylmyoglobin formation in a cured meat model system. *International Journal of Food Microbiology*, *120*(3), 303-310.
- Grau, A., Codony, R., Rafecas, M., Barroeta, A. C., & Guardiola, F. (2000). Lipid hydroperoxide determination in dark chicken meat through a ferrous oxidation-xyleneol orange method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(9), 4136-4143.
- Grau, A., Guardiola, F., Boatella, J., Barroeta, A., & Codony, R. (2000). Measurement of 2-thiobarbituric acid values in dark chicken meat through derivative spectrophotometry: Influence of various parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(4), 1155-1159.
- Gray, J., MacDonald, B., Pearson, A., & Morton, I. (1981). Role of nitrite in cured meat flavor - a review. *Journal of Food Protection*, *44*(4), 302.
- Grunwald, E. W., & Richards, M. P. (2006). Mechanisms of heme protein-mediated lipid oxidation using hemoglobin and myoglobin variants in raw and heated washed muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(21), 8271-8280.
- Grunwald, E., & Richards, M. (2006). Studies with myoglobin variants indicate that released heme is the primary promoter of lipid oxidation in washed fish muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(12), 4452-4460.
- Guardiola, F., Bou, R., Boatella, J., & Codony, R. (2004). Analysis of sterol oxidation products in foods. *Journal of AOAC International*, *87*(2), 441-466.

- Guillen-Sans, R., & Guzman-Chozas, M. (1998). The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(4), 315-330.
- Haak, L., Raes, K., Smet, K., Claeys, E., Paelinck, H., & De Smet, S. (2006). Effect of dietary antioxidant and fatty acid supply on the oxidative stability of fresh and cooked pork. *Meat Science*, 74(3), 476-486.
- Haak, L., Raes, K., Van Dyck, S., & De Smet, S. (2008). Effect of dietary rosemary and alpha-tocopheryl acetate on the oxidative stability of raw and cooked pork following oxidized linseed oil administration. *Meat Science*, 78(3), 239-247.
- Hammes, W. P. (2012). Metabolism of nitrate in fermented meats: The characteristic feature of a specific group of fermented foods. *Food Microbiology*, 29(2), 151-156.
- Hinrichsen, L., & Andersen, H. (1994). Volatile compounds and chemical-changes in cured pork - role of 3 halotolerant bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(7), 1537-1542.
- Hornsey, H. C. (1956). The colour of cooked cured pork. I. estimation of the nitric oxide-haem pigments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 7(8), 534-540.
- Hotchkiss, J., & Vecchio, A. (1985). Nitrosamines in fried-out bacon fat and its use as a cooking oil. *Food Technology*, 39(1), 67-73.
- Howard, A., Duffy, P., Else, K., & Brown, W. (1973). Possible substitutes for nitrite for pigment formation in cured meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 21(5), 894-898.

- Hoyland, D. V., & Taylor, A. J. (1991). A review of the methodology of the 2-thiobarbituric acid test. *Food Chemistry*, 40(3), 271-291.
- Hu, A., & Shelef, L. (1996). Influence of fat content and preservatives on the behavior of listeria monocytogenes in beaker sausage. *Journal of Food Safety*, 16(3), 175-181.
- Hustad, G. O., Cervený, J. G., Trenk, H., Deibel, R. H., Kautter, D. A., Fazio, T., Johnston, R. W., & Kolari, O. E. (1973). Effect of sodium nitrite and sodium-nitrate on botulinal toxin production and nitrosamine formation in wieners. *Applied Microbiology*, 26(1), 22-26.
- Hwang, C., & Juneja, V. (2011). Effects of salt, sodium pyrophosphate, and sodium lactate on the probability of growth of escherichia coil O157:H7 in ground beef. *Journal of Food Protection*, 74(4), 622-626.
- Igene, J., King, J., Pearson, A., & Gray, J. (1979). Influence of heme pigments, nitrite, and non-heme iron on development of warmed-over flavor (wof) in cooked meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(4), 838-842.
- International Organization for Standardization (ISO). (1997). Meat and meat products: Determination of moisture content (reference method); ISO 1442:1997.
- Jackson, A. L., Sullivan, G. A., Kulchaiyawat, C., Sebranek, J. G., & Dickson, J. S. (2011). Survival and growth of clostridium perfringens in commercial no-nitrate-or-nitrite-added (natural and organic) frankfurters, hams, and bacon. *Journal of Food Protection*, 74(3), 410-416.

- Jakszyn, P. (2006). *Nitrosaminas y riesgo de cancer gástrico*. (Tesis Doctoral).
Universidad Pompeu Fabra, Barcelona.
- Jantawat, P., Runglerdkriangkrai, J., Thunpithayakul, C., & Sanguandeekul, R. (1993).
Effects of initial nitrite level, heating and storage on residual nitrite and spoilage of
canned ham roll. *Journal of Food Quality*, 16(1), 1-11.
- Jellinek, G. (1985). *Sensory evaluation of food: Theory and practice*. Chichester: Ellis
Horwood Ltd. and VCH.
- Jensen, C., Flensted-Jensen, M., Skibsted, L. H., & Bertelsen, G. (1998). Effects of
dietary rape seed oil, copper(II) sulphate and vitamin E on drip loss, colour and
lipid oxidation of chilled pork chops packed in atmospheric air or in a high oxygen
atmosphere. *Meat Science*, 50(2), 211-221.
- Jensen, C., Lauridsen, C., & Bertelsen, G. (1998). Dietary vitamin E: Quality and
storage stability of pork and poultry. *Trends in Food Science & Technology*, 9(2),
62-72.
- Jofre, A., Aymerich, T., Grebol, N., & Garriga, M. (2009). Efficiency of high
hydrostatic pressure at 600 MPa against food-borne microorganisms by challenge
tests on convenience meat products. *Lwt-Food Science and Technology*, 42(5),
924-928.
- Johnston, M. A., Pivnick, H., & Samson, J. M. (1969). Inhibition of clostridium-
botulinum by sodium nitrite in a bacteriological medium and in meat. *Canadian
Institute of Food Technology Journal*, 2(2), 52-55.

- Juneja, V. K., & Friedman, M. (2007). Carvacrol, cinnamaldehyde, oregano oil, and thymol inhibit *Clostridium perfringens* spore germination and outgrowth in ground turkey during chilling. *Journal of Food Protection*, 70(1), 218-222.
- Juntilla, J., Hirn, J., Hill, P., & Nurmi, E. (1989). Effect of different levels of nitrite and nitrate on the survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of fermented sausage. *Journal of Food Protection*, 52(3), 158-161.
- Kanner, J., & Juven, B. (1980). S-nitrosocysteine as an antioxidant, color-developing, and anticlostridial agent in comminuted turkey meat. *Journal of Food Science*, 45(5), 1105.
- Kemp, J., Langlois, B., Fox, J., & Varney, W. (1975). Effects of curing ingredients and holding times and temperatures on organoleptic and microbiological properties of dry-cured sliced ham. *Journal of Food Science*, 40(3), 634-636.
- Kim, H., & Min, D. (2008). Chapter 11. chemistry of lipid oxidation. In C. Akoh, & D. Min (Eds.), *Food lipids chemistry, nutrition, and biotechnology*, (Third Edition ed.). Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, LLC.
- Kingston, E., Monahan, F., Buckley, D., & Lynch, P. (1998). Lipid oxidation in cooked pork as affected by vitamin E, cooking and storage conditions. *Journal of Food Science*, 63(3), 386-389.
- Korkeala, H., Suortti, T., & Makela, P. (1988). Ropy slime formation in vacuum-packed cooked meat-products caused by homofermentative lactobacilli and a *Leuconostoc* species. *International Journal of Food Microbiology*, 7(4), 339-347.

- Krause, B. L., Sebranek, J. G., Rust, R. E., & Mendonca, A. (2011). Incubation of curing brines for the production of ready-to-eat, uncured, no-nitrite-or-nitrate-added, ground, cooked and sliced ham. *Meat Science*, 89(4), 507-513.
- Ladikos, D., & Lougovois, V. (1990). Lipid oxidation in muscle foods - a review. *Food Chemistry*, 35(4), 295-314.
- Lathia, D., & Blum, A. (1989). Role of vitamin-E as nitrite scavenger and N-nitrosamine inhibitor - a review. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 59(4), 430-438.
- Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1-3), 181-186.
- Li, H., Li, C. B., Xu, X. L., & Zhou, G. H. (2012). Effects of illumination and packaging on non-heme iron and color attributes of sliced ham. *Meat Science*, 91(4), 521-526.
- Livingston, D., & Brown, W. (1981). The chemistry of myoglobin and its reactions. *Food Technology*, 35(5), 244-252.
- Love, J. (1988). Sensory analysis of warmed-over flavor in meat. *Food Technology*, 42(6), 140-143.
- Love, J., & Pearson, A. (1974). Metmyoglobin and nonheme iron as pro-oxidants in cooked meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22(6), 1032-1034.

- Luchansky, J., Call, J., Hristova, B., Rumery, L., Yoder, L., & Oser, A. (2005). Viability of *Listeria monocytogenes* on commercially-prepared hams surface treated with acidic calcium sulfate and lauric arginate and stored at 4 degrees C. *Meat Science*, 71(1), 92-99.
- Maas, M., Glass, K., & Doyle, M. (1989). Sodium lactate delays toxin production by *Clostridium botulinum* in cook-in-bag turkey products. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(9), 2226-2229.
- MacDougall, D., Mottram, D., & Rhodes, D. (1975). Contribution of nitrite and nitrate to color and flavor of cured meats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26(11), 1743-1754.
- Magrinya, N., Bou, R., Tres, A., Rius, N., Codony, R., & Guardiola, F. (2009). Effect of tocopherol extract, *Staphylococcus carnosus* culture, and celery concentrate addition on quality parameters of organic and conventional dry-cured sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19), 8963-8972.
- Mancini, R. A., & Hunt, M. C. (2005). Current research in meat color. *Meat Science*, 71(1), 100-121.
- Marco, A., Navarro, J. L., & Flores, M. (2006). The influence of nitrite and nitrate on microbial, chemical and sensory parameters of slow dry fermented sausage. *Meat Science*, 73(4), 660-673.
- Marshall, D. L., & Bal'a, A. F. M. (2001). Chapter 7 microbiology of meats. In O. A. Young, R. W. Rogers, Y. H. Hui & W. K. Nip (Eds.), *Meat science and applications* (pp. 149-169). New York: CRC Press Marcel Dekker, Inc.

- Marth, E. H. (1998) Extended shelf life refrigerated foods: Microbiological quality and safety. *Food Technology*, 52, 57.
- Martin, J. (2012). Chapter 30. meat-curing technology. In Y. H. Hui (Ed.), *Handbook of meat and meat processing* (2nd. ed., pp. 531-546). Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Martin, E. M., Griffis, C. L., Vaughn, K. L. S., O'Bryan, C. A., Friedly, E. C., Marcy, J. A., Ricke, S. C., Crandall, P. G., & Lary, R. Y., Jr. (2009). Control of listeria monocytogenes by lauric arginate on frankfurters formulated with or without Lactate/Diacetate. *Journal of Food Science*, 74(6), M237-M241.
- Martin, M. J., Andres, A. I., & Sanabria, M. C. (2012). Colour stability during prolonged storage of dry fermented sausages from iberian pork. *Options Mediterraneennes.Serie A, Seminaires*, (101), 355-359.
- Mbandi, E., & Shelef, L. (2001). Enhanced inhibition of listeria monocytogenes and salmonella enteritidis in meat by combinations of sodium lactate and diacetate. *Journal of Food Protection*, 64(5), 640-644.
- Mbandi, E., & Shelef, L. (2002). Enhanced antimicrobial effects of combination of lactate and diacetate on listeria monocytogenes and salmonella spp. in beef bologna. *International Journal of Food Microbiology*, 76(3), 191-198.
- McMullen, L., & Stiles, M. (1996). Potential for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. *Journal of Food Protection*, , 64-71.
- Meilgaard, M., Civille, G. V., & Carr, B. T. (1991). *Sensory evaluation techniques* (2nd ed.). Boca Raton Fla. etc.: CRC Press.

- Merusi, C., Corradini, C., Cavazza, A., Borromei, C., & Salvadeo, P. (2010). Determination of nitrates, nitrites and oxalates in food products by capillary electrophoresis with pH-dependent electroosmotic flow reversal. *Food Chemistry*, *120*(2), 615-620.
- Meyer, J. (1981). Comparison of carbon-monoxide, nitric-oxide, and nitrite as inhibitors of the nitrogenase from *clostridium-pasteurianum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *210*(1), 246-256.
- Miller, R. K., & Acuff, G. R. (1994). Sodium lactate affects pathogens in cooked beef. *Journal of Food Science*, *59*(1), 15-19.
- Min, B., & Ahn, D. (2005). Mechanism of lipid peroxidation in meat and meat products - A review. *Food Science and Biotechnology*, *14*(1), 152-163.
- Miralles, M. C., Flores, J., & Perez-Martinez, G. (1996). Biochemical tests for the selection of staphylococcus strains as potential meat starter cultures. *Food Microbiology*, *13*(3), 227-236.
- Moller, J. K. S., & Skibsted, L. H. (2006). Myoglobins - the link between discoloration and lipid oxidation in muscle and meat. *Quimica Nova*, *29*(6), 1270-1278.
- Moorcroft, M., Davis, J., & Compton, R. (2001). Detection and determination of nitrate and nitrite: A review. *Talanta*, *54*(5), 785-803.
- Morrissey, P., Sheehy, P., Galvin, K., Kerry, J., & Buckley, D. (1998). Lipid stability in meat and meat products. *Meat Science*, *49*, S73-S86.

- Morrissey, P., & Tichivangana, J. (1985). The antioxidant activities of nitrite and nitrosylmyoglobin in cooked meats. *Meat Science*, 14(3), 175-190.
- Motilva, M., Toldra, F., Nieto, P., & Flores, J. (1993). Muscle lipolysis phenomena in the processing of dry-cured ham. *Food Chemistry*, 48(2), 121-125.
- Motilva, M., Toldra, F., Aristoy, M., & Flores, J. (1993). Subcutaneous adipose-tissue lipolysis in the processing of dry-cured ham. *Journal of Food Biochemistry*, 16(5), 323-335.
- Mottram, D., & Edwards, R. (1983). The role of triglycerides and phospholipids in the aroma of cooked beef. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 34(5), 517-522.
- Mottram, D., Edwards, R., & MacFie, H. (1982). A comparison of the flavor volatiles from cooked beef and pork meat systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33(9), 934-944.
- Mottram, D. (1998). Flavour formation in meat and meat products: A review. *Food Chemistry*, 62(4), 415-424.
- Myers, K., Cannon, J., Montoya, D., Dickson, J., Lonergan, S., & Sebranek, J. (2013). Effects of high hydrostatic pressure and varying concentrations of sodium nitrite from traditional and vegetable-based sources on the growth of listeria monocytogenes on ready-to-eat (RTE) sliced ham. *Meat Science*, 94(1), 69-76.

- Nannerup, L., Jakobsen, M., van den Berg, F., Jensen, J., Moller, J., & Bertelsen, G. (2004). Optimizing colour quality of modified atmosphere packed sliced meat products by control of critical packaging parameters. *Meat Science*, 68(4), 577-585.
- Nelson, K., Busta, F., Sofas, J., & Wagner, M. (1983). Effect of polyphosphates in combination with nitrite-sorbate or sorbate on clostridium-botulinum growth and toxin production in chicken frankfurter emulsions. *Journal of Food Protection*, 46(10), 846.
- Nielsen, H. (1983). Composition of bacterial-flora in sliced vacuum packed bologna-type sausage as influenced by nitrite. *Journal of Food Technology*, 18(3), 371-385.
- Nuchi, C., Guardiola, F., Bou, R., Bondioli, P., Della Bella, L., & Codony, R. (2009). Assessment of the levels of degradation in fat co-and byproducts for feed uses and their relationships with some lipid composition parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1952-1959.
- Nute, G. R. (2002). Sensory analysis of meat. In J. Kerry, J. Kerry & D. Ledward (Eds.), *Meat processing. improving quality*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Oleary, V., & Solberg, M. (1976). Effect of sodium nitrite inhibition on intracellular thiol-groups and on activity of certain glycolytic enzymes in clostridium-perfringens. *Applied and Environmental Microbiology*, 31(2), 208-212.
- Palou, E., Alzamora, S. M., & Lopez-Malo Vigil, A. (2005). Naturally occurring compounds - plant sources. In P. M. Davidson, J. N. Sofos & A. L. Branen (Eds.), *Antimicrobials in food* (3rd ed., pp. 429-451). Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group.

- Pascual Anderson, M.R., & Calderón y Pascual, V. (2000). *Microbiología alimentaria :Metodología analítica para alimentos y bebidas* (2a ed.). Madrid: Díaz de Santos.
- Pearson, A. M., Love, J. D., & Shorland, F. B. (1977). *Warmed over flavor in meat poultry and fish*
- Pegg, R. B., & Shahidi, F. (2006). Chapter 12. processing of nitrite-free cured meats. In L. M. L. Nollet, & F. Toldrá (Eds.), *Advanced technologies for meat processing* (pp. 309-327). Boca Raton, Florida: CRC Press. Taylor & Francis Group.
- Pegg, R. B., & Shahidi, F. (2000). *Nitrite curing of meat :The N-nitrosamine problem and nitrite alternatives*. Trumbull, Conn.: Food & Nutrition Press.
- Perigo, J. A., Whiting, E., & Bashford, T. E. (1967). Observations on the inhibition of vegetative cells of clostridium sporogenes by nitrite which has been autoclaved in a laboratory medium, discussed in the context of sub-lethally processed cured meats. *International Journal of Food Science & Technology*, 2(4), 377-397.
- Pierson, M. D., & Smoot, L. A. (1982). Nitrite, nitrite alternatives, and the control of clostridium-botulinum in cured meats. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 17(2), 141-187.
- Pignoli, G., Bou, R., Rodriguez-Estrada, M. T., & Decker, E. A. (2009). Suitability of saturated aldehydes as lipid oxidation markers in washed turkey meat. *Meat Science*, 83(3), 412-416.
- Pivnick, H., Barnett, H. W., Nordin, H. R., & Rubin, L. J. (1969). Shelf stable luncheon meat inoculated with factors affecting the safety of canned cured clostridium-botulinum. *Canadian Institute of Food Technology Journal*, 2(3), 141-148.

- Pivnick, H., Johnston, M. A., Thacker, C., & Loynes, R. (1970). Effect of nitrite on destruction and germination of clostridium-botulinum and putrefactive anaerobes 3679 and 3679h in meat and in buffer. *Canadian Institute of Food Technology Journal*, 3(3), 103-109.
- Porto-Fett, A. C. S., Campano, S. G., Smith, J. L., Oser, A., Shoyer, B., Call, J. E., & Luchansky, J. B. (2010). Control of listeria monocytogenes on commercially-produced frankfurters prepared with and without potassium lactate and sodium diacetate and surface treated with lauric arginate using the sprayed lethality in container (SLIC (R)) delivery method. *Meat Science*, 85(2), 312-318.
- Price, J. F., & Schweigert, B. S. (1994). *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos* (2a ed.). Zaragoza: Acribia.
- Rahman, M. S. (2007). Chapter 13. nitrites in food preservations. In M. S. Rahman (Ed.), *Handbook of food preservation* (Second Edition ed., pp. 299-312) CRC Press.
- Rath, S., & Reyes, F. G. (2010). Chapter 13. nitrosamines. In L. M. L. Nollet, & F. Toldrá (Eds.), *Safety analysis of foods of animal origin* (pp. 421-440). Boca Raton, FL: Taylor and Francis Group CRC Press.
- Reddy, D., Lancaster, J. R., & Cornforth, D. (1983). Nitrite inhibition of clostridium-botulinum - electron-spin resonance detection of iron nitric-oxide complexes. *Science*, 221(4612), 769-770.

- Reddy, N. R., Pierson, M. D., & Lechowich, R. V. (1982). Inhibition of clostridium-botulinum by antioxidants, phenols, and related-compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(4), 835-839.
- Riha, W., & Solberg, M. (1975a). Clostridium-perfringens growth in a nitrite containing defined medium sterilized by heat or filtration. *Journal of Food Science*, 40(3), 443-445.
- Riha, W., & Solberg, M. (1975b). Clostridium-perfringens inhibition by sodium nitrite as a function of ph, inoculum size and heat. *Journal of Food Science*, 40(3), 439-442.
- Rodriguez, E., Seguer, J., Rocabayera, X., & Manresa, A. (2004). Cellular effects of monohydrochloride of L-arginine, N-alpha-lauroyl ethylester (LAE) on exposure to salmonella typhimurium and staphylococcus aureus. *Journal of Applied Microbiology*, 96(5), 903-912.
- Rodríguez-Nuñez, E., Aristoy, M., & Toldra, F. (1995). Peptide generation in the processing of dry-cured ham. *Food Chemistry*, 53(2), 187-190.
- 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.
- Sato, K., & Hegarty, G. (1971). Warmed-over flavor in cooked meats. *Journal of Food Science*, 36(7), 1098-1102.
- Scannell, A., Ross, R., Hill, C., & Arendt, E. (2000). An effective lactacin biopreservative in fresh pork sausage. *Journal of Food Protection*, 63(3), 370-375.

- Schricker, B., & Miller, D. (1983). Effects of cooking and chemical treatment on heme and non-heme iron in meat. *Journal of Food Science*, 48(4), 1340.
- Sebranek, J. G., & Bacus, J. N. (2007). Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: What are the issues? *Meat Science*, 77(1), 136-147.
- Sebranek, J. G., Jackson-Davis, A. L., Myers, K. L., & Lavieri, N. A. (2012). Beyond celery and starter culture: Advances in natural/organic curing processes in the united states. *Meat Science*, 92(3), 267-273.
- Sen, N. P., Seaman, S., & Miles, W. F. (1979). Volatile nitrosamines in various cured meat-products - effect of cooking and recent trends. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1354-1357.
- Sen, N., Tessier, L., Seaman, S., & Baddoo, P. (1985). Volatile and nonvolatile nitrosamines in fish and the effect of deliberate nitrosation under simulated gastric conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33(2), 264-268.
- Shahidi, F., Wanasundara, U. N., & Amarowicz, R. (1994). Natural antioxidants from low-pungency mustard flour. *Food Research International*, 27(5), 489-493.
- Shank, J. L., Harper, R. H., & Silliker, J. H. (1962). Effect of nitric oxide on bacteria. *Applied Microbiology*, 10(3), 185-189.
- Shehata, H., Buckenhuskes, H., & El-Zoghbi, M. (1998). Colour optimization of egyptian fresh beef sausage by natural colourants. *Fleischwirtschaft*, 78(1), 68-71.
- Shelef, L. A., & Potluri, V. (1995). Behavior of foodborne pathogens in cooked liver sausage containing lactates. *Food Microbiology*, 12(3), 221-227.

- Silliker, J. H., Greenberg, R. A., & Schack, W. R. (1958). Effect of individual curing ingredients on the shelf stability of canned comminuted meats. *Food Technology*, 12(10), 551-554.
- Sindelar, J. J., Cordray, J. C., Sebranek, J. G., Love, J. A., & Ahn, D. U. (2007a). Effects of varying levels of vegetable juice powder and incubation time on color, residual nitrate and nitrite, pigment, pH, and trained sensory attributes of ready-to-eat uncured ham. *Journal of Food Science*, 72(6), S388-S395.
- Sindelar, J. J., Cordray, J. C., Olson, D. G., Sebranek, J. G., & Love, J. A. (2007b). Investigating quality attributes and consumer acceptance of uncured, no-nitrate/nitrite-added commercial hams, bacons, and frankfurters. *Journal of Food Science*, 72, S551-S559.
- Sindelar, J. J., Cordray, J. C., Sebranek, J. G., Love, J. A., & Ahn, D. U. (2007c). Effects of vegetable juice powder concentration and storage time on some chemical and sensory quality attributes of uncured, emulsified cooked sausages. *Journal of Food Science*, 72(5), S324-S332.
- Sindelar, J. J., & Houser, T. A. (2009). Chapter 15. alternative curing systems. In R. Tarté (Ed.), *Ingredients in meat products. properties, functionality and applications* (pp. 379-405). New York: Springer Science + Business Media, LLC.
- Sindelar, J. J., Terns, M. J., Meyn, E., & Boles, J. A. (2010). Development of a method to manufacture uncured, no-nitrate/nitrite-added whole muscle jerky. *Meat Science*, 86(2), 298-303.

- Sofos, J., & Busta, F. (1980). Alternatives to the use of nitrite as an anti-botulinal agent. *Food Technology*, 34(5), 244-251.
- Sommers, C. H., Cooke, P. H., Fan, X., & Sites, J. E. (2009). Ultraviolet light (254 nm) inactivation of listeria monocytogenes on frankfurters that contain potassium lactate and sodium diacetate. *Journal of Food Science*, 74(3), M114-M119.
- Spanier, A., Edwards, J., & Dupuy, H. (1988). The warmed-over flavor process in beef - a study of meat proteins and peptides. *Food Technology*, 42(6), 110-.
- Spanier, A., Vercellotti, J., & James, C. (1992). Correlation of sensory, instrumental and chemical attributes of beef as influenced by meat structure and oxygen exclusion. *Journal of Food Science*, 57(1), 10-15.
- St. Angelo, A., Vercellotti, J., Dupuy, H., & Spanier, A. (1988). Assessment of beef flavor quality - a multidisciplinary approach. *Food Technology*, 42(6), 133-138.
- St. Angelo, A., Vercellotti, J., Legendre, M., Vinnett, C., Kuan, J., James, C., & Dupuy, H. (1987). Chemical and instrumental analyses of warmed-over flavor in beef. *Journal of Food Science*, 52(5), 1163-1168.
- Stopforth, J. D., Visser, D., Zumbrink, R., van Dijk, L., & Bontenbal, E. W. (2010). Control of listeria monocytogenes on cooked cured ham by formulation with a lactate-diacetate blend and surface treatment with lauric arginate. *Journal of Food Protection*, 73(3), 552-555.

- Sugita, K., Yamauchi, K., Ohashi, T., Suiko, M., & Miura, M. (1993). Utilization of dried radish chip extracts in processing of sausages - an ingredient for a nitrite-free curing system. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 40(5), 339-347.
- Sullivan, G. A., Jackson-Davis, A. L., Schrader, K. D., Xi, Y., Kulchaiyawat, C., Sebranek, J. G., & Dickson, J. S. (2012). Survey of naturally and conventionally cured commercial frankfurters, ham, and bacon for physio-chemical characteristics that affect bacterial growth. *Meat Science*, 92(4), 808-815.
- Sweet, C. W. (1975). *Additive composition for reduced particle size meats in the curing thereof* (US Patent 3.899.600 ed.). United States:
- Szterk, A., Stefaniuk, I., Waszkiewicz-Robak, B., & Roszko, M. (2011). Oxidative stability of lipids by means of EPR spectroscopy and chemiluminescence. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 88(5), 611-618.
- Tahmouzi, S., Razavi, S. H., Safari, M., & Emam-Djomeh, Z. (2013). Development of a practical method for processing of nitrite-free hot dogs with emphasis on evaluation of physico-chemical and microbiological properties of the final product during refrigeration. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37(2), 109-119.
- Tanaka, K., Chung, K. C., Hayatsu, H., & Kada, T. (1978). Inhibition of nitrosamine formation invitro by sorbic acid. *Food and Cosmetics Toxicology*, 16(3), 209-215.

- Tang, S., Ou, S., Huang, X., Li, W., Kerry, J., & Buckley, D. (2006). Effects of added tea catechins on colour stability and lipid oxidation in minced beef patties held under aerobic and modified atmospheric packaging conditions. *Journal of Food Engineering*, 77(2), 248-253.
- Taormina, P. J., & Dorsa, W. J. (2009). Short-term bactericidal efficacy of lauric arginate against listeria monocytogenes present on the surface of frankfurters. *Journal of Food Protection*, 72(6), 1216-1224.
- Tarladgis, B. G., Watts, B. M., Younathan, M. T., & Dugan, L. (1960). A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 37(1), 44-48.
- Taylor, S., & Somers, E. (1985). Evaluation of the antibotulinal effectiveness of nisin in bacon. *Journal of Food Protection*, 48(11), 949-952.
- Terns, M. J., Milkowski, A. L., Rankin, S. A., & Sindelar, J. J. (2011a). Determining the impact of varying levels of cherry powder and starter culture on quality and sensory attributes of indirectly cured, emulsified cooked sausages. *Meat Science*, 88(2), 311-318.
- Terns, M. J., Milkowski, A. L., Claus, J. R., & Sindelar, J. J. (2011b). Investigating the effect of incubation time and starter culture addition level on quality attributes of indirectly cured, emulsified cooked sausages. *Meat Science*, 88(3), 454-461.
- Thomas, C., Mercier, F., Tournayre, P., Martin, J., & Berdague, J. (2013). Effect of nitrite on the odourant volatile fraction of cooked ham. *Food Chemistry*, 139(1-4), 432-438.

- Thomas, D., Rajith, L., Lonappan, L., Issac, S., & Kumar, K. G. (2012). Sensitive determination of nitrite in food samples using voltammetric techniques. *Food Analytical Methods*, 5(4), 752-758.
- Tims, M., & Watts, B. (1958). Protection of cooked meats with phosphates. *Food Technology*, 12(5), 240-243.
- Toldrà, F. (Ed.). (2010). *Handbook of meat processing*. Ames: Wiley-Blackwell Publications.
- Toldrà, F. (2002). *Dry-cured meat products*. Trumbull Conn.: Food & Nutrition Press.
- Tomkin, R., Christiansen, L., & Shaparis, A. (1979). Iron and the anti-botulinal efficacy of nitrite. *Applied and Environmental Microbiology*, 37(2), 351-353.
- Tompkin, R. B. (2005). Chapter 6. nitrite. In P. M. Davidson, J. N. Sofos & A. L. Branen (Eds.), *Antimicrobials in food* (Third Edition ed., pp. 169-236). Boca Raton, FL: CRCpress, Taylor & Francis Group.
- Tompkin, R. B., Christia.Ln, Shaparis, A. B., & Bolin, H. (1974). Effect of potassium sorbate on salmonellae, staphylococcus-aureus, clostridium-perfringens, and clostridium-botulinum in cooked, uncured sausage. *Applied Microbiology*, 28(2), 262-264.
- Tompkin, R., Christiansen, L., & Shaparis, A. (1978). Effect of iron on botulinal inhibition in perishable canned cured meat. *Journal of Food Technology*, 13(6), 521-527.

- Tres, A., Daniela Nuchi, C., Bou, R., Codony, R., & Guardiola, F. (2009). Assessing rabbit and chicken tissue susceptibility to oxidation through the ferrous oxidation-xylenol orange method. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(6), 563-573.
- Tsoukalas, D. S., Katsanidis, E., Marantidou, S., & Bloukas, J. G. (2011). Effect of freeze-dried leek powder (FDLP) and nitrite level on processing and quality characteristics of fermented sausages. *Meat Science*, 87(2), 140-145.
- Valenzuela-Martinez, C., Pena-Ramos, A., Juneja, V. K., Korasapati, N. R., Burson, D. E., & Thippareddi, H. (2010). Inhibition of clostridium perfringens spore germination and outgrowth by buffered vinegar and lemon juice concentrate during chilling of ground turkey roast containing minimal ingredients. *Journal of Food Protection*, 73(3), 470-476.
- Vercellotti, J., Kuan, J., Liu, R., Legendre, M., Stangelo, A., & Dupuy, H. (1987). Analysis of volatile heteroatomic meat flavor principles by purge-and-trap gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35(6), 1030-1035.
- Villegas, R., O'Connor, T. P., Kerry, J. P., & Buckley, D. (1999). Effect of gelatin dip on the oxidative and colour stability of cooked ham and bacon pieces during frozen storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 34(4), 385-389.
- von Elbe, J., Klement, J., Amundson, C., Cassens, R., & Lindsay, R. (1974). Evaluation of betalain pigments as sausage colorants. *Journal of Food Science*, 39(1), 128-132.

- Wagner, M., & Busta, F. (1983). Effect of sodium acid pyrophosphate in combination with sodium-nitrite or sodium-nitrite potassium sorbate on clostridium-botulinum growth and toxin production in beef pork frankfurter emulsions. *Journal of Food Science*, 48(3), 990-.
- Walsh, M., Kerry, J., Buckley, D., Morrissey, P., Lynch, P., & Arendt, E. (1998). The effect of dietary supplementation with alpha-tocopheryl acetate on the stability of low nitrite cured pork products. *Food Research International*, 31(1), 59-63.
- Walters, C. (1992). Reactions of nitrate and nitrite in foods with special reference to the determination of N-nitroso compounds. *Food Additives and Contaminants*, 9(5), 441-447.
- Wasserman, A., & Gray, N. (1965). Meat flavor .I. fractionation of water-soluble flavor precursors of beef. *Journal of Food Science*, 30(5), 801-807.
- Weiss, J., Gibis, M., Schuh, V., & Salminen, H. (2010). Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products. *Meat Science*, 86(1), 196-213.
- Willer, H., & Kilcher, L. (2012). In Willer H., Kilcher L. (Eds.), *The world of organic agriculture - statistics and emerging trends 2012*. Frick and Bonn: Research Institute of Organic Agriculture (FiBL) and International Federation of Organic Agriculture Movements (IFOAM).
- Woods, L. F. J., Wood, J. M., & Gibbs, P. A. (1981). The involvement of nitric-oxide in the inhibition of the phosphoroclastic system in clostridium-sporogenes by sodium-nitrite. *Journal of General Microbiology*, 125(AUG), 399-406.

- Woolford, M. (1975). Microbiological screening of food preservatives, cold sterilants and specific antimicrobial agents as potential silage additives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26(2), 229-237.
- Wrolstad, R. E. (2005). *Handbook of food analytical chemistry :Pigments, colorants, flavors, texture, and bioactive food components*. Hoboken N.J.: Wiley-Interscience.
- Xi, Y., Sullivan, G. A., Jackson, A. L., Zhou, G. H., & Sebranek, J. G. (2011). Use of natural antimicrobials to improve the control of listeria monocytogenes in a cured cooked meat model system. *Meat Science*, 88(3), 503-511.
- Xiong, Y. L., & Mikel, W. B. (2001). Chapter 15. meat and meat products. In O. A. Young, R. W. Rogers, Y. H. Hui & W. K. Nip (Eds.), *Meat science and applications* . New York: Marcel Dekker.
- Yarbrough, J., Rake, J., & Eagon, R. (1980). Bacterial inhibitory effects of nitrite - inhibition of active-transport, but not of group translocation, and of intracellular enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, 39(4), 831-834.
- Zawirska-Wojtasiak, R. (2012). Chapter 19. methods for sensory analysis. In H. Jelen (Ed.), *Food flavors. chemical, sensory and technological properties* (pp. 439-456). Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group, CRC Press.

9. ANNEX

9.1. LLISTAT D'ABREVIATURES UTILITZADES

ANOVA: anàlisi de la variància

APPCC: anàlisi de perills i punts de control crític

ATP: trifosfat d'adenosina

BHT: butil-hidroxitoluè

CIE: *Commission Internationale d'Eclairage* (Comissió Internacional de la Il·luminació)

EDTA: àcid etilendiamintetraacètic

EFSA: *European Food Safety Authority* (Autoritat Europea de Seguretat Alimentària)

FID: detector d'ionització de flama

GC: cromatografia de gasos

GRAS: *Generally recognized as safe* (substància generalment reconeguda com a segura)

IDA: ingesta diària admissible

MDA: malondialdehid

MFD: *meat flavor deterioration*

TBA: àcid 2-tiobarbitúric

UE: Unió Europea

WOF: *warmed-over flavor*

9.2. LLISTAT DE TAULES

Taula 2-1. Quantitats de nitrats i nitrits permeses als productes carnis amb denominació ecològica. *Pàgina 67*

Taula 4-1. Disseny experimental del primer estudi. *Pàgina 79*

Taula 4-2. Disseny experimental del segon estudi. *Pàgina 80*

Taula 4-3. Disseny experimental del tercer estudi. *Pàgina 81*

Taula 4-4. Disseny experimental del quart estudi realitzat amb metilparabè. *Pàgina 82*

Taula 4-5. Disseny experimental del quart estudi realitzat amb lactat de sodi. *Pàgina 83*

Taula 4-6. Disseny experimental del quart estudi realitzat amb éster d'etil de l'arginat làuric. *Pàgina 84*

9.3. LLISTAT DE FIGURES

- Figura 2-1.** Reaccions de la mioglobina en les carns fresques i curades. *Pàgina 21*
- Figura 2-2.** Mecanisme d'autooxidació en carns. *Pàgina 25*
- Figura 2-3.** Reaccions de l'ió ferrós (Fe^{2+}) i fèrric (Fe^{3+}) amb els hidroperòxids lipídics. *Pàgina 28*
- Figura 2-4.** Producció dinàmica de l'àcid nitrós en una reacció cíclica. *Pàgina 33*
- Figura 2-5.** Reacció entre α -tocoferol i l'àcid nitrós. *Pàgina 37*
- Figura 2-6.** Estructura molecular de l'èster d'etil de l'arginat làuric. *Pàgina 46*
- Figura 2-7.** Fórmules emprades per transformar l'espai de color CIE $L^*a^*b^*$ a l'espai de color L^*C^*h . *Pàgina 56*
- Figura 2-8.** Espai de color L^*C^*h . *Pàgina 57*
- Figura 2-9.** Fórmula per al càlcul de l'eficiència del curat en productes carnis curats. *Pàgina 58*
- Figura 2-10.** Logotip de producció ecològica de la Unió Europea. *Pàgina 68*
- Figura 2-11.** Segell per a la certificació del Consell Català de la Producció Agrària Ecològica. *Pàgina 69*
- Figura 6-1.** Efecte de la font de nitrat (nitrat potàssic pur o concentrat vegetal a base d'api), ambdós proporcionant dues concentracions equivalents en nitrats (70 o 140 mg NaNO_3/kg), sobre el contingut en nitrats i nitrits residuals de les llonganisses del primer estudi. *Pàgina 205*
- Figura 6-2.** Efecte de la font de nitrit (nitrit de sodi pur o concentrat vegetal ric en nitrats a base d'api i pastanaga) sobre el contingut en nitrats i nitrits residuals de les botifarres catalanes del segon estudi. *Pàgina 206*
- Figura 6-3.** Efecte de la font de nitrit (nitrit de sodi pur o concentrat vegetal ric en nitrats a base d'api i pastanaga) sobre el contingut en nitrats i nitrits residuals de les botifarres catalanes del tercer estudi. *Pàgina 207*
- Figura 6-4.** Efecte de les condicions de fermentació (Fermentació A: producte fermentat durant 12 hores a 16 °C i amb la presència de *Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus xylosus* i *Staphylococcus carnosus*; Fermentació B: producte fermentat durant 12 hores a 4 °C i amb la presència de *S. carnosus*; Fermentació C: producte fermentat durant 12 hores a 4 °C sense cap cultiu iniciador) sobre el contingut en nitrats i nitrits residuals de les botifarres catalanes del tercer estudi. *Pàgina 207*

- Figura 6-5.** Efecte de l'addició d'un cultiu iniciador amb activitat nitrat reductasa (*Staphylococcus carnosus*) sobre el contingut en nitrats i nitrits residuals de les llonganisses del primer estudi. *Pàgina 208*
- Figura 6-6.** Efecte del temps de fermentació (6, 12 o 24 hores a 16 °C) dels cultius iniciadors de la fermentació (*Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus xylosum* i *Staphylococcus carnosus*) sobre el contingut en nitrats i nitrits residuals de les botifarres catalanes del segon estudi. *Pàgina 209*
- Figura 6-7.** Interacció entre les condicions de fermentació (Fermentació A: producte fermentat durant 12 hores a 16 °C i amb la presència de *L. sakei*, *S. xylosum* i *S. carnosus*; fermentació B: producte fermentat durant 12 hores a 4 °C i amb la presència de *S. carnosus*; i, fermentació C: producte fermentat durant 12 hores a 4 °C sense cap cultiu iniciador) i la font de nitrit (nitrit de sodi pur o concentrat vegetal ric en nitrats a base d'api i pastanaga, ambdós proporcionant l'equivalent a 70 mg NaNO₂/kg) pels continguts en nitrits i nitrats residuals de les botifarres catalanes del tercer estudi. *Pàgina 210*
- Figura 6-8.** Efecte del temps d'emmagatzematge (0, 60 i 120 dies a 4 °C, envasades al buit) sobre el contingut en nitrats i nitrits residuals de les botifarres catalanes del tercer estudi. *Pàgina 211*
- Figura 6-9.** Efecte del temps d'emmagatzematge (0 i 45 dies a 4 °C envasades en 80% N₂ i 20% CO₂) sobre el contingut en nitrats i nitrits residuals de les llonganisses del primer estudi. *Pàgina 212*
- Figura 6-10.** Efecte de l'addició d'un cultiu iniciador de la fermentació amb activitat nitrat reductasa elevada (*S. carnosus*) sobre el valor de a^* (vermellor) de la llonganissa del primer estudi. *Pàgina 213*
- Figura 6-11.** Interacció entre les condicions de fermentació (Fermentació A: producte fermentat durant 12 hores a 16 °C i amb la presència de *L. sakei*, *S. xylosum* i *S. carnosus*; Fermentació B: producte fermentat durant 12 hores a 4 °C i amb la presència de *S. carnosus*; Fermentació C: producte fermentat durant 12 hores a 4 °C sense cap cultiu iniciador) i la font de nitrit (nitrit de sodi pur o concentrat vegetal ric en nitrats a base d'api i pastanaga, ambdós proporcionant l'equivalent a 70 mg NaNO₂/kg) pels valors de color a^* i h de la botifarra catalana del tercer estudi. *Pàgina 214*
- Figura 6-12.** Efecte de la font de nitrat o nitrit sobre el color groc (b^*) de les llonganisses del primer estudi (A), de les botifarres catalanes del segon estudi (B) i de les botifarres catalanes del tercer estudi (C). *Pàgina 215*
- Figura 6-13.** Efecte de l'addició d'un extracte de tocoferols (200 mg de tocoferols/kg) sobre la brillantor (A; L^*), la intensitat de color (B; C^*) i l'angle o tonalitat (C; h) de l'espai de color L^*C^*h en les botifarres catalanes del tercer estudi. *Pàgina 216*

- Figura 6-14.** Efecte de l'addició d'un extracte de tocoferols (200 mg de tocoferols/kg) sobre la brillantor (A; L^*), la vermellor (B; a^*) i la grogor (C; b^*) de l'espai de color CIE $L^*a^*b^*$ en les llonganisses del primer estudi. *Pàgina 217*
- Figura 6-15.** Efecte del temps d'emmagatzematge sobre el valor de a^* en les llonganisses (A), les botifarres catalanes del segon estudi (B) i les botifarres catalanes del tercer estudi (C). Les llonganisses es van emmagatzemar llescades en atmosfera modificada (80% N_2 : 20% CO_2) a 4 °C fins a 45 dies. Les botifarres catalanes del segon estudi es van coure senceres, després es van tallar en quatre parts de 300g, envasar al buit, pasteuritzar i emmagatzemar a 4 °C fins a 180 dies. Les botifarres catalanes del tercer estudi es van coure envasades al buit i seguidament es van emmagatzemar a 4 °C fins a 120 dies. *Pàgina 219*
- Figura 6-16.** Efecte del temps de fermentació (A; 6, 12 o 24 hores) i de la font de nitrit utilitzada (B; nitrit de sodi pur o concentrat vegetal ric en nitrat a base d'api i pastanaga, ambdós proporcionant l'equivalent a 80 mg $NaNO_2$ /kg) sobre l'eficiència de curat de les botifarres catalanes del segon estudi. *Pàgina 220*
- Figura 6-17.** Efecte de les condicions de fermentació (A; Fermentació A: producte fermentat durant 12 hores a 16 °C i amb la presència de *Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus xylosus* i *Staphylococcus carnosus*; Fermentació B: producte fermentat durant 12 hores a 4 °C i amb la presència de *Staphylococcus carnosus*; i, Fermentació C: producte fermentat durant 12 hores a 4 °C sense cap cultiu iniciador) i de la font de nitrit utilitzada (B; nitrit de sodi pur o concentrat vegetal ric en nitrat a base d'api i pastanaga, ambdós proporcionant l'equivalent a 70 mg $NaNO_2$ /kg) sobre l'eficiència de curat de les catalanes del tercer estudi. *Pàgina 221*
- Figura 6-18.** Interacció entre la font de nitrit utilitzada (nitrit de sodi pur o concentrat vegetal ric en nitrats a base d'api i pastanaga, ambdós proporcionant l'equivalent a 70 mg $NaNO_2$ /kg) i les condicions de fermentació (Fermentació A: producte fermentat durant 12 hores a 16 °C i amb la presència de *Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus xylosus* i *Staphylococcus carnosus*; Fermentació B: producte fermentat durant 12 hores a 4 °C i amb la presència de *Staphylococcus carnosus*; i, Fermentació C: producte fermentat durant 12 hores a 4 °C sense cap cultiu iniciador) per l'eficiència de curat de la botifarra catalana del tercer estudi. *Pàgina 222*
- Figura 6-19.** Efecte de la font de nitrat/nitrit sobre el contingut en hidroperòxids lipídics expressats com equivalents d'hidroperòxid de cumè (CHP)/kg sec en les llonganisses elaborades d'acord al primer estudi (A) i a les botifarres catalanes elaborades d'acord al segon (B) i tercer (C) estudis. *Pàgina 223*

Figura 6-20. Efecte de la font de nitrat/nitrit sobre els valors obtinguts per a la prova de l'àcid tiobarbitúric (expressat com a μg de malondialdehid/kg sec) en les llonganisses elaborades d'acord al primer estudi (A) i a les botifarres catalanes elaborades d'acord al segon (B) i tercer (C) estudis. *Pàgina 224*

Figura 6-21. Efecte de l'addició d'un extracte de tocoferols (200 mg de tocoferols/kg) sobre el contingut en hidroperòxids (A; expressat com a mmol d'equivalents d'hidroperòxid de cumè/kg sec), els valors de TBA obtinguts (B; expressat com a μg de malondialdehid/kg sec) i la susceptibilitat a la oxidació (C; AUC, area sota la corba, expressat com mol d'equivalents d'hidroperòxid de cumè per hora/kg sec) de les llonganisses elaborades segons el primer estudi. *Pàgina 226*

Figura 6-22. Efecte de l'addició d'un extracte de tocoferols (200 mg de tocoferols/kg) sobre el contingut en hidroperòxids (A; expressat com a μmol d'equivalents d'hidroperòxid de cumè/kg sec), els valors de TBA obtinguts (B; expressat com a μg de malondialdehid/kg sec) i la susceptibilitat a la oxidació (C; AUC, area sota la corba, expressat com mmol d'equivalents d'hidroperòxid de cumè per hora/kg sec) de les botifarres catalanes elaborades segons el tercer estudi. *Pàgina 228*

Figura 6-23. Efecte del temps d'emmagatzematge a 4 °C sobre el contingut en hidroperòxids lipídics (A) expressats com a mmol d'equivalents d'hidroperòxid de cumè (CHP) per kg pes sec i els valors de la prova de l'àcid tiobarbitúric (B) expressats com μg d'equivalents de malondialdehid per kg pes sec en les llonganisses del primer estudi llescades i envasades en atmosfera modificada (80% N_2 : 20% CO_2). *Pàgina 231*

Figura 6-24. Efecte del temps d'emmagatzematge (a 4 °C) sobre el contingut en hidroperòxids lipídics (A) expressats com a μmol d'equivalents d'hidroperòxid de cumè (CHP) per kg pes sec i els valors de la prova de l'àcid tiobarbitúric (B) expressats com μg d'equivalents de malondialdehid per kg pes sec en les botifarres catalanes del segon estudi envasades al buit. *Pàgina 232*

Figura 6-25. Efecte del temps d'emmagatzematge (a 4°C) sobre el contingut en hidroperòxids lipídics (A) expressats com a μmol d'equivalents d'hidroperòxid de cumè i els valors de la prova de l'àcid tiobarbitúric (B) expressats com μg d'equivalents de malondialdehid per kg pes sec en les botifarres catalanes del tercer estudi envasades al buit. *Pàgina 233*

Figura 6-26. Efecte de la font de nitrit (nitrit de sodi pur o concentrat vegetal a base d'api i pastanaga) sobre l'acceptabilitat global de les catalanes elaborades segons el segon (A) i tercer (B) estudis. *Pàgina 234*

- Figura 6-27.** Efecte antimicrobià de les concentracions usades de metilparabè (0%; 0,1%; 0,5%; 1,0%, i 2,0%) sobre el creixement de bacteris productors d'acid làctic. *Pàgina 236*
- Figura 6-28.** Efecte antimicrobià de les concentracions usades de lactat de sodi (0%; 2%; 4%, i 6%) sobre el creixement de bacteris aerobis mesòfils totals (A), bacteris coliforms (B) i bacteris productors d'acid làctic (C). *Pàgina 238*
- Figura 6-29.** Efecte antimicrobià de les concentracions usades d'èster d'etil de l'arginat làuric (0,00%; 0,05%; 0,10%; 0,15%; 0,20%, i 0,25%) sobre el creixement de bacteris aerobis mesòfils totals (A), bacteris coliforms (B) i bacteris productors d'acid làctic (C). *Pàgina 240*
- Figura 6-30.** Mitjana de la població dels bacteris aerobis mesòfils a la carn picada amb 0% de greix, tractada amb èster d'etil de l'arginat làuric a diferents concentracions (0,00%; 0,05%; 0,10%; 0,15%; 0,20%, i 0,25%), envasada en atmosfera modificada (70% O₂ : 30% CO₂) a 12 °C durant 8 dies. *Pàgina 241*
- Figura 6-31.** Efecte del greix (0, 15 i 50%) sobre el creixement de microorganismes aerobis mesòfils (A), bacteris coliforms (B) i bacteris productors d'acid làctic (C) a la carn picada. *Pàgina 242*

