PARTE III

LA TIROSINA EN EL JAMON CURADO

CAPITULO I

LAS PINTAS BLANCAS

J. ARNAU y J. A. GARCIA-REGUEIRO

1.1 Descripción

En la masa muscular del jamón aparecen con frecuencia unos agregados de color blanco y apariencia yesosa (parecidos a pequeños granos de arroz), de distribución irregular y tamaño variable. Su presencia puede crear en ocasiones suspicacias al consumidor, al ser confundido con triquina, sarcosporidios o cisticercos en fase de calcificación.

Según Silla y col. (1985) y Comi y col. (1981), estos agregados están compuestos por cristales de tirosina.

La presencia de cristales de tirosina es bien conocida en jamones de larga curación: jamón serrano de cerdo ibérico y jamón de Parma. En general cuanto mayor es el tiempo de curación, mayor es el porcentaje de jamones con pintas blancas, aunque pueden observarse ocasionalmente en jamones con tiempos de curación menores de 5 meses.

Normalmente la presencia de cristales de tirosina de tamaño grande suele aceptarse como un síntoma de calidad. No obstante en ocasiones se observa la presencia de un elevadísimo número de gránulos de tirosina de pequeño tamaño, que desmejora notablemente la presentación del jamón. En los análisis sensoriales, los catadores diferencian las muestras con y sin cristales de tirosina y manifiestan preferencia por las muestras de jamón que contienen cristales de tirosina grandes (Silla y col. 1985).

La presencia de cristales de tirosina no es un fenómeno exclusivo del jamón curado, puesto que se observa su presencia en queso de larga maduración, en pollos almacenados durante períodos prolongados, y en tripas saladas que conservan la parte mucosa del intestino.

En otros productos como el vino, se observa un aumento de tirosina al final del proceso de fermentación, siendo atribuida por algunos autores a una autolisis sufrida por las levaduras y/o a la posible fermentación maloláctica.

1.2 Causas

Sobre el origen de la tirosina en el músculo del jamón, existen diversas teorías.

A) *Proteolisis enzimática tisular*

Esta teoría está basada en el hecho de que las catepsinas cuando son liberadas de los lisosomas son capaces de actuar sobre las proteínas musculares desnaturalizadas.

La tirosina liberada como consecuencia de este proceso proteolítico precipita debido a que su punto isoeléctrico es 5,63, el cual está muy cercano al intervalo de pH en el que suele estar el jamón (5, 6-6, 4), y además porque es poco soluble en agua.

El contenido de tirosina en el jamón curado es, según Butz (1974), de 6,1 μ moles/gramo, lo cual es varias veces superior a la solubilidad de la L-tirosina en agua a 23 °C (2.51 μ moles/g ó 0.454 mg/g).

Sin embargo la L-tirosina precipita seguramente en concentraciones inferiores a 2.5 μ mol/g ya que la humedad es muy baja (menor al 60 %) y existe sal y proteínas disueltas en agua.

Si la concentración de sal en la fase acuosa es de un 10 %, la solubilidad de la L-tirosina es aproximadamente 1,91 μ moles/g ó 0,345 mg/g. Esto indica que la L-tirosina está presente en el jamón, por encima de su nivel de solubilidad en la fase acuosa.

Melo (1974), encontró que la actividad enzimática de una preparación de catepsinas purificadas de jamón fresco, era inhibida en un 30 y 70 % mediante la adición de un 5 y 10 % de sal respectivamente. Asimismo, la producción de aminoácidos ácidos y neutros parece quedar ligeramente más inhibida que la de los aminoácidos básicos, y la tirosina es un aminoácido neutro.

La inhibición de la actividad catepsínica puede utilizarse como un método para prevenir la acumulación excesiva de L-tirosina libre. La concentración de sal es importante durante el envejecimiento cuando las temperaturas son favorables a la actividad catepsínica.

Tanto en jamón fresco como en curado, se ha observado la presencia de catepsinas A y D. Parris y Bailey (1966), determinaron que la catepsina D era la catepsina mayoritaria en el jamón fresco y en el lomo, mientras que la actividad de las catepsinas A, B y C era apenas detectable.

Kazakova (1972) encontró que la catepsina D del hígado de rata, rompe sustratos de bajo peso molecular en los enlaces glicil-leucina adyacentes a residuos aromáticos. Esta especificidad puede explicar la gran cantidad de aminoácidos ácidos y neutros presentes en los jamones, dado que la catepsina A (una exopeptidasa) tiene restringida su actividad a péptidos degradados previamente por la catepsina D. Los aminoácidos básicos se encuentran en poca cantidad, probablemente debido a que la catepsina B, parecida a la tripsina, es minoritaria en los músculos del jamón.

Otros autores apuntan la posibilidad de que el origen de la tirosina sea debido a que durante las primeras etapas del proceso, se produzca un aumento considerable de la tirosina libre como consecuencia de la acción prematura de enzimas proteolíticos. Estos enzimas se liberan rápidamente de los lisosomas cuando se produce un descenso rápido del pH en la canal, fenómeno que se presenta en animales que han sufrido un fuerte stress...

B) *Proteolisis enzimática microbiana y síntesis aminoacídica microbiana*

Se ha comprobado que durante el proceso de maduración del jamón existe un incremento de la flora microbiana con capacidad de hidrolizar las proteínas. En concreto, la actividad proteolítica de las levaduras se ha puesto de evidencia tanto sobre proteínas vegetales como animales. Artioli (1952) puso de manifiesto una cierta correlación entre la flora blastomicética y la producción de tirosina libre en el músculo del jamón.

Sin embargo, Zeetti (1937) aisló de un jamón numerosas colonias de blastomicetos; tras su examen se identificaron algunas especies pertenecientes al género *Debaryomyces*. Las pruebas efectuadas no mostraron ninguna relación entre aquellos y los depósitos de tirosina, concluyendo que el aislamiento de *Debaryomyces* no tiene nada que ver con la formación de depósitos de tirosina, lo que le indujo a postular que se trataba de un fenómeno de tipo autolítico.

Posteriormente, Giolitti y Mascherpa (1970) criticaron tales conclusiones basándose en tres hechos:

a) Los acúmulos de tirosina tienen lugar en determinados puntos del producto, mientras que de ser cierta la teoría autolítica, parecería razonable esperar una distribución homogénea en la masa del mismo.

b) Sólo precipita la tirosina y no otros aminoácidos también escasamente solubles.

c) Los depósitos tienen unos porcentajes de tirosina superiores al contenido medio que sería de esperar.

Así pues, estos autores se inclinan por la teoría que responsabiliza a la síntesis aminoacídica microbiana de la aparición de los acúmulos de tirosina. Su hipótesis descansa en varios trabajos científicos anteriores y de entre ellos cabe citar los siguientes:

Gilvarg y Bloch (1950) llevaron a cabo experimentos para constatar la producción de tirosina y fenilalanina por parte de varias levaduras. A tal fin utilizaron sustratos en base a glucosa y acetato, cada uno marcado con ^{14}C, para poder observar la distribución isotópica en el «pool» aminoacídico celular .

Los resultados obtenidos demostraron que la cadena lineal de la tirosina, y de la fenilalanina, proviene de la condensación de dos unidades de 3 átomos de carbono, derivados de algunos metabolitos intermediarios de la glicolisis, y por tanto de la glucosa marcada añadida al medio. El acetato es utilizado en pequeña cantidad.

Con el mismo objetivo, Ory y Lymas hicieron crecer *Lactobacillus arabinosus* en presencia de glucosa marcada con ^{14}C y $^{13}CO_2$. La tirosina aislada de estas células mostró un contenido de carbono marcado equivalente al de la glucosa usada en el sustrato. Esto confirmó que algunos átomos de carbono de la tirosina derivan de la glucosa.

Gurof e Ito (1965) observaron la adaptación de algunas células de *Pseudomonas* a diferentes sustratos, teniendo como única fuente de carbono tirosina, fenilalanina y asparagina marcadas y estudiaron su incorporación en la proteína celular. Estos microorganismos pueden utilizar la fenilalanina para producir tirosina y pueden incluir a ésta fácilmente en su propio material proteico.

Friedman (1968) amplió dichos estudios y determinó que la capacidad que tienen algunas especies de *Pseudomonas* de producir tirosina partiendo de sustratos con glutamato, para-hidroxifenilpiruvato y alternativamente fenilalanina y glicerol, no tiene lugar por simple hidroxilación, sinó que requiere una transaminación entre los precursores mencionados.

Recientemente, Comi (1981) ha aislado especies de *Debaryomyces, Torulopsis* y *Trichosporon* en el jamón de Parma, que son capaces de sintetizar tirosina. Una parte de la tirosina sintetizada difunde al exterior y otra permanece en el interior de la célula hasta que se produce la lisis celular. El número de células vivas aislado en cada cristal es muy bajo y la causa de la muerte celular podría ser atribuida a una ruptura de la membrana plasmática, provocada por un shock de tipo osmótico, debido a un excesivo almacenamiento de tirosina. En los cristales de tirosina, en los que se aislaron colonias, aparecen en observación microscópica diversos restos de células lisadas.

El hecho de que los cristales de tirosina estén localizados en el tejido conectivo intramuscular sugiere la idea de que las levaduras en cuestión utilizan los hidratos de carbono que contiene el tejido conectivo. De hecho los constituyentes principales de los mucopolisacáridos, ácido hialurónico y condriotin, son derivados de la glucosa y galactosa y por tanto pueden ser asimilados por estas levaduras, de acuerdo con los estudios anteriormente citados de Gilvarg y Bloch.

Comi, estudió asimismo, la posibilidad de que las especies aisladas de los gránulos de tirosina, y que son capaces de sintetizarla, pueden también hidrolizar las proteínas del jamón y liberar así tirosina. Es decir, intenta averiguar si también los enzimas hidrolíticos intervienen en la producción de tirosina. Para ello aisló de la tripa de embutidos maduros diversas especies de blastomicetos capaces de atacar la proteína. Las levaduras capaces de hacerlo, pertenecen a los géneros *Debaryomyces, Saccharomyces, Candida, Torulopsis* y principalmente *Trichosporon*.

1.3 Resultados

Las pintas del jamón curado están compuestas mayoritariamente por tirosina, tal como puede verse en el espectro RMN transformada por Fourier (Fig. 27) y en el cromatograma (Fig. 28).

En el espectro RMN puede verse el sistema AB de los 4 protones del núcleo fenólico y el sistema ABX de doce bandas, ocho de las cuales están perfectamente definidas y corresponden a los H diastereotópicos $J_{AB} = 11\ H_z$. Las cuatro bandas restantes a $\delta = 4{,}4$ aparecen en forma de montículo. El pico a 1,3 corresponde a ácidos grasos.

El doblete a 1,6 se presenta también en los jamones con velo blanco y sin velo blanco, como se verá en el próximo apartado, debido quizás a la presencia de lactato sódico que se origina tras el sacrificio del animal.

En el cromatograma se observa que el aminoácido mayoritario es tirosina.

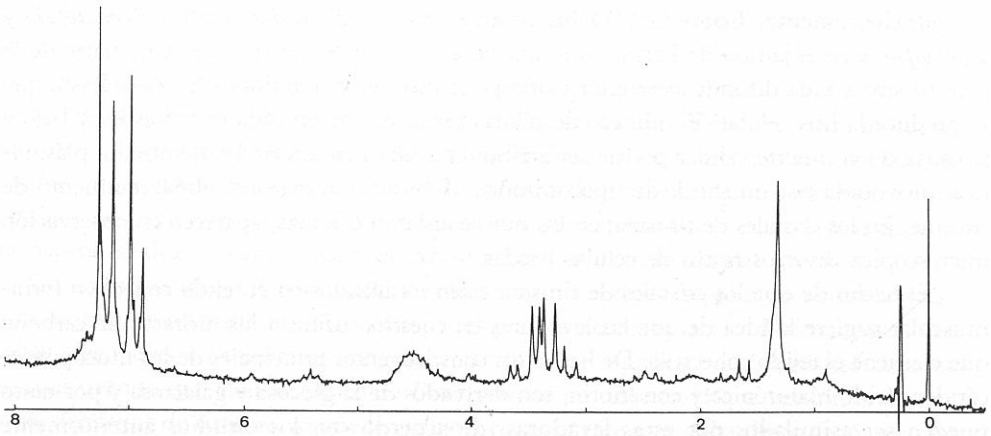


Fig. 27. Espectro RMN transformada de Fourier de pintas blancas.

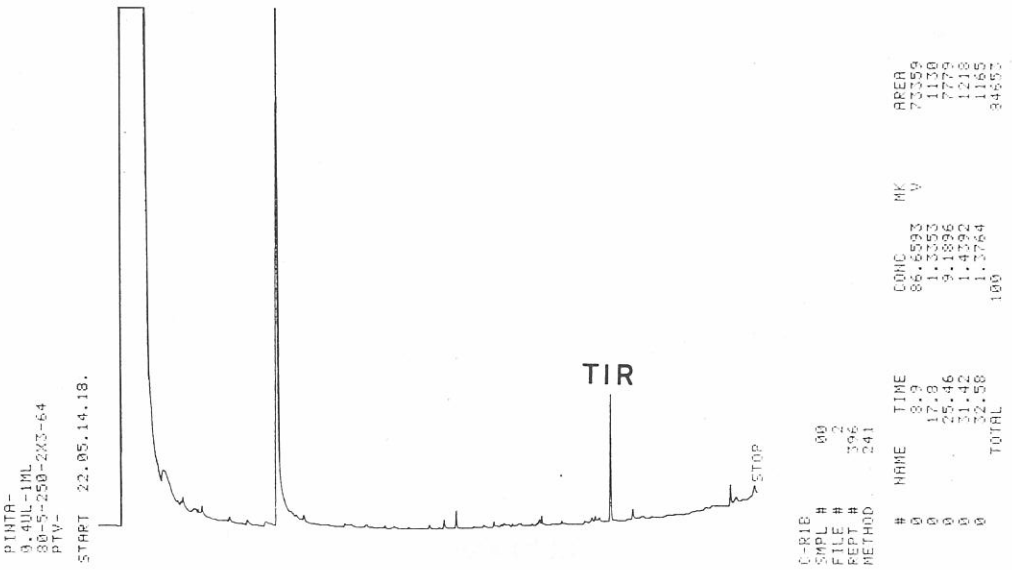


Fig. 28. Cromatograma HRGC de las pintas blancas.

1.4 Conclusiones prácticas

Las pintas de los jamones curados están compuestas principalmente por tirosina, que es un aminoácido presente en las proteínas de lo seres vivos y por tanto no representa ningún peligro para la salud.

La aparición de pintas blancas en jamones curados debe estar relacionada muy probablemente con la formación de velo blanco, alteración que se expone en el próximo apartado.

Tal como se verá en el próximo capítulo, el velo blanco se forma en toda la superficie de corte de la mayoría de los jamones sujetos a un proceso de curación largo, procesos que paralelamente son los que presentan un mayor porcentaje de jamones con pintas.

Los procesos de producción que utilizan bombo de salado, elevadas concentraciones de sal y tiempos de curación cortos, 4 meses, no suelen presentar en tanta cuantía jamones con pintas ni velo blanco. En estos casos la salazón es intensa y acelerada, por tanto los enzimas pueden ver reducida su actividad y la proteolisis es menor, disminuyendo los valores de Nitrógeno no proteico (NNP) y por tanto de aminoácidos libres.

Los jamones que poseen acúmulos de tirosina, presentan generalmente velo blanco y por tanto indican la presencia de una solución sobresaturada de tirosina en el jamón. Esta solución sobresaturada, puede dar lugar con el tiempo a cristales de tirosina que sean perceptibles visualmente. Por tanto en este sentido, las pintas blancas y el velo blanco serían dos manifestaciones distintas de un mismo fenómeno.

En la fotografía se observa la ausencia de velo blanco alrededor de las pintas. Esto es debido a que la tirosina tiene tendencia a formar cristales de mayor tamaño que son más estables termodinámicamente.

PARTE III

LA TIROSINA EN EL JAMON CURADO

CAPITULO II

EL VELO BLANCO EN EL JAMON CURADO ENVASADO AL VACIO

J. ARNAU, J. A. GARCIA-REGUEIRO, M. HUGAS y J. M. MONFORT

2.1 Introducción

Actualmente el jamón curado se comercializa esencialmente en dos formas: como piezas enteras o envasado al vacío en centros y medios.

Las mermas que se producen en los jamones enteros y los frecuentes problemas de ácaros y dípteros a la salida del secadero, que obligan al uso de insecticidas nocivos para el consumidor, han hecho aumentar la proporción de jamones comercializados en envase al vacío.

Sin embargo frente a las ventajas claras que suponen la anulación de las mermas, los problemas de dípteros y coleópteros y la mayor facilidad de corte, se encuentran también importantes inconvenientes: migración de productos del plástico al jamón con la consiguiente pérdida de calidad desde el punto de vista organoléptico, cambios de textura, reblandecimiento de las partes externas, problemas de mantos blancos en superficie, fermentaciones anómalas y pérdidas de vacío por sellado deficiente o desprendimientos de gases.

Actualmente los procesos más comunes que sufren los jamones a envasar al vacío son los siguientes:

1) Los jamones después de un proceso de curación más o menos largo son deshuesados y envasados directamente al vacío.

2) Los jamones son deshuesados en una etapa intermedia del secado y enviados de nuevo al secadero, para que las partes internas pierdan humedad.

3) Los jamones son deshuesados parcialmente antes del salado y en una etapa intermedia del secado son deshuesados totalmente siendo enviados posteriormente al secadero.

En los procesos 2 y 3, generalmente los jamones se recubren con una película plástica líquida (algunas contienen pimaricina) en la zona deshuesada, que solidifica con el tiempo, lo cual hace que las zonas internas del jamón que están aún tiernas, y pueden haberse desgarrado al deshuesar, se vean protegidas de posibles alteraciones de parásitos y de un excesivo desarrollo de hongos. Asimismo la película plástica hace que la deshidratación sea más gradual y no se produzcan encostraduras.

Uno de los defectos más comunes que se presentan en medios jamones envasados al vacío es el del velo blanco. Este se forma en la superficie de corte al cabo de unos pocos días de ser envasado al vacío. Aparece primero en los músculos con más contenido de humedad y se va extendiendo por toda la superficie de corte.

El porcentaje de jamones afectados puede variar y llega a afectar en algunos casos a la mayor parte de la partida.

Dadas las dificultades que supone este defecto para la comercialización y la ausencia de bibliografía sobre el envasado de jamones al vacío, se ha procedido a su estudio tanto en su vertiente físico-química como microbiológica.

2.2 Resultados y discusión

El velo blanco superficial del jamón está constituido básicamente por tirosina, como lo demuestran los espectros RMN, la cromatografía de gases y los ensayos colorimétricos.

En la figura 30A se muestra el espectro RMN en D_2O de la sustancia blanca obtenida mediante raspado de un jamón defectuoso. La figura 30B corresponde a un patrón de tirosina, y la figura 30C al espectro obtenido de un raspado de un jamón normal en la superficie de corte.

El sistema AB que aparece a unos 7 δ es característico de sistemas fenólicos sustituidos en para. Esta señal no aparece en jamones de la misma partida que no presentaban el velo blanco (fig. 30C).

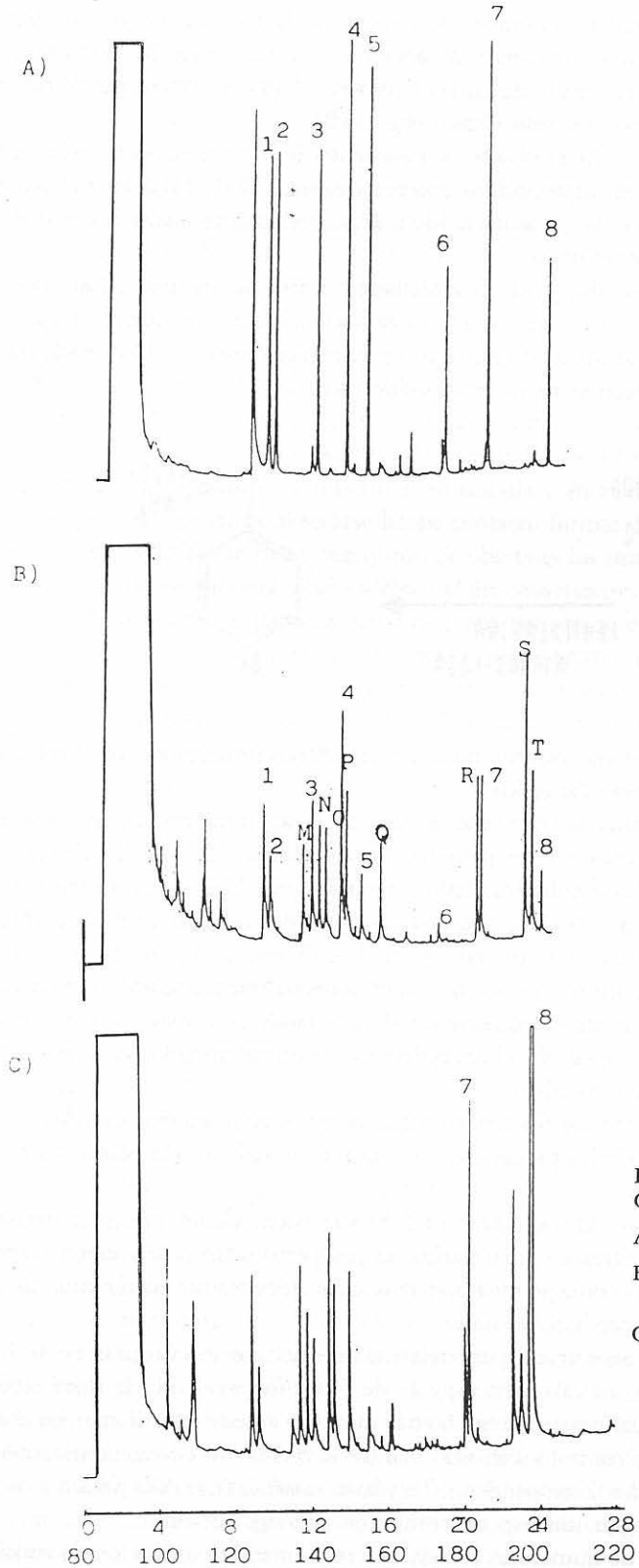
La única objeción que podría presentarse sería que este sistema AB fuera debido a parabenos o productos de migración del plástico. Sin embargo, estos jamones no fueron tratados con este conservante. Además en un estudio anterior sobre conservantes en jamones curados se observó que el éster propílico del ácido p-hidrozibenzoico no penetra prácticamente en el interior del jamón, quedando la mayor parte en superficie. Si el sistema AB fuera debido a productos de migración del plástico, tendrían que presentarse tanto en el jamón normal como en el defectuoso, ya que ambos fueron envasados en el mismo tipo de bolsa.

El doblete ligeramente desdoblado a $\delta = 3,1$, corresponde a los protones diastereotópicos H_A, H_B de la tirosina y el triplete al protón H_X del centro quiral. Los picos a 3,9 y 5,3 corresponde a dos satélites del agua: pico a $\delta = 4,6$.

Realizando el mismo espectro en $DCC1_3$ y TFA con RMN transformada de Fourier observamos análogamente (fig. 31) el sistema AB, y al mismo tiempo el sistema ABX.

Del sistema ABX, cabe esperar 12 bandas, ocho perfectamente definidas correspondientes a los H diastereotópicos, $J_{AB} = 11$ Hz y las cuatro restantes a $\delta = 4,4$. Mediante cromatografía de gases se ha estudiado la composición en tirosina de una muestra que contenía el defecto y otra de control.

Como puede verse en la figura 29C la cantidad de tirosina es considerablemente mayor que en la muestra de control (fig 29B tabla LIII).



1) Alanina
2) Glicina
M) ß-alanina
3) Valina
N) Treonina
O) Serina
4) Leucina
P) Isoleucina
5) Norleucina
Q) Prolina
6) Metionina
R) Asparagina
7) Fenilalanina
S) Glutamina
T) Lisina
8) Tirosina

Fig. 29.
Cromatogramas HRGC de:

A) Patrón de aminoácidos.

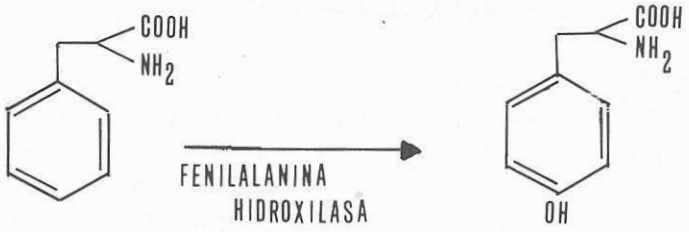
B) Raspado superficial de un jamón control.

C) Raspado superficial de un jamón con velo blanco.

El espectro UV, muestra la banda de absorción de la tirosina en medio ácido (fig. 33A a 280 nm.). En medio básico se observa un marcado efecto batocrómico, es decir, un desplazamiento a longitudes de ondas mayores. El mismo efecto puede observarse en las muestras de jamón con velo blanco (fig. 33B).

En la muestra de velo blanco, se observa un aumento de la proporción relativa de la fenilalanina, respecto a los otros aminoácidos excepto tirosina (Tabla LIII) lo cual puede ser debido a que la fenilalanina es un aminoácido a partir del cual se forma la tirosina, y poseen una gran similitud estructural.

En el organismo la hidroxilación de la fenilalanina a tirosina es irreversible, por lo que, mientras la fenilalanina puede sustituir a la tirosina en la dieta, lo contrario no ocurre. Por esto la fenilalanina es un aminoácido esencial. En la fenilcetonuria, se bloquea la reacción anterior y la tirosina se convierte en aminoácido esencial.



Mascherpa y col. (1970) encontraron también cantidades importantes de tirosina en el queso Parmigiano-Reggiano (Tabla LII).

En cuanto a los recuentos microbianos no se observan diferencias claras entre los jamones que presentan velo blanco y los jamones control (Tablas XLIX y L). Existe una gran variabilidad individual de resultados fácilmente explicable debido a la diversidad de origen de las muestras procedentes de varias fábricas con diferente situación geográfica.

No es factible una comparación de valores medios debido a la gran diversidad de resultados obtenidos, no obstante si comparamos los valores individuales, observamos unas concentraciones de microorganismos totales y de flora halotolerante más elevadas en los jamones que presentan velo blanco. En el resto de parámetros microbiológicos estudiados no se encuentran diferencias apreciables.

La composición cualitativa de flora microbiana en estos jamones deshuesados envasados al vacío es igual a la de las piezas enteras tanto si presentan velo blanco como si no.

Los microorganismos aislados en agar M.R.S. son cocos Gram positivos catalasa negativos y agrupados en parejas y/o tétradas, cuyos perfiles de clasificación (según Buchanan y Gibbons, 1974) corresponden a *Aerococcus* y *Pediococcus*. En ninguna de las colonias repicadas se observaron *Lactobacillus*.

En las placas de agar Sabouraud para recuento de hongos y levaduras no se han aislado hongos (excepto en un caso una especie de *Penicillium*). Toda la flora estaba compuesta por levaduras. Cuantitativamente no hay tampoco en este caso diferencias aceptables y claras entre jamones control y con velo blanco, lo mismo sucede cualitativamente puesto que las especies aisladas corresponden a *Torulopsis candida* (*Candida famata*) en un 100 % de los casos. Siendo ésta una especie común en jamones curados.

Debido a la existencia de numerosas teorías que relacionan la producción de tirosina

con determinadas especies de levaduras, entre ellas *Torulopsis candida* (*Candida famata*), se postuló «a priori» que en la aparición del velo blanco en jamones envasados al vacío tuvieran éstas algo que ver. No obstante y a la vista de los resultados obtenidos no se puede inferir tal conclusión puesto que encontramos *Torulopsis candida* (*Candida famata*) en los dos tipos de jamones y en concentraciones parecidas.

Paralelamente a los análisis de composición, hemos iniciado algunos ensayos en planta piloto, a fin de intentar evitar el problema. Ninguno de los productos químicos aplicados (Tabla LI) ha resultado efectivo. Los diferentes tipos de envasados con diferentes tipos de plásticos e incluso usando atmósferas de CO_2, CO_2/N_2 y N_2 han dado resultados negativos. Unicamente han resultado positivas las pruebas realizadas con películas plásticas de recubrimiento.

Se realizó una prueba con 12 trozos de jamón en que había aparecido anteriormente el velo blanco. A una cara del jamón se le aplicó película plástica y la otra servía como control, una vez seca la película, se envasó al vacío. En los 12 trozos de jamón se observó la aparición de velo blanco en la superficie no tratada y en ninguna de las tratadas.

Las películas plásticas al secarse hacen contacto íntimo con el jamón y evitan que la tirosina pueda salir al exterior y precipitar. Se observan los mismos resultados usando película plástica con pimaricina, ácido sórbico y sin conservante.

De 15 muestras de jamones serranos (zona cercana a articulación femorotibial) con 18 meses de curación, 14 muestras presentaron velo blanco a los 7 días, lo cual indica que en los procesos de larga curación en que existe una intensa proteolisis, se intensifica la aparición de velo blanco. Se observó también la aparición de velo en la superficie de corte de estos 14 jamones sin envasar al vacío, aunque con menor intensidad. Esto nos hace pensar que en la superficie de corte de los jamones enteros también se produce el precipitado de tirosina, siendo confundido en ocasiones con un enmohecimiento.

Este defecto se observa en menor grado al cortar el jamón en lonchas muy finas, lo cual puede ser debido a que la tirosina que existe en una loncha tiene más superficie para precipitar, con lo cual la densidad superficial (mg de tirosina precipitada/cm^2) disminuye.

Se ha realizado un experimento en el que se cortaron 20 lonchas de un mismo jamón, con diferentes grosores. Después de una semana presentaban el aspecto de las fotografías (ver anexo). Puede verse como al aumentar el grosor, aumenta también la cantidad de precipitado.

En otro experimento se cortó un trozo de jamón con velo blanco, de unos 4 cm de espesor, se hizo un corte fino superficial para eliminar el precipitado de tirosina y fue envasado el vacío. Posteriormente apareció el velo blanco. Volvió a eliminarse y así sucesivamente varias veces, comprobando que cada vez disminuía más la cantidad de precipitado. Después de cinco operaciones, cuando el trozo de jamón tenía un espesor de 1 cm, ya no volvió a aparecer más el velo blanco (ni al cabo de 8 meses de envasado), lo cual parece indicar que la concentración de tirosina debía estar en el umbral de solubilidad en el jamón.

En otro experimento se observó la influencia de la congelación en la aparición de velo blanco. Para ello, se congelaron 8 trozos de jamón a −20 °C, en los que teníamos la seguridad que habría velo blanco. A los 15 días no se observó velo blanco en ninguno. Cuatro de ellos se colocaron en una cámara a 1 °C, observándose la formación de precipitado de Tirosina a los 4 días. En los restantes no se observó formación de velo blanco transcurridos los 3 meses, apareciendo al ser descongelados. Por tanto la congelación frena la aparición de velo blanco.

En conversaciones con algunos fabricantes que han colaborado generosamente en el estudio del problema, se nos afirmó que había una mayor incidencia en invierno que en verano, y que una menor temperatura de estufaje hacía disminuir el problema.

En unas pruebas realizadas a nivel industrial, apareció un 10 % de jamones con este problema. Estos jamones, se llevaron al secadero y fueron después envasados al vacío, observándose en este caso una incidencia del 30 %. Una posible explicación a este fenómeno puede ser que, al disminuir la humedad en el jamón por el secado, la tirosina se sobresature más y precipite con mayor facilidad.

Al observar la evolución del proceso de formación del precipitado de tirosina, da la impresión como si el velo blanco procediese del tejido conjuntivo (perimisio y epimisio), lo cual coincide con las observaciones de Mirri (1926) que afirma que se produce a nivel de intersticios entre una fibra muscular y otra.

A nuestro entender esto no implica necesariamente que el origen de la tirosina esté en el tejido conjuntivo, sinó que puede ser simplemente la vía que siga para precipitar en el exterior.

El hecho de que se presente más en unos determinados músculos (generalmente internos), puede ser debido a que en éstos la actividad catepsínica ha sido más intensa, p. ej. el *biceps femoris* tiene en las primera etapas del proceso una actividad de agua muy superior a las zonas superficiales que contienen mayor cantidad de sal y al mismo tiempo se deshidratan, con lo cual disminuye en éstas la actividad catepsínica.

Butz y colaboradores en 1974 realizaron estudios sobre inducción de velo blanco. Observaron que los ácidos grasos libres, cuando se aplican conjuntamente con la tirosina a la superficie de corte aceleran la formación de velo blanco. Esto puede ser debido a las propiedades hidrofóbicas similares entre tirosina y ácidos grasos. Al final del proceso de curación, la grasa externa posee mayor concentración de ácidos grasos libres que la del interior, y es principalmente la grasa externa la que se extiende por encima de la superficie del jamón al cortarlo, acelerando la formación de velo blanco. En experimentos en que sumergían el corte del jamón en aceite de germen de trigo (corn oil), con bajo contenido en ácidos grasos libres, se observó que los triglicéridos no tenían efecto en la formación del velo. Por tanto estos resultados indican que la grasa tiene poco o ningún efecto en su formación, con la excepción de que los ácidos grasos libres puedan aumentar la aparición del velo.

Como se ha visto en el capítulo «pintas blancas», la insolubilidad de la tirosina en agua y el hecho que el pH del jamón sea cercano al punto isoeléctrico de la tirosina, hace que la concentración de tirosina este muy por encima de su solubilidad en agua y provoque la formación del velo blanco.

Quizás una pequeña reducción en la cantidad de tirosina libre producida por la actividad catepsínica, disminuiría la formación de velo, ya que su presencia es variable.

Bartholomew y col. (1977) inyectaron *Pediococcus cerevisiae* a unos jamones, observando que la acidez y formación de velo blanco eran superiores a los controles. El tiempo necesario para producir jamón curado americano «Country Style Ham», puede acortarse por este método, observándose una disminución del pH al principio, y un aumento al transcurrir el tiempo. El ácido-láctico de origen microbiano puede causar la disminución de pH, al actuar los microorganismos sobre la glucosa u otros carbohidratos. El incremento de pH posterior, es debido en parte a la producción de aminoácidos por las catepsinas. Estos autores observaron un incremento significativo del velo entre los 80 y 95 días ($P < 0,05$).

La tirosina es un aminoácido que está presente en las proteínas de los seres vivos, por tanto no representa ningún peligro para la salud, sin embargo la tiramina puede formarse por descarboxilación de la tirosina, la cual sí tiene interés toxicológico y deberían estudiarse las concentraciones que se presentan en los distintos tipos de jamones.

TABLA XLIX: *Recuentos microbiológicos de jamones control*

	F. mesof. total	F. halotolerante	F. ácido-láctica	Anaerobios tot.	Micrococcaceae	hongos y levaduras
C 1	6,41	–	7,34	–	6,20	–
C 2	6,46	–	3,68	–	5,84	–
C 3	5,56	5,67	1,47	7,54	–	4,73
C 4	4,63	4,63	1,87	5,54	–	5,54
C 5	–	5,62	2,69	6,01	5,66	3,39
C 6	–	6,11	1,60	6,20	3,92	2,95
C 7	–	5,34	1,39	4,65	–	3,97
C 8	–	7,91	4,21	–	6,47	3,86

Los resultados están en log cfu/g (unidades formadoras de colonia por gramo).

TABLA L: *Recuentos microbiológicos de jamones con velo blanco*

	F. mesof. total	F. halotolerante	F. ácido-láctica	Anaerobios tot.	Micrococcaceae	hongos y levaduras
VB 1	7,92	–	7,93	–	6,47	–
VB 2	5,51	–	6,13	–	4,77	–
VB 3	6,90	6,96	1,00	4,82	–	5,47
VB 4	6,43	6,57	1,69	6,38	–	5,39
VB 5	–	7,14	4,31	6,55	6,72	3,14
VB 6	–	6,16	2,00	–	6,25	3,36
VB 7	–	6,24	1,00	3,00	5,89	4,35
VB 8	–	5,63	1,74	3,00	5,53	4,96

Los resultados están expresados en log cfu/g.

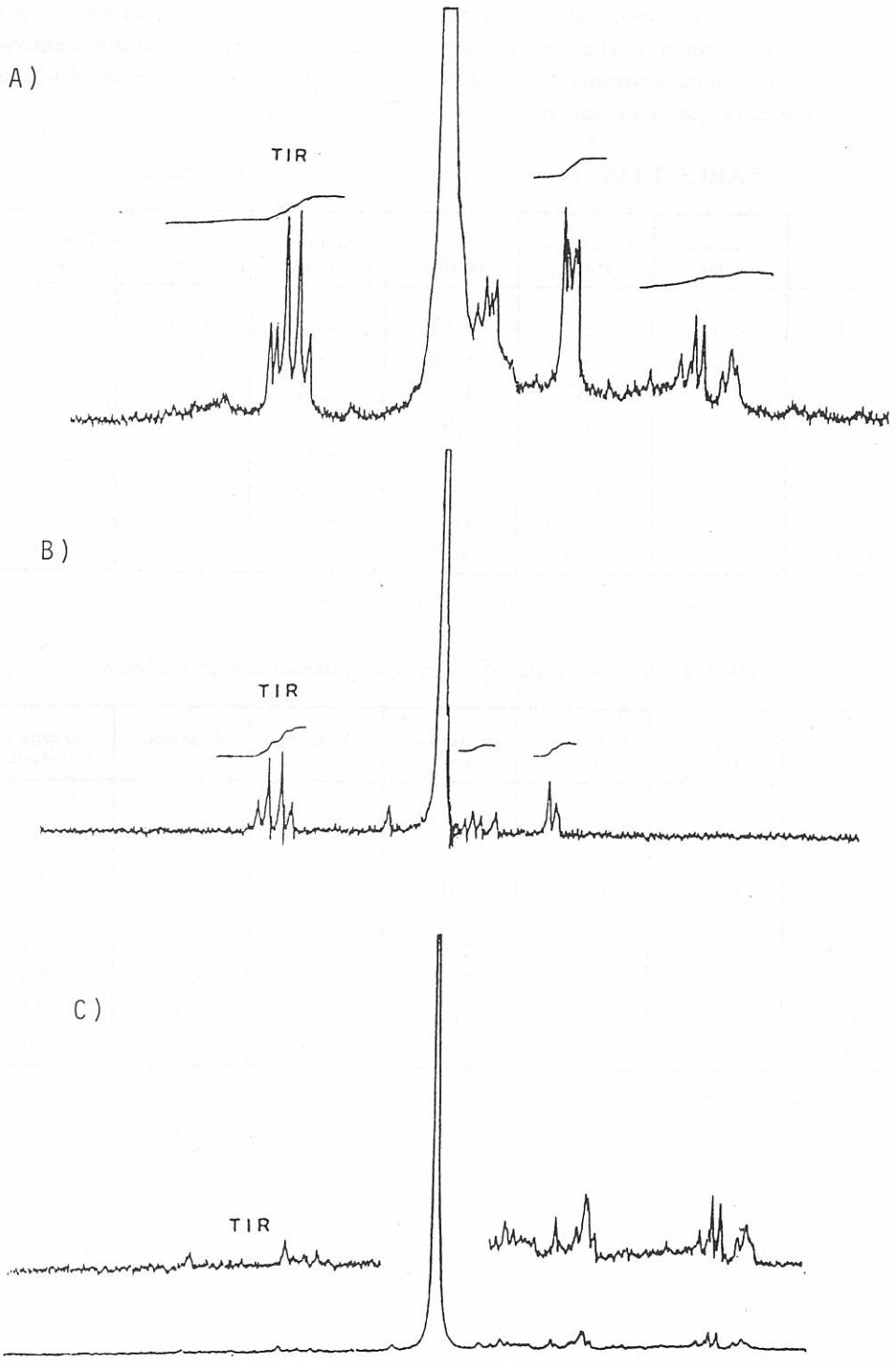


Fig. 30. Espectro RMN D_2O de:
A) Raspado superficial de jamón con velo blanco.
B) Patrón de tirosina.
C) Raspado superficial de jamón control.

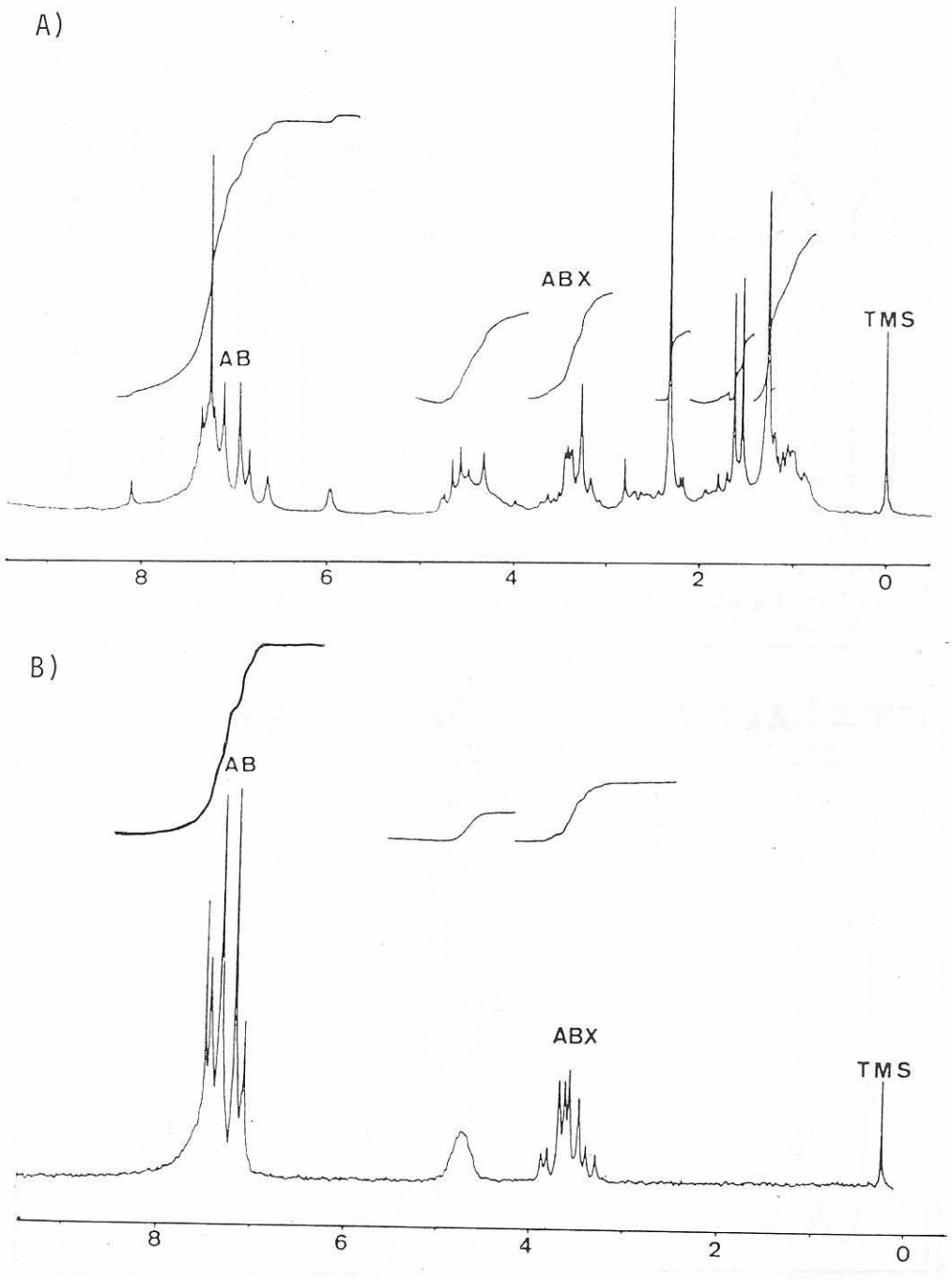


Fig. 31. Espectro RMN transformada de Fourier en $DCCL_3$/TFA de:
A) Raspado superficial de jamón con velo blanco.
B) Patrón de Tirosina.

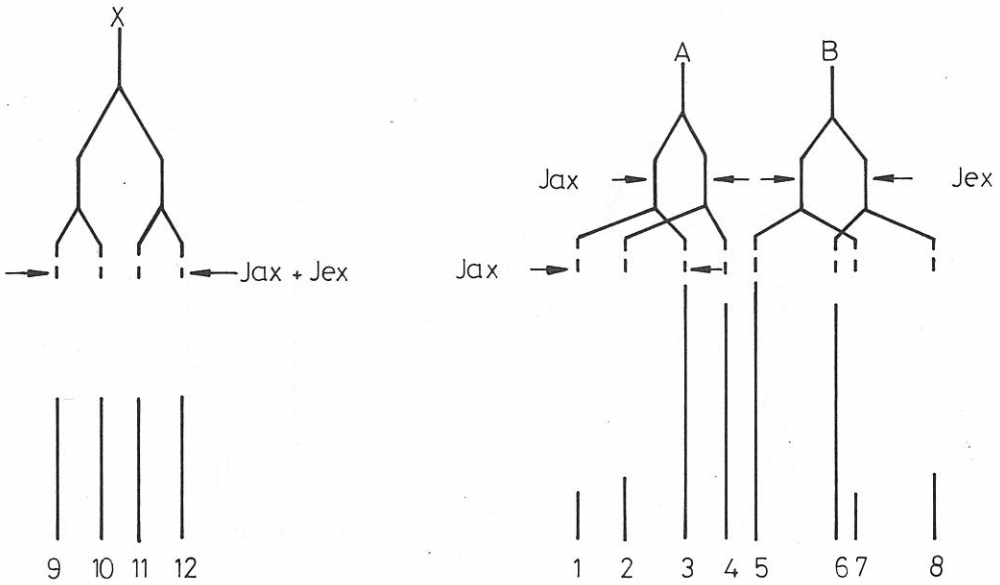


Fig. 32. Desdoblamiento de las bandas de un sistema ABX en RMN.

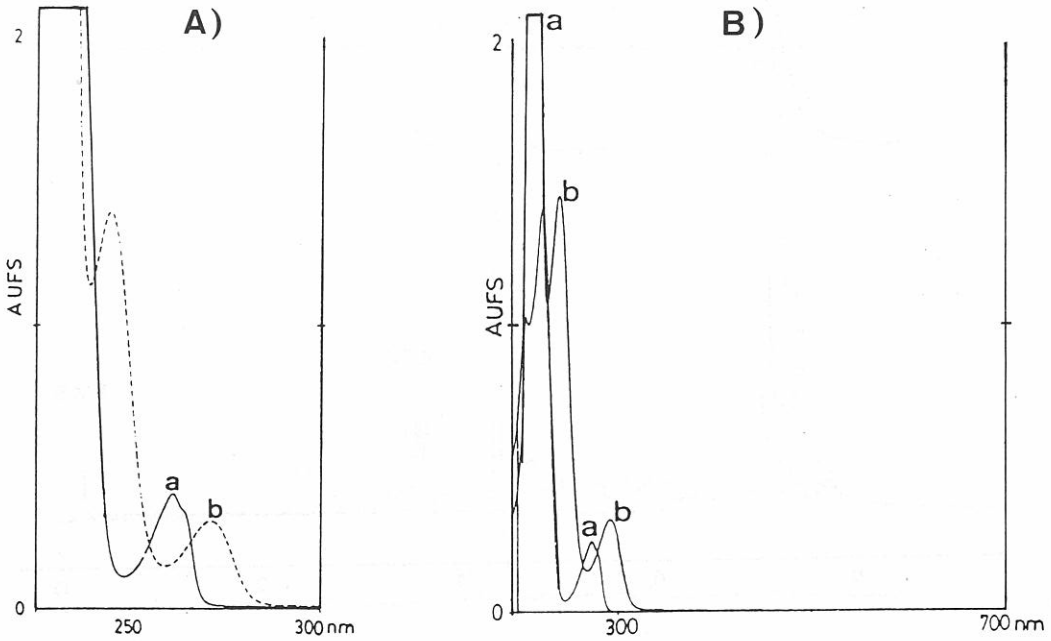


Fig. 33. Espectro U-V visible:
A) Patrón de tirosina.
B) Raspado superficial de jamón con velo blanco.

TABLA LI

Productos aplicados a la superficie del jamón	Resultado
Acido sórbico	Negativo
Esteres del ácido p-hidroxibenzoico	Negativo
Acido cítrico	Negativo
Acido-láctico	Negativo
Lejía	Negativo
Nitrato potásico	Negativo
Cal apagada	Negativo
Nisina	Negativo
Glicerina	Negativo
Vaselina	Negativo
Grasa fundida	Negativo
Celofán	Negativo
Papel Aluminio	Negativo
Colágeno	Negativo
Tripa de celulosa	Negativo
Película plástica (LAMIRSA 78/C)	Positivo
Película plástica (LAMIRSA 80/C)	Positivo
Película plástica (LAMIRSA S)	Positivo
Atmósfera controlada de CO_2	Negativo
Atmósfera controlada de Nitrógeno	Negativo
Atmósfera controlada de Nitrógeno/CO_2, 50:50	Negativo

Negativo: aparece el velo blanco. / Positivo: no aparece el velo blanco.

TABLA LII: *Concentración de aminoácidos libres en queso Parmigiano-Reggiano*

Aminoácido	Parte homogénea	Gránulos
Metionina	1,12	0,21
Ac. aspártico	3,84	0,75
Treonina	3,32	0,48
Serina	4,59	0,83
Ac. glutámico	15,08	2,92
Prolina	41,90	7,21
Glicina	1,78	0,33
Alanina	2,30	0,37
Acido 1-amino-butírico	0,07	–
Valina	4,39	0,94
Cistina	0,10	–
Metionina	0,81	0,34
Isoleucina	2,21	0,82
Leucina	2,21	11,21
Tirosina	0,57	73,70
Fenilalanina	2,95	7,65
Ornitina	1,14	0,22
Lisina	8,65	1,56
Histidina	1,67	0,33
Triptófano	0,28	0,015
Arginina	0,85	0,65

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE AMINOACIDOS EN EL MATERIAL RASPADO DE LA SUPERFICIE DE CORTE DE JAMON CURADO Y CONCENTRACIONES RELATIVAS A ISOLEUCINA

TABLA LIII

Aminoácidos	Muestras sin velo blanco		Muestras con velo blanco		Conc. relativa a isoleu. ($\bar{X}_{aa}/\bar{X}_{ile}$)		
	$\bar{X} \pm \sigma$[1]	Valores extremos	$\bar{X} \pm \sigma$[1]	Valores extremos	Sin velo (C)	Con velo (VB)	VB/C
Ala	4,67 ± 1,42	2,57 - 6,05	1,08 ± 0,62	0,58 - 2,27	3,48	3,27	0,94
Gly	3,16 ± 0,75	1,95 - 3,83	0,71 ± 0,42	0,41 - 1,52	2,36	2,15	0,91
ßala	2,84 ± 0,59	2,10 - 3,81	0,61 ± 0,33	0,42 - 1,27	2,12	1,85	0,87
Val	1,66 ± 0,36	1,07 - 2,06	0,44 ± 0,21	0,25 - 0,83	1,24	1,33	1,07
Thr	2,95 ± 0,69	2,12 - 3,83	0,72 ± 0,33	0,48 - 1,34	2,20	2,18	0,99
Ser	3,84 ± 1,26	2,59 - 5,40	1,04 ± 0,40	0,71 - 1,81	2,86	3,15	1,10
Leu	7,35 ± 1,73	4,71 - 9,08	1,94 ± 1,04	1,17 - 4,00	5,48	5,88	1,07
Ile	1,34 ± 0,26	0,91 - 1,74	0,33 ± 0,18	0,21 - 0,67	1,00	1,00	–
Pro	6,77 ± 0,82	6,10 - 7,58	1,28 ± 0,61	0,86 - 2,51	5,05	3,88	0,77
Asp	13,27 ± 1,23	11,37 - 14,98	2,62 ± 1,01	2,09 - 4,66	9,90	7,94	0,80
Phe	5,63 ± 0,29	5,24 - 6,13	5,05 ± 1,59	4,11 - 8,14	4,20	15,30	3,64
Glu	25,94 ± 2,89	22,97 - 30,22	6,07 ± 1,37	5,11 - 8,70	19,36	18,39	0,95
Lys	16,15 ± 2,25	14,43 - 19,56	3,11 ± 0,94	2,61 - 5,03	12,05	9,42	0,78
Tyr	4,41 ± 0,66	6,63 - 5,36	74,98 ± 8,81	57,24 - 80,25	3,29	227,21	69,06

[1] Valores medios en seis muestras ± desviaciones típicas.

TABLA LIV: *Análisis físico-químicos en Biceps femoris*

	Cloruros (% NaCl)	Nitritos (ppm$NaNO_2$	Humedad
Defectuoso 1	6,59	5	63,22
Normal 1	6,11	4	65,45
Defectuoso 2	6,20	4	58,03

TABLA LV: *Reacciones de color de la Tirosina*

Reacción	Aminoácidos que reaccionan	Color
1- Reacción de Millon $HgNO_3$ en HNO_3 con indicios de HNO_2	Tyr	Rojo
2- Reacción xantoproteica HNO_3 hirviendo	Tyr, Trp, Phe	Amarillo
3- Reacción de Pauly Acido sulfanílico diazotizado en solución alcalina	His, Tyr	Rojo
4- Reacción de Folin-Ciocalteau	Tyr	Azul

Realizando estas reacciones se puede determinar si el compuesto problema es tirosina o no, tanto en las pintas que pueden confundirse con alteraciones parasitarias, como el velo blanco. En caso de duda puede realizarse el espectro uv-visible y compararlo con un patrón.

2.3 Velo blanco en la superficie de corte de jamones enteros

En la superficie de corte de jamones que permanecen unos días sin que se corten lonchas, con frecuencia aparece una pátina blanquecina que se asocia frecuentemente a un enmohecimiento o desarrollo de levaduras. Si bien es cierto que la población de levaduras y hongos aumenta considerablemente, la coloración que se produce no es debido a ello sinó a una precipitación en la superficie de tirosina libre que está en el interior del jamón. Estos mismos jamones si son envasados al vacío dan lugar a la formación de velo blanco, tema comentado en el apartado anterior.

Análogamente a lo que ocurre en el envasado al vacío, generalmente este fenómeno tiene lugar en los músculos más húmedos, y es más intenso en jamones de larga curación.

En la figura 34 puede observarse el espectro RMN y UV visible de un raspado superficial de un jamón que permaneció 4 días sin que se cortaran lonchas. El corrimiento batocrómico y el doble doblete a 7 es típico de la tirosina.

Un industrial jamonero muy preocupado por el problema del velo blanco, nos indicó que en ocasiones estos jamones presentaban un aroma y un grado de aceptabilidad superior a los que no lo presentan.

Por tanto, lo que por una parte es un defecto que dificulta la comercialización de trozos y medios jamones, por otra parte puede representar una ventaja que puede ser deseable y digna de estudio, abriendo un posible camino para la mejora del aroma y calidad de los jamones curados en general.

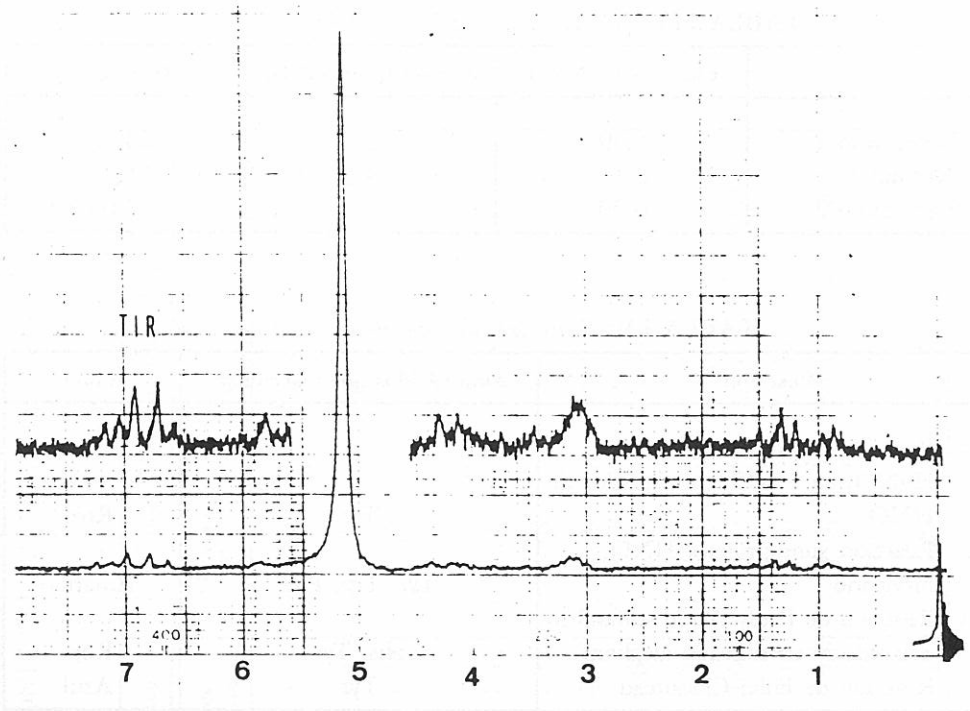


Fig. 34. A) Espectro RMN en D_2O de raspado superficial de jamón con velo blanco.

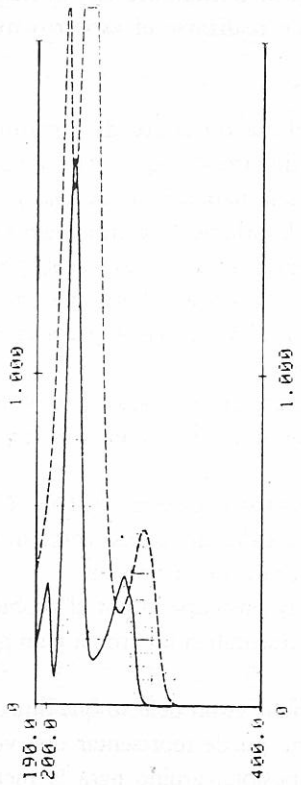


Fig. 34. B) Espectro UV-Visible (medio ácido y básico) de raspado superficial de jamón con velo blanco.

2.4 Material y métodos

Toma de muestras para microbiología

1. Las muestras analizadas provenían de medios y cuartos de jamones de cerdo blanco deshuesados y envasados al vacío.

Los jamones fueron curados en distintas fábricas.

Se estudiaron 16 muestras en total, 8 de ellas procedentes de jamones con manto blanco (VB) y 8 jamones control de apariencia normal (C). Estos últimos procedían de la misma partida que los primeros y en el caso de C3 era el mismo jamón que VB4 pero al que no le apareció el manto blanco por habérsele aplicado una película plástica de recubrimiento.

La toma de muestras se realizó mediante bisturí estéril, cortando unos 20 cm^2 aprox. de la capa muscular más superficial. Se homogeneizaron en un STOMACHER 400 con agua de peptona al 0,1 % y cloruro sódico al 4 % en una proporción de 1:9 respecto al peso de la muestra, obteniéndose a partir de esta dilución todo el banco de diluciones en el mismo medio.

A partir de cada una de las diluciones y por duplicado se inoculan en profundidad alícuotas de 0,1 ó 1 ml en placas de Petri con los siguientes medios de cultivo.

– Agar Plate Count para la flora mesófila total. Se incuba a 30 °C durante 48 horas.

– Agar Tripticasa Soja para la flora halotolerante, adicionando un 4 % de sal. Se incuba a 30 °C durante 48 horas.

– Agar M.R.S. para bacterias ácido-lácticas y Agar Shaedler para bacterias anaerobias. Se siembra en doble capa y se incuba a 37 °C durante 72 horas en estufa de anaerobiosis HERAEUS en atmósfera de Nitrógeno.

– Agar Sabouraud Dextrosa 2 % adicionado de 50 mg/ml de oxitetraciclina, para hongos y levaduras. Se incuba a 22 °C durante 5 días.

– Agar Manitol-Sal para Micrococos y estafilococos. Se incuba a 22 °C durante 72 horas.

Aparatos

Espectrofotómetro UV-visible Shimadzu UV-240. Instrumento R.M.N. equipado con Transformada de Fourier.

Cromatógrafo de gases de alta resolución DANI 3800-HR PTV equipado con inyector PTV (Programed Temperature Vaporizer), y detector de ionización de llama (FID). Registrador-Integrador CR1-B.

Reactivos

Disolución extractora: Acido clorhídrico 1N. Acetonitrilo. Solución 3NHCl en n-BuOH. Anhídrido heptafluorobutírico (HFBA). Solución Patrón de aminoácidos (20 ng/µl) derivatizados con 3N-HC1-nBuOH y HFBA.

Tratamiento de la muestra

Las muestras analizadas procedían de jamones curados que habían sido previamente envasados al vacío en forma de medios jamones. Se estudiaron muestras envasadas que presentaron el defecto y muestras control.

En todas las muestras se efectuó un raspado superficial. El material obtenido se sometió a la acción de una solución de HC1 1N a temp. ambiente. Se filtró la solución obtenida y se evaporó a sequedad en rotavapor a 70-80 °C.

Derivatización del extracto con 3N HC1-nBuOH/HFBA

El extracto resultante del tratamiento descrito se esterificó con una solución 3N HC1-nBuOH durante 20' a los 120 °C. Una vez enfriado se evaporó con Nitrógeno a Temp. ambiente. Posteriormente se añadieron 200µl de HFBA y 1 ml de CH_3 CN. La mezcla se calentó durante 30' a 130 °C. Producida la reacción se dejó enfriar y evaporó el CH_3 CN y restos de HFBA en corriente de N_2. Se redisolvió en 1 ml de CH_3CN. La solución patrón de AAs fue tratada del mismo modo.

Análisis Espectroscópicos

Se obtuvieron los espectros U.V. en el intervalo 190-300 nm. y 190-700 nm. del extracto obtenido y de una solución patrón de tirosina, en medio ácido (HC1 1N) y básico (NaOH 0,5N).

Análisis RMN

El residuo obtenido al evaporar a sequedad, es disuelto en $DCC1_3$/TCA 1:1 obteniendo posteriormente el espectro RMN transformada de Fourier de patrón de tirosina y muestra de jamón. También se realizó el espectro en D_2O.

Análisis Cromatográfico

Los derivados n-BuOH/HFBA de los extractos de aminoácidos se inyectan en un cromatógrafo DANI 3800 HR-PTV equipado con: columna capilar BP-5 (SGE, Australia) 25 m x 0,3 mm; espesor de film: 0,25 µm; gas portador, He (velocidad lineal 28 cm/min).; gas auxiliar: N_2, 40 ml/min, condiciones de trabajo: Programa de temperatura, 80 °C-5 °C/min. −260 °C; sistema de inyección, Split (1:50). Temperatura inyector y detector: 260 °C.

Análisis RMN

Se disolvieron las pintas blancas directamente en DC Cl_3/TCA 1:1, obteniendo el espectro RMN transformada de Fourier.

Derivatización del extracto con 3N HCl-BuOH/HFBA

Se disolvieron las pintas con HCl 1N a temperatura ambiente, se filtró y evaporó a sequedad en rotavapor a 70-80 °C.

El residuo fue esterificado con una solución 3N HCl-BuOH durante 20' a 120 °C. Una vez enfriado se evaporó con Nitrógeno a temperatura ambiente. Posteriormente se le añadieron 200µl de HFBA y 1 ml de CH_3CN. La mezcla fue calentada a 130 °C durante 30 minutos.

Producida la reacción se dejó enfriar y evaporó el CH_3CN y restos de HFBA en corriente de N_2. Se redisolvió en CH_3CN.