



HAL
open science

Préservation de l'arôme dans un jambon cuit non nitrifié

Caroline Thomas

► **To cite this version:**

Caroline Thomas. Préservation de l'arôme dans un jambon cuit non nitrifié. Alimentation et Nutrition. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2014. Français. NNT : 2014CLF22522 . tel-02800482

HAL Id: tel-02800482

<https://hal.inrae.fr/tel-02800482v1>

Submitted on 20 Aug 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE BLAISE PASCAL

UNIVERSITE D'Auvergne

N° d'ordre 2522

ANNEE : 2014

ECOLE DOCTORALE

SCIENCE DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT

N° d'ordre

652

Thèse

présentée à l'Université Blaise Pascal pour l'obtention du grade de :

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

Spécialité : Sciences Des Aliments

soutenue le : 10 décembre 2014

Caroline THOMAS

Préservation de l'arôme
dans un jambon cuit non nitré

DOCUMENT CONFIDENTIEL

jusqu'au 10 décembre 2019

Membres : Mr. BERDAGUÉ Jean-Louis (Directeur de Thèse)

Mr. DUFLOS Guillaume (Rapporteur)

Mr. GIAMPAOLI Pierre (Rapporteur)

Mme. LAROQUE Delphine

Mr. MICHAUD Philippe (Président)

Invités : Mr. DECROOCQ Jean-Daniel

Mr. MARTIN Jean-Luc

Remerciements

Je commencerais par remercier Guillaume Duflos et Pierre Giampaoli d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et Philippe Michaud d'avoir assuré la présidence du jury.

Au cours des réunions avec les partenaires, le partage des connaissances de chacun a permis de construire les recherches de manière raisonnée afin de pouvoir répondre à des problématiques scientifiques tout en intégrant des exigences industrielles.

Il est donc important pour moi de remercier les partenaires de Fleury-Michon : Jean-Daniel Decroocq et Céline Jarrault pour leur savoir-faire et leur expérience qu'ils ont bien voulu partager.

Merci particulièrement à Jean-Luc Martin, Jean-Luc Vendevre et Martine Carlier de l'IFIP ainsi qu'à Emilie Renault et Delphine Laroque de Diana Naturals qui m'ont beaucoup aidée pendant ces trois années et qui m'ont surtout chaleureusement accueillie à plusieurs reprises !

La liste des personnes à remercier à l'INRA, est assez longue. Je commencerais par tous les collègues de l'unité Quapa qui ont toujours été curieux et volontaires (et inconscients ?) de participer aux dégustations des mini- jambons « expérimentaux ». Merci aussi Philippe Gatellier et Claude Ferreira qui ont pris le temps de m'aider et de m'expliquer les expérimentations réalisées dans leur équipe. Je voudrais plus spécialement remercier mon équipe avec laquelle j'ai vraiment passé des super moments depuis presque 5 ans maintenant (par ordre de disposition des bureaux) :

Erwan Engel et Maïa Meurillon pour leurs nombreux conseils qu'ils soient scientifiques ou autres ! Pascal Tournayre pour avoir participé au projet depuis le début et pour toute son aide informatique. Omniprésent, je réserve un énorme merci à Frédéric Mercier qui a toujours trouvé des solutions à tous mes problèmes et qui m'a toujours accompagnée dans les bons coups !

Obligatoirement, je dois avoir une pensée pour Jihène Bouhleb et Christelle Planche qui ont dû partager mon bureau tout ce temps et donc apprendre à cohabiter avec mes affaires de sport.

Offrant toujours son aide et ses connaissances fongiques, je n'oublie pas Nathalie Kondjoyan. Un très gros merci à Jérémy Ratel qui m'a offert beaucoup de temps, le tout dans la bonne humeur et un encadrement en laboratoire qui sera utile pour la suite. Merci à Said Abouelkaram pour ses débats toujours très très très passionnants...

Raisonnement, il convient de garder le meilleur pour la fin, c'est donc à papy Jean-Louis qui a lancé ce projet odorant, que je consacre mon « plus gros merci » : pour sa gentillesse, pour sa patience (et il en fallait !), pour avoir supporté mon caractère de cochon pendant 5 ans, pour avoir autant de fois attisé ma curiosité sur des sujets très divers, pour m'avoir accompagnée de A à Z, pour toutes ses anecdotes mémorables qui ont égayé mes journées et pour avoir pris le temps de partager ses connaissances... sincèrement un très très gros merci.

C'était vraiment trois années très sympas, merci à vous tous.

RESUME

Le nitrite est un ingrédient essentiel à la fabrication du jambon cuit, pourtant les risques sanitaires dont il est accusé remettent en question son utilisation. L'emploi de cet unique additif permet de remplir de nombreuses fonctions comme la protection antioxydante et antimicrobienne mais aussi le développement de la couleur et de l'arôme. C'est sur cette dernière fonction que ce travail de thèse s'est focalisé avec pour objectif la suppression du nitrite dans la fabrication du jambon cuit.

La mise en œuvre de plusieurs techniques complémentaires de chromatographie en phase gazeuse couplées à l'olfactométrie a permis dans une première partie d'identifier le 2-méthyl-3-furanthiol, 2-méthyl-3-(méthyl-dithio)furan, et le bis(2-méthyl-3-furyl)disulfide comme les molécules soufrées responsables de l'arôme du jambon cuit. Il est apparu qu'en l'absence de nitrite et par conséquent en absence de protection antioxydante, les composés odorants issus de l'oxydation sont produits massivement et ont tendance à perturber l'arôme global du jambon cuit. Afin de restaurer l'arôme en l'absence de nitrite, l'étude a été organisée selon 2 axes : le premier visant à favoriser la production des molécules soufrées clés de l'arôme et le second visant à limiter la formation des composés d'oxydation perturbateurs de l'arôme grâce à l'utilisation d'antioxydants naturels. Les recherches ont été conduites sur des mini-jambons cuits modèles. La thiamine a été identifiée comme précurseur majoritaire du 2-méthyl-3-furanthiol, du 2-méthyl-3-(méthyl-dithio)furan, et du bis(2-méthyl-3-furyl)disulfide dans les conditions de fabrication du jambon cuit et des extraits d'acérola, de canneberge, d'oignon et de thé ont été sélectionnés pour leurs propriétés antioxydantes. L'évaluation en parallèle de l'oxydation et de l'arôme a montré que ces quatre extraits utilisés en mélange permettaient, non seulement d'égaliser les performances antioxydantes du nitrite, mais aussi de rehausser la note aromatique « jambon cuit » par rapport à la formulation non nitritée de référence.

L'association de la thiamine et des extraits végétaux a finalement permis de réaliser des jambons non nitrités qui, en termes d'arôme et d'oxydation, se rapprochent fortement d'un jambon nitrité. Les formulations réalisées constituent donc une première piste satisfaisante pour répondre à la problématique de la suppression du nitrite dans le jambon cuit. La protection antimicrobienne des nouvelles formulations doit être validée et la restauration de la couleur rose du jambon demeure une problématique organoleptique.

Mots clés : Jambon cuit ; nitrite ; composés odorants clés ; chromatographie en phase gazeuse ; olfactométrie ; composés soufrés ; précurseurs d'arôme ; oxydation ; antioxydants ; analyse sensorielle.

ABSTRACT

Sodium nitrite is an essential ingredient in the cooked ham production process, yet its use is under challenge due to food safety concerns. Sodium nitrite is a multifunctional additive used for its ability to act on several fronts—from inhibiting oxidation and preventing microbial growth to giving desirable colour and aroma. This study focused on the aroma function under a wider objective to reduce nitrite use in cooked ham processing.

Using several complementary methods with gas chromatography–olfactometry, we first identified 2-methyl-3-furanthiol, 2-methyl-3-(methyldithio)furan and bis(2-methyl-3-furyl)disulfide as the odour-active sulphur-compounds responsible for cooked ham flavour. It emerged that in the absence of nitrite—and therefore the absence of inhibited oxidation—the massive formation of an array of odour-active compounds produced by oxidative breakdown tended to disrupt the overall aroma of the final cooked ham. Next, in an effort to restore this aroma in the absence of nitrite, the study was organized into two strands, where the first strand aimed to promote the production of key aroma-active sulphur-compounds while the second strand aimed to minimize the formation of aroma-disruptive oxidation compounds by using natural antioxidants. This research was led on model cooked mini-hams. We identified thiamine as the major precursor of 2-methyl-3-furanthiol, 2-methyl-3-(methyldithio)furan and bis(2-methyl-3-furyl)disulfide under cooked ham production conditions, and we selected acerola, cranberry, onion and tea extracts as natural antioxidants. The coupled evaluations of oxidation and aroma showed that the formulated mixture of these four extracts not only equalled the antioxidant performances of added sodium nitrite but also lifted the “cooked ham” head note compared to the reference no-added-nitrite formulation.

The association of thiamine and vegetal extracts ultimately made it possible to produce no-added-nitrite hams that, in terms of aroma and oxidation levels, proved almost identical to nitrite-added ham. The engineered formulations thus offer a good research track to suppress the sodium nitrite in cooked ham. The problem of how to restore the distinctive pink colour of cooked ham is an issue that remains to be resolved, and the ability of these new formulations to inhibit microbial growth needs to be validated.

Key words: Cooked ham; nitrite; key odorants; chromatography olfactometry; sulphur compounds; aroma precursors; oxidation; antioxidants; sensory analysis.

Sommaire

Liste des tableaux et des figures	2
Liste des abréviations	3
Introduction générale	5
Chapitre I : Etude bibliographique	7
I – Historique.....	7
II – Qualités du nitrite et ses mécanismes d’action en tant qu’additif	7
III – Risques liés au nitrite et réglementation de son utilisation	13
IV – Vers une réduction partielle ou la suppression du nitrite ?.....	16
Chapitre II : Expériences, résultats et discussions	21
II – 1. Identification et origine des molécules clés de l’arôme du jambon cuit.....	23
II – 1.1. Effet du nitrite sur la fraction volatile odorante du jambon cuit	25
II – 1.2. Identification et origines des composés odorants soufrés du jambon cuit	35
II – 1.3. Effet d’ajouts de thiamine sur les composés odorants clés et sur l’arôme du jambon cuit.....	45
II – 2. Substitution du nitrite par des molécules ou par des extraits végétaux antioxydants : effets sur l’oxydation et sur l’arôme du jambon cuit	53
II – 3. Combinaisons des extraits végétaux antioxydants et de la thiamine : effets sur l’oxydation et sur l’arôme du jambon cuit.....	79
Conclusions	97
Perspectives	95
Références bibliographiques	99
Annexes	107
Annexe I : Evaluation de la couleur dans des jambons enrichis en extraits végétaux.	109
Annexe II : Analyses microbiologiques de contrôle préalables à la dégustation des mini-jambons.....	110
Annexe III : Procédé de fabrication du jambon cuit	111
Annexe IV : Evaluation de l’arôme de fabrications pilotes de jambons cuits par les partenaires du projet (Diana Naturals, Fleury-Michon, IFIP, INRA).....	113
Annexe V : Formation du 2-methyl-3-furanthiol à partir de la thiamine	114
Annexe VI : Formation du 2-methyl-3-furanthiol à partir de la cystéine	115
Annexe VII : Evaluation des propriétés antioxydantes intrinsèques des extraits végétaux d’acérola, de canneberge, d’oignon et de thé vert.	117
Liste de communications	119

Liste des tableaux et des figures

I – Introduction bibliographique

- * **Figure 1** : Les différentes formes de la myoglobine et leurs couleurs..... p.8
- * **Figure 2** : Formation du pigment nitrosomyochromogène..... p.10
- * **Figure 3** : Réactions en chaîne impliquées dans l'oxydation lipidique..... p.10
- * **Figure 4** : Formation des nitrosamines à partir d'une amine secondaire et du nitrite NO₂-..... p.14
- * **Figure 5** : Cycle du nitrite et du nitrate dans le corps humain..... p.14

II – 1.1. Effet du nitrite sur la fraction volatile odorante du jambon cuit.

- * **Figure 1** : Mean aromagram of cooked hams with and without nitrite..... p.28
- * **Tableau 1** : List of identified potent odorants..... p.29
- * **Figure 2** : GC-MS/80 aromagrams of cooked hams without and with nitrite..... p.30
- * **Figure 3** : Effect of nitrite on hexanal and 2-methyl-3-(methylthio)furan evaluated by GC-MS/80 and GC-MS..... p.31
- * **Figure 4** : Effect of the presence or absence of nitrite on "cooked ham" and "cooked pork meat" notes..... p.32

II – 1.2. Identification et origines des composés odorants soufrés du jambon cuit.

- * **Tableau 1** : Sulphur compounds identified in industrial cooked ham..... p.39
- * **Figure 1** : Aromagram of industrial cooked ham p.40
- * **Figure 2** : Productions of the main sulphur odorants as a function of the addition of precursors..... p.41
- * **Figure 3** : Thiamine concentration of the hams before and after cooking as a function of added thiamine..... p.42
- * **Figure 4** : Production of 2-methyl-5-(methylthio)furan, 2-methyl-4,5-dihydrothiophene and dimethylsulphide as a function of the addition of precursors in the brine..... p.42

II – 1.3. Effet d'ajouts de thiamine sur les composés odorants clés et sur l'arôme du jambon cuit.

- * **Tableau 1** : Composition of cooked hams and analyses realised..... p.48
- * **Figure 1** : Productions of 2-methyl-3-furanthiol, 2-methyl-3-(methylthio)furan and bis(2-methyl-3-furyl)disulphide as a function of thiamine concentration in cooked or not cooked hams..... p.50
- * **Figure 2** : Relations between the productions of 2-methyl-3-furanthiol and 2-methyl-3-(methylthio)furan or bis(2-methyl-3-furyl)disulphide evidenced by DHS-GC-MS analyses..... p.50
- * **Figure 3** : Production of 2-methyl-3-furanthiol (MFT) as a function of the thiamine concentration in hams..... p.50
- * **Figure 4** : Effect of thiamine concentration on the "cooked ham" aroma intensity..... p.51
- * **Figure 5** : Relationship between the 2-methyl-3-furanthiol content and the "cooked ham" aroma intensity..... p.51

II – 2. Substitution du nitrite par des molécules ou par des extraits végétaux antioxydants : effets sur l'oxydation et sur l'arôme du jambon cuit.

- * **Tableau 1** : Quantités de « principes actifs antioxydants » véhiculées par les extraits aux doses employées..... p.56
- * **Tableau 2** : Composition des saumures employées et liste des analyses réalisées sur les mini-jambons..... p.58
- * **Figure 1** : Typologie des principes actifs..... p.62
- * **Tableau 3** : Liste des composés volatils d'oxydation identifiés dans les mini-jambons cuits et effet des principes actifs sur leurs productions..... p.64
- * **Figure 2** : Relations entre les valeurs TBARS et l'aire moyenne des pics chromatographiques de cinq composés d'oxydation. Corrélation entre les mesures de TBARS réalisées à J+1 et à J+14..... p.66
- * **Figure 3** : Effet des 6 extraits végétaux antioxydants sur l'oxydation des mini-jambons cuits modèles..... p.68
- * **Figure 4** : Effet des ajouts des extraits sur l'intensité de l'arôme de « jambon cuit »..... p.70
- * **Figure 5** : Effet des extraits végétaux purs ou en mélanges sur l'oxydation des jambons à J+14..... p.72
- * **Figure 6** : Effet des extraits antioxydants purs ou en mélanges sur l'intensité de l'arôme de « jambon cuit »..... p.74
- * **Figure 7** : Relation entre l'oxydation des jambons et l'intensité de leur note aromatique « jambon cuit »..... p.76

II – 3. Combinaisons des extraits végétaux antioxydants et de la thiamine : effets sur l'oxydation et sur l'arôme du jambon cuit.

- * **Tableau 1** : Composition des huit saumures employées et analyses réalisées sur les mini-jambons..... p.82
- * **Figure 1** : Effets des facteurs : « maturation », « présence de thiamine » et « antioxydants » sur les TBARS..... p.86
- * **Figure 2** : Comparaison des TBARS pour des mini-jambons contenant des extraits végétaux et de la thiamine... p.86
- * **Figure 3** : Effet des extraits végétaux combinés ou non à de la thiamine sur l'oxydation des mini-jambons..... p.88
- * **Figure 4** : Effets des antioxydants et de la thiamine sur l'intensité de la note aromatique « jambon cuit »..... p.88
- * **Figure 5** : Aromagrammes obtenus pour des jambons contenant les extraits végétaux et/ou la thiamine..... p.90
- * **Figure 6** : Diagrammes circulaires représentant le ratio entre les aires des pics odorants issus de l'oxydation des lipides et les aires des pics odorants des deux soufrés dans la fraction volatile odorante des jambons cuits..... p.92

Liste des abréviations

- **GC** : Chromatographie gazeuse
- **MS** : Spectrométrie de masse
- **O et 8O** : Olfactométrie mono- (O) ou multi-postes (8O)
- **SPME** : Micro-extraction sur phase solide
- **GCxGC** : Chromatographie gazeuse bidimensionnelle exhaustive
- **MStof** : Détecteur à temps de vol couplé à la spectrométrie de masse
- **TBARS** : Substances réactives à l'acide thiobarbiturique
- **MDA** : malonedialdehyde
- **AO** : Antioxydant
- **FRAP** : Pouvoir antioxydant de réduction du fer
- **DPPH** : 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl

Introduction générale

Le nitrite de sodium NaNO_2 ou « nitrite » est un additif indispensable à la réalisation des produits de salaison. Il est utilisé sous la forme de sel de chlorure de sodium nitrité à 0,6 % habituellement et intégré à la saumure pour obtenir une concentration après injection comprise entre 90 et 150 mg.kg^{-1} de charcuterie. Le nitrite assure le bon développement de la couleur et de l'arôme ainsi que la bonne conservation des produits grâce à son action antioxydante et antimicrobienne. Cependant, cet additif est soupçonné d'être cancérigène ; raison pour laquelle son utilisation dans les produits de salaison est actuellement surveillée, voire même remise en question. Des essais de suppression du nitrite dans le jambon cuit ont montré que l'absence de cet additif induisait le développement d'un arôme « rôti de porc », « viande cuite froide » ainsi que l'apparition d'une couleur « grisâtre » provoquant le rejet des jambons non nitrités par les consommateurs. Par ailleurs, des études de marché affirment que, si les consommateurs français d'aujourd'hui recherchent une alimentation plus saine et plus « naturelle », ils ne sont cependant pas prêts, dans le cas du jambon cuit, à sacrifier les qualités organoleptiques de cet aliment. La perte de couleur réduit drastiquement l'acceptabilité du produit. Malgré cela il est possible qu'une communication explicitant les qualités mais aussi les risques liés au nitrite permette d'atténuer les *a priori* face à la couleur grisâtre peu engageante du jambon non nitrité. Au vu des nombreux antagonismes d'ordre organoleptiques et sanitaires dus à la suppression du nitrite, il est clair que remplacer cet additif polyfonctionnel reste un challenge complexe que nous n'aborderons que partiellement dans cette étude.

Notre objectif principal est seulement focalisé sur la recherche de solutions technologiques qui, sur un plan aromatique, permettraient de remplacer le nitrite dans la fabrication du jambon cuit grâce à l'emploi d'ingrédients naturels. Les qualités « colorantes » potentielles ou antimicrobiennes des additifs utilisés seront quant à elles abordées dans les Annexes I et II de ce travail.

Le premier chapitre de la thèse est consacré à une étude bibliographique qui traite à la fois de l'importance du nitrite dans le secteur de la charcuterie et des salaisons, mais aussi des risques associés à son usage. La toxicité probable de cet additif polyfonctionnel a déjà inspiré de nombreuses études dans l'élaboration de produits non nitrités ou à teneurs réduites en nitrite ; la viabilité et les limites des solutions qui ont déjà été proposées seront aussi présentées.

Le second chapitre de ce travail est rédigé sous la forme d'articles publiés ou acceptés (en langue anglaise) ou sous la forme de pré-publications (en langue française) en vue d'une éventuelle soumission dans la mesure où le secret industriel est levé par les partenaires. Les recherches ont été conduites dans une approche de « construction raisonnée de la qualité » et pour cela, une série d'expériences emboîtées ont successivement permis :

(i) de comprendre les mécanismes à l'origine de l'arôme du jambon cuit et d'explicitier pour la première fois le rôle du nitrite dans le développement de celui-ci.

(ii) de tester et de sélectionner des extraits végétaux aux forts potentiels antioxydants

(iii) d'évaluer les qualités aromatiques et l'état d'oxydation des formulations contenant à la fois le précurseur d'arôme et les extraits végétaux.

Cette étude a pu être réalisée grâce aux collaborations complémentaires de deux partenaires industriels : Fleury-Michon pour leur expertise concernant les aspects technologiques et Diana Naturals pour la recherche, le choix et l'application d'antioxydants naturels, d'un institut de transfert : l'IFIP (Institut de la Filière Porcine) et d'un institut de recherche : l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) pour les aspects scientifiques et analytiques.

La dernière partie présentera les conclusions et les perspectives de cette étude.

Chapitre I : Etude bibliographique

Avec plus de 250 000 tonnes de jambon cuit produites par an, le jambon cuit représente 25 % de la charcuterie totale produite en France. Cet aliment, très prisé des français qui en consomment près de 5 kg/an, est en outre apprécié pour sa forte teneur en protéines et son faible apport calorique. Les étapes de sa fabrication sont détaillées dans l'Annexe III.

Afin de contextualiser la problématique de la « suppression du nitrite à arôme préservé dans le jambon cuit », les différentes fonctionnalités du nitrite dans les produits de salaison, les risques associés à son utilisation ainsi que les aspects réglementaires seront présentés.

Plusieurs études s'étant déjà intéressées au problème de la suppression du nitrite ou de la réduction des doses employées, un état de l'art exposera les solutions déjà proposées ou testées.

I – Historique

Le procédé de salaison est un procédé de conservation qui existe depuis des millénaires. C'est l'utilisation d'un sel NaCl naturellement contaminé par du nitrate de potassium KNaNO_3 , aussi appelé salpêtre, qui est à l'origine des premières salaisons. Constatant l'effet « positif » du salpêtre sur les viandes, ce dernier passe alors du statut de « contaminant » au statut de « conservateur ». A la fin du 19^{ème} siècle, Polenski (1891) constate qu'une partie du salpêtre ajouté à la saumure est convertie en nitrite, sous l'action probable de microorganismes. Le nitrite, forme réduite du nitrate, se révèle en fait être le seul acteur des mécanismes conduisant à la typicité organoleptique des produits de salaison. Le nitrate de sodium a, de ce fait, progressivement été remplacé par le nitrite de sodium qui est aujourd'hui utilisé comme fixateur de la couleur et agent conservateur, référencé comme l'additif alimentaire E250.

Cet additif a toujours suscité l'intérêt des scientifiques : les premières études étaient plutôt consacrées aux nombreuses fonctionnalités du nitrite et aux mécanismes à l'origine de ses propriétés de conservation, mais plus récemment, c'est le risque qu'il constitue pour la santé des consommateurs qui est au centre des préoccupations.

II – Qualités du nitrite et ses mécanismes d'action en tant qu'additif

Si le nitrite est devenu un additif incontournable dans les produits carnés c'est qu'il est un ingrédient polyvalent à l'origine de quatre types d'actions essentielles :

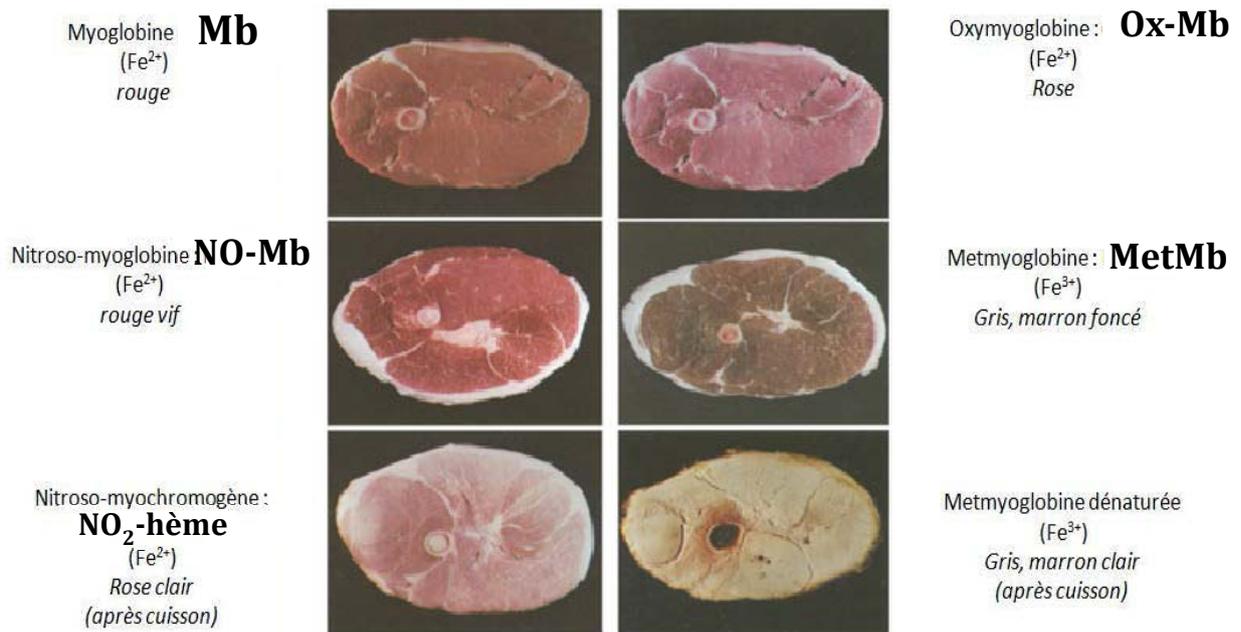


Figure 1. Les différentes formes de la myoglobine et leurs couleurs (adapté de Parthasarathy et Bryan, 2012).

- il préserve le produit des attaques microbiennes tout au long de sa fabrication et de sa conservation
- il est à l'origine du développement et de la stabilité de la couleur rose typique
- il assure une protection antioxydante efficace
- il est responsable de l'arôme typique des produits de salaison (Sindelar & Milkowski, 2011).

a. Action antimicrobienne

Bien que l'application des bonnes pratiques d'hygiène permette de réduire significativement le niveau de contamination des produits carnés, les risques de développements microbiens restent inéluctables. En tant qu'agent bactériostatique et bactéricide, le nitrite assure une grande partie de la sécurité sanitaire des viandes. Il est capable d'inhiber le développement de bactéries anaérobies et particulièrement *Clostridium botulinum* (Sofos, Busta, & Allen, 1979) dont la toxine botulique est mortelle pour l'homme. Il contribue aussi au contrôle d'autres microorganismes importants comme *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*. Les actions antimicrobiennes du nitrite sont multiples : inhibition de l'oxygène, inhibition d'enzymes essentielles au métabolisme des bactéries ou encore formation de nitrosothiols interférant sur le métabolisme des bactéries (Benedict, 1980). Le simple ajout de nitrite induit donc un large spectre d'actions inhibitrices envers des pathogènes variés (Weiss, Gibis, Schuh, & Salminen, 2010). D'autres facteurs interviennent dans l'inhibition du développement microbien : des facteurs intrinsèques à la viande comme le pH, l'activité de l'eau, le potentiel d'oxydo-réduction, la présence de fer libre, ou des facteurs extrinsèques comme la concentration initiale et résiduelle en nitrite, la concentration en sel, la température de cuisson et de conservation. La sécurité sanitaire du produit, tout au long de sa conservation, résulte ainsi de la combinaison de plusieurs facteurs dont le nitrite résiduel est un acteur clé (Grever & Ruiter, 2001). De ce fait, il est difficile de définir, dans des conditions générales, une quantité de nitrite minimale nécessaire pour assurer la protection microbienne. Plusieurs auteurs ont constaté l'inhibition du développement de la toxine de *Clostridium botulinum* dans des produits à base de porc à partir de seulement 50 mg.kg⁻¹ de nitrite ajouté (Gonzalez & Diez, 2002; Hustad, Cerveny, Trenk, Deibel, Kautter, Fazio, et al., 1973; Verkleij, Stekelenburg, & Stegeman, 2006) mais Tompkin, Christiansen, et Shaparis (1977) estiment que la qualité sanitaire n'est assurée qu'à partir de concentrations supérieures, allant de 70 à 200 mg.kg⁻¹ de nitrite. Ces doses sont d'ailleurs les plus communément employées dans l'industrie aujourd'hui.

b. Action sur la couleur

Le nitrite n'est pas directement responsable du développement de la couleur. Une première réaction, en conditions légèrement acides, permet de transformer le nitrite en acide nitreux HNO₂.

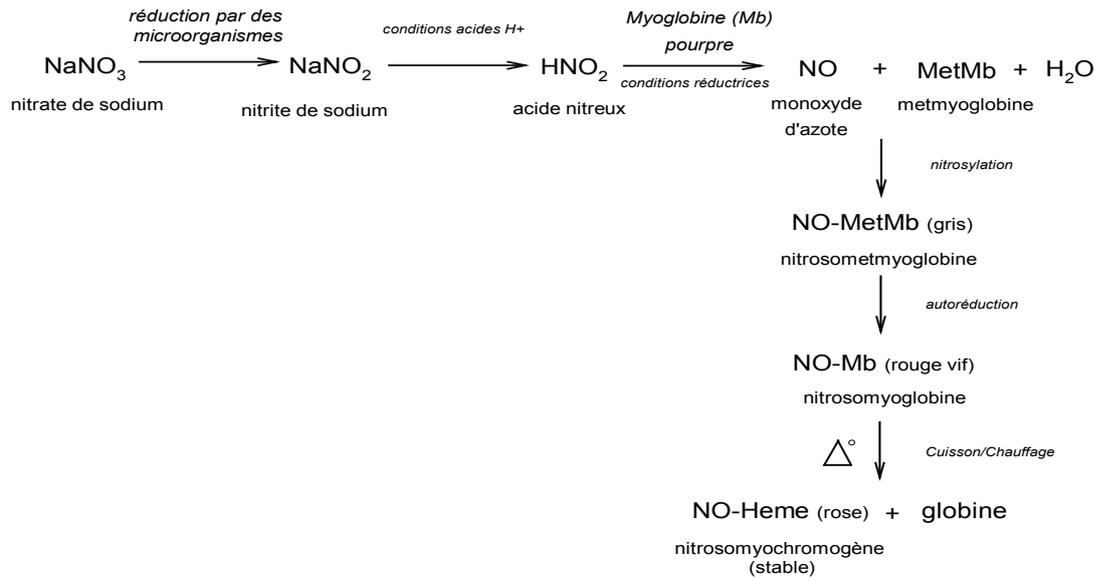
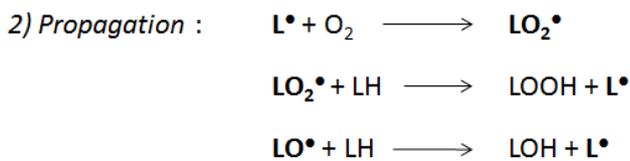


Figure 2. Formation du pigment nitrosomyochromogène responsable de la coloration rose des produits de salaison.

1) *Initiation* : Formation de radicaux alkyl L^\bullet , alkoxy LO^\bullet , peroxy LO_2^\bullet



L^\bullet = Radical alkyl d'un acide gras
 $LOOH$ = hydroperoxyde

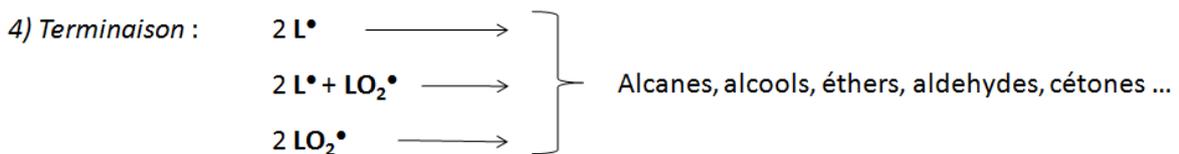
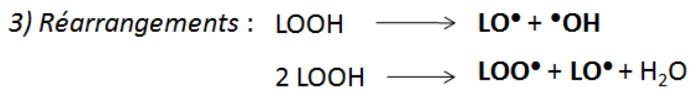


Figure 3. Réactions en chaîne impliquées dans l'oxydation lipidique (adapté de Grosch, 1982)

En conditions réductrices, l'acide nitreux réagit avec la myoglobine (Mb) de la viande (couleur pourpre, Figure 1) pour former du monoxyde d'azote (NO) et la metmyoglobine (MetMb). Le NO et la MetMb se complexent pour former la nitrosometmyoglobine (NO-MetMb) qui donne une couleur grise provisoire à la viande ; c'est la nitrosylation. La nitrosomyoglobine (NO-Mb) est ensuite obtenue à partir de l'autoréduction du complexe NO-MetMb ; ce nouveau pigment NO-Mb est responsable de la couleur rouge vive de la viande crue en sortie de malaxage (Figure 1). Durant la cuisson, la globine et l'hème, sur lequel est fixé le monoxyde d'azote NO, se séparent, tandis qu'un deuxième radical NO vient se fixer sur l'hème pour former le nitrosomyochromogène, un pigment plus stable, à l'origine de la couleur rose typique du jambon cuit (Figure 1). Au vu de toutes ces réactions, récapitulées dans la Figure 2, il est compréhensible que des paramètres comme : le pH, les propriétés oxydo-réductrices de la viande ainsi que la température et les paliers de cuisson agissent sur le bon développement et la stabilité de la couleur dans le jambon cuit. Le pH et les conditions réductrices sont des propriétés intrinsèques à la viande mais qui peuvent être modifiées par différents additifs comme l'acide ascorbique ou l'acide érythorbique (Parthasarathy & Bryan, 2012).

Des essais expérimentaux menés par l'IFIP montrent qu'un ajout de 15 à 30 mg.kg⁻¹ de nitrite de sodium suffit pour obtenir la couleur caractéristique des salaisons (IFIP, 2010). La teinte tend vers le rose dès l'ajout de 10 mg.kg⁻¹ de nitrite, et elle se stabilise à partir de 30 mg.kg⁻¹.

c. Action antioxydante

L'oxydation lipidique qui intervient dans la viande correspond à une série de réactions radicalaires en chaîne, impliquant des phases d'initiation, de propagation et de terminaison. Ces réactions sont initiées, catalysées et favorisées par la présence d'espèces pro-oxydantes comme l'oxygène, les UV ou de catalyseurs métalliques comme le fer. Il se forme dans ces conditions, un grand nombre de molécules volatiles odorantes (Figure 3), parfois responsables du développement d'une note aromatique « rance » qui contribue à la détérioration de la qualité du produit au cours de sa conservation. Pour pallier à ce problème, le nitrite est un excellent antioxydant (Macdonald, Gray, & Gibbins, 1980b,c) qui agit selon plusieurs mécanismes :

- par réaction avec l'oxygène : il empêche celui-ci d'initier les réactions radicalaires
- par réaction avec le fer de la myoglobine : il limite le relargage de fer libre pro-oxydant en stabilisant le cycle porphyrine (Sebranek & Bacus, 2007), sachant qu'il peut aussi chélater le fer libre
- par la stabilisation des composants de la membrane lipidique (Gray & Pearson, 1984)
- par la formation de dérivés nitrosés, comme la S-nitrosocysteine, produite pendant le saumurage, qui possèdent des propriétés antioxydantes (Andrée, Jira, Schwind, Wagner, & Schwägele, 2010).

Les premiers essais de Macdonald, Gray, et Gibbins (1980c) ont montré que 50 mg.kg⁻¹ de nitrite suffisaient pour obtenir une protection antioxydante satisfaisante dans le jambon cuit. Sebranek et Bacus (2007) ont ainsi pu constater qu'un apport de 50 mg.kg⁻¹ de nitrite réduisait l'oxydation de 50 à 64% par rapport à une viande de porc non nitritée. Des ajouts plus importants de nitrite permettent d'accéder à des performances antioxydantes supérieures : un ajout de 100 mg.kg⁻¹ peut réduire l'oxydation de 57 à 72%, et grâce à un ajout 200 mg.kg⁻¹ la réduction peut atteindre 91% (Sebranek & Bacus, 2007).

d. Action sur l'arôme

Le nitrite est responsable du développement de la saveur caractéristique des produits de salaison. Cet arôme spécifique et apprécié des consommateurs permet de différencier très facilement un jambon cuit d'une simple viande de porc cuite non nitritée (Jeremiah, Ball, Uttaro, & Gibson, 1996 ; Pegg, Fisch, & Shahidi, 2000). Pourtant le rôle du nitrite et les mécanismes à l'origine de cette saveur typique n'étaient toujours pas complètement élucidés lors du démarrage de la thèse. Deux hypothèses étaient cependant proposées à ce moment :

- Selon la première, le nitrite, grâce à son action antioxydante, limiterait l'apparition de composés odorants issus de l'oxydation lipidique et par conséquent éviterait une dégradation de l'arôme
- Selon la seconde, le nitrite induirait la production de composés spécifiques responsables de l'arôme de salaison.

La première hypothèse a été soutenue par plusieurs auteurs. Par exemple, Cross et Ziegler (1965) ont défini l'arôme de salaison comme un arôme « de base » ne nécessitant pas la présence du nitrite, mais qui ne pourrait pas s'exprimer à travers le masquage qu'induisent les composés d'oxydation odorants. L'hypothèse d'un tel phénomène est renforcée par l'observation d'une concentration en hexanal largement supérieure dans les produits non nitrités comparée à celle des produits nitrités (Ramarathnam, Rubin, & Diosady, 1991, 1993). L'apparition massive de ce composé fortement odorant, marqueur majoritaire de l'oxydation lipidique, a aussi été remarquée par chromatographie-olfactométrie dans la fraction volatile d'un jambon cuit non nitrité (Thomas, Mercier, Tournayre, Martin, & Berdagué, 2013). D'après Sebranek et Bacus (2007), la caractéristique aromatique induite par le nitrite est bien plus spécifique que la simple conséquence d'une protection antioxydante et elle ne peut pas être obtenue avec d'autres composés antioxydants. Cela rejoint la deuxième hypothèse émise par Gray & Pearson (1984), impliquant la formation de composés spécifiques responsables de cet arôme, obtenus par réactions entre le nitrite, des thiols ainsi que des amines.

Guillard, Le Quere, et Venduvre (1997) ont d'ailleurs pu détecter dans la fraction volatile du jambon cuit par chromatographie-olfactométrie, un composé possédant l'odeur typique de ce produit. Son

identification s'était, à l'époque, avérée impossible par spectrométrie de masse puisqu'il était présent à l'état d'ultra trace dans la matrice.

L'expérience indique que l'ajout de 40 mg.kg⁻¹ de nitrite permet d'induire un arôme significativement différent de celui d'une viande non nitritée (Pegg, Fisch, & Shahidi, 2000), mais que 50 mg.kg⁻¹ de nitrite sont nécessaires au développement de l'arôme typique de jambon cuit (Macdonald, Gray, Stanley, & Usborne, 1980a).

C'est finalement l'action antimicrobienne qui nécessite l'apport de nitrite le plus important (70-80 mg.kg⁻¹ de nitrite). La majeure partie du nitrite ajouté dans la viande est donc utilisée pour le contrôle de *C. botulinum* et la faible partie restante participe au développement de la couleur et de l'arôme ainsi qu'à la protection antioxydante. Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'action sur l'arôme dont les mécanismes étaient les moins explicités.

III – Risques liés au nitrite et réglementation de son utilisation

a. Le risque principal associé au nitrite : les nitrosamines

La fin des années 1960 a été un tournant décisif dans l'industrie des produits carnés lorsque les premières nitrosamines cancérigènes ont été identifiées dans du bacon nitrité. Les nitrosamines sont le résultat de la réaction entre le nitrite et les amines secondaires (Figure 4) et sont, pour la plupart, cancérigènes. Ces substances peuvent se former dans la viande, à partir d'amines secondaires issues de la dégradation des acides aminés qui a lieu durant le saumurage ou par cuisson à des températures supérieures à 130°C (Sindelar & Milkowski, 2011). Dans le cas du jambon cuit, les nitrosamines ont été détectées de façon sporadique (Gray & Pearson, 1984), mais ce n'est pas pour autant que ce produit nitrité est affranchit de tout risque sanitaire. En effet, le nitrite résiduel, présent dans les produits nitrités comme le jambon cuit, peut, dans l'estomac, conduire à la formation d'agents nitrosants, qui sont eux-mêmes à l'origine de nombreux composés N-nitrosés dont les nitrosamines (Figure 5). Une grande partie de ces composés sont reconnus carcinogènes, mutagènes ou capables de provoquer des malformations embryonnaires. C'est pourquoi, la consommation de produits carnés, et particulièrement de produits nitrités, est souvent accusée d'être à l'origine du développement de cancers gastriques ou colorectaux (Andrée, Jira, Schwind, Wagner, & Schwägele, 2010; DellaValle, Xiao, Yang, Shu, Aschebrook-Kilfoy, Zheng, et al., 2014; Demeyer, Honikel, & De Smet, 2008; Linseisen, Rohrmann, Norat, Gonzalez, Iraeta, Gómez, et al., 2006). Le cancer colorectal est l'un des plus meurtriers chez les non-fumeurs, c'est pourquoi, malgré l'absence de preuves consistantes de la relation entre la consommation de viande nitritée et l'apparition de cancers colorectaux (Bastide, Pierre, & Corpet, 2011), l'Agence Internationale de la Recherche sur le Cancer (IARC) indique que le

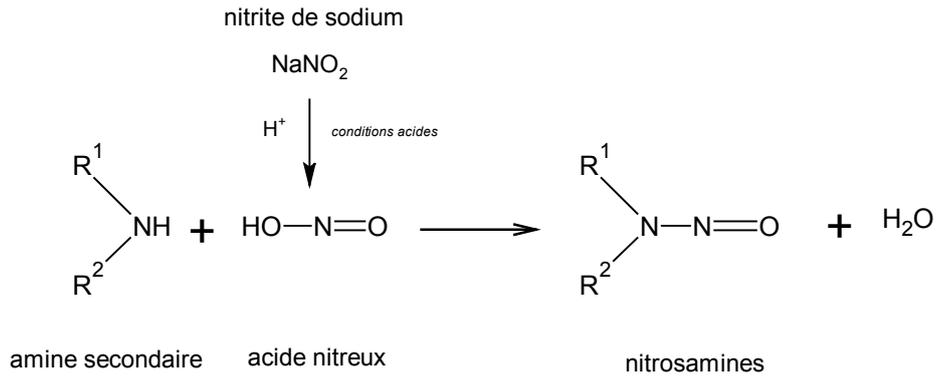


Figure 4. Formation des nitrosamines à partir d'une amine secondaire et du nitrite NO₂⁻.

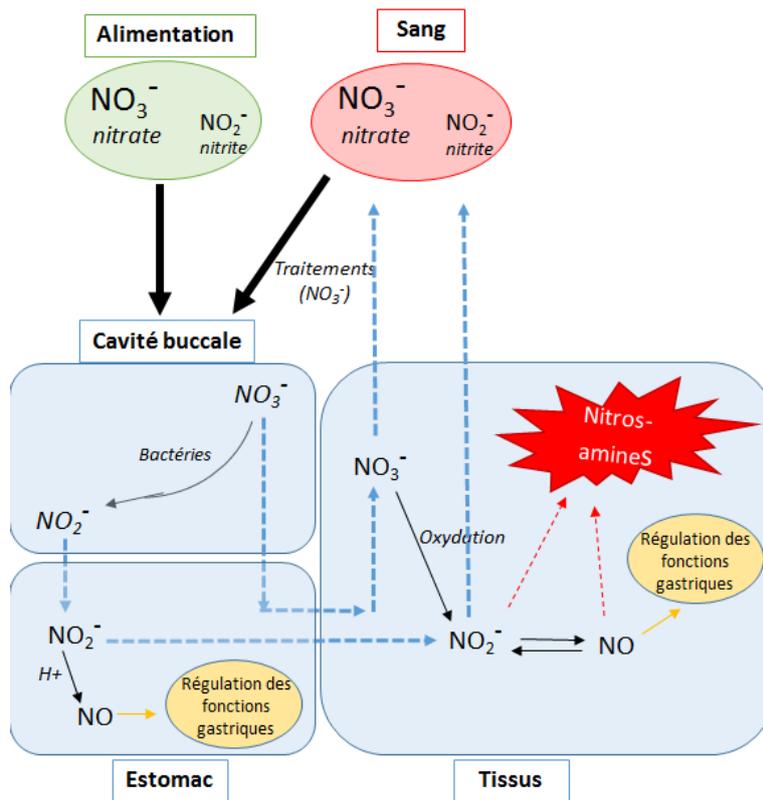


Figure 5. Cycle du nitrite et du nitrate dans le corps humain (adapté de Sindelar and Milkowski, 2011).

potentiel cancérigène de ces nitrosamines endogènes ne doit pas être négligé. L'EFSA (European Food Safety Authority) a de ce fait établi une Dose Journalière Autorisée (DJA) de 0,07 mg de nitrite/jour/kg de poids corporel, soit 5,6 mg de nitrite/jour pour un homme de 80 kg (EFSA, 2010).

Une trop grande consommation de nitrite, particulièrement chez les nouveau-nés et les enfants, peut aussi entraîner une méthémoglobinémie, ce qui correspond à une incapacité de l'hémoglobine à transporter l'oxygène. Sur ce point, les viandes nitritées ne constituent pas une source de nitrite suffisante pour représenter à elles seules un réel danger.

Selon l'US FDA (Food and Drug Administration of United States), la dose létale de nitrate est de 30 à 35 g, ingérée en une seule fois, tandis que pour le nitrite, elle est de 22 à 23 mg par kg de masse corporelle (Epley, Addis, Warthesen, & Service, 1992), soit environ 1,7 g pour un homme de 80 kg.

b. Des risques limités dans le cas des produits carnés

Malgré la possible formation de nitrosamines directement au sein des aliments nitrités et/ou indirectement dans l'estomac après leur consommation, plusieurs études indiquent que l'utilisation du nitrite aux doses réglementaires, dans les produits de salaison, ne représente aucune réelle toxicité (Corpet, 2011). Au contraire, selon Honikel (2008) les contaminations microbiennes que pourrait engendrer l'absence de nitrite représentent un risque sanitaire bien plus préoccupant. Les auteurs s'appuient sur le fait que, malgré la présence de plusieurs de leurs précurseurs dans la viande crue, les amines secondaires sont présentes en faibles quantités, ce qui limite le risque de former des nitrosamines durant le saumurage (Andrée, Jira, Schwind, Wagner, & Schwägele, 2010). De plus, dans le cas du jambon cuit, la cuisson à basse température (inférieure à 70°C en général) n'est pas favorable à la formation des nitrosamines (Loeppky, 1994). Même s'il existe une relation dose-réponse entre la consommation de produits carnés et le risque de développer un cancer colorectal, il est malgré tout difficile d'attribuer l'apparition de ce type de cancers à la seule présence du nitrite (Sebranek & Bacus, 2007). En effet, les produits de salaison véhiculent de grandes quantités de sel NaCl ainsi que de nombreux composés néo-formés lors de la cuisson, comme les amines hétérocycliques aromatiques ou les hydrocarbures polycycliques aromatiques, et ceux-ci représentent un risque sanitaire beaucoup plus élevé au vu de leurs concentrations.

Plusieurs études se sont même intéressées aux bienfaits de la consommation du nitrite (McKnight, Smith, Drummond, Duncan, Golden, & Benjamin, 1997; Parthasarathy & Bryan, 2012). En effet, à partir d'un certain âge, le corps ne produit plus assez de monoxyde d'azote NO nécessaire au maintien de la pression artérielle et au contrôle de l'afflux sanguin (Milkowski, Garg, Coughlin, & Bryan, 2010; Sindelar & Milkowski, 2011). C'est pourquoi certaines personnes sont amenées à suivre un traitement enrichi en nitrite pour combler ces carences en NO (Figure 5).

c. Consommation et réglementation

Dans le cas du jambon cuit, la formation des nitrosamines est presque essentiellement liée au nitrite résiduel. La concentration résiduelle en nitrite correspond généralement à 11-14% de la quantité de nitrite initialement ajoutée dans la saumure, soit environ 11 à 14 mg pour un kilo de jambon cuit « traditionnel ». L'apport « direct » de nitrite *via* les produits de salaison représente environ 2 mg/jour (Linseisen, et al., 2006).

Mais, à cette quantité de nitrite, il faut ajouter la quantité de nitrate apportée par les légumes et l'eau potable, qui peut être convertie en nitrite une fois consommée, grâce aux nitrate-réductases de la microflore buccale et/ou aux bactéries entériques. En estimant que 5 à 8 % du nitrate ingéré soit converti, cela représente en Europe, un apport « indirect » moyen de nitrite de 1,7 mg/jour. A cause des difficultés à quantifier le nitrite résiduel et à estimer le taux de conversion du nitrate ingéré en nitrite, l'évaluation précise de la consommation moyenne de nitrite et, par conséquent, des risques encourus, reste compliquée. Linseisen, et al. (2006) ont estimé entre 1,1 et 5,4 mg/jour/personne la consommation moyenne journalière de nitrite en Allemagne, en Espagne et au Royaume-Uni ; cette consommation moyenne est finalement assez proche de la DJA de 0,07 mg de nitrite/jour/kg de poids corporel ...

De nos jours, la consommation de produits carnés est de plus en plus importante en Europe, et celle de jambon cuit est particulièrement importante en France puisqu'elle se situe entre 9 et 11 g/jour. A cause de la méconnaissance des mécanismes conduisant à la formation des nitrosamines et des difficultés à estimer la consommation moyenne de nitrite, la prudence est de mise afin d'assurer la santé de la population. C'est pourquoi les quantités de nitrite et de nitrate utilisées dans les produits de salaison, et non plus les quantités résiduelles comme auparavant, sont aujourd'hui réglementées. Le règlement CE n°1333/2008 sur les additifs alimentaires autres que les colorants et les édulcorants, établit en Europe (sauf au Danemark), dans les produits à base de viande, des quantités maximales d'incorporation de 150 mg.kg⁻¹ de nitrite de sodium NaNO₂ auxquelles peuvent être ajoutés 150 mg.kg⁻¹ de nitrate de sodium NaNO₃, uniquement dans les produits traités thermiquement. Le Danemark est plus sévère puisque leur législation prévoit une dose maximale de nitrite de sodium de 60 mg.kg⁻¹.

IV – Vers une réduction partielle ou la suppression du nitrite ?

Le nitrite, additif de synthèse et possiblement cancérigène, n'échappe pas aux réclamations des consommateurs demandeurs d'une alimentation « plus saine et plus naturelle ». Dans le cas des produits de salaison « bio », le règlement (CE) n°89/2008 prévoit pour les produits à base de viande, traités thermiquement comme le jambon cuit, 80 mg.kg⁻¹ de NaNO₂ en dose indicative d'incorporation et 50 mg.kg⁻¹ de NaNO₃ en quantité maximale résiduelle. Aux Etats-Unis et au Canada, la législation, plus stricte, interdit l'utilisation du nitrite. Alors que dans la majorité des cas les produits de salaison labélisés

« bio » possèdent les mêmes caractéristiques que les produits « conventionnels, l'absence de nitrite dans le jambon cuit entraîne non seulement le développement d'une couleur grisâtre (associée, à tort, à l'image d'un produit impropre à la consommation), mais aussi une perte d'arôme et une réduction de la durée de conservation du produit qui rendent la commercialisation des jambons non nitrités très compliquée (Hamm, 2007). C'est pourquoi de nouvelles formulations doivent être mises en œuvre pour répondre à la demande des consommateurs.

a. Substitution du nitrite « synthétique » par le nitrite « naturel »

Puisque la « labellisation bio » n'autorise pas l'utilisation de conservateurs chimiques synthétiques comme le sel nitrité, une alternative a été proposée : l'introduction indirecte de nitrite dans les produits de salaison *via* l'ajout d'ingrédients naturellement riches en nitrate, comme le sel de mer (Wojciak, Karwowska, & Dolatowski, 2014) ou encore des extraits végétaux de céleri, de betterave ou d'épinards (Sebranek, Jackson-Davis, Myers, & Lavieri, 2012). En effet, à la cuisson et grâce à l'action d'enzymes « nitrate réductase », une partie du nitrate contenu dans les extraits végétaux ou dans le sel de mer est convertie en nitrite et ce dernier agit dans la viande de la même manière que lorsqu'il est ajouté directement sous la forme d'additif synthétique (Sebranek & Bacus, 2007). De cette manière, à partir de jus de carotte, de céleri, de betterave ou d'épinards contenant entre 171 et 3227 mg.kg⁻¹ de nitrate, il est possible d'obtenir des concentrations en nitrite comprises entre 128 et 189 mg.kg⁻¹ d'extrait après 10 jours à température ambiante (Sebranek & Bacus, 2007). Cette solution permet d'accéder, « sans nitrite ajouté », à toute la gamme d'actions du nitrite (organoleptiques, antioxydantes et antimicrobiennes) avec une efficacité similaire (Sebranek, Jackson-Davis, Myers, & Lavieri, 2012). Mais cette alternative a ses limites, la première et la plus importante concerne le nitrite résiduel (Krause, Sebranek, Rust, & Mendonca, 2011). En effet, si l'ajout de ces extraits naturellement riches en nitrite permet d'obtenir les mêmes qualités que l'ajout de nitrite « synthétique », il s'accompagne aussi des mêmes défauts. Il est à noter que dans les produits réalisés selon ce procédé, la concentration en nitrite résiduel peut varier entre 0,9 et 9,2 mg.kg⁻¹ de viande (Sebranek & Bacus, 2007), sachant qu'elle est proche de 6 mg.kg⁻¹ dans du jambon cuit réalisé avec du sel nitrité (De Gonzalez, Osburn, Hardin, Longnecker, Garg, Bryan, et al., 2012). Cette stratégie alternative ne réduit pas les quantités résiduelles du nitrite qui est accusé d'être à l'origine des nitrosamines endogènes (Andrée, Jira, Schwind, Wagner, & Schwägele, 2010) ; cela ne diminue donc pas les risques encourus. De plus, la conversion du nitrate en nitrite dépendant à la fois de la concentration initiale en nitrate, de la nature du ferment et de ses conditions d'utilisation (Sebranek, Jackson-Davis, Myers, & Lavieri, 2012), cela implique que la teneur en nitrite « introduit indirectement » dans le produit et la teneur résiduelle ne peuvent être ni prédites ni maîtrisées avec précision.

Un second problème s'impose cette fois-ci sur un plan organoleptique. En effet ce type d'additif (extraits en poudre) est généralement utilisé à 0,3% dans les saumures ; c'est-à-dire que, même pour un extrait végétal très riche en nitrate, par exemple 30 000 mg.kg⁻¹, la concentration en nitrite résultante sera seulement de 90 mg.kg⁻¹, même si la conversion est réalisée à 100%. Introduire une plus grande quantité de nitrite nécessite donc un ajout d'extrait plus important, qui peut alors être vecteur de perturbations inacceptables de l'arôme (par exemple une note aromatique perceptible de céleri) ou de la couleur (par exemple une coloration verte due à un extrait d'épinards). Cela limite par conséquent l'utilisation de ces extraits.

Cette alternative ne permet pas de réduire les risques cancérigènes associés au nitrite puisqu'elle permet seulement de modifier l'origine du nitrite ajouté et conserve les inconvénients d'un apport direct.

b. Réduction du nitrite

D'autres stratégies visant à limiter les risques encourus, aspirent plutôt à réduire les quantités de nitrite ajoutées. Différentes substances naturelles ont ainsi été employées dans le but de renforcer l'efficacité du nitrite et donc de réduire ses quantités d'utilisation.

Sur le plan bactériologique par exemple, une protection antimicrobienne équivalente à celle induite par un ajout de 100 mg.kg⁻¹ de nitrite peut être obtenue grâce à seulement 25 mg.kg⁻¹ de nitrite si ce dernier est utilisé en présence d'une combinaison d'acides organiques à longues chaînes issus de plantes (Paelinck & Szczepaniak, 2005; Szczepaniak, Paelinck, & Gyselinck, 2005).

De la même manière, l'utilisation d'une viande issue de porcs ayant reçu une alimentation enrichie en acétate d'*alpha*-tocopheryl a permis d'abaisser les quantités de nitrite utilisées à 25 mg.kg⁻¹, tout en obtenant une protection antioxydante équivalente à celle d'une viande nitritée à 100 mg.kg⁻¹ (Dineen, Kerry, Lynch, Buckley, Morrissey, & Arendt, 2000).

La perte de couleur liée à l'absence de nitrite peut, par exemple, être compensée par l'emploi du ferment *Lactobacillus fermentum* qui permet de former la nitrosomyoglobine et d'induire une couleur identique à celle d'un produit nitrité (Zhang, Kong, & Xiong, 2007). Il est aussi envisageable d'employer tout simplement des additifs naturellement colorants (Finkgremmels, Dresel, & Leistner, 1991), dans la mesure où ils sont légalement utilisés à d'autres fins que la simple « coloration ».

D'autres ingrédients naturels agissent simultanément sur plusieurs caractéristiques associées au nitrite. Par exemple, l'ajout de chitosane, un composant de l'exosquelette des crustacés, dans des jambons contenant deux fois moins de nitrite a permis de développer un arôme mais aussi une couleur identiques à ceux d'un jambon de référence nitrité à 100 mg.kg⁻¹.

Les durées de conservation et la protection microbiologique ont aussi été largement améliorées (Garcia, Beldarrain, Fornaris, & Diaz, 2011). Cependant l'introduction de substances d'origine animale autre que le porc est interdite dans la fabrication du jambon cuit.

Des extraits de canneberge, de pépin de raisin, de citron ou d'acérola, utilisés pour leurs propriétés antioxydantes ont également induit une protection antibactérienne satisfaisante (Xi, Sullivan, Jackson, Zhou, & Sebranek, 2011) et sont, à ce titre, de bons candidats au développement de solutions « naturelles » pour envisager une substitution relativement polyfonctionnelle au nitrite.

Plus simplement, des processus technologiques peuvent permettre de limiter l'emploi du nitrite comme, par exemple, un traitement des aliments sous de fortes pressions capables de détruire les microorganismes, ou encore la limitation du contact avec l'oxygène, la diminution de l'activité de l'eau, le choix des matières premières... (Chawla & Chander, 2004; Demeyer, Honikel, & De Smet, 2008).

Dans ce travail de thèse, l'objectif principal était de supprimer complètement l'utilisation du nitrite dans la fabrication du jambon cuit, tout en préservant son arôme typique. Les problèmes liés à la couleur et à la protection antimicrobienne seront seulement évoqués comme perspectives ou objectifs futurs. L'implication du nitrite dans le développement de l'arôme étant non élucidée, la première étape de cette étude sera d'identifier les molécules odorantes clés ainsi que les éventuelles interactions perceptives conduisant aux propriétés aromatiques recherchées.

Répondre à la problématique de « la suppression du nitrite dans le jambon cuit » permettra peut-être d'élargir cette stratégie à tous les produits de salaison et ainsi d'anticiper une possible évolution de la législation relative à l'utilisation du nitrite. N'oublions pas que le Danemark impose déjà une dose maximale d'utilisation du nitrite beaucoup plus faible de 60 mg.kg^{-1} , qu'il serait judicieux de réduire encore.

Chapitre II : Expériences, résultats et discussions

Le jambon cuit étant une matrice complexe et hétérogène, des fabrications de mini-jambons cuits ont été mises au point afin d'avoir accès à un milieu modèle (i) homogène, obtenu à partir d'un seul muscle haché et (ii) formulé le plus simplement possible, car contenant uniquement de l'eau, du sel et les « ingrédients à tester », sans les aromates ou les conservateurs rencontrés habituellement dans les produits industriels. Ces mini-jambons modèles ont été utilisés pour toutes les expériences menées au cours de la thèse et les mini-jambons non nitrités N⁻ ou nitrités N⁺ ont respectivement représenté la référence négative ou la référence positive à atteindre.

La première partie de l'étude a permis d'étudier l'impact du nitrite sur l'arôme du jambon cuit et d'identifier les molécules soufrées clés responsables de celui-ci. Plusieurs précurseurs de ces molécules ont ensuite été proposés et utilisés directement dans des mini-jambons modèles expérimentaux afin de sélectionner le(s) plus efficace(s) dans les conditions de fabrication du jambon cuit.

La deuxième partie de l'étude a été consacrée à un des points clés du bon développement de l'arôme : la maîtrise de l'oxydation. La recherche d'ingrédients aux propriétés antioxydantes équivalentes à celles du nitrite a sollicité les connaissances du partenaire Diana Naturals qui a fourni les extraits végétaux employés. Les ingrédients sélectionnés ont été intégrés aux mini-jambons cuits et leurs performances antioxydantes ainsi que les propriétés aromatiques qu'ils induisent dans les jambons ont été évaluées.

Dans la troisième partie, l'arôme et l'oxydation ont été évalués dans des mini-jambons cuits contenant à la fois le précurseur d'arôme identifié dans la première partie et les extraits végétaux antioxydants les plus performants employés dans la deuxième partie.

Dans une optique de transfert à l'échelle industrielle, les jambons modèles les plus appréciés, élaborés en laboratoire, ont été réalisés à l'échelle pilote grâce au partenaire industriel Fleury-Michon et leur arôme a été évalué au sein des sites des quatre partenaires du projet. Compte-tenu de la disponibilité tardive des données, celles-ci n'ont été intégrées au document de thèse que sous la forme d'annexe (Annexe IV).

II – 1. Identification et origine des molécules clés de l'arôme du jambon cuit

L'étude globale de l'origine de l'arôme du jambon cuit et de l'implication du nitrite a été réalisée en trois parties :

- *II-1.1 : Effet du nitrite sur la fraction volatile odorante du jambon cuit*
- *II-1.2 : Identification et origines des composés odorants soufrés du jambon cuit*
- *II-1.3 : Effets d'ajouts de thiamine sur les composés odorants clés de l'arôme du jambon cuit.*

II – 1.1. Effet du nitrite sur la fraction volatile odorante du jambon cuit

(Article publié dans le journal « Food Chemistry » en 2013)

Une des actions notoires du nitrite sur les produits de salaison est son impact sur le développement de l'arôme typique de salaison. En effet en l'absence de nitrite dans le jambon cuit, une note aromatique « rôti de porc, viande cuite » apparaît, signant ainsi la différence entre un produit nitrifié ou non. Malgré le fait que cette différence d'arôme induise un rejet quasi unanime des jambons non nitrifiés par les consommateurs, l'origine de ce défaut n'était pas connue au commencement de la thèse ; tout comme les molécules clés responsables de la note aromatique « jambon cuit ».

L'objectif du travail de thèse étant de supprimer le nitrite tout en conservant l'arôme du jambon cuit, il est donc apparu essentiel d'élucider dans un premier temps l'effet du nitrite sur le développement de l'arôme de jambon cuit et d'en identifier les molécules odorantes clés.

Pour cela des mini-jambons nitrifiés et non nitrifiés ont été analysés par :

- chromatographie gazeuse couplée à l'olfactométrie multipostes (GC-8O), pour une détection exhaustive des odeurs constituant la fraction volatile du jambon cuit
- chromatographie gazeuse à une ou deux dimensions couplée à la spectrométrie de masse et/ou à l'olfactométrie monoposte (GC-GC-MS/O et GC-MS/O), pour une identification fiable des composés odorants
- analyse sensorielle afin d'évaluer l'arôme global des produits.



Effect of nitrite on the odourant volatile fraction of cooked ham

Caroline Thomas^{b,†}, Frédéric Mercier^a, Pascal Tournayre^a, Jean-Luc Martin^b, Jean-Louis Berdagué^a

^a Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UR 370 QuaPA, 63122 Saint-Genès-Champagnelle, France

^b IFIP – Laboratoire d’Essais et de Mesures Physiques, 94704 Maisons-Alfort, France

article info

Article history:

Received 27 August 2012

Received in revised form 22 November 2012

Accepted 7 January 2013

Available online 25 January 2013

Keywords:

Cooked ham

Key odourants

Nitrite

Chromatography olfactometry

Mass spectrometry

abstract

The aim of this work was to reliably identify the key odour compounds in cooked ham and acquire new knowledge on the role of sodium nitrite on the formation of its aroma. Gas chromatography coupled with mass spectrometry and (or) olfactometry was used. In all, 24 odourants were identified in the volatile fraction of cooked ham. Their main origins are discussed. Orthonasal sniffing of the hams was used to study how these substances contributed to the overall aroma of the product. The aroma of cooked ham is a balance between that of certain sulfur compounds produced during cooking and that of oxidation compounds commonly found in cooked meats. In the absence of nitrite, this balance is disturbed by extensive formation of oxidation compounds that mask the meaty notes induced by the sulfur compounds.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In cooked pork products, the use of the ancestral multifunction additive sodium nitrite is currently authorised by the European legislation on food additives under the designation “preservative” (E 250) by the directive 95/2/CE, modified, of the European Parliament and Council of Europe of 20 February 1995 on food additives other than colourants and sweeteners (Official Journal of the European Communities L61 of 18.3.95). Today this additive is considered irreplaceable for preserving cooked pork products, maintaining their wholesomeness and lending them characteristic organoleptic features (Sindelar & Milkowski, 2011).

Nitrite is used as a preservative for its antioxidant properties, which stabilize the unsaturated lipids of membrane tissues (Gray & Pearson, 1994; Honikel, 2008) and chelate the ferrous ion of haemoglobin, thereby preventing it from initiating oxidation of polyunsaturated fatty acids (Gray, 1994; Honikel, 2008; Sebranek & Bacus, 2007). Nitrite also possesses bacteriostatic and bactericidal properties that protect health through inhibiting the growth of anaerobic bacteria such as *Clostridium botulinum* or *Listeria monocytogenes* (Lücke, 2008; Sebranek & Bacus, 2007). Nitrite also induces organoleptic properties, such as colour and aroma, in cooked pork products. By binding to myoglobin, it forms a nitrosomyochromogenic complex after cooking, which imparts a pink colour (Honikel, 2008; Sebranek & Bacus, 2007). Nitrite is also responsible for the typical “cooked ham” aromatic note, which

allows a nitrite-cured cooked product to be easily distinguished from a nitrite-free one (Sindelar, 2011; Sindelar, Cordray, Sebranek, Love, & Ahn, 2007). The absence of nitrite leads to a marked degradation in the aromatic properties of the pork products, causing them to be rejected by consumers (Lücke, 2008; Sindelar, 2011). Despite its positive features, nitrite use entails an additional health risk for consumers. Several studies suggest that the nitroso compounds generated during cooking (Ferguson, 2010; Loeppky, 1994) are responsible for genetic modifications that may induce gastric or colorectal cancers (Corpet, 2011; Demeyer, Honikel, & De Smet, 2008; Sebranek & Bacus, 2007). In the face of a growing demand for healthier food, the maximum authorised dose in pork products may ultimately have to be reduced. However, given its many useful functions, abruptly banning nitrite from pork products is a difficult step because it would mean replacing a chemical health risk by a microbiological one, and also profoundly changing the organoleptic characteristics of the product.

The aim of this work was to acquire new knowledge about how nitrite helps to develop the aroma of cooked pork products, and so to describe the reaction mechanisms involved. For this purpose, we chose cooked ham, one of the most widely consumed pork products, the aroma of which is particularly sensitive to the absence of nitrite. We carried out sensory and instrumental analyses on model hams made with and without added nitrite. The sensory analyses were designed to characterise the effect of nitrite on (i) the perception of ham aroma, and (ii) the perception of different odour components detected by gas chromatography olfactometry. The instrumental analyses were designed to identify and semi-quantify these compounds.

[†] Corresponding author. Tel.: +33 (0) 473 62 44 99; fax: +33 (0) 473 62 47 31.

E-mail address: caroline.thomas@clermont.inra.fr (C. Thomas).

0308-8146/\$ - see front matter © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.033>

2. Materials and methods

2.1. Making of hams and sample preparation

Two recipes for cooked mini-hams: nitrite-cured and nitrite-free, were used at IFIP (Institut de la Filière Porcine, Paris) based on 10 kg of a mixture of muscles classically used to make cooked ham (including: *M. adductor*, *M. gracilis*, *M. semimembranosus*, *M. vastus lateralis*, *M. rectus femoris*, *M. biceps femoris* + *gluteobiceps* and *M. semitendinosus*). For each recipe, 5 kg of meat cut into 40 g pieces, and 500 g of brine were used. To make 1 kg of nitrite-free brine, 220 g of sodium chloride was added to 780 g of water. To make 1 kg of nitrite-containing brine, 218.7 g of sodium chloride and 1.32 g of sodium nitrite were added to 780 g of water; this gave a final content of 120 mg of sodium nitrite per kg of brined meat. To carry out this brining step, the meat was placed in two large bags (400 × 500 mm, PA/PE 20/70, VF 90, SOUSSANA DS France). In one bag it was placed in nitrite-containing brine, in the other in nitrite-free brine. The two bags were vacuum-sealed and both placed for 15 h at 2 °C in a kneader set to an alternating rotation cycle (5 min at 7.5 rpm) and rest period (10 min) to ensure diffusion of the brine in the meat. For each of the two runs, the brined meat pieces were placed in 20 heat-shrink bags (150 × 250 mm, Vacoflex-shrink SK 045 bags, SOUSSANA DS France) each with a final weight of about 250 g, and vacuum-sealed. All 40 bags were shrunk (immersion for 5 s in a water bath at 80–85 °C), and placed in three in aluminum molds (dimensions: 30 × 4.5 × 5 cm) to compress the meat as in industrial conditions. The cooking was carried out in a steam oven (heat cycle: 60 min at 40 °C, then 60 min at 55 °C, and hold for 150 min at 65 °C. The hams were taken out of the molds and cooled (20 min at 18 °C). They were left to ripen (3 days at 2 °C in a cold room) and deep-frozen (-80 °C). Each mini-ham was thawed for 12 h at ambient temperature (21 °C) before sensory or instrumental analysis. Before gas chromatography–olfactometry–mass spectrometry analyses, hams were cut into small cubes of about 1 cm³.

These cubes were placed in Pyrex[®] extraction cartridges (Ref. M3, Maillères, Aubières 63170, France) or in Petri dishes before direct sniffing.

2.2. Gas chromatography–olfactometry–mass spectrometry analyses

In this study, two complementary GC–MS/O instruments, coupled to identical dynamic headspace devices, were used to identify odourant compounds. The first instrument made an exhaustive inventory of odourant compounds by eight-way olfactometry coupled to mass spectrometry (GC–MS/O) (Berdagué, Tournayre, 2005; Berdagué, Tournayre, & Cambou, 2007). This system could detect a very large number of olfactory zones by accumulating the performance of eight sniffers, and rapidly identify a certain number of trivial compounds, which served as adjustment markers for the second instrumental analysis. The second instrument was a chromatography–olfactometry system with a single olfaction port. This instrument worked either in gas chromatography–mass spectrometry–olfactometry (GC–MS/O) mode to fit the GC–MS/O, or in two-dimensional chromatography mode (heartcut-type) coupled with mass spectrometry (GC–GC–MS/O) to make a detailed exploration of all the odourant zones observed by GC–MS/O. GC–GC–MS/O allows an excellent synchronization between the odour of a compound and its pure mass spectrum, which is essential for identification. In all, 32 GC–MS/O analyses (2 types of ham × 8 sniffers × 2 repeats) were performed in 4 sessions. The 22 odourant zones found by GC–MS/O (Fig. 1) were then explored in detail by GC–GC–MS/O for reliable identification of odourant compounds in the nitrated or nitrite-free cooked ham headspaces.

2.2.1. Extraction of volatile compounds

The volatiles were extracted by dynamic headspace (DH) coupled to gas chromatography (Tekmar, Cincinnati, OH 45234, USA). The extractor was maintained at ambient temperature (21 °C) and purged for 60 min with a helium stream at a flow rate

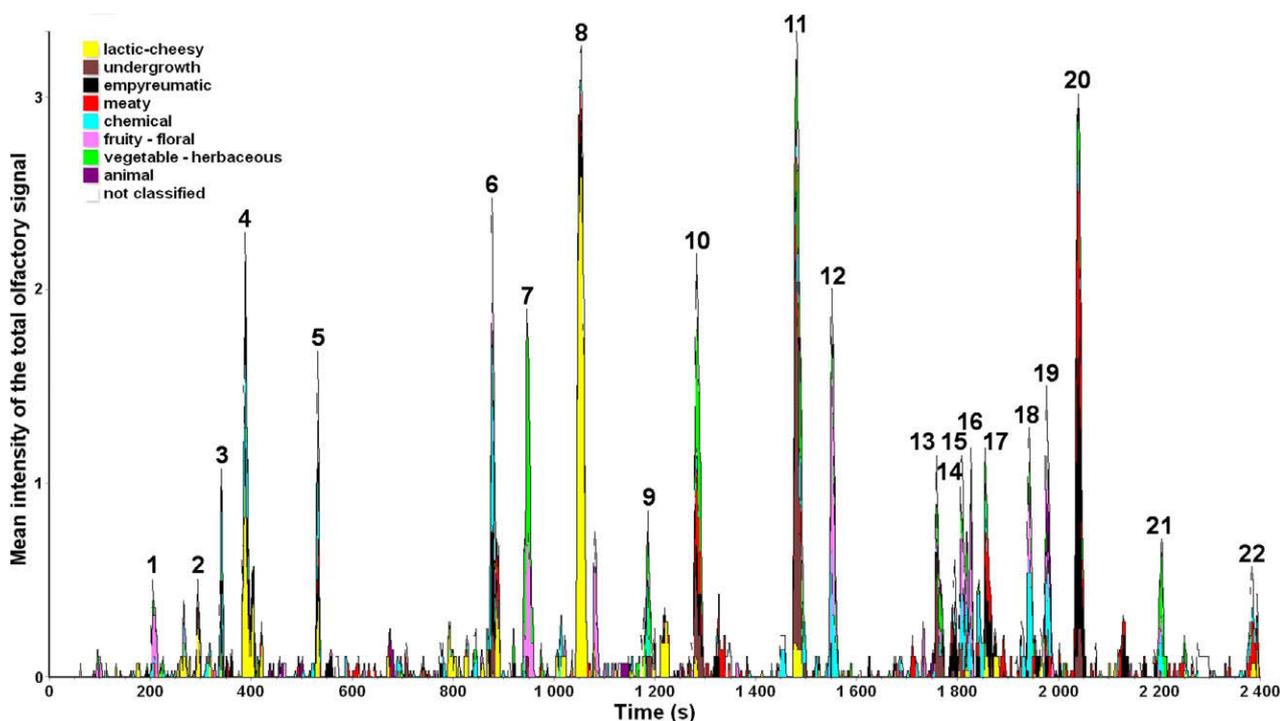


Fig. 1. Mean aromagram of cooked hams (with and without nitrite) calculated from the 32 individual sniffing sessions. The breakdown of the signal into nine odour classes shows the odourant zones belonging to a given olfactory class. Labels corresponding to the peak numbers are given in Table 1.

Table 1
List of identified potent odorants.

Peak number ^a	DB5 Retention time (min) ^b	Chemical name	Main origins ^c	LRI ^d DB5 (DBWAX)	Reliability of ID ^e	Main odour descriptions ^f	Nitrite effect ^g
1	3.37	Acetaldehyde	n.i.	348 (714)	A	Alcoholic, ethereal, pungent	n.s.
2	4.83	Ethanthiol	n.i.	508 (731)	A	Sulfurous, fruity, cabbage, potato, vegetable, cooked corn	✓
3	5.6	+Dimethyl sulfide	AA	517 (737)	A		
4	6.37	2-Methylpropanal	AA	551 (817)	A	Pungent, malt, green	n.s.
5	8.8	2,3-Butanedione	AA	585 (988)	A	Milk, butter	n.s.
6	14.53	3-Methylbutanal	AA	653 (924)	A	Malt, cocoa, almond	n.s.
	14.77	2-Methylthiophene	T/MR or LH	778 (1107)	A	Sulfurous, onion, roasted	n.s.
7	15.67	+Butyric acid		783 (1652)	A	Cheesy, vomit	
8	17.4	Hexanal	OL	799 (1087)	A	Fatty, green, grassy	✓
9	19.7	Isovaleric acid	AA	877 (1704)	A	Rancid, cheese, feet	✓
10	21.28	2-Heptanone	LO	889 (1195)	A	Spicy, fruity, cheesy	n.s.
11	24.57	3-(Methylthio)propanal	AA	907 (1473)	A	Potato, earthy	n.s.
		1-Octen-3-one	LO	978 (1315)	A	Mushroom: undergrowth	✓
		+1-Octen-3-ol	LO	979 (1446)	A		
12	25.77	Octanal	LO	1002 (1303)	A	Fatty, orange, peely, citrus, green	✓
13	29.23	1-Nonen-3-ol + 1-Nonen-3-one	LO	1077 (1554)	B	Oily-creamy, undergrowth, mushroom	n.s.
14	29.8	Unknown	n.i.	– (–)	–	Chocolate, cardboard, cat urine	✓
15	30.08	2-Nonanone	LO	1091 (1394)	A	Creamy, fatty, cheesy, fruity, floral	✓
16	30.42	Nonanal	LO	1104 (1399)	A	Floral, citrus, fatty, waxy	n.s.
17	31.2	Unknown	n.i.	– (–)	–	Vomit, fat, peanut	n.s.
18	32.28	1-Nonanol	LO	1154 (1651)	A	Oily, fatty, ethereal, slightly floral-fruity	✓
19	32.87	2-Nonenal	LO	1179 (1548)	B	Fatty, green, cucumber, fried	n.s.
20	33.87	2-Methyl-3-(methylthio)furan	T/MR	1185 (1680)	A	Sulfurous, meaty, cooked ham, roasted beef	n.s.
21	36.65	2-Decenal	LO	1252 (1645)	B	Oily, waxy, citrus, fatty; floral	✓
22	39.62	Deca-2,4-dienal	LO	1323 (–)	C	Citrus, fatty	n.s.

^a Peak number in Fig. 1.

^b Retention time (min) of the odours with the GC–MS/80 device.

^c Main chemical or biochemical origins: AA = amino acid breakdown; LH = lipid hydrolysis; LO = lipid oxidation; T/MR = thiamin degradation and (or) Maillard reaction; n.i. = not identified.

^d Linear retention indices calculated for apolar (RTX-5) and polar (DB-WAXETR) capillary columns.

^e The reliability of identification proposal is indicated by the following symbols: A, B = retention times in agreement with standard, odour and purified mass spectrum using the MS3 Mass Spectra Separation Software (Abouelkaram & Berdagué, 2010); C = mass spectrum, odour and retention time on apolar phase in agreement with standard.

^f Main odours reported by the sniffers.

^g Nitrite effect on GC–MS/80 peaks: ✓ $p < 0.01$; n.s. = not significant.

of 40 ml min⁻¹ (Messer, He/U purity: 99.995%). The trap (Tenax® TA 60/80 mesh adsorbent, Supelco Bellefonte PA 16823 USA; working length 180 mm and inside diameter 1/4" for GC–MS/80 or 1/8" for GCMS/O and GC–GC–MS/O analyses) operated at 30 °C. The dry purge step was set at 30 min. The volatile components were then desorbed from the trap at 180 °C for 10 min using helium (Messer, He/N55 purity: 99.9995%) and sent into the cryofocalization area (cooled to -150 °C with liquid nitrogen).

2.2.2. Chromatography–olfactometry

After injection by heating at 180 °C for 2 min., volatiles were separated and smelled according to Berdagué et al. (2007) for the GC–MS/80 analyses and according to Breme et al. (2009) and Théron et al. (2010) for the GC–MS/O and GC–GC–MS/O analyses. The selected sniffers were non-smokers with no known health disorders, less than 40 years old, and with attested sensitivity and ability to detect and consistently describe a wide range of odours in gas chromatography–olfactometry (GC/O) trials. To describe the odours, the sniffers could use a free vocabulary that was to remain as simple and precise as possible and avoid all hedonic judgment. The sniffers had no information on the nature of the samples analysed, and were remunerated for their participation. The duration of the olfactometry analyses was 40 min (2400 s). The scan speed of acquisition was 2 scans⁻¹. GC/O data were analysed with the AcquiSniff® Software (Berdagué & Tournayre, 2002; Tournayre & Berdagué, 2003).

2.2.3. Mass spectrometry, identification and semi-quantification of volatiles

Volatiles were detected by electronic impact ionisation at 70 eV. Ions were scanned over the range 33 < m/z < 230 a.m.u., and identified

using spectral databases (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library 2008) and by comparisons with databases of linear retention indices (Kondjoyan & Berdagué, 1996). Linear retention indices

were measured on apolar (RTX5-MS, length 60 m, internal diameter: 0.32 mm, film thickness: 1 μ m, Resteck Corporation) and polar (DB-WAXETR, length 30 m, internal diameter: 0.32 mm, film thickness: 1 μ m, J&W Scientific) chromatographic columns. In order to enhance the quality of identification of co-eluted peaks: (i) purified mass spectrums were extracted from the one-dimensional GC–MS signals by using the MS3: Mass Spectra Separation Software (Abouelkaram & Berdagué, 2010) and (ii) comprehensive gas chromatography–mass spectrometry (SPME–GCxGC–MStof) analyses were also performed according to Théron et al. (2010). The odour of the candidate structures identified by mass spectrometry was compared with their odour as described in several databases (<http://www.thegoodscentscompany.com>, <http://www.flavornet.org/>), and with their odour after co-injection of pure reference compounds. To complete the information obtained by olfactometry, the odourant compounds were semi-quantified by mass spectrometry by measuring the area of the chromatography peaks from the ion currents of their specific ions. Measurements were stabilized by performing the analyses in triplicate.

2.3. Direct sniffing

Analysis of the odour of the hams by orthonasal sniffing was carried out by the eight panellists who took part in the GC/O sessions. The panellists were made familiar with the products and the “cooked ham” and “roast, oxidised meat” odourant notes in a training session during which they smelled nitrite-cured and

nitrite-free products. Four sniffing sessions were then held, spread over four different days. During these sessions the two types of ham were presented simultaneously, using a protocol that eliminated the “order of presentation” effect. The panellists were asked to record the intensity of the “cooked ham” and “cooked pork meat odour” odourant notes on two non-structured scoring scales from 0 to 10. The analyses took place in individual booths under a red light, so that the panellists were not influenced by the difference in colour of the hams. In all, 64 analyses (two types of ham \times 8 sniffers \times 4 repeats) were performed.

2.4. Statistical analyses

2.4.1. GC–MS/80 analyses

To identify the odorous peaks significantly influenced by the presence of nitrite, 2400 ANOVAs were performed on the 2400 scans of the GC–MS/80 analyses according to the model: $\text{Scan}_{i,j,k} = \mu + N_i + S_j + \epsilon_k$ ($\text{Scan}_{i,j,k}$ = intensity of the odour at a given retention time, μ = mean effect of the model, $N_{i=2}$ = nitrite effect, $S_{j=8}$ = sniffer effect and $\epsilon_{k=2}$ production runs = residual variance). In all, 32 individual GC/O analyses were performed and the F_{Fisher} values and associated probabilities were computed from a matrix of 2400 scans \times 32 analyses.

2.4.2. Analyses of ham odours

To study the effect of nitrite on the sensory descriptors, ANOVAs were performed according to the model: $\text{Odour}_{i,j,k} = \mu + N_i + S_j + \epsilon_k$ ($\text{Odour}_{i,j,k}$ = intensity of the odour, μ = mean effect of the model, $N_{i=2}$ = nitrite effect and $S_{j=8}$ = sniffer effect and $\epsilon_{k=4}$ production runs = residual variance). In all, 64 individual orthonasal analyses of the

ham odours were performed and the F_{Fisher} value and associated probabilities were computed from a matrix containing 2 odour descriptors \times 64 analyses.

All the computations were performed with Statistica software, version 8 (Tulsa, OK, USA).

3. Results and discussion

3.1. Nature and origin of the odour-active compounds in cooked hams

The analyses carried out using the GC–MS/80 system yielded average aromagrams of the nitrite-cured and nitrite-free cooked hams (Fig. 1). The breakdown of the total olfactory signal by odour class with the AcquiSniff software enables us to visualise the verbal information associated with the odorous zones of the aromagram (Fig. 1). In all, 22 major zones with different odour properties and variable intensities were evidenced. Analysis of the vocabulary items given by the sniffers groups the zones into eight odour classes: “Animal”, “Chemical”, “Empyreumatic”, “Fruity-Floral”, “Lactic-Cheesy”, “Undergrowth”, “Vegetable, Herbaceous” and “Meaty”. The items not covered by these classes were grouped under “Not classified”. The odorous compounds were then identified by GC–MS/O and GC–GC–MS/O (Table 1). The odours of 2,3-butanedione and isovaleric acid (respectively, butter and feet-cheesy odours) classified in the “Lactic-Cheesy” class and the odours of 1-octen-3-ol and 1-octen-3-one (mushroom odour) classified in the “Undergrowth” class were consensually described by the panel. The descriptions were less consensual for most of the other odorous zones, but were consistent with those reported in the odour databases. Aldehydes (hexanal, octanal, nonanal,

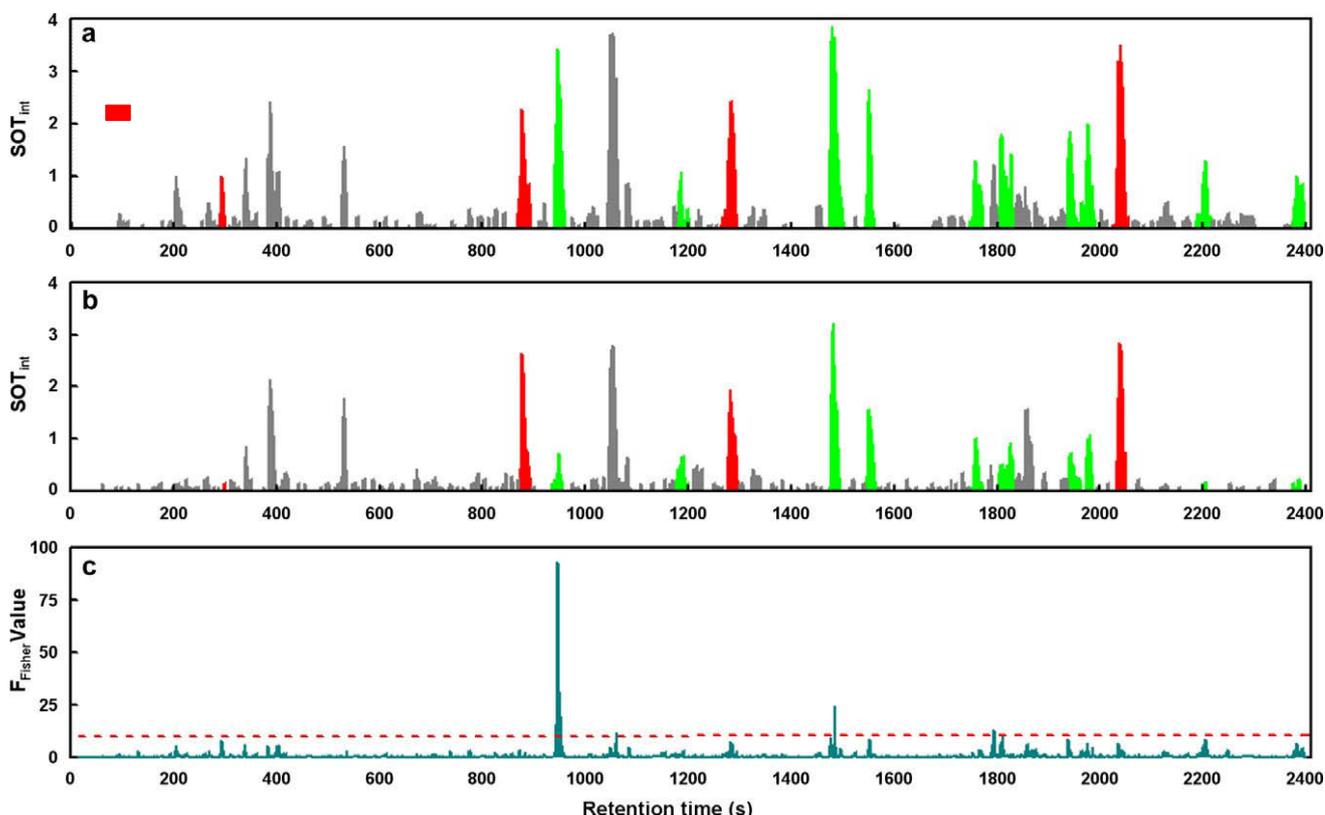


Fig. 2. GC–MS/80 aromagrams of cooked hams without (a) and with (b) nitrite expressed in mean intensities of perception, each calculated from 16 individual sniffing sessions (one type of ham \times 8 sniffers \times 2 repeats). The breakdown of the signal into three classes of chemical origin shows the odorant zones originating from: ■ = lipid oxidation, ■ = sulfur compound degradation and ■ unspecified origins. The ANOVAgram (c) presents the F_{Fisher} values computed for each scan of the aromagram for the nitrite effect (the F_{Fisher} values above the red dotted line are significant with $p < 0.01$). Results clearly show a very significant effect of nitrite on the lipid oxidation products (peak seven of hexanal in particular) and a non-significant effect on the other compounds.

2-nonenal and 2-decenal) were mostly described as “Fruity-Floral” and “Vegetable, Herbaceous” or “Fruity-Floral” and “Chemical”. Most of the oxidation products identified had very low identification thresholds in air (Gemert & van Nettenbreijer, 1977). 2-Methyl-3-(methylthio) furan (Labelled “M” in Fig. 3) was described as “Meaty” and “Empyreumatic”. Present in trace amounts, this compound is difficult to detect by mass spectrometry in ham other than in the selected ion monitoring (SIM) scanning mode. On the other hand, it possesses a very low detection threshold in air of less than 0.02 ng L^{-1} , and is one of the odorous compounds most readily detected and most intensely perceived by the sniffers. The pure odour of 2-methyl-3-(methylthio)furan was perceptible only by olfactometry (GC–GC–MS/O). This compound is commercialised in an impure form containing a large number of other very odorous sulfur-containing compounds (confirmed by GC–MS/O), and these impurities disturbed the perception of its true odour. In this work, special attention was paid to 2-methyl-3-(methylthio) furan, because its odour as perceived by GC–MS/80 is very similar to that perceived by orthonasal sniffing of nitrite-cured cooked ham; hence it is very probably a key component of the aroma of this product.

Meat fatty acid oxidation explains the presence of the numerous saturated or unsaturated aldehydes with 6–10 atoms of carbon, ketones and alcohols (Brunton, Cronin, & Monahan, 2002; Mottram, 1998). This oxidation, facilitated by a composition of meat rich in unsaturated fatty acids (Elmore, Mottram, Enser, & Wood, 1999), is catalysed by the presence of iron in muscle tissue (Mercier, Gatellier, & Renere, 2004; Min, Cordray, & Ahn, 2010). Short branched aldehydes are naturally present at trace levels in fresh meat, and originate from the animal metabolism. The oxidative degradation of branched amino acids via Strecker mechanisms is responsible for the major formation of compounds such as 3-methylbutanal, 2-methylpropanal (Estevez, Ventanas, & Heinonen, 2011) or isovaleric acid in ripened products or during cooking at low temperatures (Bertrand et al., 2011; Elmore et al., 1999). 2, 3-Butanedione is mostly derived from the hydrolysis and subsequent oxidative degradation of glycogen (Yaylayan & Keyhani, 1999). The five sulfur compounds come from the breakdown of sulfur-containing precursors, such as amino-acids and thiamine (or vitamin B1), during cooking. Dimethyl sulfide (sulfur odour) originates from the condensation of methanethiol, which comes essentially from methionine (Nanamori et al., 2008). Methional or 3-methylthiopropanal (potato odour, threshold in air 0.06 ppb , Gemert, 1977) is formed by the oxidation of methionine via Strecker degradation (Chan & Reineccius, 1994).

According to the literature, 2-methyl-3-(methylthio)furan originates from thermal degradation of thiamin (Cerny & Briffod, 2007; Grosch & Zeilerhilgart, 1992; Werkhoff et al., 1990), the levels of which are high in pork meat (Leonhardt & Wenk, 1997), and from Maillard reactions involving cystein and pentoses (Cerny & Briffod, 2007; Hofmann & Schieberle, 1995; Wang, Yang, & Song, 2012). In cooked ham ($65^\circ\text{C} < \text{cooking temperature} < 69^\circ\text{C}$), thiamin is the major precursor of this compound, because the cooking temperature is not sufficient to induce degradation of cystein. At 69°C , thiamin generates not only 2-methyl-3-(methylthio)furan but also 2-methyl-3-furanthiol and its dimer bis(2-methyl-3-furyl)disulfide. Cystein needs to be heated to 100°C to produce detectable quantities of 2-methyl-3-(methylthio)furan (unpublished data).

3.2. Effect of nitrite on the odorous volatile fraction

Comparison of the aromagrams of nitrite-free (Fig. 2a) and nitrite-cured cooked hams (Fig. 2b) shows that the odour intensity of most of the olfactory peaks is weakened by added nitrite. Statistical analysis of the differences observed indicates that the

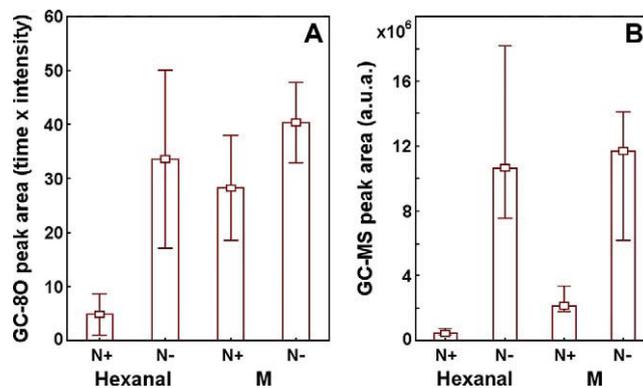


Fig. 3. Effect of the presence or absence of nitrite on the peak areas of hexanal and 2-methyl-3-(methylthio) furan (Labelled “M”) obtained by GC–MS/80 and GC–MS. In the absence of nitrite: (A) the GC/80 peak areas of hexanal and 2-methyl-3-(methylthio) furan are respectively 7.0 ($p < 0.001$) and 1.4 ($p < 0.05$) times greater than in the presence of nitrite, and (B) the GC–MS peak areas of hexanal and 2-methyl-3-(methylthio) furan are respectively 24.4 ($p < 0.001$) and 5.3 ($p < 0.001$) times greater than in the presence of nitrite. Because of the very low levels of 2-methyl-3-(methylthio) furan in the hams, the areas of its peaks (measured in SIM mode on ion 160) were multiplied by 2×10^3 to compare them visually with the peak areas of hexanal (measured in SIM mode on ion 82). All areas are expressed in arbitrary units of area (a.u.a.).

zones of the aromagrams that are most significantly changed ($p < 0.01$) by nitrite (Fig. 2c) correspond to fatty acid oxidation products (peaks coloured green in Fig. 2), and especially hexanal (grassy, green apple odour) and coeluted 1-octen-3-ol/1-octen-3-one (mushroom odour). The area of the olfactory peak of hexanal (Fig. 2), the one most markedly changed ($p < 0.001$), was multiplied by seven (Fig. 3A). This increase is consistent with the results of the instrumental analysis by GC–MS of the desorption of this compound (Fig. 3B), which was multiplied by 24 ($p < 0.0001$).

By contrast, the perception of the odorous compounds derived from the degradation of sulfur-containing precursors (peaks coloured red in Fig. 2, Table 1) was not significantly modified by the presence or absence of nitrite, although a slightly stronger perception of these compounds (dimethylsulfide in particular) was recorded in the absence of nitrite. The area of the olfactory peak of 2-methyl-3-(methylthio) furan was slightly greater, by a factor of 1.4 ($p < 0.05$), in the hams made without nitrite (Fig. 3A), also consistent with the results of the instrumental analysis of its desorption (Fig. 3B), which was multiplied by 5.0 ($p < 0.001$).

For both hexanal and 2-methyl-3-(methylthio)furan, the sensory responses to the presence or absence of nitrite by chromatography–olfactometry (Fig. 3A) were less different than the instrumental responses by GC–MS (Fig. 3B). This may partly be because the relation between intensity of perception (area odourant peak) and the intensity of stimulus (area of the GC–MS peak of the volatile compound) is not linear (Stevens, 1957).

3.3. Effect of nitrite on the odour of cooked ham

The sensory analysis of hams by orthonasal sniffing, also performed by the 8 sniffers, extended the information obtained by GC–MS/80. These analyses focused on the descriptors “cooked ham odour” and “cooked pork meat odour”, which, according to industrial operators, characterise the odour of nitrite-cured and nitrite-free ham respectively. A predominant “cooked pork meat” odour represents, for most consumers, an odour defect in cooked ham (Lücke, 2008; Sindelar, 2011). The sensory analysis of hams by orthonasal sniffing showed (Fig. 4) that without added nitrite, the “cooked ham” score fell from 5.7 to 4.3/10 ($p < 0.05$), but the “cooked pork meat” odour score rose from 3.3 to 6.5/10 ($p < 0.001$).

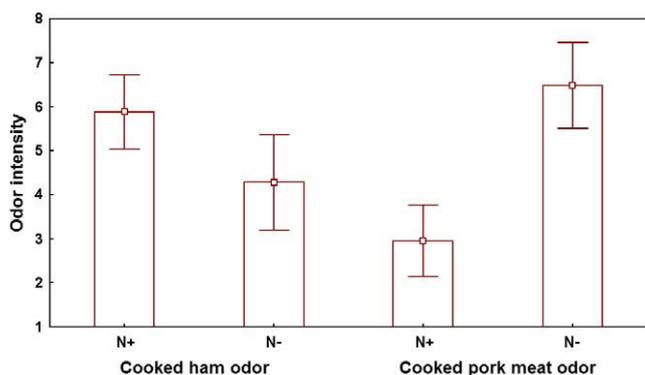


Fig. 4. Effect of the presence or absence of nitrite on “cooked ham” and “cooked pork meat” notes of cooked ham. Without nitrite: (A) the “cooked ham” note fell from 5.7 to 4.3/10 ($p < 0.05$) and (B) the “cooked pork meat” note rose from 3.3 to 6.5/10 ($p < 0.001$).

This result confirms the degradation of the cooked ham aroma when nitrite is absent.

Given (Fig. 2) that nitrite demonstrably plays (i) a major role in the formation of numerous fatty acid oxidation products, and (ii) a less important role in the formation of other odorous compounds (derived from the degradation of sulfur-containing precursors, or of other unspecified origin), we can consider that the oxidation products are mostly responsible for the observed changes in the odour of cooked ham without nitrite. Olfactory masking of compounds possessing a “meaty, empyreumatic” note by fatty acid oxidation products, which have “vegetable, herbaceous, fruity, floral” notes, would account for the effect of nitrite on the odour of cooked ham.

Our results indicate that among aldehydes, hexanal may play an important role in the masking of the “cooked ham” note, as the perception of this compound by chromatography–olfactometry was very weak for nitrite-cured hams and very intense for nitrite-free ones (Fig. 2). Hence hexanal appears to be a good instrumental marker for the antioxidant action of nitrite in cooked ham, in line with literature reports indicating that its level is proportionally linked to acceptability (Shahidi, 1989; Shahidi & Pegg, 1994) or to aroma defects (Frankel, 1991) in meat products.

4. Conclusion

Preparation with and without sodium nitrite showed that the addition of nitrated salt in ham production is not directly involved in the production of the odorous substances that give nitrite-cured pork products their specific aroma. The absence of nitrite simply favours the oxidation of fatty acids, and in particular the production of aldehydes, which will mask the odour of the sulfur-containing compounds responsible for the aromatic note typical of nitrite-cured pork products. Thus the odour of nitrite-cured pork products is merely the outcome of a balanced perception of certain sulfur-containing compounds and fatty acid oxidation products, among which aldehydes hold an important place.

Acknowledgments

We thank Jean-Luc Martin of IFIP for supplying the meat and preparing the hams, and the eight panelists for their participation in the GC–MS/80 and sensory analyses.

References

Abouelkaram, S. & Berdagué, J. L. (2010). Outil logiciel d'aide à la purification de spectres de masse en mélanges complexes [Computer software]. Institut

National de la Recherche Agronomique, UR370 Qualité des Produits Animaux, F-63122, Saint Genès Champanelle.

Berdagué, J. L. & Tournayre, P. (2002). The “Video-Sniff” method, a new approach for the “vocabulary-intensity-duration” study of “elementary odours” perceived by gas-chromatography-olfaction. In Le Quééré, J.L., Étievant, P.X. (Eds.), *Flavour research at the dawn of the twenty-first century* (TEC & DOC ed.) (pp. 514–517). Paris – 11 rue Lavoisier: Intercept Scientific Technic Medical Publishers.

Berdagué, J. L. & Tournayre, P. Gas chromatography-olfaction analysis device and method. Patent WO 2005/001470 A2. 6 January 2005.

Berdagué, J. L., Tournayre, P., & Cambou, S. (2007). Novel multi-gas chromatography-olfactometry device and software for the identification of odour-active compounds. *Journal of Chromatography A*, 1146, 85–92.

Bertrand, E., Hado-Maturana, E., Chevarin, C., Portanguen, S., Mercier, F., Tournayre, P., et al. (2011). Heat-induced volatiles and odour-active compounds in a model cheese. *International Dairy Journal*, 21, 806–814.

Breme, K., Tournayre, P., Fernandez, X., Meierhenrich, U. J., Brevard, H., Joulain, D., et al. (2009). Identification of odour impact compounds of *Tagetes minuta* L. essential oil: Comparison of two GC–olfactometry methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 8572–8580.

Brunton, N. P., Cronin, D. A., & Monahan, F. J. (2002). Volatile components associated with freshly cooked and oxidized off-flavours in turkey breast meat. *Flavour and Fragrance Journal*, 17, 327–334.

Cerny, C., & Briffod, M. (2007). Effect of pH on the maillard reaction of [(13)C(5)]xylose, cysteine, and thiamin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1552–1556.

Chan, F. & Reineccius, G. A. (1994). Kinetics of the formation of methional, dimethyl disulfide, and 2-acetylthiophene via the Maillard reaction. In *Sulfur Compounds in Food* (Vol. 564, pp. 127–137). American Chemical Society.

Corpet, D. E. (2011). Red meat and colon cancer: Should we become vegetarians, or can we make meat safer? *Meat Science*, 89, 310–316.

Demeyer, D., Honikel, K., & De Smet, S. (2008). The World Cancer Research Fund report 2007: A challenge for the meat processing industry. *Meat Science*, 80, 953–959.

Elmore, J. S., Mottram, D. S., Enser, M., & Wood, J. D. (1999). Effect of the polyunsaturated fatty acid composition of beef muscle on the profile of aroma volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1619–1625.

Estevez, M., Ventanas, S., & Heinonen, M. (2011). Formation of Strecker aldehydes between protein carbonyls - alpha-Amino adipic and gamma-glutamyl semialdehydes - and leucine and isoleucine. *Food Chemistry*, 128, 1051–1057.

Ferguson, L. R. (2010). Meat and cancer. *Meat Science*, 84, 308–313.

Frankel, E. N. (1991). Review. Recent advances in lipid oxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 54, 495–511.

Gemert, L. J. & van Nottenbreijer, A. H. (1977). *Compilation of odour threshold values in air and water*. Netherlands, National Institute for Water Supply; Netherlands, Central Institute for Nutrition & Food Research TNO: Voorburg, Netherlands; National Institute for Water Supply, Zeist, Netherlands; Central Institute for Nutrition & Food Research TNO.

Gray, J. I. & Pearson, A. M. (1994). Lipid-derived off-flavours in meat – Formation and inhibition. In *Flavor of meat and meat products* (Blackie Academic and Professional ed., pp. 129–131). London – Glasgow – Weinheim – New York – Tokyo – Melbourne – Madras: SHAHIDI, F.

Grosch, W., & Zeilerhiltgart, G. (1992). Formation of meat-like flavor compounds. *ACS Symposium Series*, 490, 183–192.

Hofmann, T., & Schieberle, P. (1995). Evaluation of the key odourants in a thermally treated solution of ribose and cysteine by aroma extract dilution techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2187–2194.

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

Kondjoyan, N. & Berdagué, J. L. (1996). *A compilation of relative retention indices for the analysis of aromatic compounds*. (Laboratoire Flaveur ed.) Clermont-Ferrand: Laboratoire Flaveur, INRA.

Leonhardt, M., & Wenk, C. (1997). Variability of selected vitamins and trace elements of different meat cuts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10, 218–224.

Loeppky, R. N. (1994). Nitrosamine and N-nitroso compound chemistry and biochemistry – advances and perspectives. *Nitrosamines and Related N-Nitroso Compounds*, 553, 1–18.

Lücke, F.-K. (2008). Manufacture of meat products without added nitrite or nitrate – Quality and safety aspects. In *3rd Baltic Conference on Food Science and Technology – FOODBALT 2008* (pp. 41–45). Jelgava – Germany.

Mercier, Y., Gatellier, P., & Renere, M. (2004). Lipid and protein oxidation in vitro, and antioxidant potential in meat from Charolais cows finished on pasture or mixed diet. *Meat Science*, 66, 467–473.

Min, B., Cordray, J. C., & Ahn, D. U. (2010). Effect of NaCl, Myoglobin, Fe(II), and Fe(III) on lipid oxidation of raw and cooked chicken breast and beef loin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 600–605.

Mottram, D. S. (1998). Flavour formation in meat and meat products: A review. *Food Chemistry*, 62, 415–424.

Nanamori, M., Kanatani, R., Kihara, M., Kawahara, K., Hayashi, K., Watanabe, T., et al. (2008). Effects of nitrogen application on malt modification and dimethyl sulfide precursor production in two Japanese barley cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 1464–1471.

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

Shahidi, F. (1989). Flavor of cooked meats. *ACS Symposium Series*, 388, 188–201.

- Shahidi, F., & Pegg, R. B. (1994). Hexanal as an indicator of the flavor deterioration of meat and meat-products. *Lipids in Food Flavors*, 558, 256–279.
- Sindelar, J. J., & Milkowski, A. L. (2011). Sodium nitrite in processed meat and poultry meats: A review of curin and examining the risk and benefit of its use. *American Meat Science Association White Paper Series No. 3*, 1–14.
- Sindelar, J. J., Cordray, J. C., Sebranek, J. G., Love, J. A., & Ahn, D. U. (2007). Effects of varying levels of vegetable juice powder and incubation time on colour, residual nitrate and nitrite, pigment, pH, and trained sensory attributes of ready-to-eat uncured ham. *Journal of Food Science*, 72, S388–S395.
- Stevens, S. S. (1957). On the psychophysical law. *Psychological Review*, 153–181.
- Théron, L., Tournayre, P., Kondjoyan, N., Abouelkaram, S., Santé-Lhoutellier, V., & Berdague, J. L. (2010). Analysis of the volatile profile and identification of odour active compounds in Bayonne ham. *Meat Science*, 85, 453–460.
- Tournayre, P. & Berdagué, J. L. (2003). AcquiSniff (Version 6.5.0) [Computer software]. IDDN.FR.001.210006.001.RP.2003.000.30000:INRA. Available from <http://www.4.inra.fr/cepia_eng/You-are-looking-for/Platforms-and-tools/Softwares/AcquiSniff>.
- Wang, R., Yang, C., & Song, H. (2012). Key meat flavour compounds formation mechanism in a glutathione-xylose Maillard reaction. *Food Chemistry*, 131, 280–285.
- Werkhoff, P., Bruning, J., Emberger, R., Guntert, M., Kopsel, M., Kuhn, W., et al. (1990). Isolation and characterization of volatile sulfur-containing meat flavor components in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 777–791.
- Yaylayan, V. A., & Keyhani, A. (1999). Origin of 2,3-pentanedione and 2,3-butanedione in D-glucose/L-alanine maillard model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3280–3284.

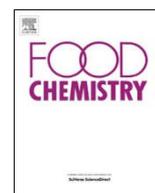
II – 1. 2. Identification et origines des composés odorants soufrés du jambon cuit

(Article publié dans le journal « Food Chemistry » en 2014)

Le travail précédent ayant mis en évidence l'importance des composés soufrés dans la « balance aromatique » qui conduit à l'arôme « jambon cuit » désiré, l'objectif de cette seconde étude est d'identifier de manière exhaustive les composés soufrés de la fraction volatile du jambon cuit et de mieux comprendre leurs origines afin de rechercher le(s) précurseur(s) d'arôme les plus efficace(s).

Dans le but d'accéder à une puissante identification de la fraction volatile du jambon cuit, des techniques variées d'extraction, de séparation chromatographique en phase gazeuse uni- ou bidimensionnelle, et de détection par spectrométrie de masse quadripolaire ou à temps de vol ont été mises en œuvre. Pour déterminer les molécules responsables de l'arôme, des analyses d'olfactométrie multipostes ont aussi été mise en œuvre. Différents précurseurs ont été testés pour préciser l'origine des composés odorants clés responsables de la note aromatique « jambon cuit ».

Les mécanismes réactionnels mettant en jeu ces différents précurseurs ont été détaillés dans les Annexes V et VI.



Identification and origin of odorous sulfur compounds in cooked ham

Caroline Thomas^{b,†}, Frédéric Mercier^a, Pascal Tournayre^a, Jean-Luc Martin^b, Jean-Louis Berdagué^a

^a Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UR 370 QuaPA, MASS group, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

^b IFIP – Laboratoire d'Essais et de Mesures Physiques, 94704 Maisons-Alfort, France

article info

Article history:

Received 8 October 2013

Received in revised form 8 January 2014

Accepted 13 January 2014

Available online 23 January 2014

Keywords:

Sulphur compounds

Cooked ham

One- and two-dimensional chromatography

Olfactometry

Key odorants

Aroma precursors

abstract

The aim of this work was to identify and gain further knowledge on the origin of sulfur compounds present in the volatile fraction of cooked ham, and on their role in the aroma of this product. To this end, we performed analyses by one- and two-dimensional gas chromatography coupled with mass spectrometry, and olfactometry. Among the odorant sulfur compounds identified, three furans present in trace amounts proved to have very intense odours responsible for the “meaty, cooked ham” notes of this pork product. They were 2-methyl-3-furanthiol, 2-methyl-3-(methylthio)furan and bis(2-methyl-3-furyl) disulphide. Addition of thiamine or cysteine also enabled us to study the effect of these odour precursors on the formation of odorant furans during the cooking of ham. The results revealed a direct link between the thermal degradation of thiamine and the formation of these compounds. By contrast, addition of cysteine in the presence of fructose or xylose did not appreciably increase their production.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The volatile fractions of foods contain a large number of compounds of which only some contribute to their aroma. In the case of cooked meats, the role of sulphur compounds is well-known (Werkhoff et al., 1990). Their importance can be partly explained by their very low detection thresholds. Their presence in trace amounts is enough to impart the pleasant “meaty, roasty, cooked ham, etc.” notes (Mottram, 1998) that help give these products their typical odour profile. Among these compounds, furan and thiophene rings possess a thiol group in position 3 that brings a “meat savoury” note (Buttery, Haddon, Seifert, & Turnbaugh, 1984; Evers et al., 1976). In the case of cooked ham, Thomas, Mercier, Tournayre, Martin, and Berdagué (2013) have confirmed the important role of sulphur compounds in its aroma.

Studies during the cooking of meats confirm the formation of many volatile sulphur compounds. At high temperatures, they can originate from the advanced stages of the Maillard reaction (Bailey, 1994; Mottram, 1994), hydrolysis or thermal degradation of amino acids (Belitz & Grosch, 1999). Several studies in model media have been conducted to elucidate the reaction mechanisms involved. These studies, combining varying physicochemical conditions and often high temperatures, showed that addition of thiamine or cysteine in the presence of certain sugars increased the production of odour-active sulphur compounds (Cerny & Davidek,

2003; Tai & Ho, 1997; Wang, Yang, & Song, 2012). However, in the conditions of low-temperature slow cooking of cooked ham (Hennel, 1966), the effect of these precursors on the formation of odour-active sulphur compounds has never been assessed.

The aim of this study was accordingly (i) to identify as fully as possible the sulphur compounds in the volatile fraction of cooked ham, including those that have an olfactive impact, and (ii) to assess the effects of adding sulphur precursors on the production of these compounds during the cooking of model hams.

2. Materials and methods

2.1. Materials and sample origins

The analyses were performed on commercially available cooked ham (to identify sulphur compounds, both odorant and non-odorant), and model cooked hams (to assess the effects of aroma precursors). The commercially available ham, selected for its intense cooked ham aroma, came from the Cellier Company (Aubièrre, France) and was made in the traditional way (Hennel, 1966). The model hams (weight of 300 g) were produced in the laboratory from a specific pig muscle (*M. semimembranosus*). We mixed 1 kg of chopped raw meat with 100 g of brine (18 g of curing salt containing 0.6% nitrite in solution in 82 g of water). This mix was then distributed in closed glass jars under vacuum. The cooking programme was 40–69 °C at 0.1 °C/min⁻¹ and 120 min hold at 69 °C. In our experiment, a broad range of aroma precursors was added to test their effects on the formation of odorant sulphur compounds detected by olfactometry.

[†] Corresponding author. Tel.: +33 (0) 473 62 44 99; fax: +33 (0) 473 62 47 31.

E-mail address: caroline.thomas@clermont.inra.fr (C. Thomas).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.029> 0308-8146/©

2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Some brines contained thiamine (0, 8, 80, 800 and 8000 mg added to 100 g of brine), cysteine plus fructose (0, 100, 1000, 3000 and 10,000 mg of cysteine and 3 g of fructose added to 100 g of brine) or cysteine plus xylose (0, 100, 1000, 3000 and 10,000 mg of cysteine and 3 g of xylose added to 100 g of brine).

2.2. Additives and reference compounds

2.2.1. Additives

Thiamine (purity 99%, Ref.: T4625), xylose (purity 99%, Ref.: X1500), fructose (purity 99%, Ref.: F0127), cysteine (purity 97%, Ref.: W326305) were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). Sodium nitrite (0.6% w/w) was added in mixture with sodium chloride 99.4% w/w (Supplier: Coopérative des Charcutiers, 43 bis rue Anatole France, 63000 Clermont-Ferrand, France).

2.2.2. Reference compounds

3-Methylthiopropional (purity 97%, Ref.: W274704), 2-methyl-3-furanthiol (purity 95%, Ref.: W318809), 2-methyl-3-(methylthio)furan (purity 98%, Ref.: W357308), bis(2-methyl-3-furyl disulphide (purity 98%, Ref.: W325900), 2-methylthiophene (purity 98%, Ref.: M84208), dimethyltrisulphide (purity 98%, Ref.: W327506) were purchased from Sigma–Aldrich.

2.3. Solid-phase microextraction–comprehensive gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry (SPME–GCxGC–MStof)

A slice of 100 g of industrial ham was minced and 2 g were placed at ambient temperature in a sealed 20-mL vial and incubated for 10 min. The extraction of volatiles was performed using a 75 mm solid-phase microextraction (SPME) Carboxen/PDMS fibre (Supelco Bellefonte, PA). The fibre was exposed to the ham headspace for 1 h at ambient temperature. After extraction, a splitless injection (at 220 °C for 2 min) of volatiles was carried out with an SPME Combipal autosampler (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland). Separation and detection was performed using a GCxGC–MStof LECO Pegasus IV system (LECO Corporation, St. Joseph, MI). Volatiles were first separated on an RTX-5 capillary column (length 30 m, internal diameter 0.32 mm, film thickness 1 µm; Supelco, Saint-Germain-en-Laye, France) and secondly on a DB-17 capillary column (length 2.50 m, internal diameter 0.178 mm, film thickness 0.30 µm; J&W Agilent, Santa Clara, CA). Volatiles were detected by electron ionisation at 70 eV, and data were acquired over the mass range $18 < m/z < 220$ at 200 scan⁻¹. More details on the analytical settings are given in Théron et al. (2010).

2.4. Dynamic headspace sampling–gas chromatography–mass spectrometry (DHS–GC–MS)

For the industrial ham and for the model hams, 100 g were minced and 7 g were placed at ambient temperature in a Pyrex® extraction cartridge (Ref.: M3, Maillères, Aubière, France). The volatile compounds were then extracted by DHS (Tekmar, Cincinnati, OH), at 30 °C for 60 min with a helium stream (Messer, He/U purity: 99.995%) at a flow rate of 40 ml min⁻¹. The trap used contained Tenax® TA (60/80 mesh adsorbent, Supelco Bellefonte PA); working length 180 mm and inside diameter 1/8". The dry purge step was set at 30 min. The volatile components were then desorbed from the trap at 180 °C for 10 min using helium (He/N55 purity: 99.9995%) and sent into the cryofocusing area (cooled at -150 °C with liquid nitrogen). After injection, by heating the trap at 180 °C for 2 min., volatiles were separated and detected using a GC–MS set-up composed of a chromatograph (GC 6890, Agilent Technologies; apolar capillary column RTX5-MS, length 60 m, internal diameter 0.32 mm,

film thickness 1 µm) linked to a quadrupole mass detector (MSD 5973 Inert, Agilent Technologies). Volatiles were detected by electronic ionisation at 70 eV, and ions were scanned over the range $18 < m/z < 220$ a.m.u. For the trials with precursors, the sulphur odourants of interest were semi-quantified by measuring their peak areas from specific ions acquired in single ion monitoring mode. Analyses of model hams were performed in triplicate.

2.5. Gas chromatography–mass spectrometry/olfactometry

Two complementary olfactometry instruments were used to detect and identify odorous compounds. They were both coupled to identical dynamic headspace devices (Tekmar) and the extraction conditions of the volatiles were similar to the conditions described in Section 2.4.

The first instrument made an exhaustive inventory of odorous compounds by eight-way olfactometry coupled to mass spectrometry (DHS–GC–MS/80) (Berdagué & Tournayre, 2005; Berdagué, Tournayre, & Cambou, 2007). This system could detect a very large number of olfactory zones by accumulating the performances of eight sniffers. The selected sniffers were non-smokers with no known health disorders, less than 40 years old, and with tested sensitivity and ability to detect and consistently describe a wide range of odours. The nature of the samples analysed was communicated to the sniffers, who were asked to focus on the “meat, cooked ham” odour. To measure the intensity of the odours, a five-level scale (1, very weak; 2, weak; 3, moderate; 4, strong, and 5, very strong) was used. Olfactometric analyses lasted 40 min. Olfactometric data were acquired and processed with AcquiSniff® Software (Berdagué & Tournayre, 2002; Tournayre & Berdagué, 2003). Two sniffing sessions (with eight sniffers per session) of the industrial cooked ham were run with the DHS–GC–MS/80 device. The aromagram of the industrial cooked ham was obtained from the mean intensities of the individual aromagrams (Berdagué & Tournayre, 2002).

The second instrument was a chromatography–mass spectrometry–olfactometry system with a single olfaction port. This instrument worked either in gas chromatography–mass spectrometry–olfactometry mode (DHS–GC–MS/O) to fit DHS–GC–MS/80 analysis, or in two-dimensional chromatography mode (DHS–GC–GC–MS/O, also termed “heart-cut mode”) to make a detailed olfactory exploration of all the odorous zones observed by DHS–GC–MS/80, which is essential for reliable identification. The DHS–GC–MS/O instrument was composed of a chromatograph (GC6890, Agilent Technologies; capillary column RTX5-MS, length 60 m, internal diameter 0.32 mm, film thickness: 1 µm) hyphenated to a quadrupole mass detector (MSD 5973 Inert, Agilent Technologies). The capillary column was connected to the mass spectrometer via a deactivated capillary column (length 0.5 m, internal diameter 0.10 mm; SGE, Ringwood, Australia) and to the sniffing port via a deactivated capillary column (SGE, length 1.7 m, internal diameter 0.32 mm) using a zero dead volume T-connector (inside tubing diameter 1/16"; ZTIM Valco® Instruments Co. Inc., Houston, TX). The ratio of effluent between sniffing port and mass detector was 1/1. For the DHS–GC–GC–MS/O mode, the volatile compounds from the first separation on the non-polar (RTX5-MS) column were cryo- focused on a second polar column (DB-WAXETR, J&W Scientific, Agilent Technologies; length 30 m, internal diameter: 0.32 mm, film thickness: 1 µm), and then sent by heating (180 °C, 2 min) to the

sniffing port and to the mass spectrometer. Olfactometric data obtained by DH–GC–MS/O or by DH–GC–GC–MS/O were both acquired by 2 assessors with the AcquiSniff® Software in similar conditions (vocabulary, odour intensity (1–5) and odour duration) to the DH–GC–MS/80 data. The odour of the candidate structures identified by mass spectrometry was compared with their odour as described

Table 1
Sulphur compounds identified in industrial cooked ham.

LRI ^a			Compound ^b	Odour ^c		Peak area ^d		Identification ^e
SPME-GC×GC-MS (SPB-5)	DHS-GC-MS/O (RTX5-MS)	DHS-GC-MS/O (DBWAX-ETR)		Description	Mean intensity	SPME-GC×GC-MS	DHS-GC-MS	
			<i>Aliphatic sulfur compounds (21)</i>			85.3	65.9	
<500	–	–	Hydrogen sulphide			4.5	–	LRI, Mstof
<500	<500	–	Methanethiol			20.1	–	LRI, MS, Mstof
<500	<500	–	Sulphur dioxide			16.2	6.2	LRI, MS, Mstof
511	–	–	Carbonyl sulphide			1.7	–	LRI, Mstof
528	502	–	Carbon disulphide			25.1	4.7	LRI, MS, Mstof
508	517	737	Dimethyl sulphide*	Sulfury, onion, cabbage	0.3	10.1	0.3	LRI, O, MS, Mstof
675	–	–	Methanedithiol			tr	–	LRI, Mstof
699	701	–	Methyl thioacetate			0.1	2.3	LRI, MS, Mstof
708	–	–	1-(Methylthio)propane			0.2	–	LRI, Mstof
721	–	–	1-(Methylthio)-1-propene			tr	–	LRI, Mstof
746	750	–	Dimethyl disulphide			5.5	33.2	LRI, MS, Mstof
795	–	–	1,2-Ethanedithiol			0.2	–	LRI, Mstof
891	–	–	2,4-Dithiapentane			tr	–	LRI, Mstof
895	–	–	3-(Methylthio)-2-butanone			tr	–	LRI, Mstof
–	904	1473	3-(Methylthio)propanal*	Potato, earthy	1.5	–	0.1	LRI, O, MS, std
915	925	–	Dimethyl sulphone			0.3	11.0	LRI, MS, Mstof
918	–	–	Allyl methyl disulphide			tr	–	LRI, Mstof
941	–	–	4-Mercapto-4-methyl-2-pentanone			tr	–	LRI, Mstof
978	–	–	2-Methyl-1-(propylthio)propane			tr	–	LRI, Mstof
980	989	1392	Dimethyl trisulphide*	Sulfury, cabbage, gas	4	1.3	8.1	LRI, O, MS, Mstof, std
1232	–	–	Dimethyl tetrasulphide			tr	–	LRI, Mstof
			<i>Cyclic sulphides (5)</i>			5.9	–	
578	–	–	Thiirane			5.8	–	LRI, Mstof
803	–	–	1,3-Dithiethane			tr	–	LRI, Mstof
974	–	–	1,3-Dithiane			0.1	–	LRI, Mstof
1446	–	–	1,2,4,5-Tetrathiane			tr	–	LRI, Mstof
1659	–	–	Hexathiepane			tr	–	LRI, Mstof
			<i>Furans (4)</i>			0.1	11.5	
870	872	1317	2-Methyl-3-furanthiol*	Cooked ham, meaty, roasted	4.2	tr	0.5	LRI, O, MS, Mstof, std
955	959	–	2-Methyl-5-(methylthio)furan			0.1	7.1	LRI, MS, Mstof
1184	1188	1680	2-Methyl-3-(methylthio)furan*	Sulfurous, meaty, cooked ham, roasted beef	4	tr	3.8	LRI, O, MS, Mstof, std
–	1482	–	bis(2-methyl-3-furyl)disulphide*	Meaty, roasted, scallion, onion, sulfur	4	tr	0.1	LRI, O, MS, std
			<i>Thiophenes (15)</i>			8.3	21.0	
669	673	–	Thiophene			0.3	1.4	LRI, MS, Mstof
783	778	–	3-Methylthiophene			7.6	–	LRI, MS, Mstof
789	778	1107	2-Methylthiophene*	Sulfurous, onion, roasted	2.6	0.1	16.2	LRI, O, MS, Mstof, std
870	–	–	2-Ethylthiophene			0.1	–	LRI, Mstof
879	–	–	2,3-Dimethylthiophene			tr	–	LRI, Mstof
879	–	–	2-Methyl-4,5-dihydrothiophene			tr	–	LRI, Mstof
883	–	–	2,5-Dimethylthiophene			tr	–	LRI, Mstof
996	997	–	3-Thiophenecarboxaldehyde			0.1	2.5	LRI, MS, Mstof
1004	–	–	Dihydro-2[3H]-thiophenone			tr	–	LRI, Mstof
1058	–	–	2-Methyl-5-propylthiophene			tr	–	LRI, Mstof
1066	–	–	2-Butylthiophene			0.1	–	LRI, Mstof
1127	–	–	5-Methyl-2-thiophenecarboxaldehyde			tr	–	LRI, Mstof
1149	–	–	2-Methyl-3-thiophenethiol			tr	–	LRI, Mstof
1169	1185	–	2-Pentylthiophene			tr	0.9	LRI, MS, Mstof
1225	–	–	Thieno[3,2-b]thiophene			tr	–	LRI, Mstof
			<i>Thiazoles (8)</i>			0.4	1.6	
735	734	–	Thiazole			0.1	0.5	LRI, MS, Mstof
805	–	–	2-Methylthiazole			0.1	–	LRI, Mstof

(continued on next page)

Table 1 (continued)

LRI ^a			Compound ^b	Odour ^c		Peak area ^d		Identification ^e
SPME-GC×GC-MS (SPB-5)	DHS-GC-MS/O (RTX5-MS)	DHS-GC-MS/O (DBWAX-ETR)		Description	Mean intensity	SPME-GC×GC-MS	DHS-GC-MS	
816	–	–	4-Methylthiazole			0.1	–	LRI, Mstof
851	–	–	5-Methylthiazole			tr	–	LRI, Mstof
953	–	–	5-Ethylthiazole			tr	–	LRI, Mstof
978	–	–	Tetrahydrothiazole			tr	–	LRI, Mstof
1025	1062	–	2-Acetylthiazole			0.1	1.1	LRI, MS, Mstof
1031	–	–	5-Ethenyl-4-methylthiazole			tr	–	LRI, Mstof

^a LRI calculated for the nonpolar SPB5-MS (SPME-GC×GC-MS device), RTX5-MS (DHS-GC-MS device) and polar DB-WAXETR (DHS-GC-MS/O device) columns were determined with a series of *n*-alkanes.

^b Compounds are listed by structural families and by elution order on RTX-5 column. Compounds detected by olfactometry are labelled with: (*).

^c Main odour descriptors given by the sniffers during the GC-O sessions (DHS-GC-MS/80, DHS-GC-MS/O and DHS-GC-GC-MS/O analyses) and mean odour intensity (on a scale from 1 to 5). Bis(2-methyl-3-furyl) disulphide was only smelt on the DHS-GC-MS/O and DHS-GC-GC-MS/O devices.

^d Relative peak area expressed in percentage of the total area of the sulphur compounds identified by SPME-GC×GC-Mstof (computations performed using the LECO ChromaTof[®] software) or by DHS-GC-MS. Compound not detected: (–) or detected at trace level (tr) if the peak area is <0.1%.

^e Identification methods: LRI, linear retention index; O, comparison of odour descriptors to our home-made GC-O data base and to the odour of the reference compound (smelled pure and smelled by olfactometry after injection in the DHS-GC-MS/O and DHS-GC-GC-MS/O devices); MS, mass spectrum obtained by DHS-GC-MS; Mstof, mass spectrum obtained by GC×GC-Mstof; std, reference compound injection.

in several databases (<http://www.thegoodscentscompany.com>, <http://www.flavornet.org>), and with their odour after co-injection of pure reference compounds on non-polar and polar phases.

2.6. Thiamine analysis

Analyses of hams were performed by the “In Vivo Labs” laboratory (Saint-Nolff, France). For that, 100 g of ham were minced and 10 g were used for the determinations of thiamine content according to the French standard Afnor NF EN 14122 (AFNOR, La Plaine Saint-Denis, France). Thiamine was first extracted by acid hydrolysis, dephosphorylated by enzymatic treatment, purified by high-performance liquid chromatography, oxidised in thiochrome, in order to be detected by fluorimetry and finally quantified by external calibration. Only hams made with brines containing 0, 8 and 80 mg of thiamine per 100 g of brine were analysed before and after cooking.

3. Results and discussion

The analyses used different types of extraction, trapping, separation and detection of volatile compounds. This allowed the identification of several sulphur structures like thiophenes,

thiazoles, furans, aliphatic and cyclic sulphides, etc. (Table 1). The highest number of identified compounds was associated with analyses by SPME-GC×GC-Mstof, owing to the very high chromatographic resolution of the numerous elutions. In comparison, extraction by dynamic headspace sampling using Tenax[®] trap allowed the injection of a great enough quantity of volatile compounds to ensure perception and description of the different odorants during olfactometric analyses (Fig. 1). The highly volatile compounds, such as hydrogen sulphide and methanethiol, are however not analysed by this technique. Indeed they are not trapped because their breakthrough volume on Tenax[®] trap is reached.

3.1. Identification of volatile sulphur compounds in cooked ham

The instrumental analyses carried out by one- or two-dimensional chromatography allowed the identification of 53 sulphur-containing structures (Table 1). Most of the substances identified were aliphatic structures such as thiols and sulphides (21) and thiophene rings (15). Thiazole rings (8), cyclic sulphides (5) and substituted furans (4) were also detected. Aliphatic structures respectively represented 85.3% and 65.9% of the total area of the sulphur compounds detected by SPME-GC×GC-Mstof or by DHS-GC-MS analyses.

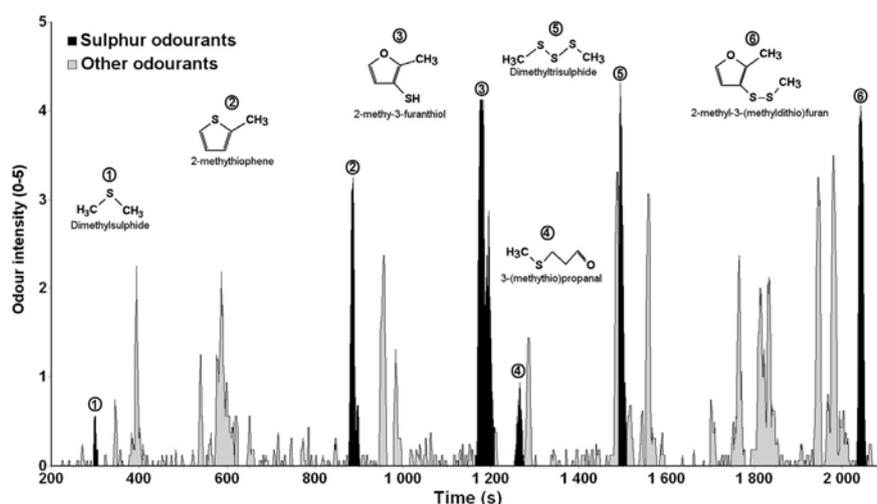


Fig. 1. Aromagram of industrial cooked ham expressed in mean odour intensity. The peaks coloured in black are attributable to sulphur compounds.

Olfactometric analyses by DHS-GC-MS/80 yielded an aromagram comprising 22 odorant peaks of mean intensity greater than 0.5/5. Six of these peaks were attributable to sulphur compounds (Fig. 1), and their cumulated areas made up 57% of the total area of the aromagram. Of these six compounds, four gave the odours most intensely perceived by the eight sniffers. The mean odorant intensities of 2-methyl-3-furanthiol: “meaty, cooked ham”, 2-methyl-3-(methylthio)furan: “meaty, roasted meat” and dimethyl trisulphide: “cabbage, sulphurous” were greater than 4/5, and that of 2-methylthiophene: “sulphurous, onion” greater than 3.5/5. The strong contributions of 2-methyl-3-furanthiol, 2-methyl-3-(methylthio)furan and dimethyl trisulphide to the area of the aromagram of the cooked ham, despite their being present in only trace amounts in the sulphur-containing volatile fraction (Table 1), are explained by their very low detection thresholds (0.02–10 ng/L of water; Filippi, Fernandez, and Duñach, 2007). Dimethyl sulphide: “cabbage, sulphurous” and methional (or 3-(methylthio)propanal): “potato”, were weakly perceived by olfactometry, with mean intensities lower than 1/5. The weak perception of methional is explained by its very low concentration, whereas the weak perception of dimethyl sulphide is due to its higher detection threshold (1000 ng/L of water; Filippi et al., 2007). To let the sniffers rest during the olfactometric analyses by DHS-GC-MS/80, the duration of the tests was limited to 40 min. To explore the segment of the chromatogram between 35 and 60 min, two olfactometric analyses (two assessors) were performed using the device with a single olfaction terminal (DHS-GC-MS/O and DHS-GC-GC-MS/O configurations). Bis(2-methyl-3-furyl)disulphide, which eluted at 54 min, gave a very intense “meaty-like” note (Table 1). This substance had an extremely low detection threshold of 0.022 ng/L of water (Belitz & Grosch, 1999; Filippi et al., 2007). Finally, among the seven odorant sulphur compounds identified by all the olfactometry techniques implemented, 2-methyl-3-furanthiol, 2-methyl-3-(methylthio)furan and bis(2-methyl-3-furyl)disulphide played an essential role in the aroma of cooked ham, each possessing

odours closely consistent with those smelt during orthonasal sniffing of this product. Their broad range of volatility (boiling points of 2-methyl-3-furanthiol, 2-methyl-3-(methylthio)furan and bis(2-methyl-3-furyl)disulphide at a pressure of 5866 Pa are respectively 60 °C, 210 °C and 280 °C) very probably ensure a certain persistence of the “meaty” odorant note after a slice of cooked ham has been exposed to the air. The short-lived head note of this pork product may be attributable mainly to 2-methyl-3-furanthiol, with heavier notes due to 2-methyl-3-(methylthio)furan and bis(2-methyl-3-furyl)disulphide.

3.2. Effect of precursors and origins of volatile sulphur compounds

Experimental addition of model hams with precursors enabled us to identify the origin of the sulphur compounds most intensely perceived during olfactometric analyses. The origin of the other sulphur compounds will be discussed solely on the basis of knowledge available in the literature.

Addition of thiamine at the highest doses clearly induced production of odorant sulphur compounds: 2-methyl-3-furanthiol, 2-methyl-3-(methylthio)furan, bis(2-methyl-3-furyl)disulphide and 2-methylthiophene (Fig. 2). Several authors have already stated that a thermal degradation of thiamine would explain the occurrence of these compounds (Cerny, 2007; Dreher, Rouseff, & Naim, 2003; Dwivedi and Arnold, 1972; Filippi et al., 2007). The most abundant production was observed for 2-methyl-3-(methylthio)furan and 2-methylthiophene. From 10 mg of added thiamine, production of both compounds was observed. The increase of the production of 2-methyl-3-furanthiol and bis(2-methyl-3-furyl)disulphide is clearly observed only from significant enrichments of thiamine (higher than 80 mg of thiamine per 100 g of brine). Indeed, these compounds intensely perceived by olfactometry (2-methyl-3-furanthiol in particular) are very difficult to detect by DHS-GC-MS, probably due both to their presence in trace amounts in the ham and to their reactivity and adsorptivity

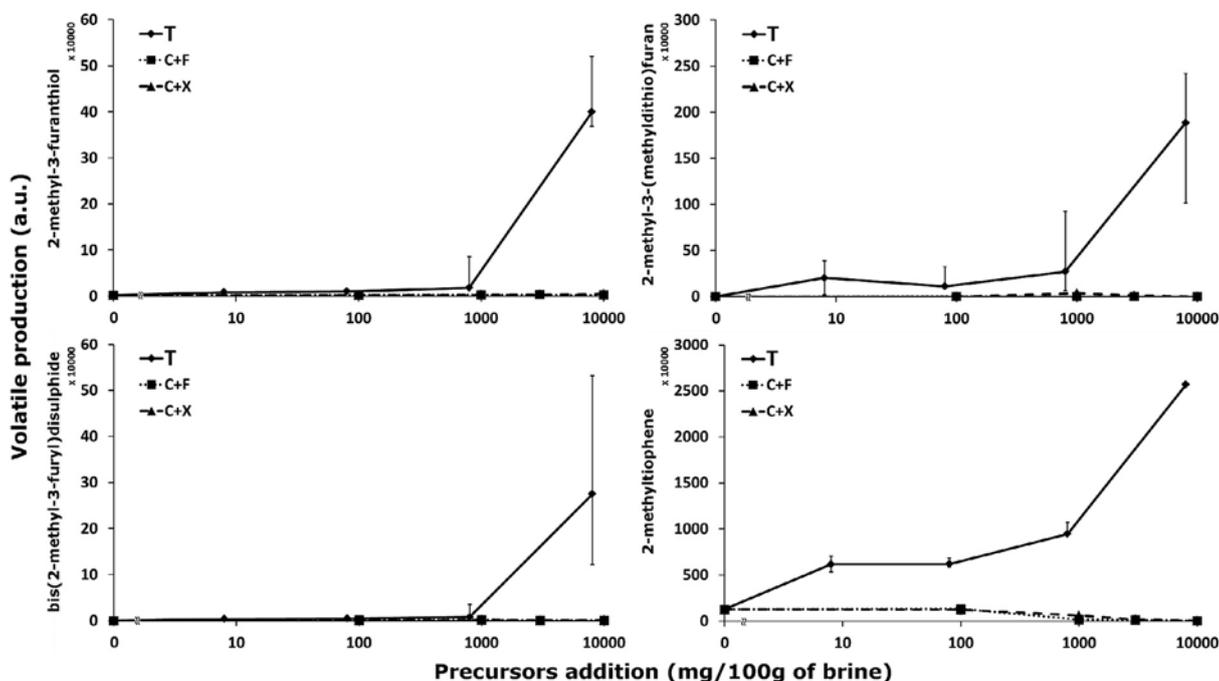


Fig. 2. Productions of the main sulphur odorants (expressed in arbitrary units of chromatographic area: a.u.) as a function of the addition of precursors (mg/100 g of brine). Precursors are labelled as follow: T, thiamine; C + F, cysteine + fructose; C + X, cysteine + xylose. To convert these values in mg added per kg of ham before cooking, values must be multiplied by 0.91. The areas of 2-methyl-3-furanthiol, 2-methyl-3-(methylthio)furan, bis(2-methyl-3-furyl)disulphide and 2-methylthiophene were respectively computed from the ions 114, 160, 113 and 97. Median, minimum and maximum values are presented on the ordinate.

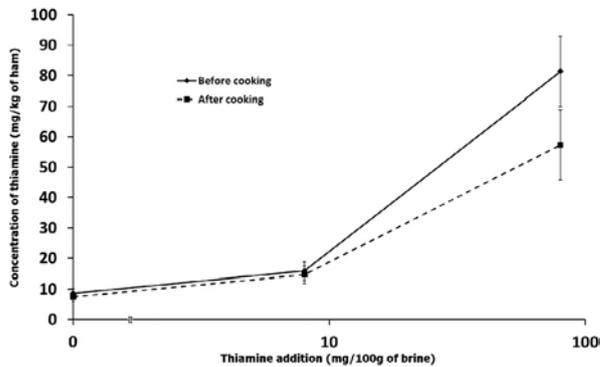


Fig. 3. Thiamine concentration (mg/100 g) of the experimental hams before and after cooking as a function of added thiamine (mg/100 g of brine). To convert these values in mg added per kg of ham before cooking, values must be multiplied by 0.91. Values and standard error are presented on the ordinate.

(2-methyl-3-furanthiol) along the analytical steps. The thiamine analysis showed that the pork meat used to manufacture the hams contained 9.5 mg per kg of thiamine and 8.6 mg per kg of thiamine after brining. After cooking, the thiamine content was 7.5 mg per kg of ham. For the hams enriched in thiamine (Fig. 3), a significant loss of this vitamin of about 30% ($p < 0.05$) was evidenced after cooking only for the most important addition (80 mg of this vitamin per 100 g of brine). For lower concentrations of thiamine, the assay's precision was insufficient to estimate the losses during cooking. Fig. 3 shows that the thiamine is only partially consumed during cooking; indicating that this vitamin is not entirely used to produce odorous sulphur compounds. Mechanistically, 2-methyl-3-furanthiol is presumably formed first, and bis(2-methyl-3-furyl)disulphide will be the dimer of 2-methyl-3-furanthiol oxidation (Dreher et al., 2003). 2-Methyl-3-(methylthio)furan could originate from the reaction of 2-methyl-3-furanthiol with methanethiol (Baek, Kim, Ahn, Nam, & Cadwallader, 2001); this is especially likely as methanethiol represents a large proportion of the total volatile fraction of the ham. By contrast, adding cysteine to model hams (Fig. 2) induced no significant production of 2-methyl-3-furanthiol, 2-methyl-3-(methylthio)furan or bis(2-methyl-3-furyl)disulphide, whichever sugar was associated (pentose or hexose). A decrease in the production of 2-methylthiophene was even observed at very high doses, possibly because of the antioxidant nature of cysteine. In contrast to observations on model media at temperatures between 95 and 180 °C (Cerny & Davidek, 2003; Hofmann & Schieberle, 1998; Whitfield & Mottram, 1999; Zheng, Brown, Ledig, Mussinan, & Ho, 1997), our results indicate that cysteine does not play a key role in the production of sulphur odorants in cooked ham. The cooking of ham at 69 °C for several hours seems insufficient to induce Maillard reactions forming compounds from cysteine. Addition of thiamine in model hams also showed that certain compounds, not perceived by olfactometry, evolve in the same way as 2-methyl-3-furanthiol, 2-methyl-3-(methylthio)furan, bis(2-methyl-3-furyl)disulphide or 2-methylthiophene. This was the case for 2-methyl-5-methylthiofuran and 2-methyl-4,5-dihydrothiophene (Fig. 4), which corresponds to the reduced form of 2-methylthiophene. However, addition of precursors could not explain the origins of the other structures identified. According to the literature, thiophene, 2,5-dimethylthiophene and 2-methyl-3-thiophenethiol appear in both the thermal degradation of thiamine (Dwivedi & Arnold, 1972) and in a reaction involving hydrogen sulphide and a pentose (Zheng et al., 1997). Hydrogen sulphide, a sulphur vector in many volatile compounds, has multiple origins according to the reaction conditions and can come from Strecker degradation of cysteine (Belitz & Grosch, 1999) or thiamine in the

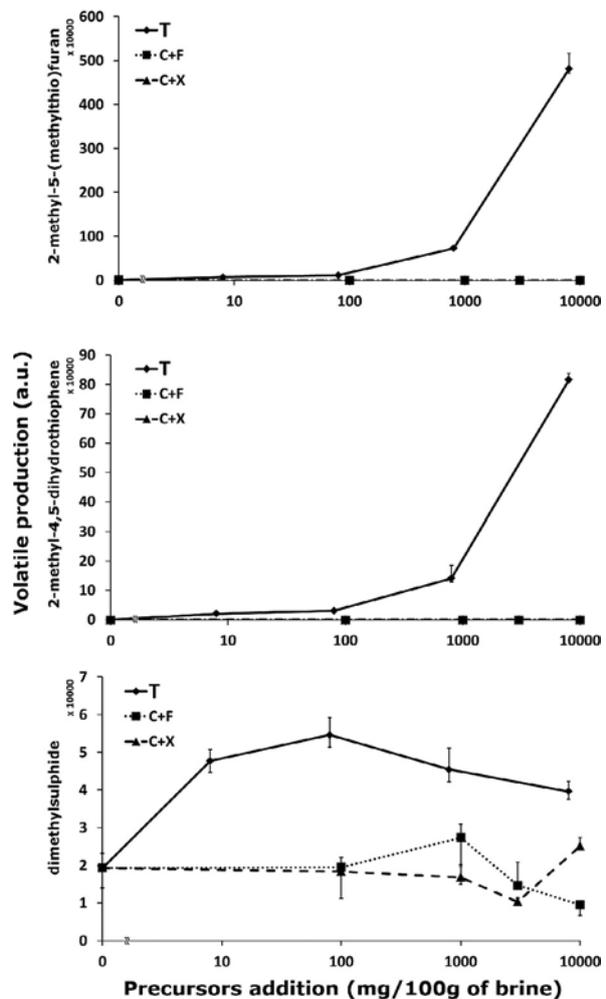


Fig. 4. Production of 2-methyl-5-(methylthio)furan, 2-methyl-4,5-dihydrothiophene and dimethylsulphide (expressed in arbitrary units of chromatographic area: a.u.) as a function of the addition of precursors mg/100 g of brine. Precursors are labelled as follow: T, thiamine, C + F, cysteine + fructose; C + X, cysteine + xylose. To convert these values to mg added per kg of ham before cooking, the values must be multiplied by 0.91. The areas of 2-methyl-5-(methylthio)furan, 2-methyl-4,5-dihydrothiophene and dimethylsulphide were respectively computed from the ions 114, 97 and 62. Median, minimum and maximum values are presented on the ordinate.

absence of other sulphur precursors (Cerny, 2007; Dreher et al., 2003). Hydrogen sulphide may also be involved in the formation of alkylthiophenes in the presence of 2,4-alkadienals by a mechanism proposed by Farmer and Mottram (1990), and Mottram (1994). Thus 2-ethyl-, 2-butyl- and 2-pentylthiophene may be formed respectively from 2,4-hexa-, 2,4-octa- and 2,4-nonadienal and hydrogen sulphide. The conversion of a furan to its thiophene homologue by simple replacement of the oxygen atom by one of sulphur has also been proposed by Mottram (1994) and Tai and Ho (1997). However, in the case of cooked ham, most of the thiophenes had no furan homologue, suggesting that this formation pathway is unlikely. Depending on the studies, thiazoles are thought to come either from reactions between products of cysteine and pentose degradation (Cerny & Davidek, 2003; Filippi et al., 2007), in which case they may reflect "roasting"-type cooking conditions (Cerny & Davidek, 2003; Filippi et al., 2007; Mottram, 1994; Mottram, 1998; Tai & Ho, 1997), or from simple thermal degradation of thiamine (Dwivedi & Arnold, 1972; Ho, Oh, & Baee-Lee, 1994). This last origin seems the more probable in the gentle conditions of ham cooking. The strong representation

of aliphatic sulphur compounds in the ham volatile fraction (structural diversity and proportion in the extracts) is consistent with the observations of Mottram (1994), Mottram (1998), who reported that sulphides and aliphatic thiols appear mostly in “boiled meat”, where cooking temperatures are also not very high. Most of the aliphatic sulphur compounds have high reactivity and sensitivity to oxygen, which explains the origin of many of the compounds identified. First, hydrogen sulphide will react very readily with unsaturated structures to form thiols. These very unstable thiols (like methanethiol) can be oxidised to give dimethyl disulphide (Belitz & Grosch, 1999), which can explain the formation of dimethyl trisulphide and dimethyl tetrasulphide. The action of thiamine on the formation of sulphides was much less intense than that observed on the formation of furans and thiophenes. In the case of dimethyl sulphide (Fig. 4), which was the sulphide easiest to analyse in our extracts, the amplitudes of variation are lower by two or three orders of magnitude than those of furans and thiophenes (Figs. 2 and 4). The effect of the dose of thiamine showed a slight increase in the production of dimethyl sulphide up to 80 mg, followed by a reduction at higher doses. The effect of cysteine was non-significant. The cyclisation of aliphatic thiols and sulphides yields the cyclic sulphides identified. Thus the cyclisations of mercaptoacetaldehyde and methanedithiol were respectively responsible for thiiirane (Zheng et al., 1997) and 1,2,4,5-tetrathiane (Hincelin, Ames, Apriyantono, & Elmore, 1992). 3-(Methylthio)propanal (methional) was not affected by addition of precursors. However, its presence attests a Strecker degradation of methionine (Belitz & Grosch, 1999), i.e. the primary step in the Maillard reaction.

4. Conclusion

The analytical methods implemented in this study have shown that the cooking of ham at 69 °C for several hours will produce a broad variety of volatile sulphur compounds. Olfactometric analyses showed the major role of several furans, such as 2-methyl-3-furanthiol, 2-methyl-3-(methylthio)furan and bis(2-methyl-3-furyl)disulphide in the aroma of ham. These substances all have very low detection thresholds, and intense “meaty” notes at low concentration. Addition of sulphur-containing precursors showed that in gentle ham cooking conditions, thiamine was a much better aroma precursor than cysteine. Technologically, supplying thiamine, either directly in the brine or indirectly through animal feed could offer a way to help optimise the aromatic note in this pork product.

Acknowledgements

We thank the eight sniffers for their participation in the GC-MS/80 analysis, and the consortium VALORIAL and ANRT for funding this research.

References

Baek, H. H., Kim, C. J., Ahn, B. H., Nam, H. S., & Cadwallader, K. R. (2001). Aroma extract dilution analysis of a beeflike process flavor from extruded enzyme-hydrolyzed soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 790–793.

Bailey, M. E. (1994). Maillard reactions and meat flavour development. In F. Shahidi (Ed.), *Flavor of meat and meat products* (pp. 153–169). Glasgow: Blackie Academic and Professional.

Dwivedi, Basant K., & Arnold, R. G. (1972). Chemistry of thiamine degradation – Mechanisms of thiamine degradation in a model system. *Journal of Food Science*, 37.

Belitz, H. D., & Grosch, W. (1999). Aroma substances. In *Food chemistry*, pp. 319–375. Springer.

Berdagué, J. L. & Tournayre, P. (2002). The “Video-Sniff” method, a new approach for the “Vocabulary-Intensity-Duration” study of “Elementary Odours” perceived by gas-chromatography-olfaction. In TEC & DOC Lavoisier (Ed.), *Flavour research at the dawn of the twenty-first century* (pp. 514–517).

Berdagué, J. L., & Tournayre, P. (2005). Gas chromatography-olfaction analysis device and method. France: Institut National de la Recherche Agronomique. Patent WO 2005/001470 A2.

Berdagué, J. L., Tournayre, P., & Cambou, S. (2007). Novel multi-gas chromatography-olfactometry device and software for the identification of odour-active compounds. *Journal of Chromatography A*, 1146(1), 85–92.

Buttery, R. G., Haddon, W. F., Seifert, R. M., & Turnbaugh, J. G. (1984). Thiamin odor and bis(2-methyl-3-furyl) disulfide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32(3), 674–676.

Cerny, C. (2007). Origin of carbons in sulfur-containing aroma compounds from the Maillard reaction of xylose, cysteine and thiamine. *LWT-Food Science and Technology*, 40(8), 1309–1315.

Cerny, C., & Davidek, T. (2003). Formation of aroma compounds from ribose and cysteine during the Maillard reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9), 2714–2721.

Dreher, J. G., Rouseff, R. L., & Naim, M. (2003). GC-olfactometric characterization of aroma volatiles from the thermal degradation of thiamin in model orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 3097–3102.

Evers, W., Heinsohn, H. H., Jr., Mayers, B. J., & Sanderson, A. (1976). Furans substituted at the three position with sulfur. In Charalambous and Katz (Eds.), *Phenolic, sulfur, and nitrogen compounds in food flavors*, ACS, New York, pp. 184–193.

Farmer, L. J., & Mottram, D. S. (1990). Interaction of lipid in the maillard reaction between cysteine and ribose – The effect of a triglyceride and 3 phospholipids on the volatile products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 53(4), 505–525.

Filippi, J. J., Fernandez, X., & Duñach, E. (2007). Les composés volatils soufrés en chimie des arômes. *Sciences des Aliments*, 27(1), 23–46.

Hennel, L. (1966). Le salage - La fabrication des jambons. In *Pratique et technique en Charcuterie* (pp. 405–469). Paris: L'ami du charcutier.

Hincelin, O., Ames, J. M., Apriyantono, A., & Elmore, J. S. (1992). The effect of xylose on the generation of volatiles from heated thiamine. *Food Chemistry*, 44(5), 381–389.

Ho, C. T., Oh, Y. C., & Bae-Lee, M. (1994). The Flavour of pork. In F. Shahidi (Ed.), *Flavour of meat and meat products* (pp. 38–51). Glasgow: Blackie Academic and Professional.

Hofmann, T., & Schieberle, P. (1998). Quantitative model studies on the effectiveness of different precursor systems in the formation of the intense food odourants 2-furfurylthiol and 2-methyl-3-furanthiol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 235–241.

Mottram, D. S. (1994). Some aspects of the chemistry of meat flavour. In F. Shahidi (Ed.), *Flavor of meat and meat products* (pp. 210–230). Glasgow: Blackie Academic and Professional.

Mottram, D. S. (1998). Flavour formation in meat and meat products: a review. *Food Chemistry*, 62(4), 415–424.

Tai, C. Y., & Ho, C. T. (1997). Influence of cysteine oxidation on thermal formation of maillard aromas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(9), 3586–3589.

Théron, L., Tournayre, P., Kondjoyan, N., Abouelkaram, S., Sante-Lhoutellier, V., & Berdagué, J.-L. (2010). Analysis of the volatile profile and identification of odour-active compounds in Bayonne ham. *Meat Science*, 85(3), 453–460.

Thomas, C., Mercier, F., Tournayre, P., Martin, J.-L., & Berdagué, J.-L. (2013). Effect of nitrite on the odourant volatile fraction of cooked ham. *Food Chemistry*, 139(1–4), 432–438.

Tournayre, P., & Berdagué, J. L. (2003–2012). AcquiSniff (version 6.5.5) [Computer software]. IDN.FR.001.210006.002.RP.2003.000.30000. France: Institut National de la Recherche Agronomique.

Wang, R., Yang, C., & Song, H. (2012). Key meat flavour compounds formation mechanism in a glutathione-xylose Maillard reaction. *Food Chemistry*, 131(1), 280–285.

Werkhoff, P., Bruning, J., Emberger, R., Guntert, M., Kopsel, M., Kuhn, W., et al. (1990). Isolation and characterization of volatile sulfur-containing meat flavor components in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3), 777–791.

Whitfield, F. B., & Mottram, D. S. (1999). Investigation of the reaction between 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone and cysteine or hydrogen sulfide at pH 4.5. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1626–1634.

Zheng, Y., Brown, S., Ledig, W. O., Mussinan, C., & Ho, C. T. (1997). Formation of sulfur-containing flavor compounds from reactions of Furaneol and cysteine, glutathione, hydrogen sulfide, and alanine/hydrogen sulfide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 894–897.

II – 1. 3. Effet d'ajouts de thiamine sur les composés odorants clés et sur l'arôme du jambon cuit

(Article soumis au journal « Food Chemistry » en août 2014 et accepté en 2015)

Le 2-méthyl-3-furanthiol, le 2-méthyl-3-(méthyl-dithio)furan, et le bis(2-méthyl-3-furyl)disulfide ont été identifiées comme les molécules soufrées responsables de l'arôme de jambon cuit et la thiamine s'est révélée être leur précurseur principal dans les conditions de fabrication du jambon cuit.

Dans le but d'optimiser les ajouts de thiamine, nous avons parallèlement cherché à :

- affiner la relation existant entre ce précurseur d'arôme et ces molécules soufrées, particulièrement le 2-méthyl-3-furanthiol, plutôt responsable de la note de tête de l'arôme du jambon cuit
- évaluer l'impact de la thiamine sur l'arôme global d'un jambon cuit non nitrité.

Dans une première approche, le suivi de la production des trois molécules soufrées a été réalisé par espace de tête dynamique couplé à la chromatographie gazeuse et à la spectrométrie de masse (DH-GC-MS) dans des mini-jambons enrichis en thiamine. Dans une seconde approche, plus fine, une technique d'extraction spécifique des thiols, préalable à l'analyse par GC-MS a été mise en œuvre afin de permettre le suivi plus précis du 2-méthyl-3-furanthiol (M1) même pour des ajouts de thiamine très faibles. L'arôme global de mini-jambons cuits réalisés avec des quantités variées de thiamine a été évalué par des analyses sensorielles afin d'étudier l'effet dose-réponse de ce précurseur.



Effect of added thiamine on the key odorant compounds and aroma of cooked ham



Caroline Thomas^{b,†}, Frédéric Mercier^a, Pascal Tournayre^a, Jean-Luc Martin^b, Jean-Louis Berdagué^a

^a Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UR 370 QuaPA, MASS Group, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

^b IFIP – Laboratoire d'Essais et de Mesures Physiques, 94704 Maisons-Alfort, France

article info

Article history:

Received 23 May 2014

Received in revised form 25 September 2014

Accepted 15 October 2014

Available online 22 October 2014

Keywords:

Cooked ham

2-Methyl-3-furanthiol Key

odorants

Aroma precursor

Thiamine Sensory

analysis

abstract

This study shows that thiamine plays a major role in the formation of three key odorants of cooked ham: 2-methyl-3-furanthiol, 2-methyl-3-methyldithiofuran, and bis(2-methyl-3-furyl)disulphide. Analyses revealed that under identical cooking conditions, the productions of these three aroma compounds increase in a closely intercorrelated way when the dose of thiamine increases. Using a specific 2-methyl-3-furanthiol extraction–quantification method, it was possible to relate the amounts of thiamine added in model cooked hams to the amounts of 2-methyl-3-furanthiol produced in the cooking process. Sensory analyses highlighted the role of thiamine as a precursor of cooked ham aroma.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Sulphur compounds play a major role in the aroma of most cooked meats. In cooked ham, three odour compounds with very low detection thresholds in air between 0.0006 and 10 ng.l⁻¹ (Filippi, Fernandez, & Duñach, 2007) are combined to collectively induce the characteristic odour of this meat product (Thomas, Mercier, Tournayre, Martin, & Berdagué, 2014): the sulphur compounds are 2-methyl-3-furanthiol (MFT), 2-methyl-3-methyldithiofuran (MDTF) and bis(2-methyl-3-furyl)disulphide (MFT-MFT). As recently shown by Thomas et al. (2014), thiamine is overwhelmingly the source of these compounds in cooked ham. The short-lived ‘cooked ham’ head note is essentially attributable to the highly volatile MFT, whereas the more persistent ‘meaty’ notes are due more to the less volatile MDTF and MFT-MFT. MDTF is produced from reactions involving MFT and methanethiol (Baek, Kim, Ahn, Nam, & Cadwallader, 2001). MFT-MFT is produced from the simple dimerization of MFT (Belitz & Grosch, 1999; Chen & Ho, 2002; Hofmann, Schieberle, & Grosch, 1996). Numerous studies in model media have successfully identified thiamine as a precursor to a broad array of sulphur compounds (Dwivedi, 1972; Cerny, 2007; Dreher, Rouseff, & Naim, 2003; Filippi et al., 2007; Thomas et al., 2014). However, all these studies

have focused on the mechanisms and key parameters underpinning MFT production from thiamine, without ever addressing the quantitative aspect of this relationship.

The primary objective of this study was to quantify the impact of thiamine on the production of the key odorant compounds in cooked ham. Dynamic headspace-gas chromatography-mass spectrometry (DHS-GC-MS) was used to trace the formation of MFT, MDTF and MFT-MFT in model cooked hams enriched with increasing quantities of thiamine. In order to get a fine-grained quantification of MFT production, we took a purpose-specific MFT extraction method based on thiol-organomercury compound affinity, originally developed for liquid products (Tominaga & Dubourdieu, 2006; Tominaga, Murat, & Dubourdieu, 1998), and adapted it to the solid cooked ham matrix. Our second objective was to study the effect of increasing thiamine dose on the development of the aromatic note of nitrite-free model cooked hams.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

2-Methyl-3-furanthiol (MFT) (purity 95%, Ref: W318809), diatomaceous earth (Ref: D3877), 4-(hydroxymercuri)benzoic acid sodium salt (*p*-HMB) (purity 95%, Ref: 55540), hydrochloric acid (HCl) (concentration: 36.5–38.0%, Ref: 320331), Trizma[®] base (Tris) (purity 99.8%, Ref: T1503), Dowex[®], 1X2 chloride form resin,

[†] Corresponding author. Tel.: +33 (0) 473 62 44 99.

E-mail address: caroline.thomas@clermont.inra.fr (C. Thomas).
http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.078 0308-8146/©

100–200 mesh (Ref: 44296), thiamine (purity 99%, Ref: T4625), ethyl acetate (purity 99.8%, Ref: 270989), sodium acetate trihydrate salt (purity 99%, Ref: S8625), cysteine (purity 99%, Ref: W326305) and dichloromethane (purity 99.9%, Ref: 650463) were purchased from Sigma–Aldrich.

2.2. Fabrication of model cooked hams

Model cooked hams were fabricated in the laboratory from a specific pig muscle (*M. semimembranosus*) according to [Thomas et al. \(2014\)](#), but without nitrited salt (except for ham #10; [Table 1](#)). Ten different formulations of ham containing a broad range of thiamine concentrations were realised ([Table 1](#)). For each recipe, 1 kg of ground raw meat was mixed with brine containing 82 g of water and 18 g of sodium chloride. Then 300 g of the mix was distributed into three closed glass jars sealed under vacuum. Cooking program was 40 °C to 69 °C at 0.1 °C min⁻¹ and 120 min held at 69 °C according to the recommendations of the French Institute of Pork Industry (IFIP). Thiamine was added to 100 g of brine at various quantities from 8 to 300 mg. Endogenous thiamine is already present in the raw meat at 9.5 mg kg⁻¹ and at 8.6 mg kg⁻¹ after dilution due to the brining process (as seen in ham #1). To study the effect of cooking on the three sulphur compounds of interest in thiamine-enriched hams, hams #1, #2, #5 and #9 were fabricated with increasing quantities of thiamine and were analysed by DHS–GC–MS before and after cooking. Only one fabrication (ham #10) was made with 108 mg of nitrite in 100 g of brine in order to study its aroma. Brine composition, thiamine concentration in the hams before cooking and analyses performed are reported in [Table 1](#).

2.3. Semi-quantification of MFT, MDTF and MFT–MFT by DHS–GC–MS

Model cooked hams were minced and 7 g were sampled for analysis. Meat was placed at ambient temperature in a Pyrex® extraction cartridge (Ref. M3, Maillères, Aubière 63170, France). The volatiles were extracted by dynamic headspace sampling (DHS) coupled to gas chromatography (Tekmar, Cincinnati, OH) for 60 min with a helium stream (Messer, He/U purity: 99.995%) at a flow rate of 40 ml min⁻¹. The trap (Tenax® TA 60/80 mesh adsorbent, Supelco Bellefonte, PA; working length 180 mm and inside diameter 14⁰⁰ for GC–MS/80 or 1/8⁰⁰ for GCMS/O and GC–GC–MS/O analyses) operated at 30 °C. After a 30 min dry purge, volatile compounds were desorbed from the trap at 180 °C for 10 min using helium (Messer, He/N55 purity: 99.9995%). Volatiles were cryo-focalised into the chromatographic pre-column (at

-150 °C with liquid nitrogen) and injected in the column by heating at 180 °C for 2 min. Volatiles were separated and detected using a GC–MS device composed of a chromatograph (GC 6890, Agilent Technologies; apolar capillary column RTX5-MS, length 60 m, internal diameter 0.32 mm, film thickness 1 μm) linked to a quadrupole mass detector (MSD 5973 Inert, Agilent Technologies). The capillary column was connected to the mass spectrometer via a deactivated capillary column (SGE, length 0.5 m, internal diameter 0.10 mm). The three volatile sulphur compounds were detected by electron ionisation at 70 eV, and data were acquired on selected ions (*m/z* = 114, 160 and 113 a.m.u.) at a scan rate of 50 scan s⁻¹. Volatiles were semi-quantified by measuring their peak area from their specific ion: 114 for MFT, 160 for MDTF and 113 for MFT–MFT. Analyses were performed on three individual hams per formulation.

2.4. Quantification of MFT by GC–MS

In order to explore the impact of added thiamine doses on MFT production, the extraction method developed specifically for this subfamily of volatile thiols by [Tominaga and Dubourdieu \(2006\)](#) and [Tominaga et al. \(1998\)](#) was adapted to fit a solid matrix.

2.4.1. MFT extraction by “Accelerated Solvent Extraction” (ASE)

A 300 g sample of cooked ham was powdered in liquid nitrogen with a ball mill. MFT was extracted from the ham powder using an ASE 350 extractor (ASE 350 Dionex, Sunnyvale, CA, USA). For this, 55 g of diatomaceous earth was added to 55 g of cooked ham powder (ratio 1:1). This mix was transferred into three 100 ml stainless-steel extraction cells (diameter: 2.9 cm). The cells were equipped with a stainless-steel frit and two cellulose filters placed in the cells outlet. Each of the three cells was then filled full with diatomaceous earth as recommended by the supplier. The solvent used was a 50/50 (v/v) mix of 0.1 M HCl and 0.1 M Tris solutions (12.1 g in 1 litre of Milli-Q water). The extraction solution was obtained by dissolving 750 mg of *p*-HMB in 1 litre of this solvent ([Tominaga & Dubourdieu, 2006](#); [Tominaga et al., 1998](#)). For each of the three cells, the ASE conditions were performed as follow: (i) the ham sample placed in the cell was heated during 5 min to reach 45 °C, then (ii) the cell was filled with 60 ml of solvent. After a static extraction step of 5 min, the cell was purged for 250 s with nitrogen pressured at 10.5 × 10⁶ Pascal. This extraction step was repeated twice for each sample. The three extracts (3 × 120 ml) were pooled before purification on the separation column.

Table 1
Composition of cooked hams and analyses realised.

Hams	Composition of the brine added to 1 kg of raw meat				Thiamine concentration ^a (mg kg ⁻¹ of brined raw meat) before cooking	Analyses ^b
	Water (g)	Sodium chloride (g)	Nitrite (mg)	Thiamine (mg)		
#1	82	18	0	0	8.6	1, 2, 3, 4
#2	82	18	0	8	15.9	1, 2
#3	82	18	0	40	45	2
#4	82	18	0	50	54	3, 4
#5	82	18	0	80	81.3	1, 2
#6	82	18	0	100	99.5	3, 4
#7	82	18	0	120	117.7	2
#8	82	18	0	200	190.4	2, 3
#9	82	18	0	300	281.3	1, 2, 3
#10	82	18	108	0	8.6	3

^a Thiamine concentration was calculated before cooking, from the quantities of thiamine added in the brine (column 5) plus the content of the endogenous thiamine already present in the matrix (9.5 mg kg⁻¹ in raw meat so 8.6 mg kg⁻¹ in brined raw meat).

^b Analyses realised on the different formulations of cooked hams: 1 = MFT, MDTF and MFT–MFT analyses by DHS–GC–MS, analyses were performed before and after cooking, 2 = specific extraction of MFT and analysis by GC–MS, 3 = “cooked ham” aroma intensity and 4 = triangular tests.

2.4.2. Column preparation

After reactivation in 0.1 M HCl, the DOWEX 1 (1X2–100) resin was rinsed with approximately 400 ml of Milli-Q water until the pH of the supernatant reached 5–6. The resin was then loaded into a purpose-designed glass column described in Tominaga & Dubourdieu (2006). The water was removed from the column before its use. Each thiol analysis used fresh resin.

2.4.3. Separation and concentration

The three extracts obtained from the ASE step (360 ml) were percolated for 30 min on the separation column in order to trap the *p*-HMB-thiol complex. The column was rinsed with 50 ml of sodium acetate buffer (13.6 g of sodium acetate trihydrate salt per litre of water; pH = 6). In order to release MFT from the *p*-HMB-thiol complex, 50 ml of a cysteine solution (500 mg of cysteine dissolved in 50 ml of the sodium acetate solution) was deposited on the separation column after it was turned upside down. The eluted solution containing the thiols was mixed with 500 μ l of ethyl acetate and successively extracted with 4 and 2 ml of dichloromethane. The extracts were first concentrated to 1 ml under nitrogen flux and a second time to 100 μ l. Finally, a 1.5 ml vial equipped with an insert was filled with this concentrated extract to be analysed GC–MS.

2.4.4. Quantification

Splitless injection of the sample was carried out with a Combipal autosampler (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland) at 250 °C. One μ l of the sample was splitless-injected during 1 min through a liquid liner (Shimadzu internal diameter 3.5 mm, external diameter 5 \times 95 mm, Ref: 221-48335-01, Restek) with a 3 ml min⁻¹ carrier gas flow to the head of the column. Separation was performed on a GC-QP2010 Shimadzu system (Shimadzu Corp, Tokyo, Japan) equipped with a DB-5MS UI apolar capillary column (length 60 m, internal diameter 0.32 mm, film thickness 1 μ m, Supelco, Saint-Germain-en-Laye, France). Temperature was programmed as follows: 5 min isothermal at 40 °C, 4 °C min⁻¹ rise to 230 °C and 10 min isothermal at 230 °C. MFT was detected by electron ionisation at 70 eV, and mass fragments were acquired after a solvent delay of 15 min., in single ion monitoring mode (*m/z* = 114 a.m.u.) at a scan rate of 10 scan s⁻¹. To quantify 2-methyl-3-furanthiol by GC–MS after its specific extraction with an organomercury compound, a quantification by external standardization using 2-methyl-3-furanthiol was performed. Owing to the high volatility and reactivity of thiols, the incorporation of internal standards (hexanethiol, 3-mercapto-2-butanone and 2-propene-1-thiol) in the ham matrix, and their subsequent extraction with pHMB disturbed the extraction of 2-methyl-3-furanthiol. For this reason, we opted to carry out an external calibration with the compound of interest, i.e. 2-methyl-3-furanthiol, which did not disturb the matrix, rather than calibrate with an internal standard. The external calibration curve was obtained from a range of 7 MFT concentrations in dichloromethane starting from 10 to 500 μ g l⁻¹. Extractions and chromatography analyses were performed on three individual cooked hams per formulation.

2.5. Sensory analyses

To study the effect of added thiamine on the sensory attributes of the model cooked hams, a sensory panel evaluated the intensity of the ‘cooked ham’ aroma from 5 nitrite-free hams enriched with thiamine at 0, 50, 100, 200 and 300 mg per 100 g of brine, which equates to thiamine concentrations of 8.6, 54, 99.5, 190.4 and 281.3 mg kg⁻¹ before cooking, and one nitrite-cured ham without thiamine addition. The sensory panel was composed of 10 judges selected for their ability to reproducibly evaluate the aromatic note ‘cooked ham’ in ham tasted. The sensory analysis was organised as

a one-by-one taste-test sequence of the 6 formulations, in which samples were presented in a different order to different judges. The sensory scale was ranked from 0 to 10. To determine the lowest concentration of thiamine inducing a perceptible sensory difference, two triangular tests were carried out according to French standard NF EN ISO 4120 (AFNOR, La Plaine Saint-Denis, France). The first test compared the hams #1 and #4, containing 8.6 and 54 mg of thiamine per kg of ham, respectively, and the second test compared the hams #1 and #6, containing 8.6 and 99.5 mg kg⁻¹ of ham, respectively. Samples were coded and presented to the assessors in a random order with a maximum number of permutations. The panel consisted of 20 trained judges aged from 24 to 60 years old.

2.6. Statistical analyses

To study the impact of the thiamine concentration in ham on its aroma, a two-way ANOVA was performed according to: $N_{ij} = \mu + T_{i=5} + A_{j=10} + e$, where N_{ij} = intensity of the ‘cooked ham’ aroma note, μ = mean effect, $T_{i=5}$ = thiamine concentration effect with five levels, $A_{j=10}$ = assessor effect with 10 levels, and e = residual variance. The multiple comparisons of means were done with the Newman–Keuls test.

For the triangular tests, significant differences were statistically searched using a two-tailed binomial distribution function (20; 1/3) where $p = 1/3$ is the probability that a random response successfully occurs. The table given in standard French norm NF-EN-ISO 4120 indicates that for a panel of 20 judges, 11 correct responses are needed to conclude on a significant difference ($p < 0.05$) between the two samples.

3. Results and discussion

The DHS–GC–MS analyses enabled us to evaluate the production of the key odorant compounds in cooked ham according to its thiamine content. Experiments run with added thiamine doses clearly showed that this sulphur-containing vitamin can strongly induce production of MFT, MDTF and MFT-MFT in cooked ham under these low-temperature cooking conditions (Fig. 1). The patterns of MFT, MDTF and MFT-MFT produced according to added thiamine are relatively similar, and the cooking process proved essential to the formation of all three key-odorant compounds (Fig. 1). When the model cooked hams with the highest thiamine contents were sliced, they gave off a perceptible intense ‘cooked ham’ aroma strongly resembling MFT aroma, confirming the role of this vitamin as an aroma precursor.

For more realistic doses in an industrial context (between 8 and 80 mg of thiamine per 100 g of brine), cooking ham at 69 °C reduces the initial thiamine content by about 30% (Thomas et al., 2014), a relatively small fraction of the thiamine available to initiate the aroma. Another study reported that 60% of thiamine was degraded by cooking for 2 h at 177 °C (Miller & Work, 1946). Thiamine degradation is impacted by both the pH of the matrix and the cooking program (Greenwood, Beadle, & Kraybill, 1943). We found fairly strong correlations between MFT and MDTF productions ($r^2 = 0.93$; $p < 0.001$) or MFT and MFT-MFT productions ($r^2 = 0.89$; $p < 0.001$) induced by added thiamine (Fig. 2). These correlations reflect the structural similarities between MFT, MDTF and MFT-MFT, which are all compounds derived from reaction mechanisms directly involving thiamine. The production of MFT-MFT appeared only from a thiamine concentration of 15.9 mg kg⁻¹. This result is consistent with previous findings indicating that a sufficient quantity of MFT is necessary to initiate the production of a detectable quantity of MFT-MFT (Chen & Ho, 2002; Dreher et al., 2003). Although MFT and its dimer both possess a ‘meaty’ note,

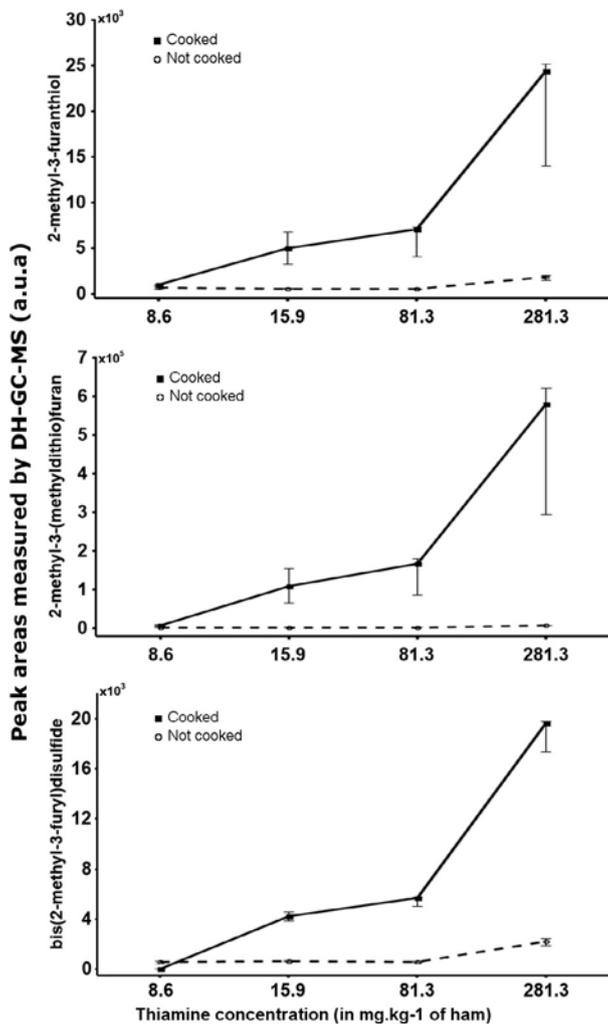


Fig. 1. Productions of 2-methyl-3-furanthiol (MFT), 2-methyl-3-(methyldithio)furan (MDTF) and bis(2-methyl-3-furyl)disulfide (MFT-MFT) as a function of thiamine concentration in cooked or not cooked hams. The areas of MFT, MDTF and MFT-MFT are expressed in arbitrary units of chromatographic area (a.u.a) and were respectively computed from the ions 114, 160 and 113. Median, minimum and maximum are presented. The abscissa represents the thiamine concentration on a logarithmic scale.

MFT-MFT is less desirable than the MFT in cooked meat because its odour gives a 'medical' note (Belitz & Grosch, 1999).

These compounds are difficult to analyse, because although they are easily detectable by olfaction at very low concentration, their detection by GC-MS can sometimes prove impossible (Bezman, Rouseff, & Naim, 2001), even using specific selective systems such as pulsed flame photometric detector (PFPD) (Dreher et al., 2003). Here, DHS-GC-MS proved relatively easy to implement and was able to track the desorption of MFT and its derivatives. In order to explore the effect of low-concentration added thiamine on the production of MFT as MDTF and MFT-MFT tracer, we adapted the method developed by Tominaga and Dubourdieu (2006) for a solid matrix. This purpose-adapted method was able to quantify MFT in model cooked hams containing thiamine at pre-cooking doses ranging from 8.6 to 281 mg.kg⁻¹ (Fig. 3). MFT production increased steadily with thiamine concentration in hams. The relationship between thiamine concentration in hams before cooking and MFT production after cooking fitted a second-order polynomial function. Despite variability tied to the non-homogeneous matrix and the different analytical steps, the method implemented here was sensitive enough to quantify MFT

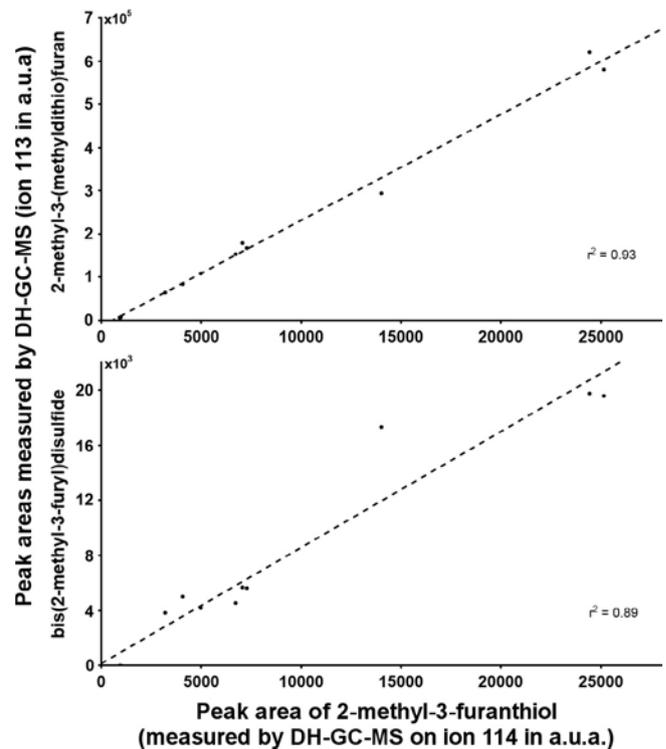


Fig. 2. Relations between the productions of 2-methyl-3-(methyldithio)furan or bis(2-methyl-3-furyl)disulfide evidenced by DHS-GC-MS analyses. Peak areas are expressed in arbitrary units of area (a.u.a) and were measured respectively from the ions 114, 160 and 113. Productions of MFT-MFT ($r^2=0.89$) and MDTF ($r^2 = 0.93$) are significantly ($p < 0.001$) correlated to the production of MFT.

at thresholds below 100 ng.kg⁻¹. The *p*-HMB makes it possible to selectively extract and purify the MFT since it does not react with sulphides or disulphides (Darriet, Tominaga, Lavigne, Boidron, & Dubourdieu, 1995). This complexation also offers a way to stabilize this highly volatile compound, and thus minimise losses throughout the analytical protocol (Mottram, SzaumanSzumski, & Dodson, 1996). The liquid extraction in dichloromethane also helps minimise MFT dimerization into MFT-MFT (Hofmann et al., 1996). Concerning aroma, the best-performing thiamine input induced an increase in 'cooked ham' aroma intensity of 1.8 points on the 10-point scale. The min/max scores were 4.1/10 for a non-spiked ham #1 and 5.9/10 for the ham #9 containing thiamine at a concentration of 2813 mg.kg⁻¹ (Fig. 4). The strongest increase in

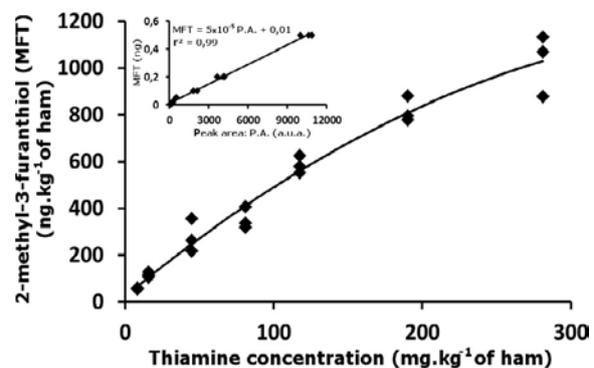


Fig. 3. Production of 2-methyl-3-furanthiol (MFT) as a function of the thiamine concentration in hams. In our cooking conditions, the amount of produced MFT according to the thiamine concentration in the ham T_h can be estimated ($MFT = -0,006 T_h + 5,277 T_h + 23,210$ with $r = 0,97$) for thiamine concentrations comprised between 8 and 735 mg.kg⁻¹. The external calibration curve of MFT (based on the ion $m/z = 114$) and equation are shown in the upper left of the figure.

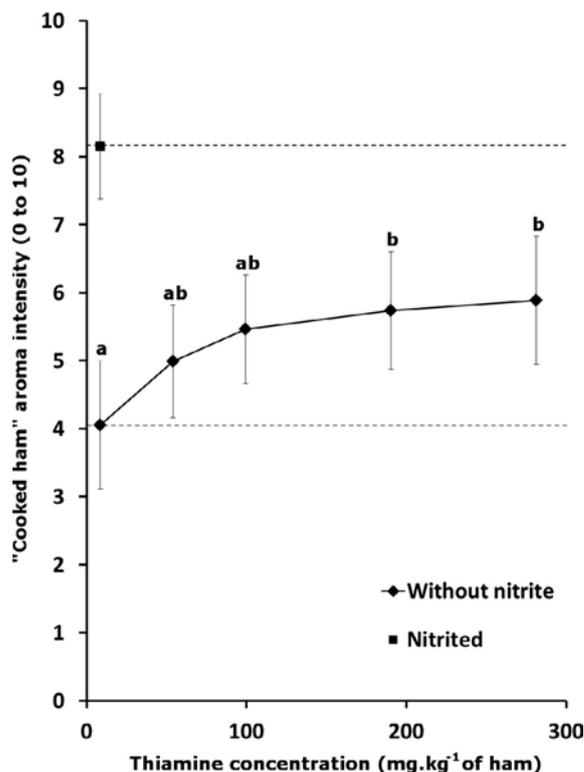


Fig. 4. Effect of thiamine concentration on the “cooked ham” aroma intensity. Mean values, confidence interval ($p < 0.05$) and means comparisons between non nitrited hams according to the Newman-Keuls test are presented ($0.01 < p < 0.05$; homogeneous means have the same letter: a, ab or b).

aromatic score (1/10) was recorded at the step from 8.6 to 54 mg kg⁻¹ thiamine. A thiamine concentration of 99.5 mg kg⁻¹ already yielded an intense ‘cooked ham’ note and scored 5.4/10.

Almost tripling the thiamine concentration (to 281 mg kg⁻¹) yielded a ‘cooked ham’ score of 5.9/10, i.e. an increase of only 0.5/10. Comparison of means showed that significant differences ($0.01 < p < 0.05$) in intensity of ‘cooked ham’ note were perceptible only between non-spiked hams (group “a” in Fig. 4) and hams enriched with thiamine at doses of 190.4 and 281.3 mg kg⁻¹ ham (group “b” in Fig. 4). In order to get a finer-grained analysis of the differences between hams less heavily spiked with thiamine, triangular tests were performed between hams #1 and #4, and then between hams #1 and #6. The difference between a non-doped ham and a thiamine-enriched ham became significant at a thiamine concentration of 99.5 mg kg⁻¹ ($p < 0.001$). This result is consistent with the scores obtained during the taste-test of ‘cooked ham’ aroma intensity, which showed clear differences only at thiamine concentrations P190.4 mg kg⁻¹. When the aim is to reveal differences, a triangular-type comparative test will always outperform taste-test intensity scores. The most efficient low threshold of thiamine is thus around 99.5 mg kg⁻¹ in ham. This is a relatively high dose given the natural thiamine content of pork meat, which is in the range 9–13 mg per kg of raw meat (Miller & Work, 1946).

At this point in the results analysis, we must bear in mind that the thiamine-spiked hams were manufactured nitrite-free. Several studies (Luecke, 2008; Thomas, Mercier, Tournayre, Martin, & Berdagué, 2013) converge to confirm that an absence of nitrite induces massive formation of an array of odorant compounds formed by oxidative breakdown, such as hexanal or 1-octen-3-ol. These compounds tend to mask the perception of the sulphur compound odorants (including MFT, but also MDTF and MFT-MFT) correlatively produced in the thiamine degradation process. Hence in the absence of nitrite, the added thiamine probably does

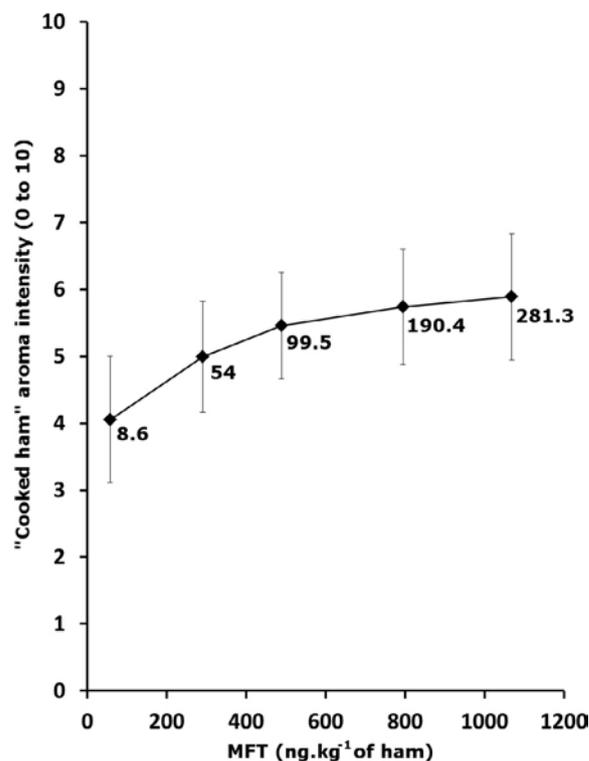


Fig. 5. Relationship between the 2-methyl-3-furanthiol content (MFT) and the “cooked ham” aroma intensity. Thiamine concentration of the hams (from 8.6 to 281.3 mg kg⁻¹) is added on the graph.

not contribute to the ‘cooked ham’ aroma score as efficiently as in its presence. Under our experimental conditions, thiamine was able to narrow the aroma-score gap between a nitrite-free ham (4.1/10) and a nitrite-cured ham (8.2/10) by around 44%. This result further confirms the role of thiamine as an aroma precursor. The curve charting ‘cooked ham’ head note intensity score against MFT concentration shows that aromatic score starts to plateau at over 800 ng kg⁻¹ MFT, induced by a thiamine concentration of 190.4 mg kg⁻¹ (Fig. 5). This curve mirrors the curve observed for ‘cooked ham’ aroma intensity score against thiamine content (Fig. 4). These correlations reflect strong ‘thiamine added’-‘MFT’- ‘cooked ham aroma’ inter-relationships. Hence to ‘improve’ the aroma of nitrite-free cooked hams, adding a reasonable amount of thiamine is authorised, either directly during the fabrication process (Regulation 1169/2011 of the European parliament, L 304/61) or indirectly by using animal feed rich or enriched in this vitamin. Another option could be to convert a larger fraction of the endogenous thiamine into aromatic sulphur compounds. This could be achieved by making adjustments to the cooking conditions (temperature, pH, etc.), provided of course that the modifications did not adversely affect yields. The quantification method reported here could be used to monitor the effects of these parameters on MFT production.

4. Conclusion

This study shows that thiamine is a key precursor of three sulphur-substituted furan derivatives that have a ‘meaty-cooked ham’ aromatic note. It also confirms that the low-temperature ham cooking process is essential to induce the co-formation of these three key odorants. A 2-methyl-3-furanthiol extraction-quantification method makes it possible to track the formation of this compound, in response to low thiamine additions. The evaluation of the ‘meaty-cooked ham’ aroma intensity confirms the major role

of thiamine as an aroma precursor. Some technological adjustments are proposed to optimise the aroma of cooked ham produced without nitrite.

Acknowledgements

We thank Philippe Darriet and Cécile Thibon for their help and their advices, and the consortium VALORIAL and ANRT for funding this research.

References

- Baek, H. H., Kim, C. J., Ahn, B. H., Nam, H. S., & Cadwallader, K. R. (2001). Aroma extract dilution analysis of a beeflike process flavor from extruded enzyme-hydrolyzed soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 790–793.
- Belitz, H. D., & Grosch, W. (1999). Aroma substances. In *Food Chemistry*, pp. 319–375. Springer.
- Bezman, Y., Rouseff, R. L., & Naim, M. (2001). 2-Methyl-3-furanthiol and methional are possible off-flavors in stored orange juice: Aroma-similarity, NIF/SNIF GC-O, and GC analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5425–5432.
- Cerny, C. (2007). Origin of carbons in sulfur-containing aroma compounds from the Maillard reaction of xylose, cysteine and thiamine. *LWT – Food Science and Technology*, 40(8), 1309–1315.
- Chen, Y., & Ho, C. T. (2002). Effects of carnosine on volatile generation from Maillard reaction of ribose and cysteine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2372–2376.
- Darriet, P., Tominaga, T., Lavigne, V., Boidron, J. N., & Dubourdieu, D. (1995). Identification of a powerful aromatic component of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon wines: 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. *Flavour and Fragrance Journal*, 10(6), 385–392.
- Dreher, J. G., Rouseff, R. L., & Naim, M. (2003). GC-olfactometric characterization of aroma volatiles from the thermal degradation of thiamin in model orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 3097–3102.
- Dwivedi, B. K., & Arnold, R. G. (1972). Chemistry of thiamine degradation – Mechanisms of thiamine degradation in a model system. *Journal of Food Science*, 37.
- Filippi, J. J., Fernandez, X., & Duñach, E. (2007). Les composés volatils soufrés en chimie des arômes. *Sciences des Aliments*, 27(1), 23–46.
- Greenwood, D. A., Beadle, B. W., & Kraybill, H. R. (1943). Stability of thiamine to heat: ii. Effect of meat-curing ingredients in aqueous solutions and in meat. *Journal of Biological Chemistry*, 149(2), 349–354.
- Hofmann, T., Schieberle, P., & Grosch, W. (1996). Model studies on the oxidative stability of odor-active thiols occurring in food flavors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(1), 251–255.
- Luecke, F.-K. (2008). Manufacture of meat products without added nitrite or nitrate – quality and safety aspects. In D. V. Karklina, P. R.; Vokk, R.; Verhe, R.; Lucke, F. K.; Kuksa, P.; Rukshan, L.; Shleikin, A. (Eds.), *The 3rd baltic conference on food science and technology* (pp. p41–45). Jelgava, Latvia.
- Miller, C. D., & Work, S. H. (1946). Thiamine content of raw and cooked pork tissues from pigs of known dietary history. *Journal of Animal Science*, 5(4), 350–357.
- Mottram, D. S., SzaumanSzumski, C., & Dodson, A. (1996). Interaction of thiol and disulfide flavor compounds with food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(8), 2349–2351.
- Thomas, C., Mercier, F., Tournayre, P., Martin, J.-L., & Berdagué, J.-L. (2013). Effect of nitrite on the odorant volatile fraction of cooked ham. *Food Chemistry*, 139(1–4), 432–438.
- Thomas, C., Mercier, F., Tournayre, P., Martin, J.-L., & Berdagué, J.-L. (2014). Identification and origin of odorous sulfur compounds in cooked ham. *Food Chemistry*, 155, 207–213.
- Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2006). A novel method for quantification of 2-methyl-3-furanthiol and 2-furanmethanethiol in wines made from *Vitis vinifera* grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(1), 29–33.
- Tominaga, T., Murat, M. L., & Dubourdieu, D. (1998). Development of a method for analyzing the volatile thiols involved in the characteristic aroma of wines made from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(3), 1044–1048.

II – 2. Substitution du nitrite par des molécules ou par des extraits végétaux antioxydants : effets sur l'oxydation et sur l'arôme du jambon cuit

Après les résultats obtenus sur le déterminisme de la production des molécules soufrées aromatiques, cette seconde partie est consacrée au contrôle de l'oxydation dans le jambon cuit qui constitue le deuxième levier d'action pour rétablir la « balance aromatique » de cette charcuterie en l'absence de nitrite.

Comme dans les expériences précédentes, les ingrédients proposés ont été intégrés à la fabrication de mini-jambons cuits afin d'évaluer leurs performances antioxydantes dans cette matrice.

L'oxydation a été évaluée dans des mini-jambons enrichis :

- en principes actifs purs,
- en extraits végétaux purs,
- puis en extraits végétaux purs ou combinés en mélanges. Pour cette dernière étape, seuls les extraits les plus performants individuellement avaient été retenus.

Finalement, les mini-jambons réalisés à partir de ces mélanges d'extraits ont été analysés afin d'évaluer leur état d'oxydation et leur arôme.

II – 2. Substitution du nitrite par des molécules ou par des extraits végétaux antioxydants : effets sur l'oxydation et sur l'arôme du jambon cuit

1. Introduction

Afin de sélectionner des substances naturelles capables de limiter l'oxydation dans des jambons non nitrités sans pour autant perturber l'arôme, les recherches ont été menées en trois étapes successives :

- 1) l'évaluation des performances antioxydantes de huit principes actifs. Ces huit molécules ont été choisies pour leur présence dans différents extraits végétaux disponibles au sein de la Société Diana Naturals ainsi que sur la base des connaissances et expertises des partenaires
- 2) l'évaluation des performances antioxydantes et aromatiques de six extraits végétaux ne contenant pas de nitrite mais contenant un ou plusieurs des principes actifs sélectionnés précédemment
- 3) l'évaluation des performances antioxydantes et aromatiques de onze mélanges réalisés à partir de 4 extraits sélectionnés précédemment.

Cette approche a non seulement permis d'évaluer les performances antioxydantes de molécules pures et d'extraits directement dans la matrice « jambon cuit » mais aussi d'étudier l'effet de ces ingrédients sur l'arôme global des mini-jambons.

Dans le but de se rapprocher d'un usage industriel, ces extraits ont été sélectionnés sur des critères économiques et législatifs et ont été introduits à des doses « réalistes » pour ce type d'application en respectant les contraintes de dissolution de l'extrait dans la saumure ainsi que des contraintes économiques.

2. Matériels et méthodes

L'état d'oxydation des minis jambons cuits modèles a été évalué (i) par dosage du malonedialdéhyde et plus généralement des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS), une méthode largement utilisée pour les produits carnés (Barriuso, Astiasaran, & Ansorena, 2013), et (ii) par semi-quantification des composés d'oxydation au moyen de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Des analyses sensorielles ont permis d'évaluer parallèlement l'impact des extraits végétaux sur l'intensité de la note aromatique « jambon cuit » des fabrications. Cette thèse est axée sur la préservation de l'arôme en l'absence de nitrite, mais nous avons cependant profité des fabrications réalisées pour évaluer l'impact de ces extraits sur la couleur des jambons cuits (Annexe I) et pour effectuer, à titre sécuritaire, des analyses microbiologiques de contrôle préalables aux dégustations (Annexe II).

Teneur de l'extrait en principes actifs (en %)	50%	23,40%	3,80%	0,24%	32%	6,70%	10%	12%	80%	80%	5%	97%	10%	5%
Principes actifs contenus dans l'extrait	Catéchines totales ^a	Epigallocatechine gallate	Epicatechine gallate	Catéchine	Acide ascorbique	Acide malique	Quercétine	PACs (en équivalent catéchine ^b)	PT (en équivalent catéchine ^b)	PT (en équivalent catéchine ^b)	Autres molécules antioxydantes	PACs (en équivalent catéchine ^b)	Catéchine + épicatechine	Catéchine
Quantités d'extraits ajoutées (en mg/100g de saumure)	Quantités "de principe actif" véhiculées par l'extrait (en mg)													
Thé vert														
50 *	25	12	2	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100 *	50	23,4	4	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
200	100	47	8	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
427	214	100	16	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2632	1316	616	100	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41667	20834	9750	1583	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acérola														
313	-	-	-	-	100	21	-	-	-	-	-	-	-	-
1500	-	-	-	-	480	100	-	-	-	-	-	-	-	-
Oignon														
250 *	-	-	-	-	-	-	25	-	-	-	-	-	-	-
500 *	-	-	-	-	-	-	50	-	-	-	-	-	-	-
1000	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-
Canneberge														
125	-	-	-	-	-	-	-	15	100	-	-	-	-	-
250 *	-	-	-	-	-	-	-	30	200	-	-	-	-	-
833	-	-	-	-	-	-	-	100	666	-	-	-	-	-
Pomme														
125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	6	-	-	-
2000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1600	100	-	-	-
Pépins de raisin														
103	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	10	5
1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	970	100	50
2000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1805	186	100

Tableau 1. Quantités de « principes actifs antioxydants » véhiculées par les extraits aux doses employées.

Les teneurs en principes actifs sont exprimées en pourcentage massique.

La lecture du tableau doit se faire ainsi : « l'extrait d'acérola contient 6,7 % d'acide malique, c'est pourquoi, l'ajout de 313 mg d'acérola dans la saumure véhicule 21 mg d'acide malique ».

Chacune des doses d'extraits testées permet de véhiculer au moins **100 mg** d'un des principes actifs. Pour les extraits de thé vert, d'oignon et de canneberge, des doses inférieures ou intermédiaires ont été testées (*) pour compléter les informations « doses-réponses » sur les performances antioxydantes de ces extraits.

La dose de *41667* mg d'extrait de thé vert en italique n'a pas pu être testée car, à cette concentration, l'extrait n'est plus soluble dans l'eau.

Liste des abréviations : PACs = proanthocyanidines totales, PT = polyphénols totaux.

^a : Catéchines totales = Epigallocatechine gallate (EGCG), Epicatechine gallate (ECG), catéchine (C) et Epigallocatechine (EGC).

^b : les concentrations des proanthocyanidines et des polyphénols totaux dans l'extrait ont été calculées en mg.g⁻¹ d'extrait puis exprimées en équivalent catéchine, étalon présent dans l'extrait.

2.1. Additifs, réactifs et standards chimiques

- Origine des molécules antioxydantes : acide ascorbique (ref : A7506, pureté : 99%), acide citrique (ref : 251275, pureté : 99,5%), acide malique (ref : M0875, pureté : 98%), acide quinique (ref : 138622, pureté : 98%), catéchine (ref : C1251, pureté : 98%), dextrose (ref : D9434, pureté : 95%), glutathion (ref : G4251, pureté : 98%), quercétine (ref : Q4951, pureté : 95%) ont été achetées chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).
- Les extraits végétaux d'acérola, de canneberge, de pépin de raisin, de pomme, d'oignon et de thé vert ont été fournis par Diana Naturals (Rennes, France) et leurs compositions sont en partie détaillées dans le Tableau 1.
- Les réactifs utilisés pour l'analyse des TBARS : le chlorure de potassium (KCl), le butylhydroxytoluène (BHT), l'acide trichloracétique (TCA), l'acide 2-thiobarbiturique (TBA), l'hydroxyde de sodium (NaOH), l'éthanol, et le *n*-butanol ont été fournis par Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).
- Les composés standards de référence utilisés pour les identifications en GC-MS ont été obtenus chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

2.2. Fabrication des jambons modèles

Afin d'étudier les effets des différents principes actifs et extraits végétaux, ceux-ci ont été intégrés dans des minis-jambons cuits modèles, fabriqués en laboratoire, à partir d'un seul muscle (*M. Semimembranosus*) selon Thomas, Mercier, Tournayre, Martin et Berdagué (2014).

Composition des saumures : Les saumures ont été élaborées de telle façon que la somme de tous les ingrédients (eau, sel NaCl ou sel NaCl nitrité à 0,6% et substances antioxydantes) soit égale à 100 g. Ainsi, entre 17 mg et 2,6 g de substances antioxydantes ont été mélangés à 18g de sel NaCl et complétés jusqu'à 100 g par de l'eau (soit entre \approx 80 et 82 g). Cette saumure a ensuite été homogénéisée avec 1 kg de viande crue hachée. Les compositions de toutes les saumures sont détaillées dans le Tableau 2. La formulation nitritée N⁺ (n°42), réalisée avec 18 g de sel nitrité à 0,6%, soit une concentration finale en nitrite dans les mini-jambons de 98 mg.kg⁻¹, représente la « référence positive » ou « cible technologique à atteindre » en termes d'oxydation et d'arôme. Par opposition, la formulation N⁻ (n°43), réalisée sans antioxydant, uniquement à partir d'eau et de sel NaCl, représente la « référence négative ».

n°	Liste des abréviations ^a	Saumure de « base »		Quantités d'antioxydant (en mg)	Antioxydants ou extraits	Quantités d'extraits végétaux utilisées						Analyses ^b	
		Eau (g)	Sel NaCl (g)			Pomme (en mg)	Pépin de raisin (en mg)	Acérola (en mg)	Canneberge (en mg)	Oignon (en mg)	Thé (en mg)		
1) Principes actifs purs	1	a.a	81,9	18	100	acide ascorbique	-	-	-	-	-	-	1,2, 3
	2	a.m	81,9	18	100	acide malique	-	-	-	-	-	-	1,2, 3
	3	a.q	81,9	18	100	acide quinique	-	-	-	-	-	-	1,2, 3
	4	a.c	81,9	18	100	acide citrique	-	-	-	-	-	-	1,2, 3
	5	c	81,9	18	100	catéchine	-	-	-	-	-	-	1,2, 3
	6	d	81,9	18	100	dextrose	-	-	-	-	-	-	1,2, 3
	7	g	81,9	18	100	glutathion	-	-	-	-	-	-	1,2, 3
	8	q	81,9	18	100	quercetine	-	-	-	-	-	-	1,2, 3
2) Extraits végétaux purs	9	P	81,9	18	-	pomme	125	-	-	-	-	-	2
	10	P	80,0	18	-	pomme	2000	-	-	-	-	-	2
	11	R	81,9	18	-	pépin de raisin	-	103	-	-	-	-	2
	12	R	81,0	18	-	pépin de raisin	-	1000	-	-	-	-	2
	13	R	80,1	18	-	pépin de raisin	-	1861	-	-	-	-	2
	14	A	81,7	18	-	acérola	-	-	313	-	-	-	2
	15	A	80,5	18	-	acérola	-	-	1500	-	-	-	2, 4
	16	C	81,9	18	-	canneberge	-	-	-	125	-	-	2
	17	C	81,8	18	-	canneberge	-	-	-	250	-	-	2, 4
	18	C	81,3	18	-	canneberge	-	-	-	833	-	-	2
	19	O	81,8	18	-	oignon	-	-	-	-	250	-	2, 4
	20	O	81,5	18	-	oignon	-	-	-	-	500	-	2
	21	O	81,0	18	-	oignon	-	-	-	-	1000	-	2
	22	T	82,0	18	-	Thé vert	-	-	-	-	-	50	2, 4
23	T	81,9	18	-	Thé vert	-	-	-	-	-	200	2	
24	T	81,8	18	-	Thé vert	-	-	-	-	-	200	2	
25	T	81,8	18	-	Thé vert	-	-	-	-	-	427	2	
26	T	79,4	18	-	Thé vert	-	-	-	-	-	2632	2	
3) Extraits végétaux en mélanges	27	A	80,5	18	-	-	-	-	1500	-	-	-	2, 4
	28	C	81,8	18	-	-	-	-	-	250	-	-	2, 4
	29	O	81,8	18	-	-	-	-	-	-	250	-	2, 4
	30	T	82,0	18	-	-	-	-	-	-	-	50	2, 4
	31	AC	81,1	18	-	-	-	-	750	125	-	-	2, 4
	32	AO	81,1	18	-	-	-	-	750	-	125	-	2, 4
	33	AT	81,2	18	-	-	-	-	750	-	-	25	2, 4
	34	CO	81,8	18	-	-	-	-	-	125	125	-	2, 4
	35	CT	81,9	18	-	-	-	-	-	125	-	25	2, 4
	36	OT	81,9	18	-	-	-	-	-	-	125	25	2, 4
	37	ACO	81,3	18	-	-	-	-	500	83	83	-	2, 4
	38	ACT	81,4	18	-	-	-	-	500	83	-	17	2, 4
	39	AOT	81,4	18	-	-	-	-	500	-	83	17	2, 4
	40	COT	81,8	18	-	-	-	-	-	83	83	17	2, 4
	41	ACOT	81,5	18	-	-	-	-	375	63	63	17	2, 4
"Références"	42	N ⁺	81,9	17,9	108	nitrite	-	-	-	-	-	-	1, 2, 3, 4
	43	N ⁻	82	18	-	-	-	-	-	-	-	-	1, 2, 3, 4

Tableau 2. Composition des saumures employées dans toute cette partie de l'étude et liste des analyses réalisées sur les mini-jambons. Les formulations de référence N⁻ et N⁺ ont été mises en œuvre à chaque étape.

^a = acide ascorbique (a.a), acide malique (a.m), acide quinique (a.q), acide citrique (a.c), catéchine (c), dextrose (d), glutathion (g), quercetine (q), extrait de pomme (P), extrait de pépin de raisin (R), extrait d'acérola (A), extrait de canneberge (C), extrait d'oignon (O), extrait de thé vert (T). Pour les combinaisons, les abréviations correspondent aux lettres des extraits en mélange, par exemple le mélange « extrait d'acérola + extrait de canneberge » est noté AC.

^b = Analyses réalisées : 1 = dosages TBARS à J+1 et 2 = à J+14 ; 3 = semi-quantification des composés volatils par GC-MS ; 4 = analyses sensorielles.

Quantités d'additifs employées :

1) Principes actifs : l'acide ascorbique (a.a), l'acide citrique (a.c), l'acide malique (a.m), l'acide quinique (a.q), la catéchine (c), le dextrose (d), le glutathion (g), et la quercétine (q) ont été intégrés à la saumure (100 g) à hauteur de 100 mg (n°1 à n°8, Tableau 2). Le choix de ces molécules s'est basé sur leurs performances antioxydantes citées littérature ainsi que sur leurs disponibilités. Les huit antioxydants ont été testés à une concentration finale identique de 91 mg.kg⁻¹ dans les mini-jambons cuits afin de pouvoir comparer leur efficacité.

2) Extraits végétaux purs : les 6 extraits végétaux de pomme (P), de pépin de raisin (R), d'acérola (A), de canneberge (C), d'oignon (O) et de thé vert (T) ont été intégrés en quantités diverses dans la saumure de « base » (n°9 à n°26, Tableau 2). Ces extraits ont été choisis pour leurs compositions riches en principes actifs et selon leurs disponibilités chez le partenaire Diana Naturals. Les doses d'extraits à ajouter ont été déterminées à partir de leurs compositions en principes actifs détaillées dans le Tableau 1. Des doses intermédiaires ou des doses plus faibles ont été testées pour les extraits de canneberge, de thé et d'oignon, afin d'obtenir une action antioxydante efficace pour un ajout d'extrait minimal, ce qui nous a permis de limiter les risques de perturbation de l'arôme.

3) Extraits végétaux purs et en mélanges : les extraits d'acérola (A), de canneberge (C), d'oignon (O) et de thé vert (T) ont été sélectionnés aux doses suivantes pour être utilisés en mélanges : pour 100 g de saumure, 1500 mg pour A, 250 mg pour C, 250 mg pour O et 50 mg pour T ce qui correspond aux quantités minimales d'ajouts pour lesquelles les extraits agissent efficacement. Ces doses ont ainsi été divisées par 2 dans les mélanges contenant 2 extraits (AC, AO, AT, CO, CT et OT), divisées par 3 dans les mélanges contenant 3 extraits (ACO, ACT, AOT et COT) et divisées par 4 dans le mélange contenant 4 extraits (ACOT). La division des masses d'antioxydants selon la complexité du mélange avait pour objectif d'induire une activité antioxydante « de même niveau » entre les différents mélanges. Ce calcul repose, en toute rigueur, sur l'absence d'interactions favorables ou défavorables entre les antioxydants. Dans ce contexte, les 4 formulations contenant les extraits purs (n°27 à n°30, Tableau 2) ainsi que les 11 combinaisons possibles de 2, 3 et 4 extraits (n°31 à n°41, Tableau 2) ont été réalisées.

Cuisson : Pour chaque formulation testée, deux verrines contenant 250 g de viande saumurée ont été fermées sous vide puis chauffées selon le cycle de cuisson suivant : la température augmente de 40°C à 69°C à raison de 0,1°C.min⁻¹ puis est maintenue à 69°C pendant 120 min. Les deux mini-jambons de chaque formulation obtenus après cuisson, ont été conservés à 4°C dans l'obscurité entre 1 et 14 jours avant d'être analysés.

2.3. Semi-quantification des composés volatils de l'oxydation lipidique par espace de tête dynamique couplé à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse (DHS-GC-MS)

Les analyses par DHS-GC-MS des mini-jambons enrichis en principes actifs (a.a, a.m, a.q, a.c, c, d, g, q) et des jambons de « référence » N⁺ et N⁻ ont été réalisées avec les mêmes équipements que ceux utilisés dans l'étude Thomas, Mercier, Tournayre, Martin et Berdagué (2014). Le lendemain de leur fabrication, ces 10 mini-jambons (n°1 à n°8 ainsi que n°42 et n°43, Tableau 2) ont été broyés par extrusion et 7 g d'échantillon ont été placés dans une cartouche d'extraction en Pyrex® (ref. M3, Maillères, Aubière 63170, France) à température ambiante (21°C). Les composés volatils ont été extraits par espace de tête dynamique (Tekmar, Cincinnati, OH 45234) sous un flux d'hélium (Messer, He/U pureté: 99.995%) à 40 ml.min⁻¹ pendant 60 min. Le piège adsorbant Tenax® (TA 60/80 mesh, Supelco Bellefonte, PA ; longueur 180 mm et diamètre 1/4") était maintenu à 30°C durant cette étape. Après une étape de « séchage » de 30 min, les composés piégés ont été désorbés à 180°C, pendant 10 min, sous un flux d'hélium (Messer, He/N55 pureté: 99.9995%) puis cryoconcentrés à -150°C en tête de pré-colonne chromatographique et finalement injectés à 180°C durant 2 min dans la colonne. Les composés ont été séparés grâce à un chromatographe (GC 6890, Agilent Technologies ; colonne capillaire apolaire RTX5-MS, longueur 60 m, diamètre 0.32 mm, épaisseur du film 1 µm, Resteck) et détectés grâce à un spectromètre de masse à quadripôle (MSD 5973 Inert, Agilent Technologies) par impact électronique à 70 eV, pour des fragments m/z compris entre 33 et 230 u.m.a. et acquis à la vitesse de 20 scans.sec⁻¹. Pour chaque formulation, deux mini-jambons ont été analysés. Les composés d'intérêt ont été semi-quantifiés à partir de l'aire de leur pic majoritaire afin de s'affranchir des problèmes de coélutions. Parmi tous les composés volatils identifiés, lors des analyses par DHS-GC-MS, nous avons choisi de ne retenir que les structures aliphatiques à plus de 4 carbones, appartenant aux familles des alcools, des cétones, des aldéhydes, des alcanes ou des alcènes ainsi que deux alkyls furanes, car ces structures sont les plus caractéristiques de l'oxydation lipidique.

2.4. Dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS)

L'oxydation lipidique a été évaluée par dosage TBARS selon la méthode de Lynch and Frei (1993) et de Mercier, Gatellier, Viau, Remignon, and Renerre (1998) dans la totalité des mini-jambons réalisés dans cette partie.

Un gramme de jambon a été broyé grâce à un système Polytron durant 30 min dans 10 ml d'une solution de KCl (0,15 M) et de BHT (0,1 mM). Un volume de 250 µL d'une solution de TBA à 1% et un volume de 250 µL d'une solution de TCA à 2,8% ont été ajoutés à 500 µL de l'échantillon tout juste broyé. Ce mélange a ensuite été incubé dans un bain marie à 100 °C pendant 10 min. Après un refroidissement de 30 min à 22°C, le complexe TBA-substances réactives (TBARS) a été extrait avec 2 ml de *n*-butanol.

Après centrifugation à 4000 rpm pendant 15 min à une température de 4 °C, la phase organique a été prélevée. L'absorbance de cette phase a été mesurée à 535 nm et retranchée de l'absorbance du « blanc » de *n*-butanol mesurée à 760 nm. La concentration du complexe TBARS a été calculée à partir d'une courbe de calibration réalisée avec du tétraéthoxypropane (0-0,012 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$). Les résultats ont été exprimés en unités TBARS ce qui correspond à des mg de malonedialdéhyde par kg de viande analysée. Pour chaque formulation, deux mini-jambons ont été analysés en double. Les mini-jambons enrichis en principes actifs (n°1 à n°8, Tableau 2) ainsi que les deux références N⁺ et N⁻ ont été analysés à J+1 (le lendemain de leur fabrication) puis à J+14 (14 jours après leur fabrication). Les jambons enrichis en extraits végétaux purs ou en mélanges (n°9 à n°41, Tableau 2) n'ont été analysés qu'à J+14.

2.5. Analyses sensorielles

L'effet des extraits végétaux (utilisés individuellement ou en mélanges) sur l'arôme du jambon cuit a été évalué par un panel de 15 dégustateurs sélectionnés selon leur capacité à noter l'arôme « jambon cuit » de façon reproductible. Les analyses ont été réalisées le lendemain de la fabrication des mini-jambons cuits et sous lumière rouge afin de masquer au maximum la différence de couleur entre le jambon nitrité (rose) et les jambons non nitrités (grisâtres). Lors de ces dégustations, les juges dégustaient les jambons cuits les un après les autres, en notant pour chacun l'intensité de la note aromatique « jambon cuit » sur plusieurs échelles de notation structurées et graduées de 0 à 10. Les formulations ont été présentées dans un ordre différent pour chaque juge et il leur était également demandé de décrire la perception d'un éventuel défaut d'arôme inacceptable dans le cas d'un jambon cuit.

Les formulations qui ont été évaluées sont :

- les 4 formulations (n°15, 17, 19 et 22, Tableau 2) réalisées avec 1500 mg d'extrait d'acérola (A), 250 mg d'extrait de canneberge (C), 250 mg d'extrait d'oignon (O) ou 50 mg d'extrait de thé vert (T).
- les 15 formulations non nitritées enrichies en extraits végétaux, purs ou en mélanges (n°27 à n°41, Tableau 2)
- les 2 références N⁺ et N⁻ (n°42 et n°43, Tableau 2).

2.6. Analyses statistiques

1) L'effet des principes actifs et du nitrite sur les marqueurs volatils de l'oxydation suivis par GC-MS a été étudié par une analyse de la variance (ANOVA) à un facteur selon le modèle suivant :

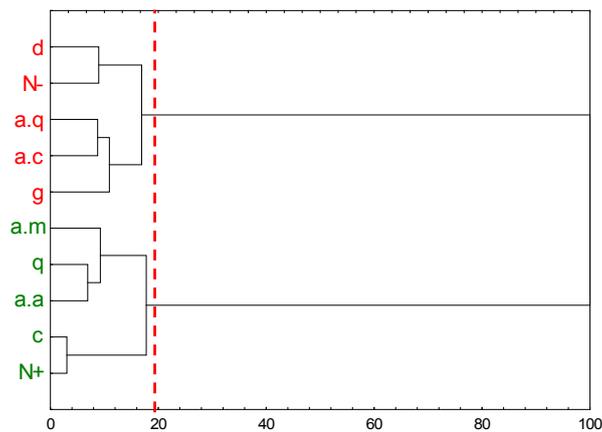


Figure 1. Typologie des principes actifs réalisée à partir des 12 composés volatils d'oxydation, identifiés par GC-MS, les plus significativement influencés par l'ajout d'antioxydants ($p < 0,001$, Tableau 3).

Deux groupes se distinguent : a.a = acide ascorbique, a.m = acide malique, c : catéchine, N⁺ : nitrite, q : quercétine forment la classe AO⁺ des antioxydants les plus performants, et a.c = acide citrique, a.q = acide quinique, d = dextrose, g = glutathion et N⁻ = sans antioxydant forment la classe AO⁻ des antioxydants les moins performants.

----- : Césure des groupes à un seuil de 20% de la variance totale.

$$A_{cox(a)i,j} = \mu + F_{i=10} + \varepsilon_{j=2}$$

avec A_{cox} = aire d'un composé volatil d'oxydation a, μ = effet moyen, F_i = effet « Formulation » (avec i = acide ascorbique, acide citrique, acide malique, acide quinique, catéchine, dextrose, glutathion, N^+ , N^- , quercétine) et ε_j = variance résiduelle ($j = 2$ répétitions).

Une ANOVA identique a été réalisée sur les valeurs TBARS et tous ces résultats sont présentés dans le Tableau 3.

Une typologie des performances antioxydantes des principes actifs à partir des aires des pics chromatographiques des composés volatils d'oxydation significativement influencés ($p < 0,001$) a été réalisée par classification hiérarchique ascendante (métrique Euclidienne, distance de Ward). Les corrélations linéaires (r de Pearson) ont été calculées entre cinq composés volatils et les valeurs de TBARS mesurées à J+1 ainsi qu'entre les valeurs TBARS mesurées à J+1 puis à J+14.

2) Pour étudier les effets des extraits végétaux purs et du nitrite sur l'oxydation à J+14 et sur l'intensité de la note « jambon cuit » à J+1, deux ANOVAs ont été réalisées selon les modèles :

$$1 : TBARS_{i,j,k} = \mu + F_{i=4-5-7} + Fab_{j=2} + \varepsilon_{k=2} \quad \text{et} \quad 2 : ArJC_{i,j,k} = \mu + F_{i=6} + J_{j=15} + \varepsilon_{k=1}$$

avec $TBARS$ = valeur TBARS à J+14, $ArJC$ = arôme de « Jambon cuit », μ = effet moyen, F_i = effet « Formulation » (avec 4, 5, 6 ou 7 niveaux selon le nombre de doses testées par extrait ou selon le nombre de jambons dégustés), Fab_j = effet « Fabrication » (2 niveaux), J_j = effet « Juge » (15 niveaux) et ε_k = variance résiduelle ($k = 1$ ou 2 répétitions). Ces ANOVAs ont été accompagnées de tests de comparaison de moyennes selon Newman-Keuls ($p < 0,05$).

3) Pour étudier les effets des extraits végétaux, purs et en mélanges, et du nitrite sur l'oxydation à J+14 et sur l'intensité de la note « jambon cuit » à J+1, deux ANOVAs ont été réalisées selon les modèles :

$$1 : TBARS_{i,j,k} = \mu + F_{i=17} + Fab_{j=2} + \varepsilon_{k=2} \quad \text{et} \quad 2 : ArJC_{i,j,k} = \mu + F_{i=17} + J_{j=15} + \varepsilon_{k=1}$$

avec $TBARS$ = valeur TBARS, $ArJC$ = arôme de « Jambon cuit », μ = effet moyen, F_i = effet « Formulation » (avec 17 niveaux), Fab_j = effet « Fabrication » (2 niveaux), J_j = effet « Juge » (15 niveaux) et ε_k = variance résiduelle ($n = 1$ ou 2 répétitions). L'ANOVA sur les TBARS a été accompagnée de tests de comparaison de moyennes selon Newman-Keuls ($p < 0,05$) et celle réalisée sur l'intensité de la note « jambon cuit » des tests de comparaison de moyennes selon Duncan ($p < 0,05$).

La typologie des performances des combinaisons d'extraits a été réalisée à partir des deux variables « valeurs TBARS à J+14 » et « intensité de l'arôme de jambon cuit » par classification hiérarchique ascendante (métrique Euclidienne, distance de Ward).

Les calculs et graphiques ont été réalisés avec le logiciel Statistica (version 12, Tulsa, OK, USA).

Composés	Ions ^a	Identification ^b	effet antioxydant ^c	Aires moyennes des pics (x.10 ⁵ unités arbitraires) ^d			
				AO ⁻	AO ⁺	AO ⁻ / AO ⁺ ^e	
Alcools				1286 ± 171,2	287 ± 25,7	4,5	
1	1-pentanol	70	MS, IK	***	349 ± 72	58 ± 37	6,0
2	1-penten-3-ol	57	MS, IK	***	377 ± 31	76 ± 47	5,0
3	1-hexanol	56	MS, IK	*	109 ± 17	45 ± 25	2,4
4	1-heptanol	70	MS, IK	n.s.	48 ± 4	23 ± 13	2,1
5	3-heptanol	87	MS, IK	***	16 ± 5	16 ± 3	1,0
6	1-octanol	84	MS, IK, std	*	22 ± 8	8 ± 4	2,8
7	1-octen-3-ol (+)	57	MS, IK, std	***	365 ± 40	61 ± 34	6,0
Cétones				266 ± 62,3	157 ± 40,4	1,7	
8	2-pentanone	86	MS, IK	***	146 ± 21	103 ± 18	1,4
9	2-heptanone (+)	114	MS, IK, std	***	23 ± 3	9 ± 2	2,6
10	3-heptanone	114	MS, IK	***	9 ± 1	8 ± 1	1,1
11	2-octanone	58	MS, IK	n.s.	32 ± 7	20 ± 7	1,6
12	1-octen-3-one (+)	55	MS, IK, std	***	56 ± 7	17 ± 5	3,3
Aldéhydes				704 ± 114,1	296 ± 42,5	2,4	
13	hexanal (+)	82	MS, IK, std	***	296 ± 129	102 ± 55	2,9
14	heptanal	81	MS, IK, std	*	77 ± 9	32 ± 10	2,4
15	octanal (+)	84	MS, IK, std	*	84 ± 19	49 ± 15	1,7
16	nonanal (+)	98	MS, IK, std	***	219 ± 47	97 ± 34	2,3
17	decanal	112	MS, IK, std	*	18 ± 8	8 ± 4	2,3
18	undecanal	82	MS, IK, std	n.s.	5 ± 1	4 ± 1	1,3
19	dodecanal	82	MS, IK, std	n.s.	5 ± 0,5	4 ± 2	1,3
Alcanes - alcènes				2788 ± 526,4	1229 ± 289,5	2,3	
20	pentane	72	MS, IK, std	n.s.	48 ± 19	8 ± 4	6,0
21	hexane	86	MS, IK, std	*	534 ± 158	255 ± 104	2,1
22	heptane	100	MS, IK, std	***	848 ± 107	198 ± 144	4,3
23	octane	114	MS, IK, std	*	1285 ± 330	729 ± 404	1,8
24	2-octene	112	MS, IK	**	73 ± 32	39 ± 25	1,9
Furanes				83 ± 24,7	25 ± 3,5	3,3	
25	2-butylfuran	81	MS, IK	***	24 ± 4	10 ± 2	2,4
26	2-pentylfuran	138	MS, IK	**	59 ± 12	15 ± 10	3,9
TBARS^f							
-	J+1	-	-	-	0,402 ± 0,03	0,239 ± 0,017	1,7
-	J+14	-	-	-	1,949 ± 0,23	1,321 ± 0,09	1,5

Tableau 3. Liste des composés volatils d'oxydation identifiés dans les mini-jambons cuits à J+1 et effet des principes actifs sur leurs productions.

^a : Ions majoritaires utilisés pour la semi-quantification des composés

^b : Fiabilité de l'identification : MS = Spectre de masse, IK = Indice de Kovats, std = comparaison avec le temps de rétention du composé standard de référence

^c : n.s. = non significatif, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$

^d : La classification des principes actifs en deux groupes selon leurs performances (Figure 1) a permis de calculer les aires (moyennes et écart-types) des composés volatils au sein de la classe des antioxydants les plus performants AO⁺ (acide ascorbique, acide malique, catéchine, N⁺ et quercétine) et au sein de la classe des antioxydants les moins performants AO⁻ (acide citrique, acide quinique, dextrose, glucose et N⁻)

^e : Rapport entre les aires moyennes du groupe AO⁻ et du groupe AO⁺

^f : Valeurs TBARS mesurées le jour suivant la fabrication (J+1) et 14 jours plus tard (J+14)

(+) Composés odeur actifs déjà identifiés dans le jambon cuit par chromatographie-olfactométrie (Thomas, Mercier, Tournayre, Martin, & Berdagué, 2013).

3. Résultats et discussion

3.1. Effet des principes actifs purs sur l'oxydation des jambons.

Les analyses par DHS-GC-MS des jambons cuits ont permis d'identifier et de semi-quantifier 26 marqueurs volatils de l'oxydation lipidique (Tableau 3), répartis selon les 5 familles chimiques suivantes : alcools (7), cétones (5), aldéhydes (7), alcanes et alcène (5) et furanes (2). Les ANOVAs montrent que 21 des 26 marqueurs volatils de l'oxydation sont significativement influencés par l'ajout de principes actifs.

La typologie des performances des composés antioxydants (Figure 1) a montré l'existence de deux classes. Les antioxydants de la classe AO^+ : l'acide malique, la quercétine, l'acide ascorbique et la catéchine ont des performances élevées se rapprochant de celles du nitrite et les antioxydants de la classe AO^- : l'acide quinique, le glutathion, le dextrose, l'acide citrique sont des molécules peu performantes qui conduisent à une oxydation dans les jambons voisine de celle obtenue pour la formulation sans nitrite. Les aires moyennes des 26 marqueurs volatils au sein de la classe AO^+ et de la classe AO^- , ainsi que les rapports des aires AO^-/AO^+ sont présentés dans le Tableau 3. Ces résultats montrent que l'usage des meilleurs antioxydants a réduit la formation des composés volatils d'un facteur allant de 1,7 à 4,5 selon les familles chimiques considérées.

Tous les composés identifiés sont présents à la fois dans les jambons du groupe AO^+ et dans ceux du groupe AO^- . Cependant, la désorption de la plupart des composés (21/26) est bien moins importante dans le cas des jambons du groupe AO^+ , protégés de l'oxydation. L'action des principes actifs les plus performants induit bien une diminution globale de la majorité des marqueurs volatils de l'oxydation lipidique comme l'ont constaté Cross et Ziegler (1965) ainsi que Ramarathnam, Rubin, et Diosady (1991, 1993) en comparant les compositions d'une viande de porc cuite nitritée ou non nitritée.

Parmi les composés identifiés, significativement influencés par l'antioxydant utilisé, le 1-pentanol, le 1-hexanol, le 1-heptanol, le 1-octen-3-ol, la 1-octen-3-one, la 2-pentanone, la 2-heptanone, le pentanal, l'hexanal, l'heptanal, l'octanal, le nonanal, le decanal, le dodecanal et le 2-pentylfuran sont des marqueurs bien connus de l'oxydation lipidique (Barriuso, Astiasaran, & Ansorena, 2013; Estevez, Ventanas, Ramirez, & Cava, 2004; Ramarathnam, Rubin, & Diosady, 1993). Parmi ces 15 composés, 6 sont des composés odeur-actifs qui ont déjà été identifiés lors d'épreuves de chromatographie-olfactométrie réalisées sur des mini-jambons cuits modèles similaires (Thomas, Mercier, Tournayre, Martin, & Berdagué, 2013). Il s'agit du 1-octen-3-ol ($AO^-/AO^+ = 6,0$) et de la 1-octen-3-one ($AO^-/AO^+ = 3,3$) qui possèdent une odeur intense de « champignon », de l'hexanal ($AO^-/AO^+ = 2,9$), l'octanal ($AO^-/AO^+ = 1,7$) et du nonanal ($AO^-/AO^+ = 2,3$) qui ont respectivement des notes puissantes de « pomme verte-herbe écrasée », « agrume » et « rance-oxydé » et de la 2-heptanone ($AO^-/AO^+ = 2,6$) qui a une note « fromage bleu ».

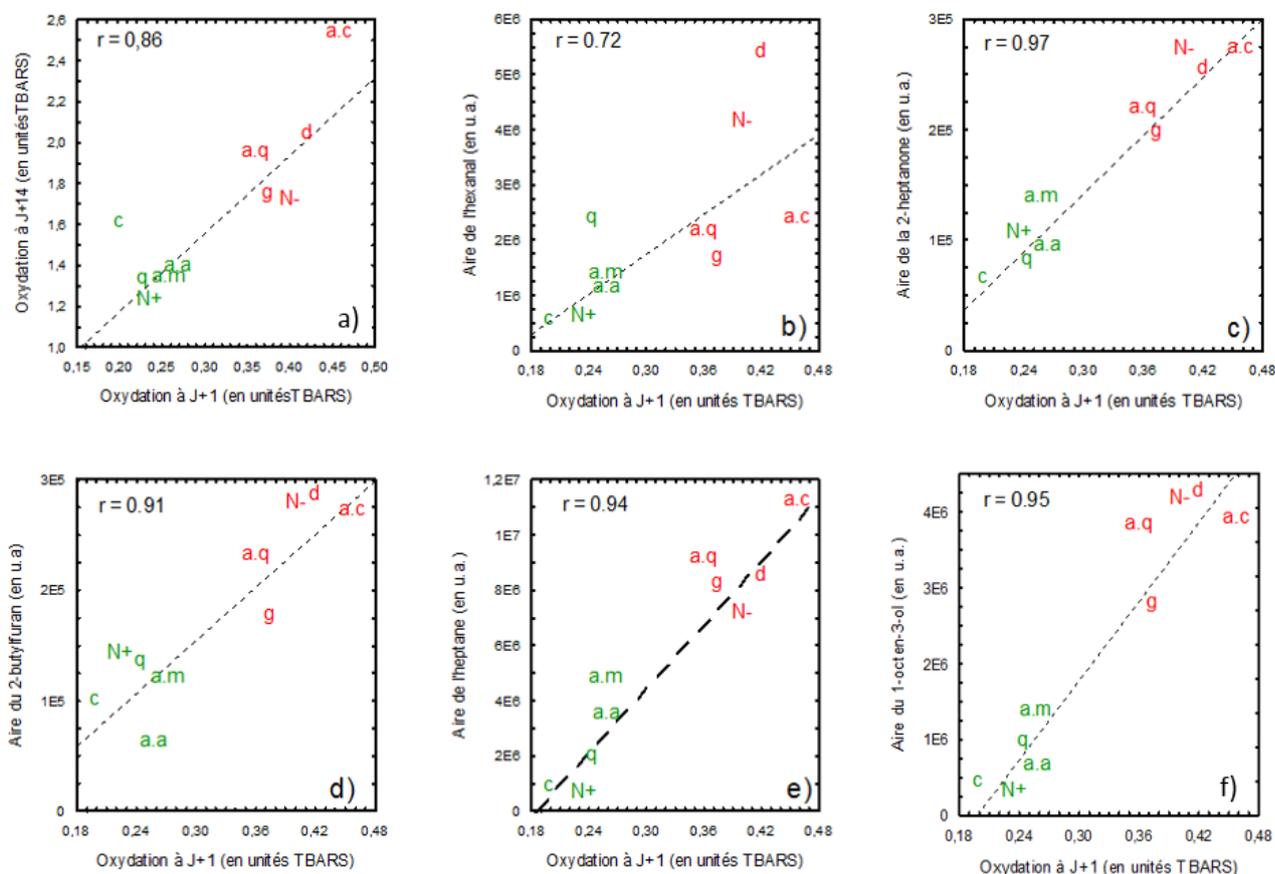


Figure 2. (a) Corrélation entre les mesures de TBARS réalisées le lendemain de la fabrication (J+1) et après 14 jours de conservation dans l'obscurité à 4°C (J+14). (b-f) Relations entre les valeurs TBARS mesurées à J+1 et l'aire moyenne des pics chromatographiques de cinq composés d'oxydation, représentatifs des 5 familles chimiques, significativement influencés par l'ajout des antioxydants (Tableau 3). Les antioxydants performants appartenant au groupe AO^+ , a.a : acide ascorbique, a.m : acide malique, c : catéchine, N^+ : nitrite, q : quercétine) sont représentés en vert. Les composés les moins performants, a.c = acide citrique, a.q = acide quinique, d = dextrose, g = glutathion et N^- = sans antioxydant, appartenant au groupe AO^- , sont représentés en rouge. Les valeurs des coefficients de corrélation ($p < 0,05$) entre les valeurs TBARS et les aires des pics chromatographiques sont également présentées.

Ces composés aux seuils de détection très bas, ont vu leurs désorptions multipliées par un facteur allant de 2 à 6 en l'absence d'antioxydant performant. Ce sont des composés clés de l'oxydation lipidique susceptibles d'induire une perturbation de l'arôme, comme l'ont déjà proposé Im, Hayakawa, & Kurata (2004) ainsi que Konopka, Guth, & Grosch (1995).

L'ANOVA réalisée sur les valeurs TBARS à J+1 et à J+14 (Tableau 3) confirme l'efficacité du groupe d'antioxydants AO⁺ et indique que leur efficacité perdure jusqu'à deux semaines après la fabrication des jambons cuits. La pérennité de cette protection antioxydante, validée par la corrélation des mesures à J+1 et à J+14 (Figure 2a), est nécessaire pour envisager une application industrielle ultérieure.

Ainsi, ce sont les principes actifs appartenant au groupe AO⁺ : l'acide ascorbique, l'acide malique, la catéchine et la quercétine, qui ont été retenus et désignés comme critères de sélection des extraits végétaux et de leurs doses d'utilisation dans la suite de cette partie.

Les Figures 2b) à 2f) visualisent les corrélations assez étroites entre les aires des pics chromatographiques et les valeurs TBARS. Le lien entre ces deux techniques d'analyses a souvent été évoqué dans le cas de l'hexanal (Ganhao, Estevez, & Morcuende, 2011; Macdonald, Gray, Stanley, & Osborne, 1980c; Shahidi, Yun, Rubin, & Wood, 1987) mais nos résultats expérimentaux montrent que cette relation est aussi observée pour d'autres composés d'oxydation comme la 2-heptanone, le 2-butylfuran, l'heptane ou le 1-octen-3-ol (Figures 2c, d, e et f).

Les analyses par DHS-GC-MS sont performantes pour évaluer l'oxydation mais sont relativement onéreuses et l'exploitation des résultats reste assez lourde. C'est pourquoi seuls les dosages TBARS ont été retenus pour évaluer l'oxydation des jambons dans la suite de l'étude. Ce choix est d'autant plus judicieux que les valeurs TBARS mesurées à J+1 sont bien corrélées aux valeurs TBARS mesurées à J+14 (Figure 2a).

3.2. Effet des extraits végétaux antioxydants sur l'oxydation et sur l'arôme du jambon cuit.

Les 6 extraits végétaux antioxydants testés sont des extraits de thé vert (T), d'acérola (A), d'oignon (O), de canneberge (C), de pomme (P), et de pépin de raisin (R) et contiennent naturellement un ou plusieurs des 4 principes actifs précédemment sélectionnés à savoir : l'acide ascorbique, l'acide malique, la quercétine et la catéchine (Tableau 1). Ces 6 extraits végétaux ont été ajoutés à la saumure à différentes doses (Tableau 2). Certains de ces extraits ont déjà prouvé leur efficacité contre l'oxydation dans de la viande de porc crue (Kim, Jin, Park, Kim, Joo, & Yang, 2010; Sun, Zhang, Zhou, Xu, & Peng, 2010; Tang, Kerry, Sheehan, Buckley, & Morrissey, 2001). L'activité antioxydante des extraits végétaux dépend (i) de la matrice ou de l'environnement dans lesquels ils sont intégrés (Sun, Zhang, Zhou, Xu, & Peng, 2010) et (ii) de la dose à laquelle ils sont utilisés.

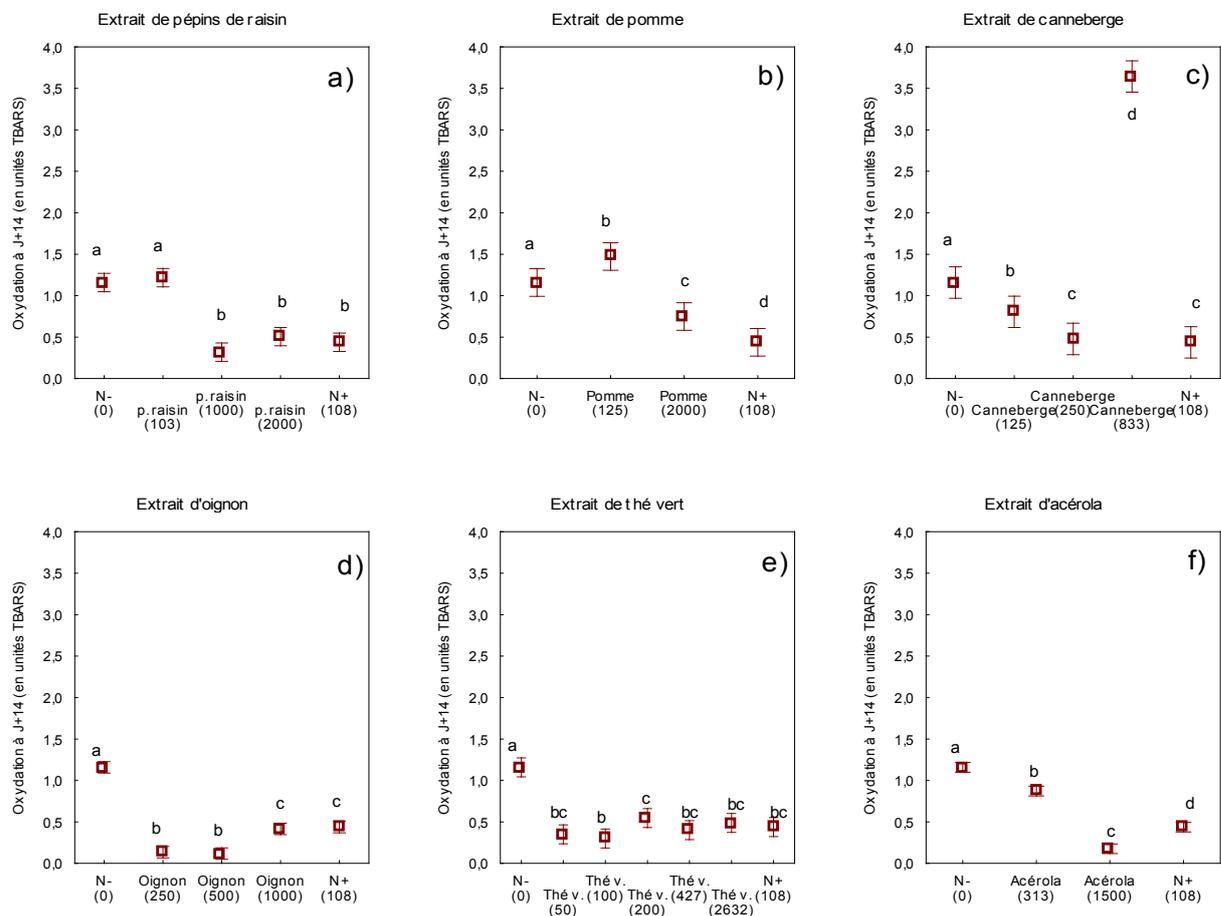


Figure 3. Effet des 6 extraits végétaux antioxydants sur l'oxydation des mini-jambons cuits modèles. Les valeurs TBARS ont été mesurées à J+14 dans les mini-jambons contenant les 6 extraits végétaux antioxydants à des doses variées. Les formulations sans nitrite (N⁻) et avec nitrite (N⁺) sont présentées à titre de référence : N⁺ correspondant aux performances antioxydantes à atteindre et N⁻ correspondant à un jambon oxydé. Les ajouts d'extraits végétaux sont exprimés en mg pour 100g de saumure (valeurs indiquées entre parenthèses). Pour chaque formulation, la moyenne et l'intervalle de confiance du modèle d'ANOVA sont présentés sous forme de moustaches. Les lettres a, b, c et d représentent les groupes homogènes lors des comparaisons de moyennes réalisées selon le test de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

En effet, augmenter la dose d'extrait ajoutée peut tout aussi bien améliorer la protection antioxydante (Yen, Chen, & Peng, 1997) qu'au contraire, favoriser l'oxydation lipidique (Przybylski, Lee, & Eskin, 1998), et ces propriétés sont matrice-dépendantes. C'est pour ces raisons que l'évaluation des performances de ces extraits a été réalisée directement dans la matrice jambon cuit et que les extraits ont été ajoutés selon une large gamme de concentrations.

Les performances antioxydantes des extraits purs ont aussi été évaluées *in vitro* grâce à deux méthodes. Ces deux méthodes, FRAP et DPPH, permettent d'évaluer respectivement la capacité des extraits à réduire le fer et leur capacité à piéger des radicaux libres. Ces analyses renseignent sur les performances intrinsèques des extraits mais ne permettent pas de prédire leur efficacité une fois qu'ils sont intégrés dans une matrice donnée. C'est pourquoi les résultats de ces analyses, non corrélés aux résultats obtenus par les dosages TBARS, sont uniquement présentés dans l'Annexe VII.

A cause des notes aromatiques spécifiques, liées à la nature de l'extrait, et des sensations astringentes induites par des concentrations en polyphénols trop importantes, certains extraits peuvent être à l'origine de perturbations de l'arôme global du produit. Il est donc important de valider que les extraits, utilisés aux doses choisies, n'altèrent pas l'arôme du jambon cuit.

3.2.1. Sélection d'extraits végétaux : Effet des extraits végétaux sur l'oxydation

Les dosages TBARS ont été réalisés 14 jours après la fabrication des minis-jambons et les résultats sont présentés sur les Figures 3a) à 3f).

Dans le cas de l'extrait de pépin de raisin, qui a été testé à 103, 1000 et 2000 mg pour 100 g de saumure (Figure 3a), seules les concentrations les plus importantes de 1000 et 2000 mg.kg⁻¹ de viande ont permis d'atteindre les performances antioxydantes du nitrite. Cet extrait, riche en proanthocyanidines et en catéchines a, non seulement apporté une coloration noire intense (Annexe I) mais aussi une sensation astringente détectable à partir de 103 mg par 100 g de saumure. A cause de ces défauts organoleptiques, cet extrait n'a pas été retenu.

L'extrait de pomme qui a été testé à 125 et 2000 mg pour 100 g de saumure (Figure 3b) n'a pas non plus été retenu car il est trop peu antioxydant lorsqu'il est utilisé à des « doses raisonnables ». En effet, il est nécessaire d'ajouter au moins 2000 mg d'extrait pour 100 g de saumure si l'on souhaite limiter significativement l'oxydation par rapport à un jambon non nitrifié N⁻.

Les quatre extraits suivants ont été retenus pour la suite de l'étude :

L'extrait de canneberge a été testé à 125, 250 et 833 mg pour 100 g de saumure (Figure 3c). Utilisé à 125 mg, il permet de diminuer significativement l'oxydation mais c'est à partir de 250 mg qu'il égale les performances du nitrite.

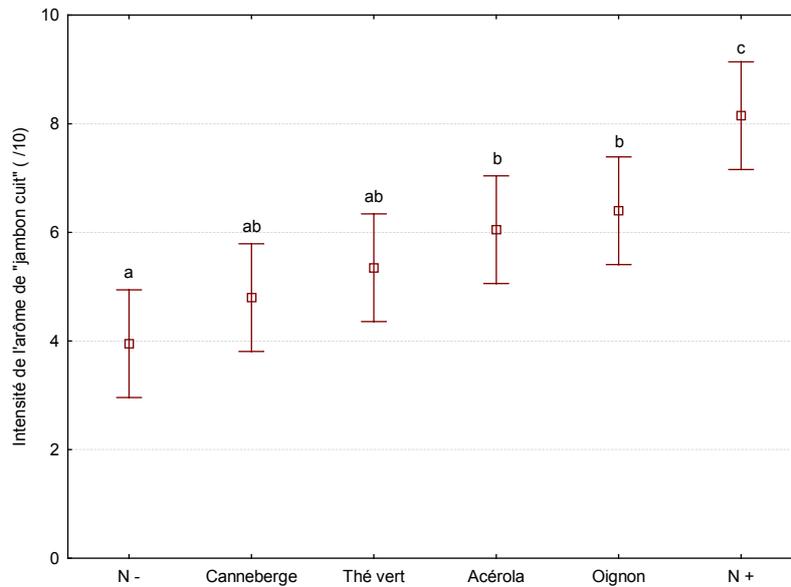


Figure 4. Effet des ajouts des extraits d'acérola, de canneberge, d'oignon ou de thé sur l'intensité de l'arôme de « jambon cuit ». Les extraits sont ajoutés aux doses suivantes pour 100 g de saumure : 250 mg pour la canneberge, 50 mg pour le thé, 1500 mg pour l'acérola et 250 mg pour l'oignon. Les intensités des formulations nitritées (N⁺) ou non nitritées (N⁻) sont présentées à titre de référence afin d'estimer (i) l'intensité aromatique gagnée par rapport à N⁻ et (ii) celle de la cible N⁺ à atteindre. Pour chaque formulation, la moyenne et l'intervalle de confiance du modèle d'ANOVA sont présentés sous forme de moustaches. Les moyennes obtenues sont rangées par ordre croissant. Les lettres ^{a, b et c} représentent les groupes homogènes lors des comparaisons de moyennes selon Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Introduit à trop fortes doses (833 mg), cet extrait induit un effet pro-oxydant puisque les valeurs TBARS sont alors presque trois fois supérieures à celles d'un jambon non nitré N⁻. L'hypothèse d'une interférence de la couleur rose/rouge de l'extrait de canneberge sur les mesures TBARS, qui expliquerait cette forte augmentation, a été réfutée grâce à un dosage des TBARS dans un échantillon « blanc » ne contenant pas d'acide thiobarbiturique. Cette analyse a révélé que l'absorbance mesurée à cette longueur d'onde était uniquement due au complexe MDA-TBARS.

L'extrait d'oignon, testé à 250, 500 et 1000 mg pour 100 g de saumure (Figure 3d) possède des notes aromatiques soufrées typiques et susceptibles de perturber l'arôme du jambon cuit. Aussi, la dose utilisée doit être assez faible. Une concentration de 250 mg pour 100 g de saumure est suffisante pour atteindre le pouvoir antioxydant du nitrite, c'est pourquoi, à cette dose, cet extrait peut être retenu.

L'extrait de thé vert testé à 50, 100, 200, 427 et 2632 mg pour 100 g de saumure (Figure 3e) a des performances qui ne semblent pas vraiment dépendre de la dose utilisée. En effet, l'état d'oxydation est le même dans un mini-jambon réalisé avec 50 ou 2632 mg d'extrait pour 100 g de saumure. Cet extrait, riche en catéchines, est susceptible d'apporter une sensation astringente. C'est pourquoi, afin de limiter les risques de perturbations de l'arôme, la dose minimale de 50 mg d'extrait de thé vert pour 100 g de saumure a été retenue.

L'extrait d'acérola testé à 313 et 1500 mg pour 100 g de saumure (Figure 3f) a permis de limiter significativement l'oxydation dans les deux cas. Cependant, l'ajout de 313 mg ne permet pas d'égaliser les performances du nitrite. L'acérola n'apportant aucun défaut organoleptique, une dose relativement importante de 1500 mg pour 100 g de saumure, communément utilisée dans les produits carnés industriels, a été retenue.

En tenant compte à la fois des performances antioxydantes des extraits et des défauts organoleptiques qu'ils sont susceptibles d'induire, seuls quatre des six extraits végétaux proposés ont été retenus. Les doses d'utilisation « optimales » ont pu être déterminées, c'est-à-dire les doses permettant d'obtenir le meilleur compromis entre une quantité minimale d'ajout, une action antioxydante maximale et un apport minimal de défauts organoleptiques. Finalement ce sont les extraits d'acérola (à 1500 mg pour 100 g de saumure), de canneberge et d'oignon (à 250 mg pour 100 g de saumure), et de thé vert (à 50 mg pour 100 g de saumure) qui ont été utilisés pour l'étude de leurs effets sur l'arôme des jambons.

3.2.2. Effet des extraits végétaux sur l'arôme du jambon cuit

La dégustation des jambons enrichis en acérola (A), canneberge (C), oignon (O) et thé vert (T) et des deux jambons de référence N⁺ et N⁻ a permis d'évaluer l'impact de ces ingrédients sur l'intensité de la note aromatique « jambon cuit » (ArJC) dans les jambons modèles (Figure 4).

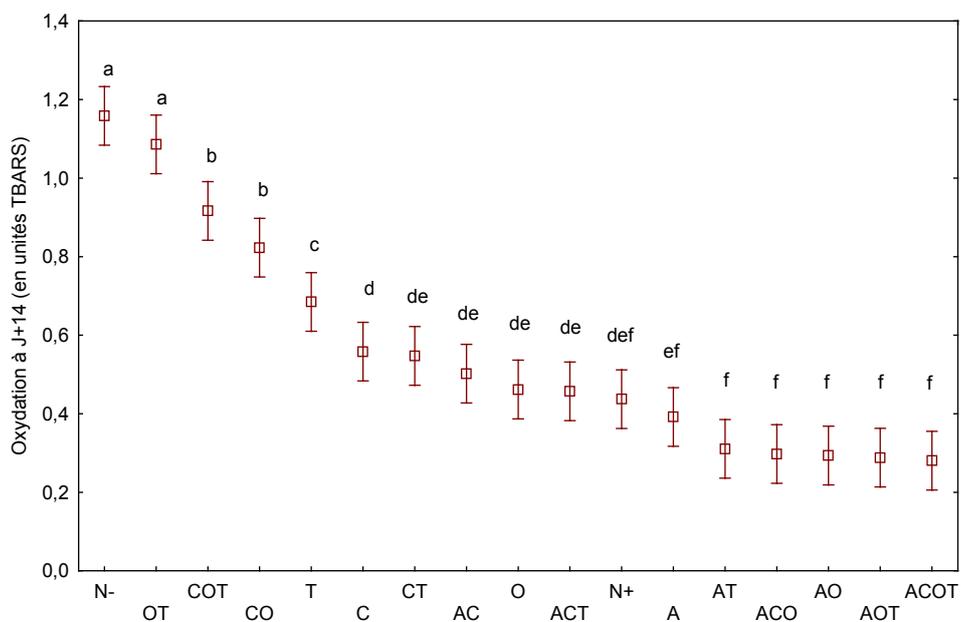


Figure 5. Effet des extraits végétaux purs ou en mélanges sur l'oxydation des jambons à J+14. Les mélanges d'extraits sont notés de la façon suivante : le mélange « Acérola + Canneberge » est noté AC. Les doses auxquelles les différents extraits ont été utilisés sont consignées dans la 3^{ème} partie du Tableau 1. Pour chaque formulation, la moyenne et l'intervalle de confiance du modèle d'ANOVA sont présentés sous forme de moustaches. Les moyennes obtenues sont rangées par ordre décroissant. Les lettres a, b, c, d, e et f représentent les groupes homogènes lors des comparaisons de moyennes réalisées selon le test de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Les résultats montrent que l'amplitude maximale de variation est observée entre les formulations N⁺ (ArJC = 8,2/10) et N⁻ (ArJC = 4/10). Ainsi, le simple apport de 108 mg de nitrite permet d'augmenter l'intensité de l'ArJC de 4,2 points sur 10 ; soit plus qu'un doublement de sa valeur. Les formulations contenant l'extrait de canneberge (ArJC = 4,8/10) ou l'extrait de thé vert (ArJC = 5,4/10) se distinguent peu du jambon non nitrifié malgré une note ArJC plus intense d'environ 1 point sur 10. En revanche les notes ArJC dans les formulations contenant les extraits d'acérola (ArJC = 6,1/10) et d'oignon (ArJC = 6,4/10) sont significativement supérieures à celle d'un jambon non nitrifié N⁻ avec des gains respectifs de 2,1 et 2,4 points sur 10. Les gains d'arôme obtenus grâce à l'addition des extraits antioxydants dans des mini-jambons non nitrifiés sont ainsi compris entre 0,8 et 2,4/10 mais ne permettent pas d'atteindre l'arôme des mini-jambons nitrifiés. Il est important de noter qu'aux doses employées les extraits végétaux n'ont pas induit de perceptions organoleptiques inacceptables dans le jambon cuit : telle une note alliagée due à l'utilisation de l'extrait d'oignon ou une sensation d'astringence liée à l'emploi d'extraits riches en polyphénols comme les extraits de thé vert ou de canneberge.

Ces 4 extraits (A, C, O et T) et leurs doses d'utilisation ont été sélectionnés et déterminés sur la base de leurs performances antioxydantes et pour qu'ils n'induisent aucun défaut notoire sur l'arôme global ; ils seront employés dans les mêmes conditions dans la partie suivante.

3.3. Effets des combinaisons d'extraits végétaux sur l'oxydation et sur l'arôme des jambons.

Les 4 extraits d'acérola (A), de canneberge (C), d'oignon (O) et de thé vert (T) ont été ajoutés à la saumure sous la forme de 6 mélanges binaires (AC, AO, AT, CO, CT et OT), 4 mélanges ternaires (ACO, ACT, AOT, COT) et du mélange des 4 extraits (ACOT). Les effets de ces 11 mélanges sur l'oxydation et sur l'arôme des jambons cuits modèles ont été évalués de la même manière que précédemment respectivement par dosage TBARS à J+14 et par analyse sensorielle. Les extraits végétaux, une fois en mélanges, peuvent avoir des actions synergiques ou au contraire antagonistes.

Afin de pouvoir observer de telles interactions, des formulations contenant les extraits purs A, C, O et T ont à nouveau été évaluées dans les mêmes conditions de fabrication que les mini-jambons contenant ces extraits en mélanges.

3.3.1. Effet des mélanges d'extraits végétaux sur l'oxydation

Les résultats du dosage des TBARS (Figure 5) indiquent que les 11 combinaisons d'extraits réalisées permettent de réduire l'oxydation par rapport à une formulation non nitrifiée N⁻. Les combinaisons CT, AC, O, ACT et A ont permis d'atteindre des performances antioxydantes similaires à celles du nitrite.

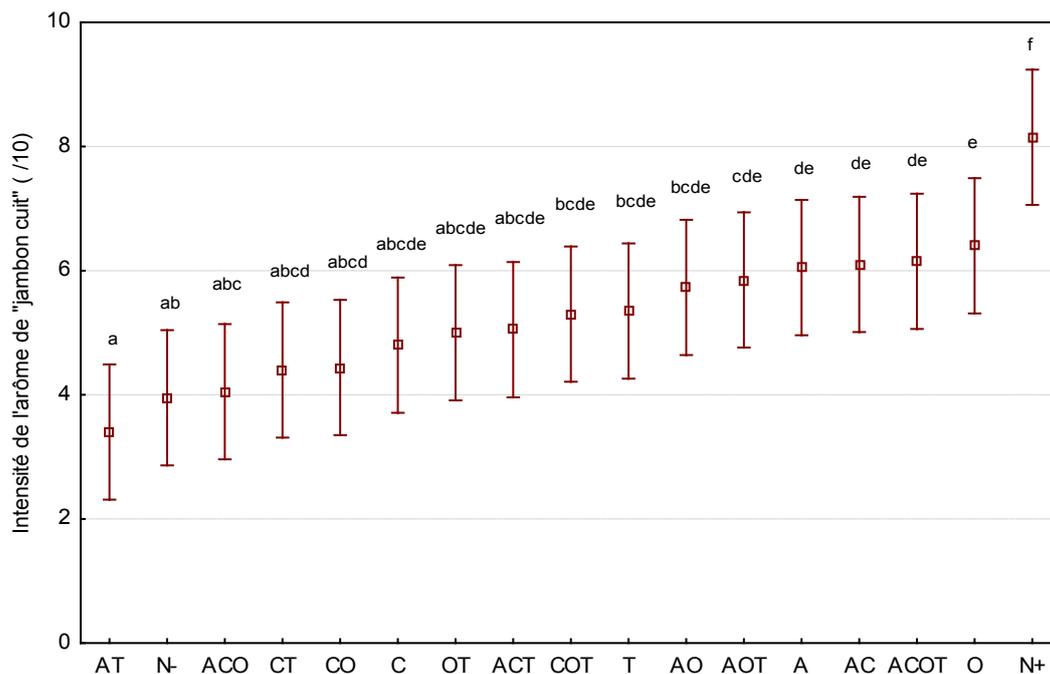


Figure 6. Effet des extraits antioxydants, utilisés purs ou en mélanges, sur l'intensité de l'arôme de « jambon cuit ». Pour chaque formulation, la moyenne et l'intervalle de confiance du modèle d'ANOVA sont présentés sous forme de moustaches. Les moyennes obtenues sont rangées par ordre croissant. Les lettres a, b, c, d, e et f représentent les groupes homogènes lors des comparaisons de moyennes selon le test de Duncan ($p < 0,05$).

Les cinq formulations, correspondant à : deux mélanges binaires AT et AO, deux mélanges ternaires AOT et ACO et le mélange des 4 extraits ACOT, ont même permis d'obtenir des jambons moins oxydés que les jambons nitrés N⁺ de référence.

Il est intéressant de constater que les performances antioxydantes des combinaisons OT, COT et CO sont inférieures à celles des extraits correspondants utilisés individuellement (O, C et T). Cela trahit l'existence d'interactions défavorables entre ces antioxydants qui induisent un effet prooxydant notoire. A l'inverse, ces résultats indiquent l'existence d'interactions favorables entre l'extrait d'acérola (A) et les extraits de thé vert (T), d'oignon (O) et de canneberge (C) qui contribuent à limiter au maximum l'oxydation.

Compte-tenu des valeurs de TBARS obtenues, il est également possible de conclure que parmi les 15 formulations testées, 10 pourraient *a priori* convenir à la substitution du nitrite sur un plan oxydatif.

3.3.2. Effet des mélanges d'extraits végétaux sur l'arôme du jambon cuit

La dégustation des 15 fabrications enrichies en extraits végétaux (Tableau 2) et des fabrications de référence N⁺ et N⁻, a permis d'évaluer l'effet des formulations sur l'intensité de l'arôme « jambon cuit » (ArJC) des mini-jambons modèles (Figure 6).

Le rôle du nitrite dans le développement de l'arôme « jambon cuit » (8,1/10) a encore été largement confirmé puisqu'il permet une augmentation de 4,2 points sur 10 par rapport à celui de la formulation non nitrée N⁻ (3,9/10).

En ce qui concerne, l'effet des extraits végétaux, le plus mauvais résultat est obtenu pour le mélange Acérola-Thé, avec une note de 3,4/10, moins intense que celle d'un jambon non nitré N⁻. Le meilleur résultat est obtenu pour l'extrait d'oignon avec une note de 6,4/10. L'amplitude de variation observée entre les différents jambons enrichis en extraits est de 3,0 points sur 10.

Par rapport à un jambon non nitré N⁻ (ArJC = 3,9/10), le gain maximum d'ArJC est de 2,5 points sur 10 et il est obtenu avec l'extrait d'oignon (note de 6,4/10), soit près de 60% du gain nécessaire pour atteindre l'arôme d'un jambon nitré N⁺. Ainsi le meilleur des antioxydants ne permet d'obtenir qu'une note ArJC de 6,4/10 pour une note de 8,1/10 à atteindre ; soit un écart résiduel de 1,7/10 par rapport à la référence nitrée. L'observation attentive de la contribution à l'arôme des extraits individuels (Figure 6) montre qu'il n'est pas évident de faire émerger une règle explicative de la contribution individuelle de chaque extrait à l'arôme final des mini-jambons lorsqu'ils sont en mélanges.

Finalement, les extraits ou mélanges d'extraits les plus performants pour restaurer l'arôme « jambon cuit » sont A, AC, ACOT et O et ils ont tous conduit à des notes ArJC supérieures à 6/10.

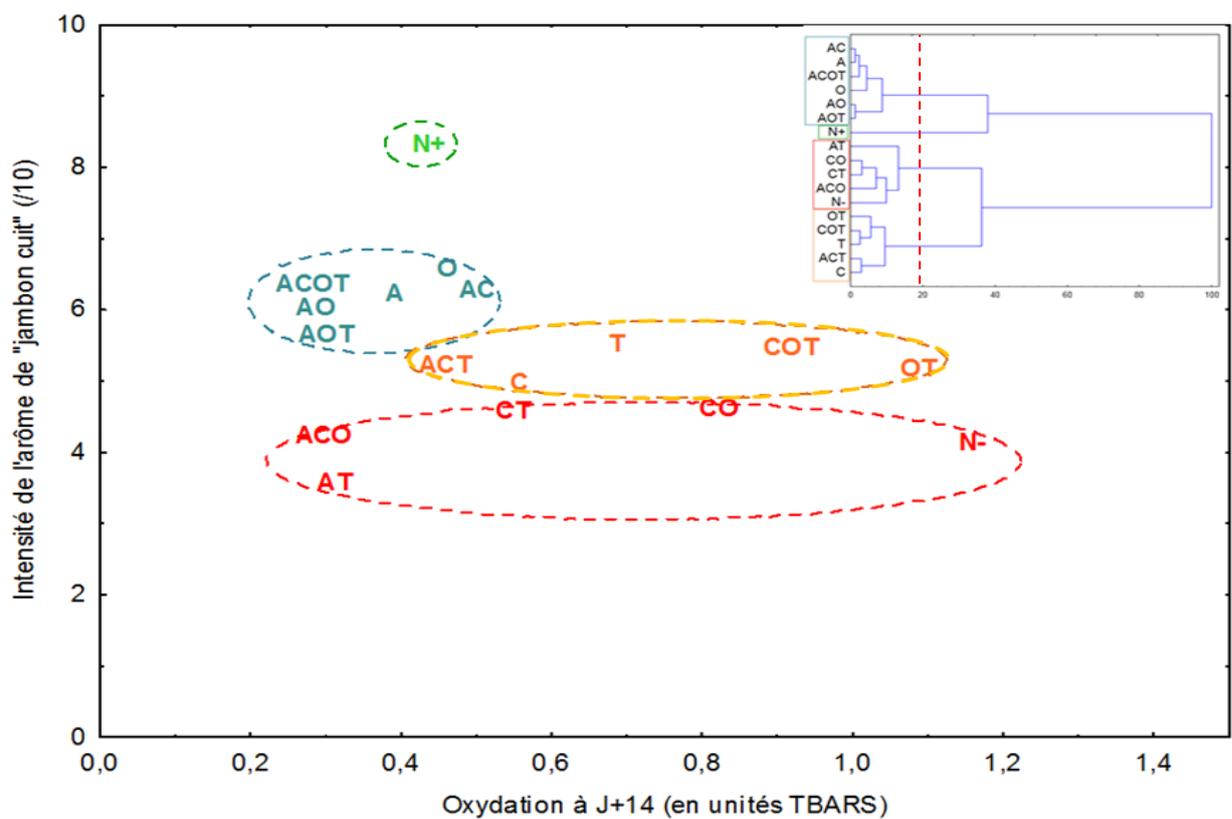


Figure 7. Relation entre l'oxydation des jambons mesurée 14 jours après leur fabrication et l'intensité de leur note aromatique « jambon cuit ». La classification hiérarchique ascendante (CAH) présentée en haut à droite a été obtenue à partir des deux variables « intensité de l'arôme de jambon cuit » et « oxydation à J+14 ». La CAH a permis de segmenter les différentes formulations selon leurs performances aromatiques et antioxydantes et ces différents groupes ont été repérés selon 4 nuages de points vert, bleu, orange et rouge.

----- : Césure des groupes à un seuil de 20% de la variance totale.

3.3.3. Relation entre les performances antioxydantes et la qualité aromatique des extraits.

Le nuage de points visualisant la relation entre l'oxydation (valeurs TBARS) et l'intensité de la note aromatique « jambon cuit » (ArJC) (Figure 7) montre qu'il n'existe pas de corrélation entre ces deux variables. En effet, certaines classes d'extraits peuvent induire des notes ArJC faibles situées autour de 4/10 (classes rouge et orange, Figure 7) et être pourtant associé à des valeurs TBARS très différentes comprises entre 0,3 (ACO, AT) et 1,2 (OT, CO et N⁻). D'un autre côté, des combinaisons d'extraits comme ACOT, AO, AOT, A, O, AC induisent des notes ArJC assez élevées autour de 6/10 et des niveaux d'oxydation faibles voire même inférieurs à ceux obtenus avec le nitrite.

Selon la littérature, il existe une relation entre des valeurs TBARS faibles et l'acceptabilité aromatique du produit (Nissen, Byrne, Bertelsen, & Skibsted, 2004; Shahidi, Yun, Rubin, & Wood, 1987) mais, dans notre cas, nous constatons l'absence de lien direct entre l'« oxydation » et l'« arôme ». Cela peut s'expliquer par le fait que chacun des extraits individuels (O, A, T, C) est susceptible d'apporter ou d'induire des modifications de l'arôme ou de la saveur des jambons. Ces modifications peuvent être directement attribuables à la perception sensorielle de substances déjà présentes dans les extraits. C'est le cas, par exemple, des substances astringentes présentes dans l'extrait de thé, qui peuvent altérer la note ArJC ou des substances soufrées dans l'extrait d'oignon qui peuvent au contraire rehausser la note ArJC, comme il l'est évoqué dans l'étude de Kim, Jin, Park, Kim, Joo et Yang (2010). Pour l'extrait d'oignon, il peut même s'agir d'un apport de précurseurs soufrés des molécules aromatiques clés (composés soufrés déjà identifiées dans la partie II-1.1) dans le jambon. Cela pourrait expliquer le fait que quatre des six combinaisons les plus performantes contiennent l'extrait d'oignon.

Des interactions par synergie ou par masquage de l'arôme du jambon cuit peuvent expliquer que la présence de canneberge ou de thé vert dans les jambons réduise, dans la plupart des formulations, l'intensité de la note ArJC. Cinq des six formulations les plus performantes en termes d'arôme et d'oxydation : ACOT, AO, AOT, A et AC, contiennent l'extrait d'acérola. Dans ce cas, il est envisageable que les performances aromatiques soient directement liées aux excellentes propriétés antioxydantes de l'acérola. Ainsi, ce serait une réduction massive de la production des composés volatils d'oxydation, limitant le masquage des composés soufrés clés de l'arôme du jambon, qui permettrait ainsi à la note « jambon cuit » de s'exprimer, comme il l'a été proposé dans la première étude II-1.1.

Des modifications de l'arôme ou de la saveur des jambons peuvent également être induites par des interactions chimiques entre les substances présentes dans chacun des extraits individuels et la matrice carnée, générant de nouveaux composés « arôme actifs ». Cette hypothèse pourrait, dans le cas des molécules volatiles, être étudiée par des analyses de chromatographie-olfactométrie.

4. Conclusion

L'effet des principes actifs purs sur l'oxydation des jambons a permis de sélectionner quatre composés antioxydants qui sont l'acide ascorbique, l'acide malique, la catéchine et la quercétine. Ces molécules se sont révélées être des antioxydants relativement performants pour remplacer le nitrite.

Puisque l'objectif principal de ce travail était plutôt de substituer des extraits naturels au nitrite, nous avons cherché à intégrer ces molécules sous la forme d'extraits végétaux. Pour cela, six extraits végétaux : de pépin de raisin, de pomme, de canneberge, d'acérola, de thé vert et d'oignon ont été testés à différentes doses. Les résultats ont montré que seuls les extraits végétaux : de canneberge, d'acérola, de thé vert et d'oignon ont induit une protection antioxydante égale voire supérieure à celle du nitrite ; cela sans générer de défauts organoleptiques. Ces extraits ont également intensifié la note aromatique « jambon cuit » par rapport à la formulation non nitritée ; permettant ainsi de se rapprocher de l'arôme d'un jambon nitrité.

Compte-tenu des interactions et des synergies complexes entre antioxydants, il était important de tester toutes les combinaisons possibles d'extraits végétaux afin de sélectionner *in fine* les formulations les plus performantes.

Les bonnes performances antioxydantes et aromatiques des formulations Acérola-Canneberge, Acérola, Acérola-Canneberge-Oignon-Thé, Oignon, Acérola-Oignon et Acérola-Oignon-Thé en font des alternatives intéressantes à la substitution du nitrite.

II – 3. Combinaisons des extraits végétaux antioxydants et de la thiamine : effets sur l’oxydation et sur l’arôme du jambon cuit

Les résultats acquis précédemment ont montré que l’arôme du jambon cuit est majoritairement attribuable à un équilibre entre trois molécules soufrées (le 2-méthyl-3-furanthiol, le 2-méthyl-3-(méthyl-dithio)furan, et le *bis*(2-méthyl-3-furyl)disulphide) et les composés odorants issus de l’oxydation.

La thiamine a été identifiée comme le précurseur principal de ces molécules soufrées et son impact sur l’arôme du jambon cuit a été mis en évidence. L’élaboration de plusieurs combinaisons d’extraits végétaux a permis de limiter significativement l’oxydation dans les mini-jambons cuits.

L’objectif de cette partie est donc d’étudier l’impact de formulations intégrant (i) la thiamine, afin de rehausser la note aromatique « jambon cuit », et (ii) des extraits végétaux, pour limiter le masquage de cette note « jambon cuit ». Le but final étant de mettre au point une formulation non nitritée dont l’arôme se rapproche le plus possible de celui de la référence nitritée.

II - 3. Combinaisons d'extraits végétaux antioxydants et de la thiamine : effets sur l'oxydation et sur l'arôme du jambon cuit

1. Introduction

En tenant compte des résultats précédents et selon la réflexion et la volonté des partenaires industriels, trois formulations d'extraits végétaux : Acérola-Canneberge (AC), Acérola-Oignon (AO) et Acérola-Oignon-Thé vert (AOT) ont été retenues pour être combinées à la thiamine dans les mini-jambons. Les formulations les plus simples d'acérola (A) et d'oignon (O) n'ont pas été retenues au profit de formulations plus complexes, susceptibles d'induire des synergies entre les différents extraits antioxydants. La formulation Acérola-Canneberge-Oignon-Thé (ACOT) contenant 4 extraits n'a pas non plus été sélectionnée car trop onéreuse à réaliser pour une efficacité antioxydante semblable à celle des formulations AC, AO et AOT (voir partie II-2).

Au final, six formulations ont été testées : trois formulations contenant uniquement les combinaisons d'extraits : AC, AO et AOT sans apport de thiamine, et trois autres contenant ces combinaisons d'extraits avec un apport de thiamine : AC + thiamine, AO + thiamine et AOT + thiamine.

L'oxydation a été évaluée par des dosages TBARS effectués dans les mini-jambons entre le jour suivant leur fabrication et après 28 jours de conservation afin de réaliser un suivi de l'oxydation dans le temps.

Sur un plan sensoriel, deux types d'analyses ont été mis en œuvre afin :

- (i) d'estimer l'effet des formulations sur la note « jambon cuit » par la dégustation des différentes formulations de jambon.
- (ii) d'expliquer l'origine moléculaire des différences sensorielles observées grâce à l'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à l'olfactométrie multivoies des formulations AOT, AOT + thiamine, N⁻ et N⁺.

La finalité de cette partie est de définir une ou plusieurs formulation(s) capable(s) de pallier l'absence de nitrite de sodium dans le jambon cuit, tant sur un plan oxydatif que gustatif.

2. Matériels et méthodes

2.1. Additifs, réactifs et standards chimiques

- Les extraits végétaux d'acérola, de canneberge, d'oignon et de thé vert ont été fournis par Diana Naturals (Rennes, France). Les extraits d'acérola, l'oignon et le thé vert correspondent aux extraits utilisés dans la partie précédente II-2. Le nouvel extrait de canneberge étant plus concentré en proanthocyanidines (PACs) que celui utilisé précédemment, 15% contre 12% pour le précédent, nous avons décidé de diminuer sa dose d'utilisation.

	Abréviations ^a	Base de la saumure		Nitrite (mg)	Thiamine (mg)	Quantités d'extraits végétaux ajoutées à la saumure				Analyses ^b
		Eau (g)	Sel NaCl (g)			Acérola (mg)	Canneberge (mg)	Oignon (mg)	Thé (mg)	
Mélanges d'extraits	AC	81,2	18	-	-	750	100	-	-	1, 2
	AO	81,1	18	-	-	750	-	125	-	1, 2
	AOT	81,4	18	-	-	500	-	83	17	1, 2, 3
Mélanges d'extraits +	AC + Thiamine	81,1	18	-	100	750	100	-	-	1, 2
	AO + Thiamine	81,0	18	-	100	750	-	125	-	1, 2
Précurseur	AOT + Thiamine	81,3	18	-	100	500	-	83	17	1, 2, 3
"Références"	N+	82,0	17,9	108	-	-	-	-	-	1, 2, 3
	N-	82,0	18	-	-	-	-	-	-	1, 2, 3

Tableau 1. Composition des huit saumures employées et analyses réalisées sur les mini-jambons.

^a : Liste des abréviations = extrait d'acérola (A), extrait de canneberge (C), extrait d'oignon (O), extrait de thé vert (T). Pour les combinaisons, les abréviations correspondent aux lettres des extraits en mélange, par exemple le mélange d'extraits « Acérola + Canneberge » est noté AC.

^b : 1 = dosages TBARS réalisés le lendemain de la fabrication des jambons et après 7, 14, 21 et 28 jours de conservation (J+1, J+7, J+14, J+21 et J+28), 2 = analyses sensorielles (dégustations), 3 = analyses par chromatographie gazeuse couplée à l'olfactométrie multivoies.

Puisque 125 mg de l'extrait à 12% apportaient 15 mg de PACs (Table 1 – chapitre II-2.), 100 mg du nouvel extrait à 15% suffiront à véhiculer les mêmes quantités de PACs.

- Les réactifs employés pour les dosages TBARS sont les mêmes que ceux de la partie II-2 (Sigma-Aldrich).

- Les composés standards de référence utilisés pour l'identification des composés odorants dans les analyses d'olfactométrie multivoies sont : l'hexanal, le 1-octen-3-ol, la 1-octen-3-one, l'octanal, le 1-nonen-3-ol, la 2-nonanone, le nonanal et le 2-nonanal (Sigma-Aldrich).

2.2. Fabrication des jambons modèles

Toutes les analyses ont été réalisées sur des mini-jambons cuits modèles, élaborés en laboratoire, selon le protocole habituel.

Composition des saumures : Les saumures ont été réalisées de telle façon que la somme de tous les ingrédients (eau, sel NaCl ou sel nitrité à 0,6% et substances antioxydantes) soit égale à 100 g. Pour cela, 17 à 750 mg d'extraits végétaux d'acérola, de canneberge, d'oignon et/ou de thé, 0 à 100 mg de thiamine et 18 g de sel, nitrité ou non, ont été additionnés. Le tout a ensuite été complété jusqu'à 100 g par de l'eau. Les compositions de toutes les formulations sont détaillées dans le Tableau 1. Chaque saumure a ensuite été mélangée et homogénéisée à 1 kg de viande crue hachée. Comme dans la partie précédente, les formulations nitritée N⁺ et non nitritée N⁻ représentent respectivement la « cible à atteindre » et la référence « négative ». Les 6 mini-jambons cuits contenant les trois mélanges d'extraits : Acérola-Canneberge (AC), Acérola-Oignon (AO) et Acérola-Oignon-Thé (AOT), avec ou sans ajout de thiamine, ainsi que les mini-jambons nitrité N⁺ et non nitrité N⁻ ont été élaborés pour étudier l'impact de ces additifs sur l'oxydation et sur l'arôme des jambons cuits.

2.3. Dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS)

L'oxydation secondaire des lipides dans les mini-jambons élaborés à partir de différents additifs (nitrite, extrait végétaux antioxydants, thiamine) a été évaluée par des dosages TBARS selon la méthode de Lynch and Frei (1993) et Mercier, Gatellier, Viau, Remignon, and Renner (1998), détaillée dans la partie II-2. Pour chaque formulation, deux mini-jambons ont été analysés en double. Les résultats sont exprimés en unités TBARS (équivalents à des mg de malonedialdéhyde par kg de viande analysée). Les valeurs TBARS ont été mesurées, dans les mini-jambons, le lendemain de leur fabrication mais aussi après 7, 14, 21, 28 jours de conservation dans l'obscurité à 4°C (notés respectivement J+1, J+7, J+14, J+21, J+28). Les résultats des dosages TBARS réalisés au-delà de 28 jours n'ont pas été présentés, dans ce travail, en raison de problèmes inhérents à la méthode de dosage.

En effet, au début de l'oxydation secondaire (jusqu'à J+28), le malonedialdéhyde (MDA) réagit principalement avec l'acide thiobarbiturique (TBA) et, à moindre titre, avec les protéines, rendant possible l'estimation de l'oxydation par la quantification du complexe formé par le TBA et les composés d'oxydation secondaire, majoritairement le MDA. A partir de J+35, à cause d'une production moins intense de MDA, cet équilibre bascule en faveur de la réaction du MDA avec les protéines, l'évaluation de l'oxydation par la quantification du complexe TBA-MDA n'est alors plus interprétable dans ces conditions.

2.4. Analyses sensorielles

L'intensité de la note aromatique « jambon cuit » des 8 formulations de mini-jambons cuits a été évaluée le lendemain de leurs fabrications par un panel de 14 dégustateurs sur une échelle de notation graduée de 0 à 10. Les juges ont été sélectionnés selon leurs capacités à noter de façon reproductible l'arôme « jambon cuit ». Les analyses ont été réalisées sous lumière rouge, afin de masquer au mieux les différences de couleurs entre le jambon nitrifié rose et les jambons non nitrifiés plus « grisâtres ». Les mini-jambons ont été présentés dans un ordre différent pour chaque juge et dégustés les uns après les autres. Il a également été demandé aux juges de décrire leur perception d'un éventuel défaut d'arôme inacceptable pour un produit comme le jambon cuit.

2.5. Analyses par chromatographie en phase gazeuse couplée à l'olfactométrie à 8 voies (GC-8O)

La chromatographie en phase gazeuse couplée à l'olfactométrie multivoies permet de détecter rapidement et de façon fiable et exhaustive un grand nombre de zones odorantes dans la fraction volatile d'un produit grâce au cumul des performances de 8 juges. Les deux mini-jambons de « référence » N⁺ et N⁻ ainsi que ceux contenant les mélanges Acérola-Oignon-Thé (AOT) et Acérola-Oignon-Thé + Thiamine (AOT+thiamine) ont été analysés le lendemain de leur fabrication. L'étape d'extraction des composés volatils est identique à celle décrite dans la partie II-2. Après une étape d'extraction sous un flux d'hélium d'une heure et une étape de séchage de 30 min, les composés extraits de la matrice « jambon cuit » ont été cryo-concentrés puis injectés pendant 2 min à 180°C en tête de colonne. Les composés volatils sont séparés par la colonne chromatographique apolaire (RTX5, longueur 60m, diamètre interne 0,53 mm, épaisseur de film 1,5µm, Restek, Evry, France) et sont ensuite détectés simultanément en olfactométrie par un panel de 8 juges et en spectrométrie de masse. Du côté de l'olfactométrie, un « diviseur de flux » chauffé à 215°C relie la colonne chromatographique aux 8 ports d'olfaction par l'intermédiaire de 8 lignes de transfert à 220°C. Les composés volatils odorants sont alors détectés par un panel de 8 juges qui décrivent les odeurs perçues et notent leur intensité (de 1 à 5). Du côté de la spectrométrie, les composés volatils sont détectés par impact électronique à 70 eV (fragments m/z compris entre 33 et 230 u.m.a.) et collectés à la vitesse de 2 scans.sec⁻¹.

Les données d'olfactométrie ont été acquises et traitées grâce au logiciel AcquiSniff® (Berdagué & Tournayre, 2003; Tournayre & Berdagué, 2003). L'identification des composés volatils a été réalisée grâce aux spectres de masse acquis, aux temps de rétention et à la comparaison avec des standards de référence co-injectés.

Les 8 juges, non-fumeurs et âgés de 23 à 50 ans, ont été sélectionnés pour leurs bonnes performances en termes de détection et de description des odeurs. Seule la nature du produit (jambon cuit) leur a été communiquée. Quatre séances d'olfactométrie, soit 32 analyses de GC-80 (8 juges x 4 formulations de jambon analysées) ont été réalisées.

2.6. Analyses statistiques

L'effet « Formulation », c'est-à-dire l'effet du nitrite et des extraits végétaux, utilisés seuls ou en mélange avec la thiamine, sur l'oxydation (évaluée par les dosages TBARS) et sur l'intensité de la note « jambon cuit », a été étudié par deux ANOVAs selon les modèles suivants :

$$(1) TBARS_{i,j,k} = \mu + F_i + Mat_j + F * Mat_{i,j} + \epsilon_k$$

avec $TBARS$ = valeur TBARS, μ = effet moyen, F_i = effet « Formulation » (8 niveaux), Mat_j = effet « Maturation » (5 niveaux), interaction $F * Mat_{i,j}$ (40 niveaux) et ϵ_k = variance résiduelle ($k = 4$ répétitions).

$$(2) TBARS_{i,j,k,l} = \mu + AO_i + T_j + Mat_k + AO * T_{i,j} + AO * Mat_{i,k} + T * Mat_{j,k} + AO * T * Mat_{i,j,k} + \epsilon_l$$

avec $TBARS$ = valeur TBARS, μ = effet moyen, AO_i = effet « Antioxydant » (3 niveaux : AC, AO et AOT), T_j = effet « Thiamine » (2 niveaux : avec ou sans), Mat_k = effet Maturation (5 niveaux), $AO * T_{i,j}$, $AO * Mat_{i,k}$, $T * Mat_{j,k}$ et $AO * T * Mat_{i,j,k}$ = effet des interactions d'ordre 2 et 3, ϵ_l = variance résiduelle ($l = 4$ répétitions).

$$(3) ArJC_{i,j,k} = \mu + AO_i + T_j + AO * T_{i,j} + \epsilon_k$$

avec $ArJC$ = « arôme de jambon cuit », μ = effet moyen, AO_i = effet « Antioxydant » (4 niveaux : AO, AC, AOT et N⁻), T_j = effet Thiamine (2 niveaux), $AO * T_{i,j}$ = effet des interactions d'ordre 2 et ϵ_k = variance résiduelle ($k = 14$ ou 13 juges). L'ANOVA a été accompagnée d'un test de comparaison de moyennes selon Duncan ($p < 0,05$).

Les calculs et les graphiques ont été réalisés avec le logiciel Statistica (version 12, Tulsa, OK, USA).

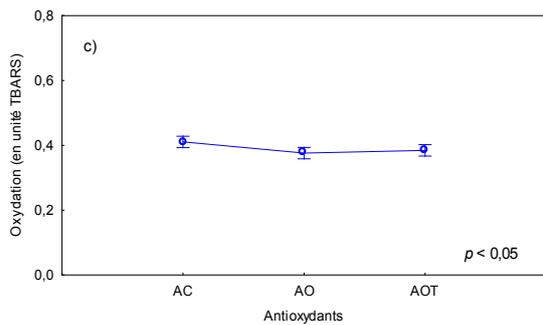
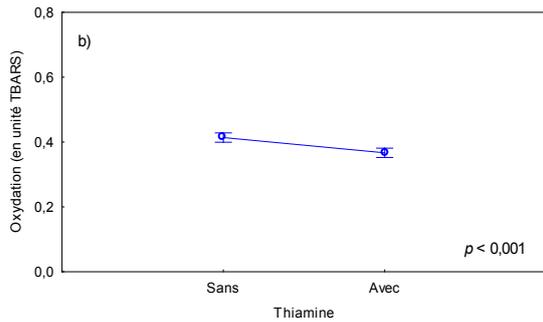
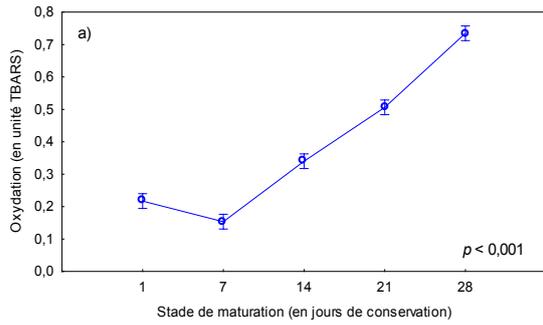


Figure 1. Effets des 3 facteurs : « Stade de maturation », « présence/absence de thiamine » et « nature des antioxydants AC, AO et AOT » sur les valeurs TBARS. Les valeurs les moyennes et l'intervalle de confiance du modèle d'ANOVA(2) sont présentées sous forme de moustaches.

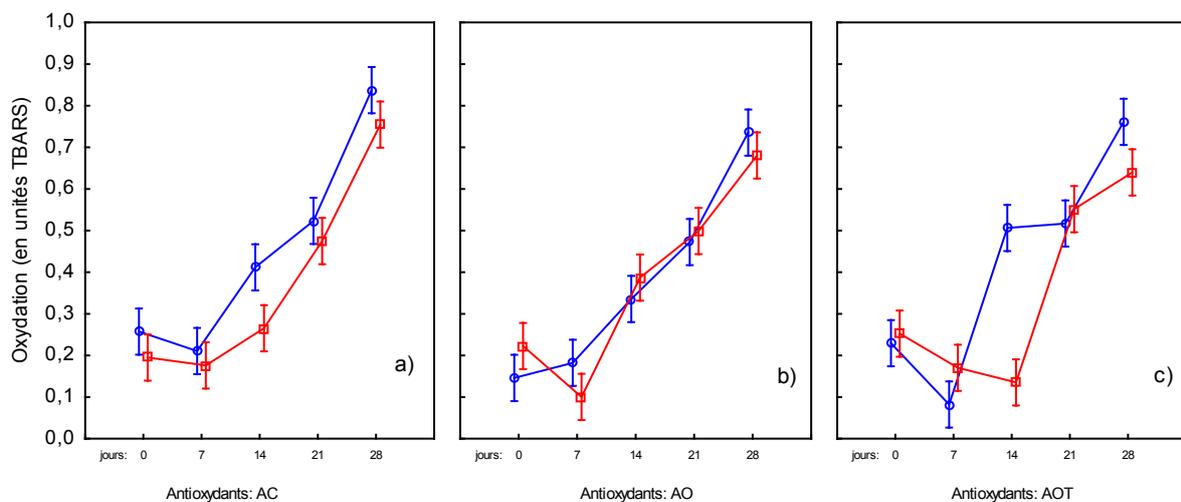


Figure 2. Comparaison des valeurs TBARS mesurées dans des mini-jambons contenant l'une des trois combinaisons d'extraits végétaux et contenant de la thiamine (courbe rouge) ou n'en contenant pas (courbe bleue). L'oxydation a été mesurée après 1, 7, 14, 21 et 28 jours de conservation. La moyenne et l'intervalle de confiance du modèle d'ANOVA (2) sont représentés sous forme de moustaches.

3. Résultats et discussion

3.1. Effets de la durée de maturation, des combinaisons d'antioxydants végétaux et de la thiamine sur l'oxydation des jambons

Les Figures 1a), 1b) et 1c) permettent de comparer les effets moyens de 3 facteurs sur l'oxydation des jambons et montrent que le stade de maturation est le facteur qui induit les plus grandes variations entre 0,1 et 0,75 unités TBARS ($p < 0,001$). Viennent ensuite la « présence/absence de thiamine » ($p < 0,001$) puis la « nature des antioxydants » ($p < 0,05$) dont les effets n'entraînent que des variations assez faibles et respectives de 0,37 à 0,41 unités TBARS pour l'effet « thiamine » et de 0,38 à 0,41 unités TBARS pour l'effet « nature des antioxydants » (Figure 1b et c).

L'effet antioxydant observé pour la thiamine peut s'expliquer par ses propriétés réductrices dans les conditions physico-chimiques de nos fabrications modèles. Une analyse plus fine de l'influence de la thiamine (Figure 2) montre que son action antioxydante est différente selon les combinaisons d'extraits végétaux auxquels elle est associée. Ainsi, la thiamine semble légèrement améliorer les performances antioxydantes de la formulation AC (Acérola-Canneberge) mais s'avère sans effet sur la formulation AO (Acérola-Oignon). Ce résultat est difficilement interprétable en l'absence d'expériences complémentaires aux vues de la variabilité des mesures et des multiples interactions possibles entre les différents extraits et la thiamine.

Les faibles variations induites par l'effet « antioxydants » s'expliquent probablement par le fait que leurs doses d'utilisation avaient été calculées pour obtenir des performances antioxydantes équivalentes.

L'oxydation mesurée à J+1, majoritairement induite par la cuisson, est comprise entre 0,15 et 0,26 unités TBARS pour les différents mélanges antioxydants (Figure 3). Elle est réduite de plus de 50% par rapport à la valeur moyenne de 0,52 unités TBARS mesurée pour le jambon N°. Les différentes formulations à base d'extraits végétaux, avec ou sans thiamine, ont eu jusqu'à J+14 des effets antioxydants assez voisins de ceux du nitrite (Figure 3). Ces résultats confirment les bonnes performances antioxydantes des formulations AO, AC et AOT au cours du temps qui ont déjà été mises en évidence dans la partie précédente II-2. A partir de J+21 toutes les formulations « expérimentales » contenant les extraits se sont montrées légèrement moins performantes que la formulation nitritée. A J+28, les performances de ces formulations ont commencé à se distinguer entre elles ; ainsi la performance de la formulation AOT+Thiamine est apparue clairement supérieure à celles de la formulation AC. A partir de ce stade de maturation les formulations les plus efficaces étaient AO+Thiamine et AOT+Thiamine, réduisant de près de 40 % l'oxydation par rapport à la formulation N°. La formulation AC était la moins performante et n'a réduit l'oxydation que de 20 % environ.

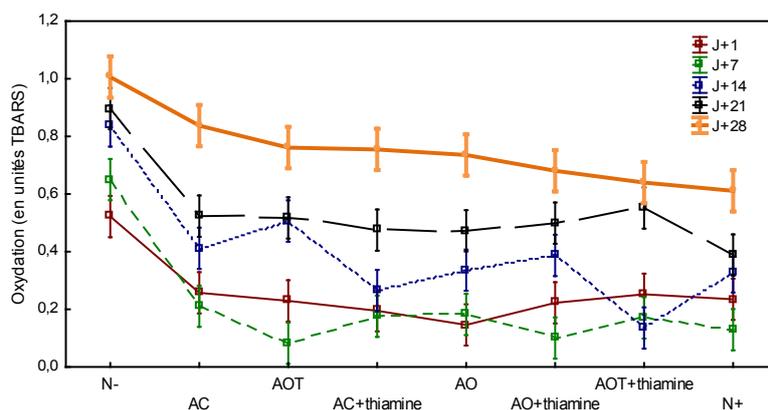


Figure 3. Effet des formulations à base d'extraits végétaux, combinés ou non à de la thiamine, sur l'oxydation des mini-jambons cuits modèles après 1, 7, 14, 21 et 28 jours de conservation. Les formulations nitritées N⁺ et non nitritées N⁻ représentent les jambons de « références ». Pour chaque formulation, la moyenne et l'intervalle de confiance du modèle d'ANOVA (1) sont présentés, dans l'ordre décroissant, sous forme de moustaches. Les jambons AC, AO, AOT ont été enrichis respectivement avec les mélanges Acérola-Canneberge, Acérola-Oignon ou Acérola-Oignon-Thé. Leurs doses d'utilisation sont indiquées dans le Tableau 1. Les formulations AC, AO et AOT ont également été réalisées avec un ajout de 100 mg de thiamine pour 100 g de saumure.

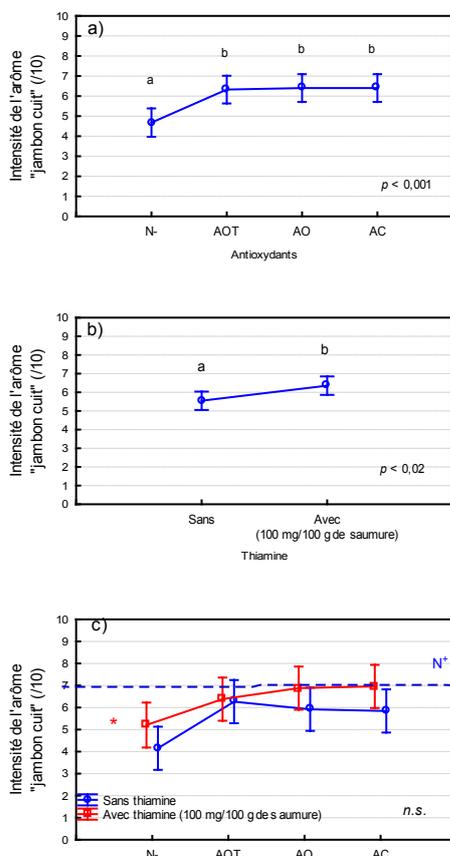


Figure 4. Effets principaux des antioxydants a), de la thiamine b) et des interactions antioxydants x thiamine c) sur l'intensité de la note aromatique « jambon cuit ». Les abréviations utilisées pour les formulations sont les suivantes : N⁻ (sans nitrite), AOT (sans nitrite + Acérola-Oignon-Thé), AO (sans nitrite + Acérola-Oignon), AC (sans nitrite + Acérola-Canneberge) et N⁺ (avec nitrite). Les tracés en rouge signalent l'usage de la thiamine. Les moyennes et intervalles de confiance ont été obtenus selon le modèle d'ANOVA (3) et sont présentés sous forme de moustaches. Les lettres a et b représentent les groupes homogènes lors des comparaisons de moyennes selon le test de Duncan ($p < 0,05$).

--- : valeur moyenne de l'intensité aromatique de la formulation nitritée N⁺ (sans thiamine).

* : valeur moyenne de l'intensité aromatique de la formulation N⁻ + thiamine (sans nitrite et avec 100 mg de thiamine pour 100 g de saumure) obtenue dans la partie II-1.3. de la thèse en conditions d'analyse sensorielle similaires.

Après 28 jours de conservation, les valeurs TBARS des formulations expérimentales restent en dessous de la valeur TBARS du jambon N^o, nous pouvons donc raisonnablement considérer que les mélanges d'extraits végétaux, associés ou non à la thiamine induisent une protection antioxydante satisfaisante ; tout particulièrement pour les combinaisons AO+thiamine et AOT+thiamine dont les propriétés antioxydantes à J+28 sont très proches de celles du nitrite.

3.2. Effet des extraits végétaux antioxydants et de la thiamine sur l'arôme du jambon cuit

L'intensité de l'arôme « jambon cuit » (ArJC) a été évaluée par la dégustation des 8 formulations décrites dans le Tableau 1. Ces formulations ont été dégustées dès le lendemain de leur fabrication et non après une période de maturation plus importante afin d'éviter tout risque sanitaire d'ordre microbien lié à l'absence de nitrite.

Les Figures 4a), 4b) et 4c) permettent de comparer les effets moyens des facteurs « antioxydant » et « thiamine ». La Figure 4a) montre que l'arôme jambon cuit est significativement amélioré par l'ajout des mélanges d'extraits végétaux antioxydants « AOT, AO et AC » (ArJC = 6,3 - 6,4) par rapport à la formulation N^o sans nitrite (ArJC = 4,7). En effet, le rôle positif des antioxydants sur l'arôme du jambon cuit peut s'expliquer par la limitation de la production de composés d'oxydation volatils odorants, susceptibles de masquer la perception de la note « jambon cuit » induite par les molécules odorantes soufrées. Cet effet a déjà été constaté et mis en évidence lors de notre étude sur le déterminisme de l'arôme du jambon cuit fabriqué avec ou sans antioxydant (Thomas, Mercier, Tournayre, Martin, & Berdagué, 2013, chapitre II-1). Aucune différence significative dans l'intensité de l'arôme « jambon cuit » n'a cependant été observée entre les 3 combinaisons d'antioxydants ; ce qui est cohérent avec les résultats obtenus pour les analyses TBARS où l'état d'oxydation dans les trois formulations contenant les trois mélanges d'extraits végétaux était assez similaire (Figures 1 et 2). Par ailleurs, lors des analyses sensorielles, aucun défaut d'arôme n'a été perçu dans les formulations enrichies en extraits antioxydants, avec ou sans thiamine ; ce qui signifie que les mélanges d'additifs, à la dose employée, n'ont pas introduit de substances aromatiques sapides à caractère négatif. L'effet de l'apport de thiamine s'est avéré significatif et a permis de gagner 1 point sur 10 dans l'intensité de la note « arôme de jambon cuit » (Figure 4b). Aucune interaction significative « Antioxydant » x « Thiamine » n'a été observée (Figure 4c). La thiamine a eu une action positive mais avec une efficacité variable selon les formulations et la combinaison AOT s'est avérée la moins sensible à cet apport de thiamine.

Nous retiendrons qu'en terme d'arôme global, toutes les combinaisons d'extraits, avec ou sans thiamine permettent d'obtenir un arôme relativement proche de celui d'un jambon nitrifié.

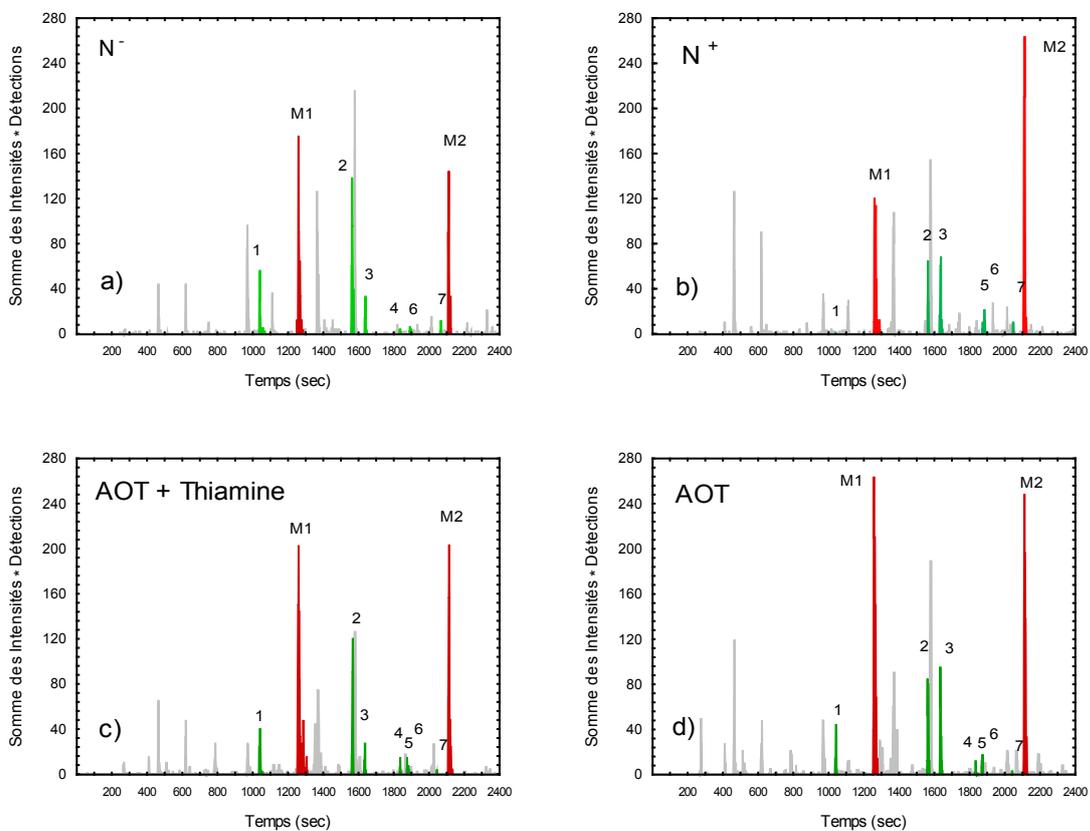


Figure 5. Aromagrammes obtenus, à partir des données d'olfactométrie multivoies, pour des jambons contenant les extraits végétaux et/ou la thiamine. Les axes des ordonnées représentent le produit du « nombre de détections » (de 1 à 8) multiplié par la « somme des intensités des pics » (intensité notée par chacun des 8 juges entre 1 et 5). Les pics *verts* correspondent aux composés issus de l'oxydation lipidique : (1) hexanal, (2) 1-octen-3-ol/one, (3) octanal, (4) 1-nonen-3-ol, (5) 2-nonanone, (6) nonanal, (7) 2-nonenal. Les pics *rouges* représentent les 2 molécules clés de l'arôme de jambon cuit issues de la dégradation de la thiamine (M1 : 2-méthyl-3-furanethiol et M2 : 2-méthyl-3-(méthylthio)-furan). Les pics *gris* correspondent aux composés ayant d'autres origines.

Afin de valider nos résultats expérimentaux, les formulations AC, AO, AOT et AC + thiamine ont été réalisées à l'échelle pilote grâce et selon le savoir-faire du partenaire industriel Fleury-Michon. Les notes aromatiques « jambon cuit » et « rôti de porc » ont été évaluées par des jurys d'analyse sensorielle recrutés sur les sites des différents partenaires. Les résultats sont présentés en Annexe IV car les données sont parvenues tardivement. Les résultats moyens obtenus par l'ensemble des partenaires confirment que les mélanges d'antioxydants, avec ou sans thiamine, augmentaient significativement l'arôme par rapport à celui d'un jambon non nitrité.

3.3. Effet des extraits végétaux antioxydants et de la thiamine sur la fraction volatile odorante des mini-jambons cuits

Les analyses de chromatographie couplée à l'olfactométrie multivoies ont été mises en œuvre pour les deux formulations de référence N⁺ et N⁻ ainsi que pour les 2 jambons contenant le mélange Acérola-Oignon-Thé à savoir : AOT et AOT + thiamine (Figures 5a-5d).

Afin de simplifier la présentation des résultats, en accord avec les connaissances récentes acquises sur le déterminisme de l'arôme du jambon cuit (Thomas, Mercier, Tournayre, Martin, & Berdagué, 2013, partie II-1.1), les pics odorants des aromagrammes ont été classés en 3 groupes :

- les pics « rouges », correspondant aux molécules 2-méthyl-3-furanethiol (M1) et 2-methyl-3-(methyl-dithio)-furan (M2), responsables de l'arôme du jambon cuit
- les pics « verts », correspondant aux composés issus de l'oxydation lipidique, responsables du masquage de l'arôme « jambon cuit »
- les pics « gris » correspondant aux composés ayant d'autres origines et aucun intérêt dans cette étude.

Le bis(2-methyl-3-furyl)disulfide (M3) n'est pas retenu dans cette partie puisque son temps de rétention est largement supérieur à la durée des analyses par olfactométrie multi-postes.

Les pics odorants verts correspondent à l'hexanal, au 1-octen-3-one/ol, à l'octanal, au 1-nonen-3-ol, à la 2-nonanone, au nonanal et au 2-nonenal ; il s'agit des marqueurs volatils de l'oxydation significativement influencés par l'ajout d'antioxydants comme nous l'avons montré lors des analyses par GC-MS réalisées dans la partie II-2. Le pic n°2 correspond à une co-élution partielle du 1-octen-3-one et du 1-octen-3-ol (deux fortes odeurs de champignon) s'est avéré beaucoup plus intense dans la fraction volatile du jambon non nitrité N⁻ que dans celles des trois jambons protégés de l'oxydation, soit par le nitrite (Figure 5b), soit par le mélange d'antioxydants AOT (Figure 5c et d).

Pour les molécules M1 et M2, leurs odeurs ont été perçues plus intensément dans les deux jambons contenant l'extrait d'oignon : AOT et AOT + thiamine ; cela laisse supposer que l'extrait d'oignon, riche en molécules soufrées, pourrait être porteur des molécules M1 et M2 ou de leurs précurseurs.

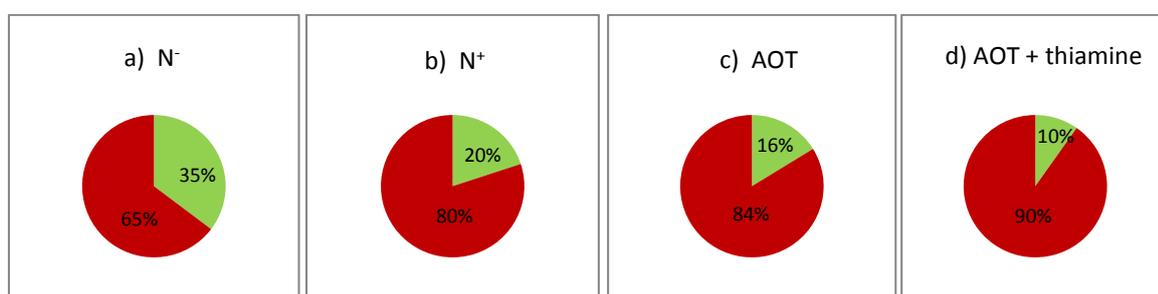


Figure 6. Diagrammes circulaires (camemberts) réalisés à partir des données olfactométriques représente le ratio entre les aires des pics odorants issus de l'oxydation des lipides « $\sum OX$ » (pics verts, Figure 5) et les aires des pics odorants des deux soufrés: 2-méthyl-3-furanethiol (M1) et 2-methyl-3-(methyl-dithio)-furan (M2) issus de la dégradation de la thiamine « $\sum S$ » (pics rouges, Figure 5), dans la fraction volatile odorante des mini-jambons cuits. Les aires ont été calculées à partir des 4 aromagrammes de la Figure 5.

Pour apprécier la contribution relative des composés soufrés responsables de l'arôme du jambon cuit « $\sum S$ » et des composés issus de l'oxydation lipidique « $\sum Ox$ », la proportion entre l'aire totale des pics olfactométriques attribuables à la dégradation thermique de la thiamine (en rouge, Figure 6) et l'aire totale des pics olfactométriques correspondant aux produits d'oxydation (en vert, Figure 6) a été présentée sous la forme de diagrammes circulaire (Figure 6) ; et cela pour chacune des 4 formulations analysées (N^- , N^+ , AOT et AOT + thiamine). Les résultats montrent que les formulations comportant un antioxydant (N^+ ou AOT) ont des ratios « $\sum S / \sum Ox$ » très supérieurs à celui de la formulation non nitrifiée ; cela confirme le rôle du nitrite dans l'arôme du jambon cuit qui a été élucidé dans la première partie du travail de thèse. D'autre part, ces ratios confirment que la présence de thiamine dans la formulation AOT + thiamine renforce la contribution odorante des molécules soufrées (part rouge) par rapport à la formulation « AOT » (Figure 6c et 6d). Cette représentation Figure 6 montre également que le ratio « $\sum S / \sum Ox$ » de la formulation AOT est supérieur à celui de la formulation N^+ , probablement en raison de substances ou de précurseurs soufrés apportés par l'extrait d'oignon comme il l'a été supposé dans la partie II-2.

4. Conclusion

Les résultats ont montré que l'oxydation dans les jambons cuits expérimentaux était majoritairement influencée par le stade de maturation. Tous les apports d'extraits végétaux en mélanges ont permis de réduire significativement l'oxydation par rapport à la formulation N^- , réalisée sans nitrite. Cela dit, aux doses auxquelles les extraits ont été utilisés, leurs propriétés antioxydantes sont très similaires jusqu'à J+21 mais leurs performances antioxydantes commencent à se distinguer à J+28. La thiamine, combinée aux mélanges « Acérola-Canneberge » et « Acérola-Oignon-Thé », permet une réduction encore plus importante de l'oxydation ; conduisant aussi à des performances voisines de celles de la formulation nitrifiée de référence, même après 28 jours de conservation.

Sur un plan organoleptique, les mélanges ont largement permis de rehausser la note aromatique « jambon cuit » par rapport à la formulation non nitrifiée. En cohérence avec les résultats obtenus sur le plan oxydatif, les performances des trois combinaisons d'extraits « Acérola-Canneberge », « Acérola-Oignon » et « Acérola-Oignon-Thé » sur l'arôme des mini-jambons sont relativement proches. Avec un ajout de 100 mg de thiamine pour 100 g de saumure, la note aromatique « jambon cuit » est rehaussée, et ces formulations atteignent ainsi un arôme se rapprochant fortement de celui de la formulation nitrifiée.

Les analyses olfactométriques ont confirmé que l'arôme du jambon cuit résultait d'un équilibre entre la perception des produits odorants issus de l'oxydation lipidique et des molécules odorantes soufrées issues de la dégradation de la thiamine. Dans ce contexte, les actions conjointes des antioxydants et de la thiamine ont permis de restaurer l'équilibre aromatique de jambons non nitrifiés.

Techniquement, les formulations « Acérola-Canneberge + thiamine » et « Acérola-Oignon + thiamine » semblent être de bonnes alternatives à la suppression du nitrite. Sur un plan industriel, l'apport d'oignon dans les formulations pourrait être optimisé afin d'utiliser ses capacités à rehausser l'arôme du jambon cuit.

Conclusions

Nature et origine de l'arôme du jambon cuit.

La mise en œuvre de puissants moyens analytiques dans le domaine de l'étude des molécules volatiles odorantes a permis d'identifier pour la première fois les composés clés responsables de l'arôme du jambon cuit. Ainsi, la note « jambon cuit » typique de cette charcuterie est attribuable à trois composés soufrés qui sont : le 2-méthyl-3-furanthiol, son dimère le bis(2-méthyl-3-furyl)disulfide ainsi que le 2-méthyl-3-(méthyl-dithio)furan dont les productions dans le jambon sont très intercorrélées. L'utilisation de précurseurs potentiels de ces trois composés a permis de démontrer qu'ils sont spécifiquement issus de la dégradation de la thiamine et qu'ils ne proviennent pas de réactions de Maillard impliquant la cystéine ; cela en raison de la cuisson à basse température du jambon. Grâce à la mise au point d'une méthode de dosage spécifique du 2-méthyl-3-furanthiol, la relation entre la concentration en thiamine présente dans le jambon et la concentration en 2-méthyl-3-furanthiol formé à la cuisson a pu être calculée.

Nos recherches ont également permis d'élucider le rôle du nitrite dans le développement de l'arôme du jambon cuit en démontrant que cet arôme résulte d'un équilibre perceptif entre les composés odorants soufrés précités et certains composés d'oxydation lipidique odorants formés lors de la cuisson ou lors du stockage du jambon. C'est finalement grâce à son action antioxydante que le nitrite contrôle cet équilibre en limitant la formation de produits d'oxydation, évitant ainsi le masquage olfactif des composés soufrés.

Formulations de substitution au nitrite.

Parmi les principes actifs purs testés, quatre composés antioxydants qui sont l'acide ascorbique, l'acide malique, la catéchine et la quercétine se sont révélés être des alternatives relativement performantes pour se substituer au nitrite sur un plan oxydatif. Désireux de vectoriser ces substances par le biais d'extraits végétaux naturels, six extraits de pépin de raisin, de pomme, de canneberge, d'acérola, de thé vert et d'oignon contenant ces composés ont été testés à différentes doses. Les extraits végétaux de canneberge, acérola, thé vert et oignon ont présenté des performances antioxydantes égales ou supérieures à celle du nitrite de sodium et cela sans générer de défauts organoleptiques. Ces extraits ont également permis d'obtenir un arôme « jambon cuit » plus intense que celui d'un jambon non nitrifié et se rapprochant de celui d'un jambon nitrifié. *In fine*, ce sont les formulations « Acérola-Canneberge, Acérola, Acérola-Canneberge-Oignon-Thé, Oignon, Acérola-Oignon et Acérola-Oignon-Thé » qui ont démontré les

meilleures performances antioxydantes et aromatiques pour se substituer au nitrite sur des périodes de maturation du jambon allant, pour certaines formulations, jusqu'à plusieurs semaines après leur fabrication.

L'apport de 100 mg de thiamine pour 100 g de saumure s'est avéré efficace pour rehausser significativement l'arôme « jambon cuit » des formulations « non nitritées », « Acérola-Canneberge » et « Acérola-Oignon ». La dégradation thermique de cette vitamine a permis d'induire des notes aromatiques « jambon cuit » proches de celles d'un jambon nitrité ; ce qui représente la cible à atteindre que nous avons fixée au début de ce travail de thèse. Cependant, la quantité de thiamine nécessaire est élevée et peu réaliste pour un usage en contexte industriel.

Finalement, la démarche d'ingénierie de la qualité sensorielle, basée sur la chromatographie-olfactométrie, que nous avons mise en œuvre, a démontré que l'acquisition de connaissances sur le déterminisme de l'arôme des aliments, nécessitant l'utilisation de puissants moyens analytiques, est aujourd'hui utilisable pour moduler ou restaurer l'arôme d'un aliment, même dans une matrice aussi complexe que celles d'un produit carné cuit.

Perspectives

Restauration de l'arôme des jambons non nitrités

Au niveau de la formulation, l'approche « screening » mise en œuvre dans ce travail pourra être prolongée en vue d'une optimisation des doses des constituants les plus performants. Pour cela un usage de techniques exploratoires issues de la méthodologie de la recherche expérimentale ; telles que des plans d'expérience couplés à des algorithmes d'optimisation pourront être mis en œuvre. Dans ce contexte, un usage d'extraits végétaux riches en composés soufrés, tels que certains alliés (comme l'oignon...), pourrait être envisagé pour rehausser l'arôme « jambon cuit ». L'objectif sera de renforcer la production des trois molécules soufrées clés impliquées dans la note « jambon cuit » à partir de précurseurs soufrés contenus dans les extraits végétaux, sans perturber la note aromatique caractéristique du jambon cuit.

Le procédé de fabrication des jambons mériterait également d'être optimisé à la fois pour mieux définir les doses minimales de thiamine à ajouter lors de la fabrication et/ou pour augmenter la dégradation de la thiamine endogène contenue dans la viande. En effet, cette vitamine n'est que très partiellement consommée lors de la cuisson et représente un potentiel naturel de substances aromatiques d'intérêt. La perte ainsi engendrée n'induirait aucun déficit nutritionnel chez le consommateur car celle-ci est présente en quantité suffisante dans de nombreux aliments. Des modifications du barème de cuisson, à condition que les rendements ou les coûts de fabrication ne soient pas trop perturbés, ou une induction ciblée de la dégradation de la thiamine par modification de la physico-chimie de la matière première sont envisageables... à condition de respecter la naturalité du produit ! Des bouillons à base de viande ou de végétaux, naturellement riches en composés clés de l'arôme du jambon, pourraient également être intégrés à la saumure avant la cuisson.

Pour rappel, l'arôme « jambon cuit » de nos formulations non nitritées et enrichies en extraits végétaux a été perçu légèrement inférieur à celui d'une formulation nitritée. Dans les recettes « classiques » de jambon cuit élaborées par Fleury-Michon, d'autres ingrédients comme des bouillons et des aromates sont employés. Il serait intéressant de déterminer si le simple ajout de ces aromates ou de ces bouillons ne suffirait pas à combler le faible écart d'arôme qui existe entre nos formulations non nitritées enrichies en extraits végétaux et les formulations nitritées.

Restauration de la couleur et limitation du risque microbiologique

L'ajout *sensu-stricto* de colorants, même naturels, n'est pas autorisé à ce jour. Seul, l'usage d'un extrait végétal employé pour ses performances antioxydantes ou antimicrobiennes et accessoirement vecteur d'une coloration pourrait être employé. Une solution, plus simple, consisterait à réaliser une campagne d'information expliquant aux consommateurs l'origine de la perte de la couleur rose dans les jambons non nitrités, en insistant sur les atouts de ces nouvelles formulations de jambon cuit. Cette solution pourrait cependant constituer une communication négative qui nuierait à la commercialisation des produits nitrités. Dans ce contexte, une étude de marché préalable serait nécessaire pour évaluer les enjeux et les verrous à lever pour assurer la meilleure communication possible.

Sur un plan microbiologique, les analyses basiques que nous avons réalisées se sont révélées satisfaisantes. Celles-ci devront être suivies par des analyses plus poussées ; par exemple par ensemencement avec *E. coli* ou *C. botulinum* des formulations que nous avons sélectionnées. Cela permettrait de déterminer si les extraits végétaux employés sont performants pour inhiber ces bactéries. Les extraits de canneberge, d'acérola et d'oignon étant réputés pour leurs propriétés antimicrobiennes, il est envisageable que leur présence suffise à assurer la sécurité sanitaire du produit. Si ce n'est pas le cas, il faudra rechercher de nouveaux extraits aux propriétés antimicrobiennes plus performantes, sans oublier d'évaluer parallèlement leurs impacts sur l'arôme final du produit.

Références bibliographiques

- Abouelkaram, S. & Berdagué, J. L. (2010). Outil logiciel d'aide à la purification de spectres de masse en mélanges complexes. [Computer software]. Institut National de la Recherche Agronomique, UR370 Qualité des Produits Animaux, F-63122, Saint Genès Champanelle.
- Andrée, S., Jira, W., Schwind, K. H., Wagner, H., & Schwägele, F. (2010). Chemical safety of meat and meat products. *Meat Science*, 86(1), 38-48.
- Baek, H. H., Kim, C. J., Ahn, B. H., Nam, H. S., & Cadwallader, K. R. (2001). Aroma extract dilution analysis of a beeflike process flavor from extruded enzyme- hydrolyzed soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 790–793.
- Bailey, M. E. (1994). Maillard reactions and meat flavour development. In F. Shahidi (Ed.), *Flavor of meat and meat products* (pp. 153–169). Glasgow: Blackie Academic and Professional.
- 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.
- Bastide, N. M., Pierre, F. H. F., & Corpet, D. E. (2011). Heme Iron from Meat and Risk of Colorectal Cancer: A Meta-analysis and a Review of the Mechanisms Involved. *Cancer Prevention Research*, 4(2), 177-184.
- Basant K. Dwivedi, R. G. A. (1972). Chemistry of thiamine degradation - Mechanisms of thiamine degradation in a model system. *Journal of Food Science*, 37.
- Belitz, H. D., & Grosch, W. (1999). Aroma Substances. In *Food Chemistry - Second Edition* 2nd ed., (pp. 319-375): Springer.
- Benedict, R. C. (1980). Biochemical basis for nitrite inhibition of Clostridium botulinum in cured meat *Journal of Food Protection*(43), 877-981.
- Berdagué, J. L., & Tournayre, P. (2005). Gas chromatography-olfaction analysis device and method. France: Institut National de la Recherche Agronomique. Patent WO 2005/001470 A2.
- Berdagué, J. L. & Tournayre, P. (2002). The “Video-Sniff” method, a new approach for the “vocabulary-intensity-duration” study of “elementary odours” perceived by gas-chromatography-olfaction. In Le Quéré, J.L., Étievant, P.X. (Eds.), *Flavour research at the dawn of the twenty-first century* (TEC & DOC ed.), (pp. 514–517). Paris – 11 rue Lavoisier: Intercept Scientific Technic Medical Publishers.
- Berdagué, J. L., Tournayre, P., & Cambou, S. (2007). Novel multi-gas chromatography-olfactometry device and software for the identification of odour-active compounds. *Journal of Chromatography A*, 1146, 85–92.
- Bertrand, E., Hado-Maturana, E., Chevarin, C., Portanguen, S., Mercier, F., Tournayre, P., et al. (2011). Heat-induced volatiles and odour-active compounds in a model cheese. *International Dairy Journal*, 21, 806–814.
- Bezman, Y., Rouseff, R. L., & Naim, M. (2001). 2-methyl-3-furanthiol and methional are possible off-flavors in stored orange juice: Aroma-similarity, NIF/SNIF GC-O, and GC analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5425-5432.
- Breme, K., Tournayre, P., Fernandez, X., Meierhenrich, U. J., Brevard, H., Joulain, D., et al. (2009). Identification of odour impact compounds of *Tagetes minuta* L. essential oil: Comparison of two GC–olfactometry methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 8572–8580.

- Brunton, N. P., Cronin, D. A., & Monahan, F. J. (2002). Volatile components associated with freshly cooked and oxidized off-flavours in turkey breast meat. *Flavour and Fragrance Journal*, *17*, 327–334.
- Buttery, R. G., Haddon, W. F., Seifert, R. M., & Turnbaugh, J. G. (1984). Thiamin odor and bis(2-methyl-3-furyl) disulfide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *32*(3), 674–676.
- Cerny, C. (2007). Origin of carbons in sulfur-containing aroma compounds from the Maillard reaction of xylose, cysteine and thiamine. *Lwt-Food Science and Technology*, *40*(8), 1309-1315.
- Cerny, C., & Briffod, M. (2007). Effect of pH on the maillard reaction of [(13)C₅] xylose, cysteine, and thiamin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 1552–1556.
- Cerny, C., & Davidek, T. (2003). Formation of aroma compounds from ribose and cysteine during the Maillard reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(9), 2714–2721.
- Chan, F. & Reineccius, G. A. (1994). Kinetics of the formation of methional, dimethyl disulfide, and 2-acetylthiophene via the Maillard reaction. In *Sulfur Compounds in Food (Vol. 564, pp. 127–137)*. American Chemical Society.
- Chawla, S. P., & Chander, R. (2004). Microbiological safety of shelf-stable meat products prepared by employing hurdle technology. *Food Control*, *15*(7), 559-563.
- Chen, Y., & Ho, C. T. (2002). Effects of carnosine on volatile generation from Maillard reaction of ribose and cysteine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(8), 2372-2376.
- Corpet, D. E. (2011). Red meat and colon cancer: Should we become vegetarians, or can we make meat safer? *Meat Science*, *89*, 310–316.
- Cross, C. K., & Ziegler, P. (1965). A Comparison of the Volatile Fractions from Cured and Uncured Meat. *Journal of Food Science*, *30*(4), 610-614.
- Darriet, P., Tominaga, T., Lavigne, V., Boidron, J. N., & Dubourdieu, D. (1995). Identification of a powerful aromatic component of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon wines: 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. *Flavour and Fragrance Journal*, *10*(6), 385-392.
- De Gonzalez, M. T. N., Osburn, W. N., Hardin, M. D., Longnecker, M., Garg, H. K., Bryan, N. S., & Keeton, J. T. (2012). Survey of Residual Nitrite and Nitrate in Conventional and Organic/Natural/Uncured/Indirectly Cured Meats Available at Retail in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(15), 3981-3990.
- DellaValle, C. T., Xiao, Q., Yang, G., Shu, X. O., Aschebrook-Kilfoy, B., Zheng, W., Li, H. L., Ji, B. T., Rothman, N., Chow, W. H., Gao, Y. T., & Ward, M. H. (2014). Dietary nitrate and nitrite intake and risk of colorectal cancer in the Shanghai Women's Health Study. *International Journal of Cancer*, *134*(12), 2917-2926.
- Demeyer, D., Honikel, K., & De Smet, S. (2008). The World Cancer Research Fund report 2007: A challenge for the meat processing industry. *Meat Science*, *80*, 953–959.
- Dineen, N. M., Kerry, J. P., Lynch, P. B., Buckley, D. J., Morrissey, P. A., & Arendt, E. K. (2000). Reduced nitrite levels and dietary alpha-tocopheryl acetate supplementation: effects on the colour and oxidative stability of cooked hams. *Meat Science*, *55*(4), 475-482.
- Dreher, J. G., Rouseff, R. L., & Naim, M. (2003). GC-olfactometric characterization of aroma volatiles from the thermal degradation of thiamin in model orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(10), 3097–3102.

- Dwivedi, Basant K., & Arnold, R. G. (1972). Chemistry of thiamine degradation – Mechanisms of thiamine degradation in a model system. *Journal of Food Science*, 37.
- EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to food (ANS) . Statement on nitrites in meat products. EFSA Journal 2010; 8(5):1538 [12 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2010.1538; Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal
- Elmore, J. S., Mottram, D. S., Enser, M., & Wood, J. D. (1999). Effect of the polyunsaturated fatty acid composition of beef muscle on the profile of aroma volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1619–1625.
- Estevez, M., Ventanas, S., & Heinonen, M. (2011). Formation of Strecker aldehydes between protein carbonyls - alpha-Aminoadipic and gamma-glutamic semialdehydes - and leucine and isoleucine. *Food Chemistry*, 128, 1051–1057.
- Estevez, M., Ventanas, S., Ramirez, R., & Cava, R. (2004). Analysis of volatiles in porcine liver pates with added sage and rosemary essential oils by using SPME-GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16), 5168-5174.
- Epley, R. J., Addis, P. B., Warthesen, J. J., & Service, M. E. (1992). *Nitrite in Meat*: Minnesota Extension Service, University of Minnesota.
- Evers, W., Heinsohn, H. H., Jr., Mayers, B. J., & Sanderson, A. (1976). Furans substituted at the three position with sulfur. In Charalambous and Katz (Eds.), *Phenolic, sulfur, and nitrogen compounds in food flavors*, ACS, New York, pp. 184–193.
- Ferguson, L. R. (2010). Meat and cancer. *Meat Science*, 84, 308–313.
- Farmer, L. J., & Mottram, D. S. (1990). Interaction of lipid in the maillard reaction between cysteine and ribose – The effect of a triglyceride and 3 phospholipids on the volatile products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 53(4), 505–525.
- Filippi, J. J., Fernandez, X., & Duñach, E. (2007). Les composés volatils soufrés en chimie des arômes. *Sciences des Aliments*, 27(1), 23–46.
- Finkgremmels, J., Dresel, J., & Leistner, L. (1991). Use of monascus extracts as an alternative to nitrite in meat-products. *Fleischwirtschaft*, 71(10), 1184-1186.
- Frankel, E. N. (1991). Review. Recent advances in lipid oxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 54, 495–511.
- Ganhao, R., Estevez, M., & Morcuende, D. (2011). Suitability of the TBA method for assessing lipid oxidation in a meat system with added phenolic-rich materials. *Food Chemistry*, 126(2), 772-778.
- Gemert, L. J. & van Nettenbreijer, A. H. (1977). *Compilation of odour threshold values in air and water*. Netherlands, National Institute for Water Supply; Netherlands, Central Institute for Nutrition & Food Research TNO: Voorburg, Netherlands; National Institute for Water Supply. Zeist, Netherlands; Central Institute for Nutrition & Food Research TNO.
- Garcia, M., Beldarrain, T., Fornaris, L., & Diaz, R. (2011). Partial substitution of nitrite by chitosan and the effect on the quality properties of pork sausages. *Ciencia E Tecnologia De Alimentos*, 31(2), 481-487.
- Gonzalez, B., & Diez, V. (2002). The effect of nitrite and starter culture on microbiological quality of "chorizo" - a Spanish dry cured sausage. *Meat Science*, 60(3), 295-298.
- Gray, J. I., & Pearson, A. M. (1984). Cured Meat Flavor. In E. M. M. C.O. Chichester & B. S. Schweigert (Eds.), *Advances in Food Research*, vol. Volume 29 (pp. 1-86): Academic Press.

- Gray, J. I. & Pearson, A. M. (1994). Lipid-derived off-flavours in meat – Formation and inhibition. In *Flavor of meat and meat products* (Blackie Academic and Professional ed., pp. 129–131). London – Glasgow – Weinheim – New York – Tokyo – Melbourne – Madras: Shahidi, F.
- Greenwood, D. A., Beadle, B. W., & Kraybill, H. R. (1943). stability of thiamine to heat: (ii) effect of meat-curing ingredients in aqueous solutions and in meat. *Journal of Biological Chemistry*, 149(2), 349-354.
- Grever, A. B. G., & Ruiter, A. (2001). Prevention of Clostridium outgrowth in heated and hermetically sealed meat products by nitrite - a review. *European Food Research and Technology*, 213(3), 165-169.
- Grosch, W., & Zeilerhilgart, G. (1992). Formation of meat-like flavor compounds. *ACS Symposium Series*, 490, 183–192.
- Guillard, A.-S., Le Quere, J.-L., & Vendevre, J.-L. (1997). Emerging research approaches benefit to the study of cooked cured ham flavour. *Food Chemistry*, 59(4), 567-572.
- Hamm, U. (2007). Consumer acceptance of organic sausages produced without curing agents. *Fleischwirtschaft*, 87(11), 126-130.
- Hennel, L. (1966). Le salage - La fabrication des jambons. In *Pratique et technique en Charcuterie* (pp. 405–469). Paris: L'ami du charcutier.
- Hincelin, O., Ames, J. M., Apriyantono, A., & Elmore, J. S. (1992). The effect of xylose on the generation of volatiles from heated thiamine. *Food Chemistry*, 44(5), 381–389.
- Ho, C. T., Oh, Y. C., & Bae-Lee, M. (1994). The Flavour of pork. In F. Shahidi (Ed.), *Flavour of meat and meat products* (pp. 38–51). Glasgow: Blackie Academic and Professional.
- Hofmann, T., & Schieberle, P. (1995). Evaluation of the key odourants in a thermally treated solution of ribose and cysteine by aroma extract dilution techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2187–2194.
- Hofmann, T., Schieberle, P., & Grosch, W. (1996). Model studies on the oxidative stability of odor-active thiols occurring in food flavors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(1), 251-255.
- Hofmann, T., & Schieberle, P. (1998). Quantitative model studies on the effectiveness of different precursor systems in the formation of the intense food odourants 2-furfurylthiol and 2-methyl-3-furanthiol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 235–241.
- Honikel, K. O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science*, 78, 68–76.
- Hustad, G. O., Cerveny, 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. *Appl Microbiol*, 26(1), 22-26.
- IFIP. (2010). Etude de l'impact des conditions de salage-salaison et de traitement thermique sur la formation et la stabilité de la couleur de produits cuits (jambons) ou étuvés (poitrines et lardons). *IFIP, INAPORC*.
- Im, S., Hayakawa, F., & Kurata, T. (2004). Identification and sensory evaluation of volatile compounds in oxidized porcine liver. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(2), 300-305.
- Jeremiah, L. E., Ball, R. O., Uttaro, B., & Gibson, L. L. (1996). The relationship of chemical components to flavor attributes of bacon and ham. *Food Research International*, 29(5-6), 457-464.

- Kim, Y. J., Jin, S. K., Park, W. Y., Kim, B. W., Joo, S. T., & Yang, H. S. (2010). The Effect Of Garlic Or Onion Marinade On The Lipid Oxidation And Meat Quality Of Pork During Cold Storage. *Journal of Food Quality*, 33, 171-185.
- Kondjoyan, N. & Berdagué, J. L. (1996). *A compilation of relative retention indices for the analysis of aromatic compounds*. (Laboratoire Flaveur ed.) Clermont-Ferrand: Laboratoire Flaveur, INRA.
- Konopka, U. C., Guth, H., & Grosch, W. (1995). Potent odorants formed by lipid-peroxidation as indicators of the warmed-over flavor (wof) of cooked meat. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, 201(4), 339-343.
- 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.
- Leonhardt, M., & Wenk, C. (1997). Variability of selected vitamins and trace elements of different meat cuts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10, 218–224.
- Linseisen, J., Rohrmann, S., Norat, T., Gonzalez, C. A., Iraeta, M. D., Gómez, P. M., Chirlaque, M.-D., Pozo, B. G., Ardanaz, E., Mattisson, I., Pettersson, U., Palmqvist, R., Guelpen, B. V., Bingham, S. A., McTaggart, A., Spencer, E. A., Overvad, K., Tjønneland, A., Stripp, C., Clavel-Chapelon, F., Kesse, E., Boeing, H., Klipstein-Grobusch, K., Trichopoulou, A., Vasilopoulou, E., Bellos, G., Pala, V., Masala, G., Tumino, R., Sacerdote, C., Del Pezzo, M., Bueno-de-Mesquita, H. B., Ocke, M. C., Peeters, P. H., Engeset, D., Skeie, G., Slimani, N., & Riboli, E. (2006). Dietary intake of different types and characteristics of processed meat which might be associated with cancer risk – results from the 24-hour diet recalls in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Public Health Nutrition*, 9(04), 449-464.
- Loeppky, R. N. (1994). Nitrosamine and *N*-nitroso compound chemistry and biochemistry – advances and perspectives. *Nitrosamines and Related N-Nitroso Compounds*, 553, 1–18.
- Luecke, F.-K. (2008). Manufacture of meat products without added nitrite or nitrate - quality and safety aspects. In D. V. Karklina, P. R.;Vokk, R.;Verhe, R.;Lucke, F. K.;Kuka, P.;Rukshan, L.;Shleikin, A. (Ed.), *The 3rd Baltic Conference On Food Science And Technology*, (pp. p41-45). Jelgava, Latvia.
- Lynch, P. L. M., & Young, I. S. (2000). Determination of thiamine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 881(1–2), 267-284.
- Macdonald, B., Gray, J. I., Stanley, D. W., & Osborne, W. R. (1980a). Role Of Nitrite In Cured Meat Flavor - Sensory Analysis. *Journal of Food Science*, 45(4), 885-888.
- Macdonald, B., Gray, J. I., Kakuda, Y., & Lee, M. L. (1980b). Role of nitrite in cured meat flavor - chemical-analysis. *Journal of Food Science*, 45(4), 889-892.
- Macdonald, B., Gray, J. I., & Gibbins, L. N. (1980c). Role of nitrite in cured meat flavor - antioxidant role of nitrite. *Journal of Food Science*, 45(4), 893-897.
- McKnight, G. M., Smith, L. M., Drummond, R. S., Duncan, C. W., Golden, M., & Benjamin, N. (1997). Chemical synthesis of nitric oxide in the stomach from dietary nitrate in humans. *Gut*, 40(2), 211-214.
- Mercier, Y., Gatellier, P., & Renerre, M. (2004). Lipid and protein oxidation in vitro, and antioxidant potential in meat from Charolais cows finished on pasture or mixed diet. *Meat Science*, 66, 467–473.
- Mercier, Y., Gatellier, P., Viau, M., Remignon, H., & Renerre, M. (1998). Effect of dietary fat and vitamin E on colour stability and on lipid and protein oxidation in turkey meat during storage. *Meat Science*, 48(3-4), 301-318.
- Milkowski, A., Garg, H. K., Coughlin, J. R., & Bryan, N. S. (2010). Nutritional epidemiology in the context of nitric oxide biology: A risk-benefit evaluation for dietary nitrite and nitrate. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*, 22(2), 110-119.

- Miller, C. D., & Work, S. H. (1946). Thiamine content of raw and cooked pork tissues from pigs of known dietary history. *Journal of animal science*, 5(4), 350-357.
- Min, B., Cordray, J. C., & Ahn, D. U. (2010). Effect of NaCl, Myoglobin, Fe(II), and Fe(III) on lipid oxidation of raw and cooked chicken breast and beef loin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 600–605.
- Mottram, D. S. (1994). Some aspects of the chemistry of meat flavour. In F. Shahidi (Ed.), *Flavor of meat and meat products* (pp. 210–230). Glasgow: Blackie Academic and Professional.
- Mottram, D. S. (1998). Flavour formation in meat and meat products: A review. *Food Chemistry*, 62, 415–424.
- Mottram, D. S., SzaumanSzumski, C., & Dodson, A. (1996). Interaction of thiol and disulfide flavor compounds with food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(8), 2349-2351.
- Nanamori, M., Kanatani, R., Kihara, M., Kawahara, K., Hayashi, K., Watanabe, T., et al. (2008). Effects of nitrogen application on malt modification and dimethyl sulfide precursor production in two Japanese barley cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 1464–1471.
- Nissen, L. R., Byrne, D. V., Bertelsen, G., & Skibsted, L. H. (2004). The antioxidative activity of plant extracts in cooked pork patties as evaluated by descriptive sensory profiling and chemical analysis. *Meat Science*, 68(3), 485-495.
- Paelinck, H., & Szczepaniak, S. (2005). New strategies for the preservation of cooked ham. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 14(Suppl.1), 37-40.
- Parthasarathy, D. K., & Bryan, N. S. (2012). Sodium nitrite: The "cure" for nitric oxide insufficiency. *Meat Science*, 92(3), 274-279.
- Pegg, R. B., Fisch, K. M., & Shahidi, F. (2000). The replacement of conventional meat curing with nitrite-free curing systems. *Fleischwirtschaft*, 80(5), 86-89.
- Polenski, E. (1891). Über den Verlust welchen das Rindfleisch und Nährwert durch das Pokeln erleidet, sowie über die Veränderungen Salpeterhaltiger pokel. *Ken. Arb. Kais. Gesundh*(7), 471.
- Przybylski, R., Lee, Y. C., & Eskin, N. A. M. (1998). Antioxidant and radical-scavenging activities of buckwheat seed components. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 75(11), 1595-1601.
- Ramarathnam, N., Rubin, L. J., & Diosady, L. L. (1991). Studies On Meat Flavor .1. Qualitative And Quantitative Differences In Uncured And Cured Pork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(2), 344-350.
- Ramarathnam, N., Rubin, L. J., & Diosady, L. L. (1993). Studies On Meat Flavor .3. A Novel Method For Trapping Volatile Components From Uncured And Cured Pork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(6), 933-938.
- Sebranek, J. G., & Bacus, J. N. (2007). Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: What are the issues? *Meat Science*, 77, 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.
- Shahidi, F. (1989). Flavor of cooked meats. *ACS Symposium Series*, 388, 188–201.
- Shahidi, F., & Pegg, R. B. (1994). Hexanal as an indicator of the flavor deterioration of meat and meat-products. *Lipids in Food Flavors*, 558, 256–279.
- Shahidi, F., Yun, J., Rubin, L. J., & Wood, D. F. (1987). The Hexanal Content As An Indicator Of Oxidative Stability And Flavor Acceptability In Cooked Ground Pork. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal-Journal De L Institut Canadien De Science Et Technologie Alimentaires*, 20(2), 104-106.

- Sindelar, J. J., Cordray, J. C., Sebranek, J. G., Love, J. A., & Ahn, D. U. (2007). Effects of varying levels of vegetable juice powder and incubation time on colour, residual nitrate and nitrite, pigment, pH, and trained sensory attributes of ready-to-eat uncured ham. *Journal of Food Science*, 72, S388–S395.
- Sindelar, J. J., & Milkowski, A. L. (2011). Sodium nitrite in processed meat and poultry meats: A review of curin and examining the risk and benefit of its use. *American Meat Science Association White Paper Series No. 3*, 1–14.
- Sofos, J. N., Busta, F. F., & Allen, C. E. (1979). Botulism control by nitrite and sorbate in cured meats - review. *Journal of Food Protection*, 42(9), 739-770.
- Stevens, S. S. (1957). On the psychophysical law. *Psychological Review*, 153–181.
- Sun, W. Q., Zhang, Y. J., Zhou, G. H., Xu, X. L., & Peng, Z. Q. (2010). Effect Of Apple Polyphenol On Oxidative Stability Of Sliced Cooked Cured Beef And Pork Hams During Chilled Storage. *Journal of Muscle Foods*, 21(4), 722-737.
- Szczepaniak, S., Paelinck, H., & Gyselinck, C. (2005). New generation of natural anti-microbial products for the preservation of cooked ham. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 14(Suppl.1), 107-110.
- Tai, C. Y., & Ho, C. T. (1997). Influence of cysteine oxidation on thermal formation of maillard aromas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(9), 3586–3589.
- Tang, S., Kerry, J. P., Sheehan, D., Buckley, D. J., & Morrissey, P. A. (2001). Antioxidative effect of added tea catechins on susceptibility of cooked red meat, poultry and fish patties to lipid oxidation. *Food Research International*, 34(8), 651-657.
- Théron, L., Tournayre, P., Kondjoyan, N., Abouelkaram, S., Santé-Lhoutellier, V., & Berdague, J. L. (2010). Analysis of the volatile profile and identification of odour- active compounds in Bayonne ham. *Meat Science*, 85, 453–460.
- Thomas, C., Mercier, F., Tournayre, P., Martin, J.-L., & Berdagué, J.-L. (2013). Effect of nitrite on the odourant volatile fraction of cooked ham. *Food Chemistry*, 139(1–4), 432-438.
- Thomas, C., Mercier, F., Tournayre, P., Martin, J.-L., & Berdagué, J.-L. (2014). Identification and origin of odorous sulfur compounds in cooked ham. *Food Chemistry*, 155(0), 207-213.
- Tominaga, T., & Dubourdiou, D. (2006). A novel method for quantification of 2-methyl-3-furanthiol and 2-furanmethanethiol in wines made from *Vitis vinifera* grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(1), 29-33.
- Tominaga, T., Murat, M. L., & Dubourdiou, D. (1998). Development of a method for analyzing the volatile thiols involved in the characteristic aroma of wines made from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(3), 1044-1048.
- Tompkin, R. B., Christiansen, L. N., & Shaparis, A. B. (1977). Variation in inhibition of c-botulinum by nitrite in perishable canned comminuted cured meat. *Journal of Food Science*, 42(4), 1046-1048.
- Tournayre, P. & Berdagué, J. L. (2003). AcquiSniff (Version 6.5.5) [Computer software]. IDDN.FR.001.210006.002.RP.2003.000.30000: INRA. Available from <http://www.4.inra.fr/cepia_eng/You-are-looking-for/Platforms-and-tools/Softwares/AcquiSniff>.
- Verkleij, T. J., Stekelenburg, F. K., & Stegeman, D. (2006). Effects of reducing the amount of nitrite in organic meat products. In D. Troy, R. Pearce, B. Byrne & J. Kerry (Eds.), *52nd International congress of meat science and technology : harnessing and exploiting global opportunities*, (pp. 483-484). Wageningen: Wageningen Academic Publishers.
- Wang, R., Yang, C., & Song, H. (2012). Key meat flavour compounds formation mechanism in a glutathione–xylose Maillard reaction. *Food Chemistry*, 131(1), 280–285.

- 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.
- Werkhoff, P., Bruning, J., Emberger, R., Guntert, M., Kopsel, M., Kuhn, W., et al. (1990). Isolation and characterization of volatile sulfur-containing meat flavor components in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3), 777-791.
- Whitfield, F. B., & Mottram, D. S. (1999). Investigation of the reaction between 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone and cysteine or hydrogen sulfide at pH 4.5. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1626-1634.
- Wojciak, K. M., Karwowska, M., & Dolatowski, Z. J. (2014). Use of acid whey and mustard seed to replace nitrites during cooked sausage production. *Meat Science*, 96(2), 750-756.
- 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.
- Yaylayan, V. A., & Keyhani, A. (1999). Origin of 2,3-pentanedione and 2,3-butanedione in D-glucose/L-alanine maillard model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3280-3284.
- Yen, G. C., Chen, H. Y., & Peng, H. H. (1997). Antioxidant and pro-oxidant effects of various tea extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(1), 30-34.
- Zhang, X., Kong, B. H., & Xiong, Y. L. L. (2007). Production of cured meat color in nitrite-free Harbin red sausage by *Lactobacillus fermentum* fermentation. *Meat Science*, 77(4), 593-598.
- Zheng, Y., Brown, S., Ledig, W. O., Mussinan, C., & Ho, C. T. (1997). Formation of sulfur-containing flavor compounds from reactions of Furaneol and cysteine, glutathione, hydrogen sulfide, and alanine/hydrogen sulfide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 894-897.

Annexes

Des analyses concernant de façon plus indirecte notre sujet de recherche ont été réalisées et les résultats ont été ajoutés en annexe. Ces analyses traitent :

- de l'évaluation de la couleur dans les jambons non nitrités et enrichis en extraits végétaux
- des analyses microbiologiques de contrôle réalisées sur les jambons préalablement à leur dégustation.
- d'analyses sensorielles réalisées sur des formulations réalisées à l'échelle pilote industrielle
- de l'évaluation du pouvoir antioxydant intrinsèque des extraits végétaux d'acérola, de thé vert, d'oignon et de canneberge par les méthodes FRAP et DPPH.

(Annexe I, II, IV, et VII).

La fabrication industrielle du jambon cuit ainsi que les mécanismes réactionnels mis en jeu dans la formation du 2-méthyl-3-furanethiol à partir de la thiamine ou à partir de la cystéine ont été détaillés (Annexe III, V et VII).



Figure 1. Mini-jambons réalisés à partir des extraits d'acérola, de pépin de raisin, de pomme, d'oignon, de thé vert et de canneberge, utilisés aux doses indiquées pour 100 g de saumure.

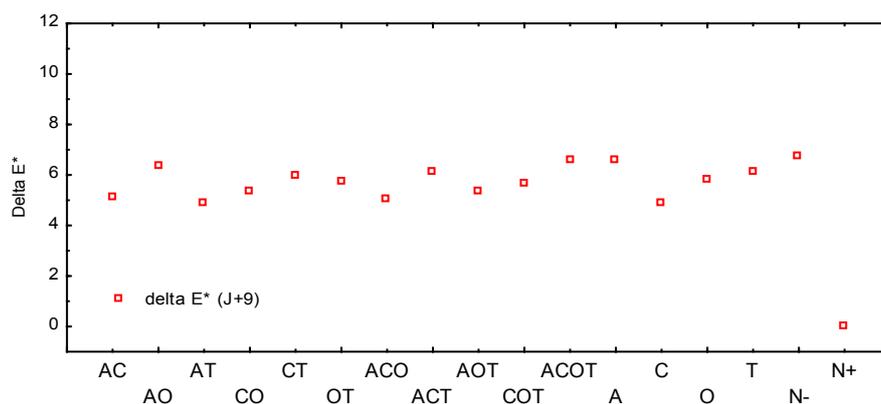
Annexe I : Evaluation de la couleur dans des jambons enrichis en extraits végétaux.

La valeur ΔE^* permet de quantifier un « écart de couleur » entre un produit et un produit de référence. Dans cette étude, nous avons calculé l'écart de couleur entre les jambons x non nitrités et enrichis en extraits végétaux et le jambon nitrité de référence N^+ grâce à la formule :

$$\Delta E^* = \sqrt{(L_{N^+}^* - L_x^*)^2 + (a_{N^+}^* - a_x^*)^2 + (b_{N^+}^* - b_x^*)^2}$$

où L^* , a^* , b^* sont les composantes moyennes d'une couleur dans le système CIE Lab avec L^* la clarté, a^* la position de la couleur sur l'axe « vert-rouge » et b^* la position de la couleur sur l'axe « bleu-jaune ».

Il est admis qu'une différence de couleur, dans ce cas entre un jambon x et un jambon nitrité N^+ , est perçue par l'œil humain à partir d'une valeur $\Delta E^* > 3$. Les mesures de couleur ont été réalisées à J+9, à l'intérieur des mini-jambons, et la valeur ΔE^* a été calculée afin de comparer les couleurs des mini-jambons enrichis en extraits végétaux ou seulement non nitrité N^- à la couleur d'un jambon nitrité.



La valeur ΔE^* doit être comprise entre 0 et 3 pour que la couleur des jambons enrichis en extrait soit confondue avec celle de la référence N^+ . L'ajout d'extraits végétaux a permis d'améliorer légèrement la couleur à l'intérieur des jambons par rapport à une formulation sans nitrite et sans extrait puisque $\Delta E^*_{N^-/N^+} = 6,7$ tandis qu'en moyenne, la valeur ΔE^* entre un jambon enrichi en extraits et le jambon N^+ est de 5,2. L'extrait de canneberge possède une couleur rouge/violette très intense, mais utilisé à ces concentrations, il ne permet pas d'obtenir la coloration rose d'un jambon cuit nitrité. La différence de couleur entre les jambons non nitrités enrichis en extraits n'est pas très importante ($4,7 < \Delta E^* < 6,7$) mais est perceptible par le consommateur et reste un obstacle à l'acceptabilité et à la vente de ces produits.

Annexe II : Analyses microbiologiques de contrôle préalables à la dégustation des mini-jambons

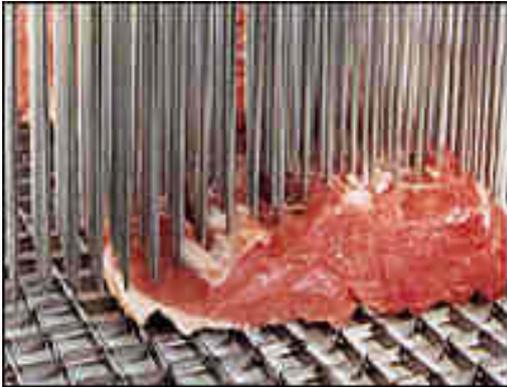
Des analyses microbiologiques ont été réalisées à J+1, J+15 et J+35 sur une partie des échantillons dégustés (chapitre II-2). Les trois critères à respecter pour que la sécurité microbiologique des jambons cuits soit satisfaisante sont :

- à J +35 le logarithme de la flore totale (FT) doit être inférieure à 6
- à J +35 le rapport « flore totale (FT)/flore lactique (FL)» doit être inférieur à 100
- à J0 le total des entérobactéries doit être inférieur à 50.

		Flore totale	Flore Lactique	Entérobactérie	FT/FL
J+1	N+	1,00E+01	<10	<10	
J+15	N+	<10	5,00E+01	<10	
J+35	N+	<10	9,00E+01	<10	< 100
J+1	ACT	1,00E+01	<10	<10	
J+15	ACT	<10	<10	<10	
J+35	ACT	<10	<10	<10	< 100
J+1	ACO	3,00E+01	<10	4,80E+01	
J+15	ACO	2,00E+01	<10	1,00E+01	
J+35	ACO	<10	<10	1,00E+01	< 100
J+1	AOT	<10	1,00E+01	<10	
J+15	AOT	1,00E+01	1,00E+01	1,00E+01	
J+35	AOT	<10	<10	<10	< 100
J+1	AOT	<10	3,00E+01	<10	
J+15	AOT	1,00E+01	1,00E+01	<10	
J+35	AOT	<10	3,00E+01	<10	< 100
J+1	ACOT	<10	<10	1,00E+01	
J+15	ACOT	1,00E+01	<10	<10	
J+35	ACOT	<10	3,00E+01	4,00E+01	< 100
J+1	N-	<10	<10	<10	
J+15	N-	<10	<10	<10	
J+35	N-	1,00E+01	<10	<10	< 100

Toutes les formulations ont respecté les trois critères microbiologiques et en conséquence, elles ont pu être dégustées en sécurité.

Annexe III : Procédé de fabrication du jambon cuit



(1)

Le saumurage des différents muscles composant le jambon cuit peut être réalisé par immersion, procédé plutôt artisanal durant plusieurs semaines, ou bien par injection (1).

La saumure est composée majoritairement d'eau (75%), de sel nitraté à 0,6% (18%) mais aussi de sucre, d'aromates et d'épices (7%).



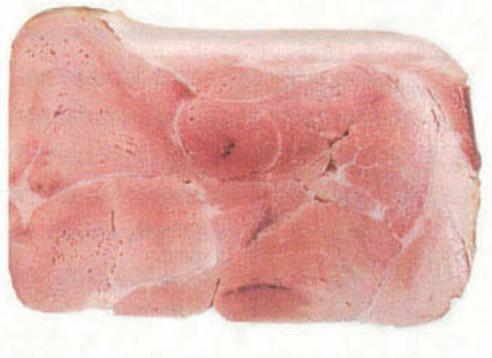
(2)

Les muscles saumurés sont ensuite malaxés sous vide à 4°C pendant plusieurs heures afin d'assurer une bonne répartition de la saumure (2).



(3)

La viande saumurée est compactée dans des moules (3) et cuite selon un barème de cuisson assez long (environ 10-12h) à une température inférieure 70 °C. Cette étape permet d'assurer la bonne cohésion entre les différents muscles et de faciliter ultérieurement le tranchage (4).



(4)

Les informations concernant la composition du jambon cuit et ses qualités nutritionnelles peuvent être consultées sur le site de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (<https://pro.anses.fr/TableCIQUAL/index.htm>).

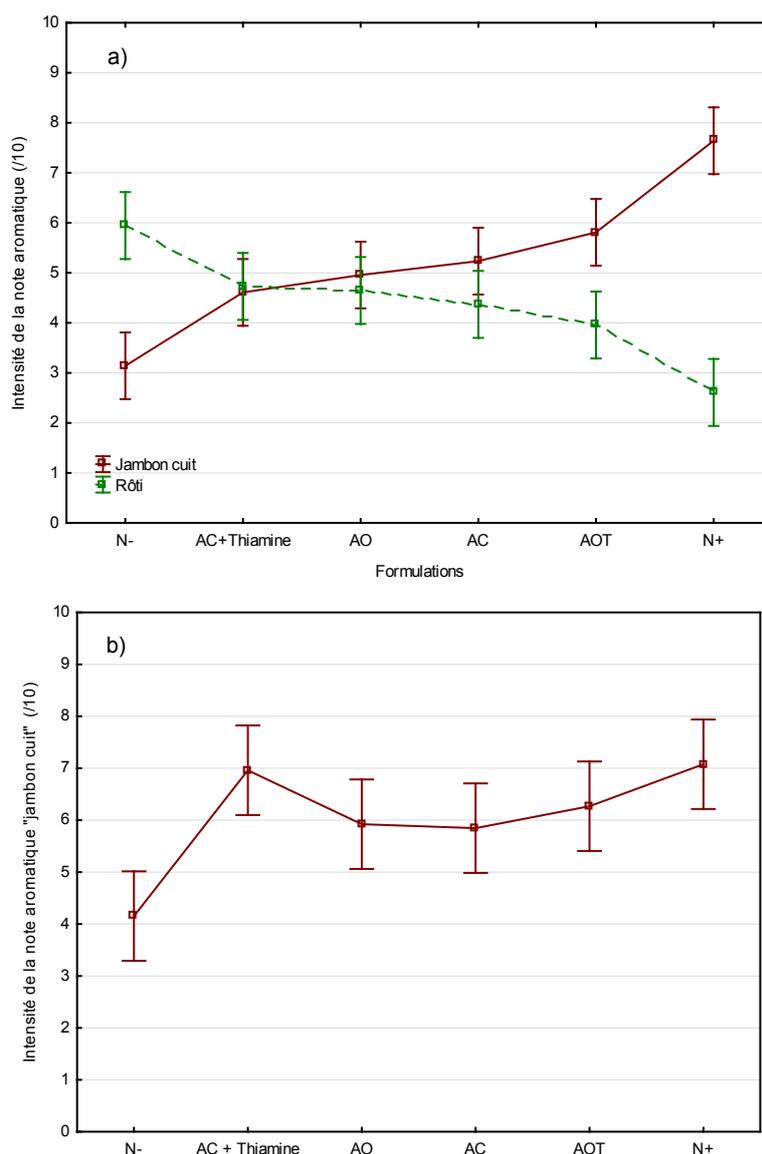


Figure 1. Effet des extraits antioxydants et de la thiamine sur l'intensité de l'arôme « jambon cuit ».

- La figure 1a) présente les résultats des analyses sensorielles des jambons cuits réalisés à l'échelle pilote par la société « Fleury-Michon ». Ces analyses ont été conduites indépendamment par les 4 partenaires (IFIP, Diana Naturals, Fleury-Michon et INRA) de l'étude selon un protocole commun. L'effet « Formulation », c'est-à-dire l'effet du nitrite et des extraits végétaux, utilisés seuls ou en mélange avec la thiamine, sur l'intensité de la note « jambon cuit », a été étudié selon le modèle d'ANOVA : $ArJC_{i,j,k} = \mu + F_i + J_j + \varepsilon_k$ (avec $ArJC$ = arôme de « Jambon cuit », μ = effet moyen, F_i = effet « Formulation » (avec 6 niveaux), J_j = effet « Juge » (46 niveaux) et ε_k = variance résiduelle ($n = 1$ répétition)). Pour chaque formulation, la moyenne et l'intervalle de confiance du modèle sont présentés sous forme de moustaches).

- La figure 1b) reprend (pour les formulations concernées) les résultats déjà décrits dans le chapitre II-3 des analyses sensorielles des mini-jambons modèles élaborés en laboratoire et analysés par l'INRA.

Les abréviations « AC », « AC+Thiamine », « AO », « AOT », « N- » et « N+ » correspondent respectivement aux mélanges d'extraits « Acérola + Canneberge », « Acérola + Canneberge + Thiamine », « Acérola + Oignon », « Acérola + Oignon + Thé » et aux deux références « non nitrifiée » et « nitrifiée ».

Annexe IV : Evaluation de l'arôme de fabrications pilotes de jambons cuits par les partenaires du projet (Diana Naturals, Fleury-Michon, IFIP, INRA)

Parmi les formulations expérimentales étudiées dans la partie II-3, six ont été réalisées à l'échelle pilote industrielle sur le site du partenaire Fleury-Michon : « acérola + canneberge », « acérola + oignon », « acérola + oignon + thé » et finalement « acérola + canneberge + thiamine » ainsi que les deux formulations de référence nitritée « N+ » et non nitritée « N- ». Ces résultats ayant été obtenus assez tardivement ils n'ont pu être présentés qu'en annexe.

1. Protocole expérimental

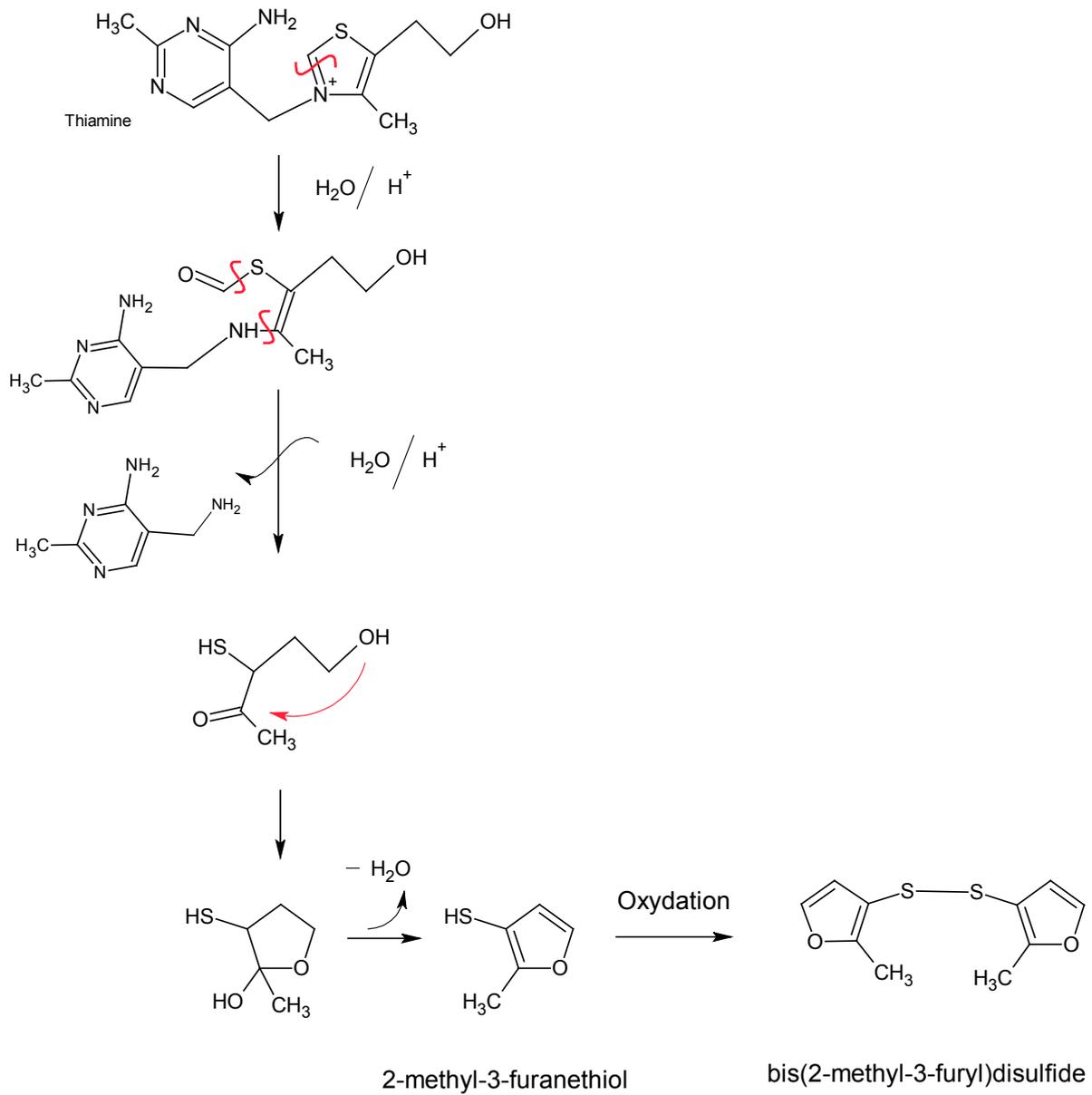
La composition des saumures employées pour ce passage à l'échelle pilote industrielle est détaillée dans le Tableau 1 du chapitre II-3 (p. 86). Les formulations initialement établies pour des jambons de 1 kg ont été adaptées à la fabrication de jambons cuits de 4 kg. La fabrication des 6 pains de jambons de 4 kg, correspondant aux 6 recettes étudiées, a été réalisée selon le protocole habituel et confidentiel de l'entreprise Fleury-Michon. Après 5 jours de maturation, les pains de jambon ont été tranchés et conditionnés sous barquette plastique sous vide. Ils ont été dégustés 2 semaines après leur fabrication. Les analyses sensorielles ont été organisées sur les différents sites selon le même protocole de présentation et de dégustation que dans les chapitres II-2 et II-3. Six tranches de jambon cuit ont donc été proposées aux juges (entre 9 et 21 juges selon les sites) selon des ordres de présentation différents. Pour chacune des recettes dégustées, les juges devaient à la fois évaluer l'intensité de la note aromatique « jambon cuit » et l'intensité de la note aromatique « rôti de porc » sur deux échelles distinctes et graduées de 0 à 10. Les analyses se déroulaient sous lumière rouge afin de masquer au mieux la différence entre la couleur du jambon nitrité et celle des jambons non nitrités. Les juges ont été sélectionnés selon leurs capacités à différencier le jambon nitrité et le jambon non nitrité et les notes obtenues ont été traitées statistiquement.

2. Résultats

L'apport d'extraits végétaux, avec ou sans ajout de thiamine, permet d'augmenter l'intensité de la note aromatique (ArJC) « jambon cuit » et de diminuer la note indésirable (ArR) « rôti de porc » (Figure 1).

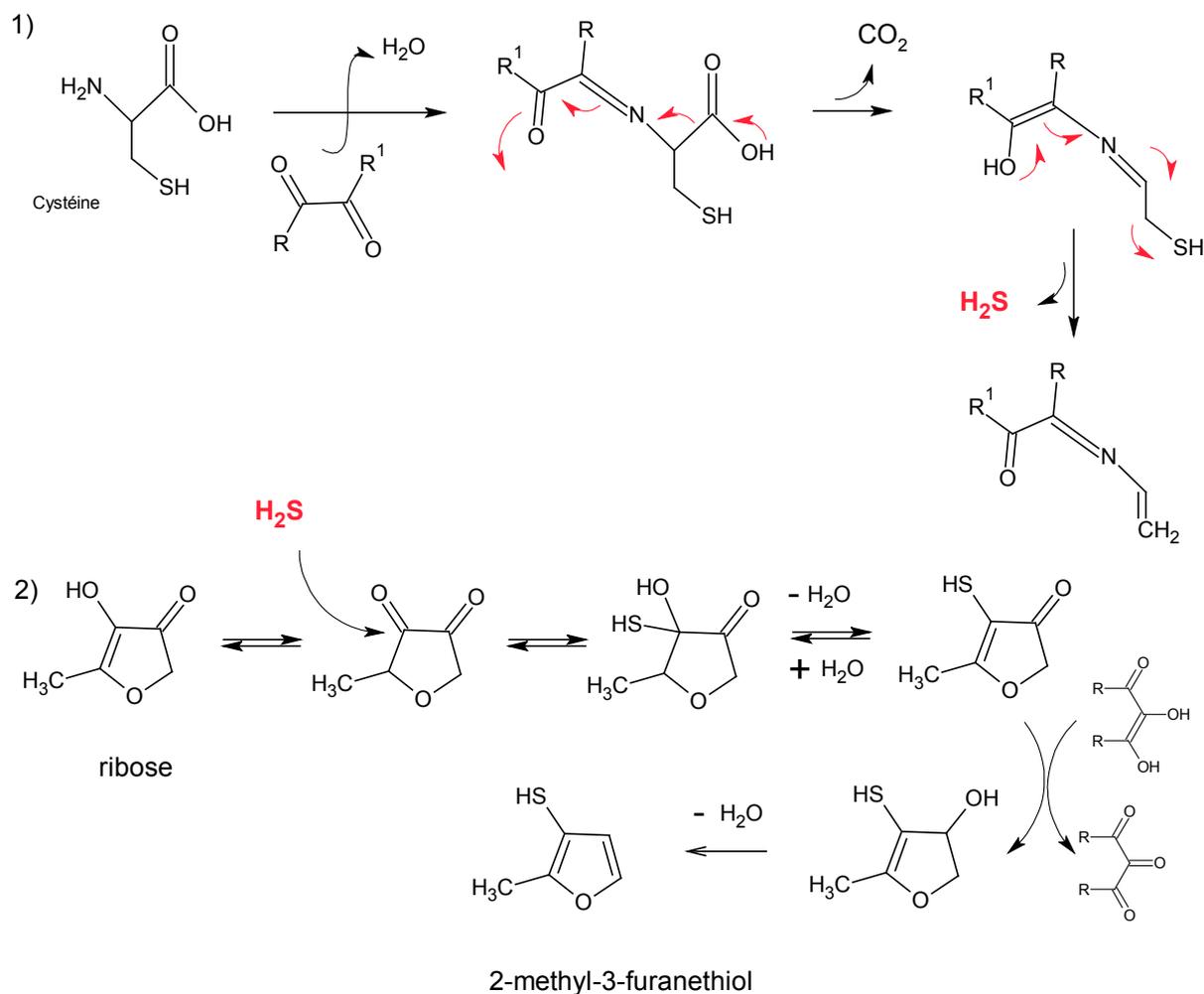
Les deux notes « jambon cuit » et « rôti de porc » semblent parfaitement anti-corrélées aux vues des notes obtenues. La note « ArJC » est de 5,2/10 en moyenne grâce à l'ajout des extraits végétaux, soit une augmentation de plus de 2 points sur 10 par rapport à la formulation non nitritée de référence. Malgré tout, cette amélioration n'est pas suffisante pour atteindre l'intensité aromatique du jambon cuit nitrité qui est de 7,6/10. Cette différence a d'ailleurs été perçue par le même jury sensoriel lors d'analyses triangulaires réalisées parallèlement aux analyses d'évaluation de l'arôme. Tous ces résultats (Figure 1 p112) corroborent ceux obtenus dans des mini-jambons modèles fabriqués en laboratoire dans le chapitre II-3 (Figure 4, p. 88).

Annexe V : Formation du 2-méthyl-3-furanthiol à partir de la thiamine



(Belitz, H. D., & Grosch, W., 1999 ; Filippi, J. J., Fernandez, X., & Duñach, E., 2007; Cerny, C., 2007)

Annexe VI : Formation du 2-méthyl-3-furanthiol à partir de la cystéine



1) Dégradation de la cystéine et libération de sulfure d'hydrogène

2) Réaction entre le ribose et le sulfure d'hydrogène pour former le 2-méthyl-3-furanthiol.

(Belitz, H. D., & Grosch, W., 1999 ; Cerny, C., Dvidek, T., 2003)

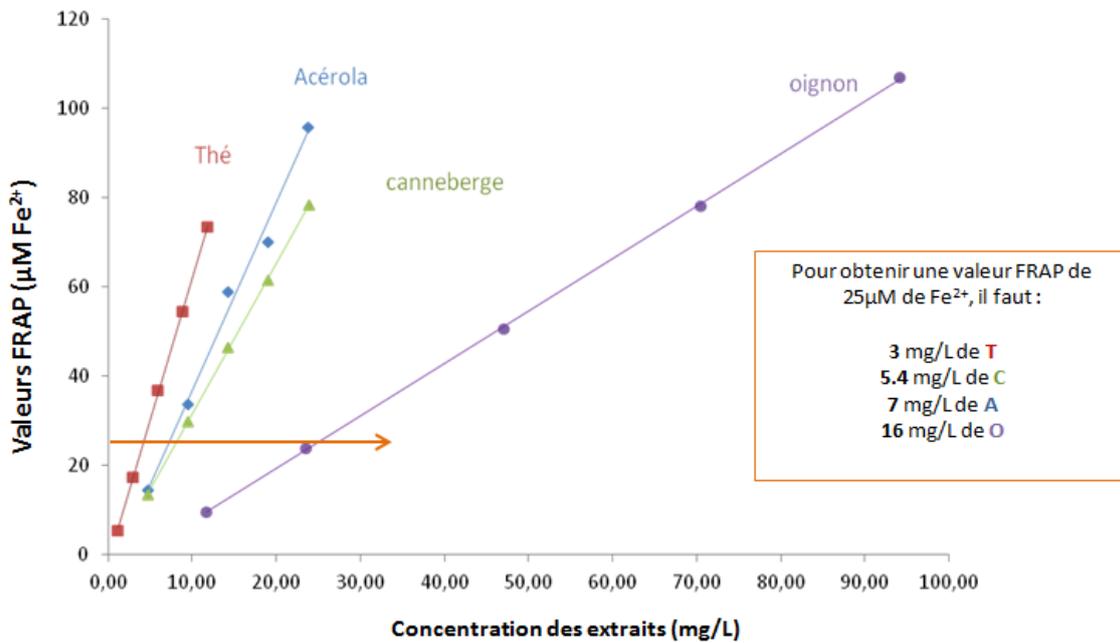


Figure 1. Evaluation de la capacité des extraits d'acérola, de canneberge, de thé et d'oignon à réduire le fer. Leur pouvoir réducteur est comparé à celui d'une solution de Fe²⁺ et est donc exprimé en concentrations de Fe²⁺ (en µM) équivalentes.

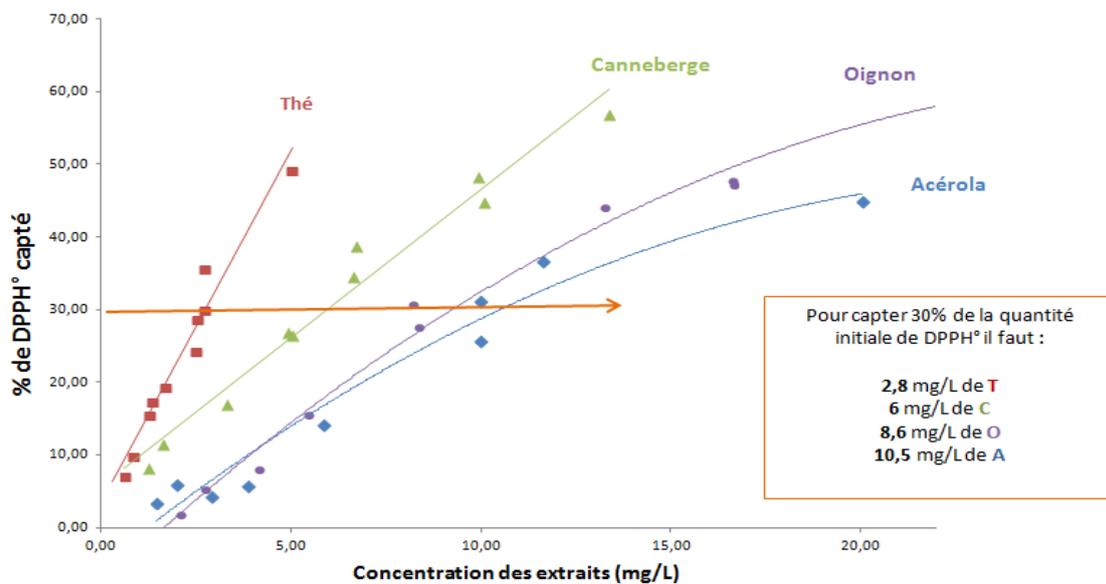


Figure 2. Evaluation de la capacité des extraits d'acérola, de canneberge, de thé et d'oignon à piéger des radicaux libres. Leur capacité de piégeage est exprimée en % de DPPH° piégé pour une concentration de DPPH° initiale donnée.

Annexe VII : Evaluation des propriétés antioxydantes intrinsèques des extraits végétaux d'acérola, de canneberge, d'oignon et de thé vert.

Dans les chapitres II-2 et II-3, les propriétés antioxydantes des extraits végétaux ont été évaluées, de façon « indirecte », dans une matrice spécifique, grâce à l'évaluation de l'état d'oxydation des mini-jambons cuits par les mesures TBARS.

Les méthodes FRAP (Fer Reducing Antioxydant Power) et DPPH (relative au radical 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl = DPPH°, utilisé dans cette technique) permettent d'évaluer les propriétés antioxydantes intrinsèques aux extraits végétaux et de déterminer leur(s) type(s) d'action antioxydante.

1. Méthode FRAP

La méthode FRAP permet d'estimer le pouvoir réducteur d'un extrait antioxydant par spectrophotométrie ; c'est sa capacité à réduire l'ion ferrique Fe^{3+} en ion ferreux Fe^{2+} qui est évaluée selon la méthode décrite par Benzie and Strain (1996). Les résultats obtenus pour les extraits sont comparés aux résultats obtenus pour une solution référence très réductrice de Fe^{2+} . C'est pourquoi les résultats sont exprimés en « efficacité équivalente à celle d'une solution contenant y μ moles de Fe^{2+} ». L'extrait de thé vert est environ deux fois plus réducteur que les extraits d'acérola et de canneberge et cinq fois plus que l'extrait d'oignon.

2. Méthode DPPH

La méthode DPPH permet d'évaluer la capacité d'un extrait à piéger les radicaux libres et donc de stopper les réactions radicalaires en chaînes constituant l'oxydation lipidique. A partir d'une quantité donnée de DPPH°, un radical stable, la quantité de DPPH° qui a été piégée par l'extrait antioxydant est déterminée par spectrophotométrie, selon la méthode décrite par Morales and Jimenez-Perez (2001). L'extrait de thé vert est un piègeur de radicaux environ deux fois supérieur à l'extrait de canneberge et trois à quatre fois supérieur aux extraits d'acérola ou d'oignon.

3. Relation entre les méthodes DPPH/FRAP et TBARS

Aucune relation n'a pu être établie entre les résultats obtenus par FRAP ou par DPPH et les résultats obtenus par la méthode TBARS. Il a seulement été constaté qu'un extrait performant en termes de réduction et/ou de piégeage radicalaire, comme les extraits de thé vert et de canneberge, constitue un antioxydant performant dans la matrice « jambon cuit ». Par contre un antioxydant performant dans le jambon cuit peut aussi agir selon d'autres mécanismes que la réduction ou le piégeage des radicaux, c'est le cas du nitrite par exemple.

Liste de communications

Revue scientifique internationale de rang A

1. THOMAS, C., MERCIER, F., TOURNAYRE, P., MARTIN, J.-L., & BERDAGUÉ, J.-L. (2013). Effect of nitrite on the odourant volatile fraction of cooked ham. *Food Chemistry*, 139(1–4), 432-438.
2. THOMAS, C., MERCIER, F., TOURNAYRE, P., MARTIN, J.-L., & BERDAGUÉ, J.-L. (2014). Identification and origin of odorous sulfur compounds in cooked ham. *Food Chemistry*, 155(0), 207-213.
3. THOMAS, C., MERCIER, F., TOURNAYRE, P., MARTIN, J.-L., & BERDAGUÉ, J.-L. (2015). Effect of added thiamine on the key odourant compounds and aroma of cooked ham. *Food Chemistry*, 173, 790-795.

Participation à des Congrès internationaux

4. THOMAS C., MARTIN J.L., MERCIER F., TOURNAYRE P., BERDAGUÉ J.L., 2013. Effect of thiamine and cysteine addition on the formation of the key sulfur odorants of cooked ham. Book of abstracts edited by Hamit Köksel, www.eurofoodchemxvii.org. pp 627. EUROFOODCHEM XVII, 07-10 may 2013, Istanbul, Turkey. (Texte intégral + Poster)
5. THOMAS C., VENDEUVRE J.L., A.S. GUILLARD, J. SUDRON, MERCIER F., TOURNAYRE P., FUCHSMANN P., BREME K., BERDAGUÉ J.L., 2013. Volatile sulfur compounds and cooked ham aroma. Book of abstracts Edited by Hamit Köksel, www.eurofoodchemxvii.org, pp 626. EUROFOODCHEM XVII, 07-10 may 2013, Istanbul, Turkey. (Texte intégral + Poster). Lauréate du 1er prix du poster EUROFOODCHEM XVII.
6. THOMAS C., MERCIER F., TOURNAYRE P., RATEL J., BERDAGUÉ J.L., 2014. Identification of volatile sulphur compounds of cooked ham by GCxGC-TOFMS, GC-MS/80 and GC-GCMS/O. 38th International Symposium on Capillary Chromatography and 11th GCxGC Symposium, 18-23 May 2014, Riva del Garda, Italy (Résumé + Poster).
7. THOMAS C., MERCIER F., TOURNAYRE P., BERDAGUÉ J.L., 2014. Effect of thiamine addition on the production of odourant sulfur compounds in relation with cooked ham aroma. 14th Weurman Flavour Research Symposium, 15-19 September 2014. Queens' College, Cambridge, United Kingdom. (Texte intégral + Poster).

Vulgarisation

8. INRA-Science & Impact. Département Caractérisation et Élaboration des Produits Issus de l'Agriculture. Recherches et Innovations : pour l'aliment et les bioproduits, 2014. « L'arôme sans nitrite dans le jambon cuit... »
Contacts : Jean-Louis BERDAGUÉ et caroline THOMAS.

Animation scientifique

9. Journée de l'Ecole Doctorale (JED 2012). Présentation d'un poster intitulé « Nitrite et arôme du jambon cuit », Thomas C., Tournayre P. et Berdagué J.L., Clermont-Ferrand (24-25 Mai 2012).

Enseignement

10. THOMAS C. : Cours de chimie analytique des composés volatils des aliments aux BTS Anabiotec. Institut des Sciences et Vie de la Terre du Puy-en-Velay (43000). Novembre 2013 et 2014.

