

UNIVERSITE BLAISE PASCAL – CLERMONT II
Ecole Doctorale Sciences de la vie, Santé, Agronomie, Environnement

THESE

Présentée par

Hassan SAFA

pour obtenir le grade de

Docteur d'Université

Spécialité : **Nutrition & Sciences des aliments**

**Réduction combinée en chlorure de sodium et en matière grasse
animale lors de la fabrication du saucisson sec**

« Effets sur les propriétés physicochimiques et les réactions biochimiques en lien avec la
production aromatique et les attributs sensoriels »

Directeur de thèse : Pierre-Sylvain MIRADE

Soutenue publiquement le 25 Janvier 2016 devant le jury composé de :

Rapporteurs :

Mme BERRI Cécile	Directrice de Recherches – INRA Nouzilly
M. COLLIGNAN Antoine	Professeur – Montpellier SupAgro

Membres :

M. LEBERT André	Professeur – Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand
M. SALLES Christian	Directeur de Recherches – INRA Dijon
M. GATELLIER Philippe	Ingénieur de Recherches – INRA Theix (Co-encadrant de thèse)
M. MIRADE Pierre-Sylvain	Chargé de Recherches – INRA Theix (Directeur de thèse)
M. PICGIRARD Laurent	Ingénieur Chargé de projet – ADIV Clermont-Ferrand (invité)

Dédicace

À la mémoire de mon oncle Souheil.

À mes parents, mon espoir immortel.

À ma sœur, mon sourire exceptionnel.

À mon frère, mon ange Gabriel.

À mes nièces Léa et Maria, ma joie éternelle.

À toi, le guide attendu, toute ma reconnaissance...

Remerciements

“Celui qui a de la charité dans son cœur a toujours quelque chose à donner”

Je tiens, tout d'abord, à exprimer mes plus vives reconnaissances à l'encontre de Monsieur **Pierre-Sylvain MIRADE**, qui m'a soutenu tout au long de ce travail et à la direction avisée, fidèle et exigeante qu'il a eue et à laquelle cette thèse doit beaucoup. Mes sincères remerciements vont aussi à mes encadrants, Messieurs **Philippe GATELLIER** et **Jean-Louis BERDAGUE**, pour leurs conseils judicieux, tout au long de la préparation de cette thèse. Je remercie également, Monsieur **Alain KONDJAYAN**, le directeur de l'unité **QuaPA** et Madame **Véronique SANTE-LHOUTELLIER**, la responsable de l'équipe **Biochimie et Protéines du Muscle (BPM)**, pour leur aide et leur soutien durant ces trois années de recherche enrichissantes.

Je remercie Madame **Cécile BERRI**, Directrice de Recherches à l'INRA de Nouzilly, ainsi que Monsieur **Antoine COLLIGNAN**, Professeur à Montpellier SupAgro, d'avoir accepté la lourde charge de rapporter mon travail de thèse. Je leur exprime toute ma reconnaissance pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail. À Monsieur **Christian SALLES**, Directeur de Recherches INRA au sein de l'UMR CSGA de Dijon, et Monsieur **Philippe GATELLIER**, Ingénieur de Recherches au sein de l'unité QuaPA, l'un de mes encadrants, j'exprime ma profonde gratitude pour avoir accepté de juger ma thèse en tant qu'examineurs. Que Monsieur **André LEBERT**, Professeur de l'Université Blaise Pascal et chercheur au sein de l'UMR Institut Pascal de Clermont-Ferrand, soit remercié pour avoir représenté l'Université Blaise Pascal et l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement dans mon jury de thèse.

Je remercie aussi les membres de mon comité de thèse : Madame **Régine TALON**, Monsieur **Laurent GUILLIER**, Madame **Nathalie KONDJAYAN**, Monsieur **Laurent PICGIRARD** et Monsieur **Denys DURAND** pour les conseils précieux qu'ils ont pu et su me donner lors des réunions constructives que nous avons eues.

Un merci du fond du cœur à mes financeurs Libanais, en l'occurrence Monsieur le Ministre **Yassine JABER** et l'**Association de Spécialisation et d'Orientation Scientifique**, ainsi qu'au **Conseil Régional d'Auvergne** pour la bourse qu'il m'a attribuée en lien avec ma participation à un congrès scientifique à l'étranger.

J'adresse aussi mes remerciements à Messieurs **Jean-Dominique DAUDIN**, **Thierry ASTRUC**, **Erwan ENGEL** pour tous leurs conseils et leurs remarques. Je remercie toute

l'équipe Imagerie et Transferts de l'Unité QuaPA, sans exception ; un merci spécial à **Stéphane PORTANGUEN** pour sa créativité dans les montages expérimentaux, également à **Raphaël FAVIER** pour son aide durant certaines de mes expérimentations. Un grand Merci à l'équipe **BPM** de QuaPA, notamment à **Laurent AUBRY** et **Claude FERREIRA** pour leur aide technique et leur gentillesse. Je remercie également **Frédéric MERCIER** de m'avoir aidé dans les analyses au sein de l'équipe **MASS**.

Je remercie également l'**ADIV** et spécialement Monsieur **Laurent PICGIRARD** pour m'avoir permis d'utiliser certains de leurs équipements et pour avoir participé au jury de soutenance de ma thèse en tant que personne invitée.

A vous **Anne, Caroline, Cristelle, Diaa, Hanadi, Jihène, Khaled, Laure, Marwa, Rachid** et **Rami** cette aventure n'aurait pas été la même si je ne vous ai pas rencontrés. Merci pour votre amitié, votre soutien permanent et les bons moments partagés ensemble.

Je remercie également les personnes Ressources Informatiques de l'Unité QuaPA, **Jean-Michel AUBERGER** et **Pascal TOURNAYRE** pour leurs disponibilités, ainsi qu'**Eliane BACHELARD**, **Françoise LASSALAS**, et **Mathilda SERPOLLIER** pour leurs contributions administratives, financières et comptables. Finalement, merci à tout le personnel de l'unité **QuaPA** pour l'ambiance générale et leur accueil chaleureux.

Je remercie mes amis, **Hussein, Ihabe, Khodor** et **Mahmoud** pour m'avoir écouté et soutenu pendant les périodes dures de la thèse.

Des personnes plus intimes méritent des remerciements plus profonds, à eux je dédie ce travail. Je remercie ceux qui ont fait de moi ce que je suis, ceux grâce à qui tant d'années d'études ont été possibles, ma mère et mon père. C'est à vous que je dois cette réussite, et j'ai le plaisir de vous l'offrir. Je remercie du fond de mon cœur ma sœur et mon frère **Loyal** et **Ali** ainsi que mon beau-frère **Wassim**, Je remercie toute ma famille.

Enfin, à la source de mes joies, mes nièces **Léa** et **Maria**. Merci pour m'avoir remonté le moral avec vos sourires et vos regards angéliques...

Merci à tous. Cordialement, avec tous mes respects.

Hassan SAFA

SOMMAIRE GENERAL

AVANT-PROPOS

Liste des communications	p I
Résumé	p III
Abstract	p IV
Liste des abréviations, des figures et des tableaux	p V
Liste des abréviations	p V
Liste des figures	p IX
Liste des tableaux	p XVI

<u>INTRODUCTION</u>	p 1
----------------------------------	------------

<u>PLAN DE TRAVAIL</u>	p 6
-------------------------------------	------------

Chapitre 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Introduction	p 7
1.2. Article n°1 (projet à soumettre à Critical Reviews in Food Science and Nutrition)...	p 8
1.3. Conclusions de l'étude bibliographique	p 43

Chapitre 2 : MATERIELS et METHODES

2.1. Fabrication des saucissons secs (articles n°2 et 4)	p 45
2.1.1. Première série de fabrication	p 45
2.1.2. Seconde série de fabrication	p 46
2.1.3. Procédure de fabrication de saucissons secs	p 48
2.2. Composition chimique des saucissons secs (articles n°2 et 4)	p 50
2.2.1. Teneur en eau	p 50
2.2.2. Teneur en sel	p 50
2.2.3. Teneur en lipides	p 51
2.3. Analyses physicochimiques (articles n°2 et 4)	p 52
2.3.1. Perte de poids	p 52
2.3.2. Activité de l'eau	p 52
2.3.3. Valeurs de pH	p 52
2.4. Analyses biochimiques (articles n°2 et 4)	p 53
2.4.1. Indice de protéolyse	p 53

2.4.2. Lipolyse	p 53
2.4.3. Oxydation lipidique	p 54
2.4.3.1. Méthode des TBARS	p 54
2.4.3.2. Dosage du taux de bases de Schiff hydrosolubles	p 55
2.4.4. Oxydation protéique	p 55
2.4.4.1. Taux de carbonyles	p 55
2.4.4.2. Taux de groupements thiols libres	p 56
2.5. Analyses instrumentales (article n°4)	p 56
2.5.1. Mesure de texture	p 56
2.5.2. Mesure de couleur	p 58
2.6. Analyse de la fraction volatile odorante (article n°3)	p 58
2.6.1. Origines des échantillons de saucisson de haut de gamme	p 59
2.6.2. Analyse par chromatographie bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (SPME–GCxGC–tofMS)	p 59
2.6.3. Analyse par espace de tête dynamique couplé à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse (DHS-GC-MS)	p 60
2.6.4. Chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse couplées à l’olfactométrie	p 60
2.7. Analyse sensorielle (article n°4)	p 63
2.8. Analyses statistiques (articles n°2 et4)	p 63

Chapitre 3 : RESULTATS

3.1. Introduction	p 65
3.2. Article n°2 (publié dans Food and Bioprocess Technology, 8(10), 2109-2122) .	p 66
3.3. Article n°3 (soumis à Meat Science en Août 2015)	p 90
3.4. Article n°4 (soumis à Meat Science en Octobre 2015)	p 99
3.5. Conclusions.....	p 122

Chapitre 4 : DISCUSSION GENERALE

4.1. Effet d’une réduction directe et combinée en chlorure de sodium et en matière grasse animale (article n°2)	p 123
4.1.1. Effet sur les propriétés physicochimiques	p 124
4.1.1.1. Perte en poids	p 124
4.1.1.2. Activité de l’eau	p 125

4.1.1.3. Valeurs de pH	p 126
4.1.2. Effet sur les réactions biochimiques	p 127
4.1.2.1. Protéolyse	p 127
4.1.2.2. Lipolyse	p 128
4.1.2.3. Oxydations lipidique et protéique	p 129
a. Oxydation lipidique	p 129
b. Oxydation protéique.....	p 130
4.2. Rôle critique de l'aromatisation dans les composés odorants clés de saucissons de haut de gamme (article n°3)	p 131
4.3. Effet de l'aromatisation et d'une substitution partielle combinée du chlorure de sodium et de la matière grasse animale (article n°4)	p 132
4.3.1. Effet sur les propriétés physicochimiques	p 133
4.3.1.1. Perte en poids	p 133
4.3.1.2. Activité de l'eau	p 136
4.3.1.3. Le pH	p 138
4.3.2. Effet sur les réactions biochimiques	p 140
4.3.2.1. Protéolyse	p 140
4.3.2.2. Lipolyse	p 141
4.3.2.3. Oxydations lipidique et protéique.....	p 142
a. Oxydation lipidique	p 143
b. Oxydation protéique.....	p 144
4.3.3. Effet sur les mesures instrumentales de qualité	p 145
4.3.3.1. Paramètres de texture	p 145
4.3.3.2. Mesure de couleur.....	p 147
4.3.4. Effet de l'aromatisation et d'une substitution partielle combinée sur l'acceptabilité des produits fabriqués par les consommateurs	p 149
4.4. Etude des transferts de matière (eau, sel) lors de la fabrication d'un saucisson sec	p 153
4.4.1. Etude des profils de teneurs en eau et en sel lors de la fabrication d'un saucisson sec	p 154
4.4.1.1. Perte de poids	p 155
4.4.1.2. Profils de teneur en eau dans les saucissons	p 157
4.4.1.3. Profils de teneur en sel dans les saucissons	p 158
4.4.1.4. Profils d'a _w dans les saucissons	p 159

4.4.2. Effet de la formulation sur la diffusité de l'eau	p 160
4.4.2.1. Estimation du flux d'eau évaporé en surface	p 160
4.4.2.2. Estimation du gradient de concentration d'eau en surface	p 161
4.4.3. Construction d'un modèle d'isotherme de sorption pour les saucissons secs	p 163
<u>PRINCIPALES CONCLUSIONS et PERSPECTIVES</u>	p 168
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	p 175

Annexe I : Calcul de la densité de la matière sèche d'un saucisson

Annexe II : Publication Safa, Gatellier, Lebert, Picgirard, Mirade (2015). Food and Bioprocess Technology 8:2109

AVANT-PROPOS

1 - Publications internationales à comité de lecture

- Safa, H., Gatellier, P., Lebert, A., Picgirard, L., Mirade, P.S. (2015). Effect of Combined Salt and Animal Fat Reductions on Physicochemical and Biochemical Changes During the Manufacture of Dry-Fermented Sausages. *Food and Bioprocess Technology* 8:2109–2122.
- Safa, H., Mercier, F., Kondjoyan, N., Mirade, P.S, Berdagué, J.L. The contribution of flavouring to key aroma compounds in dry-fermented sausage. *Meat Science*, submitted in August 2015.
- Safa, H., Gatellier, P., Berdagué, J.L., Kondjoyan, N., Mercier, F., Favier, R., Mirade, P.S. Impact of flavouring and of combined partial substitutions of sodium chloride and animal fat on physicochemical and biochemical parameters, texture and sensory attributes of dry-fermented sausage. *Meat Science*, submitted in October 2015.
- Safa, H., Gatellier, P., Mirade, P.S. Effect of direct salt and fat reductions or partial substitutions on the physicochemical, biochemical, aromatic and sensory properties of dry-fermented sausages: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, will be submitted in November 2015.

2 - Article de vulgarisation

- La réduction combinée du chlorure de sodium et de la matière grasse animale lors de la fabrication du saucisson sec : une nouvelle technologie pour des saucissons plus sains. www.auvergnesciences.com. Safa H. & Mirade P.S., 2015.

3 - Communications à des congrès et colloques

- Safa, H., Daudin, J.D., Mirade, P.S. (2015). Impact of lipid and sodium chloride contents on water transfers in dry-fermented sausages. *61st International Congress of Meat Science & Technology*, Clermont-Ferrand, France, 23-28 August (poster + text).
- Safa, H., Berdagué, J.L., Mirade, P.S. (2015). Physicochemical properties and sensory attributes of new formulations of dry-fermented sausages. *61st International Congress of Meat Science & Technology*, Clermont-Ferrand, France, 23-28 August (poster + text).
- Safa, H., Gatellier, P., Mirade, P.S. (2015). Biochemical changes in dry fermented sausages, made with sunflower oil and potassium chloride. *12th International Congress on Engineering and Food*, Quebec City, Canada, 14-18 June (poster + abstract).
- Safa, H., Gatellier, P., Picgirard, L., Mirade, P.S. (2014). Effet de la réduction en chlorure de sodium et en matière grasse animale sur les propriétés physicochimiques, la protéolyse et la texture de saucissons secs. *15^{èmes} Journées des Sciences du Muscle et Technologies des Viandes*, Clermont-Ferrand, 4-5 Novembre (oral + texte).
- Safa, H., Gatellier, P., Picgirard, L., Mirade, P.S. (2014). Effect of reducing sodium chloride and animal fat content on the physicochemical and textural properties of dry-fermented sausages. *2nd International Symposium on Fermented Meats*, Valencia, Spain, 20-23 October (oral + abstract).

- Safa, H., Gatellier, P., Mirade, P.S. (2014). Proteolytic and oxidative changes in low salt and low fat dry-fermented sausages. *2nd International Symposium on Fermented Meats*, Valencia, Spain, 20-23 October (poster + abstract).

4 - Autres

- Co-encadrement de stage de Master 1 : Dynamique d'évolution des paramètres biochimiques lors de la fabrication de saucissons secs réduits en sel et en matière grasse animale, Université Blaise Pascal, ISMAIL Hanadi (2014).
- Co-encadrement de stage de Master 2 : Impact des teneurs en chlorure de sodium et en matière grasse animale sur l'évolution des propriétés physicochimiques, la protéolyse et la texture de saucissons secs, Université Blaise Pascal, AGOUNINESSOUK Rachid (2014).
- Participation à l'organisation *des Journées Portes Ouvertes du centre INRA de Theix*, Saint Genès Champanelle, Theix, France, 28-31 Mai 2015.
- Participation à l'organisation du *61st International Congress of Meat Science & Technology*, Clermont-Ferrand, France, 23-28 August 2015.

Titre

Réduction combinée en chlorure de sodium et en matière grasse animale lors de la fabrication du saucisson sec : effets sur les propriétés physicochimiques et les réactions biochimiques en lien avec la production aromatique et les attributs sensoriels.

Résumé

Du fait de problèmes de santé publique, l'industrie agroalimentaire doit réduire la quantité de sel et de matière grasse dans les aliments, et donc dans les charcuteries. Lors de la fabrication des saucissons secs, une diminution combinée des taux de sel et de matière grasse animale peut se traduire par des problèmes de stabilité microbiologique, des défauts d'arôme et de texture dus à des modifications physicochimiques et biochimiques. Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse étaient : (1) d'étudier l'impact d'une réduction directe des teneurs en sel et en matière grasse animale sur les évolutions physicochimiques et biochimiques au sein des produits, (2) d'identifier les composés aromatiques responsables de l'arôme du saucisson sec, ainsi que leurs origines, (3) de développer de nouvelles formulations de saucissons secs à teneurs réduites en sodium et en acides gras saturés, et (4) d'étudier les transferts d'eau et sel et de développer une isotherme de sorption spécifique pour le saucisson sec.

L'étude de l'effet d'une réduction directe combinée a mis en évidence la difficulté de fabriquer des saucissons secs à teneurs réduites en sel et en matière grasse animale, sans modifier les évolutions physicochimiques et biochimiques. Une identification des composés volatils odorants de saucissons secs de haut de gamme a permis de montrer que l'aromatisation par l'ail et le poivre noir pouvait être un levier technologique permettant d'améliorer la qualité aromatique des saucissons secs allégés en sel et en matière grasse animale. L'impact de l'aromatisation et d'une substitution partielle combinée du sel par le chlorure de potassium et du gras de bardière de porc par l'huile de tournesol oléique sur les propriétés physicochimiques, les réactions biochimiques et les attributs sensoriels de saucissons secs, a été étudié. Cette étude a montré le rôle important de l'aromatisation qui agit en introduisant des molécules aromatiques qui rehaussent l'acceptabilité des produits par les consommateurs, en tant qu'exhausteur de la perception du goût salé et aussi, sur les processus fermentaires qui vont conditionner l'aspect et la texture finale du produit. La substitution partielle combinée est une solution efficace pour conserver au mieux la qualité organoleptique des saucissons, en permettant, d'une part, d'éviter les défauts texturaux et sensoriels liés aux modifications physicochimiques, protéolytiques et lipolytiques générés par une réduction directe combinée, et d'autre part, d'améliorer l'arôme du produit en rehaussant les niveaux d'oxydations lipidique et protéique.

L'étude des transferts d'eau et de sel a mis en évidence une migration du sel vers le cœur du saucisson, et a permis de déterminer des valeurs de diffusivité apparente de l'eau en surface de ces produits. Il a été montré qu'une forte réduction en matière grasse réduisait la diffusivité de l'eau à la surface du saucisson. Une isotherme de sorption spécifique permettant de prédire l' a_w en fonction des teneurs en eau, en lipides et en sel a été construite en adaptant un modèle de Ross établi pour la gélatine salée et gras.

Mots clés : saucisson sec ; sel ; sodium ; matière grasse animale ; réduction directe ; substitution partielle ; propriétés physicochimiques et biochimiques ; composés volatils odorants ; aromatisation ; acceptabilité ; transferts d'eau et sel ; diffusivité de l'eau ; isotherme de sorption.

Title

Combined salt and animal fat reductions during dry-fermented sausage manufacture: effects on physical-chemical properties and biochemical reactions related to the aromatic compound production and sensory attributes.

Abstract

Because of public health problems, the food industry must lower sodium and animal fat contents in all food products, therefore in cured meat products. During dry-fermented sausage manufacture, a combined reduction both in salt and animal fat contents may induce microbial safety problems and textural and aroma defects due to physical-chemical and biochemical changes. On account of that, this work of thesis aims (1) to investigate the impact of a direct reduction on the salt and animal fat contents on the physical-chemical and biochemical evolutions in the products, (2) to identify the aromatic compounds responsible for the aroma of dry-fermented sausage, and their origins, (3) to develop new nutritionally-improved formulations of dry-fermented sausages with less sodium and saturated fatty acids, and (4) to study the impact of lipid and sodium chloride contents on water transfers in dry-fermented sausages and to build a specific sorption isotherm curve for dry sausages.

The study of the effect of a combined direct reduction highlighted the difficulty of manufacturing sodium-reduced fat-reduced dry sausages, without affecting the physical-chemical and biochemical evolutions. Identification of odorous volatile compounds of high quality dry sausages showed that flavouring, especially garlic and black pepper, could be a good solution for improving the aromatic quality of salt-reduced fat-reduced dry-fermented sausages. The impact of flavouring and of a combined salt and animal fat replacement by potassium chloride and oleic sunflower oil, respectively, on physical-chemical properties, biochemical reactions and sensory attributes of dry-fermented sausages was then studied. This specific study showed the crucial role played by flavouring which introduces aromatic molecules that enhance the product acceptability by consumers, which acts as an enhancer of the saltiness perception and which improves the product appearance and texture by boosting the fermentation process. Consequently, the combined partial substitution is an efficient solution to preserve at best the organoleptic quality of the products, allowing, on one hand, avoiding the textural and sensory defects related to physical-chemical, proteolytic and lipolytic modifications induced by a combined direct reduction, and on the other hand, enhancing the product aroma by increasing the levels of lipid and protein oxidations.

The study on water and salt transfers highlighted a salt diffusion towards the dry sausage core, and made it possible to determine values of apparent water diffusivity at the sausage surface. We demonstrated that a strong reduction in animal fat content significantly lowered the water diffusivity value at the product surface. A specific sorption isotherm curve based on a modified Ross model was built, allowing dry-fermented sausages water activity to be calculated as a function of water, fat and salt contents.

Keywords: dry-fermented sausage; salt; sodium; animal fat; direct reduction; partial substitution; physical-chemical and biochemical properties; odorous volatile compounds; flavouring; acceptability; water and salt transfers; water diffusivity; sorption isotherm curve.

Liste des ABREVIATIONS, des FIGURES et des TABLEAUX

Nomenclature of dry-fermented sausage formulations

Formulations	Designation	<i>Fat, salt and flavouring contents</i>
S1	Experiment 1	<i>14.7% animal fat and 2.4% sodium chloride</i>
S2	Experiment 2	<i>21% animal fat and 2.4% sodium chloride</i>
S3	Experiment 3	<i>17.9% animal fat and 2.8% sodium chloride</i>
S4	Experiment 4	<i>8.4% animal fat and 2.4% sodium chloride</i>
S5	Experiment 5	<i>11.6% animal fat and 2.0% sodium chloride</i>
S6	Experiment 6	<i>17.9% animal fat and 2.0% sodium chloride</i>
S7	Experiment 7	<i>11.6% animal fat and 2.8% sodium chloride</i>
NF	Non-flavoured formulation	<i>21% animal fat, 2.8% sodium chloride and <u>0% flavouring</u></i>
K-RS	Reduced-sodium formulation	<i>21% animal fat, <u>2.0% sodium chloride</u> and <u>0.8% potassium chloride</u></i>
RF	Reduced-fat formulation without partial salt replacement	<i><u>7% animal fat and 2.8% sodium chloride</u></i>
K-RSF	Reduced-fat formulation with partial salt replacement	<i><u>7% animal fat, 2.0% sodium chloride and 0.8% potassium chloride</u></i>
SFO-RF	Reduced-fat formulation containing 3% oleic sunflower oil, without partial salt replacement	<i><u>7% animal fat, 3% oleic sunflower oil and 2.8% sodium chloride</u></i>
K-SFO-RSF	Reduced-fat formulation containing 3% oleic sunflower oil, with partial salt replacement	<i><u>7% animal fat, 3% oleic sunflower oil, 2.0% sodium chloride and 0.8% potassium chloride</u></i>
S8 or Control:	Baseline reference experiment	<i>21% animal fat and 2.8% sodium chloride</i>

Liste des abréviations

\dot{O}_{eau}	Flux d'eau évaporé en surface
∇C_{eau}	Gradient de concentration d'eau en surface
ρ_{eau}	Masse volumique de l'eau
$\rho_{\text{protéines}}$	Masse volumique des protéines
ρ_{lipides}	Masse volumique des lipides
ρ°_{MS}	Masse volumique initiale de la matière sèche
a^*	Variation rouge/vert (couleur)
ACTIA	Association de Coordination Technique pour l'Industrie Agro-alimentaire
ADIV	Association pour le Développement de l'Institut de la Viande
ADRIA	Association pour le Développement, la Recherche et l'Innovation Agroalimentaires
AGS	Acides gras saturés
ANOVA	Analysis of variance ou Analyse de variance
a_w	Activité de l'eau ou Water activity
B\$	Billion dollars
b^*	Variation jaune/bleu (couleur)
B€	Billion euros
BHA	Hydroxyanisole butylé
BHT	Hydroxytoluène butylé
BPM	Biochimie et Proteines du Muscle
CaCl₂	Chlorure de calcium ou Calcium chloride
C_{eau}	Concentration en eau
DAG	Diacylglycerol
DDP	Dipeptidyleptidase
D_{eau}	Diffusivité de l'eau
DHS	Dynamique headspace sampling
DHS–GC–MS	Dynamic headspace sampling–gas chromatography–mass spectrometry
DM	Dry matter
DNPH	Dinitrophénylhydrazine
DTNP	2'-dithiobis(5-nitropyridine)
EU	European union

FFAs	Free fatty acids
GC	Gas chromatography
GENTIV gmbh	Centre for innovative process engineering
GSH-Px	Glutathion peroxydase
H₂O₂	Hydrogen peroxide
HCA	Hierarchical cluster analysis
HSB	Hydrosoluble Schiff bases
HO	Hydroxyl
HO₂	Hydroperoxyl
HPLC	High performance liquid chromatography
INRA	Institut national de la recherche agronomique
IP	Indice de protéolyse
KCl	Chlorure de potassium ou Potassium chloride
K-lactate	Lactate de potassium ou Potassium Lactate
KOH	Hydroxyde de Potassium ou Potassium hydroxide
L*	Variation blanc/noir (couleur)
L°	Alkyl
LAB	Lactic acid bacteria ou bactéries lactiques
LDL- Cholesterol	Low density lipoprotein - Cholesterol
LOO°	Peroxide radicals
LOOH	Lipid hydroperoxide
MDA	Malondialdehyde
MgCl₂	Chlorure de magnésium ou Magnesium chloride
MHC	Myosin heavy chain
MS	Mass spectrometry
MT	Matière totale
MUFAs	Mono-unsaturated fatty acids ou acides gras mono-insaturés
n-3 PUFA	Omega-3 polyunsaturated fatty acids
n-6 PUFA	Omega-6 polyunsaturated fatty acids
NaCl	Chlorure de sodium ou Sodium chloride
NPN	Non-protein nitrogen
O₂⁻	Superoxide
P°	Carbon centred radical
PI	Proteolysis index
PO°	Alkoxy radical

POH	Hydroxyl derivative
POO°	Peroxyl radical
PUFAs	Polyunsaturated fatty acids
QuaPA	Qualité des produits animaux
RH	Relative humidity
ROOH	Hydroperoxide
ROS	Reactive oxygen species
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodécyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis
SFAs	Saturated fatty acids
SFO	Oleic sunflower oil
SOD	Superoxyde dismutase
SPME	Solid phase microextraction
SPME-GC×GC-tofMS	Solid-phase micro-extraction-comprehensive gas chromatography-time of-flight mass spectrometry
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TCA	Trichloroacetic acid
TeRiFiQ	Combining <u>T</u> echnologies to achieve significant binary <u>R</u> eductions in Sodium, <u>F</u> at and Sugar content in everyday foods whilst optimizing their nutritional <u>Q</u> uality (EU project)
TLC	Thin layer chromatography
TM	Total matter
TN	Total nitrogen content
TPA	Texture profile analysis
TTP	Tripeptidylpeptidase
UK	United Kingdom
UMR CSGA	Unité Mixte de Recherche Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation
USA	United States of America
X_{eau}^{MT}	Teneur en eau par rapport à la matière totale
X_{eau}^{MS}	Teneur en eau par rapport à la matière sèche
X_{eau}^{protéines}	Teneur en eau par rapport à la teneur en protéines
X_{NaCl}^{eau}	Teneur en sel par rapport à la teneur en eau

Liste des figures

Chapitre 1 : Revue bibliographique

- Figure 1.1** Detailed schematic illustration of how dry-fermented sausages are commonly manufactured in France. **(article n°1)** p 10
- Figure 1.2** Typical time course of pH values in dry-fermented sausages as a function of the type of fermentation: slow or non-acid, medium and fast. **(article n°1)** p 15
- Figure 1.3** Brief description of the several consecutive stages involved in proteolysis. **(article n°1)**..... p 22
- Figure 1.4** Brief description of the several consecutive stages involved in lipolysis of lipids, both (a) non-polar (triglycerides) and (b) polar (phospholipids). **(article n°1)** p 24
- Figure 1.5** Brief description of the three consecutive stages involved in lipid oxidation. **(article n°1)**..... p 27

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

- Figure 2.1** Procédure décrivant les différentes étapes suivies lors de la fabrication des deux séries de saucissons secs réalisée à l'ADIV. p 48
- Figure 2.2** Photographie montrant l'appareil de chromatographie ionique du laboratoire utilisé pour le dosage des ions chlorure, sodium ou potassium. p 51
- Figure 2.3** Photographie montrant l' a_w -mètre du laboratoire utilisé pour mesurer l' a_w des échantillons de saucissons secs. p 52
- Figure 2.4** Principe général du dosage du taux de carbonyles par la méthode utilisée dans ce travail..... p 56
- Figure 2.5** Photographie montrant le dispositif expérimental de mesure par « texture profile analysis » (TPA) de la texture des échantillons de saucissons secs. p 57
- Figure 2.6** Exemple de résultat de courbe force-temps obtenue après un test de « texture profile analysis » (TPA) appliqué à un échantillon de viande. p 57
- Figure 2.7** Photographie montrant le spectrophotomètre du laboratoire utilisé pour mesurer la couleur des échantillons de saucissons secs. p 58

Figure 2.8 Photographies et schéma décrivant le dispositif d'olfactométrie à 8 voies du laboratoire qui a été utilisé pour faire un inventaire exhaustif des composés odorants-actifs piégés dans les échantillons de saucissons secs analysés. p 61

Figure 2.9 Photographie et schéma décrivant le dispositif du laboratoire qui a été utilisé pour identifier les composés odorants-actifs piégés dans les échantillons de saucissons secs analysé. p 62

Chapitre 3 : Résultats

Figure 3.1 Time-course of weight losses investigated for the eight formulations of dry-fermented sausages given in Table 3.1. Hierarchical cluster analysis was performed on raw values in order to pool dry-fermented sausage formulations presenting similar patterns. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$). (article n°2) p 77

Figure 3.2 Time-course of mean water activity (a_w) values investigated for the eight formulations of dry-fermented sausages given in Table 3.1. Hierarchical cluster analysis was performed on raw values in order to pool dry-fermented sausage formulations presenting similar patterns. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$). (article n°2) p 79

Figure 3.3 Time-course of mean pH values investigated for the eight formulations of dry-fermented sausages given in Table 3.1. Hierarchical cluster analysis was performed on raw values in order to pool dry-fermented sausage formulations presenting similar patterns. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$). (article n°2) p 81

Figure 3.4 Time-course of proteolysis index investigated for the eight formulations of dry-fermented sausages given in Table 3.1. Hierarchical cluster analysis was performed on raw values in order to pool dry-fermented sausage formulations presenting similar patterns. For each class of dried sausages, values were means \pm standard deviation calculated from all the independent measurement values of each experiment constituting the class. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$). (article n°2) p 83

Figure 3.5 Time-course of lipid oxidation reaction investigated for the eight formulations of dry-fermented sausages of Table 3.1. Lipid oxidation was quantified by determining hydrosoluble Schiff bases (HSB) content. Hierarchical cluster analysis was performed on raw values in order to pool dry-fermented sausages formulations presenting similar patterns. For each class of dried sausages, values were means \pm standard deviation calculated from all the

independent measurement values of each experiment constituting the class. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$). **(article n°2)** p 86

Figure 3.6 Time-course of protein oxidation reaction investigated for the eight formulations of dry-fermented sausages of Table 3.1. Protein oxidation was quantified by determining free-thiol-group content. Hierarchical cluster analysis was performed on raw values in order to pool dry-fermented sausages formulations presenting similar patterns. For each class of dried sausages, values were means \pm standard deviation calculated from all the independent measurement values of each experiment constituting the class. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$). **(article n°2)** p 87

Figure 3.7 Mean aromagram of dry-fermented sausages calculated from each individual sniffing session. The signal is broken down into 9 odour classes to show how the odour-active zones align to a given olfactory class. The legend to the peak numbers is given in Table 3.4. **(article n°3)** p 95

Figure 3.8 Relative contribution of the odour-active compounds to the aromagram area according to main origin. **(article n°3)** p 97

Figure 3.9 Time-course of proteolysis index, investigated in the seven formulations of dry-fermented sausages. Hierarchical cluster analysis was performed on raw values in order to pool product formulations presenting similar patterns. For each class of dried sausages, values are means \pm standard deviation calculated from all the independent measured values of each formulation in that class. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$). **(article n°4)** p 110

Figure 3.10 Rate of lipolysis quantified through an acidity value at day 29. Hierarchical cluster analysis was performed on raw values in order to pool product formulations presenting similar patterns. For each class of dried sausages, values are means \pm standard deviation calculated from all the independent measured values of each formulation in that class. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$). **(article n°4)** p 112

Figure 3.11 Time-course of lipid oxidation reaction investigated in the seven formulations of dry-fermented sausages. Lipid oxidation was quantified by determining hydrosoluble Schiff base (HSB) content. Hierarchical cluster analysis was performed on raw values in order to pool product formulations presenting similar patterns. For each class of dried sausages, values are means \pm standard deviation calculated from all the independent measurements of each

formulation in that class. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$). (article n°4) p 113

Figure 3.12 Time-course of protein oxidation reaction investigated in the seven formulations of dry-fermented sausages. Protein oxidation was quantified by determining free-thiol-group content. Hierarchical cluster analysis was performed on raw values in order to pool product formulations presenting similar patterns. For each class of dried sausages, values are means \pm standard deviation calculated from all the independent measurements of each formulation in that class. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$). (article n°4) p 115

Figure 3.13 Instrumental colour measurement: (a) lightness, (b) redness and (c) yellowness of each dry-fermented sausage formulation listed in Table 3.5. Different letters tagged to formulation name of the graphs denote significant differences between means at $p < 0.05$. (article n°4) p 117

Figure 3.14 Mean acceptability in terms of (a) appearance, (b) mouthfeel, (c) taste and (d) aroma as evaluated by 29 assessors for each dry-fermented sausage formulation listed in Table 3.5. Different letters tagged to formulation name of the graphs denote significant differences between means at $p < 0.05$. (article n°4) p 120

Chapitre 4 : Discussion générale

Figure 4.1 Contribution relative des composés volatiles odorants-actifs aux zones de l'aromagramme du saucisson sec, en se basant sur leur origine principale. p 131

Figure 4.2 Cinétiques de perte de poids mesurées dans les formulations de la seconde série de fabrications listées dans le tableau 3.5 (p 102). p 134

Figure 4.3 Cinétiques de perte de poids mesurées dans les formulations 'contrôle' des deux séries de fabrication, dans la formulation combinant réduction directe en matière grasse animale et en sel (formulation 'S5') et dans celle combinant substitution partielle de la matière grasse animale et du sel par, respectivement, de l'huile de tournesol oléique et du chlorure de potassium (formulation 'K-SFO-RSF'). p 135

Figure 4.4 Cinétiques d' a_w mesurées dans les formulations de la seconde série de fabrications listées dans le tableau 3.5 (p 102). p 136

- Figure 4.5** Cinétiques d' a_w mesurées dans les formulations 'contrôle' des deux séries de fabrication, dans la formulation combinant réduction directe en matière grasse animale et en sel (formulation 'S5') et dans celle combinant substitution partielle de la matière grasse animale et du sel par, respectivement, de l'huile de tournesol oléique et du chlorure de potassium (formulation 'K-SFO-RSF')..... **p 137**
- Figure 4.6** Cinétiques de pH mesurées dans les formulations de la seconde série de fabrications listées dans le tableau 3.5 (p. 102). **p 138**
- Figure 4.7** Cinétiques de pH mesurées dans les formulations 'contrôle' des deux séries de fabrication, dans la formulation combinant réduction directe en matière grasse animale et en sel (formulation 'S5'), dans celle combinant substitution partielle de la matière grasse animale et du sel par, respectivement, de l'huile de tournesol oléique et du chlorure de potassium (formulation 'K-SFO-RSF') et dans celle sans aromatisation ('NF', sans ail ni poivre).... **p 140**
- Figure 4.8** Cinétiques de protéolyse (indice de protéolyse, IP) mesurées dans les formulations 'contrôle' des deux séries de fabrication, dans la formulation combinant réduction directe en matière grasse animale et en sel (formulation 'S5') et dans celle combinant substitution partielle de la matière grasse animale et du sel par, respectivement, de l'huile de tournesol oléique et du chlorure de potassium (formulation 'K-SFO-RSF'). **p 141**
- Figure 4.9** Taux de lipolyse mesurés dans les formulations 'contrôle' des deux séries de fabrication, dans la formulation combinant réduction directe en matière grasse animale et en sel (formulation 'S5') et dans celle combinant substitution partielle de la matière grasse animale et du sel par, respectivement, de l'huile de tournesol oléique et du chlorure de potassium (formulation 'K-SFO-RSF'). **p 142**
- Figure 4.10** Cinétiques d'oxydation lipidique mesurées dans les formulations 'contrôle' des deux séries de fabrication, dans la formulation combinant réduction directe en matière grasse animale et en sel (formulation 'S5') et dans celle combinant substitution partielle de la matière grasse animale et du sel par, respectivement, de l'huile de tournesol oléique et du chlorure de potassium (formulation 'K-SFO-RSF'). **p 143**
- Figure 4.11** Cinétiques d'oxydation protéique mesurées dans les formulations 'contrôle' des deux séries de fabrication, dans la formulation combinant réduction directe en matière grasse animale et en sel (formulation 'S5') et dans celle combinant substitution partielle de la matière grasse animale et du sel par, respectivement, de l'huile de tournesol oléique et du chlorure de potassium (formulation 'K-SFO-RSF'). **p 144**

Figure 4.12 (a) Classification hiérarchique des juges en fonction des notes d'acceptabilité des 4 critères sensoriels investigués : l'apparence, la texture en bouche, le goût et l'arôme. Trois classes ont été identifiées au seuil choisi (ligne pointillée rouge). (b) Diagramme des notes d'acceptabilité des différents critères sensoriels en fonction des classes de juges. p 150

Figure 4.13 Cinétiques de perte en poids mesurées dans le cas de la formulation 'Contrôle' et de la formulation 'S4' à teneurs réduites en sel et en matière grasse animale. p 156

Figure 4.14 Positionnement des prélèvements des échantillons sur les tranches de saucissons pour les différentes mesures chimiques : teneurs en sel et en eau, et mesures d'activité de l'eau, afin de tracer ensuite les profils. p 156

Figure 4.15 Définition des différents rayons sur une tranche de saucisson donnée qui ont servi au calcul des distances d_0 , d_i et d_n utilisées ensuite pour tracer les profils de teneurs en sel et en eau, et les profils d' a_w p 156

Figure 4.16 Evolution des profils de teneur en eau mesurés en fonction de la distance à partir du centre du produit, pour la formulation 'Contrôle' et la formulation 'S4' réduite en sel et en matière grasse animale, pour 4 temps de fabrication différents : (a) J2, (b) J7, (c) J14 et (d) J29. p 157

Figure 4.17 Evolution des teneurs en sel au cours du séchage en fonction de la distance à partir de la surface du saucisson, pour (a) : la formulation 'Contrôle' et (b) : la formulation 'S4' réduite en sel et en matière grasse animale. p 158

Figure 4.18 Evolution des profils d' a_w mesurés en fonction de la distance à partir du centre du produit, pour (a) la formulation 'Contrôle' et (b) la formulation 'S4' réduite en sel et en matière grasse animale, pour 4 temps de fabrication différents : J2, J7, J14 et J29..... p 159

Figure 4.19 Cinétiques de flux d'eau évaporé calculées en surface des saucissons de la formulation 'Contrôle' et de la formulation 'E4' à teneurs réduites en sel et en matière grasse. p 160

Figure 4.20 Evolution de la diffusivité apparente de l'eau en fonction de la teneur en eau (kg eau/kg matière sèche), respectivement, dans des saucissons correspondant à formulation 'Contrôle', à la formulation 'S4' à teneurs réduites en sel et en matière grasse animale, dans du salami (Muñoz et Comaposada, 2011) et dans du jambon sec (Harkouss, 2014). p 162

Figure 4.21 Prédiction d'une isotherme de sorption pour le saucisson sec selon un lissage par les modèles de (a) Ferro-Fontan et de (b) Peleg. p 164

Figure 4.22 Valeurs des résidus ($a_{w,prédite} - a_{w,mesurée}$) calculés pour quantifier la qualité de la prédiction de l' a_w d'un saucisson, selon les modèles (a) de Ferro-Fontan et (b) de Peleg. **p 165**

Figure 4.23 Comparaisons des valeurs d'activité de l'eau mesurées et prédites par le modèle de Ross dans le cas d'échantillons de saucissons secs, après ajustement du coefficient γ . **p 166**

Liste des tableaux

Chapitre 1 : Revue bibliographique

- Table 1.1** Variations in pH according to the type of fermented sausage manufactured that itself varies according to country and region. **(article n°1)** p 16
- Table 1.2** List of main modifications in the amino acid residue chains and main specific compounds induced by protein oxidation. **(article n°1)** p 30
- Table 1.3** List of main key aroma compounds and associated odours identified in fermented sausages and found in the literature. **(article n°1)** p 33

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

- Tableau 2.1** Détail de la composition en matière grasse animale et en chlorure de sodium des formulations de saucissons secs fabriqués lors de la première série, suite à la mise en place d'un plan d'expériences de Doehlert. Les teneurs en matière grasse et en chlorure de sodium sont exprimées en % par rapport à la matière totale (MT) et ont été étudiées, respectivement, dans la gamme [8,4%-21,0% MT] et [2,0%-2,8% MT]. (*Idem* Table 3.1 **article n°2**) p 46
- Tableau 2.2** Détail de la composition en matière grasse animale et en chlorure de sodium des formulations de saucissons secs fabriqués lors de la seconde série. L'ensemble des teneurs est exprimé en % par rapport à la matière totale (MT), sauf les teneurs en ail et en poivre (aromatisation) qui sont exprimées en g/kg. (*Idem* Tableau 3.5 **article n°2**) p 47

Chapitre 3 : Résultats

- Table 3.1** Details of experiments giving all the formulations of dry-fermented sausages performed in the present study. This list was built from a Doehlert design on the basis of two factors: initial animal fat content in the range [8.4%–21% total matter] and initial salt content in the range [2.0%–2.8% total matter]. **(article n°2)** (*Idem* Tableau 2.1 p 46) p 69
- Table 3.2** Time-course evolution of chemical composition (moisture, sodium chloride and animal fat contents) measured in dry-fermented sausages for the eight formulations of Table 3.1. Measured values were the means \pm standard deviation calculated from six independent determinations. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$). **(article n°2)** p 75

- Table 3.3** Details of statistical analyses: (a) – Analysis of variance and (b) - post-hoc Tukey procedure, performed on the values of physicochemical (weight loss, a_w , pH) and biochemical (proteolysis, lipolysis, lipid and protein oxidations) parameters measured in the dry-fermented sausages for all the formulations of Table 3.1. ANOVA was run to test the effects of time, salt content, fat content and the interaction salt content \times fat content on all the parameters studied. Significance is noted as: ns ($p > 0.05$), * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$), and (-) corresponds to a factor not studied. A Tukey test was applied on the means \pm standard deviation calculated from all independent determinations and for all timepoints. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$). **(article n°2)** **p 78**
- Table 3.4** Odour-active volatile compounds identified in the mix of 5 traditional dry-fermented sausages. **(article n°3)** **p 96**
- Table 3.5** Details of the experimental formulations of dry-fermented sausages tested in this study. Percentages are expressed as a function of total matter, except for flavouring (g/kg). **(article n°4)** (*Idem* Tableau 2.2 p 47) **p 102**
- Table 3.6** Details of statistical analyses: (a) analysis of variance, (b) physical-chemical parameters measured (weight loss, a_w , pH) and (c) post-hoc procedure performed on the values of biochemical parameters (proteolysis, lipolysis, lipid and protein oxidations) for all 7 formulations of dry-fermented sausages. ANOVA was performed to study the effect of time, flavouring, salt content, fat content, sunflower oil (SFO) content, and salt content \times fat content and salt content \times SFO content interactions on the physical-chemical and biochemical parameters studied. Significance is annotated as: ns ($p > 0.05$), * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$), and () indicates a factor not studied. A Tukey test was applied on the means \pm standard deviation calculated from all independent determinations and for all time points. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$). **(article n°4)** **p 108**
- Table 3.7** (a) Texture profile analysis (hardness, cohesiveness, elasticity, fragility) performed in the 7 formulations of 29-day-old dry-fermented sausages. Measured values were means \pm standard deviation calculated from 6 independent determinations. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$). (b) Details of analysis of variance. ANOVA tested the effects of flavouring, fat content, salt content, sunflower oil (SFO) content, animal fat content \times salt content interaction and SFO content \times salt content interaction on the texture parameters studied. Level of significance is annotated as follows: ns ($p > 0.05$), * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$). **(article n°4)** **p 119**

Table 3.8 Key comments formulated by the 29 assessors on the organoleptic characteristics of the dry-fermented sausages for the 7 formulations. (**article n°4**) **p 121**

Chapitre 4 : Discussion générale

Tableau 4.1 (a) Mesures des paramètres de couleur : variation rouge/vert (a^*), variation jaune/bleu (b^*) et variation blanc/noir (L^*) effectuées sur les produits finis des 7 formulations de la seconde série de fabrications. Les valeurs mesurées correspondent aux moyennes \pm écarts-types déterminés à partir de 15 mesures indépendantes. Les valeurs ne portant exposants similaires diffèrent de façon significative ($p < 0,05$). (b) Détails de l'analyse de variance. Les facteurs investigués : aromatisation, teneur en matière grasse animale, substitution du sel, teneur en huile de tournesol oléique, et les interactions teneur en matière grasse animale-substitution du sel et teneur en huile de tournesol oléique-substitution du sel. Le niveau de significativité est annoté comme suit : ns ($p > 0,05$), * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$). **p 148**

Tableau 4.2 Principaux commentaires formulés par les 29 juges sur les caractéristiques organoleptiques des 7 formulations de saucissons secs testées par analyse sensorielle. ... **p 152**

Tableau 4.3 Valeurs des paramètres des équations du modèle de Ferro-Fontan qui donne l'isotherme de sorption spécifique pour le saucisson sec..... **p 164**

Tableau 4.4 Valeurs des paramètres des équations du modèle de Peleg qui donne l'isotherme de sorption spécifique pour le saucisson sec. **p 164**

Tableau 4.5 Valeurs des paramètres calculés rentrant dans les équations des isothermes de désorption de la gélatine et des saucissons secs, selon le modèle de Ross. **p 166**

INTRODUCTION

Dans les pays industrialisés, la demande des consommateurs vis-à-vis de produits alimentaires plus sains et plus naturels est en constante augmentation. Ces dernières années, les industriels ont donc mis à profit cette tendance pour mettre sur le marché des aliments « moins gras », « moins salés », « moins sucrés », « sans phosphate », voire « sans nitrite ». Ces exigences alimentaires ont été au cœur de nombreux projets de recherche et de collaboration entre l'industrie agroalimentaire et les centres de recherche. La présente thèse s'inscrit dans le cadre du projet européen TeRiFiQ¹, coordonné par Christian Salles, chercheur INRA de l'UMR CSGA de Dijon, avec l'appui d'INRA Transfert (Yohan Lecuona). Ce projet rassemble 17 partenaires, associant des centres de recherche, des laboratoires universitaires et des industriels, appartenant à 9 pays européens : Allemagne (CENTIV GmbH), Belgique (Hervé, Brasserie d'Orval), Espagne (Boadas 1880), France (INRA, INRA Transfert, ACTIA, ADRIA, Chazal Groupe), Grande-Bretagne (Institute of Food Research), Italie (Federalimentari Servizi), Norvège (Nofima, Milba, Leiv Vidar), Pays-Bas (Université de Wageningen, Nizo Food Research) et Roumanie (Sativa). Le projet TeRiFiQ vise, par la recherche et l'innovation technologique, une réduction combinée significative de la quantité de sel/matières grasses ou de sucre/matières grasses dans quatre types d'aliments de consommation courante, à savoir les fromages, les produits carnés (saucisses cuites et saucissons secs), les viennoiseries (muffins) et les plats préparés (sauces). D'autre part, pour s'assurer d'une bonne acceptation par le consommateur, les propriétés nutritionnelles et sensorielles de ces produits doivent être conservées, voire améliorées, grâce à des ajustements techniques de leur formulation initiale. Enfin, un des objectifs majeurs de TeRiFiQ est de démontrer que ces nouvelles formulations sont transférables à l'échelle industrielle. Cette thèse a pour thème l'étude de l'effet d'une réduction combinée en chlorure de sodium et en matière grasse animale sur les propriétés physicochimiques, les réactions biochimiques en lien avec la production aromatique et les attributs sensoriels, lors de la fabrication de saucissons secs. Elle s'est déroulée au sein de l'unité Qualité des Produits Animaux (QuaPA) de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Theix, en collaboration avec l'Association pour le Développement de l'Institut de la Viande (ADIV).

Le saucisson sec est une charcuterie crue, fermentée, étuvée, puis séchée. C'est un produit typique, traditionnel et authentique, très consommé en Europe, notamment en Espagne (production de 200 000 tonnes/an) et en France (production de 40 000 tonnes/an). Ce produit

¹ TeRiFiQ: Combining Technologies to achieve significant binary Reductions in Sodium, Fat and Sugar content in everyday foods whilst optimizing their nutritional Quality (Convention de subvention n°289397, www.terifiq.eu)

de charcuterie est aussi fabriqué par plusieurs autres pays méditerranéens et d'Europe centrale. Son nom provient du mot latin « *salsus* », qui signifie viande conservée par salage. Différents types de saucissons secs existent en Europe et sont fabriqués selon des recettes et des technologies qui diffèrent en fonction des pays et des régions. Généralement, ces produits sont fabriqués, en hachant 70% de viande maigre (généralement, de porc et/ou de bœuf) et 25% de matières grasses, surtout de la bardière de porc (lard dorsal). La viande (maigre et bardière de porc) hachée est ensuite mélangée avec 5% d'épices, du sel, des additifs et des ferments, formant ainsi une mûlée. Cette dernière est ensuite embossée dans des boyaux naturels ou artificiels, le tout étant ensuite plongé ou aspergé avec une solution contenant des moisissures (*i.e. Penicillium nalgiovensis, chrysogenum*) et des levures sélectionnées (*i.e. Debaryomyces hansenii*), conduisant à la formation d'une fleur de surface. Enfin, le produit est égoutté, étuvé, fermenté et séché pendant 1 à 10 semaines, selon son diamètre. Industriellement, les étapes d'étuvage et de séchage se font selon des conditions d'humidité, de température et de flux d'air contrôlés. C'est pendant ces étapes que le produit acquiert sa stabilité microbiologique et développe ses attributs sensoriels, suite à l'établissement de nombreux phénomènes physicochimiques (transferts d'eau et de sel, chute de pH et abaissement d' a_w) et biochimiques (protéolyse, lipolyse, oxydation lipidique et oxydation protéique).

Le saucisson sec, comme beaucoup de produits de charcuterie, est une source importante de protéines, de vitamines et de sels minéraux. Cependant, ce produit présente certains inconvénients : il est riche en matière grasse animale (25-45%), en particulier en acides gras saturés, il est très hypercalorique (300-450 kcal/100 g), et aussi, riche en sel, notamment en chlorure de sodium (2,8 à 5%). D'une manière générale, en France, les charcuteries constituent la deuxième source d'apport en sel dans l'alimentation humaine, derrière le pain et les biscottes. Or, dans les pays Européens et d'Amérique du Nord, une surconsommation de sodium, de calories et d'acides gras saturés dans l'alimentation humaine a été étroitement liée au développement de nombreux problèmes de santé comme l'obésité, l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie, certaines maladies cardio-vasculaires et même certains cancers. Afin de limiter le développement de ces maladies chez l'Homme, les organismes de santé publique (par exemple, Département of Health and Human Services, 2005) dans les pays industrialisés ont recommandé de limiter la consommation de sel à 6 g par jour et réduire également l'apport en matières grasses, de façon à ce qu'il représente moins de 30% des calories totales, et de limiter la consommation d'aliments riches en acides gras saturés (AGS) et en cholestérol. Comme les saucissons secs présentent de forts taux de chlorure de sodium et d'acides gras

saturés, il serait bénéfique, du point de vue de la santé humaine, de réduire leur teneur en sel et en matière grasse animale. Cependant, ces deux composants jouent des rôles clés dans la fabrication des saucissons. En effet, le sel assure la sécurité microbiologique en diminuant l'activité de l'eau (a_w) au sein du produit, tout en affectant le déroulement des réactions biochimiques impliquées dans le développement des caractéristiques organoleptiques et sensorielles finales des saucissons secs, tels que la texture, la saveur et l'aspect. D'autre part, la matière grasse animale est considérée dans les produits carnés comme une source précieuse d'énergie, d'acides gras et de vitamines. De plus, les réactions biochimiques qui affectent la fraction lipidique sont également impliquées dans le développement des attributs sensoriels des saucissons secs. Une réduction du taux de sel ou bien celui de la matière grasse animale semble critique vis-à-vis de la qualité finale des saucissons secs. A notre connaissance, une réduction combinée en sel et en matière grasse animale dans ce type de produit n'a été que très peu investiguée, d'où l'intérêt d'étudier l'effet d'une telle réduction sur les propriétés physicochimiques, les réactions biochimiques et les attributs sensoriels de saucissons secs, tout au long du procédé de fabrication (phases d'étuvage et de séchage). Il serait aussi intéressant de tester des approches de substitution partielle du sel et de la matière grasse animale afin d'identifier et de trouver des technologies permettant d'améliorer les qualités nutritionnelles des saucissons secs, tout en conservant leurs qualités organoleptiques et sensorielles.

Ce travail de recherche, qui est présenté sous la forme de quatre publications scientifiques, combine des approches expérimentales qui sont décrites au cours de quatre grands chapitres.

En premier lieu, une revue bibliographique, écrite sous la forme d'un article scientifique (article n°1), présente et détaille plusieurs aspects inhérents à l'élaboration des saucissons secs : le procédé de fabrication, le rôle du sel et de la matière grasse animale, les phénomènes physicochimiques (perte en poids, pH, et a_w) et les phénomènes biochimiques (protéolyse, lipolyse et oxydations lipidique et protéique) qui évoluent pendant toute la durée du procédé. Ces aspects généraux, physicochimiques et biochimiques sont précédés d'une synthèse sur les risques en matière de santé humaine liés à une surconsommation de sel et de matière grasse dans l'alimentation. Cette revue bibliographique détaille également l'effet des réductions en sel et en matière grasse animale sur la production des composés volatils odorants, ainsi que sur les propriétés sensorielles des saucissons secs, notamment l'aspect, la couleur, le goût, la flaveur, l'arôme et la texture. Au final, cette revue bibliographique permet de dégager des pistes permettant de réduire significativement la teneur en sodium et en matière grasse animale des saucissons secs, sans altérer leurs qualités organoleptiques et microbiologiques finales.

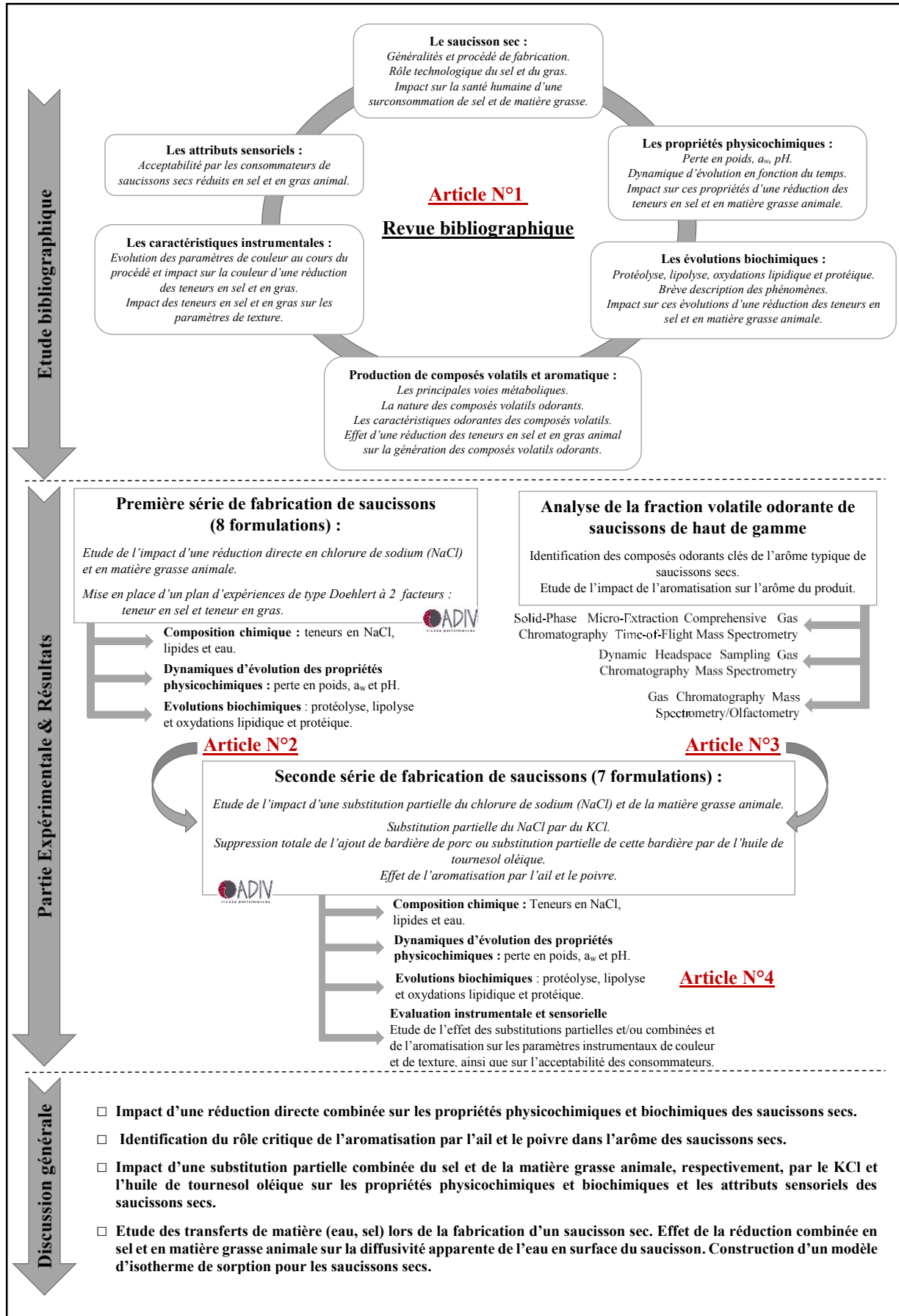
Le deuxième chapitre de cette thèse décrit le procédé de fabrication utilisé, en collaboration avec l'ADIV, pour produire les différentes formulations de saucissons secs, ainsi que la procédure utilisée dans l'approche de substitution de la matière grasse animale par de la matière grasse végétale. Ce chapitre détaille aussi les matériels et méthodes utilisés pour quantifier les compositions chimiques des saucissons secs au cours du temps (teneur en eau, teneur en lipides et teneur en sel), les évolutions physicochimiques (perte en poids, pH et a_w) et biochimiques (protéolyse, lipolyse, oxydations lipidique et protéique). Il présente également les techniques utilisées pour l'identification des molécules volatiles odorantes, ainsi que les protocoles suivis lors des mesures instrumentales de couleur et de texture. Dans cette partie, l'analyse sensorielle et l'acceptabilité des consommateurs vis-à-vis des différentes formulations de saucissons secs sont décrites, ainsi que les traitements et les analyses statistiques appliquées aux résultats obtenus : classification hiérarchique ascendante, analyse de variance (ANOVA) et tests *post-hoc*.

Au cours du troisième chapitre, sont présentés et discutés les principaux résultats obtenus dans ce travail, au travers de trois nouveaux articles. Un des articles (article n°3) présente les travaux conduits afin d'étudier les composés volatils dans des saucissons secs artisanaux de haut de gamme et identifier les composés odorants responsables de l'arôme caractéristique du saucisson sec, ainsi que leurs origines biochimiques ; ceci afin de trouver des leviers technologiques permettant de rehausser, de manière simple, l'arôme de saucissons secs allégés en sel et en matière grasse animale. En s'appuyant sur les résultats de l'article n°3 et sur des résultats préliminaires obtenus par l'ADIV dans le cadre du projet TeRifiQ, deux séries de fabrication de saucissons secs ont été préparées et font l'objet des deux articles suivants (articles n°2 et n°4). L'objectif scientifique de la première série de fabrication (8 formulations) était de quantifier les effets d'une réduction directe du sel et de la matière grasse animale sur la dynamique d'évolution de la composition chimique, des paramètres physicochimiques (perte en poids, pH et a_w) et des réactions biochimiques (protéolyse, lipolyse, oxydation lipidique et oxydation protéique), tout au long de la fabrication de saucissons secs (article n°2). Pour cela, les teneurs en sel et en matière grasse de chaque formulation de cette première série ont été fixées grâce à un plan d'expériences à deux facteurs (plan de Doehlert). Les données issues de cette première série de fabrication ont été aussi exploitées afin de répondre aux questions suivantes : Quel est l'effet d'une réduction directe en sel et en matière grasse sur les transferts d'eau et de sel ? Est-il possible de construire une isotherme de sorption spécifique pour le saucisson sec ?

L'objectif de réaliser la seconde série de fabrication était d'explorer le rôle de l'aromatization (ail et poivre) dans la fabrication du saucisson sec, ainsi que l'effet d'une substitution partielle, combinée ou non, du sel et de la matière grasse animale, respectivement, par du chlorure de potassium (KCl) et de l'huile de tournesol oléique. Au cours de cette seconde série de fabrication, l'effet de ces facteurs a été étudié, comme précédemment, sur la dynamique d'évolution de la composition chimique, des paramètres physicochimiques et des réactions biochimiques tout au long de la fabrication des saucissons secs, mais aussi sur les qualités finales des produits élaborés au moyen de mesures instrumentales (analyse de texture et de couleur) et de dégustations par un panel de consommateurs permettant d'apprécier l'acceptabilité de ces nouvelles formulations. L'ensemble de ces résultats est présenté dans l'article n°4.

Le dernier chapitre de ce mémoire de thèse consiste en une discussion critique et objective des résultats majeurs obtenus dans ce travail, correspondant (1) à une quantification des effets physicochimiques et biochimiques induits par une réduction directe combinée des teneurs en sel et en matière grasse animale lors de la fabrication de saucissons secs, (2) à l'identification des composés odorants-actifs à l'origine de l'arôme typique de saucissons secs de haut de gamme et (3) à une quantification des effets induits par une substitution partielle combinée des teneurs en sel et en matière grasse animale par, respectivement, du chlorure de potassium et de l'huile de tournesol oléique sur les évolutions physicochimiques, biochimiques et des attributs sensoriels des saucissons secs fabriqués. Enfin, une quatrième partie de ce dernier chapitre discute en détail les transferts d'eau et de sel qui s'opèrent pendant le séchage des saucissons secs.

Le schéma de la page qui suit décrit la démarche scientifique qui a été suivie tout au long de cette thèse, tout en mettant clairement en évidence l'articulation entre les différents travaux qui ont été conduits. Ce schéma indique également l'ensemble des publications qui ont été écrites sur la base des travaux bibliographiques et expérimentaux réalisés dans ce travail.



Chapitre 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Introduction

Le saucisson sec est considéré comme un produit typique, traditionnel et authentique par la plupart des consommateurs. Sa fabrication est réalisée à partir d'un mélange de viande maigre et de matière grasse animale (très souvent du gras dorsal de porc, appelé bardière) préalablement hachées, dans lequel sont incorporés plusieurs additifs et ingrédients. La mûlée, ainsi constituée, est ensuite embossée dans des boyaux, ce qui permet, au final, de conserver la viande sous l'action du salage, de la fermentation et du séchage. Les qualités organoleptiques et sensorielles de ce type de produit résultent de divers phénomènes physicochimiques et biochimiques qui se déroulent tout au long du procédé de fabrication, notamment pendant les phases de fermentation et de maturation. Toutefois, compte tenu de son procédé de fabrication, le saucisson sec est un produit carné hypercalorique et très riche en sodium et en acides gras saturés, du fait des fortes teneurs en chlorure de sodium et en matière grasse animale utilisées.

Sur la base des informations précédentes, une étude approfondie du rôle technologique joué par le chlorure de sodium et la matière grasse animale, de l'effet de la teneur de ces deux ingrédients sur le déroulement des réactions biochimiques et des phénomènes physicochimiques, ainsi que les effets sur la santé humaine d'une surconsommation de sodium et d'acides gras saturés, était donc indispensable. Ceci implique que la revue bibliographique traite également de l'effet des réductions en sel et en matière grasse animale sur l'évolution des propriétés physicochimiques comme la perte en poids, l'activité de l'eau (a_w) et le pH, mais aussi sur les réactions biochimiques qui se déroulent lors de la fabrication du saucisson sec, notamment celles qui sont impliquées dans l'arôme et les attributs sensoriels du produit fini. Ces réactions biochimiques rassemblent les réactions enzymatiques de protéolyse et de lipolyse qui sont dues à l'action des enzymes protéolytiques et lipolytiques, ainsi que les modifications chimiques correspondant aux réactions d'oxydations lipidique et protéique, dont les évolutions et l'intensité sont conditionnées par les teneurs en sel et en matière grasse des produits fabriqués.

En résumé, la revue bibliographique qui est présentée sous la forme d'un article scientifique, s'attache à faire un point précis, d'une part, sur le procédé d'élaboration du saucisson sec, en faisant un focus sur les rôles technologiques du sel et de la matière grasse animale et sur les effets sur la santé humaine d'une surconsommation de ces deux ingrédients, et d'autre part, sur les modifications physicochimiques et biochimiques qui surviennent pendant l'élaboration du produit, notamment celles qui sont en lien avec la production aromatique et

l'évolution des propriétés sensorielles des saucissons secs. La revue présente aussi les leviers technologiques possibles pour réduire directement ou substituer partiellement les teneurs en sodium et en matière grasse animale d'un saucisson sec, tout en faisant le point sur l'impact de ces réductions sur l'évolution des propriétés physicochimiques, de certains paramètres biochimiques (protéolyse, lipolyse, oxydations protéique et lipidique), de la production des composés volatiles et aromatiques, ainsi que sur les attributs sensoriels (apparence, couleur, flaveur, odeur, goût et texture) des produits finaux.

1.2. Article n°1 (projet à soumettre à Critical Reviews in Food Science and Nutrition)

Effect of direct salt and fat reductions or partial substitutions on the physicochemical, biochemical, aromatic and sensory properties of dry-fermented sausages: A review

Hassan Safa^a, Philippe Gatellier^a, Pierre-Sylvain Mirade^a

^aINRA, UR370 Qualité des Produits Animaux, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France.

Abstract

In many countries worldwide, meat processing, for example the dry-fermenting of sausages, is a standard method of conservation. Today the healthiness of these products, which are rich in fat, especially in saturated fatty acids, and in sodium chloride, has been challenged. An excessive intake of sodium and saturated fatty acids has been linked to some severe human health problems such as hypertension, increased risk of cardiovascular diseases, obesity and some types of cancer. Hence reducing salt and fat during dry-sausage manufacture could benefit consumer health. This review first presents the technological functions of salt and fat in dry sausage manufacture, and the main health problems related to an overconsumption of salt and fat in the human diet. We then broadly review the main studies dealing with direct salt and fat reduction or partial substitution during dry-fermented sausage manufacture, with the particular aim of assessing how and to what extent reducing the content of these two ingredients affects the physicochemical properties (pH, weight loss, and water activity), biochemical reactions (proteolysis, lipolysis, and lipid and protein oxidations), production of volatile and aromatic compounds, and sensory attributes (appearance, colour, taste, flavour, and texture) of dry sausages.

Keywords: dry-fermented sausages; salt; fat; reduction; partial substitution.

Introduction

Dry-fermented sausage manufacture is an important food industry sector in Europe, especially in Spain and France. In 1992, the Spanish production of sausages amounted to about 170,000 metric tons/year (Edwards et al., 1999), and in 2006, in response to an increasing demand from consumers and tourists, it reached 200,000 tons, approximately one-fifth of the Spanish production of all meat products (Martin-Sanchez et al., 2011). In France, the same production amounted to about 40,000 metric tons/year. Many tons of dry-fermented sausages are also produced by other Mediterranean and central European countries (Hoz et al., 2004). In Mediterranean countries with a dry climate like Spain, Italy, France, Portugal and Turkey, dry-fermented sausages are one of the oldest ways of preserving meat. The word sausage comes from the Latin “*salsus*” (salted) (Pérez-Alvarez et al., 1999). Dry-fermented sausages are produced according to different recipes and technologies, depending on the country and region. They are manufactured by mincing 70% total matter (TM) of lean meat (pork or beef) and 25% TM of fat, especially pork backfat, and mixing them with 5% TM of spices, curing agents, additives, and starter cultures; the batter obtained is then pushed into natural or artificial casings, before undergoing fermentation, steaming and drying (Pérez-Alvarez et al., 1999; Olivares et al., 2009). Figure 1.1 shows how French dry-fermented sausages are currently manufactured.

Dry-fermented sausages like other meat products are an important source of proteins, vitamins and minerals (Jiménez-Colmenero et al., 2001; Josquin et al., 2012). However, these products are also rich in animal fat (25–45% TM) especially saturated fatty acids (SFAs), high in energy content (300–450 kcal/100 g) and salt content, notably in sodium chloride (2.8–5% TM) (Muguerza et al., 2004, Ruiz-Capillas et al., 2012). An excessive consumption of these constituents has been correlated with some severe human health problems such as obesity, some types of cancers, high blood pressure, high blood cholesterol, and coronary heart disease (García et al., 2002). Here we review studies dealing with salt and fat reduction or partial substitution during dry-fermented sausage manufacture with the particular aim of assessing how and to what extent modifying the content of these two ingredients affects the physicochemical properties, biochemical reactions, aromatics production and sensory attributes of dry-fermented sausages. We first recall the positive technological functions of salt and fat during dry sausage manufacture and summarize the main human health problems arising from overconsumption of salt and fat in the human diet.

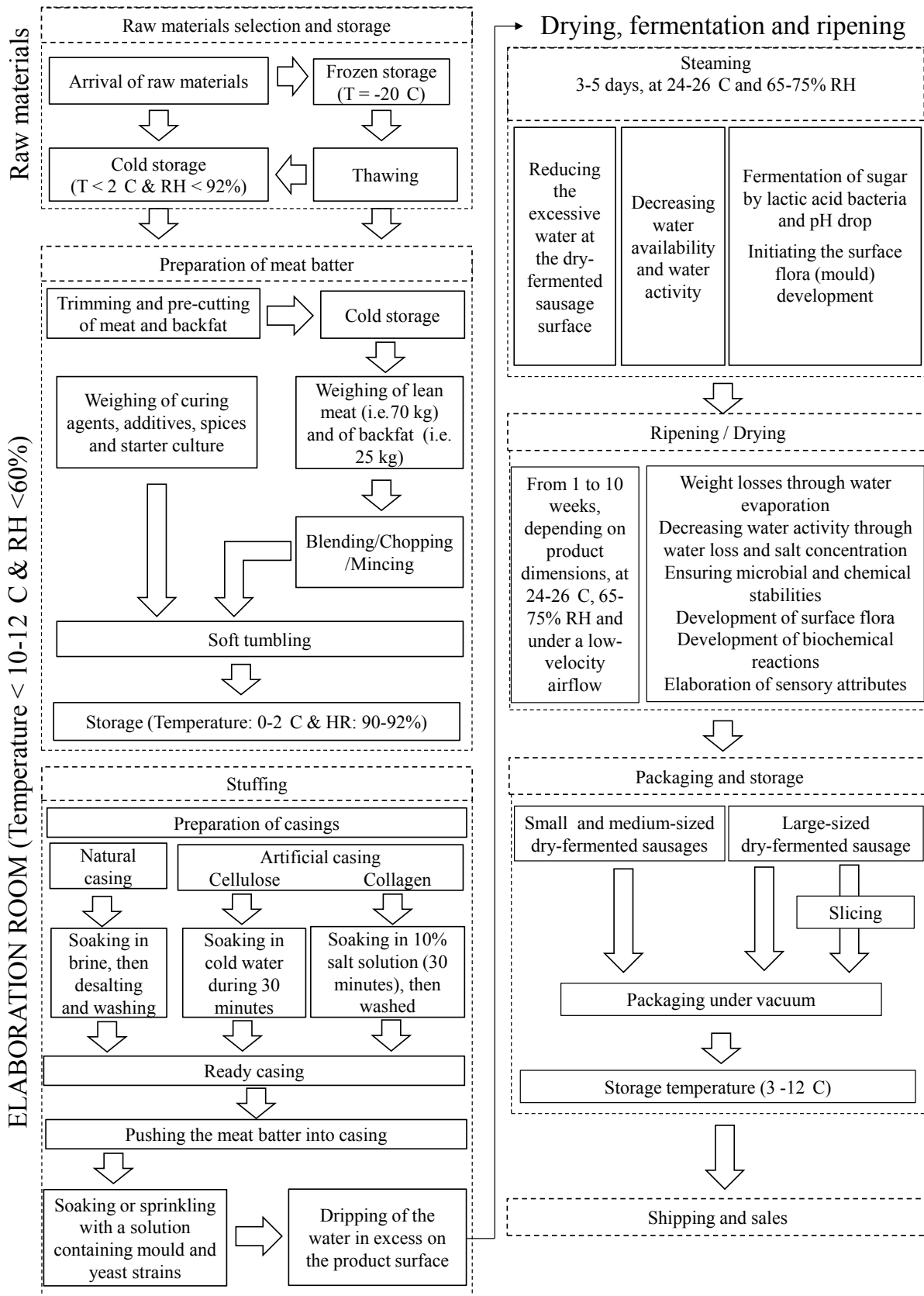


Figure 1.1 Detailed schematic illustration of how dry-fermented sausages are commonly manufactured in France.

Technological roles played by salt and fat

In processed foods, salting has become an important issue. Salt plays many roles in food products. Salt is hygroscopic, i.e. it is able to capture water molecules: when added to a food product, it tends to pick up water molecules and thus significantly depress water availability in foods, thereby lowering water activity (a_w) (Ruusunen and Puolanne, 2005). Salting is thus of interest to manufacturers, because adding salt artificially increases product mass by increasing water retention, and so food products with the same meat content can be sold at a higher price. This hygroscopic behaviour also has a bacteriostatic effect, because most bacteria need a certain amount of available water to grow. Bacterial growth is impossible on a salted food with low a_w . Industrial operators thus use salt to artificially reduce a_w in foods and increase their conservation and shelf-life. This method of preservation is used mainly for meat products, especially in dry-cured ham and dry-fermented sausages. In addition, salt is considered as a flavour and taste enhancer, because it impacts the perception of flavour and taste by acting as a neurotransmitter and by stimulating hedonism. It is known that sodium ensures the transmission of nerve impulses of sensory information (flavour, taste, etc.) to the brain. Salt is also involved in the development of other sensory attributes such as colour, appearance and texture. Sodium chloride impacts the texture of meat products by causing the solubilisation of myofibrillar protein and increasing their hydration and water-binding capacity (Desmond, 2006).

Fat added to a food product plays three roles. First, fat is a major source of essential fatty acids (Coutron-Gambotti and Gandemer, 1999; Gandemer, 2002; Zanardi et al., 2004). For example, in dry-fermented sausages, fat is hydrolysed by lipases into free fatty acids such as linoleic and oleic acids, which are needed by the human body (Zanardi et al., 2004). Fat is also the main source of vitamins, specifically liposoluble vitamins, such as vitamin A (retinol), which is involved in human growth and vision, and which contributes to a healthy skin and mucous membranes, vitamin D, necessary for calcium uptake by bone, vitamin E, which has an antioxidant function, and vitamin K, which is essential for blood clotting (García et al., 2002; Muguerza et al., 2002; Campagnol et al., 2012a). Fat is also the most concentrated source of energy, 1 g of fat providing 9 kcal or 36.7 kJ (García et al., 2002; Olivares et al., 2010a). In meat products, fat plays an important role in the development of sensory attributes such as flavour, juiciness and texture. As regards flavour and juiciness, fat is the main precursor of volatile compounds and is a solvent for other aromatic compounds. Fat also modifies the perception of flavour compounds and increases in-mouth coating and the feeling of satiety during meal intake (García et al., 2002). Regarding texture, fat content influences the

rheological, structural and binding properties of dry-fermented sausages. Granulated fat content also modifies the drying process, because high fat content slows down weight loss during drying, yielding softer end-products (Olivares et al., 2010a; Mora-Gallego et al., 2013). From a basic economic point of view, fat reduces the cost of food product manufacture, because it is cheaper than lean meat and yields end-dry products that contain more water. This is of interest to manufacturers because it increases product mass, and so products with the same meat content can be sold at a higher price.

Relationship between excessive salt and fat consumption and human health

Despite the progress made in recent decades, many health problems remain a worldwide concern. In industrialized countries these problems include high blood pressure (hypertension), which can lead to cardiovascular diseases (Ibañez et al., 1995; Gelabert et al., 2003; He and MacGregor, 2010; Zanardi et al., 2010), and some cancers such as stomach cancer (Gimeno et al., 2001a; Stollewerk et al., 2012). These human health disorders have often been correlated with overconsumption of salt (Guardia et al., 2006; Ruusunen and Puolanne, 2005; Tuomilehto et al., 2001a, 2001b). Several reports evaluate the cost of cardiovascular diseases related to hypertension at 169 B€ per year in the European Union, and at about 403 B\$ for 2006 in the United States (Desmond, 2006). In Europe, total dietary sodium intake ranges between 3.5 and 5 g per day (9–12 g salt) (Ruusunen and Puolanne, 2005), with more consumed by males than by females (about 9.9 g of salt per day vs. 6.8 g). To offset the development of sodium-related health problems, human health organizations have recommended limiting daily sodium chloride intake to 6 g (US Department of Health and Human Services, 2005). Most sodium chloride intake currently comes from processed foods, especially processed meats, which represent about 12–24% of total intake. For instance, sodium intake from cured and processed meats is estimated to be about 20.5% in Ireland, 20.8% in UK and 21% in USA (US Department of Health and Human Services, 2005). From a human health standpoint, reducing sodium in meat products is thus of great potential interest (Ruusunen and Puolanne, 2005; Guardia et al., 2006, 2008). In 2008, the European Union (EU) implemented salt reduction initiatives to induce consumers to adapt to a decreasingly salty taste in four food product categories: processed meat, bread, cheese and ready-to-eat meals; a salt reduction of 4% per year over 4 years was suggested (Commission, 2008). In some products, salt reduction merely means a less salty taste, but in processed products the change is more complex, especially in processed meats, in which reducing salt content can generate microbiological hazards and technological problems (Taormina, 2010).

Excessive fat intake has been linked to obesity, high blood cholesterol and coronary heart disease (García et al., 2002; Muguerza et al., 2003; Josquin et al., 2012). Today about 40% of total calorie intake comes from fat, especially from animal fat, which is very rich in SFAs and cholesterol, the overconsumption of which is considered a primary cause of hypercholesterolemia. This in turn is a major factor in the development of cardiovascular diseases, especially coronary heart disease (Severini et al., 2003; Valencia et al., 2007). By contrast, monounsaturated fatty acids (MUFAs) and polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are negatively correlated with increased risk of coronary heart disease. PUFAs, especially *n*-3 PUFAs, have beneficial effects on human health, by reducing plasma LDL-cholesterol (Muguerza et al., 2003). It has also been found that in Mediterranean populations, the incidence of heart disease is relatively low due to a diet high in MUFA-rich olive oil (Severini et al., 2003). Other studies show that PUFAs have an anti-arrhythmic effect, improve serum lipid profile, and slow the development of cardiovascular diseases. They also have beneficial effects on diabetes by improving insulin sensitivity (Muguerza et al., 2003). According to Ruxton et al. (2005), *n*-3 PUFAs have beneficial effects on cardiovascular health, on several forms of cancer, play an important role in the brain, and are involved in diseases with an immunoinflammatory component. However, other PUFAs such as *n*-6 PUFAs, which occur in seeds, fowl, pork and vegetable oils, can have an adverse effect on human health, and their excessive consumption favours thrombosis and inflammation (Covington, 2004; Josquin et al., 2012). The nutritional quality of the lipid fraction of food is described by two ratios, P/S and *n*-3/*n*-6 ratios. P/S is the ratio of polyunsaturated to saturated fatty acids, and *n*-3/*n*-6, the ratio of omega-3 to omega-6 PUFA families. To guard against excessive consumption of SFA, health organizations recommend a P/S ratio of between 0.4 and 0.5 (Enser et al., 2000; Ansorena and Astiasarán, 2004a; Wood et al., 2004). In industrialized countries, an *n*-3/*n*-6 ratio in the range 15–20 is generally observed: the recommended value is 4–5 (Wood et al., 2004). For these reasons, some world health organizations have advocated reducing SFAs, cholesterol, and calorie intakes by reducing fat intake to below 30% of total calories. As previously stated, meat products supply 40–50% of total calories, and are an important source of fat, SFAs and cholesterol (Severini et al., 2003; Ferguson, 2010; McAfee et al., 2010;). For example, dry sausages present a high energy content (Jiménez-Colmenero et al., 2013) and are very rich in SFAs and cholesterol, especially because the drying process leads to a fat (and salt) concentration that can peak at 50% TM at the end of drying. For these reasons, the meat industry is endeavouring to make healthier dry-cured meat products. However, reduction in fat content is limited because fat, like

salt, plays important technological and sensory roles in the fabrication of dry-fermented sausages.

In recent years, many studies have thus focused on partial substitution of the animal fat and sodium chloride by other lipids, such as vegetable oils (Sandrou and Arvanitoyannis, 2000; Jiménez-Colmenero et al., 2001; Muguerza et al., 2004) or incorporation of high *n*-3 PUFA-replacers such as fish oil or marine food products (Moghadasian, 2008), and other salts such as potassium chloride (Corral et al., 2013) or salt mixtures (Zanardi et al., 2010), or by applying alternative processing techniques such as high pressure processing and hot processing (Verma and Banerjee, 2011).

Effect of salt and fat contents on the physicochemical properties of dry-fermented sausages

Effect on pH

In food products, pH is an important physicochemical parameter because it affects biochemical mechanisms and helps determine shelf life and sensory attributes of food products. In dry-fermented sausages, pH falls, ensuring microbiological stability by acting as a barrier against the proliferation of pathogenic microorganisms and spoilage bacteria. Dry-fermented sausage production is successfully achieved when lactic acid bacteria (LAB) and *Micrococcaceae* populations are dominant (Muguerza et al., 2002; Liaros et al., 2009). LAB counts increased rapidly during the first 4 days of fermentation, from 5.5 to about 8.5 log₁₀ cfu/g, and then remained constant (Liaros et al., 2009). These bacteria are involved in the fermentation process, during which they convert carbohydrates previously added to the meat batter into organic acids, especially lactic acids, thus lowering pH; a strong negative correlation ($r^2 = 0.894$, $p < 0.001$) was found between pH drop and increase in LAB (Liaros et al., 2009). This acidification during fermentation also causes the coagulation of myofibrillar proteins and so the formation of a protein gel, which contains the granulated fat (Olivares et al., 2009). During the fermentation and drying stages, the pH time course displays four phases (Figure 1.2). First, a latency period corresponding to the adaptation of LAB to their new environment, i.e. the meat batter. Second, an exponential growth of LAB and of lactic acid production, leading to a fast pH decrease. Third, the rest of the fermentation stage and the ripening period, when the pH remains stable. This can be explained by LAB inactivation due to excessive acidity or to exhaustion of sugar. Fourth, a possible slight increase in pH as a result of consumption of lactic acid by the moulds present in the products and/or the production of alkaline compounds due to proteolysis. How

pH varies in time depends on many factors such as the sugar fraction concentration and the reactivity of micro-organisms added during dry sausage manufacture (Figure 1.2).

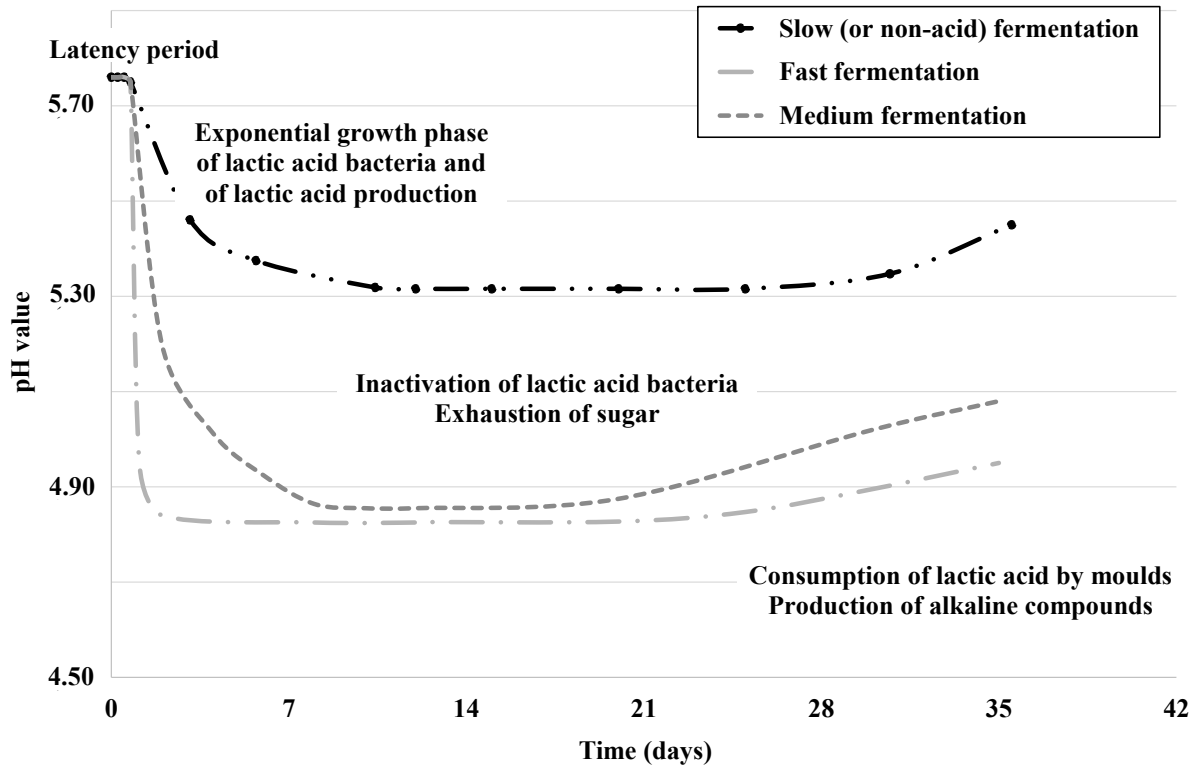


Figure 1.2 Typical time course of pH values in dry-fermented sausages as a function of the type of fermentation: slow or non-acid, medium and fast.

As shown in Table 1.1, pH varies according to both the type of sausage and the region and country where the sausage is manufactured.. In Spanish dry-fermented sausages such as chorizo and salchichón, final pH values range from 4.4 to 5.6 (Gimeno et al., 2000; Fanco et al., 2002; Salgado et al., 2006; Herrero et al., 2007), whereas in other Spanish dry sausages such as androlla, fuet or mini-fuet, higher pH values are encountered (Fanco et al., 2002; Herrero et al., 2007). In Greek dry-fermented sausages, final pH values are about 4.6–5.1 (Papadima and Bloukas, 1999; Ambrosiadis et al., 2004; Drosinos et al., 2005; Rantsiou et al., 2005). In Portuguese dry-fermented sausages, higher pH values are found, with values in the range 5.1–6.0 (Roseiro et al., 2008, 2010), whereas in sucuk, a Turkish ripened sausage, pH is even higher, with values in the range 5.2–6.3 (Ercoskun and Özkal, 2011; Kabak and Dobson, 2011).

Table 1.1 Variations in pH according to the type of fermented sausage manufactured that itself varies according to country and region.

Sausage	Origin	pH at fermentation stage	pH at the end of ripening	Previously reported by ^A
Chorizo (Pamplona, cebolla, etc.)	Spain	-	4.39-5.10	1-3
Androlla	Spain	5.47	5.50-5.60	4
Salchichon	Spain	-	4.40-5.62	3
Fuet	Spain	-	5.24-6.65	3
Salami	Spain	-	4.21-4.65	3
Mini-fuet	Spain	-	5.84-6.17	3
Non-acid fermented sausage	Spain	5.30	5.75	5
Dutch-style	Netherlands	4.30	4.50-4.67	6-7
Greek traditional sausages (no sugar)	Greek	-	4.61-5.00	8-9
Greek traditional sausages	Greek	4.74-4.97	4.78-5.10	10-11
Painho de Portalegre	Portugal	-	5.10-5.50	12
Chouriço grosso de Estremoz e Borba PGI	Portugal	-	5.44-6.02	13
Sucuk	Turkey	4.83	5.20-6.31	14-15
Naples-type salami	Italy	4.80	5.60-5.70	16
Sausages from north-east Italy	Italy	5.50	5.62-5.73	11,17
Varzi	Italy	5.30	6.57	18
Brianzzone	Italy	4.90	5.99	18
Piacentino,	Italy	5.34	6.62	18
Sicilian salami	Italy	-	6.25-6.35	19
Milano-type dry fermented sausage	Italy	4.85	4.87-4.92	20
Sausages from Hungary	Hungary	5.40	5.60	11
Saucisson sec	France	-	5.4-6.3	21
Frankfurters	Germany	-	6.24-6.56	22
Chinese sausage	China	-	6.30-6.60	23

^A Previously reported in dry-fermented sausages by: 1: (Gimeno et al., 2000); 2: (Salgado et al., 2006); 3: (Herrero et al., 2007); 4: (Fanco et al., 2002); 5: (Mora-Gallego et al., 2014); 6: (Josquin et al., 2012); 7: (Pelser et al., 2007); 8: (Papadima and Bloukas, 1999); 9: (Ambrosiadis et al., 2004); 10: (Drosinos et al., 2005); 11: (Rantsiou et al., 2005); 12: (Roseiro et al., 2008); 13: (Roseiro et al., 2010); 14: (Ercoşkun and Özkal, 2011); 15: (Kabak and Dobson, 2011); 16: (Mauriello et al., 2004); 17: (Comi et al., 2005); 18: (Di Cagno et al., 2008); 19: (Moretti et al., 2004); 20: (Tabanelli et al., 2013); 21: (Rason et al., 2007); 22: Lopez-Lopez et al., 2009); 23: (Tan et al., 2007).

Several studies have reported the effect of salt and fat reductions and/or salt and fat substitutions on LAB count, carbohydrate hetero-fermentation and thus pH evolution. For salt reduction and substitution, conflicting data were found. For example, Stahnke (1995) and Olesen et al. (2004) found lower pH values during the fermentation stage in salt-reduced dry-fermented sausages. By contrast, no significant effect on pH evolution and ultimate pH value was found when salt-reduced slow-fermented sausages were manufactured (Corral et al., 2013). Several studies have focused on partially replacing sodium chloride by other salts or a mixture of salts. Corral et al. (2013) showed that partial substitution of NaCl (16%) by KCl affected neither LAB population, nor the evolution of pH, nor its final value. Guardia et al. (2008) confirmed that adding KCl in dry-fermented sausages did not affect LAB count or final pH value. These results are consistent with those published by Ibañez et al. (1995), Gimeno et al. (2001b) and Gelabert et al. (2003), who found no significant differences between pH in control dry sausages and in sodium-reduced potassium-added dry sausages. Other studies were carried where sodium chloride was replaced by divalent cations such as magnesium chloride and calcium chloride. Gimeno et al. (2001a) report that partially replacing sodium chloride by calcium ascorbate led to a decrease in final pH value and to higher LAB counts, especially when a 50% substitution was made. These authors attributed this difference to the fact that calcium ascorbate reduced the redox potential: low redox potential enhances LAB development and leads to higher carbohydrate fermentation and lower pH. In literature reports, sodium chloride has also been replaced by a mixture of chloride salts. For instance, Zanardi et al. (2010) manufactured dry-fermented sausages using the following salt mixture: NaCl 13.5 g/kg, KCl 4.2 g/kg, CaCl₂ 2.4 g/kg, and MgCl₂ 2.4 g/kg, giving an ionic strength equivalent to that of 27 g/kg NaCl. These authors found this mixture to have no effect on pH or LAB evolution. By contrast, Gimeno et al. (2001b) found a greater pH decrease in an NaCl-reduced formulation manufactured with a mixture of NaCl (10 g/kg), KCl (5.52 g/kg), MgCl₂ (2.35 g/kg), and CaCl₂ (4.64 g/kg). Salt substitution can also be performed by replacing NaCl with potassium lactate (K-lactate). However, incorporating a high level of K-lactate leads to greater pH values (Gelabert et al., 2003; Guardia et al., 2008). Finally, salt can be replaced by glycine with no significant effect on pH (Gelabert et al., 2003).

Conflicting data are also reported in the literature for animal fat reduction. In some studies, animal fat was simply directly reduced without addition of other components. Liaros et al. (2009) found no significant differences in either LAB counts or final pH value between high-fat (control) and low-fat (10% fat) dry products. These results were in line with those of

Papadima and Bloukas (1999) and Muguerza et al. (2001), who also found no significant effect of fat level on pH or LAB counts. Likewise, García et al. (2002) failed to find any difference in pH between traditional sausages and low-fat sausages containing cereal or fruit fibre. By contrast, several authors report an effect of fat level on pH. For example, faster pH decline is reported in low-fat sausages by Olivares et al. (2010a), although pH was significantly lower in dry sausages made with high amounts of pork backfat compared with lean products, as reported by Mora-Gallego et al. (2013).

In addition to a direct reduction, another strategy used to reduce animal fat content consists in partially substituting animal fat by vegetable oils or other substances. For example, Muguerza et al. (2001) replaced pork backfat by virgin olive oil pre-emulsified with soy protein, but failed to find any effect either on LAB counts or on pH change or end pH value. However, Severini et al. (2003), who replaced animal fat by 33%, 50% and 66% of extra virgin oil, report significant differences between the pH values for various formulations at all times, except at the end of ripening. Some difference in pH values between animal fat-reduced products and traditional ones were also found when pre-emulsified soy oil was used as fat replacer (Muguerza et al., 2003). By contrast, using 5% of sunflower oil to replace pork backfat in the case of non-acid fermented sausages did not modify the pH time course (Mora-Gallego et al., 2013). Similar results were obtained in Chinese sausages made with extract of yam (*Dioscorea alata*), the tuber of a perennial plant high in protein and low in fat content (Tan et al., 2007), and also in Dutch-style sausages made with a high omega-3 content through the inclusion of fish oil (Josquin et al., 2012). Finally, amorphous cellulose and konjac gel have also been used as fat replacer: Campagnol et al. (2012b) found that sausages made with 50, 70 and 100% amorphous cellulose gel had a lower final pH, probably as a result of a faster LAB growth in modified products. By contrast, Ruiz-Capillas et al. (2012) found higher initial pH values in modified products containing 50% and 80% konjac gel, but similar pH values at the end of ripening. They attributed this trend to a higher pH of the konjac gel compared with animal fat.

Finally, some studies have focused on the combined effect of salt and fat reductions in dry sausages. Beriain et al. (2011) studied the effect of olive oil emulsified alginate on the physical and chemical properties of low-salt, inulin-enriched sausages: they found a greater pH drop in modified sausages, probably due to the use of CaCl₂ in the formulation containing olive oil emulsified with alginate, and to a higher initial acidity of vegetable oil compared with pork backfat.

Effect on product weight loss

The successful production of dry-fermented sausages depends not only on the fermentation stage, but also on the ripening period during which dry-fermented sausages reach their desired characteristics. Dehydration of dry-fermented sausages is the main event that takes place during these stages: about half of the initial water content is lost through evaporation. This process is very important because product price, microbiological safety (shelf life) and biochemical reactions, and thereby sensory attributes such as texture, taste and aroma profile depend on the water loss kinetics. As previously stated, salt content affects the solubility and binding capacity of proteins, and so the drying process. Thus reducing salt necessarily impacts the water loss process. Concerning the effect of salt substitution on weight loss, conflicting data are found in the literature. For example, Gimeno et al. (2001b) found no significant differences in the moisture content of end-products when NaCl was partially replaced by a mixture with an equivalent ionic strength. Flores et al. (2005) and Zanardi et al. (2010) also found no significant difference in equilibrium water content between sodium-reduced dry-fermented sausages and classical products. By contrast, using a high amount of KCl or K-lactate as salt replacers leads to a slight difference in final moisture and loss process: lower moisture content was found in products manufactured with a high amount of KCl, while higher water content was found in sausages produced with a high percentage of K-lactate (Guardia et al., 2008). Comaposada et al. (2007) report lower equilibrium water content in meat mixtures with KCl, but higher moisture content in those prepared with K-lactate. Lower moisture content was also found in sausages containing 40% of KCl (Gelabert et al., 2003), thus confirming the results obtained in dry-cured ham when partial replacement of NaCl by KCl was performed (Leak et al., 1987).

Concerning fat level and its replacement, several studies state that reducing fat level led to faster and higher water losses (Bloukas et al., 1997; Papadima and Bloukas, 1999; Muguerza et al., 2002; Liaros et al., 2009; Mora-Gallego et al., 2013). However, Olivares et al. (2010a) found no significant effect of fat content on weight loss during the first 50 days, attributing this difference in water loss kinetics to the fact that their sausages were ripened under slow ripening conditions. Regarding fat replacement, several studies highlight a delay in the water loss when fat was replaced with vegetable oils in liquid form (Bloukas et al., 1997; Mora-Gallego et al., 2013). These authors explained these results by the fact that the liquid oil coated each particle of ground meat and prevented the release of water. However, no effect on product weight loss was found in the case of partial substitution of animal fat by pre-emulsified olive oil with soy protein (Muguerza et al., 2002). Furthermore, using amorphous cellulose gel or konjac gel led

to higher weight loss due to higher initial water content in these components. Finally, Liaros et al. (2009) report that packaging can mitigate the higher weight loss in low-fat sausages.

The weight loss intensity therefore depends on salt content and the nature of the salt, i.e. on the ionic strength. It also depends on fat level and nature, on how the fat replacer was incorporated, and also on the ripening and storage conditions (temperature, humidity, time and packaging).

Effect on product water activity

Water activity (a_w) is an important physicochemical parameter in processed food products such as dry-fermented sausages. Preservation of these types of meat products is mainly based on decreasing water activity to limit the proliferation of pathogenic bacteria and spoilage microorganisms. For example, decreasing a_w below 0.92 efficiently limits the development and growth of *Listeria monocytogenes*. As previously stated, during the fermentation and ripening stages, dry-fermented sausages lose water as result of evaporation from the product surface, which in turn causes salt concentration. Water availability and thus a_w therefore decrease throughout dry-fermented sausage processing. In conventional sausages, a_w decreases gradually, to reach a final value of about 0.88–0.90.

Reducing or partially replacing sodium chloride with other salts can affect the drying process of fermented sausages and consequently the time-course of a_w . Roseiro et al. (2008) report that salt-reduced dry-fermented sausages showed higher a_w values at the end of processing. Higher a_w values were also reported in 50% sodium-reduced dry-fermented sausages (Olesen et al., 2004). However, Corral et al. (2013) found some differences in a_w at 9 days, but not at the end of processing. Campagnol et al. (2012a) report that replacement of NaCl with KCl led to higher a_w values, thus confirming previous results obtained by Ibañez et al. (1995) and Gimeno et al. (2001b). By contrast, Corral et al. (2013) found no significant difference in a_w values when 16% of NaCl was replaced by an equivalent percentage of KCl. Finally, Zanardi et al. (2010) report that replacement of salt with the following salt mixture: NaCl 13.5 g/kg, KCl 4.2 g/kg, CaCl₂ 2.4 g/kg, and MgCl₂ 2.4 g/kg, giving an ionic strength equivalent to that of 27 g/kg NaCl, did not affect a_w any time in the process. Thus a_w depends mainly on salt content and nature (ionic strength), and also on the intensity of water loss.

Regarding fat reduction, as often, the literature reports conflicting data. Liaros et al. (2009) found lower water activity (0.869) in low-fat sausages, especially when sausages were not packaged, in comparison to traditional ones (0.904). These results are inconsistent with those of Olivares et al. (2010a) who reported higher a_w in low-fat sausages, especially at 9 days of

process, and those of García et al. (2002) who found no significant difference in a_w values in low and high-fat sausages manufactured with cereal and fruit fibre. Concerning fat substitution, the literature shows that a_w depends strongly on the nature of fat used for the substitution, and on the percentage of fat incorporated. For example, in Chinese sausages, replacing pork backfat with yam extract led to higher final a_w (Tan et al., 2007). Partially replacing fat by sunflower oil or diacylglycerols (DAG) led to slight higher a_w values (Mora-Gallego et al., 2013). Partial substitution of fat by olive oil led to higher final a_w (Severini et al., 2003). By contrast, when fat was partially replaced with konjac gel, lower a_w values were found in dry-fermented sausages (Ruiz-Capillas et al., 2012), whereas no significant difference was noted when pork backfat was partially replaced with amorphous cellulose gel (Campagnol et al., 2012b). Hence besides their strong dependence on ionic strength, the dry sausage a_w values also depend on fat content and nature.

Effect of salt and fat contents on biochemical evolution in dry-fermented sausages

Meat and meat products are complex solid matrices rich in proteins, lipids and carbohydrates. The nutritional value and sensory attributes of meat products depend strongly on how biochemical reactions such as lipolysis, proteolysis, sugar fermentation and oxidation occur. In this section, we will discuss in depth the biochemical reactions that take place in dry-fermented sausages, and how these reactions are impacted by fat and salt reduction/substitution.

Effect on proteolysis

In meat products, proteolysis can be defined as a group of reactions that target proteins, causing their degradation by proteolytic enzymes (proteases) such as cathepsins (cathepsin B, L, H and D) and calpains, which are mainly endogenous enzymes, but can also be produced by microorganisms (Toldrá and Etherington, 1988; Parreño et al., 1994; Toldrá, 1998, Toldrá and Flores, 2000; Luccia et al., 2005; Casaburi et al., 2008). Proteolysis goes through several consecutive stages (Figure 1.3). First, myofibrillar proteins, i.e. myosin and actin, are hydrolysed by calpains and cathepsins into intermediate size polypeptides, which are then degraded into free amino acids by the action of dipeptidyl peptidase (DDP), tripeptidyl peptidase (TTP), dipeptidases, aminopeptidases and carboxypeptidases. The main changes occurring during this process are the degradation of myofibrils through the z-disc, the degradation of neublin, titin and desmin and the appearance of two intermediate size polypeptides (95 and 30 kDa) (Flores et al., 1998). On the other hand, Monin et al. (1997) showed that during the ripening stage of dry-cured ham, the main modifications were detected

in myosin heavy chain (MHC), troponin C and I, and in myosin light chain by the formation of 50–100 and 14.4–45 kDa fragments. Zhao et al. (2008) demonstrated that more than 90% of the non-protein nitrogen (NPN) compounds coming from protein degradation were free amino acids and peptides of less than 1 kDa in molecular weight.

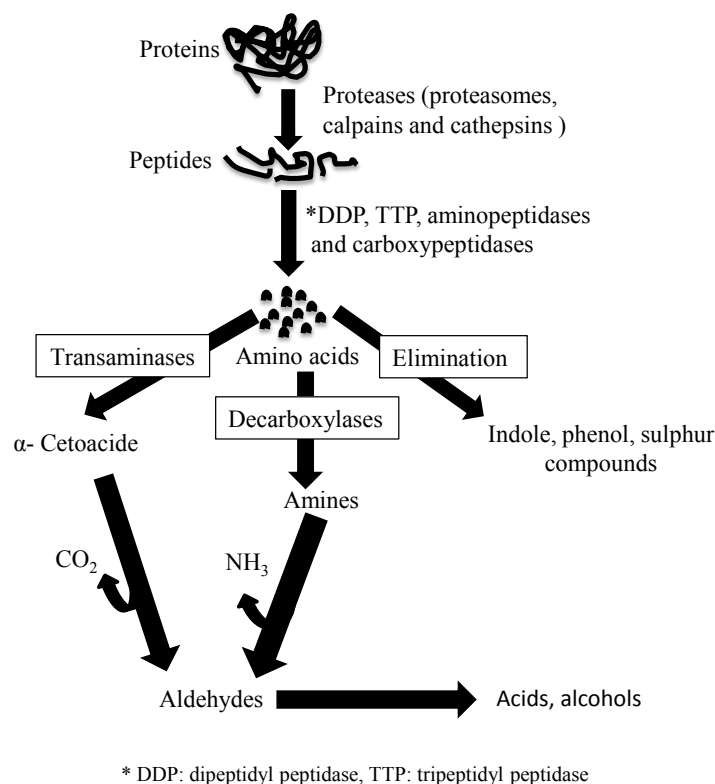


Figure 1.3 Brief description of the several consecutive stages involved in proteolysis.

Proteolysis depends on many physicochemical factors such as temperature, pH, a_w and ionic strength (salt content) (Toldrá, 1998; Arnau et al., 2003; Ruiz-Ramírez et al., 2006). In this context, Zhao et al. (2005), who studied the effect of these factors on cathepsins L and B in dry-cured ham, showed that temperature had a strong influence on these enzymes, especially at low pH values, but these authors found no apparent effect of pH on cathepsin B activity at a temperature below 10°C. These authors also demonstrated that increasing pH value weakened the temperature effect on cathepsin L activity. Regarding salt content, Parreño et al. (1994) and Zhao et al. (2005) highlighted the inhibitory role of salt by demonstrating that calpains and cathepsins B and L lost their activity after the salting stage. Experimentally, proteolysis is quantified by a proteolysis index (PI), commonly defined as the percentage ratio of non-protein nitrogen (NPN) content to total nitrogen content (TN) (Kjeldhal method: ISO 937:1978). Very recently, Harkouss et al. (2012) proposed defining PI as the percentage ratio of the N-terminal α -amino group content to the total protein content of the product extract.

In the literature, several studies have focused on proteolysis quantification in dry-fermented sausages. Ikonić et al. (2013) used an electrophoresis-based method (Lab-on-a-Chip, LoaC) to study proteolytic changes in sarcoplasmic and myofibrillar proteins in Serbian sausages, highlighting a slow degradation of myosin heavy chain, sarcoplasmic protein and actin. These authors concluded that proteolysis in this type of meat products was not intense. Roseiro et al. (2008) also studied the effect of alternative drying environmental conditions on proteolysis and found that processing environment conditions affected proteolysis and the accumulation of free amino acids in end-products. Hughes et al. (2002), who characterized proteolysis during the ripening of salami, confirmed that endogenous enzymes were primarily responsible for the initial proteolysis of the sarcoplasmic proteins and for the release of hydrophilic peptides from both protein fractions, i.e. sarcoplasmic and myofibrillar proteins. These authors also indicated that bacterial enzymes contributed to the initial degradation of myofibrillar protein, especially to the release of free amino acids from myosin and actin. Their results were in line with those of Spaziani et al. (2009). Durá et al. (2004) studied protein degradation in sausages manufactured with *Debaryomyces spp.*, and found that at the beginning of the drying, the *Debaryomyces spp.* inoculation accelerated the degradation of myofibrillar proteins.

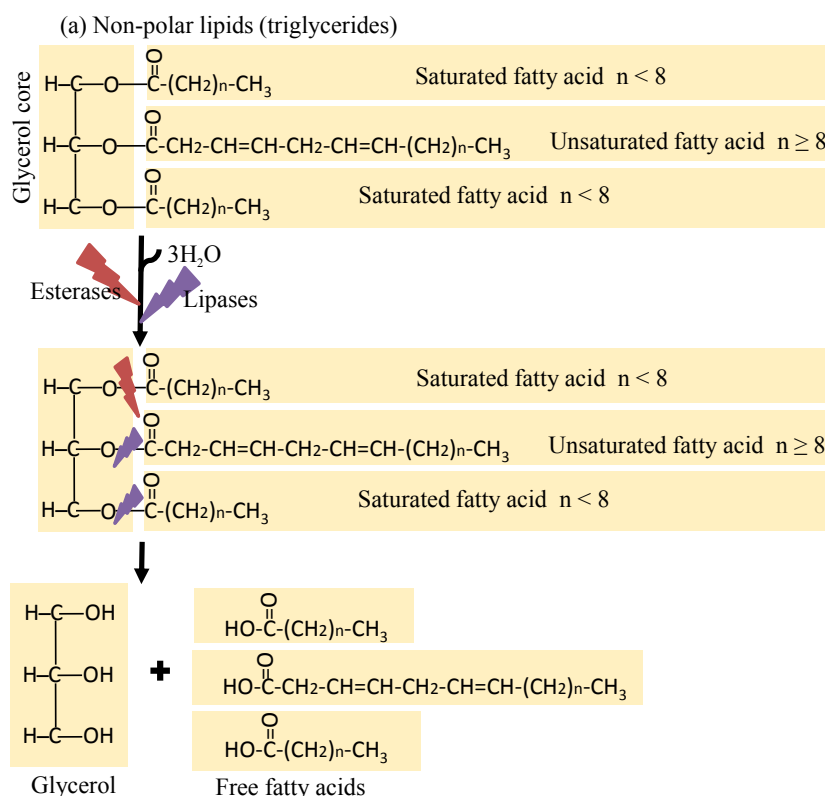
Several studies focused on the effect of salt content on proteolytic enzymes in dry-fermented sausages, demonstrating that proteolysis intensity was affected by the salt concentration (Ruiz-Capillas et al., 2007; Armenteros et al., 2009; Zanardi et al., 2010; Armenteros et al., 2012). By quantifying proteolysis rate in dry sausages made with different NaCl content (3% and 6%, respectively), Roseiro et al. (2008) found that the low-NaCl sausages presented a higher proteolysis rate. Corral et al. (2013) demonstrated that aromatic profile of volatile compounds derived from protein and amino acid degradation was affected by salt content. Regarding the effect of salt substitution on proteolysis, Ibañez et al. (1997) evaluated protein changes when salt was partially replaced by KCl, and found the modified products to show lower protein solubility, but slightly higher proteolysis intensity. Corral et al. (2013) noted little difference in volatile compounds derived from protein and amino acid degradation when NaCl was partially replaced by KCl. The recent results of dos Santos et al. (2015) showed that reducing NaCl by 50% and replacing it with CaCl₂ altered the electrophoretic profile of the sarcoplasmic proteins during the manufacturing process, indicating altered proteolysis. These authors observed lower degradation of sarcoplasmic proteins in dry-fermented sausages containing CaCl₂, probably due to the slower growth of LAB in these products, given that these microorganisms have shown high ability to degrade protein. These authors also report higher amounts of total free amino

acids in salt-reduced dry-fermented sausages, indicating higher proteolytic activities in these products. However, Gelabert et al. (2003) found no significant differences in non-protein nitrogen or total nitrogen ratio (NPN/TN) when salt was partially replaced by KCl or K-lactate, but they found higher NPN/TN ratios when sausages were made with partial replacement of salt by glycine.

Finally, few studies have investigated the effect of fat reduction or substitution on proteolysis. In general, it is reported that fat reduction or its substitution by amorphous gel cellulose modified aromatic profile of volatile compounds derived from protein and amino acid degradation (Olivares et al., 2011; Campagnol et al., 2012b).

Effect on lipolysis

In meat products, lipids are targeted by a set of specific enzymes including lipases, esterases and phospholipases. As shown in Figure 1.4, these enzymes cleave the ester linkage between fatty acids and the glycerol core of the glycerides and phospholipids (Gandemer, 2002; Olivares et al., 2009), leading to the formation of free fatty acids (FFAs). Generally, lipases and esterases are involved in the breakdown of glycerides. Esterases hydrolyse acyl ester chains from 2 to 8 carbons atoms in length, while lipases act on acyl ester chains of 10 or more carbon atoms. By contrast, phospholipases are involved in the breakdown of polar lipids, namely phospholipids.



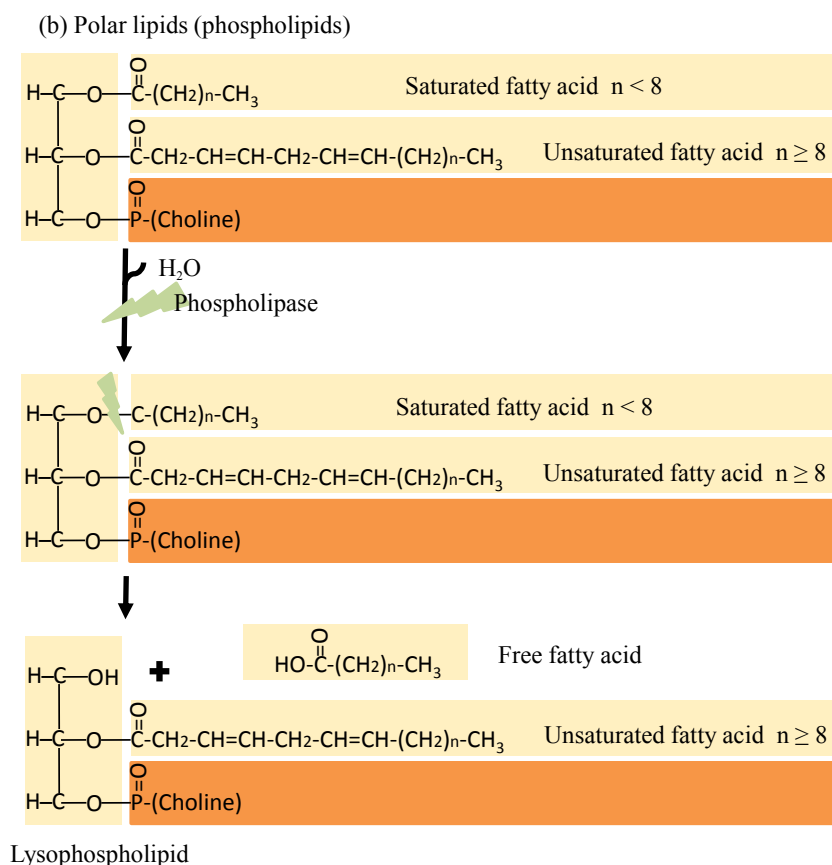


Figure 1.4 Brief description of the several consecutive stages involved in lipolysis of lipids, both (a) non-polar (triglycerides) and (b) polar (phospholipids).

In meat, lipolytic enzymes can be endogenous, but most are produced by microorganisms (Molly et al., 1996; Navarro et al., 1997). For instance, *Micrococcaceae* are considered the most important bacteria in the lipolysis process in fermented meat due to their capacity to hydrolyse triglycerides by extracellular lipases and their activity over a long period (Montel, 1999; Ordóñez et al., 1999). Other microorganisms are also involved in lipolysis, for example, LAB, yeasts and moulds produce some lipolytic enzymes and target mainly mono- and diglycerides (Montel, 1999; Bolumar et al., 2006; Casaburi et al., 2008). However, some authors report that in meat products, bacterial contribution to lipolysis is weak because the conditions are far from optimal in these products (Molly et al., 1997; Suzzi et al., 2001). In meat products, lipolysis is very important because taste, flavour and texture depend strongly on the lipid fraction and its degradation.

Lipolysis, like proteolysis, depends on many factors such as temperature, pH, a_w and ionic strength (salt content), type of muscle, starter cultures and process parameters. In the literature, lipolysis is quantified by several methods. FFA content can be determined by alkali titration (neutralization of the free acidity of 100 g of fat, the result expressed as grams of oleic acid per

100 g of lipid), or by the copper soaps method (colorimetric/spectrophotometric method based on the formation of coloured copper salts absorbing at 715 or 440 nm). Other methods can also be used to quantify and identify FFAs, such as thin layer chromatography (TLC), gas chromatography (GS) and high-performance liquid chromatography (HPLC). Concerning dry-fermented sausages, the rate of lipolysis depends on processing parameters: temperature, humidity, ripening time, etc. (Navarro et al., 1997). For example, slow drying and mild ripening allow higher lipolytic activity and higher FFA release. In addition, it has been found that lipid breakdown increases in the course of the processing and ripening period. For instance, in Mediterranean and North European sausages, FFA rose from 0.7–1.5% in the fresh meat batter to 2.2–4.5%, at the end of the process (Zanardi et al., 2004). In Spanish androlla and traditional chorizos, FFA content rose from 1.49 to 5.36 mg KOH per g of fat, after 42 days of processing (Fanco et al., 2002). In Belgian sausages and chorizos, FFA content increased 5.6-fold from 6.8 to 39 mg KOH per gram of lipid, after 21 days of ripening (Molly et al., 1997). In nham, a Thai-style fermented pork sausage, it was observed that FFA content quickly increased from 8.5 to 57.9 mg per gram of lipid during fermentation (Visessanguan et al., 2006a, 2006b).

Several studies have investigated how salt content impacts the lipolysis intensity in dry-cured meat products. Andres et al. (2005) observed a promoting effect of NaCl on lipolysis in Iberian dry-cured ham, especially FFA acid release from polar lipids such as phospholipids. In dry-cured loin, the replacement of salt with up to 50% of KCl significantly led to a higher release of FFAs, and thus to a higher lipolysis rate. Other authors showed that reducing sodium chloride or partially replacing it with KCl promoted the activity of lipolytic enzymes (Stahnke, 1995; Quintanilla et al., 1996). Ripollés et al. (2011) later showed that salting with a mixture of salts (55% NaCl, 25% KCl, 15% CaCl₂ and 5% MgCl₂) led to higher SFA release and slightly higher lipolysis.

Regarding the effect of fat content on lipolysis, Olivares et al. (2011) observed that total FFA concentration was significantly higher in high-fat dry-fermented sausages (1257 mg/100 g of dry matter (DM)) than in medium and low-fat sausages (1081 and 977 mg/100 g DM, respectively). These results were in line with those of Soyer et al. (2005), who report lower lipolysis in low-fat fermented sausages than in products made with normal fat content.

Effect on lipid oxidation

Lipid oxidation is one of the main biochemical reactions that occur in muscle and meat products. It affects nutritional value, flavour, colour and texture of meat products (Muguerza et al., 2001, 2004). Lipid oxidation corresponds to the oxidative degradation of fatty acids,

especially unsaturated fatty acids. It is a complex molecular mechanism involving various chain reactions in three phases: initiation, propagation and termination (Figure 1.5).

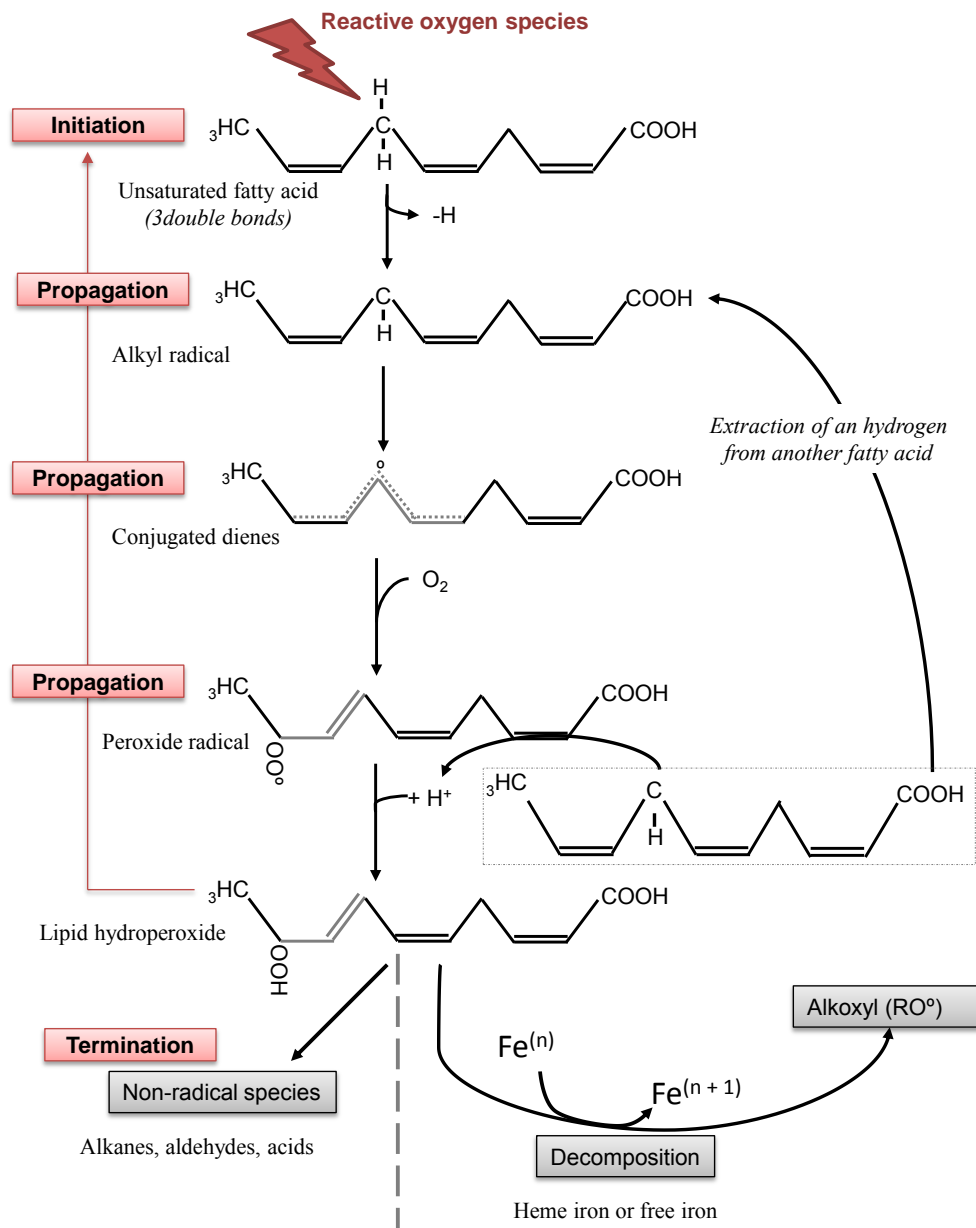


Figure 1.5 Brief description of the three consecutive stages involved in lipid oxidation (from Promeyrat, 2013).

During the initiation phase, lipid oxidation is initiated in the presence of initiators or reactive oxygen species by the extraction of haemolytic hydrogen from a fatty acid, and the formation of lipid free radicals (alkyl: L^\bullet). In the case of polyunsaturated fatty acids, this step is immediately followed by a reorganization of the double bonds, resulting in the formation of more stable conjugated dienes. During the propagation phase, under aerobic conditions, these

conjugated dienes react directly with molecular oxygen to form peroxide radicals (LOO°): $L^\circ + O_2 \rightarrow LOO^\circ$. The peroxide radicals then extract a second hydrogen from another polyunsaturated fatty acid (LH) to form a lipid hydroperoxide (LOOH), and an alkyl radical, which reacts again with oxygen: $LOO^\circ + LH \rightarrow LOOH + L^\circ$. This cycle is repeated 8–14 times before termination. This last step allows the formation of stable secondary products such as pentanal, hexanal, 4-hydroxynonenal, and malonaldehyde (MDA). These compounds are derived from either the interaction of two free radical species, or an interaction with radical trappers, such as vitamin E, as reported by St. Angelo et al. (1996).

Regarding lipid oxidation in dry-fermented sausages, Liaros et al. (2009) report that low-fat sausages presented lower lipid oxidation than controls, especially when the sausages were vacuum-packed with low oxygen permeability film. Concerning the incorporation of vegetable oils, Muguerza et al. (2001) and Muguerza et al. (2004) found similar hexanal contents in control sausages and in formulations made with 20% or 30% olive oil, and lower levels of oxidation in sausages made with 10, 15 and 25% of olive oil. However, these authors showed no difference in rancid taste between controls and any of their modified products. By contrast, Severini et al. (2003) found higher level of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS values) in salami made with olive oil (5%, 7.5% and 10%) than in controls, indicating higher lipid oxidation. However, in formulations with 7.5% and 10% olive oil, these authors found lower TBARS values than in control formulations after 30 days of storage. Ansorena and Astiasaran (2004b) demonstrated that substitution of 25% of pork backfat with pre-emulsified olive oil containing antioxidants did not affect TBARS levels. These authors also showed a higher impact of sausage formulations than storage conditions on the lipid oxidation intensity. Ruiz-Capillas et al. (2012) found that substitution of 50–80% of pork backfat by a similar proportion of konjac gel did not affect TBARS values, provided antioxidant agents were also used. By contrast, Campagnol et al. (2012b) showed that the replacement of 25–100% of pork backfat by a similar proportion of amorphous cellulose gel reduced volatile compounds originating from lipid oxidation, especially hexanal, a good indicator of lipid oxidation in meat products. Additionally, Pelsler et al. (2007), who investigated the partial substitution of pork backfat with canola oil and flaxseed oil, report that canola oil did not affect peroxide or TBARS values or the amount of hexanal. This could be due to the relatively high content of tocopherol (antioxidant agent) in canola oil. By contrast, these authors observed that sausages made with flaxseed oil showed higher peroxide, TBARS and hexanal content, thus explaining this behaviour by the high amount of linolenic acid (*n*-3 PUFAs) in flaxseed oil, which are very

prone to oxidation. However, these authors report that encapsulation of flaxseed oil can be used as strategy to prevent oxidation in modified sausages. Finally, Valencia et al. (2007) studied the effect of algae oil and antioxidants (BHT and BHA) in dry-fermented sausages on lipid oxidation and found no problem related to the oxidation process in the modified products.

On the other hand, the effect of salt on lipid oxidation is not clear, and conflicting data can be found in the literature. Corral et al. (2013) reported higher TBARS values and a higher abundance of volatile compounds derived from lipid oxidation in salt-reduced sausages and in products containing KCl. These results are in line with those published by Kanner et al. (1991) and Zanardi et al. (2010). These last authors showed higher oxidation in salt-reduced sausages made with mixture of other salts.

In summary, lipid oxidation in dry-fermented sausages depends on many factors such as fat content, type of fat, how a fat replacer is incorporated, and type and level of salt. It also depends on process parameters, packaging during storage and the use of antioxidants.

Effect on protein oxidation

In contrast to lipid oxidation, which has been thoroughly studied in meat products, protein oxidation is poorly understood and described due to a lack of suitable and specific methodologies. Proteins are oxidized during storage and processing of meat. This process is initiated by primary and secondary lipid oxidation products and catalysed by reactive oxygen species (ROS), such as hydroxyl HO, superoxide O_2^- , hydroperoxyl HO_2 , hydrogen peroxide H_2O_2 , and hydroperoxides ROOH, and by metal cations such as iron and copper (Butterfield and Stadtman, 1997). These compounds catalyse the abstraction of hydrogen from a susceptible amino acid residue, leading to the generation of a protein carbon-centred radical (P^\cdot), subsequently converted into a peroxy radical (POO^\cdot) in the presence of oxygen, and an alkyl peroxide (POOH) by abstraction of a hydrogen atom from another molecule. Reduced forms of transition metals such as Cu^{2+} and Fe^{2+} and hydroperoxyl lead to the formation of alkoxy radical (PO^\cdot) and its hydroxyl derivative (POH) (Estévez, 2011). As shown in Table 1.2, this reaction induces some modifications in the amino acid residue chains and leads to the formation of specific compounds. For example, oxidation of histidine generates oxohistidine, tryptophan is converted into kynurenine or *N*-formylkynurenine, and leucine and valine are converted to hydroxyl derivatives (Levine and Stadtman, 2001). In addition, sulphur-containing amino acids cysteine and methionine are highly prone to oxidation in the presence of oxidizing lipids. Their oxidation generates various sulphur-containing compounds such as sulphone, sulphoxide and disulphide derivatives (Levine and Stadtman, 2001). The oxidation of other amino acids, such

as arginine, lysine and proline, leads to the generation of carbonyl residues through oxidative deamination reactions (Table 1.2).

Table 1.2 List of main modifications in the amino acid residue chains and main specific compounds induced by protein oxidation.

Parent amino acid	Oxidizing agent / Mechanism of formation	Products	Previously reported by ^A
Histidine	Hydroxyl radical (OH [·])	2-oxohistidine	5
Tryptophan	Hydroxyl radical (OH [·])	<i>N</i> -formyl kynurenine Kynurenine	4
	Peroxynitrite (ONOO ⁻)	<i>N</i> -formyl kynurenine Oxindole + hydroxytryptophan	
Cysteine	Hydrogen abstraction from SH group and subsequent radical dimerization	Cystine	2-5
Methionine	Both radical and non-radical reactions	Methionine sulphoxide	2
Arginine	Hydrogen atom abstraction from side chain in presence of O ₂ , and subsequent loss of guanidine group	5-hydroxy-2-aminovaleric acid	1
Lysine	Hydrogen atom abstraction from side chain in presence of O ₂	Lysine hydroperoxide 5-hydroxylysine Aldehydes Ketones	3
Proline	Hydrogen atom abstraction from side chain in presence of O ₂	Proline hydroperoxides 3- or 4-oxo (ket) prolines 3- or 4- hydroxyprolines 5-hydroxy-2-aminovaleric acid Glutamic acid	1

^A Amino acid oxidation mechanisms previously reported by: 1: (Ayala and Cutler, 1996); 2: (Levine and Stadtman, 2001); 3: (Stadtman and Levine, 2003); 4: (Delattre, 2007); 5: (Lund et al., 2011).

Protein oxidation can be assessed by several methods. Tryptophan is an amino acid of interest, being highly susceptible to oxidation, and presenting an intrinsic fluorescence (excitation at 280 or 295 nm). Since the oxidation of this amino acid decreases the emission of fluorescence, tryptophan fluorescence can be used as an indicator of protein oxidation (Xiong, 2000). In addition, the determination of carbonyl content is largely used in the assessment of protein

oxidation in meat products. This method was developed by Toussaint et al. (1987) and improved by Mercier et al. (2001). It is based on the reaction between carbonyl groups and 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) and the formation of 2,4-dinitrophenyl hydrazone (hydrazone). Hydrazone is assayed using a spectrophotometer at 370 nm, and concentration of protein is measured at 280 nm; carbonyl content is expressed in nmols DNP-hydrazone per mg of protein. Protein oxidation can also be assessed by the determination of protein thiol groups. Cysteine and methionine lose SH groups during oxidative degradation, and are converted into cysteine disulphide, sulphenic acid and methionine sulphoxide. Protein oxidation can thus be quantified by the assay of protein thiol groups. Furthermore, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE) can be employed to detect oxidized myofibril protein in meat products, mainly myosin heavy chain (MHC) and actin. In general, protein oxidation leads to the loss of corresponding band density at 200 kDa (MHC) and at 45 kDa (actin). In fresh meat, and as consequence of aerobic metabolism, oxidative reactions affect lipids and proteins of muscle, about 10% of the total cellular protein being oxidized and transformed into carbonyls. The total amount of carbonyl in fresh pork is estimated to be about 1–2 nmol/mg protein. However, during ageing, storage and processing, the amount of carbonyls is increased. For instance, Estévez (2011) report that after slaughter, cellular compartments were altered and free iron and oxidizing enzymes were released to contribute to the oxidation mechanism. Processing and transformation of muscle also affect protein oxidation. For example, the amount of total carbonyl is affected by irradiation (Badr and Mahmoud, 2011) and by cooking (Gatellier et al., 2010). In addition, Estévez (2011) and Bombrun et al. (2014) report that salting and drying may have a marked effect on protein oxidation in transformed meat products such as dry-fermented sausages and dry-cured hams.

Concerning dry-fermented sausages, few studies have investigated the effect of salt on protein oxidation. However, it is clear that adding NaCl affects the ionic strength and thereby biochemical reactions such as protein oxidation. However, Montero et al. (2005) report that NaCl affected the degree of assembly of myofibril protein and their susceptibility to carbonylation. Kanner et al. (1991) also demonstrated that NaCl (Cl^-) stimulated the pro-oxidant activity of iron. Sun et al. (2011a) studied the oxidation of protein in Cantonese sausages, and showed that carbonyl amount increased from 1.46 to 3.31 nmol/mg protein, and the formation of S-S bonds increased from 20 to 60 $\mu\text{mol/mg}$ protein through the drying process. These authors showed that carbonyl amount increased from 1 to 6 nmol/mg protein, and a gradual and remarkable decrease in the fluorescence intensity of tryptophan was detected

during sausage manufacture (Sun et al, 2011b, 2011c). Fuentes et al. (2014) report that carbonyl content was also affected by the level and type of fat.

More studies must be undertaken to gain a fuller understanding of protein oxidation in dry-fermented sausages, because this oxidative degradation of protein can affect the nutritional and sensory quality of the products.

Effect of salt and fat contents on the production of volatile compounds and aromatics in dry-fermented sausages

Meat and meat products are composed of proteins, amino acids, nucleotides, sugars, lipids, vitamins, and other compounds. As mentioned previously, during meat processing these constituents undergo various types of reaction that lead to the production of hundreds of volatile compounds that make up the odour and flavour of the product. The main reactions involved in the development of odour and flavour of dry-ripened meat products are lipid degradation (lipolysis and oxidation), proteolysis and microbial amino acid degradation, glycogen and carbohydrate degradation, Strecker degradation, degradation of ribonucleotides, and Maillard reactions (Dwivedi and Brockmann, 1975; Toldrá and Flores, 2007). Several methods can be used to analyse volatile compounds and key aroma compounds in food products such as distillation, solvent extraction, dynamic head space (DHS), solid-phase micro-extraction (SPME) and olfactometry (Cadwallader and MacLeod, 1998; Olivares et al., 2010b). In these methods, analysis of volatile compounds is performed by an extraction step, followed by concentration, chromatographic separation, detection and identification (mainly using mass spectrometry).

In dry-fermented sausages, many volatile compounds have been identified using different extraction techniques. These compounds can be classified into several chemical families, i.e. aldehydes, alkanes or alkenes, aromatic hydrocarbons, furans, ketones, alcohols, carboxylic acids, esters and sulphur compounds (Olivares et al., 2011; Lorenzo et al., 2012; Gómez and Lorenzo, 2013; Lorenzo et al., 2013; Lorenzo, 2014). Aldehydes such as hexanal, benzenacetaldehyde, benzaldehyde and heptanal are volatile compounds produced mainly by lipid auto-oxidation (Olivares et al., 2009; Corral et al., 2013; Gómez and Lorenzo, 2013). These compounds are known to have low odour threshold values and to contribute to the development of the aroma of dry-cured and dry-fermented meat products (Estévez et al., 2007). Also, aliphatic and aromatic hydrocarbons originate from numerous processes such as lipid auto-oxidation. In general, aliphatic hydrocarbons (hexane and octane) have a high threshold

value, and do not contribute significantly to the aroma of dry-ripened sausages, whereas aromatic hydrocarbons such as methylbenzene play an important role in the aroma of this kind of meat product (Estévez et al., 2007). Ketones such as 3-hydroxy-2-butanone and 2,3-butanedione come from glycogen or carbohydrate degradation (Buscailhon et al., 1994), while alcohols derive from several reactions such as lipid oxidation (1-octen-3-ol) and fermentation (ethanol). Alcohols possess a low odour threshold (Sabio et al., 1998) and contribute effectively to the aroma of dry sausages. In addition, esters such as methyl-3-methylbutanoate, methylhexanoate and methyl-2-methyl-propanoate are produced from alcohols and carboxylic acids by the action of *staphylococci*. They have a low odour threshold value, give a fruity-floral note to meat products, and mask rancid odour (Sabio et al., 1998). Table 1.3 shows the principal key aroma compound already found in dry-fermented sausages and the odours lent by these compounds. Generally, a broad variety of odours are described in the literature from identified key aroma compounds. They can be grouped into eight families: “meaty-animal-dry sausage”, “sulphured-garlic”, “fruity-floral”, “fermented-lactic”, “mouldy-mushroom”, “vegetal”, “empyreumatic” and “plastic-chemical”.

Table 1.3 List of main key aroma compounds and associated odours identified in fermented sausages and found in the literature.

Aroma compound	Odour	Previously reported by ^A
(2E, 4Z)-Decadienal	Rancid, dirty	4, 6
(E)-2-Nonenal	Fatty, tallowy, green, cucumbers, herbal, woody	2-3, 5
(E,E)-2,4-Nonadienal	Fatty, tallowy, herbal, unpleasant, roasted, stale, meaty, oily	2-3
(R/S)-Linalool	Flowery, sour-pungent, carnation	6
(Z)-2-Nonenal	Fatty, tallowy, green, herbal, strawberry, medicinal	2-4
1,8-Cineol	Menthol	6
1-Hexanol	Green grass, plastic	5
1-Octanol	Mushroom	5
1-Octen-3-ol	Mushroom, fungus, dirty, dust	1-3, 5
1-Pentanol	Floral, butter, roasted nuts, roasted, roasted meat	2, 5
2,3-Butanedione	Butter, cooked ham, lactic, cheese, snacks, sweet, caramel-like, vanilla-like	1-4, 6
2,3-Pentanedione	Butter, cheese	5
2,4-Heptadienal	Roasted, butter, soap	5

2,4-Heptadienal (E,E)	Cooked meat, nutty	5
2,6-Dimethylpyrazine	Meaty, roasted, mashed potatoes, toasted	4
2-Acetyl-1-pyrroline	Roasty, popcorn-like, savoury, snacks, overheated meat -like, cured ham like, roasted	1
2-Ethylfuran	Tallowy, savory, sweet, toasted, garlic	2, 5
2-Heptanol	Plastic	5
2-Heptanone	Medicinal, fruity, cured ham-like, toasted, nutty	4-5
2-Heptenal (E)	Rancid, dirty, fruity, fried food-like	5
2-Hexanal (Z)	Sweet roasted, meat broth	2
2-Hexenal (E)	Salty meat, dry cured ham	5
2-Hydroxybenzaldehyde	Herbal, stable, roasted bread	2
2-Methoxy-4-(2-propenyl)-phenol	Cloves, spicy, smoky	6
2-Methylbutanal	Malty, fresh cut grass, rancid, toasted, fruity, almond-like	4
2-Methylpropanal,	Empyreumatic, green grass, fresh, toasted, fruity, pungent	3
2-Nonanone	Toasted, weak fruity, plastic, wood, pop-corn, roasted, burnt	1-2, 4-6
2-Octanone	Green, garlic, floral, geranium	2-3
2-Octenal (E)	Dry cured ham, dry cured sausage, deep fried, fruity, rancid, tropical fruit-like	5
2-Pentanone	Roasted, sweet, green, fruity, tropical fruit-like	4-5
2-Pentylfuran	Metallic, green, unpleasant, cabbage, meat broth, savory, onions, rancid	1-2
2-Phenylethanol	Honey-like, flowery, rose	6
3-(Methylthio)propanal(methional)	Cooked potato-like, potatoes, earthy, onion, meat broth, rancid, savoury snack, boiled meat-like, cured ham-like	1-3, 5
3-Hydroxy-2-butanone	Butter, soft	7
3-Methylbutanal	Malty, chocolate, rancid cheese, green, herbal, rancid, dry cured ham, sour cheese, fruity, toasted, almond-like	4-5
3-Methylbutanoic acid	Sweaty, strong cheese, feet, dirty socks	1, 5-6
3-Methylthiopene	Cooked potato, green, wood	2
3-Methylthiopropenal	Cooked potato, savory	1-4
3-Pentanone	Butter, damp	1
4-Methylphenol	Horse-like, phenolic, plastic, stables, rancid	2-3, 6
4-Methylphenol (<i>p</i> -cresol)	Horse-like, phenolic, plastic, stables, rancid, Musty, smoky	6
4-Terpinol	Greenish	6
Acetic acid	Pungent, sour, vinegar	1-6

Acetone	Acetone, alcohol	4-5
Benzaldehyde	Toasted, tobacco	1
Benzenacetaldehyde	Rancid, musk, jasmin, roses	2-3
Benzothiazole	Toasted, savoury, sulphurous	1
Butanal	Sweet, snacks	4-5
Butanoic acid	Sweaty, cheese-like, cheese	2-6
Decanal	Green, wood, potatoes, butter	1, 4
Decanoic acid	Pungent, repellent	6
Diacetyl(2,3-butanedione)	Cheese, snacks	5
Diallyldisulphide	Garlic	6
Diallylsulphide	Garlic	6
Dimethyldisulphide	Garlic	4, 6
Dimethyltrisulphide	Sulphury, cabbage, gas, onion, rotten, rotten egg-like, burnt	2
Ethanol	Alcohol, bread dough, yeast	5
Ethyl hexanoate	Sweet, fruity, cherry	5
Ethyl pentanoate	Strawberry	5
Ethyl-2-methylpropanoate	Fruity, Sweet, strawberry	1, 5
Ethyl-3-methylbutanoate	Fruity, flowery, sweet	1, 6
Ethylacetate	Artificial fruity, fruity, toffees, Spice, rancid, wood, boiled vegetables	4-6
Ethylbutanoate	Fruity, fresh cut grass, green, Pineapple, strawberry	2-3, 5-6
Ethylpropanoate	Fruity	6
Heptanal	Fruity, unpleasant, citrus, soap, rancid cured ham, rancid, dirty, cured ham-like, toasted, sewage, fatty	3-5
Heptanoic acid	Animal, pungent, rancid, herbal, dry cured ham	2, 5
Hexanal	Green, grassy, fresh cut grass, fruity, green apple, vegetable, spicy, cucumber, rancid, citrus, soap, rancid dry cured ham, potatoes, green leaves	1-6
Hexanoic acid	Sweaty, putrid	4, 6
Limonene	Fresh, citrus, orange	2, 4, 6
Methanethiol	Rotten, stable, unpleasant, rotten eggs, cauliflower	3-5
Methyl-2-hydroxy-propionate	Green grass, fresh	3
Methylallyldisulphide	Garlic	6
Methylallylsulphide	Garlic-like	6
Methylbutanoate	Fruity, flowery	6
Methylethylsulphide	Rotten onion, unpleaseant	3
Methyloctanoate	Fruity	3
Methylprazine	Green, cooked potato	1

Methylpropanoic acid	Sweaty, fatty, savory snacks	5-6
Nonanal	Citrus-like, soapy, green, rancid, plastic, laurel, carnation, plastic, nettle	2, 4-5
Nonanoic acid	Spicy, hazelnut, walnut	1
Octanal	Lemon, floral, fruity, green, chemical,, citrus, geranium, herbal, herbal, nettle, stew-like, boiled meat-like, rancid	1, 3-5
Octanoic acid	Animal, meaty, toasted, coffee, rancid, woody	3-5
Pental	Green, nut, meat broth	2
Pentanal	Fresh cut grass, rancid, green, rancid, green leaves,nutty, toasted, fruity	4-5
Pentanoic acid	Sweaty	4,6
Phenol	Wet dog hair	1, 6
Phenylacetaldehyde	Honey-like, roses	5
Phenylethylalcohol	Winery	5
Propanoic acid	Glue, wax, sweaty, cheese, sour	1, 4-6
α -Pinene	Pine-like, peppery, spices, green pine needles	6
β -Myrcene	Herbal	6
β -Pinene	Sharp, dry	6
γ -Terpinene	Herbal	6

^A Aroma compounds previously reported in fermented sausages by: 1: (Corral et al., 2015); 2: (Corral et al., 2013); 3: (Olivares et al., 2011); 4: (Olivares et al., 2010b); 5: (Marco et al., 2007); 6: (Schmidt and Berger, 1998).

As previously stated, volatile compounds and key aroma compounds derive from several chemical and enzymatic reactions that are influenced by the fat and salt contents, and also by the nature of the salt and fat. Few studies have focused on the effect of reducing/replacing fat and/or salt on volatile compounds and aromatic production during dry-fermented sausages manufacture. Corral et al. (2013) report that direct reduction of sodium chloride (16%) or its partial replacement by potassium chloride (16%) led to a decrease in the amount of sulphur and acidic volatile compounds such as dimethyltrisulphide, 3-methylthiophene and acetic acid, and to an increase in some aldehydes, such as hexanal, butanal and 2-octanal. Regarding fat content, Olivares et al. (2011) report that volatiles were significantly affected by reducing animal fat level, with an increase in volatile compounds originating from bacterial metabolism such as methyloctanoate, and a decrease in lipid-derived compounds such as propanal, hexane and hexanal. These authors also found greater amounts of ester and acetic acid in low-fat products. Recently, Gómez and Lorenzo (2013) investigated the effect of fat level on the aroma of

chorizo, and showed that the abundance of volatile compounds was significantly affected by fat level, with a higher amount of total volatile compounds detected in low-fat sausages compared with control dry-fermented sausages. These authors report that ester and alcohols such as 3-methylbutanoate, methylhexanoate and 2,3-butanediol were more abundant in fat-reduced dry-fermented sausages. Furthermore, Gómez and Lorenzo (2013) found higher amounts of volatile compounds derived from amino acid catabolism in low and medium fat level products. By contrast, they report that fat level did not affect the level of hydrocarbons, except for hexane, which was more abundant in high-fat sausages. Finally, Campagnol et al. (2012b) report that the replacement of pork backfat by amorphous cellulose gel significantly affected the aroma compounds, especially those that originated from lipid oxidation, such as butanal, hexanal, and 2-heptanal.

This part of our review emphasizes that the content and nature of salt and fat significantly affect the generation of volatile compounds and key aroma compounds. Thus reducing salt and fat in dry-fermented sausages can cause sensory problems, especially in terms of taste, flavour and odour, owing to the change induced in the aromatic profile of the products.

Effect of salt and fat contents on the sensory attributes of dry-fermented sausages

Dry-fermented sausages are typical meat products characterized by several sensory attributes such as appearance, colour, texture, and flavour. These sensorial characteristics derive from numerous complex mechanisms such as biochemical reactions, microbiological contributions and drying and ripening processes (Liaros et al., 2009). Additives introduced during manufacture, such as salt, nitrite, garlic and pepper also contribute to the development of these properties. In this section, we discuss how reducing or replacing salt and fat affects the appearance, colour, texture, flavour and odour of dry-fermented sausages.

Impact on product appearance and colour

The appearance and colour of meat products are important quality attributes for both the consumer's selection of the product and for the consumer's final evaluation and acceptance during consumption. Visual appearance and colour of meat products are rapidly appraised and induce a response: to buy or not to buy, to eat or not to eat.

Several authors report the effect of reducing fat on the appearance of dry-fermented sausages. Muguerza et al. (2002) showed that total fat level had a significant negative effect on the appearance of the product, while partial replacement of pork backfat with 20% of olive oil had no effect. In addition, replacing animal fat with konjac gel had no effect on visual aspect or on

the cross section of the product (Ruiz-Capillas et al., 2012). However, Jiménez-Colmenero et al. (2013) showed that the appearance of dry-fermented sausages was affected by fat level and konjac gel addition. In all cases, defects in appearance were correlated with faster and greater weight loss. Slow ripening or alternative ripening and the use of packaging can offer solutions to prevent these visual problems. In this context, Olivares et al. (2010a) showed that slow fermentation of sausages could prevent defects in appearance. Liaros et al. (2009) report that dry-fermented sausages ripened under vacuum presented high sensory scores for outward appearance.

Consumers view colour as one of the most important attributes of meat products when they make the decision to purchase a retail product. Most of the changes in colour of dry-fermented sausages are caused by oxygen, light, temperature, processing and packaging conditions. For example, lightness (L^*) increased during mincing, and stabilized or decreased during ripening due to the weight loss and diminution of a_w (Bozkurt and Bayram, 2006). Likewise, redness (a^*) increased during the first days of process due to the reaction between myoglobin and nitrites and the formation of nitrosomyoglobin. However, this substance was rapidly oxidized during ripening, causing a drop in the a^* value (Papadima and Bloukas, 1999). Yellowness (b^*) also decreased during ripening due to the consumption of oxygen by microorganisms (Bozkurt and Bayram, 2006).

Concerning the effect of fat reduction on colour evolution, it has been reported that colour parameters are affected by the fat content (Papadima and Bloukas, 1999; Muguerza et al., 2002, 2003). For instance, Bloukas et al. (1997), Papadima and Bloukas (1999), Muguerza et al. (2002), Olivares et al. (2010a), Ruiz-Capillas et al. (2012) and Mora-Gallego et al. (2013) report that L^* increased with fat content. Lower L^* value corresponded to higher water loss in low-fat products. Liaros et al. (2009) report that ripening low-fat sausages under vacuum packaging led to similar weight losses and L^* value to those of control sausages. An increased a^* value was observed when fat was reduced due to higher myoglobin concentration in these products corresponding to higher amounts of lean meat (Muguerza et al., 2002, 2003, 2004). Additionally, replacement of pork backfat by other sources of fat can also affect colour parameters. Bloukas et al. (1997) report that sausages made with olive oil showed higher b^* and L^* values and lower a^* value. By contrast, Severini et al. (2003) did not note any difference between colour parameters of control sausages and those made with olive oil. Pelsler et al. (2007) report that incorporating flaxseed oil and canola oil led to similar a^* and L^* values, but a higher b^* value. By contrast, addition of soy oil did not affect colour parameters (Muguerza

et al., 2002). For sunflower oil, Mora-Gallego et al. (2013) reported that non-acid dry-fermented sausages made with 5% sunflower oil showed lower L^* and a^* values. In Chinese sausages, replacing animal fat with yam extract led to higher a^* value and lower L^* value (Tan et al., 2007). By contrast, frankfurter sausages made with seaweed presented higher L^* and b^* values, but a lower a^* value (Cofrades et al., 2008; Lopez-Lopez et al., 2009). Dry sausages made with a mixed emulsion of linseed and algae oil showed no sensory difference in colour parameters (Garcia-Iniguez et al., 2010). Conflicting results are found in the literature regarding the adding of konjac as pork backfat replacer. Ruiz-Capillas et al. (2012) indicate that konjac gel led to a lower a^* value and did not affect lightness of the products, whereas Jiménez-Colmenero et al. (2013) report that sausages made with konjac gel showed a higher a^* value and lower L^* value. Finally, replacement of pork backfat by DAG led to lighter products, but did not modify yellowness (Mora-Gallego et al., 2013).

Concerning the effect of salt substitution on colour evolution, several authors found no change in colour parameters when sodium chloride was partially replaced with potassium chloride (Pérez-Alvarez et al., 1999; Campagnol et al., 2012a). By contrast, replacing sodium chloride with a high amount of K-lactate led to lower cured colour intensity (Guardia et al., 2008). These results were explained by the difference in pH values among treatments at the end of fermentation and at the end of drying. At low pH, nitrite is converted into nitrite oxide, which is involved in the formation of nitrosomyoglobin pigment, itself responsible for cured colour. Beriain et al. (2011) concluded that partial substitution of sodium chloride with a mixture of potassium chloride and calcium chloride led to lighter, yellower products. However, Gimeno et al. (2001a) found that dry-fermented sausages made with high amount of calcium ascorbate (50%) were yellower and redder than both controls and products made with less than 50% calcium ascorbate.

All these results show that the chemical nature and contents of fat and salt used for substituting pork backfat and sodium chloride influence the typical colour of dry-fermented sausages.

Impact on product taste, flavour and odour

Taste, odour and flavour of meat products play a critical role in the acceptability and choice of such food products. As reported previously, these sensory attributes are the result of numerous factors such as raw materials, type and quantity of ingredients, additives, curing agents, processing parameters (ripening time, fermentation with the choice of starter culture), and of the chemical and enzymatic reactions that occur during processing.

As previously reported, levels and types of salt and fat significantly affect the generation of volatile compounds and key aroma compounds. Hence reducing salt and fat in dry-fermented can also lead to sensory problems, especially in terms of taste, flavour and odour. Olivares et al. (2010a) report that higher fat level led to higher aroma scores. Mendoza et al. (2001) report that frankfurters and sausages made with low-fat content showed lower juiciness than high-fat products. Muguerza et al. (2002) also report that low-fat fermented sausages generally presented lower odour and taste scores than control products, although higher scores were recorded for sausages containing 8% pork backfat and 2% olive oil compared with control sausages. By contrast, Liaros et al., (2009) found no difference in flavour between low-fat sausages and control sausages, but ripening under vacuum of low-fat sausages led to lower flavour scores. Mora-Gallego et al. (2013) showed that sausages made with 5% pork backfat, or sunflower oil or DAG presented a higher intensity of ripened odour than leaner products, with the highest scores obtained in the case of sausages made with 5% sunflower oil. Replacing partially animal fat with konjac gel did not affect the flavour of the products, but significantly impacted their juiciness (Ruiz-Capillas et al., 2012; Jiménez-Colmenero et al., 2013).

Concerning salt, some authors report that partial replacement of sodium chloride by potassium chloride led to a bitter or metallic flavour (Gelabert et al., 2003). However, these authors report that products with 33% KCl were acceptable, and very similar to control products. Campagnol et al. (2012a) reported that replacing sodium chloride by potassium chloride decreased the sensory score for taste and aroma. These authors also found that defects in taste and aroma due to 50% substitution of NaCl by KCl could be offset by adding a mixture of lysine, disodium guanylate, and disodium inosinate.

Impact on product texture

The texture of meat-based products is another important sensory attribute influencing the consumer's final evaluation and acceptance at time of consumption. Numerous factors affect the textural parameters of meat, such as breed and age of the animal, stress prior to slaughter, chilling, cooking and processing methods. Texture parameters of meat products can be measured by different tests such as shear, penetration, compression, tension, and torsion.

In processed meats such as dry-fermented sausages, texture parameters result from numerous factors such as raw material, type and quantity of ingredients, additives, curing agents and processing parameters. Hence reducing or partially replacing fat and/or salt in this kind of product can adversely affect the final texture of the products. Several studies focusing on the textural parameters in fat-reduced dry-fermented sausages report that fat reduction during

sausage manufacture led to harder, firmer, chewier and gummier products as a result of faster weight loss during drying (García et al., 2002; Muguerza et al., 2002; Liaros et al., 2009; Olivares et al., 2010a; Mora-Gallego et al., 2013). However, Liaros et al. (2009) report that ripening of fat-reduced sausages under vacuum packaging could prevent these texture defects. Concerning the use of vegetable oils, several authors indicate that partial replacement of pork backfat with vegetable oils had no effect on textural features. Bloukas et al. (1997), Muguerza et al. (2002), Muguerza et al. (2003) and Valencia et al. (2007) found no significant difference in texture properties when animal fat was partially replaced by olive oil. By contrast, Severini et al. (2003) found less firm salami when extra-virgin olive oil was used to replace animal fat. In addition, higher cohesiveness and springiness and lower hardness and chewiness were found when non-acid fermented sausages were made with 5% sunflower oil (Mora-Gallego et al., 2013). In another study, fermented sausages made with flaxseed oil and canola oil, pre-emulsified with soy protein isolate were judged firmer than classical products made with pork backfat, probably due to the large amount of carbohydrate used during encapsulation of oil (Pelser et al., 2007). However, Garcia-Iniguez de Ciriano et al. (2010) found no significant effect on textural parameters when 25% pork backfat was replaced by a mixed emulsion of linseed and algae oils. Textural parameters were also studied in sausages made with other fat replacers. For example, using amorphous cellulose gel at high levels (75–100%) led to harder products (Campagnol et al., 2012b). Ruiz-Capillas et al. (2012) found harder, chewier and less cohesive values for products made with konjac gel. By contrast, Jiménez-Colmenero et al. (2013) report that sausages made with konjac gel were less hard and more cohesive than control products. These authors explained the difference between their results and those of Ruiz-Capillas et al. (2012) by the difference in the criterion for the end of ripening (time vs. weight loss). Finally, Josquin et al. (2012) studied the effect of using fish oil on the textural features of dry sausages, and showed that using pure fish oil led to less firm products, while emulsified and encapsulated fish oil led to firmer sausages. All these results emphasize that texture parameters are strongly influenced by the amount and type of fat.

On the other hand, since it is known that salt promotes protein solubilisation and leads to a protein gel that is involved in the formation of texture features of meat-based products, reducing or replacing salt can alter texture parameters of sausages. Gimeno et al. (2001a) and dos Santos et al. (2015) found softer and less gum for low-salt sausages. Corral et al. (2013) assert that sausages made with low NaCl amount were less cohesive and less chewy. Gelabert et al. (2003), Guardia et al. (2008), Zanardi et al. (2010), Corral et al. (2013) and dos Santos et al. (2015)

report that sausages made with partial replacement of NaCl by KCl were harder and less chewy. KCl was also used in combination with other divalent salts such as calcium chloride. This combination led to texture defects with a diminution in hardness, cohesiveness, and chewiness (Gimeno et al., 2001a). By contrast, other authors have recently indicated that partial replacement of NaCl by a mixture of potassium chloride and calcium chloride affects texture by increasing hardness and firmness (dos Santos et al., 2015). Finally, using K-lactate or glycine led to softer and less cohesive products than control sausages, probably due the higher pH at the end of fermentation (Gelabert et al., 2003). Lactic fermentation leads to a decrease in pH, which in turn leads to the formation of a protein gel that is detrimental to hardness and cohesiveness of dry-fermented sausages. Besides fat content, salt content and type of salt clearly influence texture parameters during the manufacture of sausages.

Conclusions

Dry-fermented sausages have become popular worldwide as traditional authentic meat products. However, because of the way they are manufactured, these products contain high levels of sodium chloride and animal fat, which if consumed in excess are related to the onset of severe human health disorders. For these reasons, a combined reduction in salt and fat contents during dry-sausage manufacture could benefit human well-being. However, such a reduction, salutary though it may be, raises manufacturing problems. In the literature, the effect of salt and animal fat substitutions on physicochemical, biochemical, organoleptic and sensory characteristics of dry-fermented sausages is not clear, and conflicting results are reported. What is certain is that reducing salt content or partially incorporating salts other than sodium chloride modifies ionic strength and water activity, which are parameters that markedly influence what happens in terms of biology, microbiology, physics, chemistry and biochemistry during dry sausage manufacture. All these changes are further modified when the fat content is also directly reduced or partially replaced by other sources of fat. Moreover, on the basis of current knowledge, it is very difficult to foresee what the technological, microbial and sensory characteristics of the low-fat low-salt dry-fermented sausages will be at the end of drying. In the literature, very few studies have investigated the combined reduction of sodium chloride and pork backfat or their partial substitution during dry sausage manufacture. This is one of the objectives of the European TeRiFiQ project (www.terifiq.eu), which aims to develop procedures that, further to binary reductions ('fat/sugar' or 'fat/salt'), enable the production of safe, nutritionally-improved food products that are acceptable to consumers. For dry sausages, the dual reduction target is a 30% reduction in sodium and a 60% reduction in SFAs.

Acknowledgements

The research leading to these results received funding from the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement No. 289397 (TeRiFiQ project). This paper is part of the thesis of Hassan Safa, who works for this research program. The authors thank ATT for proofreading.

1.3. Conclusions de l'étude bibliographique

Le saucisson sec est devenu, au fil du temps, un produit traditionnel et authentique, de consommation très courante dans le monde entier. Toutefois, comme la fabrication d'un saucisson sec requiert de fortes teneurs en sel, notamment en chlorure de sodium, et en matière grasse animale, riche en acides gras saturés et en cholestérol, une consommation excessive de ce type de produit peut avoir des effets néfastes sur la santé humaine. Pour ces raisons, une réduction combinée en sel et en matière grasse animale lors de la fabrication ne peut qu'améliorer la qualité nutritionnelle de ce type de produit. Cependant, une forte réduction combinée en sel et en matière grasse animale conduit à des problèmes technologiques, microbiologiques et génère, au final, des défauts sensoriels sur les produits. La littérature montre qu'une réduction directe en chlorure de sodium, ainsi que sa substitution partielle par d'autres types de sel, modifie la force ionique et l'activité de l'eau au sein du milieu, ces deux grandeurs influençant fortement les évolutions biologiques, physicochimiques et biochimiques qui se déroulent tout au long de la chaîne de fabrication. Toutes ces évolutions sont de nouveau modifiées quand la teneur en matière grasse animale est réduite, aussi bien directement que partiellement par substitution avec d'autres sources de matière grasse. Sur la base des connaissances actuelles, il est donc quasiment impossible de prévoir quelles seront les caractéristiques organoleptiques, microbiologiques et sensorielles finales d'un saucisson à teneur réduite en sel et en matière grasse animale. De plus, malgré la foulditude d'études existant dans la littérature (notamment espagnoles) mettant en œuvre des substitutions partielles de chlorure de sodium ou de matière grasse animale, très peu de travaux ont porté sur des réductions combinées en sel et en matière grasse animale lors de la fabrication des produits de charcuterie sèche. C'est l'un des objectifs du projet Européen TeRiFiQ (www.terifiq.eu) qui ambitionne d'améliorer la qualité nutritionnelle de quatre familles de produits de consommation très courante (fromage, charcuterie, viennoiserie, plat préparé), en procédant à des réductions combinées 'gras-sucre' et 'gras-sel'. En ce qui concerne le saucisson sec, tout en préservant ses

qualités organoleptiques et sensorielles, les réductions visées dans ce projet sont 30% et 60%, respectivement, pour les teneurs finales en sodium et en acides gras saturés.

Chapitre 2 : MATERIELS et METHODES

2.1. Fabrication des saucissons secs

En collaboration avec l'ADIV, deux séries de fabrication de saucissons secs ont été réalisées. L'objectif de la première série de fabrication était d'étudier l'impact d'une réduction directe des teneurs en matière grasse animale et en sel (NaCl) sur les transferts d'eau et de sel, les paramètres physicochimiques et les réactions biochimiques. Au travers de la seconde série de fabrication, nous souhaitons étudier l'effet d'une substitution partielle du NaCl par du chlorure de potassium (KCl), d'une suppression totale de l'ajout de bardière (gras dorsal) et de l'ajout d'huile végétale (huile de tournesol oléique) pour abaisser la teneur en acides gras saturés (AGS), sur les transferts d'eau et de sel et l'évolution des propriétés physicochimiques et biochimiques lors de la fabrication de saucissons secs. Le but de cette seconde série d'essais était aussi d'évaluer la qualité du produit et de juger l'acceptabilité des consommateurs vis-à-vis de ces saucissons fermentés à teneurs réduites en sodium et en matière grasse animale.

2.1.1. Première série de fabrication

La première série de fabrication de saucissons secs, conçue pour étudier l'effet d'une réduction directe en NaCl et en matière grasse animale sur l'évolution temporelle des paramètres physicochimiques (pH, perte de poids et a_w) et biochimiques clés (indice de protéolyse, lipolyse, oxydation des protéines et oxydation lipidique), était constituée de 8 lots de saucissons différents. Dans cette série de fabrication, les teneurs en matière grasse animale et en NaCl de chaque lot ont été fixées suite à la construction d'un plan expérimental de type Doehlert (Doehlert, 1970), à deux facteurs : la teneur en sel initiale, dans une gamme [2,0%-2,8% par rapport à la matière totale (MT)], et la teneur initiale en matière grasse animale, dans une gamme [8,4%-21% MT]. Précisons que les bornes inférieures des gammes de variation des 2 facteurs étudiés ont été déterminées de façon à correspondre globalement à des réductions de 30% en sodium et de 60% en AGS, qui sont les objectifs de réduction visés dans le cadre de TeRiFiQ. Il est important de noter aussi que, dans un plan de Doehlert, le nombre de niveaux n'est pas le même pour tous les facteurs. Le premier facteur, *i.e.* la teneur en sel, a été étudié à trois niveaux : 2,0%, 2,4% et 2,8% MT, alors que le second facteur, *i.e.* la teneur en matière grasse animale, a été étudié à cinq niveaux : 8,4%, 11,6%, 14,7%, 17,9% et 21,0% MT. La mise en place d'un plan d'expériences de Doehlert a permis de réduire le nombre de formulations nécessaires à 7, auxquelles a été ajoutée une huitième formulation, dit de « contrôle », dans laquelle les saucissons secs ont été fabriqués avec une teneur en sel initiale de 2,8% MT et une teneur en matière grasse animale initiale de 21% MT. La formulation de contrôle a été utilisée

comme référence lors de l'analyse des résultats ayant trait aux autres formulations. Le détail des différentes formulations fabriquées lors de cette première série et issues du plan de Doehlert est donné dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1 Détail de la composition en matière grasse animale et en chlorure de sodium des formulations de saucissons secs fabriquées lors de la première série, suite à la mise en place d'un plan d'expériences de Doehlert. Les teneurs en matière grasse et en chlorure de sodium sont exprimées en % par rapport à la matière totale (MT) et ont été étudiées, respectivement, dans la gamme [8,4%-21,0% MT] et [2,0%-2,8% MT].

Formulations	Teneur en matière grasse animale (% MT)	Teneur en chlorure de sodium (% MT)
S1	14,7	2,4
S2	21,0	2,4
S3	17,9	2,8
S4	8,4	2,4
S5	11,6	2,0
S6	17,9	2,0
S7	11,6	2,8
S8 (Contrôle)	21,0	2,8

2.1.2. Seconde série de fabrication

La seconde série de fabrication de saucissons secs a été définie suite à des résultats préliminaires conduit par l'ADIV et l'INRA-QuaPA qui ont mis en évidence : (1) l'intérêt d'ajouter du KCl et de l'huile végétale pour réduire très fortement les teneurs en sodium (jusqu'à 30%) et en AGS (jusqu'à 60%) des saucissons et (2) le rôle très important joué par l'incorporation d'ail et de poivre dans l'arôme final des saucissons et dans l'appréciation des consommateurs français.

Le tableau 2.2 détaille les 7 formulations de saucissons de cette seconde série de fabrication. La première formulation de saucissons, appelée « contrôle » et utilisée comme référence pour analyser les 6 autres formulations, a été préparée à partir d'un mélange d'environ 70% MT de viande maigre de porc, 21% MT de matière grasse animale (correspondant à 7% de gras déjà contenus dans la viande maigre, auxquels ont été ajoutés 14% de bardière), 2,8% MT de sel, plus l'aromatisation à base d'ail et de poivre. Cette première formulation est, en tout point, identique à la formulation S8 du tableau 2.1. La deuxième formulation, notée NF, a été

préparée de manière identique à la formulation contrôle, mais sans aromatisation afin d'étudier l'impact de cette aromatisation sur l'ensemble des paramètres physicochimiques et biochimiques investigués. La troisième fabrication, notée K-RS, correspondait à une formulation réduite en sodium, contenant 0,8% MT de KCl. Les quatrième et cinquième formulations, préparées uniquement avec de la viande maigre de porc, sans ajout de bardière, correspondaient à des formulations réduites en matière grasse animale, combinées (formulation K-RSF) ou non (formulation RF) à une substitution partielle du NaCl par du KCl. Les deux dernières fabrications de saucissons correspondaient à des formulations réduites en matière grasse animale, contenant 3% d'huile de tournesol oléique et combinées (formulation K-SFO-RSF) ou non (formulation SFO-RF) à une substitution partielle du NaCl par du KCl.

Tableau 2.2 Détail de la composition en matière grasse animale et en chlorure de sodium des formulations de saucissons secs fabriquées lors de la seconde série. L'ensemble des teneurs est exprimé en % par rapport à la matière totale (MT), sauf les teneurs en ail et en poivre (aromatisation) qui sont exprimées en g/kg.

Formulations	Teneur en matière grasse animale (% MT)	Teneur en huile de tournesol oléique (% MT)	Teneur en NaCl (% MT)	Teneur en KCl (% MT)	Aromatisation	
					Ail en poudre (g/kg)	Poivre noir (g/kg)
Contrôle	21	0	2,8	0	0,5	2
NF	21	0	2,8	0	0	0
K-RS	21	0	2,0	0,8	0,5	2
RF	7	0	2,8	0	0,5	2
K-RSF	7	0	2,0	0,8	0,5	2
SFO-RF	7	3	2,8	0	0,5	2
K-SFO-RSF	7	3	2,0	0,8	0,5	2

De manière similaire à la première série de fabrication, l'effet de la formulation des saucissons fabriqués lors de cette seconde série sur les cinétiques des paramètres physicochimiques (pH, perte de poids et a_w) et biochimiques clés (protéolyse, lipolyse, oxydations protéique et lipidique) a été étudié. De plus, les qualités sensorielles des saucissons fabriqués lors de cette seconde série ont été analysées, aussi bien instrumentalement (mesures de texture et de couleur) qu'au travers de dégustations par un panel de consommateurs afin de juger l'acceptabilité de ces nouveaux saucissons secs allégés en sodium, en matière grasse animale et en AGS.

2.1.3. Procédure de fabrication de saucissons secs

Les deux séries de fabrication de saucissons ont été préparées dans l'installation pilote de l'ADIV selon la procédure décrite sur la figure 2.1.

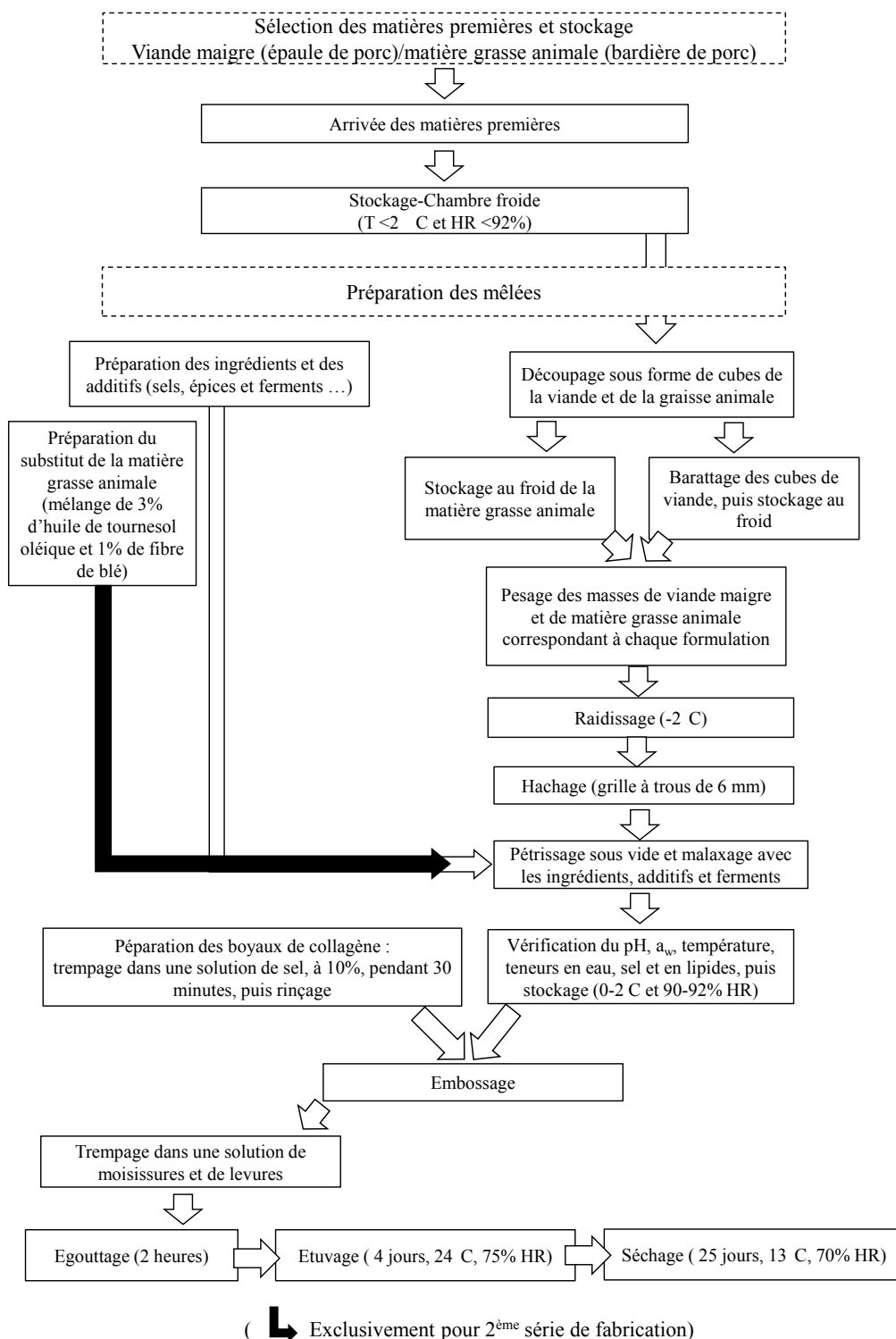


Figure 2.1 Procédure décrivant les différentes étapes suivies lors de la fabrication des deux séries de saucissons secs réalisées à l'ADIV.

Pour chaque formulation de chaque série, environ 30 saucissons ont été fabriqués de la manière suivante. Tout d'abord, de la viande de porc fraîche (épaule et bardière) a été achetée auprès d'un distributeur local (DISTRIPORC, Clermont-Ferrand, France). Le pH, la teneur en eau et l'activité de l'eau (a_w) de la viande de porc maigre ont été vérifiés à réception (pH = 5,98 +/- 0.03, teneur en eau = 74,0% +/- 0.5% et a_w = 0,971 +/- 0.002). Dans un premier temps, les épaules de porc ont été dégraissées, puis découpées en petits parallélépipèdes. Parallèlement, les bardières ont été aussi découpées en petits parallélépipèdes. Dans le cas des essais de substitution partielle de matière grasse animale de la seconde série de fabrication, 3% d'huile de tournesol oléique (préalablement stockée à -2°C) ont été mélangés avec un peu de viande de porc maigre et 1% de fibres végétales de blé (WF200, Rettenmaier & Fils, Rosenberg, Allemagne), jusqu'à l'obtention d'une pâte lisse permettant de minimiser lors du séchage la perte d'huile sous forme liquide. Pour chaque formulation, la quantité correspondante de cubes d'épaule de porc dégraissée et de bardière a été pesée, broyée au moyen d'un hachoir muni d'une grille à trous de 6 mm de diamètre, puis mélangée avec la quantité correspondante de NaCl et de KCl, et avec un ensemble d'additifs et de ferments. A noter que la solution de ferments a été préalablement préparée à une concentration de 100 kg/L, avant d'être ajoutée dans chaque formulation à une concentration de 10 g/kg. Pour chaque formulation, ont aussi été ajoutés, dans la mûlée, les ingrédients et les additifs suivants : dextrose (5 g/kg), nitrate de potassium (0,3 g/kg), érythorbate de potassium (0,5 g/kg), poivre noir (2 g/kg) (à l'exception de formulation NF de la seconde série), ail en poudre (0,5 g/kg) (à l'exception de formulation NF). Avant le poussage, le pH et l' a_w de chaque mûlée ont été vérifiés ; en parallèle, des boyaux synthétiques de 50 mm de diamètre ont été préparés, en les trempant dans une solution de sel (à 10%) et en les rinçant à l'eau. Ensuite, chaque mûlée a été poussée dans les boyaux (phase d'embossage) pour obtenir des saucissons crus, pesant environ 450 g et ayant 20 cm de longueur. Ces saucissons ont ensuite été plongés dans une solution de *Penicillium* afin que la surface des produits se couvre d'une « fleur » pendant la phase de séchage. Tous les saucissons ont été ensuite étuvés, pendant 4 jours, à 24°C et 70% d'humidité relative (HR), puis séchés pendant 25 jours, à 13°C et 70% HR, dans une cellule de séchage contrôlée en température et hygrométrie.

Pour chaque formulation, un échantillon au jour J0 (mûlée) et 3 saucissons aux jours J1, J2, J5, J7, J14, J21 et J29 de séchage ont été prélevés afin d'évaluer l'évolution de la composition chimique et des paramètres physicochimiques (a_w , perte de poids, pH) et biochimiques (protéolyse, lipolyse, oxydation des protéines et oxydation des lipides).

Cependant, comme les analyses ont été lourdes à mettre en place, les paramètres biochimiques ont finalement été évalués à seulement cinq points dans le temps : jours J0, J1, J7, J21 et J29. A noter que, pour les analyses chimiques et biochimiques, les saucissons ont été préalablement traités individuellement avec de l'azote liquide, de façon à les transformer en poudre fine. Cette opération visait à minimiser d'éventuels problèmes dans les analyses ultérieures résultant d'une hétérogénéité dans l'échantillonnage. La poudre fine a, au final, été stockée à -80°C, jusqu'à la réalisation des analyses.

2.2. Composition chimique des saucissons secs

2.2.1. Teneur en eau

Pour la mesure de la teneur en eau, 1,5 à 2,5 g de saucisson sec préalablement transformé en poudre fine (broyage à l'azote liquide) ont été déposés dans une coupelle, dont la masse à vide avait été auparavant mesurée et notée (m_c). La masse de la coupelle contenant l'échantillon (m_i) a été aussi mesurée et notée, puis le tout a été placé dans une étuve (Modèle FT127U, Firlabo, France), à 80°C +/- 2°C, pendant 72 h. Après étuvage, la masse finale de la coupelle contenant l'échantillon (m_f) a été, de nouveau, mesurée. Au final, la teneur en eau de l'échantillon, exprimée par rapport à la masse totale (MT), a été calculée par la formule suivante :

$$X_{eau} = \frac{m_i - m_f}{m_i - m_c} \quad (2.1)$$

Chaque mesure de teneur en eau figurant dans ce document correspond à la moyenne de six répétitions.

2.2.2. Teneur en sel

Le chlorure de sodium (NaCl) a été dosé dans les échantillons de saucisson sec par la chromatographie ionique, technique récemment acquise par le laboratoire. La chromatographie ionique (Modèle 850 professional IC, Metrohm France SAS, France) permet d'optimiser les séparations chromatographiques en gradient basse ou haute pression (Figure 2.2). Ce système peut recevoir différents modes de détection et comprend différents modules pour automatiser les préparations d'échantillons. Il est piloté par le logiciel Mag IC Net, qui présente une grande convivialité, de par son interface graphique. Il propose également des fonctionnalités de calcul intéressantes permettant de réaliser des dilutions « intelligentes » avec les automates d'injection. Deux types de dosage peuvent ainsi être évalués : les anions et les cations, ce qui

permet de doser, soit les ions sodium, calcium ou magnésium existants dans la viande, soit les ions chlorure, moyennant un changement de la colonne de séparation.

La préparation de la solution à analyser consiste à homogénéiser 2 g d'échantillon de saucisson sec dans 20 ml d'eau déminéralisée, en utilisant un Ultra-Turrax T25 (Ika, Allemagne). Après quelques heures de repos, une centrifugation a été faite pendant 20 min, à 14000 tr/min. Le surnageant a été dilué avec de l'eau déminéralisée et les ions chlorure, sodium ou potassium ont été mesurés au moyen de l'appareil de chromatographie ionique présenté sur la Figure 2.2. Au final, la teneur en chlorure de sodium et en chlorure de potassium a été exprimée en pourcentage par rapport à la matière sèche de l'échantillon (% MS). Chaque mesure de teneur en chlorure de sodium et en chlorure de potassium correspond à la moyenne de six répétitions.



Figure 2.2 Photographie montrant l'appareil de chromatographie ionique du laboratoire utilisé pour le dosage des ions chlorure, sodium ou potassium.

2.2.3. Teneur en lipides

La teneur en lipides dans les échantillons de saucisson sec a été déterminée selon la méthode de Folch, Lees et Sloane-Stanley (1957), mais en utilisant du dichlorométhane/éthanol (2:1) au lieu de chloroforme/méthanol (2:1) comme solvant. A partir de 0,5 g d'échantillon, les lipides totaux ont été extraits avec 50 ml de solvant. La phase organique (dichlorométhane) contenant les lipides a été séparée en utilisant 10 ml de solution saline à 0,73%, après centrifugation à 2000 g pendant 5 min, à 4°C. L'extrait obtenu a été évaporé dans un évaporateur sous vide et pesé pour déterminer la teneur totale en lipides (% MT). Pour chaque mesure de teneur en lipides, six répétitions ont été effectuées.

2.3. Analyses physicochimiques

2.3.1. Perte de poids

Tout au long des étapes de fermentation et d'affinage, 9 saucissons secs appartenant à chaque lot de fabrication ont été rassemblés sur une même barre et pesés simultanément, pratiquement tous les jours, afin de déterminer la cinétique de perte de poids. La perte de poids a été exprimée en pourcentage du poids initial.

2.3.2. Activité de l'eau

L'activité de l'eau (a_w) a été mesurée, à une température de 20°C, avec un a_w -mètre (AW Sprint TH-500, Novasina, Suisse) (Figure 2.3). Des tests préliminaires effectués pour mesurer l' a_w , individuellement, sur trois saucissons de chaque formulation ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les trois valeurs obtenues ($< 0,001$ unité d' a_w). Pour chaque formulation, l'activité de l'eau a donc été déterminée sur un mélange unique constitué d'échantillons prélevés sur 3 saucissons secs.



Figure 2.3 Photographie montrant l' a_w -mètre du laboratoire utilisé pour mesurer l' a_w des échantillons de saucissons secs.

2.3.3. Valeurs de pH

Pour mesurer le pH, 1 g d'échantillon de saucisson sec a été broyé dans 10 ml d'eau déminéralisée, pendant 1 min, en utilisant un Ultra-Turrax T25 (Ika, Allemagne). La mesure du pH a, ensuite, été faite au moyen d'une sonde de pH-mètre (Modèle InLab427, Mettler Toledo, France), préalablement calibrée avec des solutions standards de pH 4 et pH 7. Chaque mesure de pH a fait l'objet de 9 répétitions.

2.4. Analyses biochimiques

2.4.1. Indice de protéolyse

La technique de dosage par fluorescence mise au point au laboratoire (Harkouss *et al.*, 2012) a été retenue pour le dosage de la protéolyse. Pour cela, dans 10 ml d'eau ultra pure, a été déposé 1 g de saucisson, pendant 1 h, à froid afin de faciliter le broyage ultérieur au Polytron. Les peptides et les acides aminés résultant de l'action de la protéolyse ont été séparés des protéines par précipitation à l'acide trichloracétique à 12,5%, suivie d'une centrifugation à 4000 t/min, pendant 15 min, à 4°C. La fraction soluble contenant les produits de protéolyse a été neutralisée au moyen de borate de sodium (2 M, pH 10). L'extrait, ainsi neutralisé, a été incubé pendant 1 h avec une sonde fluorescente (fluorescamine), à raison de 600 µL d'extrait pour 180 µL de solution de fluorescamine. La fluorescamine préparée dans de l'acétone (0,6 mg de fluorescamine par mL d'acétone) n'est pas fluorescente à l'état libre. C'est le couplage entre l'amine primaire et la fluorescamine qui donne un produit fluorescent. Dans chaque puits d'une microplaque à puits, ont été versés 200 µL de la solution préparée. La fluorescence émise par la solution a été dosée par un spectrofluorimètre (FP 8300, Jasco France, France) équipé d'un lecteur de microplaques. Ce dosage a été fait dans le visible avec une excitation à 375 nm et une émission à 475 nm. Pour calculer le taux d'acides aminés et de peptides libérés, exprimé en équivalent glycine, une gamme étalon de glycine traitée dans les mêmes conditions a été préparée. Le taux total de protéines de l'extrait brut initial a été évalué par la méthode classique du biuret (Gornall *et al.*, 1949) et exprimée en mg/mL. Le rapport du taux d'acides aminés et de peptides libérés sur le taux total de protéines a permis ainsi de calculer un indice de protéolyse 'IP'. Pour chaque échantillon de saucisson sec, six répétitions de mesures de l'IP ont été effectuées.

2.4.2. Lipolyse

La dégradation des lipides en acides gras a été quantifiée en déterminant l'indice d'acidité d'un corps gras (norm NF T 60-204) dans des échantillons de saucissons secs prélevés au 29^{ème} jour. En effet, à partir de 25 g d'échantillon, les acides gras libérés par la lipolyse ont été solubilisés dans un mélange de solvant éther/éthanol. Le taux d'acide gras libre a, ensuite, été déterminé quantitativement au moyen d'hydroxyde de potassium (0,1 N), en présence d'un indicateur coloré (phénolphtaléine). En effet, avant la neutralisation de l'acidité des acides gras libres par l'hydroxyde de potassium, la phénolphtaléine est incolore. De plus, à partir de la neutralisation et dans un milieu basique, la couleur de la phénolphtaléine devient rose violacé.

Le volume d'hydroxyde de potassium utilisé pour neutraliser le milieu réactionnel est équivalent à l'acidité de l'échantillon ; l'indice d'acidité retenu correspond à la masse d'hydroxyde de potassium (en mg) nécessaire pour neutraliser 1 g de matière grasse. Pour chaque échantillon de saucisson sec, trois répétitions de la quantification de la lipolyse ont été effectuées.

2.4.3. Oxydation lipidique

Le niveau d'oxydation lipidique peut renseigner sur le développement aromatique qui s'opère durant la fabrication des saucissons secs. La quantification de l'oxydation lipidique dans les échantillons de saucissons secs a été réalisée selon deux méthodes complémentaires.

2.4.3.1. Méthode des TBARS

Dans un premier temps, la méthode développée par Mercier *et al.* (2000) a été utilisée pour quantifier le taux d'oxydation lipidique. Cette technique est elle-même une adaptation de la technique mise au point par Lynch et Frei (1993). Le principe de cette méthode est basé sur le dosage des composés provenant de la décomposition des hydro-péroxydes lipidiques. En effet, la peroxydation des lipides de la viande produit des aldéhydes, dont environ 95% le sont sous forme de malondialdéhyde (MDA) ou aldéhyde malonique. En milieu acide et à chaud, le MDA réagit avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un complexe de couleur rose présentant un maximum d'absorbance à 535 nm. Cette technique donne, au final, une approximation du taux d'oxydation des lipides dans la viande.

Pour réaliser ce dosage, 0,5 ml d'extrait de viande a été prélevé, suite au broyage d'1 g d'échantillon de saucisson sec dans 10 ml d'eau ultra-pure. A cet extrait, 0,25 ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 2,8% (préparé dans de l'eau) a été ajouté afin de maintenir le milieu à un pH acide, ainsi que 0,25 ml de TBA à 1%, préparé dans une solution de soude à 50 mM. L'ensemble des réactifs a été incubé à 100 C, pendant 10 min, afin de faciliter la réaction, puis refroidi, au minimum, 30 min, à température ambiante. Ensuite, les produits d'oxydation des lipides ont été extraits, à 4 C, suite à l'ajout de 2 ml de n-butanol, par centrifugation à 4000 rpm, pendant 15 min. La phase organique a été prélevée et sa densité optique a été mesurée au spectrophotomètre à 535 nm, par comparaison à un blanc de n-butanol. Afin de tenir compte des erreurs de mesure liées à la turbidité de l'échantillon, deux densités optiques ont été mesurées : l'une à 535 nm, qui est le maximum d'absorption du complexe TBA-MDA-TBA, et l'autre à 760 nm, représentative de la turbidité de l'échantillon ; la densité optique a ensuite été corrigée à partir de la simple différence entre les 2 densités optiques mesurées. Au final, les

taux d'oxydation des lipides ont été exprimés en unités TBA (UTBA), *i.e.* en mg de MDA par kg d'échantillon. Pour chaque échantillon de saucisson sec, six répétitions d'oxydation lipidique au moyen de la méthode des TBARS ont été effectuées.

2.4.3.2. Dosage du taux de bases de Schiff hydrosolubles

Dans les produits alimentaires tels que les produits carnés, les aldéhydes générés par l'oxydation des lipides peuvent aussi réagir avec d'autres composés de la viande tels que les protéines, les peptides et les acides aminés. En réagissant avec le groupement amines de ces composés, ils ne sont plus détectables par la technique des TBARS. En revanche, la réaction entre ces aldéhydes et le groupement amine de la fraction protéique aboutit à la formation des bases de Schiff qui sont fluorescentes et détectables dans la gamme du spectre 370-470 nm. Selon Gatellier *et al.* (2009), les bases de Schiff qui dérivent de la réaction entre un aldéhyde et le groupement amine des protéines et des peptides aboutissent à la formation des bases de Schiff hydrosolubles (HSB), qui apportent 70 à 80% de l'information relative au taux d'oxydation lipidique.

Afin de doser le taux de HSB dans les échantillons de saucissons secs, la phase aqueuse obtenue pendant la détermination de la teneur en lipides a été récupérée. En parallèle, une gamme étalon correspondant à une base de Schiff commerciale (en l'occurrence, de la quinine) a été préparée. La fluorescence de chaque point de la gamme étalon et de chaque échantillon a été mesurée ensuite à l'aide d'un spectrofluorimètre (FP 8300, Jasco France, France) selon les conditions suivantes : longueur d'onde d'excitation de 370 nm (fente d'excitation de 10 nm), longueur d'onde d'émission de 470 nm (fente d'émission de 10 nm) et temps d'intégration de 3 s. Une gamme étalon linéaire de quinine a été obtenue et a permis de calculer le taux de HSB contenu dans chaque échantillon. Au final, le taux de HSB a été exprimé en $\mu\text{M}/\text{kg}$ de saucisson sec équivalent quinine. Pour chaque échantillon de saucisson, six répétitions de dosage du taux de HSB ont été effectuées.

2.4.4. Oxydation protéique

L'oxydation des protéines dans les échantillons de saucissons secs a été évaluée par, à la fois, une mesure des taux de composés carbonylés et de groupements thiols libres.

2.4.4.1. Taux de carbonyles

Le taux de groupements carbonyles a été quantifié sur la base de la méthode développée par Oliver *et al.* (1987) et modifiée par Mercier *et al.* (1998) dans le cas d'échantillons de

viande. Selon cette méthode, les groupements carbonyles sont détectés par la formation de 2,4 dinitrophénylhydrazone après réaction avec la sonde 2,4 dinitrophenylhydrazine (DNPH) (Figure 2.4). Un composé jaune est alors formé, avec une absorbance à 370 nm.

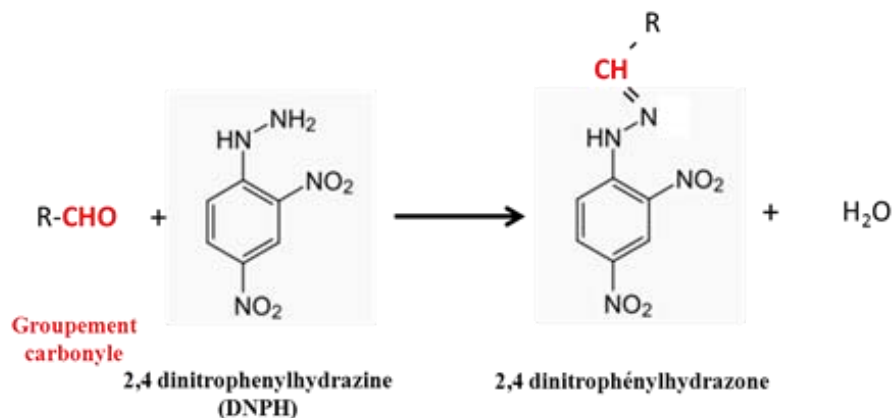


Figure 2.4 Principe général du dosage du taux de carbonyles par la méthode utilisée dans ce travail.

Les taux de carbonyles sont, au final, exprimés en nM de DNPH fixé par mg de protéine. Chaque dosage du taux de carbonyles dans les échantillons de saucissons secs a été répété six fois.

2.4.4.2. Taux de groupements thiols libres

Le dosage des groupements thiols libres a été réalisé par la méthode modifiée de Ellman (Morzel *et al.*, 2006), en utilisant une sonde 2,2'-dithiobis (5-nitropyridine) DNTP qui se fixe spécifiquement aux groupements SH de la cystéine. Le complexe, ainsi formé, est détectable par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 370 nm. Les résultats sont exprimés en nM de groupements thiols libres par mg de protéine. Chaque mesure de dosage du taux de groupements thiols libres dans les échantillons de saucissons secs a été répétée six fois.

2.5. Analyses instrumentales

2.5.1. Mesure de texture

La mesure de la texture des échantillons de saucissons prélevés au 29^{ème} jour a été faite selon la méthode de « Texture Profile Analysis (TPA) » (Bourne, 2002), à température ambiante, en utilisant le texturomètre universel (Modèle TA.XT plus, Stable MicroSystems Ltd., Surrey, England), dont disposait l'ADIV. Pour ce faire, deux parallélépipèdes de 2 cm de hauteur et de section 5 x 3 cm² ont été extraits de chaque saucisson non congelé. Les échantillons ont été ensuite placés sur le plateau de compression et ont été compressés

axialement deux fois successivement, à 50 % de leur hauteur initiale, avec un laps de temps de 2 s entre chacune des deux compressions (Figure 2.5).



Figure 2.5 Photographie montrant le dispositif expérimental de mesure par « texture profile analysis » (TPA) de la texture des échantillons de saucissons secs.

Concrètement, la mesure consiste à enregistrer des courbes force-temps, suite à l'application d'une charge de 15 kg sur l'échantillon à une vitesse de 1 mm/s. Au final, les paramètres mesurés à l'aide du logiciel XT.RA Dimension associé au texturomètre sont : la dureté, la fragilité, l'élasticité et la cohésion (Figure 2.6).

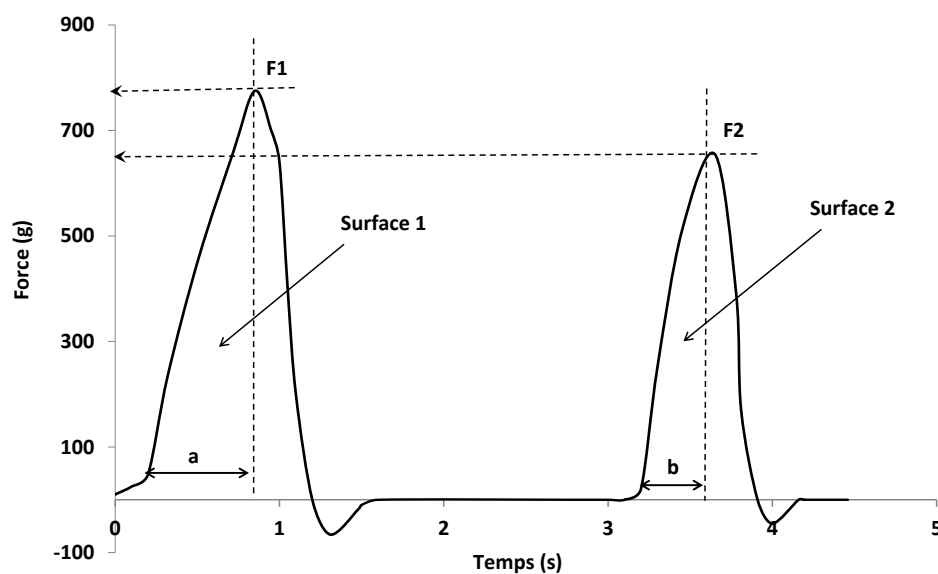


Figure 2.6 Exemple de résultat de courbe force-temps obtenue après un test de « texture profile analysis » (TPA) appliqué à un échantillon de viande.

La dureté est définie par la force maximale pendant le premier cycle de compression (F1) et est exprimée en N. La fragilité correspond au rapport des forces F2/F1. La cohésion est calculée par le ratio entre la surface située sous le second pic (Surface 2) et la surface située sous le premier pic (Surface 1). Enfin, l'élasticité est définie comme le ratio entre le temps enregistré entre le début du second pic et le second renversement de sonde (b) et le temps enregistré entre le début du premier pic et le premier renversement de sonde (a) (Figure 2.6). Chaque mesure de texture par TPA sur les échantillons de saucissons secs a été répétée six fois.

2.5.2. Mesure de couleur

La mesure de couleur des échantillons de saucissons secs a été effectuée avec un spectrophotomètre Konica Minolta CM 2500d (Japon) (Figure 2.7), en utilisant la source de lumière D65 et le système CIELAB (L*a*b*). L'instrument a été étalonné à 0 (dans l'air) et avec un standard blanc (n °7009694). Les mesures de couleur ont été effectuées sur la surface de tranches préalablement découpées sur des saucissons de 29 jours. Pour chaque formulation de saucisson fabriquée, les mesures de couleur indiquées ont été calculées à partir d'une moyenne de 15 mesures effectuées sur 3 tranches en 5 endroits différents.



Figure 2.7 Photographie montrant le spectrophotomètre du laboratoire utilisé pour mesurer la couleur des échantillons de saucissons secs.

2.6. Analyse de la fraction volatile odorante

L'identification des composés volatils odorants dans des saucissons secs de haut de gamme avait comme principal objectif d'identifier les composés responsables de l'arôme caractéristique du saucisson sec et ainsi comprendre leurs origines biochimiques, ceci afin de trouver des moyens simples permettant de rehausser l'arôme de produits à teneurs réduites en sel et en matière grasse animale. À cette fin, nous avons mis en œuvre des méthodes d'identification performantes, comme la chromatographie en phase gazeuse haute résolution à une et deux dimensions couplée à la spectrométrie de masse et à l'olfactométrie mono ou

multipostes. L'identification des odeurs clés de l'arôme du saucisson a permis de retracer leurs origines biochimiques les plus probables (viande, matière grasse, aromatisation ou autres).

2.6.1. Origines des échantillons de saucisson de haut de gamme

Les composés odorants-actifs ont été identifiés sur des saucissons secs artisanaux de haut de gamme disponibles dans le commerce. Ces saucissons secs ont été sélectionnés pour leur arôme intense et typique de saucisson. Ils provenaient des fournisseurs suivants :

- Salaisons de Fix, Le Bourg, 43320 Fix-Saint-Geney, France (<http://www.salaisondifix.fr>).
- Salaisons du Lignon, 160 rue Chazelet, BP 12, 43200 Saint-Maurice-de-Lignon, France (<http://www.salaisons-du-lignon.com>).
- Salaisons Debroas, Le Bas-de-Celas, 07110 Largentière, France (http://www.ardeche-agroalimentaire.fr/entreprise/SALAISONS-DEBROAS_103).
- Salaisons Pyrénéennes, 2 rue Anatole-France, 65320 Bordères-sur-l'Echez, France (<http://www.salaisons-pyreneennes.com/>).
- SARL Bornes, 4 place de la Mairie, 15400 Trizac, France (<http://www.boucherie-bornes.fr/>).

2.6.2. Analyse par chromatographie bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (SPME–GCxGC–tofMS)

A partir de 5 saucissons secs artisanaux (un par fournisseur), un mélange équipondérant de 5 g a été préparé, puis placé à température ambiante dans une ampoule (20 ml) hermétiquement fermée, avec une pré-incubation d'une durée de 10 min. L'extraction des composés volatils a été réalisée en plaçant une fibre d'extraction en phase solide (SPME) de 75 mm (Carboxen/PDMS fibre, Supelco Bellefonte, PA) dans l'espace de tête de l'échantillon, pendant 1 h. Une fois l'extraction terminée, une injection en continu (à 220°C, pendant 2 min) des composés volatils a été réalisée au moyen d'un auto-échantillonneur Combipal SPME (CTC Analytics AG, Zwingen, Suisse). La séparation et la détection ont ensuite été réalisées en utilisant un spectromètre de masse LECO Pegasus IV (LECO Corporation, St. Joseph, MI). Il convient de noter que les composés volatils ont, tout d'abord, été séparés sur une colonne capillaire RTX-5 (longueur : 30 m, diamètre intérieur : 0,32 mm, épaisseur du film : 1 µm; Supelco, Saint-Germain-en-Laye, France), puis ensuite sur une colonne capillaire DB-17 (longueur : 2,50 m, diamètre intérieur : 0,178 mm, épaisseur de film : 0,30 µm; J&W Agilent, Santa Clara, CA). Au final, les composés volatils ont été détectés par ionisation électronique à

70 eV, et les ions ont été scannés entre 33 m/z <math><220</math> u.m.a. Plus de détails sur les paramètres analytiques peuvent être trouvés dans Théron *et al.* (2010).

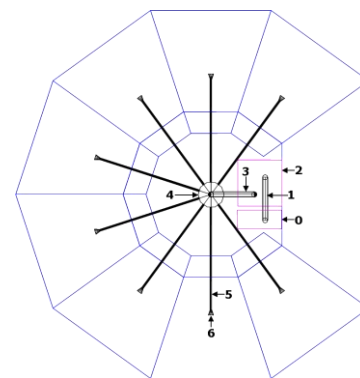
2.6.3. Analyse par espace de tête dynamique couplé à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse (DHS-GC-MS)

A partir de 5 saucissons secs artisanaux (un par fournisseur), un mélange équipondérant de 10 g a été préparé, puis placé à température ambiante dans une cartouche d'extraction Pyrex (M3, Maillères, Aubière, France). Les composés volatils ont été ensuite extraits par espace de tête dynamique (Tekmar, Cincinnati, OH 45234, USA), pendant 60 min, au moyen d'un flux d'hélium de 40 mL.min⁻¹ (Messer, pureté He/U : 99,995%), à 30°C, sur un piège (Tenax® TA 60/80, Supelco Bellefonte, PA; longueur de travail : 180 mm et diamètre intérieur : 1/8^{ème} pouce). Les composants volatils ont été ensuite extraits du piège par chauffage à 180°C, pendant 10 min, en utilisant de l'hélium (He / N55 pureté: 99,9995%), puis concentrés par cryo-focalisation (refroidissement à -150°C avec de l'azote liquide) en tête de colonne chromatographique. L'injection a été réalisée en chauffant le piège à 180°C, pendant 2 min. Les substances volatiles ont été séparées et identifiées en utilisant un ensemble GC-MS, composé d'un appareil de chromatographie phase gazeuse (GC 6890, Agilent Technologies; colonne apolaire capillaire RTX5-MS, longueur : 60 m, diamètre intérieur : 0,32 mm, épaisseur de film : 1 µm) relié à un spectromètre de masse quadripolaire (MSD 5973 inert, Agilent Technologies). Au final, les composés volatils ont été détectés par ionisation électronique à 70 eV, et les ions ont été scannés entre 33 m/z <math><220</math> u.m.a. Il convient de noter que les composés odorants soufrés ont été semi-quantifiés en mesurant les aires des ions spécifiques à chaque composé.

2.6.4. Chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse couplées à l'olfactométrie

Deux instruments d'olfactométrie complémentaires ont été utilisés pour détecter et identifier les composés odorants-actifs. Ils ont été couplés à des dispositifs d'extraction identiques de type espace de tête dynamique (Tekmar, Cincinnati, OH 45234, USA).

Le premier dispositif utilisé (Figure 2.8) permet un inventaire exhaustif des composés odorants-actifs, en couplant l'olfactométrie à 8 voies (système permettant à 8 personnes de sentir en même temps) à la spectrométrie de masse (DHS-GC-MS/8O) (Berdagué & Tournayre, 2005; Berdagué *et al.*, 2007). Ce système est capable de détecter un très grand nombre de zones olfactives en accumulant les performances des 8 juges.



8 personnes
qui sentent en
même temps

Figure 2.8 Photographies et schéma décrivant le dispositif d'olfactométrie à 8 voies du laboratoire qui a été utilisé pour faire un inventaire exhaustif des composés odorants-actifs piégés dans les échantillons de saucissons secs analysés.

Pour mesurer l'intensité des odeurs, une échelle à 5 niveaux a été utilisée : 1 – intensité très faible, 2 – faible, 3 – modérée, 4 – forte et 5 – très forte. Une session de « sniffing », d'une durée de 35 min, a été organisée avec 8 personnes, avec ce premier dispositif. Les données d'olfactométrie, ainsi obtenues, ont été ensuite traitées au moyen du logiciel AcquiSniff® (Berdaqué & Tournayre, 2002). L'aromagramme final des échantillons de saucissons secs a été déterminé à partir des intensités moyennes des aromagrammes individuels (Berdaqué & Tournayre, 2002).

Le second dispositif utilisé (Figure 2.9) est constitué d'un appareil de chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse et à l'olfactométrie. Ce dispositif fonctionne, soit en mode chromatographie phase gazeuse monodimensionnelle (DHS-GC-MS/O), d'une manière similaire au dispositif précédent DHS-GC-MS/8O, soit en mode chromatographie phase gazeuse bidimensionnelle (DHS-GC-GC-MS/O, dit mode « heartcut ») pour effectuer une exploration olfactive détaillée de toutes les zones odorantes-actives décelées par DHS-GC-MS/8O, ce qui est essentiel pour une identification fiable. Ce système est composé d'un appareil de chromatographie phase gazeuse (GC 6890, Agilent Technologies; colonne capillaire RTX5-MS, longueur : 60 m, diamètre intérieur : 0,32 mm, épaisseur du film : 1 µm) connecté à un détecteur de masse quadripolaire (MSD 5973, Agilent Technologies). La colonne capillaire est reliée au spectromètre de masse par l'intermédiaire d'une colonne capillaire désactivée (SGE,

longueur : 0,5 m, diamètre intérieur : 0,1 mm) et aussi au port d'olfactométrie par l'intermédiaire d'une autre colonne capillaire désactivée (SGE, longueur : 1,7 m, diamètre intérieur : 0,32 mm), au moyen d'un connecteur en T ne présentant pas de volume mort (diamètre intérieur du tube : 1/16^{ème} pouce ; ZTIM Valco® Instruments, Houston, TX). Le rapport de l'effluent entre le port d'olfactométrie et le détecteur de masse était de 1/1 (Figure 2.9).

En mode DHS-GC-GC-MS/O, chaque zone odorante active repérée lors de l'analyse par DHS-GC-MS/8O est isolée lors de la première séparation sur la colonne apolaire (RTX5-MS) et cryo-concentrée sur une seconde colonne polaire (DB-WAXETR, J & W Scientific, Agilent Technologies ; longueur : 30 m, diamètre intérieur : 0,32 mm, épaisseur du film : 1 µm). Les composés sont ensuite injectés dans la seconde colonne chromatographique par chauffage à 180°C, pendant 2 min, et sont finalement détectés par olfactométrie et par spectrométrie de masse (Figure 2.9). Les données d'olfactométrie obtenues par DHS-GC-MS/O ou par DHS-GC-GC-MS/O ont toutes les deux été acquises au moyen du logiciel AcquiSniff®, dans des conditions similaires, en termes de vocabulaire, de notation de l'intensité de l'odeur (1-5) et de durée de l'odeur, à celles utilisées pour les données précédentes de DHS-GC-MS/8O. Il est à noter que l'odeur des molécules identifiées par spectrométrie de masse a été comparée, d'une part, à des odeurs préalablement décrites et disponibles dans plusieurs bases de données (<http://www.thegoodscentscompany.com>, <http://www.flavornet.org>) et d'autre part, aux odeurs perçues par les personnes suite à la co-injection de composés de référence purs dans les colonnes apolaire et polaire.

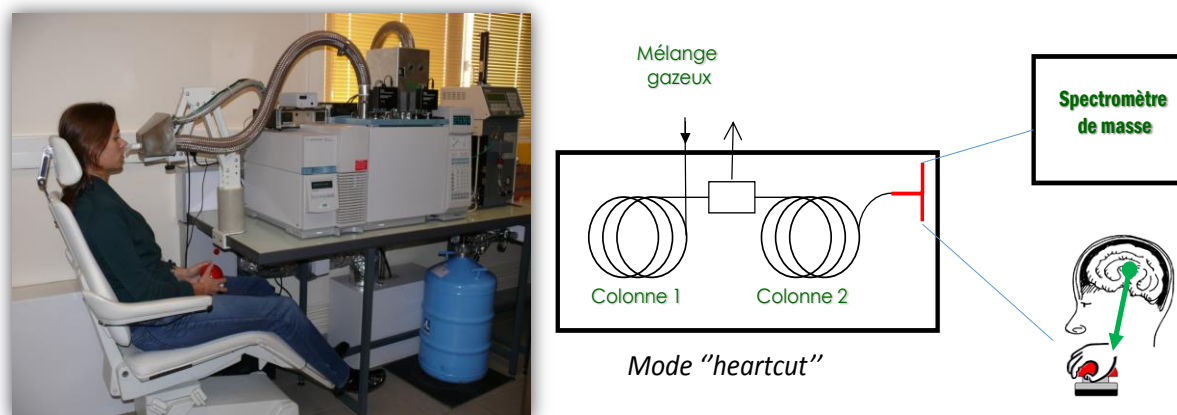


Figure 2.9 Photographie et schéma décrivant le dispositif du laboratoire qui a été utilisé pour identifier les composés odorants-actifs piégés dans les échantillons de saucissons secs analysés.

2.7. Analyse sensorielle

L'acceptabilité par les consommateurs de fabrications de saucissons secs allégés en sodium et en matière grasse animale, avec ou sans aromatisation, correspondant à la seconde série de fabrication, a été évaluée et comparée suite à une dégustation effectuée par un panel de 29 personnes habituées à consommer du saucisson sec et recrutées au sein du laboratoire (appelées juges). Après avoir vérifié la sécurité microbiologique des saucissons secs fabriqués en termes d'absence de *Salmonella spp.* et de *Listeria monocytogenes*, les analyses sensorielles ont été réalisées par les 29 juges en utilisant une échelle de notation structurée, allant de 0 (score le plus faible) à 10 (score le plus élevé). Huit échantillons de saucisson sec ont été présentés aux juges sous éclairage naturel. Le premier échantillon correspondait à la formulation de contrôle et était uniquement destiné à habituer les juges à la séance de dégustation. L'ensemble des 7 formulations de saucisson fabriquées lors de la seconde série ont ensuite été présentées aux juges dans un ordre aléatoire ; seuls les résultats de ces 7 évaluations sensorielles ont été analysés statistiquement. Quatre critères d'acceptabilité ont été étudiés : l'aspect visuel, la texture en bouche, le goût et l'arôme des produits. De façon à compléter l'évaluation de l'acceptabilité des saucissons, il a également été demandé aux juges de décrire avec un vocabulaire libre les caractéristiques organoleptiques de texture, de saveur et d'arôme des saucissons perçues.

2.8. Analyses statistiques

Pour rendre les résultats physicochimiques et biochimiques plus faciles à interpréter et les figures plus facile à lire, un traitement statistique spécifique appelé classification hiérarchique ascendante a été appliqué à toutes les valeurs brutes mesurées. Cette classification a consisté à grouper les échantillons qui conduisaient à des résultats similaires par rapport à un paramètre donné, et ainsi, créer des classes de formulations de saucissons secs. Cela a été réalisé en utilisant la méthode de Ward, avec le logiciel STATISTICA 10-V2014. De plus, quand une classe de formulations de saucissons a été formée, les valeurs du paramètre correspondant à la classe ont été calculées, pour chaque temps, à partir de la moyenne de toutes les valeurs de tous les saucissons appartenant à cette même classe.

Les analyses statistiques des résultats ont été complétés par une analyse de variance (ANOVA) en utilisant le logiciel STATISTICA 10-V2014. L'objectif était d'évaluer l'effet de chaque facteur étudié (temps, aromatisation, teneur en sel, teneur en matière grasse animale, ajout d'huile de tournesol, substitution du NaCl par du KCl), ainsi que l'effet des interactions

entre les teneurs en sel et en matière grasse animale et entre les teneurs en sel et en huile de tournesol, sur chaque variable mesurée. Lorsque un effet significatif a été trouvé ($p < 0,05$), des procédures *post-hoc* ont été appliquées, consistant en des comparaisons multiples entre les moyennes par l'intermédiaire du test de Tukey afin de déterminer le niveau de significativité entre les groupes.

Enfin, les résultats issus de l'analyse sensorielle ont été aussi traités statistiquement. Une classification hiérarchique ascendante a été réalisée pour obtenir une typologie des juges en fonction de leur acceptabilité des 7 formulations testées. Celle-ci a été réalisée à partir des variables d'acceptabilité de l'aspect visuel, de la texture en bouche, du goût et de l'arôme des produits. Les calculs ont été réalisés selon la méthode de Ward (STATISTICA 10-V2014). L'effet des formulations sur les notes d'acceptabilité de l'aspect, de la texture, du goût et de l'arôme des produits a été évalué par analyse de la variance selon les deux modèles suivants :

$$\text{Acceptabilité}_{i,j,k} = \mu + \text{Juge}_i + \text{Formulation}_j + (\text{Juge} \times \text{Formulation})_{ij} + \varepsilon_k \quad (2.2)$$

$$\text{Acceptabilité}_{i,j,k} = \mu + \text{Typologie des juges}_i + \text{Formulation}_j + \varepsilon_k \quad (2.3)$$

Où : μ est l'effet moyen ; Juge_i correspond à l'effet juge ($i=29$) ; Formulation_j correspond à l'effet formulation (7 niveaux) ; $(\text{Juge} \times \text{Formulation})_{ij}$ correspond à l'interaction juge-formulations ; $\text{Typologie des juges}_i$ correspond à la classe des effets juge et ε_k est la variance résiduelle.

Les comparaisons de moyennes ont été réalisées selon le Test de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Chapitre 3 : RESULTATS

3.1. Introduction

Les résultats majeurs obtenus dans ce travail de thèse sont présentés dans ce troisième chapitre, sous la forme de 3 articles scientifiques :

- Le premier article (article n°2, publié dans *Food and Bioprocess Technology*) décrit, à partir de 8 formulations différentes de saucissons établies à partir d'un plan d'expériences de Doehlert à deux facteurs, l'effet d'une réduction directe des teneurs en sel et en matière grasse sur la dynamique d'évolution des paramètres chimiques (teneurs en eau, en sel et en lipides), physicochimiques (pertes de poids, a_w , pH) et biochimiques (protéolyse, lipolyse, oxydations lipidique et protéique), tout au long de la chaîne de fabrications de saucissons secs.
- Le deuxième article (article n°3, soumis à *Meat Science*) porte sur l'identification des composés volatils odorants clés de saucissons secs de haut de gamme et met en évidence le rôle critique joué par l'aromatisation (l'ail et le poivre) dans l'apparition de ces composés odorants clés.
- Le dernier article de ce chapitre (article n°4, récemment soumis à *Meat Science*) a pour objet l'étude de l'effet d'une substitution partielle du chlorure de sodium et de la matière grasse animale, respectivement, par du chlorure de potassium et de l'huile de tournesol oléique, sur la dynamique d'évolution des propriétés physicochimiques et des réactions biochimiques lors de la fabrication de saucissons secs. Cet article met en évidence le rôle crucial de l'aromatisation (notamment le poivre) dans l'évolution du pH. Il présente également les résultats d'appréciation de la qualité sensorielle réalisée sur ces nouvelles formulations de saucissons secs aux qualités nutritionnelles améliorées, à savoir (i) des mesures instrumentales de texture et de couleur, et (ii) l'acceptabilité de ces nouveaux produits à teneurs réduites en sodium et AGS perçue par un jury de consommateurs du laboratoire.

3.2. Article n°2 (publié dans *Food and Bioprocess Technology*, 8(10), 2109-2122)

Effect of combined salt and animal fat reductions on physicochemical and biochemical changes during the manufacture of dry-fermented sausages

Hassan Safa^a, Philippe Gatellier^a, André Lebert^b, Laurent Picgirard^c, Pierre-Sylvain Mirade^a

^aINRA, UR370 Qualité des Produits Animaux, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France.

^bInstitut Pascal, UMR6602 UBP/CNRS/IFMA, 24 avenue des Landais, BP80026,
63171 Aubière Cedex, France.

^cADIV, 10 rue Jacqueline Auriol, ZAC Les Gravanches, 63039 Clermont-Ferrand Cedex 2,
France.

Abstract

Reducing salt and fat contents in dry-fermented sausages could benefit consumer health. This study aimed to quantify, from an experimental design, the effects of salt and fat contents and combined salt and fat reductions on the time-course of several physicochemical (product weight loss, mean water activity and pH values) and biochemical (proteolysis, lipolysis, lipid and protein oxidations) parameters. Statistical analyses found that time, salt and fat contents had a very significant impact on weight loss and a_w and that time and salt content (not fat content) had a significant impact on pH. Biochemical results indicated that proteolysis was salt content-dependent and amplified by combined salt and fat reductions. Intensity of lipolysis was mainly dependent on fat content. Lipid and protein oxidations were more intense in higher-fat formulations. Combined salt and fat reductions in dry-fermented sausages increased acidification, weight losses and a_w , leading to more proteolysis, less lipolysis and less oxidation. Sensory studies are now required to investigate consumer acceptability of these healthier sausages. However, the present results constitute a valuable set of data for helping professionals wishing to reduce salt and fat contents in dry-fermented sausages.

Keywords: dry-fermented sausage; combined salt and fat reductions; physicochemical properties; proteolysis; lipolysis; lipid and protein oxidations.

Introduction

Meat and meat products are very important elements in human diet as they are especially rich in proteins, vitamins and minerals (Josquin et al. 2012). Dry fermentation and dry curing are centuries-old techniques of meat preservation, and dry-processed meats have become typical, authentic and very popular products across Europe. To illustrate, Spain produces about 200,000

tons of dry-fermented sausage per year (Martin-Sanchez et al. 2011) while France produces another 110,000 tons (Hoz et al. 2004). Dry-fermented sausages are made to different recipes using different technologies in different countries and local regions, but all are generally prepared from raw meats consisting of about $\frac{2}{3}$ lean meat and $\frac{1}{3}$ fat. In general, the lean meat comes from different animal sources such as pork and beef, whereas the fat is almost always pig backfat. The term “dry-fermented sausage” corresponds to raw meats preserved under the effect of salting, lactic fermentation and drying. These products are manufactured by mincing raw meat and pork backfat added with 5% of spices, curing agents—chiefly sodium chloride—additives and starter culture. The meat batter thus obtained is pushed into artificial or natural casings before undergoing fermentation, steaming and drying processes (Olivares et al. 2009).

Excessive consumption of salt, especially sodium chloride, in human diet is strongly related to increased blood pressure and consequently cardiovascular disease (Gelabert et al. 2003), and to certain cancers, including stomach cancer (Stollewerk et al. 2012). To limit the development of these human diseases, several health organizations in industrialized countries worldwide recommend limiting salt consumption to 6 g per day (e.g. US Department of Health and Human Services 2005). These organizations also prone reducing fat intake to less than 30% of total calories to limit the development of serious health disorders like obesity, high blood cholesterol and coronary heart diseases which are highly related to excessive intake of fat-rich foods, especially saturated fatty acids (SFA) and cholesterol (Ansorena and Astiasarán 2004; Ruiz-Capillas et al. 2012). Given that dry-fermented sausages contain high levels of sodium and SFA, from a health standpoint, it would be beneficial to reduce the salt and fat contents in this family of meat products. However, salt and fat play key functional ingredients in dry-fermented sausage manufacture. For instance, salt ensures microbiological safety by decreasing water activity (a_w), as well as acting on the drying process by decreasing weight losses. It has also been reported that salt affects biochemical reactions such as proteolysis, lipolysis, oxidation and fermentation that are involved in the development of the final sensory attributes of dry-fermented sausages, such as texture, flavour and appearance. On the other hand, fat in meat products is considered a valuable source of energy, fatty acids and vitamins, and biochemical reactions affecting the lipid fraction are also involved in the development of the final sensory attributes of dry-fermented sausages, such as flavour, juiciness and texture. Several studies have focused on the effect of reducing salt or fat content on physicochemical properties (weight losses, a_w , and pH) and biochemical reactions (proteolysis, lipolysis, lipid and protein oxidations). For instance, Mora-Gallego et al. (2013) recently reported that salt

slows the drying process by affecting the binding water capacity of protein, and that reducing fat content accelerates product weight losses. Furthermore, Roseiro et al. (2008) showed that salt-reduced dry-fermented sausages showed higher a_w values than control batches. Likewise, Olivares et al. (2010) showed that reducing fat content in dry-fermented sausages led to slightly higher end-of-process a_w . The literature on pH is far less consistent. Corral et al. (2013) did not find significant difference between pH values of salt-reduced and control dry-fermented sausages, whereas Roseiro et al. (2008) reported higher fermentation rates in salt-reduced dry-fermented sausages. With respect to fat content, Olivares et al. (2010) found a faster pH decline in low-fat sausages whereas Muguerza et al. (2002) did not find any effect of fat level on pH value. Other authors have focused on the effect of salt content and fat content on the biochemical reactions in meat products. Harkouss et al. (2014), for example, reported higher proteolytic activity when salt is reduced in dry-cured ham. Several authors have found higher proteolysis rates in salt-reduced dry-fermented sausages (Armenteros et al. 2012). Likewise, the literature reports higher lipolysis rates in dried salted meat products (Armenteros et al. 2012; Quintanilla et al. 1996; Stahnke 1995). Several studies have reported that NaCl is able to accelerate the oxidation process (Jin et al. 2013), whereas other authors find that salt plays an antioxidant role. For example, Rhee et al. (1983) reported that lipid oxidation is inhibited in ground pork meat prepared with high NaCl concentrations. Some authors also observed a significant increase of lipid oxidation in sodium-reduced dry-fermented sausage formulations compared to the traditional one, when using calcium chloride to partially replace sodium chloride (Flores et al. 2005; Zanardi et al. 2010). Reducing fat content logically reduces the extent of lipolysis and the production of lipid oxidation products. Sanchez-Zapata et al. (2013) highlighted a positive impact of adding tiger nut fibre as a source of fibre and walnut oil as a source of unsaturated fatty acids during the manufacture of a traditional Spanish dry-cured fermented sausage. However, all the above-cited studies focused on the impact of separate reductions in salt or fat content during dry-fermented sausage manufacture. To our knowledge, few studies have addressed a combined reduction in salt and fat.

Therefore, the objective of this study was to use an experimental design to quantify the effect of salt content, fat content and combined salt and fat reductions on the time-course of several physicochemical properties and on the biochemical reactions that occur during the manufacture of dry-fermented sausages.

Materials and methods

Manufacture of dry-fermented sausages

To investigate the effects of time, fat content, salt content and their interactions on physicochemical and biochemical changes during the processing of dry-fermented sausages, a Doehlert design (Doehlert 1970) was established on the basis of two factors: initial animal fat content in the range [8.4%–21%] and initial salt content in the range [2.0%–2.8%]. The first factor, i.e. fat content, was studied at five levels: 8.4%, 11.6%, 14.7%, 17.9% and 21.0%, while the second factor, i.e. salt content, was studied at three levels: 2.0%, 2.4% and 2.8%. In this study, setting up a Doehlert design leads to seven formulations of dry-fermented sausages with different amounts of salt and fat, as indicated in Table 3.1. We added a control fabrication numbered ‘eight’ in which dry-fermented sausages were manufactured from a 2.8% initial salt content and a 21% initial fat content to be used as baseline reference for the other seven fabrications.

Table 3.1 Details of experiments giving all the formulations of dry-fermented sausages performed in the present study. This list was built from a Doehlert design on the basis of two factors: initial animal fat content in the range [8.4%–21% total matter] and initial salt content in the range [2.0%–2.8% total matter].

Experiments	Animal fat content (%)	Sodium chloride content (%)
S1	14.7	2.4
S2	21	2.4
S3	17.9	2.8
S4	8.4	2.4
S5	11.6	2.0
S6	17.9	2.0
S7	11.6	2.8
S8 (Contrôle)	21	2.8

For each formulation, the corresponding amount of defatted pork shoulder and backfat was weighed, ground to 6 mm diameter, and mixed with the corresponding amount of salt, a set of additives and a starter culture corresponding to a mid-acidification kinetic starter. The starter culture (MF55, Biovitec, Lissieu, France) was prepared at 100 kg/L concentration and added to each formulation at 10 g/kg. In each meat batter, we added dextrose (5 g/kg), potassium nitrate (0.3 g/kg), potassium erythorbate (0.5 g/kg), black pepper (2 g/kg), garlic powder (0.5 g/kg)

and finally a solution of starters (10 g/kg). The meat batter was then stuffed into 50 mm-diameter collagen casings. The raw sausages, weighing 450 g and about 20 cm in length, were then plunged in a *Penicillium nalgiovensis* solution to cover their surface during the drying stage. All products were steamed for 4 days at 24°C and 70% relative humidity (RH) then dried for 25 days at 13°C and 70% RH in the same ripening room.

For the 8 batches of Table 3.1, three sausages were taken at day 1, 2, 5, 7, 21 and 29 of drying to evaluate the time-course patterns of chemical composition, physicochemical parameters (a_w , weight loss, pH) and biochemical parameters (proteolysis, fermentation, protein oxidation, lipid oxidation). As the experiments were cumbersome to set up, the biochemical parameters were ultimately only assessed at four timepoints, i.e. day 1, 7, 21 and 29. In addition, for biochemical and basic chemical analyses, all the dried products were individually treated with liquid nitrogen, ground down into fine powder to minimize problems tied to heterogeneity of sampling in subsequent analysis, and stored at -80°C until analysis.

Chemical composition of dry-fermented sausages

Moisture

Moisture was determined by drying about 1.5 g of powdered-down sample at $80 \pm 2^\circ\text{C}$ in a temperature-controlled chamber (Model FT127U, Firlabo, France) until constant weight, which took at least 48 h (adapted from Norm NF V 04401). Moisture content was expressed on a total matter basis (kg H₂O/kg TM). All moisture measurements were performed in six replicates.

Salt content

Salt content was measured using 2 g of powdered-down sample. The sample was homogenized (Ultra-Turrax system, Ika, Germany) with 20 mL of ultrapure water. After a 3-hour rest period, the homogenate was centrifuged at 11,300 g for 10 min at room temperature (MiniSpin Plus, Eppendorf, France). The supernatant was recovered, diluted in ultrapure water, and run through an ion chromatography system (850 professional IC, Metrohm France SAS, France) to systematically measure chloride ion and sodium ion contents. The chloride ion or sodium ion values were then used to calculate an equivalent NaCl content (%). All the details on this measurement technique developed in the laboratory can be found in Bombrun (2013). All salt content measurements were performed in six replicates.

Fat content

Fat content was determined on powdered-down samples based on the method of Folch et al. (1957) but using dichloromethane/ethanol (2:1) instead of chloroform/methanol (2:1) as solvent. Total lipids from 0.5 g of sample were extracted with 50 mL of solvent. The organic phase (dichloromethane) containing total lipids was separated using 10 mL of salt solution at 0.73%, after centrifugation at 2000 *g* for 5 min, at 4°C. The extract obtained was evaporated in a vacuum evaporator and weighed to determine total lipid content. All fat content measurements were performed in six replicates.

Physicochemical analysis of dry-fermented sausages

Weight loss

Throughout the dry-fermented sausage drying period, 9 products from each batch arranged on the same bar were weighed together practically every day to determine the kinetics of weight loss. Weight loss was expressed as percentage of initial weight.

Water activity (a_w)

Water activity (a_w) was measured at 20°C with a laboratory a_w -meter (a_w Sprint TH-500, Novasina, Switzerland). Preliminary tests performed to measure a_w individually on the three sausages of each formulation showed that there was no significant difference between the three values ($<0.001 a_w$ unit). Water activity values were therefore determined on a mixture of the three sausages for each formulation.

pH

pH was determined using 1 g of powdered-down sample homogenized (Ultra-Turrax system, Ika, Germany) with 10 mL of ultrapure water. pH was measured conventionally with a pH meter (InLab427, Mettler Toledo, France) calibrated with standard solutions of pH 4 and pH 7. All pH measurements were performed in nine replicates.

Biochemical analysis of dry-fermented sausages

Proteolysis

The proteolysis index (PI) of each powdered-down sample of dry-fermented sausages was determined using a fluorescence method based on the reaction of fluorescamine with N terminal α -amino groups of peptides in TCA soluble fractions (Harkouss et al. 2012). In this method, PI

is defined as the percentage of the ratio of amino group content to total protein content. All PI measurements were performed in nine replicates.

Lipolysis

The degradation of fat into fatty acids was quantified by determining the acid value of fat (Norm NF T 60-204) in samples of dry-fermented sausages, at day 29. Briefly, total free fatty acids from 25 g of sample were solubilized in a solvent mix of ether/ethanol. Total free fatty acids were determined quantitatively by potassium hydroxide (0.1 N) in the presence of a colour indicator (phenolphthalein). Before neutralization, phenolphthalein (acid medium) is colourless. Under basic conditions (beyond neutralization), it colours pink. The number of equivalents of potassium hydroxide poured is equal to the number of equivalents of acid present in the sample, and acid value is the mass of potassium hydroxide, in mg, required to neutralize one gram of fat. All these measurements were performed in three replicates.

Lipid oxidation

Lipid oxidation was quantified in powdered-down samples of dry-fermented sausages by determining hydrosoluble Schiff bases (HSB) using the procedure reported in Gatellier et al. (2009). For this purpose, the aqueous phase obtained to determine fat content was collected to quantify HSB levels. A standard curve of commercial Schiff bases (quinine) was prepared in parallel. Fluorescence of each point of the standard curve and fluorescence of each sample were measured with a spectrofluorometer (FP 8300, Jasco, France) at a 370 nm excitation wavelength (excitation slit: 10 nm), a 470 nm emission wavelength (emission slit: 10 nm) and a 3 s integration time. A linear standard curve of quinine was plotted, and sample HSB levels were expressed as micromoles/kg meat *vs.* quinine equivalent. All lipid oxidation measurements were performed in nine replicates.

Protein oxidation

Protein oxidation was assessed in powdered-down samples of dry-fermented sausages by determining free thiol groups of cysteine residues from Ellman's assay using 2,2'-dithiobis(5-nitropyridine) (DTNP) as reagent (Morzel et al. 2006). In alkaline solution, DTNP binds to the anionic free thiol groups of cysteine residues to form a complex that absorbs at 386 nm. The results are expressed in nanomoles of bound DTNP per mg protein. All protein oxidation measurements were performed in nine replicates.

Statistical analyses

To make the results easier to interpret and the figures easier to read, a specific statistical treatment called hierarchical cluster analysis (HCA) (Chrétien & Szymoniak 1987; Wishart 1969) was applied to all measured raw values. HCA consists in clustering samples that lead to similar results on a given parameter, thereby creating classes of dry-fermented sausages. HCA was calculated using Ward's method on STATISTICA 10-V2014 software. In addition, when a class of sausages is formed, the values of the parameter corresponding to the class are calculated, at each time point, by averaging the values of all the same-class sausages.

Statistical analyses of the results were completed by analysis of variance (ANOVA) using STATISTICA 10-V2014 software. The objective was to assess the effect of each factor (time, fat content, salt content, and salt content \times fat content interaction) on each variable measured in this study. When ANOVA found a significant effect ($p < 0.05$), post-hoc procedures were used: multiple comparisons among means were examined by the Tukey test to determine the level of significance between groups.

Results and discussion

Effects on chemical composition of dry-fermented sausages

Drying dry-fermented sausages globally leads to a reduction in in-product water content due to water evaporation from the product surface and, in turn, to a fat and salt concentration that increases fat and salt contents, respectively. We therefore ran chemical analysis of moisture, salt content and fat content at four timepoints, i.e. day 1, day 7, day 21 and day 29 (end of drying) to track and trend the time-course of these parameters. Table 3.2 shows the measured values of moisture, salt content and fat content in these dry-fermented sausages.

Moisture

Analysis of Table 3.2 confirms that in-product moisture decreases globally with drying, with mean values decreasing from initial values of 59.9%–68.1% at day 1 to final values of 36.9%–43.6% at day 29. The lowest final water content values were obtained for the two 21%-animal fat formulations (S2 and S8, i.e. the control) and for S6 corresponding to a high-fat but low-salt formulation (17.9% fat and 2.0% salt, respectively). Note that at day 1 in-product water content values of all formulations were lower than the water content measured at reception of the fresh lean meat that was not dried (73.5%), probably as a result of the pork backfat, curing agents (NaCl, nitrite) and additives added to the pork lean when preparing the meat batter. Indeed, at

day 1, the higher moisture contents were measured on the three formulations containing less than 12% animal fat and the highest value (68.1%) was even obtained for the lowest-fat formulation (S4).

It can be concluded that the respective proportions of lean meat and pork backfat logically influence moisture values during dry-fermented sausage manufacture (Table 3.2). For an identical drying process, the highest moisture values expressed as percentage of total matter are obtained for the low-fat products.

Salt content

Analysis of Table 3.2 logically indicates a net increase in in-product salt content with drying. Note that fresh pork lean is known to naturally contain small amounts of sodium and chloride ions; here we measured a 0.17% equivalent of NaCl content in the fresh pork lean. At day 1, measured salt content value ranged from 2.34% to 3.13% depending on formulation (Table 3.2), whereas intended salt content corresponded to the levels of the Doehlert design: 2.0%, 2.4% and 2.8%. This implies that real salt content values are globally higher than intended values. Accurate analysis between real and intended salt content shows that discrepancies ranged from 0.18% (S8) to 0.52% (S2) depending on formulation, with a mean discrepancy of 0.37%. This underlines just how difficult it is to add exactly the intended amount of NaCl to meat batters with varying proportions of lean meat and fat, even at pilot-scale level. At day 29, the final NaCl content values ranged from 6.26% to 7.64% depending on experiment and on the weight loss experienced by the dry-fermented sausages. The highest final NaCl content value was measured for the control (S8) that initially contained about 2.98% NaCl (day 1) and that counted one of the lowest final water contents measured (60.8%, Table 3.2).

Regarding in-product salt content, it can be concluded that the measured salt content values at day 1 were still higher than the intended values, probably as a result of the natural presence of sodium and chloride ions in lean pork meat and very probably as a result of the real difficulty in perfectly adjusting the amount of salt added during the meat batter preparation. However, the formulations with the higher intended salt content values nevertheless contained more salt than the others once the meat batters were prepared, thus a priori lowering the impact of this observed discrepancy on the physicochemical and biochemical results subsequently obtained.

Table 3.2 Time-course evolution of chemical composition (moisture, sodium chloride and animal fat contents) measured in dry-fermented sausages for the eight formulations of Table 3.1. Measured values were the means \pm standard deviation calculated from six independent determinations. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$).

Moisture content (% total matter)				
Experiments	Day 1	Day 7	Day 21	Day 29
S1	62.5 \pm 0.8 ^c	57.7 \pm 0.7 ^c	46.1 \pm 0.6 ^{bc}	43.6 \pm 1.0 ^a
S2	61.1 \pm 0.7 ^b	54.8 \pm 0.6 ^{de}	41.3 \pm 0.8 ^e	37.4 \pm 0.8 ^c
S3	59.9 \pm 0.5 ^a	55.6 \pm 0.8 ^d	43.4 \pm 1.2 ^{de}	41.1 \pm 0.6 ^b
S4	68.1 \pm 0.6 ^f	62.9 \pm 1.0 ^a	49.8 \pm 0.9 ^a	40.7 \pm 1.0 ^b
S5	66.0 \pm 0.5 ^e	59.8 \pm 1.2 ^b	48.1 \pm 0.3 ^{ab}	39.7 \pm 0.7 ^b
S6	61.7 \pm 0.5 ^{bc}	51.7 \pm 0.7 ^f	42.0 \pm 0.5 ^e	38.2 \pm 0.5 ^c
S7	64.8 \pm 0.3 ^d	59.3 \pm 0.6 ^b	45.4 \pm 0.3 ^{cd}	40.4 \pm 0.7 ^b
S8 control	60.8 \pm 0.6 ^{ab}	54.1 \pm 0.5 ^e	42.8 \pm 1.0 ^e	36.9 \pm 0.7 ^c
Sodium chloride content (% total matter)				
Experiments	Day 1	Day 7	Day 21	Day 29
S1	2.86 \pm 0.50 ^{bcd}	3.76 \pm 0.30 ^c	5.77 \pm 0.41 ^{cd}	6.54 \pm 0.60 ^{bcd}
S2	2.92 \pm 0.25 ^{abc}	4.35 \pm 0.15 ^{ab}	5.93 \pm 0.12 ^c	6.56 \pm 0.23 ^{bcd}
S3	3.13 \pm 0.30 ^a	4.5 \pm 0.40 ^a	6.76 \pm 0.40 ^a	7.15 \pm 0.50 ^{ab}
S4	2.84 \pm 0.23 ^{cd}	3.77 \pm 0.29 ^c	6.27 \pm 0.20 ^b	6.86 \pm 0.20 ^{bc}
S5	2.34 \pm 0.17 ^{de}	3.62 \pm 0.13 ^d	5.61 \pm 0.18 ^d	6.26 \pm 0.13 ^d
S6	2.44 \pm 0.13 ^{cde}	3.64 \pm 0.14 ^d	5.66 \pm 0.14 ^d	6.39 \pm 0.20 ^{cd}
S7	3.08 \pm 0.14 ^{ab}	4.23 \pm 0.16 ^b	5.71 \pm 0.15 ^{cd}	6.34 \pm 0.16 ^{cd}
S8 control	2.98 \pm 0.16 ^{ab}	4.33 \pm 0.20 ^{ab}	6.57 \pm 0.17 ^{ab}	7.64 \pm 0.23 ^a
Animal fat content (% total matter)				
Experiments	Day 1	Day 7	Day 21	Day 29
S1	14.3 \pm 0.2 ^c	17.7 \pm 1.3 ^b	22.8 \pm 1.0 ^c	25.6 \pm 0.4 ^d
S2	18.9 \pm 0.2 ^{ab}	23.3 \pm 0.6 ^a	31.1 \pm 1.6 ^a	34.0 \pm 1.4 ^{ab}
S3	17.1 \pm 0.4 ^b	19.8 \pm 1.0 ^b	25.7 \pm 1.6 ^b	29.5 \pm 1.6 ^c
S4	8.0 \pm 0.3 ^e	10.8 \pm 1.3 ^d	14.7 \pm 0.2 ^e	16.5 \pm 0.4 ^f
S5	11.2 \pm 0.2 ^d	14.2 \pm 1.1 ^c	19.7 \pm 0.2 ^d	20.8 \pm 0.4 ^e
S6	18.1 \pm 0.4 ^b	22.7 \pm 0.8 ^a	27.8 \pm 1.6 ^b	31.0 \pm 1.8 ^{bc}
S7	12.0 \pm 0.2 ^d	14.5 \pm 1.4 ^c	19.3 \pm 1.4 ^d	21.0 \pm 1.4 ^e
S8 control	20.6 \pm 0.5 ^a	25.2 \pm 1.1 ^a	31.9 \pm 1.3 ^a	35.0 \pm 1.3 ^a

Total fat content

Analysis of Table 3.2 confirms that animal fat concentrates with drying. Like for salt content, discrepancies emerged between measured in-product total lipid content and the intended fat content fixed by the Doehlert design, but the order is respected, meaning that the formulations with the highest intended fat contents have the highest measured total lipid contents, and vice-versa (Table 3.2). For example, formulations corresponding to S2 and S8 for which intended fat content was 21% really contained 18.9% and 20.6% total lipids, respectively, at day 1. For the 17.9%-fat formulations (S3 and S6), the discrepancy in total lipid content was -0.8% and +0.2%, respectively. Moreover, 8.0%-total lipid content was measured in the specific case of formulation S4 where 8.4% fat content was planned. Finally, discrepancy in total lipid content ranged from -1.1% to +0.2% depending on experiment investigated, again underlining the real difficulty in perfectly adjusting the amount of added fat during meat batter preparation. The formulations can be sorted as a function of their real total lipid content in the same order, from the beginning (day 1) until the end (day 29) of the drying process. However fortunately, the formulations with the higher intended fat content values really contained more fat than the others, once the meat batters were prepared, thus a priori lowering the impact of this observed discrepancy on the results subsequently obtained.

Effect on physicochemical parameters in dry-fermented sausages

Time-course of weight loss

Figure 3.1 charts weight loss kinetics during the ripening process. First of all, from day 1, all the dry-fermented sausages lose weight corresponding to the water lost through evaporation during steaming and ripening. HCA applied to all weight loss values led to the formation of three classes of formulations, as shown in Figure 3.1. The first class, corresponding to the lowest weight loss (about 43% at day 29), is composed of experiments S1, S2, S3, S6 and S8 (control). The two other classes strongly diverge from the first class from day 5, and they pool the three lowest-fat formulations that generate higher water losses from the sausages. These two classes stay very close up to day 14 and thus separate the three lowest-fat formulations as a function of their relative NaCl content; the highest-salt formulation (S7) led to lower weight loss (45.4% at day 29) than the two other formulations (S4 and S5) which are less salty (2.4% and 2.0%, respectively) for which water loss reached 49% at the end of drying. Thus, Figure 3.1 shows that lean dry-fermented sausages globally lose more water than the fattiest products.

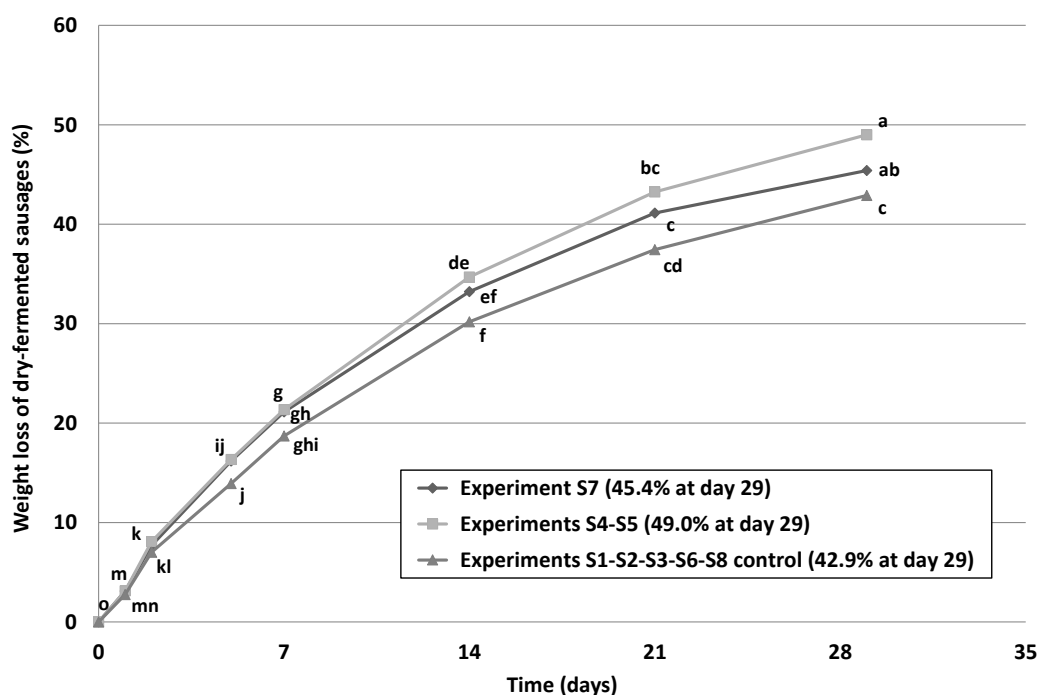


Figure 3.1 Time-course of weight losses investigated for the eight formulations of dry-fermented sausages given in Table 3.1. Hierarchical cluster analysis was performed on raw values in order to pool dry-fermented sausage formulations presenting similar patterns. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$).

Furthermore, these results were confirmed by the ANOVA and Tukey tests (Table 3.3) that highlighted very highly significant effects of time, backfat and salt content ($p < 0.001$) but no significant effect of the interaction between salt and fat content ($p > 0.05$). These results are in line with several studies designed to assess the impact of reducing salt or fat content on the sensory qualities of these kinds of meat products (Corral et al. 2014; Liaros et al. 2009), but disagree with Corral et al. (2013) who did not find any differences in weight losses for slow-fermented dried sausages prepared with different levels of salt (2.7% and 2.26%). However, the salt effect observed here was for a higher level of salt reduction (-30%) combined with high fat reduction. Regarding the effect of fat content on product water loss, Olivares et al. (2010) failed to find differences in water loss between high and low-fat sausages, but they studied dried slow-fermented sausages slow-ripened for 63 days, whereas here where we applied high fermentation and faster drying.

Table 3.3 Details of statistical analyses: (a) – Analysis of variance and (b) - post-hoc Tukey procedure, performed on the values of physicochemical (weight loss, a_w , pH) and biochemical (proteolysis, lipolysis, lipid and protein oxidations) parameters measured in the dry-fermented sausages for all the formulations of Table 3.1. ANOVA was run to test the effects of time, salt content, fat content and the interaction salt content \times fat content on all the parameters studied. Significance is noted as: ns ($p > 0.05$), * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$), and (-) corresponds to a factor not studied. A Tukey test was applied on the means \pm standard deviation calculated from all independent determinations and for all timepoints. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$).

(a) - Analysis of variance (ANOVA)							
	Weight losses	a_w	pH	Proteolysis (Proteolysis index)	Lipolysis (Acidity value)	Lipid oxidation (HSB)	Protein oxidation (Thiol group)
Time	***	***	***	***	(-)	***	***
Salt	***	***	ns	***	**	ns	ns
Fat	***	***	***	***	***	***	***
Salt x Fat	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns
(b) - Post-hoc procedure (Tukey test)							
S1	19.0 ^a	0.940 ^{de}	5.45 \pm 0.34 ^a	4.80 \pm 1.25 ^b	8.1 \pm 0.33 ^{ab}	3.70 \pm 1.07 ^b	26.64 \pm 1.19 ^b
S2	18.9 ^a	0.939 ^{cd}	5.43 \pm 0.35 ^a	4.75 \pm 1.22 ^b	10.4 \pm 0.26 ^{cd}	3.87 \pm 1.11 ^{cd}	21.80 \pm 1.21 ^a
S3	18.7 ^a	0.935 ^{bc}	5.41 \pm 0.34 ^a	4.39 \pm 0.92 ^a	9.0 \pm 0.13 ^b	3.82 \pm 1.10 ^{bc}	26.67 \pm 0.83 ^b
S4	22.3 ^b	0.943 ^{de}	5.41 \pm 0.31 ^a	4.89 \pm 1.28 ^b	7.4 \pm 0.30 ^a	3.51 \pm 0.86 ^a	30.16 \pm 0.53 ^d
S5	21.6 ^b	0.944 ^c	5.33 \pm 0.37 ^b	5.45 \pm 1.51 ^d	7.9 \pm 0.25 ^{ab}	3.52 \pm 0.89 ^a	28.60 \pm 0.62 ^c
S6	20.5 ^{ab}	0.944 ^c	5.31 \pm 0.36 ^b	5.17 \pm 1.38 ^c	9.7 \pm 0.35 ^c	3.83 \pm 1.08 ^{bc}	26.32 \pm 0.6 ^b
S7	21.0 ^b	0.935 ^{bc}	5.41 \pm 0.33 ^a	4.34 \pm 0.96 ^a	7.5 \pm 0.45 ^a	3.50 \pm 0.94 ^a	28.72 \pm 1.46 ^c
S8 control	18.6 ^a	0.933 ^a	5.40 \pm 0.34 ^a	4.25 \pm 0.81 ^a	10.0 \pm 0.38 ^c	3.96 \pm 1.26 ^d	21.81 \pm 0.64 ^a

Time-course of mean water activity values

Figure 3.2 charts the kinetics of mean in-product a_w values measured for the eight formulations of Table 3.1. Generally speaking, the drying process led to a reduction in water content and to a concentration of salt into the matrix, and thus to a decrease in mean a_w value.

HCA applied to a_w values led to the formation of three classes of formulations (Figure 3.2). The class corresponding to the lowest mean values of a_w , with variations from 0.958 at day 1 to 0.886 at day 29, is formed by batches S3, S7 and S8, i.e. the three highest-salt formulations containing at least 11.6% animal fat. The class corresponding to the highest in-product mean a_w values, with variations from 0.963 at day 1 to 0.901 at day 29, is formed by batches S4, S5

and S6, i.e. the two lowest-NaCl formulations (S5 and S6) and the lowest-fat formulation (containing just 8.4% animal fat) (S4). The third class is formed by experiments S1 and S2 which contain a moderate NaCl content (2.4%) and a fairly high (>14.7%) animal fat content. This class presented an intermediate pattern in terms of time-course of mean in-product a_w , with values ranging from 0.960 at day 1 to 0.897 at day 29. Note that all the final mean in-product a_w values are below 0.92 and that a_w values below 0.92 are considered safe in terms of *Listeria monocytogenes* growth capacity (Ingham et al. 2004).

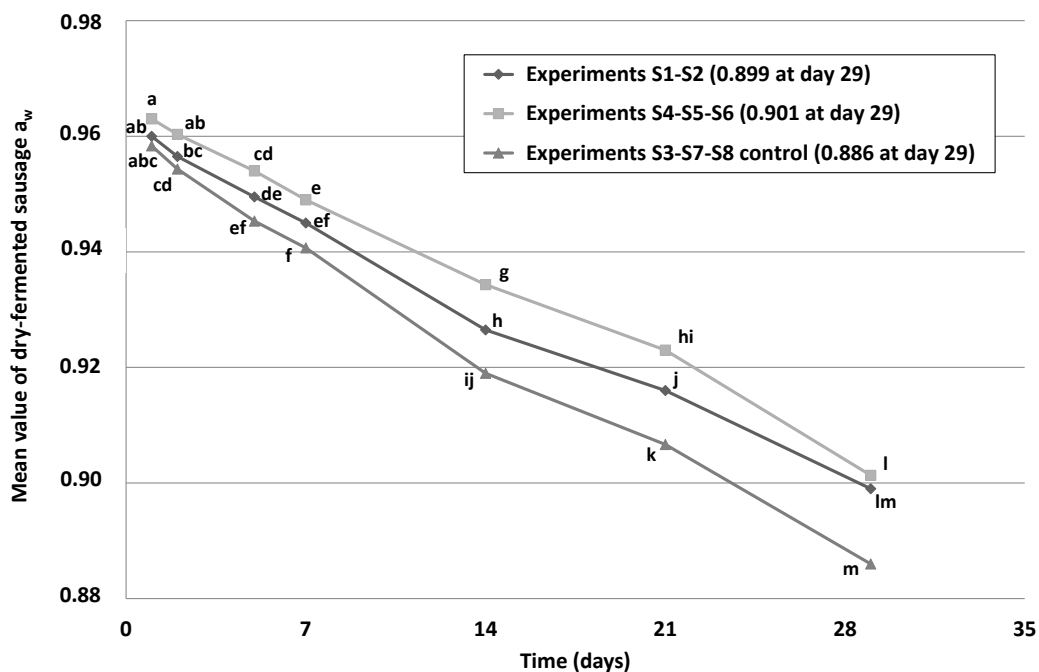


Figure 3.2 Time-course of mean water activity (a_w) values investigated for the eight formulations of dry-fermented sausages given in Table 3.1. Hierarchical cluster analysis was performed on raw values in order to pool dry-fermented sausage formulations presenting similar patterns. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$).

In a similar way to the time-course of weight loss, the statistical analyses performed on the mean a_w values, i.e. ANOVA and Tukey tests, showed very highly significant effects of time, salt content and fat content ($p < 0.001$) but no significant effect of the interaction between salt and fat content ($p > 0.05$) (Table 3.3). Literature data on the effect of fat content on a_w values is inconsistent. Some authors have reported that reducing fat content during dried sausage manufacture led to higher final a_w values (Corral et al. 2014; Gómez and Lorenzo 2013) or higher a_w values at the fermentation stage (Olivares et al. 2010) whereas others did not find any significant difference in a_w values between low and high-fat dried sausages manufactured with

cereal and fruit fibres (Garcia et al. 2002). Concerning salt content, several studies have mentioned that reducing salt logically led to higher a_w values (Olesen et al. 2004; Roseiro et al. 2008). By contrast, other authors did not find any difference in final a_w values of dried sausages made with different levels of salt. For example, Corral et al. (2013) found significant differences in a_w values after 9 days but, surprisingly, not at the end of processing. However, Corral et al. (2014) reported that a combined reduction of salt and fat contents affected sausage quality by producing an increase in final a_w values.

Concerning the time-course of mean a_w values, the HCA analysis-based results presented here logically showed a strong impact of salt content and also an effect of fat content. Indeed, modifying the fat content of the meat batter modifies the salt concentration in the lean part of the batter, and thus the water activity value. From a water activity perspective, reducing fat content in dry-fermented sausages provokes the same increase on a_w as reducing salt content. So, binary reductions in fat and salt contents may prove detrimental from a safety standpoint if the products are not sufficiently dried afterwards.

Time-course of pH values

Figure 3.3 charts the time-course of pH values. All formulations followed a normal time-course of pH values with a strong decrease in pH during the first week of process, from 5.91-5.93 at day 1 to a minimum of about 5.0 at day 7, corresponding to intense acidification due to the action of the lactic acid bacteria (LAB) added during sausage manufacture. This period is characterized by an exponential growth phase of LAB that fermented sugar substrate into lactic acid. Beyond day 7, pH values increased progressively until the end of the drying process as a result of an array of phenomena including a strong decrease in LAB acidifying action due to the depletion of sugar substrate, the transformation of lactic acid into other chemical substances, consumption of lactic acid by moulds (Flores et al. 2004) and/or the production of alkaline molecules due to proteolytic mechanisms (Ordóñez et al. 1999).

HCA applied to the pH values of all the formulations led to the formation of two distinct classes differentiated according to NaCl content of the formulations (Figure 3.3). Lower pH values were obtained for the two lowest-salt formulations, i.e. S5 and S6 that contain only 2.0% NaCl, probably due to more intense LAB activity. The second class pooled all the other formulations that contain at least 2.4% NaCl. The difference between the two classes resided in the fact that a more intense acidification was observed for the two lowest-salt formulations during the first week of process (with 0.10 pH unit less at day 7); this discrepancy persisted as pH values increased over the next two weeks of process, before growing slightly stronger during the last

week of process to peak at 0.15 pH units at day 29. However, all these pH values, especially the lowest and final values, are fully representative of what classically happens during French dry-fermented sausage manufacture (Rason et al. 2007). Note that drying process, low a_w values and the pH values at fermentation stage (day 7) and at the end of ripening (day 29) obtained in this study are considered enough to ensure the microbial safety of dry-fermented sausages (Papadima and Bloukas 1999).

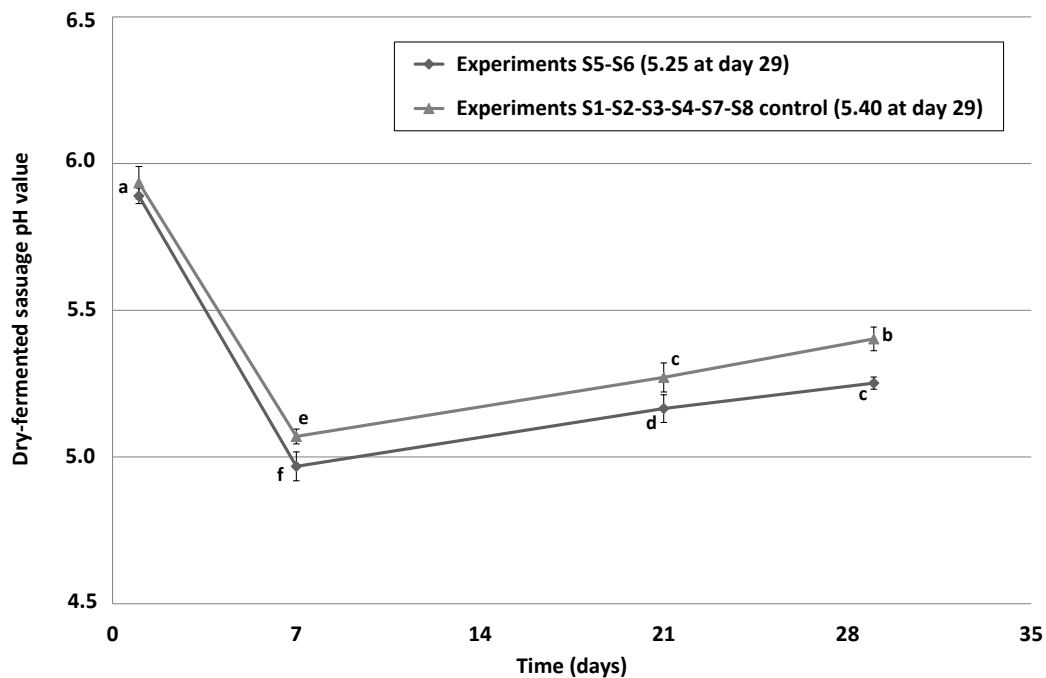


Figure 3.3 Time-course of mean pH values investigated for the eight formulations of dry-fermented sausages given in Table 3.1. Hierarchical cluster analysis was performed on raw values in order to pool dry-fermented sausage formulations presenting similar patterns. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$).

ANOVA and Tukey test (Table 3.3) showed very highly significant effects of time and fat content ($p < 0.001$). On the other hand, salt content and the interaction between salt and fat content appeared non-significant ($p > 0.05$). There is extensive research on the effect of reducing salt or fat content on pH values in dry-fermented sausages. For example, Olesen et al. (2004) and Stahnke (1995) reported lower pH values at fermentation stage in sausages made with lower amounts of NaCl. By contrast, Corral et al. (2013) did not find a significant effect on pH evolution nor on final pH value when NaCl was reduced by 16% or substituted by 16% KCl in slow-fermented sausages. The literature reports conflicting data on the effect of fat content on pH values. For instance, some studies did not find differences in pH values when

comparing high and low-fat dried sausages (Garcia et al. 2002; Liaros et al. 2009; Papadima and Bloukas 1999). By contrast, Olivares et al. (2010) highlighted a faster pH decline in the case of fat-reduced dried sausages. Finally, Corral et al. (2014) did not find any significant difference in pH values between control sausages and sausages made with combined reduced-fat and reduced-salt formulations.

Our results (Figure 3.3) show that combined salt and animal fat reductions during the manufacture of dry-fermented sausages led to a fully normal time-course of pH values, with strong acidification during the first week of process followed by a progressive increase in pH value.

Effect on biochemical parameters in dry-fermented sausages

During dry-fermented sausage manufacture, and especially during the fermentation and ripening stages, the meat protein and lipid components undergo enzymatic and chemical modifications. The enzymatic modifications involved are chiefly proteolysis and lipolysis. These biochemical reactions are of high interest because they shape the development of sensory attributes of dry-fermented sausages, such as texture, juiciness and aroma.

Time-course of proteolysis

Figure 3.4 charts the time-course of proteolysis index. All eight formulations produced the same pattern of behaviour in terms of PI time-course. On the first day of process, proteolytic enzyme activity is already visible, which is quite logical because proteolytic enzymes are highly active at a temperature of about 24°C (Harkouss et al. 2014). Proteolysis index (PI) ranged between 2.9%–3% at day 1 and reached 4.6–5.9% at day 7 depending on formulation. From day 7, rate of proteolysis decreased noticeably, probably due to a non-optimal pH value for proteolytic enzyme activity (Garcia-Garrido et al. 2000) due to the intense lactic acidification occurring at that point, as shown in Figure 3.3. Beyond day 21, very surprisingly, PI values decreased for all formulation classes (Figure 3.4).

To be sure this decrease was not due to a problem with the fluorescent technique used, we measured PI in some samples with the classic Kjeldhal method consisting in calculating the percentage ratio of non-protein nitrogen content to total nitrogen content. This classical PI measurement method confirmed the decrease in PI values over the last week of the drying process (data not shown). This ultimately tends to prove that some end-products of proteolysis had disappeared, likely consumed by microorganisms present in the dry-fermented sausages at that point in time, and so could not be detected by the measurement techniques used.

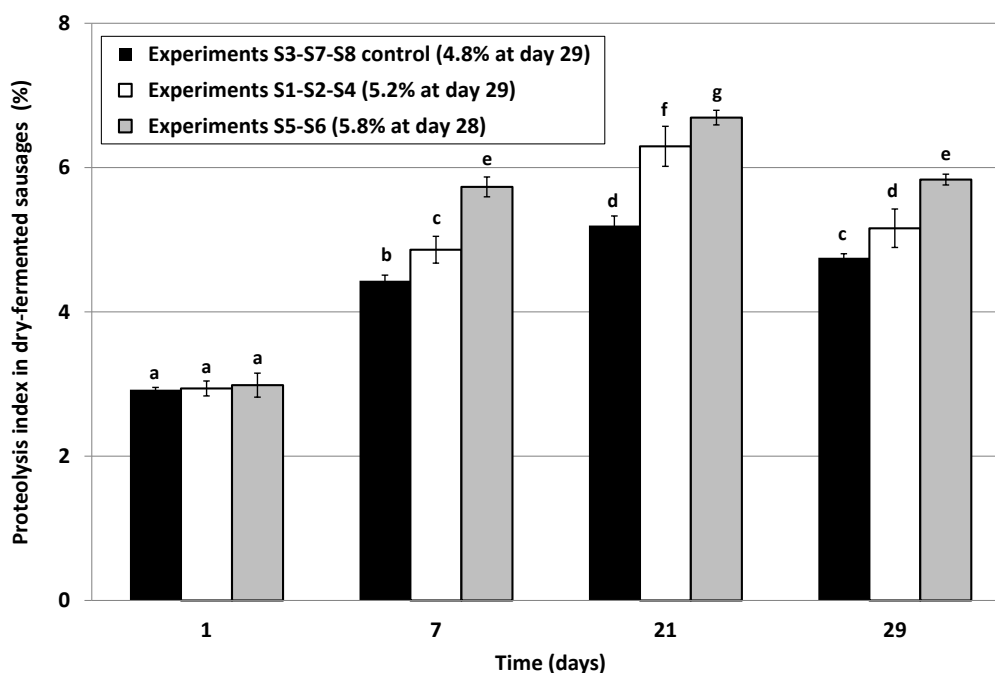


Figure 3.4 Time-course of proteolysis index investigated for the eight formulations of dry-fermented sausages given in Table 3.1. Hierarchical cluster analysis was performed on raw values in order to pool dry-fermented sausage formulations presenting similar patterns. For each class of dried sausages, values were means \pm standard deviation calculated from all the independent measurement values of each experiment constituting the class. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$).

Figure 3.4 shows that HCA formed three classes of formulations. In-depth analysis of results highlighted that the formulations are perfectly classified as a function of their respective NaCl content, thus further confirming the inhibitory effect of salt content on proteolytic enzyme activity. Indeed, the first class that led to the lowest PI values is formed by the three 2.8%-NaCl formulations (S3, S7 and control S8), the second class by the 2.4%-NaCl formulations (S1, S2 and S4), and the third class by the 2.0%-NaCl formulations (S5 and S6). At day 21, PI values were 5.2%, 6.3% and 6.7%, respectively, according to class/salt content considered.

Moreover, ANOVA and Tukey test (Table 3.3) highlighted, for the first time, very highly significant effects of all the factors tested, i.e. time, salt content, fat content, and also the interaction between salt and fat content ($p < 0.001$). However, no marked effect of fat content is visible in Figure 3.4. Nevertheless, when comparing Experiments S5 and S6 that belong to the same class, finer-grained analysis of the raw results revealed that proteolysis was slightly

more intense in S5 than S6, with day-21 PI values of 6.8% and 6.6%, respectively. This probably resulted from a lower fat content (11.6% vs. 17.9%) that provoked a more marked salt dilution and thus a lower salt concentration in the lean part of the meat batter that contained the greater quantity of lean pork meat (i.e. experiment S5). These results are in good agreement with Armenteros et al. (2009, 2012).

The present results (Figure 3.4) confirmed that proteolysis in dry-fermented sausages was mainly governed by salt content but also highlighted that combined salt and animal fat reductions could amplify proteolytic enzyme activity. So, reducing the salt and fat content increases proteolysis, this can prove detrimental to the final texture of the end-products.

Lipolysis of end-products

Applying HCA on the acidity values (lipolysis) determined at day 29 for all 8 formulations led to the formation of two distinct classes as a function of animal fat content regardless of NaCl content. One class pooled the four formulations for which fat content was at most equal to 14.7% and the other class pooled the 17.9%-animal fat and 21%-animal fat formulations. Mean acidity value was significantly higher for the formulations containing over 17% animal fat, at 9.8 vs. 7.6 mg KOH per g of product fat.

ANOVA showed that salt content significantly affected ($p < 0.01$) rate of lipolysis in dry-fermented sausages and that fat content was a highly significant factor strongly impacting rate of lipolysis ($p < 0.001$), unlike the interaction between salt and fat content ($p > 0.05$). Olivares et al. (2011) also cited a strong effect of fat content on lipolysis and on the generation of free fatty acids. These authors reported that slow-fermented sausages initially containing 30% pork backfat showed higher rates of lipolysis than dried products made with lower pork backfat content (10% and 20%). Furthermore, several authors have reported a more intense lipolysis in salt-reduced dried sausages (Stahnke 1995).

To conclude on lipolysis, our data suggests that the intensity of this biochemical phenomenon is strongly dependent on fat content and also influenced by salt content, but without significant interaction between these two factors, unlike for proteolysis.

Time-course of lipid and protein oxidations

Lipid and protein oxidations that occur throughout the manufacture of dry-fermented sausages are also involved in the elaboration of the taste, flavour and odour of these kinds of dried cured products (Corral et al. 2013).

Lipid oxidation

Figure 3.5 charts the time-course of lipid oxidation quantified by determining hydrosoluble Schiff base (HSB) values. However, lipid oxidation was first measured by the thiobarbituric acid reactive substances method (TBARS) (data not shown). A biphasic curve was obtained for all eight formulations, with TBARS value decreasing with time (mg MDA/kg of sample) beyond day 1, which is not a logical pattern and indicates that the TBARS quantification method was ill-suited to accurate assessment of lipid oxidation in the present study. This prompted us to assess lipid oxidation based on the fluorescence of HSB. Schiff bases are formed in meat during storage and cooking (Gatellier et al. 2009). They correspond to the binding of the aldehydic products of lipid peroxidation to free amino groups of proteins. The polarity of Schiff bases depends on their composition. It was observed in raw meat that the aqueous fluorophores were responsible for up to 72% of total fluorescence intensity, whereas cooking reversed the percentages to reach 36% in the polar phase and 64% in the apolar phase (Gatellier et al. 2009). Figure 3.5 shows the results of HCA applied to HSB values of all formulations. Contrary to the TBARS method (data not shown), HSB values increased observably as a function of time, meaning that lipid oxidation logically increased with time. Applying HCA led to classify the formulations into three distinct classes as a function of fat content; higher fat content means higher HSB values and thus higher lipid oxidation. The first class is formed of the three formulations containing at most 11.6% animal fat (experiments S4, S5 and S7), the second class is formed of the three formulations containing between 14.7% and 17.9% animal fat (experiments S1, S3 and S6), and the third class gathered the two 21%-animal fat formulations (experiments S2 and control S8). Figure 3.5 shows that these three classes differ in terms of lipid oxidation, especially at day 21 but less so at the end of product drying (day 29) and not really early on in the process (days 1 and 7).

ANOVA and Tukey tests (Table 3.3) indicated very highly significant effects of time and animal fat content ($p < 0.001$) on lipid oxidation but no significant effect of salt content, nor the interaction between salt and fat content ($p > 0.05$). These results are in line with Liaros et al. (2009) and Soyer et al. (2005) who reported that low-fat sausage presented lower lipid oxidation levels than control sausages. Olivares et al. (2011) also reported higher TBARS values in high-fat sausages compared to low-fat sausages. The literature is less clear on the effect of salt on lipid oxidation. For example, very recently, Corral et al. (2015) reported higher TBARS values and higher abundance of volatile compounds derived from lipid oxidation in salt-reduced dried sausages, thus confirming their previous results (Corral et al. 2013). However, Jin et al. (2013)

reported that high salt levels led to higher oxidation by decreasing antioxidant enzyme activity and releasing iron from heme-binding protein. Furthermore, Corral et al. (2015) recently reported higher lipid oxidation levels in salt-and-fat-reduced sausages.

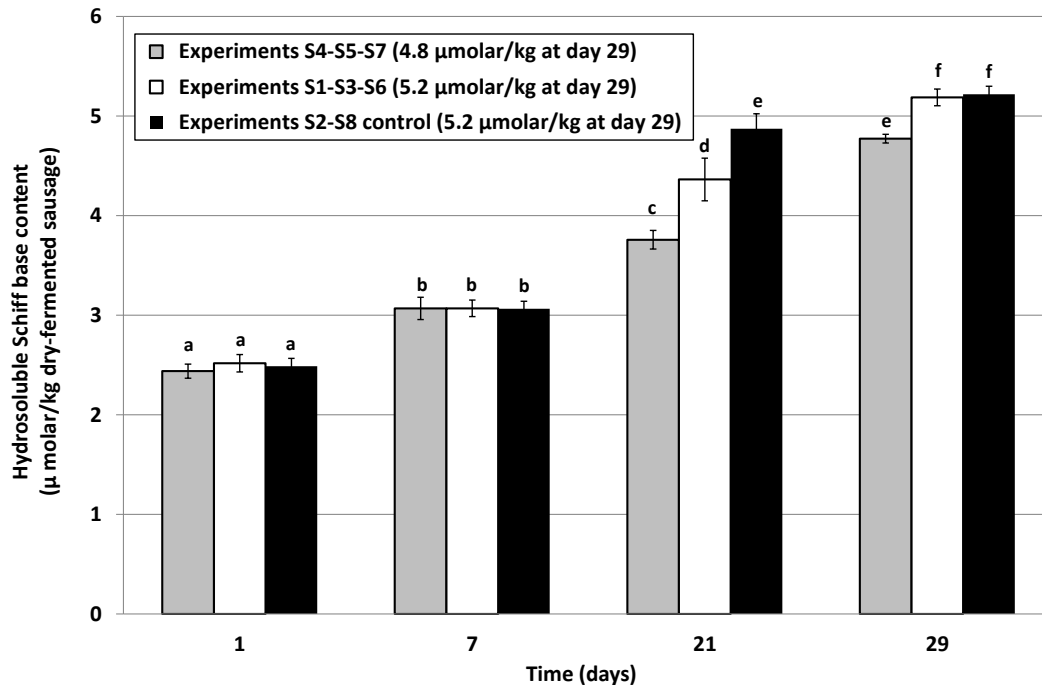


Figure 3.5 Time-course of lipid oxidation reaction investigated for the eight formulations of dry-fermented sausages of Table 3.1. Lipid oxidation was quantified by determining hydrosoluble Schiff bases (HSB) content. Hierarchical cluster analysis was performed on raw values in order to pool dry-fermented sausages formulations presenting similar patterns. For each class of dried sausages, values were means \pm standard deviation calculated from all the independent measurement values of each experiment constituting the class. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$).

Protein oxidation

Protein oxidation was assessed by quantifying free-thiol-group content. Indeed, thiol groups of cysteine are very sensitive to the oxidative process and their oxidation leads to the formation of disulfide bridges. Note that protein oxidation is maximal when free-thiol-group content is minimal.

HCA-based results, shown in Figure 3.6, led to the formation of three classes of formulations, once again classified as a function of their respective fat content. Maximal protein oxidation was observed for the two 21%-animal fat formulations (experiments S2 and S8). Minimal

protein oxidation was found for the three formulations containing at most 11.6% animal fat (experiments S4, S5 and S7). An intermediate class of experiments S1, S3 and S6 was formed from the formulations containing either 14.7% animal fat or 17.9% animal fat. However, since no clear change in protein oxidation appears with time, beyond day 1 (Figure 3.6), protein oxidation seems to occur rapidly, maybe directly during the meat batter preparation, without subsequent intensification.

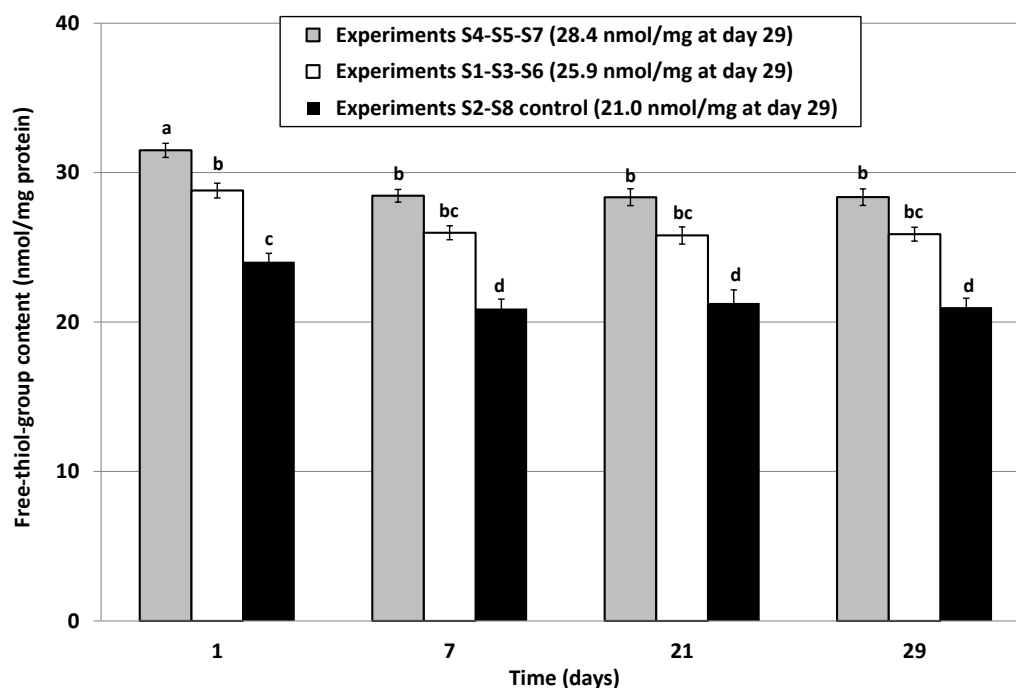


Figure 3.6 Time-course of protein oxidation reaction investigated for the eight formulations of dry-fermented sausages of Table 3.1. Protein oxidation was quantified by determining free-thiol-group content. Hierarchical cluster analysis was performed on raw values in order to pool dry-fermented sausages formulations presenting similar patterns. For each class of dried sausages, values were means \pm standard deviation calculated from all the independent measurement values of each experiment constituting the class. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$).

Like for lipid oxidation, ANOVA and Tukey test (Table 3.3) showed very highly significant effects of time and fat content ($p < 0.001$) on protein oxidation, but without any significant effect of salt content, nor the interaction between salt and fat content ($p > 0.05$). Protein and lipid oxidations are linked by the fact that lipid oxidation produces free radicals that, in turn, drive protein oxidation. Therefore, maximal protein oxidation occurred in high-fat formulations. The present results are in good agreement with Fuentes et al. (2014) who recently reported a strong impact of fat level on protein oxidation. Regarding the effect of salt content

on protein oxidation, Kanner (1991) concluded that salt level increased the susceptibility of myofibril to carbonylation and the pro-oxidant activity of iron.

The present results indicate that lipid and protein oxidations in dry-fermented sausages are mainly affected by fat level but not by salt level in the range studied here (2.0%-2.8% NaCl) nor by the combined salt and animal fat reductions. The fact that reducing fat level decreases both these oxidative phenomena can potentially affect the final aroma of these products.

Conclusions

A series of eight fabrications of dry-fermented sausages was designed to investigate the effect of reducing salt and animal fat contents on the time-course of physicochemical parameters such as pH, weight loss and a_w and biochemical parameters such as proteolysis, lipolysis, lipid oxidation and protein oxidation. Analysis of the time-course of chemical composition in dry-fermented sausages confirmed that product drying globally leads to a reduction in in-product water content due to water evaporation from the product surface and, in turn, to a fat and salt concentration that increases fat and salt contents, respectively. Statistical analyses of the physicochemical parameters measured for dry-fermented sausages showed very highly significant impacts of time, salt and animal fat contents on weight loss and a_w values but only of time and salt content on pH values. Indeed, modifying the fat content of the meat batter modifies the salt concentration in the lean part of the batter, and thus the water activity value. Regarding a_w , reducing fat content in the products provokes the same increase in water activity as reducing salt content. So, binary reductions in fat and salt content may prove detrimental from a safety standpoint if the products are not sufficiently dried. The results on proteolysis confirmed that this biochemical phenomenon in dry-fermented sausages was mainly governed by salt content and highlighted that it can be amplified by a combined reduction in fat and salt contents. Our experimental data also indicated that intensity of lipolysis was mainly dependent on fat content and that lipid and protein oxidations were more intense in high-fat formulations. Combined salt and fat reductions during the manufacture of dry-fermented sausages globally affect end-product quality by increasing acidification, weight losses and a_w values. These combined reductions also accelerate proteolysis and decelerate lipolysis and oxidative mechanisms, which can negatively affect the final sensory attributes of dry-fermented sausages. Additional sensory studies are thus necessary to investigate the final product quality and consumer acceptability of low-salt and low-fat dry-fermented sausages. Furthermore, it will also be important from an industrial point of view to obtain accurate data on the potential

application of new technologies in dried sausage production, such as partial substitution of NaCl by potassium chloride and adding vegetable oil rich in mono-unsaturated fatty acids, in an effort to reduce end-product content of SFA by 60% and salt content by 30% in line with nutritional health recommendations.

Acknowledgements

The research leading to these results received funding from the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement No. 289397 (TeRiFiQ project). This paper is part of the thesis of Hassan Safa, who works for this research program. The authors thank R. Favier, R. Agouninessouk, S. Portanguen and the ADIV staff for their technical assistance, and ATT for proofreading the manuscript.

3.3. Article n°3 (soumis à Meat Science en Août 2015)

The contribution of flavouring to key aroma compounds in dry-fermented sausage

Hassan Safa^a, Frédéric Mercier^a, Nathalie Kondjoyan^a, Pierre-Sylvain Mirade^a, Jean-Louis Berdagué^a

^aInstitut National de la Recherche Agronomique (INRA), UR 370 QuaPA, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France.

Abstract

The aim of this study was to identify the odour-active compounds in high-quality dry sausages and to determine the contribution of flavouring—particularly added garlic—to final aroma. For this purpose, the volatile fraction of an equally-weighted mixture of 5 artisanal dry-fermented sausages was analysed by gas chromatography–mass spectrometry coupled with olfactometry. The aromagram obtained highlighted 34 different odour-active areas, with strong variations in olfactory characteristics from one area to another. Moreover, 26 odour-active compounds were identified by coupling the aromagram to mass spectrometry and using standard references. The structural identification and odour characteristics of these key aroma compounds made it possible to trace their most likely origins, demonstrating that flavouring (mainly garlic) contributed to about 1/3 of overall aromatic intensity. Incorporating garlic could therefore prove hugely valuable as a way to counterbalance the loss of aroma that occurs when manufacturing low-salt and low-fat dry-fermented sausages.

Keywords: aroma compounds; dry-fermented sausage; flavouring; garlic; chromatography-mass-spectrometry; olfactometry.

Introduction

Dry-fermented sausages are traditional meat products produced in several countries worldwide, mainly in Europe. These products are manufactured from a mixture of minced meat (60–70% lean content), pork backfat (35–25%), curing agents and additives (nitrited salt, sugar), starter cultures and spices (chiefly black pepper and garlic). This mixture is stuffed into artificial or natural casings, submitted to fermentation and then ripened for a number of days under natural or controlled ripening conditions to develop typical sensory characteristics. In meat products such as dry-fermented sausages, flavour plays a key role in overall consumer acceptance. The flavour of dry-fermented sausages is determined by several volatile compounds with low odour threshold value (Corral, Salvador, & Flores, 2013; Olivares, Navarro, & Flores, 2011) that

originate from numerous biochemical reactions, such as carbohydrate fermentation (Buscailhon et al., 1994), proteolysis or lipolysis. The free amino acids and free fatty acids are then oxidized (Sabio, Vidal-Aragón, Bernalte, & Gata, 1998) and the acids and alcohols thus produced may become esterified (Berdagué, Monteil, Montel, & Talon, 1993). The generation of volatile compounds is further influenced by several factors such as minced ingredients (lean and fat proportions, sugar and salt types and contents, nitrite and nitrate, additives and spices) as well as extrinsic factors such as fermentation (starter culture choice) and ripening conditions (temperature, relative humidity and ripening time) (Bolumar et al., 2006). Furthermore, a number of vegetal additives also contribute to flavour development in dry-fermented sausage (Bolumar et al., 2006). In Mediterranean countries such as Spain, Italy, France and Portugal, garlic is typically used to aromatize dry-cured meat products. However, the precise contribution of garlic to the flavour of these products is still unclear.

The study reported here was conducted within the framework of the European TeRiFiQ project that aims to develop procedures that, further to binary reductions ('fat/sugar' or 'fat/salt'), enable the production of safe, nutritionally improved food products that are acceptable to consumers. For dry sausage, the binary reduction goal targeted is a 30% reduction in sodium and a 60% reduction in saturated fatty acids (SFA). We ran a comprehensive analysis of the odour-active compounds responsible for the characteristic intense aroma of high-quality dry-fermented sausages and the contribution of the flavouring (especially garlic) to this aroma in order to identify simple technological levers to enhance the aroma of new low-fat low-salt dry products. For this purpose, we used high-resolution gas-chromatography coupled with mass spectrometry and olfactometry to identify the key aromatic compounds of French traditional dry-fermented sausages.

Materials and Methods

Sample origins

The odour-active compounds were identified in commercially-available artisanal dry-fermented sausages selected for their intense aroma in previous studies. These products were sourced from: (1) "Salaisons de Fix", 43320 Fix-Saint-Geney, France, (2) "Salaisons du Lignon", 43200 Saint-Maurice-de-Lignon, France, (3) "Salaisons Debros", 07110 Largentière, France, (4) "Salaisons Pyrénéennes", 65320 Bordères-sur-L'Échez, France, and (5) "SARL Bornes", 15400 Trizac, France. All these products contained fresh garlic (no powdered-down dehydrated garlic) in their formulations. Note that the amount of fresh garlic flavouring in the

dry-fermented sausages ranged between 4 and 10 g per kg of meat batter, while black pepper content ranged between 0.4 and 1.2 g per kg meat batter.

Solid-phase micro-extraction–comprehensive gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry (SPME–GC×GC–tofMS)

First, a preliminary 10-minute incubation of 5 g of minced dry-fermented sausages (i.e. a mix of 1 g of each artisanal product purchased) was carried out in a sealed 20 mL vial at ambient temperature. The volatiles were then collected for 1 h at ambient temperature onto a 75 mm solid-phase micro-extraction (SPME) Carboxen/PDMS fibre (Supelco Bellefonte, PA, USA) followed by splitless injection (at 220°C during 2 min) using a SPME Combipal autosampler (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland). After injection, separation and identification were performed using a LECO Pegasus IV GC×GC–tofMS system (LECO Corporation, St. Joseph, MI). Volatiles were separated first on a Rtx®-5 capillary column (length 30 m, internal diameter 0.32 mm, film thickness 1 µm; Supelco, Saint-Germain-en-Laye, France) and second 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 then detected by electron ionization at 70 eV, and ions were acquired over the range $33 < m/z < 220$ a.m.u. at 200 scan.s⁻¹. More details on the analytical settings are given in Théron et al. (2010).

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

The volatiles in 10 g of minced dry-fermented sausages (i.e. a mix of 2 g of each artisanal product purchased) were extracted using a DHS (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. In parallel, the trap (Tenax® TA 60/80 mesh adsorbent, Supelco Bellefonte, PA; working length 180 mm and inside diameter 1/8") was operated at 30°C and the dry purge step was set at 30 min. After extraction, 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 cryofocalisation area (cooled at -150°C with liquid nitrogen). After injection, the trap was heated at 180°C for 2 min to separate and detect the volatiles using a GC–MS set-up composed of a chromatograph (GC 6890, Agilent Technologies; apolar capillary column Rtx®5-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 under electron ionization at 70 eV, and ions were scanned over the range $33 < m/z < 220$ a.m.u. For the trials with precursors, the sulphur odour-

active compounds of interest were semi-quantified by measuring their peak areas from specific ions acquired in single-ion monitoring mode.

Gas chromatography–mass spectrometry/olfactometry

Odour-active compounds were detected and identified using two complementary olfactometry instruments coupled to identical dynamic headspace devices (Tekmar, Cincinnati, OH). The volatile compound extraction conditions were similar to the conditions described in the previous section on DHS–GC–MS.

The first instrument gave an exhaustive inventory of odour-active compounds by 8-way olfactometry coupled to mass spectrometry (DHS–GC–MS/8O) (Berdagué, Tournayre, & Cambou, 2007). This system was able to detect a very large number of olfactory zones by accumulating the performances of 8 sniffers. The selected sniffers were non-smokers with no known health disorders, aged under 40, and with attested sensitivity and ability to detect and consistently describe a wide range of odours. 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. One sniffing session with 8 sniffers per session was run on the dry-fermented sausage samples with this first device. The final aromagram was obtained from the mean intensities of the individual aromagrams (Berdagué & Tournayre, 2002).

The second instrument was a DHS–GC–MS-olfactometry system working in one-dimensional chromatography mode (DHS–GC–MS/O) to fit DHS–GC–MS/8O analysis or in a two-dimensional chromatography mode (DHS–GC×GC–MS/O, also termed “heartcut mode”) to give a detailed olfactory exploration of all the odorous zones observed by DHS–GC–MS/8O, which is essential for reliable identification. The DHS-GC-MS/O or DHS-GC-GC-MS/O instrument was composed of a chromatograph (GC 6890, Agilent Technologies; capillary column RTX[®]5-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 (SGE, length 0.5 m, internal diameter 0.10 mm) 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, 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 apolar column (RTX[®]5-MS) were cryofocussed 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. Olfactometry data obtained by DHS–GC–MS/O or by DHS–GC×GC–MS/O were both acquired by AcquiSniff® software in similar conditions (vocabulary, odour intensity (scaled 1–5) and odour duration) as in Berdagué & Tournayre (2002). The odour of the candidate structures identified by MS was compared to their odour as described in several databases (<http://www.thegoodscentcompany.com>, <http://www.flavornet.org>) and with the odour perceived by the sniffers after co-injection of pure reference compounds on the apolar column Rtx®5 and the polar column DB-WAXETR.

Results and Discussion

Identification of the main odour-active compounds

A total of 34 odour-active compounds were detected, mainly aldehydes, esters, alcohols, ketones, and sulphur compounds. Their odour intensities ranged from 1/5 to 5/5 (Figure 3.7 and Table 3.4). Of these 34 odour-active compounds, 26 were formally identified. To synthesize the description of the odours described by sniffers, they were grouped into olfactory poles (Berdagué et al., 2007). The 9 olfactory poles selected were: “animal–dry sausage”, “sulphured–garlic”, “fruity–floral”, “lactic–fermented”, “mouldy–mushroom”, “vegetal”, “empyreumatic”, “plastic–chemical” and “not described”.

Figure 3.7 gives the mean aromagram of dry-fermented sausages, showing a clear predominance of the “animal–dry sausage” and “sulphur–garlic” smells, consistent with the overall odour of dry-fermented sausages. Carbohydrate catabolism during the sugars fermentation step was the origin of the formation of 2,3-butanedione (butter odour) as well as ethanol (not detected by olfactometry) but also responsible for secondary esterification reactions involved in the formation of esters with intense fruity odours. Lipid metabolism such as lipolysis of glycerides led to the formation of short-chain aliphatic fatty acids like octanoic acid (rancid or cooked fat odours). In addition, the oxidative degradation of fatty acids was at the origin of the formation of carbonyl compounds such as hexanal, octanal, 1-octen-3 ol or 3-octanone (Corral et al., 2013; Olivares et al., 2011). These odour-active compounds were also perceived quite intensely by olfactometry analysis. On the other hand, during the maturation of dry-fermented sausages, microbial degradation of sulphur amino acids induced the formation of sulfhydryl groups such as dimethyl trisulphide with sulphured, cabbage-like odours (Théron et al., 2010). In addition, methional (potato like odour) is a specific product of the microbial catabolism of methionine. Its formation occurs primarily at the surface of cured meats and depends on the fungal flora of products (Gros et al., 2003).

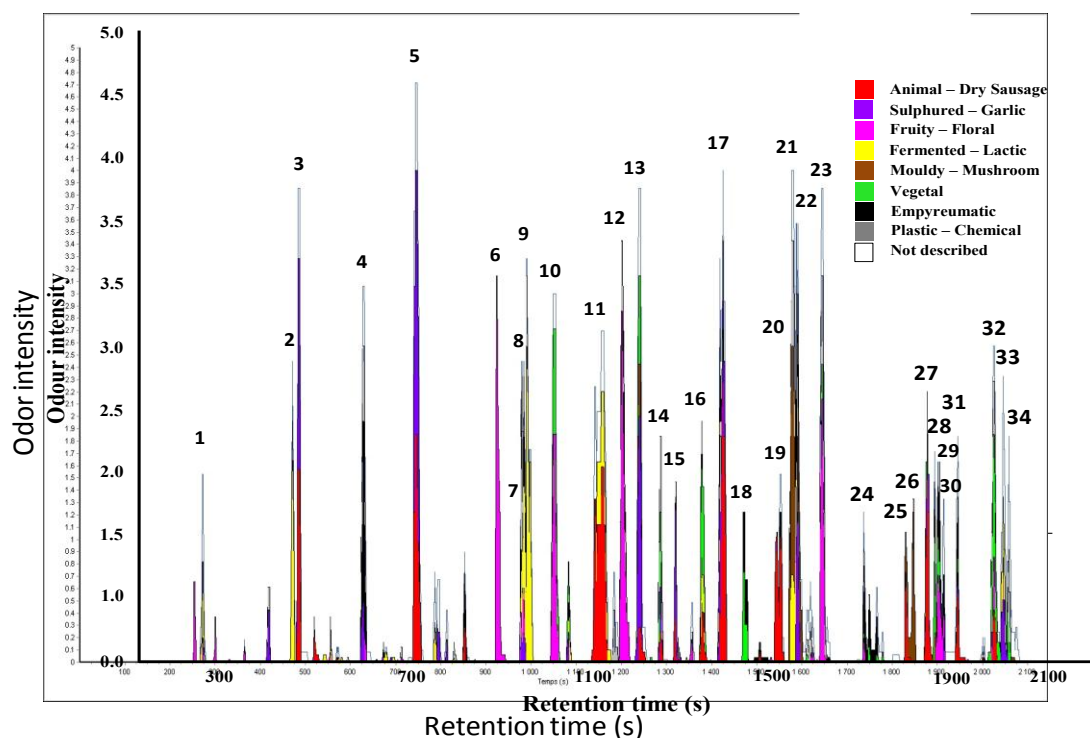


Figure 3.7 Mean aromagram of dry-fermented sausages calculated from each individual sniffing session. The signal is broken down into 9 odour classes to show how the odour-active zones align to a given olfactory class. The legend to the peak numbers is given in Table 3.4.

The degradation of phenylalanine probably explained the presence of phenylethanol (floral odour), while the oxidative degradation of branched-chain amino acids such as leucine or isoleucine allowed the formation of branched carboxylic acids such as propanoic acid, 2 methyl-, butanoic acid, 2-methyl (only detected by MS) and butanoic acid, 3-methyl (animal, feet odours) (Corral et al., 2013). These acids were at the origin of the three following esters: propanoic acid, 2 methyl-, ethyl ester; butanoic acid, 2-methyl, ethyl ester and butanoic acid, 3-methyl, ethyl ester, all of which were detected by olfactometry with strong fruity odours. Furthermore, flavouring by garlic was responsible for the presence of 2-propene-1-thiol, allyl methyl sulphide, allyl sulphide, allyl methyl disulphide, diallyl disulphide and of all the sulphur compounds and structures having a garlic odour detected by olfactometry. Flavouring with pepper had less substantial effects in terms of products identified here, but typically led to the presence of some terpenes and sesquiterpenes found at trace levels. Only one was representative (pinene) and was detected by olfactometry. Most of these compounds have already been

identified in different flavoured dry-fermented sausages (Schmidt & Berger, 1998; Sunesen, Dorigoni, Zanardi, & Stahnke, 2001; Viallon et al., 1996).

Table 3.4 Odour-active volatile compounds identified in the mix of 5 traditional dry-fermented sausages.

N°	Compound	RRI ^A	Main odours	Main origin ^B	Previously reported by ^C
1	Unknown 1	<500	Cheesy	O	-
2	2,3-butanedione	568	Butter	M	1, 4-9
3	2-propene-1-thiol	601	Meaty, Garlic	G	-
4	Butanal, 3-methyl-	660	Chocolate	M	1, 3, 6-9
5	Allyl methyl sulfide	702	Garlic, Dry sausage	G	2
6	Propanoic acid, 2 methyl-, ethyl ester	758	Fruity	M	4
7	Toluene	772	Plastic	O	4
8	Thiophene, 3-methyl-	777	Chemical	O	6-8
9	Butanoic acid	783	Cheesy, Vomit	M	1, 2, 6
10	Hexanal	801	Fruity, Green	M	1-4, 6-7
11	Butanoic acid, 3-methyl-	833	Animal	M	2, 4
12	Butanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester	849	Fruity	M	1-2, 4, 6, 9
12	Butanoic acid, 3-methyl-, ethyl ester	849	Fruity	M	1-2, 4, 6, 9
13	Allyl sulfide	865	Garlic, Onion, Sausage-like	G	2
14	Propyl allyl sulfide	878	Sulphured, Gas, Dry sausage	G	2
15	Unidentified alkyl-thiol	892	Garlic, Gas, Sausage	G	-
16	Methional	913	Potatoes	M	4, 6-7
17	Allyl methyl disulfide	926	Peel of dry-cured sausage	G	2
18	Pinene	945	Pepper, Vegetal	P	2
19	Unknown 2	972	Animal, Peel of sausage	O	-
20	1-octen-3-ol	980	Mushroom	M	3-4, 6-7, 9
21	Dimethyl trisulfide	986	Cabbage, Gas	M	4-5, 7
22	3-octanone	986	Mushroom, Woody	M	6-7
23	Octanal	1010	Citrus, Fruity	M	1, 4, 6, 8-9
24	Unknown 3	1039	Brunt caramel	G	-
25	Unknown 4	1061	Foot, Faecal	O	-
26	Unknown 5	1077	Mushroom	G	-
27	Diallyl disulfide	1084	Garlic, Sausage	G	2
28	Unidentified terpenoid	1095	Vegetal, Woody	O	-
29	Phenylethanol	1099	Floral	M	2
30	Unknown 6	1100	Floral, Roasted	O	-
31	Unknown 7	1119	Sulphured, Meaty, Sausage	O	-

32	Octanoic acid	1154	Rancid, Cooked fat	M	4, 6
33	Unknown 8	1166	Sulphured, Cheesy	O	-
34	Benzene, 1,4-dimethoxy-	1170	Vegetal, Floral, Chemical	G	-

^ARRI: Relative Retention Index measured on an Rtx[®]5 column; ^BMain origin, i.e. M: Meat tissue degradation, G: Garlic, P: Pepper and O: Other; ^CPreviously reported by: 1 (Stahnke, 1994), 2 (Schmidt & Berger, 1998), 3 (Meynier, Novelli, Chizzolini, Zanardi, & Gandemer, 1999), 4 (Théron et al., 2010), 5 (Gianelli, Olivares, & Flores, 2011), 6 (Olivares et al., 2011), 7 (S. Corral et al., 2013), 8 (Thomas, Mercier, Tournayre, Martin, & Berdagué, 2013) and 9 (Corral, Salvador, Belloch, & Flores, 2015).

The olfactometric analyses reported here clearly showed that using garlic as additive during dry-fermented sausage manufacture induced the appearance of many “allium” odours, some of which were even directly associated to salted dry sausage and salted meat products (Figure 3.7 and Table 3.4). The association between “allium” odours and “salted meats–dry sausage” odours was probably attributable to the eating habits of French sniffers who regularly consume garlic-flavoured dry sausage.

Identification of the main origins of these odour-active compounds

To estimate the contribution of the main origins of aromatic compounds in the dry-fermented sausage aromagram, we calculated the total areas of the odour peaks (i) derived from the biochemical processes of meat maturation during drying, (ii) due to flavouring, and (iii) that were of multiple or indeterminate origins (Figure 3.8).

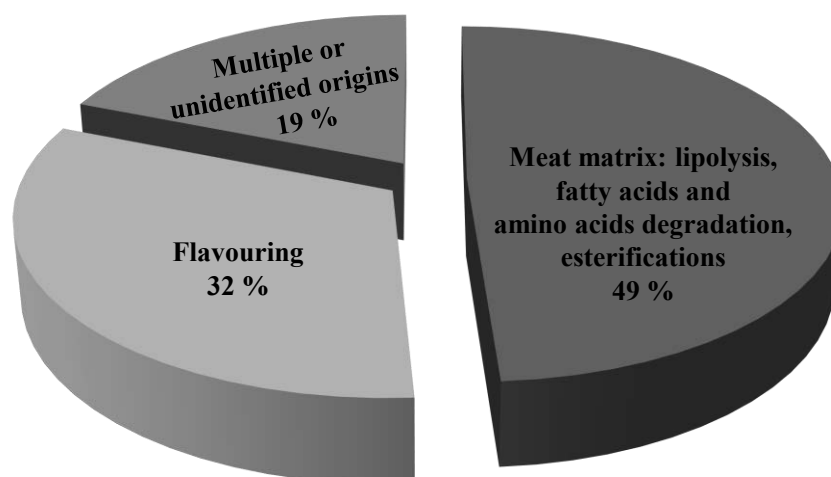


Figure 3.8 Relative contribution of the odour-active compounds to the aromagram area according to main origin.

It was found that the dry-fermented aroma required a very strong contribution from substances derived from amino acid degradation, fatty acid oxidation, and secondary reactions of esterification, given that about 50% of the intensity of the odours detected by olfactometry came from the transformation of the meat matrix during drying (Figure 3.8). On the other hand, garlic played a key role in the construction of the final aromatic properties of dry-fermented sausages, as about $\frac{1}{3}$ of the intensity of the odours detected was derived from garlic (Figure 3.8). This key role can be explained by both the low detection threshold of sulphur compounds and their individual odours. These compounds have intense “garlic” notes as well as “dry sausage-like” notes that give the final note to the overall dry-fermented sausage aroma, very probably by masking much of the other odour-active compounds during consumption of dry sausages. The aromatic role of pepper proved much more limited, and probably influenced taste more than aroma.

Conclusion

These preliminary results confirm that dry sausage aroma stems from volatile substances of varied and numerous odours and origins. The two main origins of the aroma of dry sausages are (i) degradation of animal tissue during fermentation and ripening, and (ii) flavouring by natural substances, particularly garlic. The interest of adding garlic was confirmed since this vegetal introduced aromatic notes that enhanced the dry-fermented sausages aroma. We found that about $\frac{1}{3}$ of the intensity of the odours detected was derived from this vegetal. Flavouring, mainly with garlic, could therefore prove hugely valuable as a way to counterbalance the loss of aroma that occurs when manufacturing low-salt and low-fat dry-fermented sausages. In this perspective, various flavouring solutions will probably have to be implemented according to consumer tastes and eating habits in the countries or regions of sale in order to optimize the consumer acceptability of these new products.

Acknowledgements

This work was funded by the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement No. 289397 (TeRiFiQ project) and from the ‘Conseil Régional d’Auvergne’ within the framework of the Scientific Communication program “1182” under grant agreement No. 939.92-6574/13968. This paper is part of the thesis of Hassan Safa, who is working for this research program. The authors thank the 8 sniffers for their participation in the GC-MS/80 analysis and ATT for proofreading the manuscript.

3.4. Article n°4 (soumis à Meat Science en Octobre 2015)

Impact of flavouring and of combined partial substitutions of sodium chloride and pork backfat on physicochemical, biochemical and instrumental attributes and sensory acceptability of dry-fermented sausages

Hassan Safa^a, Philippe Gatellier^a, Jean-Louis Berdagué^a, Nathalie Kondjoyan^a,
Frédéric Mercier^a, Raphaël Favier^a, Pierre-Sylvain Mirade^a

^aINRA, UR370 Qualité des Produits Animaux, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France.

Abstract

We performed 7 fabrications of dry-fermented sausages to investigate the effects of flavouring and combined partial substitutions of sodium chloride by potassium chloride and pork backfat by oleic sunflower oil on key physical-chemical and biochemical parameters, instrumental colour and texture measurements, and the sensory acceptability of the end-products. The new product formulations combining salt and fat substitutions lead to globally acceptable water loss and water activity values and similar rates of proteolysis, lipolysis and lipid oxidation, but less protein oxidation. The results clearly showed (1) that sodium and animal fat contents in dry-fermented sausages can be drastically reduced with no adverse effect on colour, final textural properties or consumer acceptability, and (2) the crucial role of flavouring as it activated the fermentation processes that further shape textural acceptability. Flavouring is one possible solution that we can advocate to enhance the acceptability of low-fat low-sodium dry-fermented sausages.

Keywords: dry-fermented sausage; combined partial substitutions; potassium chloride; sunflower oil; oxidation; instrumental and sensory characteristics.

Introduction

In Europe, processed meats such as dry-cured ham and dry-fermented sausage are staple ways of transforming and conserving meat. However, their production has always used large amounts of curing agents like salt that, if consumed in excess, are related to the development of human health problems such as high blood pressure and cardiovascular diseases (Zanardi, Ghidini, Conter, & Ianieri, 2010). Furthermore, meat products such as dry-fermented sausages are typically rich in saturated fatty acids (SFA), and an excessive intake of fat in human diet has been implicated as a driver of hypercholesterolemia and coronary heart disease (Ansorena & Astiasarán, 2004; Muguerza, Ansorena, & Astiasarán, 2003). For these reasons, health

authorities have recommended cutting fat intake down to less than 30% of total caloric intake, keeping polyunsaturated-to-saturated fatty acids ratio between 0.4-0.5, and cutting salt intake down to just 6 g salt per day from the current average daily NaCl intake estimated at between 8.3 and 10 g of salt (Severini, De Pilli, & Baiano, 2003; US Department of Health and Human Services, 2005). Reducing salt and fat intake in human diet hinges on reducing the consumption of processed meat products, which contribute up to 22%–24% of NaCl intake and 50% of total calorie intake (Ruusunen, & Puolanne, 2005; Severini et al., 2003). However, meat industry efforts to strongly reduce fat and salt have often failed due to the crucial functions played by salt and fat in processed meat products. Reducing salt and fat inputs in dry-fermented sausage manufacture reportedly leads to organoleptic and sensory defects. For example, texture, aroma and taste defects and lower overall consumer acceptability have been reported in low-salt slow-fermented sausages (Corral, Salvador, & Flores, 2013) and low-fat fermented sausages (Muguerza, Fista, Ansorena, Astiasaran, & Bloukas, 2002). Industry efforts to improve the nutritional quality of dry-fermented sausages have therefore turned to the partial substitutions of salt with other free-sodium salts (Corral et al., 2013; Gimeno, Astiasaran, & Bello 2001a,b; Guardia, Guerrero, Gelabert, Gou, & Arnau, 2008; Zanardi et al., 2010) and of pork backfat with other sources of more polyunsaturated fatty acid-rich fat such as vegetable oils (Mora-Gallego et al., 2013; Muguerza et al., 2002; Muguerza et al., 2003; Severini et al., 2003). However, salt and animal fat substitutions could equally have physicochemical, organoleptic and sensory impacts on dry-fermented sausage quality. Several papers report no significant effects on textural features when animal fat was partially substituted by olive oil (Bloukas, Paneras, & Fournitzis, 1997; Muguerza et al., 2002, 2003; Valencia, Ansorena, & Astiasaran, 2006). By contrast, a study on salami found lower firmness when animal fat was replaced with extra-virgin olive oil (Severini et al., 2003) and a study on non-acid-fermented sausages made with 5% sunflower oil (SFO) found that the end-products were more cohesive and very springy but softer and less chewy (Mora-Gallego et al., 2013). The literature contains several reports of effects of salt substitution on textural features. For example, harder products were obtained when sausages were made with partial replacement of NaCl with KCl (Corral et al., 2013; Gelabert, Gou, Guerrero, & Arnau, 2003; Guardia et al., 2008; Zanardi et al., 2010). In addition, it was reported that partial replacement of salt by other divalent salts such as calcium chloride leads to harder, more cohesive and chewier sausages (Gimeno, Ansorena, Astiasaran, & Bello, 2000). Concerning flavour, taste and aroma, fermented sausages made with 8% pork backfat and 2% olive oil were found to have intense odour and taste (Muguerza et al., 2002) and non-acid-fermented sausages made with 5% SFO had a more intense ripened odour and flavour

(Mora-Gallego et al., 2013). By contrast, metallic flavour and taste and aroma defects were detected in sausages made with high levels (> 33%) of KCl (Campagnol, dos Santos, Terra, & Pollonio, 2012; Gelabert et al., 2003; Gimeno et al., 2001b). Furthermore, using high amounts of K-Lactate reduced the cured colour intensity as a result of higher pH values at the end of fermentation (Guardia et al., 2008), and partial substitution of NaCl with mixtures of KCl and calcium chloride or calcium ascorbate led to lighter and yellower sausages (Gimeno et al., 2001a, b). However, very few studies have investigated the combined substitution of NaCl and pork backfat during dry sausage manufacture. Beriain, Gomez, Petri, Insausti, and Sarries (2011) studied the effect of incorporating emulsified olive oil on the physicochemical properties of low-salt, inulin-enriched dried sausages. Mora-Gallego, Serra, Guardia, and Arnau (2014) investigated the effect of replacing pork fat by SFO on the physicochemical, instrumental and sensory characteristics of small low-sodium non-acid fermented sausages. We recently reported that direct combined reductions of fat and salt content during dry sausage manufacture increased product weight losses, water activity, proteolysis and lactic fermentation, while decreasing lipolysis and oxidation (Safa, Gatellier, Lebert, Picgirard, & Mirade, 2015).

This study was conducted within the framework of the European TeRiFiQ project which aims to develop procedures that, further to binary reductions ('fat/sugar' or 'fat/salt'), enable the production of safe, nutritionally-improved food products that are acceptable to consumers. For dry sausage, the binary reduction goal targeted is a 30% reduction in sodium and a 60% reduction in SFA. Preliminary experiments showed that these reductions are achievable and practicable only by partially substituting NaCl with KCl and directly reducing added pork backfat by using lean pork meat containing just 7% fat, and are maintained when 3% oleic SFO is added to reach a similar level of unsaturated fatty acids to conventional products. Here, we ran an in-depth analysis of 7 fabrications of dry-fermented sausages of varying composition to quantify how and to what extent flavouring (garlic, black pepper) and combined partial substitutions of sodium chloride by potassium chloride and pork backfat by oleic SFO affect the time-course of key biochemical reactions occurring in dry-fermented sausage manufacture as well as the physicochemical, instrumental (product colour and texture) and sensory characteristics of end-products designed to offer new healthier product formulations.

Materials and methods

Dry-fermented sausage manufacture

Raw pork meat, i.e. pieces of pork shoulder and pork backfat, was purchased from a local distributor (DISTRIPORC, Clermont-Ferrand, France). At reception of the pork meat, the water content, pH and water activity (a_w) of the pork lean were verified as water content=74.0% \pm 0.5%, pH=5.99 \pm 0.03, a_w =0.971 \pm -0.002. In total, seven formulations of dry-fermented sausages of varying composition were manufactured (Table 3.5).

Table 3.5 Details of the experimental formulations of dry-fermented sausages tested in this study. Percentages are expressed as a function of total matter, except for flavouring (g/kg).

Formulations	Animal fat content (%)	Sunflower oil content (%)	NaCl content (%)	KCl content (%)	Flavouring	
					Garlic powder (g/kg)	Black pepper (g/kg)
Control	21	0	2.8	0	0.5	2
NF	21	0	2.8	0	0	0
K-RS	21	0	2.0	0.8	0.5	2
RF	7	0	2.8	0	0.5	2
K-RSF	7	0	2.0	0.8	0.5	2
SFO-RF	7	3	2.8	0	0.5	2
K-SFO-RSF	7	3	2.0	0.8	0.5	2

The first formulation, termed ‘Control’ and used as baseline reference for the 6 other fabrications, was prepared mainly using more than 70% pork lean, 21% animal fat (7% contained in the lean meat plus 14% added pork backfat), 2.8% NaCl and flavouring (0.5 g/kg of dehydrated powdered-down garlic plus 2 g/kg of black pepper). The second fabrication, termed ‘non-flavoured, NF’ was prepared similarly to the control formulation but without flavouring in order to assess whether flavouring effectively impacts all the parameters investigated. The third fabrication corresponded to a reduced-sodium formulation that contained 0.8%-KCl (K-RS). The fourth and fifth fabrications, prepared only with lean meat, corresponded to reduced-fat formulations which were not combined (RF) or combined with partial replacement of NaCl by KCl (K-RSF). The last two fabrications corresponded to reduced-fat formulations containing 3% oleic SFO without (SFO-RF) or with (K-SFO-RSF) partial substitution of NaCl by KCl. In reality, the exact composition of these 7 formulations was driven by preliminary outcomes highlighting the benefits of incorporating KCl and

vegetable oil instead of pork backfat to reduce sodium and SFA content in dry sausages while increasing the potassium/sodium and monounsaturated fatty acid (MUFA)/SFA ratios.

For each formulation in Table 3.5, about 30 dry-fermented sausages were manufactured as per the following procedure. The corresponding amount of pieces of defatted pork shoulder and backfat (when necessary) was weighed, ground to 6 mm in diameter and mixed with the corresponding amount of NaCl, KCl, a set of additives and a mid-acidification kinetic starter culture (MF55, Biovitec, Lissieu, France) prepared at 100 kg/L concentration and added at 10 g/kg. In each meat batter, we added dextrose (5 g/kg), potassium nitrate (0.3 g/kg), potassium erythorbate (0.5 g/kg), black pepper (2 g/kg; except in formulation NF), garlic powder (0.5 g/kg; except in formulation NF) and finally the solution of starters (10 g/kg). The incorporation of 3% total matter (TM) oleic SFO (previously stored at -2°C) in the products of formulations SFO-RF and K-SFO-RSF required the prior preparation of an emulsion with lean pork meat and the addition of 1% TM wheat plant fibres (WF200, Rettenmaier & Son, Rosenberg, Germany) to bind the batter and minimize further oil loss in liquid form. For each formulation, the meat batter was then stuffed into 50 mm-diameter collagen casings. The raw sausages, weighing 450 g and about 20 cm in length, were then plunged in a *Penicillium nalgiovensis* solution to cover their surface during the drying stage. All products were steamed for 4 days at 24°C and 70% relative humidity (RH), then ripened for 25 days at 13°C and 70% RH — i.e. a total drying time of 29 days — in a ventilated temperature- and RH-controlled room.

For the 7 fabrications, three sausages were taken at days 7 and 29 to evaluate the physicochemical parameters and at days 1, 7, 21 and 29 to evaluate the time–course patterns of biochemical parameters. For biochemical analyses, all the sausages were individually treated with liquid nitrogen, ground down into fine powder to minimize problems tied to heterogeneity of sampling in subsequent analysis, and stored at -80°C until analysis.

Physical-chemical analysis

Weight loss

Almost every day of drying, for each formulation, the weight of 9 dry sausages arranged on the same bar was measured to determine percentage weight loss. To avoid any impact of potential heterogeneities of the drying conditions on product weight losses, the location of the bars inside the room was changed after each weight measurement. Weight loss was expressed as percentage of initial weight.

Water activity

Water activity (a_w) was measured at 20°C using a lab a_w -meter (Aw Sprint TH-500, Novasina, Switzerland). Preliminary a_w measurements were realized individually on three dry sausages corresponding to each formulation. Since no significant difference between the three values ($< 0.001 a_w$ unit) was found, a_w values for each formulation were thus determined on a mixture of the three dry sausages.

pH values

pH was determined using 1 g of powdered-down sample previously homogenized with 10 mL of ultrapure water (Ultra-Turrax system, Ika, Germany). pH was measured with a pH meter (InLab427, Mettler Toledo, France) calibrated with standard solutions at pH 4 and pH 7. All pH measurements were performed in nine replicates.

Biochemical analysis

Proteolysis index measurement

Proteolysis index (PI) was determined on powdered-down samples of dry-fermented sausages based on a fluorescence method using the reaction of fluorescamine with N-terminal α -amino groups of peptides in TCA-soluble fractions (Harkouss, Mirade, & Gatellier, 2012). The method defines PI as the percentage ratio of amino group content to total protein content. All PI measurements were performed in nine replicates.

Lipolysis quantification

Fat degradation into fatty acids was quantified by determining the acid value of fat (standard NF T 60-204) in samples of 29-day-old dry-fermented sausages. Total free fatty acid content from 25 g of sample was dissolved in a solvent mix of ether/ethanol and quantified by potassium hydroxide (0.1 N) in the presence of a colour indicator, i.e. phenolphthalein (acid medium) which is colourless before neutralization but turns pink after neutralization under basic conditions. The number of equivalents of potassium hydroxide poured is equal to the number of equivalents of acid present in the sample. The acid value is thus the mass of potassium hydroxide (in mg) required to neutralize 1 g of fat. All these measurements were performed in three replicates.

Lipid oxidation quantification

Lipid oxidation was assessed in powdered-down samples of dry-fermented sausages by determining fluorescent hydrosoluble Schiff bases (HSB). For this purpose, the aqueous phase

obtained during the determination of fat content was collected and used to quantify HSB levels. In parallel, a standard curve of commercial quinine was prepared. Fluorescence of each point of the standard curve and fluorescence of each sample were measured with a spectrofluorometer (FP 8300, Jasco, France) at a 370 nm excitation wavelength, a 470 nm emission wavelength and a 3 s integration time. A linear standard curve of quinine was plotted, and sample HSB levels were calculated from this curve and expressed as micromoles/kg meat *vs.* quinine equivalent. All lipid oxidation measurements were performed in nine replicates.

Protein oxidation quantification

Protein oxidation was assessed in powdered-down samples of dry-fermented sausages through the determination of free thiol groups of cysteine residues from Ellman's assay using 2,2'-dithiobis (5-nitropyridine) (DTNP) as reagent. Under alkaline conditions, DTNP binds to the anionic free thiol groups of cysteine residues to form a complex that absorbs at 386 nm. The results were expressed in nanomoles of bound DTNP per mg of protein. All protein oxidation measurements were performed in nine replicates.

Quantification of instrumental and sensory characteristics of dry-fermented sausages

Instrumental colour measurement

Colour was recorded using a Konica Minolta CM 2500d (Japan) spectrophotometer in the CIELAB colour space (D65-10°-L*a*b*-d/8 SCE). The instrument was calibrated at 0 (in the air) and with white standard (No. 7009694). Colour was measured on the top of the dry-fermented sausage slices. For each product formulation, the colour data reported here corresponded to the average of 15 local measurements performed on three whole product slices.

Texture profile analysis

Dry-fermented sausage quality was first evaluated through texture measurements on non-frozen 30×20×50 mm parallelepiped samples extracted from 29-day-old products. A TA.XT Plus universal texture analyser (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, England) was used to perform the texture profile analysis (TPA) tests (Bourne, 2002) at room temperature. The 20 mm-high parallelepiped samples were placed under the compression plate surface (flat 490 mm² cross-section plunger) and twice compressed axially to 50% of their original height with a time interval of 2 s between the two successive compressions. The TPA parameters obtained using the XT.RA Dimension software package delivered with the experimental device were hardness,

fragility, elasticity and cohesiveness. The mean \pm standard deviation of 6 samples of each formulation was used for statistical analyses.

Sensory analysis

Dry-fermented sausage quality was also evaluated through a sensory analysis performed by 29 assessors accustomed to eating dry sausages with the objective of comparing consumer-panel acceptability of flavoured and non-flavoured low-salt and low-fat products. Scoring was carried out by the 29 assessors using a structured scoring scale (from 0 'low score' to 10 'high score'). Eight samples were presented to the assessors. The first sample corresponded to the control formulation and was designed only to habituate the assessors to the tasting task. The other 7 samples corresponded to the 7 product formulations and were presented to the assessors in random order. The assessors' sensory evaluation results were analysed statistically. Four product acceptability criteria were studied: appearance, mouthfeel, taste and aroma. To complete the evaluation of product acceptability, the assessors were also asked to freely describe, in their own words, the organoleptic texture, flavour and aroma characteristics of the dry sausages.

Statistical analyses

Hierarchical cluster analysis (HCA), calculated using Ward's method on STATISTICA 10-V2014 software, was applied to all measured raw values to make the figures easier to read and the results easier to interpret. HCA consists in clustering samples that lead to similar results on a given parameter, thereby creating classes of formulations. Once a class of formulations of sausages is formed, the values of the parameter corresponding to the class are calculated, at each time point, by averaging the values of all the same-class formulations of sausages.

To assess the effect of each factor (flavouring, fat and salt contents, SFO use, salt content \times fat content interaction, and salt content \times SFO content interaction) on each variable measured in this study, statistical analyses of the results (except for sensory analysis) were performed by analysis of variance (ANOVA) using STATISTICA 10-V2014 software. When ANOVA found a significant effect ($p < 0.05$), post-hoc procedures were used and multiple comparisons among means were examined by the Tukey test to determine the level of significance between groups.

For the results of sensory analysis, the effects of formulations on acceptability scores for product appearance, mouthfeel, taste and aroma were evaluated by ANOVA using the model:

$$\text{Acceptability score}_{i,j,k} = \mu + \text{Assessor}_i + \text{Formulation}_j + \text{Assessor} \times \text{Formulation}_{i,j} + \varepsilon_k \quad (3.1)$$

where μ is mean effect, Assessor is assessor effect (29 assessors), Formulation is formulation effect (7 levels), Assessor \times Formulation_{*i,j*} represents the interactions between formulations and assessors, and ε_k is the residual variance. Means were compared by a Tukey test ($p < 0.05$).

Results and Discussion

Main results of physical-chemical analysis

Weight loss of end-products

Weight losses are reported in Table 3.6. At the end of ripening, product weight losses ranged from 41.3% to 50.2% depending on formulation. As shown in Table 3.6, regardless of salt content, a higher fat levels equates to lower percentage weight losses (41.3% for experiment NF and 41.5% for experiments Control and K-RS, respectively). Moreover, replacing NaCl by KCl at a 30% fat level had no significant effect on percentage weight loss at the end of drying ($p > 0.05$). By contrast, reducing the animal fat level from 21% to 7% with or without adding 3% oleic SFO increased product weight losses, which ranged from 45.8% to 50.2% for formulations RF, K-RSF, SFO-RF and K-SFO-RSF. In-depth analysis found that incorporating 3% oleic SFO to 7% animal fat led to slightly higher weight loss, probably as result of a less oil loss in liquid form during the fermentation stage. Indeed, we noted that the surface of the products corresponding to the two formulations with added SFO (experiments SFO-RF and K-SFO-RSF) remained visibly 'oily' throughout the first week of process. For these two batches, product weight losses at the end of drying ranged from 49.2% (SFO-RF) to 50.2% (K-SFO-RSF).

Furthermore, ANOVA and Tukey tests highlighted very highly significant effects of fat content and use of oleic SFO ($p < 0.001$) on final product weight loss but no significant effect of flavouring, salt content or the two interactions studied ($p > 0.05$) (Table 3.6). These results, showing that product weight losses are highest when animal fat content is reduced and vegetable oil is added, confirm results obtained in previous studies (Liaros, Katsanidis, & Bloukas, 2009; Muguerza, Gimeno, Ansorena, Bloukas, & Astiasarán, 2001). Indeed, Muguerza et al. (2001) reported substantial dripping of liquid oil during the manufacture of healthier dried Chorizo de Pamplona sausages, which they explained by the fact that higher unsaturation of fatty acids in this type of oil made it more fluid. However, these results do not concur with Bloukas et al. (1997) and Mora-Gallego et al. (2013) who reported higher water losses in control dry-fermented sausages compared to products elaborated with vegetable oils, which they attributed to oil covering each particle of ground meat acting as a barrier against water evaporation.

Table 3.6 Details of statistical analyses: (a) analysis of variance, (b) physical-chemical parameters measured (weight loss, a_w , pH) and (c) post-hoc procedure performed on the values of biochemical parameters (proteolysis, lipolysis, lipid and protein oxidations) for all 7 formulations of dry-fermented sausages. ANOVA was performed to study the effect of time, flavouring, salt content, fat content, sunflower oil (SFO) content, and salt content \times fat content and salt content \times SFO content interactions on the physical-chemical and biochemical parameters studied. Significance is annotated as: ns ($p > 0.05$), * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$), and (-) indicates a factor not studied. A Tukey test was applied on the means \pm standard deviation calculated from all independent determinations and for all time points. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$).

(a) Analysis of variance (ANOVA)								
	Weight losses (day 29)	a_w (day 29)	pH (day 7)	pH (day 29)	Proteolysis (Proteolysis index)	Lipolysis (Acidity value)	Lipid oxidation (HSB)	Protein oxidation (Thiol groups)
Time	(-)	(-)	(-)	(-)	***	(-)	***	**
Flavouring	ns	ns	***	***	ns	ns	ns	ns
Salt	ns	***	ns	ns	***	***	ns	ns
Fat	***	ns	ns	***	ns	***	***	***
Oleic SFO	***	ns	ns	ns	ns	ns	***	***
Salt \times Fat	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Salt \times Oleic SFO	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
(b) Physical-chemical measurements					(c) Post-hoc procedure (Tukey test)			
Control	41.5 ^a	0.884 ^a	5.00 \pm 0.06 ^a	5.31 \pm 0.03 ^a	4.27 \pm 0.79 ^a	9.70 \pm 0.26 ^b	2.71 \pm 1.14 ^c	21.81 \pm 1.50 ^a
NF	41.3 ^a	0.885 ^a	5.50 \pm 0.10 ^b	5.60 \pm 0.04 ^c	4.29 \pm 0.93 ^a	10.0 \pm 0.30 ^b	2.73 \pm 1.13 ^c	21.79 \pm 1.58 ^a
K-RS	41.5 ^a	0.894 ^b	5.04 \pm 0.04 ^a	5.34 \pm 0.04 ^a	4.46 \pm 0.94 ^b	12.30 \pm 0.53 ^d	2.73 \pm 1.11 ^c	22.06 \pm 1.37 ^a
RF	45.8 ^b	0.886 ^a	5.05 \pm 0.05 ^a	5.43 \pm 0.04 ^b	4.37 \pm 0.95 ^{ab}	7.40 \pm 0.30 ^a	2.20 \pm 0.96 ^a	30.16 \pm 1.47 ^c
K-RSF	47.0 ^{bc}	0.894 ^b	5.02 \pm 0.04 ^a	5.44 \pm 0.02 ^b	4.57 \pm 0.97 ^c	8.60 \pm 0.23 ^{ab}	2.16 \pm 0.98 ^a	29.88 \pm 1.57 ^c
SFO-RF	49.2 ^c	0.889 ^a	5.01 \pm 0.01 ^a	5.47 \pm 0.05 ^b	4.45 \pm 0.97 ^b	10.50 \pm 0.33 ^c	2.53 \pm 1.08 ^b	28.59 \pm 1.50 ^b
K-SFO-RSF	50.2 ^c	0.896 ^b	5.05 \pm 0.04 ^a	5.49 \pm 0.02 ^b	4.60 \pm 1.00 ^c	10.0 \pm 0.30 ^b	2.47 \pm 1.13 ^b	28.72 \pm 1.39 ^b

Water activity of end-products

At the end of drying, mean a_w values ranged from 0.884 to 0.896 (Table 3.6), thus ensuring product safety as all these a_w values were comfortably below the ‘safe’ threshold value of 0.92 for growth capacity of *Listeria monocytogenes*. ANOVA and Tukey test showed that mean a_w value was only significantly affected by salt level ($p < 0.001$). The highest a_w values ($a_w > 0.89$) were obtained for the three formulations made with partial substitution of NaCl by KCl (Table 3.6), thus confirming the lower a_w -depressor effect of KCl compared to NaCl. These findings are in good agreement with other reports (Gimeno, Astiasaran, & Bello, 1998; Ibanez

et al., 1995). For example, higher a_w values were reported in dry-fermented sausages made with a salt mixture containing 1.00% NaCl, 0.55% KCl, 0.23% MgCl₂, and 0.46% CaCl₂ (Gimeno et al., 1998).

pH values

pH value was measured at the end of fermentation (day 7) and again at the end of drying (day 29). As shown in Table 3.6, in all formulations (except for NF), an acidic pH value close to 5.0 was logically obtained at the end of fermentation as a result of the action of lactic acid bacteria (LAB) converting sugars into lactic acid. This acidification during fermentation contributes to the safety of dry-fermented sausages, along with drying, added salt and low a_w values. On the other hand, the abnormal pH value of 5.5 measured at the end of fermentation in formulation NF could be assigned to the absence of flavouring, specifically black pepper. Indeed, the cuticle of spices like black pepper contains manganese, which is known to increase starter culture activity in meat (Coventry & Hickey, 1993). At day 29, mean pH values of the dry-fermented sausages ranged from 5.31 to 5.60, with non-flavoured formulation NF again posting the highest final pH value. pH values increased in all formulations from day 7 to day 29, driven by the transformation of lactic acid into other chemical substances and the production of alkaline molecules due to proteolysis (Flores, Dura, Marco, & Toldra, 2004). If we exclude experiment NF, the highest final pH values were measured in fat-reduced dried sausages (Olivares, Navarro, Salvador, & Flores, 2010) but all the pH values obtained are acceptable as they mirror the pH values classically found in dry-fermented sausages.

ANOVA and Tukey test (Table 3.6) showed that at the end of fermentation, pH values were very significantly affected by flavouring ($p < 0.001$) but unaffected by salt and fat content, oleic SFO, salt content \times fat content interaction and salt content \times SFO content interaction ($p > 0.05$), whereas at the end of drying, pH values were very significantly affected by flavouring but also by level of animal fat ($p < 0.001$). These findings are in line with the results reported by Corral et al. (2013), Gelabert et al. (2003), Gimeno et al. (2001b), Guardia et al. (2008), Ibañez et al. (1995) and Olivares et al. (2010), but diverge from the results of García, Dominguez, Galvez, Casas, and Selgas (2002), Liaros et al. (2009), Mora-Gallego et al. (2013), Muguerza et al. (2001) and Papadima and Bloukas (1999) who did not find significant differences between pH and/or lactic bacteria counts when comparing control dry sausages with products elaborated with partial substitution of NaCl with KCl or low-fat-content sausages.

Main effects on biochemical parameters in dry-fermented sausages

The key sensory attributes of dry-fermented sausages result from complex biochemical phenomena involving the main components of meat products, such as proteins and lipids (Corral et al., 2013; Gómez & Lorenzo, 2013; Olivares, Navarro, & Flores, 2009, 2011). Here, NaCl was partially replaced with KCl, and pork backfat was totally removed or partially replaced with 3% oleic SFO. We thus quantified proteolysis, lipid oxidation and protein oxidation through the drying process and lipolysis in the end-products to assess to what extent these biochemical reactions were impacted by these combined partial substitutions.

Time-course of proteolysis

Initial proteolysis index (PI) values measured in several raw lean pork meat samples ranged from 2.6% to 2.8%, i.e. in good agreement with values reported by Harkouss, Safa, Gatellier, Lebert and Mirade (2014). Figure 3.9 charts the time-course of proteolysis measured in dry-fermented sausages.

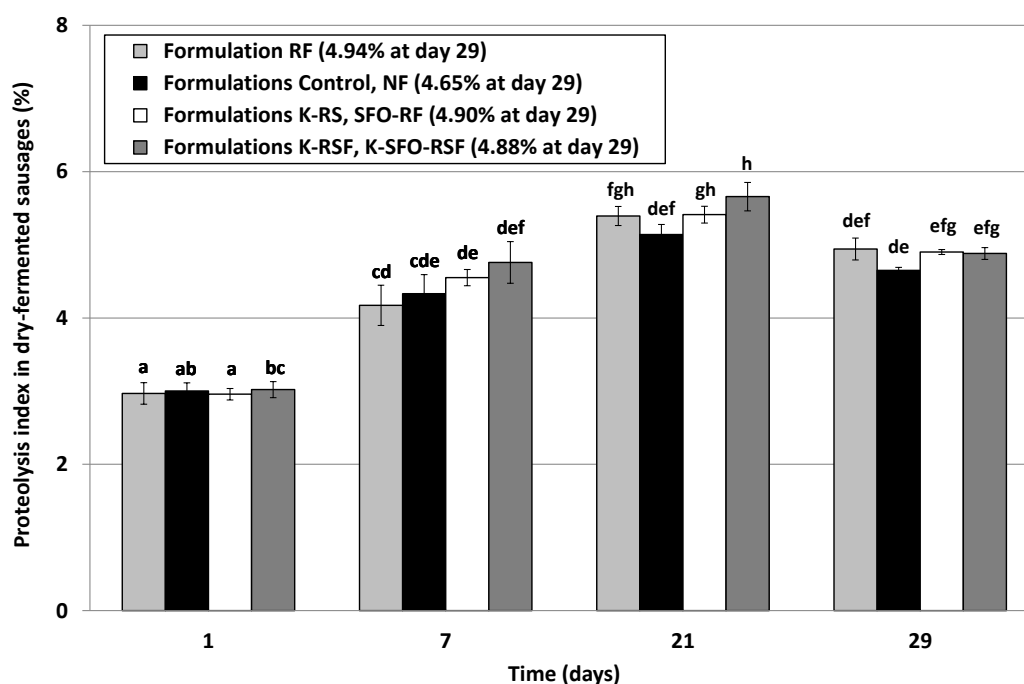


Figure 3.9 Time-course of proteolysis index, investigated in the seven formulations of dry-fermented sausages. Hierarchical cluster analysis was performed on raw values in order to pool product formulations presenting similar patterns. For each class of dried sausages, values are means \pm standard deviation calculated from all the independent measured values of each formulation in that class. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$).

A close look at Figure 3.9 shows that proteolytic activity is detectable straight from day 1, as proteolytic enzymes are already active at 24°C (Harkouss et al., 2014) and bacterial enzymes (e.g. *Debaryomyces spp.*) at work during the fermentation stage contribute to the initial degradation of myofibrillar proteins, especially the release of free amino acids from myosin and actin (Durá, Flores, & Toldrá, 2004). PI ranged from 2.9%–3.1% at day 1 and reached 4.2%–4.9% at day 7 depending on formulation. From day 7, rate of proteolysis decreased noticeably, probably due to sub-optimal pH for enzyme activity due to the intense lactic acidification. Beyond day 21, PI values decreased for all formulation classes (Table 3.6). To be sure that this decrease was not due to a problem with the experimental technique used, we measured PI in some samples using the classic Kjeldhal method, which confirmed the decrease in PI values over the last week of process (data not shown). This indicates that some end-products of proteolysis had disappeared, likely consumed by microorganisms present in the products at that point in time, and so could not be detected by the measurement techniques used.

The HCA applied to PI values of all formulations segregated four classes of formulations but with lower between-class differences in time-course patterns of PI (Figure 3.9). The first group that leads to the lowest PI values is formed by the 21%-animal fat formulations containing higher NaCl content (Control and NF), likely reflecting the well-known inhibitor effect of salt against proteolytic enzyme activity. Higher PI values were observed in the 7%-animal fat formulations that contain 0.8% KCl, regardless of oleic SFO content (K-RSF and K-SFO-RSF). The two other classes are very close in terms of PI values but nevertheless differentiate the formulation RF that contains 7% animal fat and 2.8% NaCl and the K-RS and SFO-RF formulations that contain either 21% animal fat, 2.0% NaCl and 0.8% KCl (K-RS) or 7% animal fat, 3% oleic SFO and 2.8% NaCl (SFO-RF). Nevertheless, the PI values remain substantially similar between the four classes, possibly because salt content differed little between formulations ('2.8% NaCl' or '2.0% NaCl, plus 0.8% KCl').

ANOVA and Tukey tests (Table 3.6) highlighted that PI values were strongly affected by time and by partial substitution of NaCl with KCl ($p < 0.001$) but unaffected by flavouring, fat content, and the two interactions ($p > 0.05$). These results are in agreement with Corral et al. (2013), Ibañez, Quintanilla, Cid, Astiasarán, and Bello (1997), and Olivares et al. (2011) who found higher proteolytic activities in fat-reduced dry-fermented sausages and in dried products made with partial substitution of NaCl with KCl.

End-product lipolysis

Figure 3.10 reports the results found for rate of lipolysis. Applying HCA on acidity values measured in end-products for all 7 formulations led to three distinct classes, with two classes counting only one formulation. Indeed, measured acidity value was different in formulations RF and K-RS, whereas all the other formulations belonged to the same class with a mean acidity value of 10.1 mg KOH per g of product fat. Moreover, the fact that a lower acid value (7.4 mg KOH per g of product fat) was found for formulation RF may be explained by its combination of high NaCl content (2.8%) and low animal-fat content (7%). Regarding K-RS, the highest acidity value measured (12.3 mg KOH per g of product fat) may be attributable to its high animal fat content (21%) combined with the presence of 0.8% KCl, unlike the NF and Control formulations that contained only 2.8% NaCl.

ANOVA and Tukey tests (Table 3.6) showed that rate of lipolysis was highly significantly affected by fat content and salt content ($p < 0.001$) but unaffected by flavouring, oleic SFO content, and all the interactions ($p > 0.05$). These findings are in line with the results reported by Olivares et al. (2011) and Soyer, Ertaş, and Üzümcüoğlu (2005).

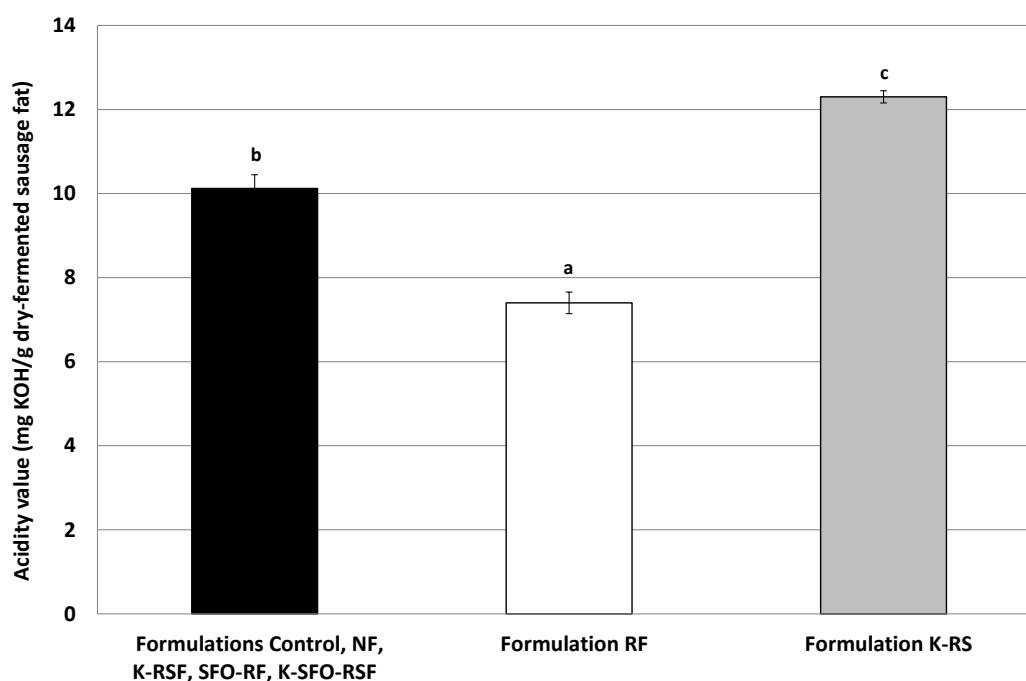


Figure 3.10 Rate of lipolysis quantified through an acidity value at day 29. Hierarchical cluster analysis was performed on raw values in order to pool product formulations presenting similar patterns. For each class of dried sausages, values are means \pm standard deviation calculated from all the independent measured values of each formulation in that class. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$).

Time-course of lipid and protein oxidations

Lipid oxidation

In the literature, lipid oxidation is very often quantified using the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) method. Here we found that the TBARS quantification method was ill-suited to accurate assessment of lipid oxidation in dry-fermented sausage samples due to a biphasic phenomenon making the results very difficult to interpret as the measured TBARS values decreased from day 1 onward (data not shown). This phenomenon probably reflects an interaction between aldehydes and other in-product compounds. Moreover, interactions between the primary amines of amino acids and/or proteins and aldehydes lead to the formation of Schiff bases which, in turn, can be used as markers of lipid oxidation.

Figure 3.11 charts the time-course of lipid oxidation quantified by determining hydrosoluble Schiff base (HSB) values, showing that HSB values and thus oxidation mechanism increased observably over drying time.

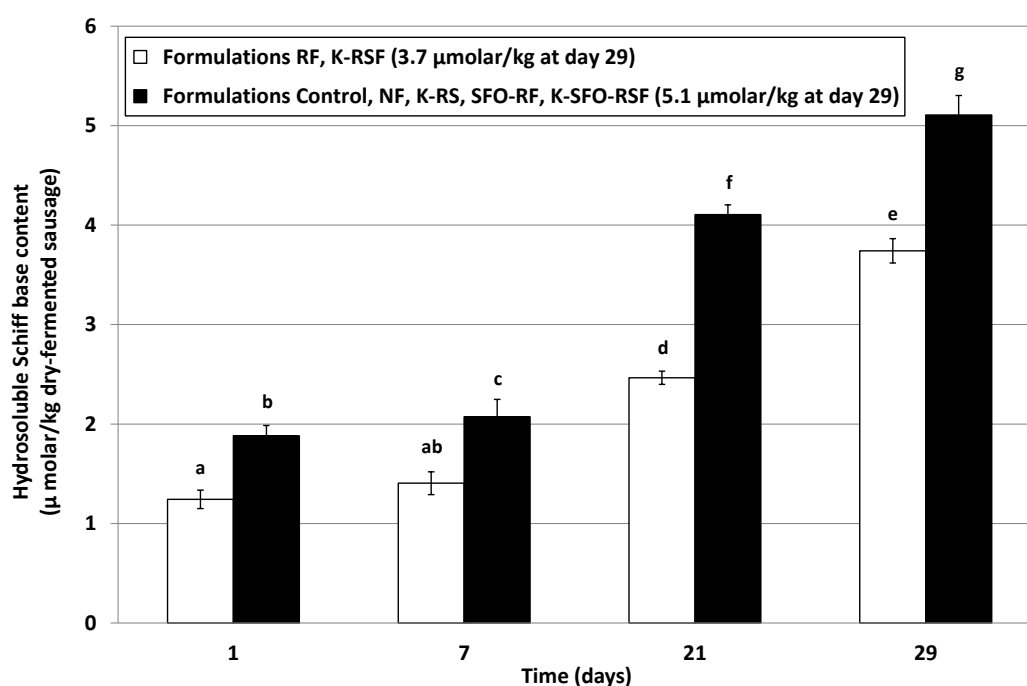


Figure 3.11 Time-course of lipid oxidation reaction investigated in the seven formulations of dry-fermented sausages. Lipid oxidation was quantified by determining hydrosoluble Schiff base (HSB) content. Hierarchical cluster analysis was performed on raw values in order to pool product formulations presenting similar patterns. For each class of dried sausages, values are means \pm standard deviation calculated from all the independent measurements of each formulation in that class. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$).

In addition, HCA pooled the seven formulations of dry-fermented sausages into just two classes: a first class that leads to the lowest HSB values was formed by the two leanest formulations containing only 7% animal fat (RF and K-RSF), and a second class covering all other formulations containing more than 7% fat, including the two that incorporated 3% oleic SFO. This finding highlights how dry-fermented sausage manufacturers need to be careful incorporating PUFA-rich vegetable oil to avoid excessive lipid oxidation and thus the potential off-flavours.

ANOVA and Tukey test (Table 3.6) confirmed that lipid oxidation was highly significantly affected by time, fat level and oleic SFO content ($p < 0.001$) but not by flavouring, salt content or any of the interactions studied ($p > 0.05$). Liaros et al. (2009) found lower lipid oxidation in fat-reduced dried sausages. Other authors have reported similar levels of lipid oxidation when animal fat was partially replaced with vegetable oil such as 20-30% olive oil (Muguerza et al., 2001) or 7.8% SFO (Fuentes, Estévez, Ventanas, & Ventanas, 2014). By contrast, other studies report that using vegetable oils could accelerate lipid oxidation (Severini et al., 2003). Finally, here we found no significant effect of salt substitution, contrary to Corral et al. (2013), Flores, Nieto, Ferrer and Flores (2005) and Zanardi et al. (2010) who observed a significant increase in lipid oxidation in reduced-sodium dry sausages compared to traditional products.

Protein oxidation

We first quantified protein oxidation by determining carbonyl groups, and the results showed no significant changes over drying time and between all seven formulations (data not shown). However, thiol groups of cysteine are very sensitive to the oxidative process and their oxidation leads to the formation of disulphide bridges. The decrease of free-thiol-group content can therefore be used to measure protein oxidation. Here, the initial value of free-thiol-group content measured in raw pork meat samples ranged from 37-38.4 nanomoles DNTP/mg of protein.

For the 7 formulations of this study, HCA-based results (Figure 3.12) led to the formation of two classes as a function of their relative animal fat content regardless of presence or absence of oleic SFO. The first class pools the three 21%-animal fat formulations (Control, NF, and K-RS). The second class pools the four other formulations that correspond to 7%-animal fat formulations containing or not 3% oleic SFO (RF, K-RSF, SFO-RF, and K-SFO-RSF). In addition, in all formulations, thiol-group content decreased with time from the first week to the end of process, from 31.6–24.5 to 28.7–21.5 nmol/mg protein. Since no clear change in protein oxidation appeared with time beyond day 1, protein oxidation visibly occurred rapidly, maybe

directly during meat batter preparation, after which there was no subsequent intensification, because the thiol-group-content measured at day 1 was already lower than that measured in the raw meat. However, this particular trend may also result from H₂S production from cysteine and cystine by microorganisms such as lactic bacteria, yeasts and moulds that experienced exponential growth during the first week of process.

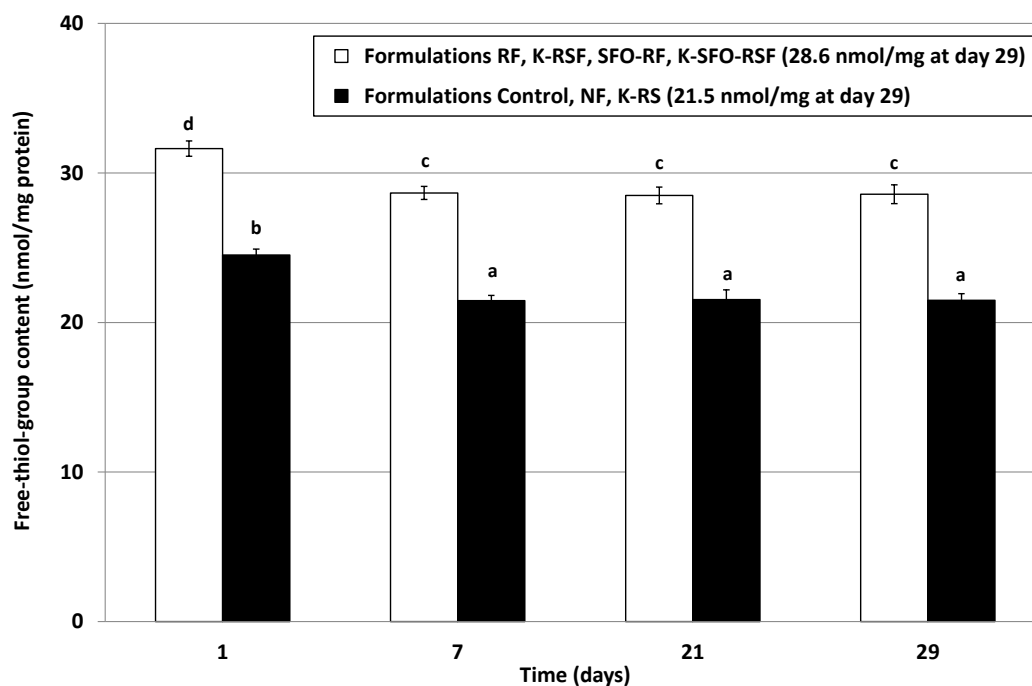


Figure 3.12 Time-course of protein oxidation reaction investigated in the seven formulations of dry-fermented sausages. Protein oxidation was quantified by determining free-thiol-group content. Hierarchical cluster analysis was performed on raw values in order to pool product formulations presenting similar patterns. For each class of dried sausages, values are means \pm standard deviation calculated from all the independent measurements of each formulation in that class. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$).

ANOVA and Tukey tests (Table 3.6) confirmed that protein oxidation was very significantly affected by fat content and oleic SFO content ($p < 0.001$), significantly affected by time ($p < 0.01$), but unaffected by flavouring, salt content and the two interactions investigated ($p > 0.05$). These findings are in line with results published by Fuentes et al. (2014) who reported high lipid oxidation and low protein oxidation in dried sausages made with oleic SFO. Regarding salt content, some authors have reported that salt led to higher oxidation by increasing the pro-oxidant activity of iron and the susceptibility of myofibril to carbonylation

(Perez-Cacho, Galan-Soldevilla, Leon Crespo, & Molina Recio, 2005), whereas other studies have found an antioxidant effect of salt (Rhee, Smith, & Terrell, 1983).

Main effects on instrumental and sensory characteristics of dry-fermented sausages

Colour measurements

Results for instrumental colour measurements, i.e. lightness (L^*), redness (a^*) and yellowness (b^*) values, are reported in Figure 3.13. Data analysis of figure 3.13a shows that both fat level and flavouring had very significant effects on lightness ($p < 0.001$). The 21%-animal fat formulations (Control, NF, and K-RS) showed higher L^* values than the other 4 formulations (RF, K-RSF, SFO-RF and K-SFO-RSF), thus confirming previous reports indicating higher L^* values in higher-fat sausages (Mora-Gallego et al., 2014). The fact that the highest L^* values were found in high-fat sausages could be assigned to a lower percentage of weight losses and low nitrosomyoglobin pigment content in these batches (Bloukas et al., 1997; Mora-Gallego et al., 2013; Muguerza et al., 2002; Papadima & Bloukas, 1999; Ruiz-Capillas, Triki, Herrero, Rodriguez-Salas, & Jimenez-Colmenero, 2012). In addition, Figure 3.13a shows few differences in L^* values between the three high-fat formulations but a lower L^* value for non-flavoured experiment NF than experiments Control and K-RS, likely due the lack of flavouring, i.e. black pepper, disrupting the fermentation process. In addition, the products of formulations K-RS, in which NaCl was partially replaced by KCl, seemed slightly lighter than control products. Similarly, lighter dry sausages were reported in the literature further to partial substitution of NaCl with a mixture of KCl and calcium chloride (Beriaín et al., 2011).

Regarding the redness (a^*) parameter (Figure 3.13b), the highest values found were for the 7%-animal fat formulations not containing 3% oleic SFO (RF and K-RSF), followed by the 7%-animal fat formulations that contained 3% oleic SFO (SFO-RF and K-SFO-RSF), and then the 21%-animal fat formulations (Control, NF, and K-RS). This pattern is due to higher myoglobin concentrations in the low-fat products that contained a higher amount of lean meat compared to 21%-animal fat formulations. Statistical analyses showed a very highly significant effect of fat content on a^* values ($p < 0.001$). The literature also reports higher a^* values in fat-reduced sausages (Muguerza et al., 2002, 2003). In addition, we found that flavouring also acted on the development of redness in dry-fermented sausages ($p < 0.001$). In fact, at low pH, nitrite is known to convert to nitric oxide which is involved in the formation of nitrosomyoglobin pigment that produces redness or cured colour (Guardia et al., 2008). This is why, in non-flavoured experiment NF, the lower a^* value had to result from over-high pH values during the

fermentation stage compared to the other formulations. In low-fat formulations, using SFO resulted in slightly lower a^* values (SFO-RF and K-SFO-RSF), and this effect was significant ($p < 0.05$). It has already been reported that dry sausages made with olive oil (Bloukas et al., 1997) or SFO have lower a^* values (Mora-Gallego et al., 2014).

We measured yellowness (b^*) on product slices at day 29 (Figure 3.13c). Level of animal fat and use of oleic SFO have significant effects on yellowness ($p < 0.05$). The highest b^* values found were for the 21%-animal fat formulations, followed by the 7%-animal fat formulations with 3% oleic SFO, probably due to their higher unsaturated fatty acid content which would make them prone to colour changes due to oxidation (Mora-Gallego et al., 2014).

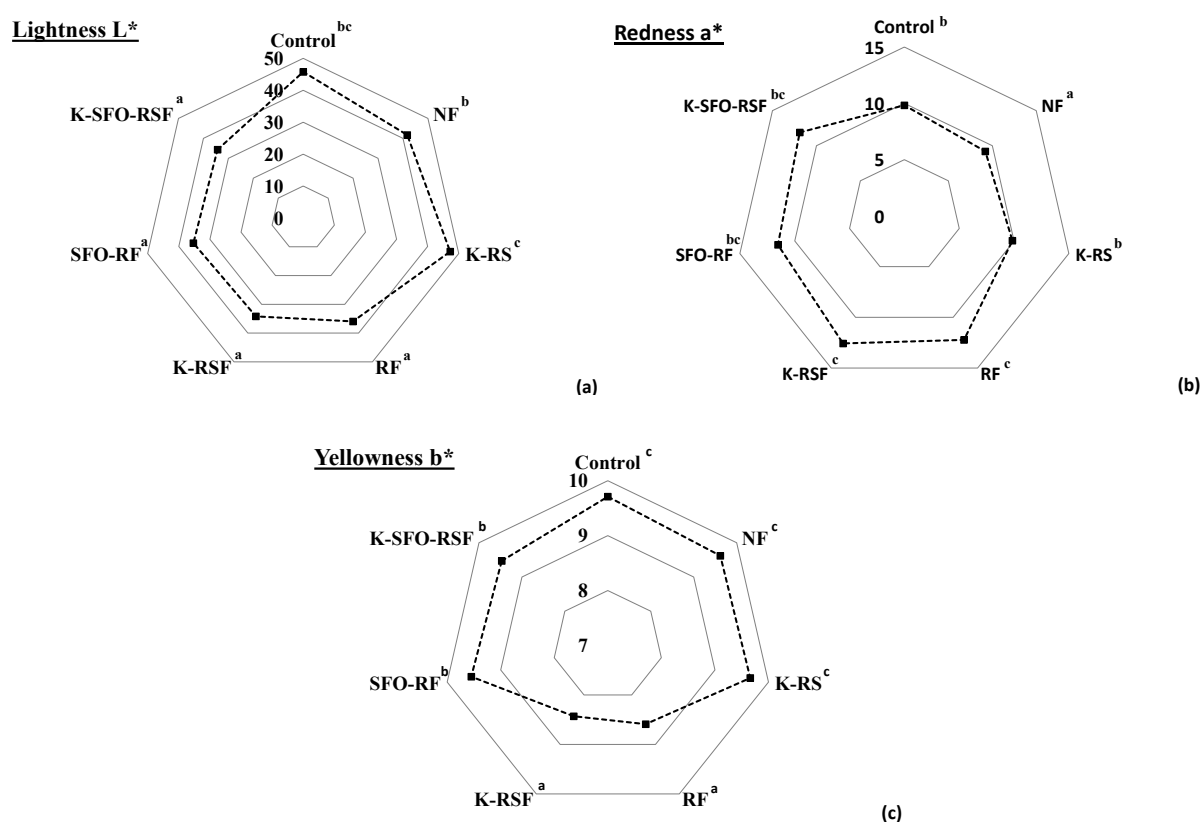


Figure 3.13 Instrumental colour measurement: (a) lightness, (b) redness and (c) yellowness of each dry-fermented sausage formulation listed in Table 3.5. Different letters tagged to formulation name of the graphs denote significant differences between means at $p < 0.05$.

Texture measurement

The hardness, cohesiveness, elasticity and fragility values measured by TPA-testing are reported in Table 3.7. Hardness was higher in 7%-animal fat formulations (RF, K-RSF, SFO-RF and K-SFO-RSF) than 21%-animal fat formulations (Control, NF, and K-RS), reflecting a

very significant effect of fat content on final product texture ($p < 0.001$). The literature also reports higher hardness values in low-fat sausages (Garcia et al., 2002; Liaros et al., 2009; Mora-Gallego et al., 2013; Muguerza et al., 2002; Olivares et al., 2010). However, adding vegetable oil (formulations SFO-RF and K-SFO-RSF) also led to clearly harder dry-fermented sausage texture ($p < 0.001$), likely due to the wheat fibre used when preparing oleic SFO or the higher weight losses that occurred when SFO was added. The literature also reports higher hardness values in sausages made with low fat content (6%) and 3% wheat fibres (Garcia et al., 2002). Here, comparing formulations Control vs. K-RS and RF vs. K-RSF, we found that switching from NaCl to KCl had very little impact on dry-fermented sausage hardness, whereas other studies found that partial replacement of NaCl with KCl led to harder and less chewy dry sausages (Corral et al., 2013; Gelabert et al., 2003; Guardia et al., 2008; Zanardi et al., 2010). However, Chorizo de Pamplona was found to be softer when salt was replaced with a NaCl, KCl and CaCl_2 salt mixture (Gimeno et al., 1998). These differences in terms of product hardness could also result from the higher proteolytic activities that generally occurred in salt-reduced formulations. Furthermore, not adding flavouring was detrimental to final dry-fermented sausage hardness due to the under-acidification detected at end of the fermentation stage that led to a visibly poor sliceability. Indeed, during fermentation, the acidification activity of lactic acid bacteria prompts myofibrillar proteins to coagulate and thus form a protein gel implicated in sausage hardness (Olivares et al., 2009).

Cohesiveness was slightly lower in 21%-animal fat formulations (Control, NF, and K-RS) than 7%-animal fat formulations (RF, K-RSF, SFO-RF and K-SFO-RSF). Statistical analysis (Table 3.7) confirmed the significant effect of fat content ($p < 0.01$) on final product cohesiveness but found no significant effect of flavouring, SFO, and salt content ($p > 0.05$).

Elasticity and fragility (Table 3.7) were slightly lower in 21%-animal fat formulations (Control, NF, and K-RS) than 7%-animal fat formulations (RF, K-RSF, SFO-RF and K-SFO-RSF), but statistical analysis found a highly significant effect ($p < 0.001$) of fat content on these two textural parameters. We found no statistically significant effect of flavouring, salt content, type of salt or adding SFO on product elasticity and fragility. However, previous studies report higher fragility, elasticity and cohesiveness values and lower hardness values when non-acid fermented sausages are made with 5% or 3% SFO (Mora-Gallego et al., 2013, 2014).

Table 3.7 (a) Texture profile analysis (hardness, cohesiveness, elasticity, fragility) performed in the 7 formulations of 29-day-old dry-fermented sausages. Measured values were means \pm standard deviation calculated from 6 independent determinations. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$). (b) Details of analysis of variance. ANOVA tested the effects of flavouring, fat content, salt content, sunflower oil (SFO) content, animal fat content \times salt content interaction and SFO content \times salt content interaction on the texture parameters studied. Level of significance is annotated as follows: ns ($p > 0.05$), * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

a - Texture profile analysis				
Formulations	Hardness	Cohesiveness	Elasticity	Fragility
Control	58.2 \pm 5.4 ^{bc}	0.573 \pm 0.032 ^{ab}	0.773 \pm 0.003 ^a	0.932 \pm 0.007 ^a
NF	37.6 \pm 4.3 ^a	0.570 \pm 0.024 ^{ab}	0.765 \pm 0.004 ^a	0.935 \pm 0.004 ^{ab}
K-RS	54.6 \pm 3.9 ^b	0.556 \pm 0.043 ^a	0.759 \pm 0.003 ^a	0.932 \pm 0.006 ^a
RF	72.6 \pm 6.1 ^{de}	0.588 \pm 0.023 ^b	0.804 \pm 0.008 ^b	0.944 \pm 0.002 ^{bc}
K-RSF	67.7 \pm 6.0 ^{cd}	0.611 \pm 0.026 ^b	0.807 \pm 0.005 ^b	0.949 \pm 0.007 ^c
SFO-RF	81.5 \pm 6.2 ^{ef}	0.615 \pm 0.019 ^b	0.807 \pm 0.004 ^b	0.948 \pm 0.007 ^c
K-SFO-RSF	85.0 \pm 8.5 ^f	0.598 \pm 0.039 ^b	0.798 \pm 0.002 ^b	0.946 \pm 0.008 ^{bc}

b - Analysis of variance (ANOVA)				
Flavouring	***	ns	ns	ns
Fat	***	***	***	***
Salt	ns	ns	ns	ns
Fat \times Salt	ns	ns	ns	ns
SFO	***	ns	ns	ns
SFO \times Salt	ns	ns	ns	ns

Sensory acceptability of low-fat and low-sodium formulations

Results for sensory analysis are shown in Figure 3.14 and Table 3.8. Except for formulations NF and K-RSF, all other dry-fermented sausage formulations were judged acceptable, as acceptability scores for most of the criteria lay between 5.5 and 6.5/10. The products that scored highest on all the criteria corresponded to formulations K-SFO-RSF and SFO-RF, which scored slightly higher on acceptability than control formulation. The non-flavoured formulation NF was judged the most mediocre with the lowest scores for aspect, mouthfeel, taste and aroma, which ranged from 4.0 to 4.7/10 (Figure 3.14). As stated above, the absence of flavouring, especially black pepper, limited the acidification process, thus leading to texture and appearance deficits. The absence of garlic and black pepper could further explain the low scores on aroma and taste.

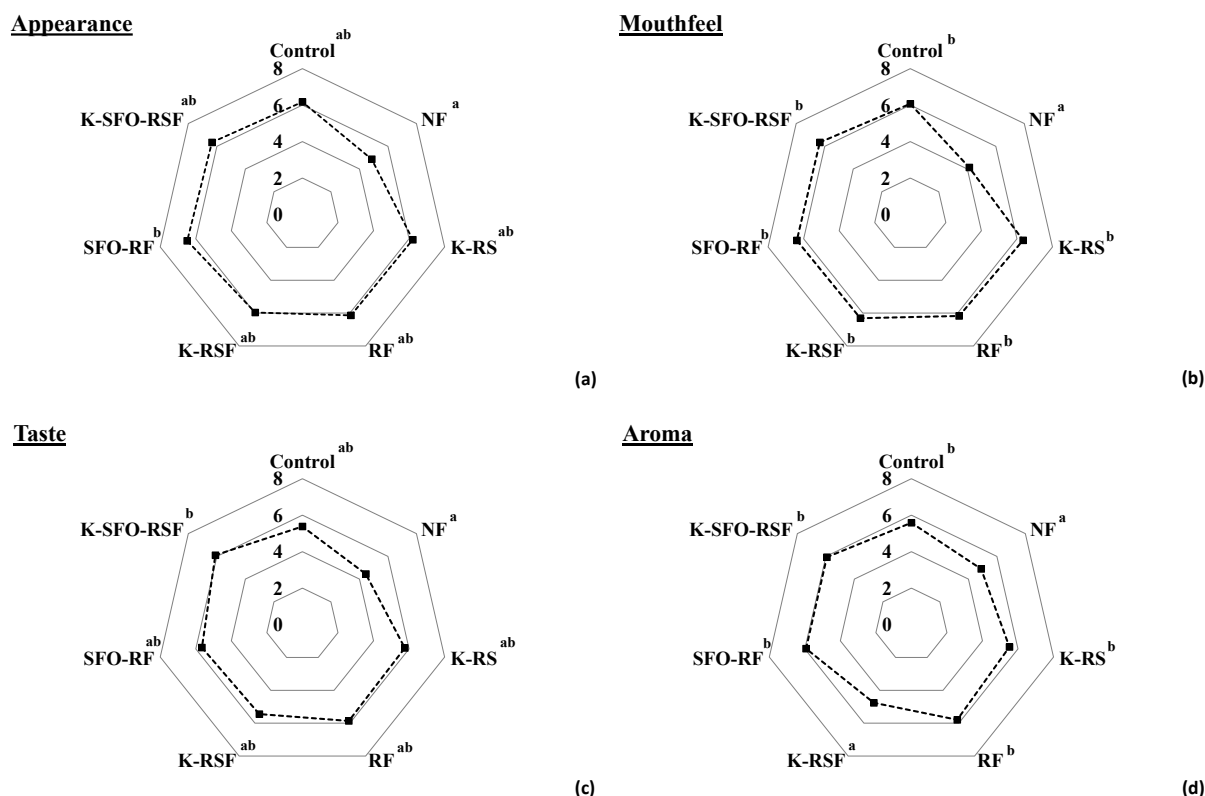


Figure 3.14 Mean acceptability in terms of (a) appearance, (b) mouthfeel, (c) taste and (d) aroma as evaluated by 29 assessors for each dry-fermented sausage formulation listed in Table 3.5. Different letters tagged to formulation name of the graphs denote significant differences between means at $p < 0.05$.

In addition, the assessors' free-form comments also confirmed that non-flavoured products was not dry enough, soft, with poor cohesion and little or no aroma, flavour or dry-cured ham aroma (Table 3.8). Therefore, the crucial role of flavouring in dry sausages also extends to their consumer acceptability. Assessors assigned the unacceptability of formulation K-RSF to aroma and taste defects, citing low aroma, off-flavours and a metallic taste, possibly as a result of the fact that KCl/NaCl ratio reached 0.4. Note that in all low-salt but flavoured formulations, sausage flavour was always found to be salty enough or even too salty. This can be explained by the likely role of garlic and pepper as saltiness enhancers, as assessors very frequently associated items such as "too salty and spicy". The literature also reports good acceptability of odour, flavour, taste and texture in non-acid fermented sausages made with 5% SFO (Mora-Gallego et al., 2013) or with 3% SFO combined with low sodium content (Mora-Gallego et al., 2014).

Table 3.8 Key comments formulated by the 29 assessors on the organoleptic characteristics of the dry-fermented sausages for the 7 formulations.

Formulations	Texture	Taste	Aroma
Control	Irregular texture, too fat, poor cohesion, soft.	Fat flavour, too salted.	Animal, pork aroma, nutty, butter.
NF	Not dry enough, too fat, poor cohesion, soft.	Fat flavour, bland, too salted.	Low aroma, no aroma, dry-cured ham aroma, no flavour, fatty, butter.
K-RS	Too mixed, rubbery, poor cohesion.	Salted and spicy.	Pork flavour, flavoured, pleasant.
RF	Too mixed, not firm texture, dry cured ham texture, pleasant texture.	Good saltiness and piquant (pepper).	Too spicy, limited sausage aroma.
K-RSF	Pleasant texture, not too fat.	Too salty, metallic and piquant.	Low sausage aroma, vegetal aroma, off-flavours.
SFO-RF	Mixed, Firm but pleasant, good cohesion, rubbery, dry.	Too salty.	Good aroma, spicy, pleasant.
K-SFO-RF	Bad texture, rubbery.	Too salty and piquant.	Low sausage aroma, bland.

Conclusions

This study investigated the effects of added flavouring and combined partial substitutions of NaCl by KCl and pork backfat by oleic SFO on physical-chemical and biochemical parameters, instrumental colour and texture attributes and sensory acceptability in seven purpose-manufactured formulations of dry-fermented sausages. The results clearly showed that sodium and animal fat contents can be drastically reduced without leading to unacceptable defects in terms of physical-chemical and biochemical development and with no adverse effect on final textural properties or consumer acceptability. The role of flavouring proved very important, as it acted not only by adding aromatics that enhance aroma acceptability but also by activating fermentation processes that further shape texture acceptability. We advocate flavouring with garlic and pepper, since it has a long history of use in French dry-cured meat products, but ultimately, various other flavouring solutions will probably have to be implemented to fit consumer tastes and eating habits in the countries or regions of retail in order to optimize the acceptability of new low-fat low-salt product formulations.

Acknowledgements

The research leading to these results received funding from the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement No. 289397 (TeRiFiQ project) and from the ‘Conseil Régional d’Auvergne’ within the framework of the Scientific Communication program “1182” under grant agreement No. 939.92-6574/13968. This paper is part of the thesis of Hassan Safa, who works for this research program. The authors thank R. Favier, H. Ismail, R. Agouninessouk, S. Portanguen and the ADIV staff for their technical assistance, and ATT for proofreading the manuscript.

3.5 Conclusions

Même si réduire les teneurs en sel et en matière grasse animale modifie les évolutions physicochimiques et biochimiques au cours de la fabrication des saucissons secs, il est donc possible de procéder à une réduction drastique de leurs teneurs sans conduire à des défauts inacceptables en termes de développement biochimique et physicochimique et sans effet majeur rédhibitoire vis-à-vis des propriétés organoleptiques et sensorielles finales, qui nuisent à l'acceptabilité de ces nouvelles formulations de saucissons par les consommateurs. Il est également possible et « accepté » pour les consommateurs d’ajouter un peu d’huile végétale afin de rehausser la teneur en acides gras insaturés et le ratio P/S (en fonction du type d’huile ajoutée) des produits fabriqués. Attention, toutefois, à maîtriser les phénomènes oxydatifs.

Bien qu’ajoutée en très faible quantité, l’aromatisation (incorporation d’ail en poudre et de poivre noir moulu) joue un rôle crucial dans le bon déroulement des évolutions physicochimiques et biochimiques lors de la fabrication des saucissons. L’ail, de par ses nombreux composés odorants-actifs, participe activement à l’établissement de l’arôme typique de saucisson sec et donc à maintenir cet arôme lorsque les teneurs en sel et en matière grasse sont réduites. Quant au poivre noir, il joue un rôle crucial en activant le processus fermentaire, du fait de la richesse en manganèse de la peau de ses grains, ce qui permet d’obtenir une acidification suffisante au bout de 7 jours, et au final, une texture du produit qui soit acceptable par les consommateurs. L’aromatisation des produits est donc un levier technologique potentiel afin de maintenir, voire de rehausser, les qualités sensorielles (arôme et texture) de saucissons secs à teneurs réduites en sodium et en AGS. Bien entendu, les produits d’aromatisation qui seront ajoutés dans les produits devront correspondre aux habitudes alimentaires des consommateurs qui sont variables selon les pays, et même, selon les régions.

Chapitre 4 : DISCUSSION GENERALE

Une discussion critique et objective des principaux résultats de ce travail est faite dans le dernier chapitre de cette mémoire. Quatre points sont discutés :

- L'effet d'une réduction directe combinée en chlorure de sodium et en matière grasse animale sur la dynamique d'évolution des propriétés physicochimiques (perte en poids, a_w et pH) et des réactions biochimiques (protéolyse, lipolyse, oxydations lipidique et protéique) lors de la fabrication du saucisson sec.
- Le rôle critique de l'aromatisation (l'ail et le poivre) dans les composés odorants clés de saucissons de haut de gamme.
- L'effet de l'aromatisation et d'une substitution partielle combinée du chlorure de sodium et de la matière grasse animale, respectivement, par le chlorure de potassium et l'huile de tournesol oléique sur :
 - la dynamique d'évolution des propriétés physicochimiques (perte en poids, a_w et pH).
 - l'évolution des réactions biochimiques (protéolyse, lipolyse, oxydations lipidique et protéique) lors de la fabrication du saucisson sec.
 - les mesures instrumentales de texture et de couleur.
 - l'acceptabilité du consommateur.
- Les transferts d'eau et d'ions pendant la fabrication des saucissons secs, ainsi que le développement d'une isotherme de sorption spécifique pour ce produit permettant de prédire l'activité de l'eau en fonction des teneurs en eau, en sel et en lipides.

4.1 Effet d'une réduction directe et combinée en chlorure de sodium et en matière grasse animale (article n°2)

L'étude de l'impact d'une réduction directe et combinée en chlorure de sodium et en matière grasse animale sur l'évolution des propriétés physicochimiques et les évolutions biochimiques tout au long du procédé de fabrication, a nécessité de fabriquer un grand nombre de saucissons. Selon notre connaissance, aucune étude de ce type n'était disponible dans la littérature. Afin de limiter le nombre de fabrications à réaliser et donc le nombre d'échantillons à analyser et afin de pouvoir quantifier les effets des différents facteurs, un plan d'expériences de type Doehlert (Doehlert, 1970) a été établi. Sur la base des teneurs en sel et en matière grasse animale fixées par ce plan, 7 formulations de saucissons listées dans le tableau 3.1 (p 69) ont été fabriquées, en collaboration avec l'ADIV, et séchées dans une installation pilote pendant 29 jours. Une huitième formulation dit de « contrôle », utilisée comme base de référence pour les autres formulations, a été ajoutée, dans laquelle les saucissons secs ont été fabriqués avec

une teneur en sel initiale de 2,8% MT et une teneur en matière grasse animale initiale de 21% MT. Au cours de la fabrication et au fur et à mesure du séchage, des saucissons secs ont été prélevés à différents temps : au début des fabrications (J1), à la fin de la fermentation (J7), au 21^{ème} jour (J21) et à la fin du séchage (J29). L'analyse de ces saucissons a permis de suivre et d'étudier l'impact des teneurs en sel et en matière grasse animale sur l'évolution des propriétés physicochimiques, ainsi que le déroulement des réactions biochimiques.

4.1.1. Effet sur les propriétés physicochimiques

4.1.1.1. Perte en poids

Au cours de l'affinage et de la maturation des saucissons secs, une perte en poids progressive a été enregistrée pour toutes les formulations (Figure 3.1, p 77), due à un échange d'eau par convection (évaporation) entre le flux d'air existant dans la cellule de séchage et la surface des produits.

Il a été constaté que les formulations qui avaient des teneurs en matière grasse animale supérieures ou égales à 14,7% MT (formulations S1, S2, S3, S6 et S8, le contrôle) présentaient des pertes de poids relativement plus faibles que les trois autres (formulations S4, S5 et S7) ayant des teneurs en matière grasse animale inférieures ou égales à 11,6% MT. La différence entre les différentes cinétiques de pertes de poids des différentes formulations étant visible dès le 5^{ème} jour. L'analyse statistique des résultats (Tableau 3.3, p 78) a confirmé le fort impact de la teneur en matière grasse animale sur l'intensité de la perte de poids des saucissons. Ces résultats sont tout à fait en accord avec certaines études publiées dans la littérature (Corral *et al.*, 2014 ; Liaros *et al.*, 2009), mais en contradiction avec d'autres (Olivares *et al.*, 2010). La différence entre les résultats obtenus dans la présente étude et ceux publiés par Olivares *et al.* (2010) peut être expliquée par le fait que, dans la littérature, l'effet de la teneur en matière grasse sur la perte en poids a été étudié dans le cas de saucissons secs fermentés et séchés lentement pendant 63 jours, contrairement aux produits fabriqués dans cette étude, qui ont subi une fermentation plus forte et un séchage plus rapide.

En ce qui concerne la réduction du sel, la figure 3.1 (p 77) montre qu'à partir du 14^{ème} jour, les formulations à teneur en matière grasse animale inférieure ou égale à 11,6% MT avec une teneur en sel inférieure ou égale à 2,4% MT (formulations S4 et S5) ont une perte de poids légèrement supérieure à celle de la formulation S7 qui a une teneur en matière grasse animale équivalente aux deux autres (11,6% MT), mais une teneur en sel plus élevée (2,8% MT).

Concernant la perte de poids, l'analyse de la variance et le test Tukey réalisés (Tableau 3.3, p 78) ont mis en évidence des effets très hautement significatifs des facteurs temps et teneurs en matière grasse et en sel ($p < 0,001$), mais aucun effet significatif de l'interaction entre les teneurs en sel et en matière grasse animale ($p > 0,05$). Ceci confirme les résultats obtenus très récemment par Corral *et al.* (2014), mais est en contradiction avec de précédents résultats de ces mêmes auteurs (Corral *et al.*, 2013), probablement à cause du fort niveau de réduction en sel (-30%) appliqué à certains produits de la présente étude.

4.1.1.2. Activité de l'eau

D'une manière générale, le procédé de séchage conduit à une réduction de la teneur en eau et à une concentration du sel dans la matrice du produit, et donc à une diminution de la valeur moyenne de l' a_w . A la fin du procédé du séchage, les valeurs d' a_w mesurées pour toutes les formulations étaient en dessous du seuil de capacité de croissance de *Listeria monocytogenes*, i.e. 0,92 (Ingham *et al.*, 2004), ce qui signifie des produits sûrs vis-à-vis de ce danger microbiologique (Figure 3.2, p 79).

Cependant, des différences en termes de valeurs d' a_w ont été observées entre les différentes formulations, avec des valeurs plus élevées dans le cas de formulations réduites en sel. Ceci est parfaitement en accord avec les résultats d'autres études (Olesen *et al.*, 2004 ; Roseiro *et al.*, 2008). Les résultats obtenus ont aussi montré qu'une forte réduction de la teneur en matière grasse animale se traduisait par des valeurs d' a_w en fin de séchage relativement plus fortes, surtout si cette réduction était combinée à une réduction en sel (formulations S4, S5 et S6). En effet, la réduction de la teneur en matière grasse entraîne une diminution de la concentration en sel dans la partie maigre de la mûlée, et donc conduit à des valeurs moyennes d' a_w plus élevées. Ainsi, une réduction combinée en matière grasse animale et en sel peut être préjudiciable du point de vue de la sécurité microbiologique des saucissons, surtout si les produits ne sont pas suffisamment séchés par la suite. Ces résultats sont en accord avec la littérature (Corral *et al.*, 2014 ; Gómez and Lorenzo 2013).

Concernant l' a_w des saucissons, les analyses statistiques (Tableau 3.3, p 78) ont mis en évidence des effets très hautement significatifs des facteurs temps et teneurs en matière grasse et en sel ($p < 0,001$), mais aucun effet significatif de l'interaction entre les teneurs en sel et en matière grasse animale ($p > 0,05$).

4.1.1.3. Valeurs de pH

Au cours de la fabrication des différentes formulations de saucissons secs, une évolution normale des valeurs de pH a été constatée, avec une forte diminution du pH au cours de la première semaine du procédé, de 5,9 au 1^{er} jour à un minimum d'environ 5,0 à au 7^{ème} jour, ce qui correspond à une intense acidification due à l'action des bactéries lactiques ajoutés lors la préparation des différentes mêlées (Figure 3.3, p 81). Cette période est caractérisée par une phase de croissance exponentielle des bactéries lactiques qui fermentent le sucre en acide lactique. Au-delà du 7^{ème} jour, les valeurs de pH augmentent progressivement jusqu'à la fin du séchage, suite à une série de phénomènes comprenant une forte diminution de l'activité des bactéries lactiques du fait de l'épuisement du sucre, la transformation de l'acide lactique en d'autres substances chimiques, la consommation de l'acide lactique par des moisissures (Flores *et al.*, 2004) et/ou la production de molécules alcalines résultant des mécanismes protéolytiques (Ordóñez *et al.*, 1999).

Des différences en termes de valeurs de pH ont été observées entre les différentes formulations de saucissons secs, avec des valeurs de pH plus faibles pour les formulations S5 et S6 (Figure 3.3, p 81). Cependant, toutes les valeurs de pH, en particulier les valeurs les plus faibles et les valeurs finales, correspondent à des valeurs de pH « normales » dans ce type de produits fabriqué en France (Rason *et al.*, 2007). Les résultats statistiques (Tableau 3.3, p 77) ont montré des effets très hautement significatifs du temps et de la teneur en matière grasse ($p < 0,001$) sur l'évolution du pH, mais aucun effet significatif de la teneur en sel et de l'interaction sel-matière grasse ($p > 0,05$).

Dans la littérature, des résultats contradictoires existent quant à l'effet de la réduction du sel sur les valeurs de pH dans les saucissons secs fermentés. Par exemple, selon Olesen *et al.* (2004) et Stahnke (1995), la réduction du sel lors de la fabrication du saucisson secs aboutit à un taux de fermentation plus important. En revanche, Corral *et al.* (2013) n'ont trouvé aucun effet significatif, ni sur l'évolution du pH, ni sur la valeur finale de pH, lorsque la teneur en NaCl a été réduite de 16% ou substituée par 16% de KCl, dans le cas de saucissons fermentés et séchés lentement. La littérature révèle aussi des données contradictoires sur l'effet de la teneur en matière grasse sur les valeurs de pH. Certaines études ne trouvent aucun effet significatif de la réduction de la matière grasse animale sur les valeurs du pH (Garcia *et al.*, 2002 ; Liaros *et al.*, 2009; Papadima et Bloukas, 1999), à la différence d'Olivares *et al.* (2010) qui ont constaté qu'une réduction de la teneur en matière grasse animale aboutissait à une fermentation plus précoce et plus rapide. Au final, la présente étude confirme les résultats de Corral *et al.* (2014)

et montre qu'une réduction combinée en chlorure de sodium et en matière grasse animale n'impacte pas de manière significative le pH, ni en termes d'évolution, ni en termes de valeurs finales.

4.1.2. Effet sur les réactions biochimiques

4.1.2.1. Protéolyse

Au cours de la fabrication des produits de charcuterie tels que le jambon sec et le saucisson sec, les enzymes protéolytiques endogènes restent longtemps actives, ce qui aboutit à la dégradation des protéines et à la diminution du taux d'azote protéique (Toldra *et al.*, 1988, 1991 ; Gil, 1989).

Dans la présente étude, l'activité des enzymes protéolytiques (Figure 3.4, p 83) était déjà visible, dès le premier jour de fabrication, ce qui est tout à fait logique puisque les enzymes protéolytiques sont actives dès l'abattage (Toldra *et al.*, 1988). Au premier jour, l'indice de protéolyse (IP) était égal à 2,9-3,0%, soit une valeur tout à fait équivalente aux valeurs d'indices de protéolyse mesurées dans les premiers jours de fabrication d'un jambon sec (Harkouss *et al.*, 2014). Au cours de la fabrication des différentes formulations de saucissons secs, la dynamique d'évolution des enzymes protéolytiques a été affectée par plusieurs facteurs, comme le temps et le type de formulation. Au-delà du 1^{er} jour, une forte activité protéolytique a été remarquée, conduisant à des valeurs d'IP comprises entre 4,6% et 5,9% au 7^{ème} jour (Figure 3.4, p 83), ce qui est logique puisque les enzymes protéolytiques sont très actives à une température élevée d'environ 24°C. En fait, chaque enzyme exerce son activité maximale à une température donnée qui est dite « optimale » ; par exemple, les cathepsines exercent leur effet maximal à une température d'environ 40°C (Rico *et al.*, 1990). Au-delà du 7^{ème} jour, la vitesse de protéolyse est ralentie (Figure 3.4, p 83), ce qui peut être expliqué par l'effet de l'acidification lactique intense qui aboutit à une valeur de pH non optimale pour l'activité enzymatique protéolytique (Garcia-Garrido *et al.*, 2000). En effet, généralement à des pH fortement acides, les protéines, et du coup certaines enzymes, sont dénaturées et rendues totalement ou partiellement inactives. La littérature montre que certaines protéases agissent à des pH légèrement acides, telles que les cathepsines A, B2, C, III, les dipetdylaminopetidases II et les exopeptidases, comme les cathepsines B1, H, L et D (Garcia-Garrido *et al.*, 2000). Au-delà du 21^{ème} jour, de façon très surprenante, les valeurs d'IP ont diminué, quelle que soit la formulation (Figure 3.4, p 83). Pour être sûr que cette diminution n'était pas due à un problème de technique de mesure, les IP ont été quantifiés pour certains échantillons au moyen de la méthode classique de dosage à l'azote

(méthode de Kjeldhal). Cette méthode de mesure classique a confirmé la diminution des valeurs d'IP au cours de la dernière semaine de séchage. Cela tend finalement à prouver que certains produits finaux de la protéolyse avaient disparu, vraisemblablement consommés par les microorganismes présents dans les saucissons secs à ce stade du séchage, et ainsi ne pouvaient pas être détectés par les techniques de mesure utilisées.

D'autre part, comme cela était prévisible puisque le sel est considéré comme un puissant inhibiteur de l'activité des enzymes protéolytiques, une réduction de la teneur en chlorure de sodium a conduit à des valeurs d'IP relativement plus élevées. En effet, à forte concentration en NaCl, l'activité des calpaïnes est totalement inhibée et celle des cathepsines D est fortement diminuée (Sarraga *et al.*, 1989 ; Rico *et al.*, 1990). De la même manière, la réduction en matière grasse animale a abouti à des valeurs d'IP légèrement plus élevées. Cela peut être expliqué par le fait qu'à teneur en sel égale, une faible teneur en matière grasse animale entraîne une dilution du sel dans la partie maigre et donc conduit à une concentration moyenne en sel plus faible (Armenteros *et al.*, 2009, 2012).

Au final, l'analyse statistique des résultats de protéolyse (Tableau 3.3, p 78) a montré que ce mécanisme biochimique était très significativement affecté par les facteurs temps et teneurs en sel et en matière grasse animale, ainsi que par l'interaction teneur en sel-teneur en matière grasse animale ($p < 0,001$). En effet, réduire de manière combinée les teneurs en chlorure de sodium et en matière grasse animale accroît l'activité des enzymes protéolytiques, et donc amplifie la protéolyse, ce qui peut être préjudiciable pour la texture finale des saucissons secs.

4.1.2.2. Lipolyse

Dans les produits carnés, les lipides sont également dégradés par un ensemble d'enzymes spécifiques telles que les lipases, les estérases et les phospholipases. Dans les produits carnés, les enzymes lipolytiques peuvent être endogènes, mais sont principalement produites par les microorganismes (Molly *et al.*, 1996 ; Navarro *et al.*, 1997). Par exemple, les microcoques sont considérés comme les bactéries les plus actives dans le processus de lipolyse se déroulant dans les produits de charcuterie fermentée, en raison de leur capacité à hydrolyser les triglycérides par les lipases extracellulaires dont l'activité persiste sur une longue période (Montel 1999 ; Ordóñez *et al.*, 1999). En outre, d'autres microorganismes sont impliqués dans le processus de lipolyse, comme les bactéries lactiques, les levures et les moisissures qui produisent des enzymes lipolytiques ciblant principalement les mono et les diglycérides (Montel 1999 ; Bolumar *et al.*, 2006; Casaburi *et al.*, 2008).

La présente étude a montré que les teneurs en sel et en matière grasse animale ($p < 0,01$) affectaient de manière significative le taux de lipolyse, contrairement à l'interaction teneur en sel-teneur en matière grasse ($p > 0,05$) (Tableau 3.3, p 78). Sur ce point, la littérature montre clairement que, lors de la transformation de la viande en produits carnés salés et séchés, de nombreux facteurs tels que la technique de salage, le temps d'affinage et la température peuvent affecter la lipolyse et la production d'acides gras libres (Buscailhon et Monin, 1994a; Toldra et Flores, 1998). Par exemple, lors de la fabrication du jambons secs, une température relativement forte aboutit à une forte production d'acides gras libres et donc, conduit à un taux de lipolyse élevé (Gandemer, 2002 ; Zanardi *et al.*, 2004). D'autre part, il a été montré que la teneur en sel affectait fortement la lipolyse. Par exemple, Andres *et al.* (2005) a montré que le NaCl provoquait la libération des acides gras libres à partir des phospholipides. En revanche, d'autres études ont montré que la réduction du chlorure de sodium activait les enzymes lipolytiques (Stahnke 1995 ; Quintanilla *et al.*, 1996 ; Ripollés *et al.*, 2011). Cela peut être expliqué par le fait que les enzymes lipolytiques sont majoritairement d'origine microbienne et qu'une forte teneur en sel inhibe totalement ou partiellement la croissance des microorganismes. De la même manière, une réduction de la teneur en matière grasse animale aboutit à une réduction du taux de lipides et donc, à une réduction du niveau d'acides gras libres (Olivares *et al.*, 2011 ; Soyer *et al.*, 2005). Ainsi, une réduction combinée des teneurs en sel et en matière grasse animale affectent fortement le niveau de lipolyse, ce qui peut être préjudiciable pour la production aromatique et donc, pour les attributs sensoriels finaux des saucissons secs.

4.1.2.3. Oxydations lipidique et protéique

a. Oxydation lipidique

L'oxydation lipidique est un phénomène très important dans l'industrie agroalimentaire car cette réaction qui affecte la fraction lipidique est souvent préjudiciable pour la production aromatique et les attributs sensoriels. Ce phénomène a donc été très étudié dans la littérature, mettant en évidence des résultats contradictoires et un rôle flou de certains facteurs, comme l'effet de la teneur en sel. En effet, certaines études montrent que le sel joue un rôle pro-oxydant vis-à-vis des lipides pour des teneurs en sel dans la viande comprises entre 0,7 et 2,5 % (Lee *et al.*, 1997 ; O'Neill *et al.*, 1999 ; Hernandez *et al.*, 2002 ; Devatkal et Naveena, 2010 ; Gheisari, 2010). Ceci est dû à l'action inhibitrice du sel sur les enzymes anti-oxydantes que sont la catalase, le superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase (GSH-Px). Ces enzymes anti-oxydantes de la viande s'opposent à l'action des radicaux libres ($O_2^\circ-$, OH°) ou des produits de peroxydation (H_2O_2) sur les protéines et les lipides. Le sel peut aussi contenir des

traces de métaux lourds pouvant participer à l'oxydation. Le sel peut au contraire, dans certains cas, protéger les lipides contre l'oxydation (Sarraga, Carreras et Regueiro, 2002). Cet effet protecteur serait dû à une diminution de la solubilité de l'oxygène dans les milieux à forte force ionique.

L'oxydation des lipides est un phénomène complexe qui aboutit à la formation de composés volatils et non volatils, notamment des aldéhydes comme le pentanal, l'hexanal, le 4-hydroxynonanal, le malonaldéhyde (MDA)... Dans la littérature, les aldéhydes sont très souvent quantifiés en utilisant la méthode de substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS). Dans cette étude, nous avons constaté que la méthode de quantification TBARS était mal adaptée à l'évaluation précise de l'oxydation des lipides dans des échantillons de saucissons secs, du fait d'un phénomène biphasique qui ont rendu les résultats impossibles à interpréter. Ce phénomène reflète probablement une interaction entre les aldéhydes et d'autres composés dans le produit. De plus, les interactions entre les amines primaires d'acides aminés et/ou des protéines et les aldéhydes conduisent à la formation de bases de Schiff qui, à leur tour, peuvent être utilisées comme marqueurs de l'oxydation des lipides (Gatellier *et al.*, 2009).

Ainsi, dans la présente étude, suite à un dosage des bases de Schiff, les résultats de quantification de l'oxydation lipidique ont indiqué des effets très hautement significatifs du temps et de la teneur en matière grasse animale ($p < 0,001$), mais aucun effet significatif de la teneur en sel, ni de l'interaction teneur en sel-teneur en matière grasse animale ($p > 0,05$) (Tableau 3.3, p 78). Cependant, la réduction de la matière grasse animale dans le saucisson sec peut être critique puisque cela conduit à une diminution de l'oxydation lipidique qui contribue à l'arôme de ce type de produit carné (Olivares *et al.*, 2009; Corral *et al.*, 2013; Gómez and Lorenzo 2013).

b. Oxydation protéique

Le changement de l'état physico-chimique des protéines a été bien étudié lors de la cuisson de la viande (Haak *et al.*, 2006 ; Chelh *et al.*, 2006 et 2007 ; Astruc *et al.*, 2007 ; Santé-Lhoutellier *et al.*, 2008 ; Gatellier *et al.*, 2009, 2010 ; Promeyrat *et al.*, 2010a, 2010b), lors de l'irradiation (Rowe *et al.*, 2004) et lors du stockage en présence d'un niveau élevé d'oxygène (Lund *et al.*, 2007 ; Zakrys *et al.*, 2008). Cependant, peu d'informations sont disponibles sur les produits carnés séchés et fermentés.

Les résultats de la présente étude ont montré que l'oxydation des protéines semblait se produire rapidement, peut-être directement lors de la préparation des mêlées, sans

intensification ultérieure. De manière similaire à l'oxydation lipidique, les résultats obtenus ont montré des effets très hautement significatifs du temps et de la teneur en matière grasse animale sur l'oxydation des protéines ($p < 0.001$), mais aucun effet significatif de la teneur en sel, ni de l'interaction entre teneur en sel-teneur en matière grasse animale ($p > 0.05$). Ceci n'est pas très étonnant puisque les oxydations lipidiques et protéiques sont liées par le fait que l'oxydation des lipides produit des radicaux libres qui, à leur tour, entraînent l'oxydation des protéines.

4.2. Rôle critique de l'aromatisation dans les composés odorants clés de saucissons de haut de gamme (article n°3)

Les composés odorants-actifs provenant de 5 saucissons de haut de gamme fabriqués dans différentes régions de France et préalablement identifiés comme étant des produits présentant un arôme typique de saucisson sec, ont été isolés et identifiés, ainsi que leurs origines biochimiques.

Les résultats obtenus ont confirmé que l'arôme typique des saucissons secs provenait de substances volatiles odorantes qui avaient plusieurs origines. Les deux principales origines de l'arôme des saucissons secs identifiées dans ce travail sont (i) la dégradation des tissus d'origine animale pendant la fermentation et la maturation tels que les réactions biochimiques affectant les lipides (lipolyse, oxydation lipidique et réactions d'estérification secondaires), les protéines et les acides aminés (protéolyse et oxydation protéique) et (ii) les substances naturelles apportées par l'aromatisation, en particulier l'ail (Figure 4.1).

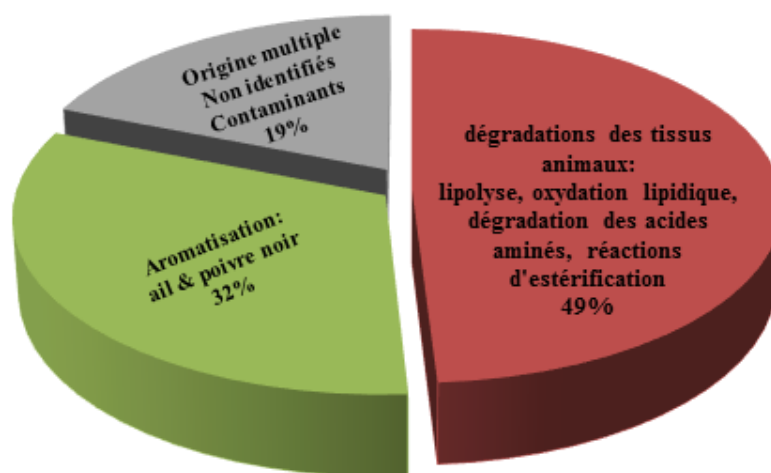


Figure 4.1 Contribution relative des composés volatiles odorants-actifs aux zones de l'aromagramme du saucisson sec, en se basant sur leur origine principale.

Ce travail a eu le mérite de confirmer l'intérêt et le rôle positif de l'ail dans l'établissement de l'arôme typique de saucisson sec puisque ce végétal introduit a apporté des composés aromatiques qui ont amélioré l'arôme et l'acceptabilité des saucissons secs. Nous avons constaté que près d' $\frac{1}{3}$ de l'intensité des odeurs actives détectées dérivait de ce végétal. L'aromatisation, principalement avec de l'ail, pourrait donc être un levier d'action sur lequel agir pour contrebalancer la perte d'arôme qui se produit lors de la fabrication de saucissons secs allégés en sel et en matière grasse animale.

Sur cette base, divers cocktails aromatisants devront probablement être mis au point conformément aux goûts et aux habitudes alimentaires des consommateurs dans les pays ou les régions de vente afin d'optimiser l'acceptabilité-consommateur de ces nouveaux produits.

4.3. Effet de l'aromatisation et d'une substitution partielle combinée du chlorure de sodium et de la matière grasse animale (article n°4)

En se basant sur les résultats des deux parties précédentes et de la littérature, une nouvelle série de fabrication de saucissons secs a été élaborée, en essayant d'introduire de nouveaux éléments permettant d'atténuer les défauts physicochimiques et biochimiques observés lors de la réduction directe et combinée en chlorure de sodium et en matière grasse animale. Ainsi, une étude de substitution a été mise en place et le facteur aromatisation a été pris en compte. Par conséquent, 7 nouvelles formulations de saucissons listées dans le tableau 3.5 (p 102) ont été fabriquées selon la même procédure que celle de la première série, y compris une formulation de « contrôle » (teneur en sel initiale de 2,8% MT et teneur en matière grasse animale initiale de 21% MT). Les 6 autres formulations produites étaient :

- une formulation 'NF' contenant les mêmes teneurs en chlorure de sodium et en matière grasse animale que la formulation 'contrôle', mais sans aromatisation (ni ail ni poivre), afin de juger l'effet du facteur 'aromatisation' sur l'évolution des paramètres investigués.
- une formulation 'K-RS' permettant d'étudier l'effet d'une substitution partielle (30%) du sel par du chlorure de potassium (KCl).
- deux autres formulations ('RF' et 'K-RSF') pour lesquelles une réduction du taux d'acides gras saturés néfastes pour la santé a été effectuée, en supprimant totalement la bardière de porc habituellement ajoutée, et associée ('K-RSF') ou pas ('RF') à une substitution partielle (30%) du NaCl par le KCl.
- deux dernières formulations ('SFO-RF' et 'K-SFO-RSF') pour lesquelles la bardière de porc habituellement ajoutée a été remplacée par 3% d'huile de tournesol oléique, ce qui

a permis d'enrichir le produit en acides gras mono-insaturés (bénéfique pour la santé humaine), et de réduire son taux d'acides gras saturés néfastes pour la santé, le tout étant combinée ('K-SFO-RSF') ou pas ('SFO-RF') à une substitution partielle (30%) du NaCl par le KCl. Pour établir ces deux recettes, l'huile de tournesol oléique a été préalablement transformée en émulsion grâce à une procédure spécifique développée par l'ADIV.

Ainsi, il a été possible d'étudier l'effet de ces nouvelles formulations sur la dynamique d'évolution des propriétés physicochimiques (perte en poids, a_w et pH), sur celle des réactions biochimiques (protéolyse, lipolyse, oxydations lipidique et protéique), sur les mesures instrumentales de texture et de couleur, ainsi que sur l'acceptabilité-consommateur des produits fabriqués.

4.3.1. Effet sur les propriétés physicochimiques

4.3.1.1. Perte de poids

De manière identique à ce qui a été observé suite à la première série de fabrication de saucissons secs, une perte de poids progressive a été enregistrée pour toutes les formulations de cette seconde série de fabrication, au cours de l'affinage et de la maturation des saucissons secs, qui résulte de l'évaporation de l'eau en surface des produits (échange de matière par convection air-produit).

Comme prévu, la réduction de la matière grasse animale s'est révélée critique quant à la perte de poids, aboutissant à une perte en poids relativement plus élevée, surtout lorsque la bardière de porc a été remplacée par l'huile de tournesol oléique (Figure 4.2). Bien qu'au début du séchage, l'ensemble des formulations réduites en matière grasse animale montrait le même comportement en termes de perte de poids, au-delà du 4^{ème} jour, une divergence de comportement est apparue entre les formulations réduites en matière grasse animale contenant de l'huile de tournesol et celles n'en contenant pas. Cette différence de comportement a été attribuée à une légère perte d'huile sous forme liquide lors de l'étape d'étuvage. En effet, la surface des saucissons correspondant aux formulations 'SFO-RF' et 'K-SFO-RSF' était restée au toucher « huileuse », tout au long de la première semaine du procédé. Toutefois, dans la littérature, des données contradictoires ont été trouvées sur ce sujet. En effet, Bloukas *et al.* (1997) et Mora-Gallego *et al.* (2013) ont rapporté des pertes de poids plus élevées dans des saucissons secs classiques par rapport à des produits élaborés avec de l'huile d'olive, attribuant ces différences au fait que l'huile qui couvre chaque particule de viande hachée agit comme une barrière contre l'évaporation de l'eau. Cette différence de comportement en termes de perte de

poinds entre les résultats obtenus dans cette étude et ceux de la littérature peut être expliquée par une différence dans la manière de préparer l'inclusion d'huile végétale et peut-être aussi, par des valeurs de viscosité différentes des différentes huiles utilisées (Sagiroglu, Ozcan, Isbilir, Paluzar, & Toprakkiran, 2013). Par contre, les résultats obtenus dans cette étude concordent avec ceux de Muguerza *et al.* (2001) qui ont constaté un égouttage d'huile sous forme liquide lors de la fabrication de Chorizo de Pamplona. Ces auteurs ont expliqué ce phénomène d'égouttage par le fait que l'huile d'olive contient un taux élevé d'acides gras insaturés, rendant l'huile beaucoup moins visqueuse. Les propriétés physiques de chaque acide gras, y compris leur point de fusion, sont déterminées par le degré de saturation et la longueur de la chaîne carbonée. En effet, les acides gras mono-insaturés ont un point de fusion plus élevé que les acides gras polyinsaturés et les acides gras saturés ont un point de fusion plus élevé que celui des acides gras mono-insaturés ou polyinsaturés. Ainsi, le grand nombre d'acide gras insaturés dans l'huile de tournesol oléique la rend sensible à l'augmentation de la température pendant l'étuvage et cette sensibilité se traduit par la fusion et l'égouttage de l'huile. L'analyse statistique des résultats de perte de poids a confirmé l'effet hautement significatif ($p < 0.001$) de la teneur en matière grasse animale et celui de l'ajout d'huile de tournesol oléique (Tableau 3.6, p 108).

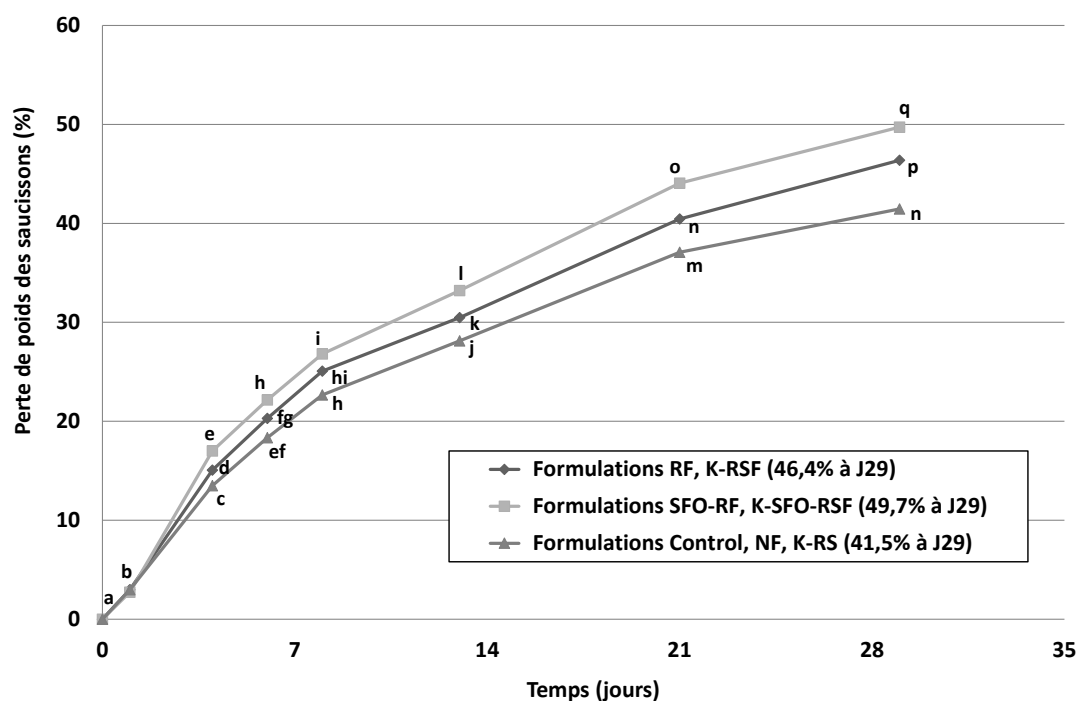


Figure 4.2 Cinétiques de perte de poids mesurées dans les formulations de la seconde série de fabrications listées dans le tableau 3.5 (p 102).

De plus, les résultats obtenus ont montré un effet significatif sur le processus de perte de poids lorsqu'une substitution partielle du sel par le chlorure de potassium a été mise en place (Tableau 3.6, p 108). D'une manière générale, les formulations élaborées avec du KCl montrent une cinétique de perte de poids sensiblement plus rapide, sûrement à cause du fait que le NaCl possède une capacité de rétention d'eau plus élevée. Ces résultats sont en accord avec ceux de Gelabert, Gou, Guerrero, et Arnau (2003) et Guardia *et al.* (2008). Enfin, aucun effet statistiquement significatif de l'aromatization et des interactions teneur en sel-teneur en matière grasse animale et teneur en sel-teneur en huile de tournesol oléique n'a été trouvé.

La figure 4.3 montre une comparaison des cinétiques de pertes de poids mesurées dans le cas des deux formulations 'contrôle', de la formulation 'S5' (1^{ère} série de fabrication) dans laquelle une forte réduction directe combinée en sel (-30%) et en matière grasse animale (-55%) a été faite, et dans le cas de la formulation 'K-SFO-RSF' (2^{de} série de fabrication) dans laquelle une forte substitution partielle combinée en sel (-30%) et en matière grasse animale (-55%) a été effectuée.

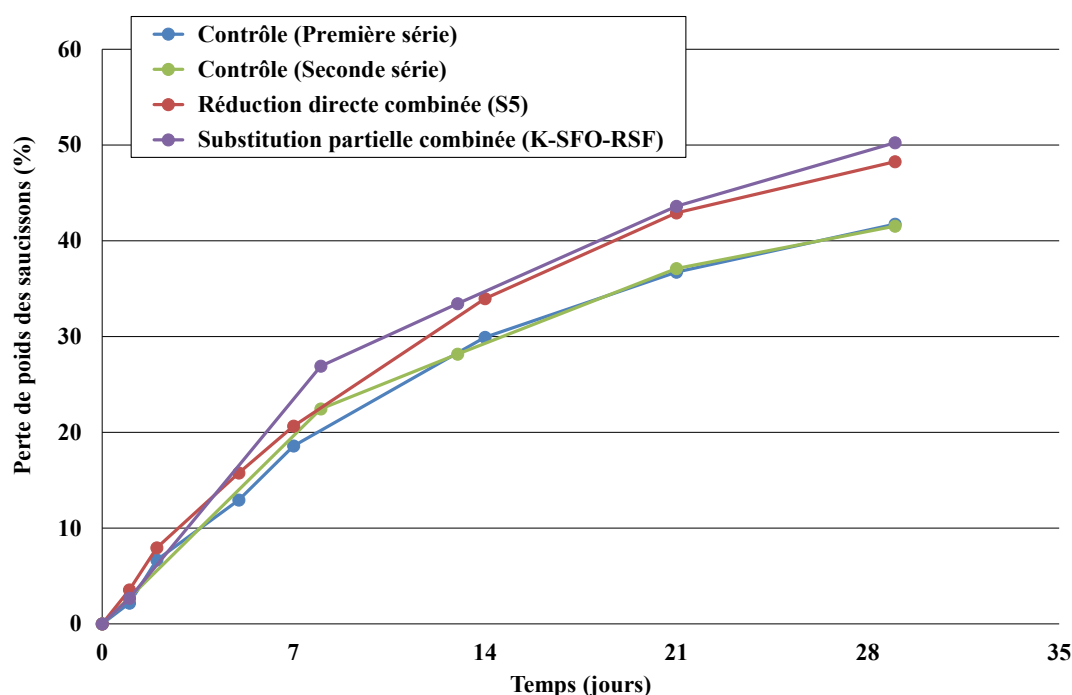


Figure 4.3 Cinétiques de perte de poids mesurées dans les formulations 'contrôle' des deux séries de fabrication, dans la formulation combinant réduction directe en matière grasse animale et en sel (formulation 'S5') et dans celle combinant substitution partielle de la matière grasse animale et du sel par, respectivement, de l'huile de tournesol oléique et du chlorure de potassium (formulation 'K-SFO-RSF').

L'analyse de la figure 4.3 montre clairement une bonne reproductibilité entre les pertes de poids mesurées dans le cas des formulations 'contrôle' des deux fabrications. Cette figure montre également que la réduction directe combinée (formulation 'S5') et la substitution partielle combinée (formulation 'K-SFO-RSF') aboutissent à des pertes de poids semblables, mais plus élevées que celles des formulations 'contrôle'.

4.3.1.2. Activité de l'eau

De manière identique à ce qui a été observé lors la première série de fabrication de saucissons secs, une diminution de l' a_w a été mise en évidence au cours de l'étuvage et du séchage des différentes formulations de saucissons secs de cette seconde série. Cette diminution de l' a_w s'explique par une diminution de la teneur en eau des saucissons et par une concentration du sel dans la matrice du produit.

L'analyse des résultats de mesure des valeurs d' a_w des saucissons (Figure 4.4) montre que, dès les premiers jours d'étuvage et jusqu'à la fin du séchage, les formulations préparées avec de fortes teneurs en sodium et en matière grasse animale (formulations 'contrôle' et 'NF') conduisent aux valeurs d' a_w les plus faibles, confirmant de nouveau que l'effet dépresseur sur l' a_w du NaCl est supérieur à celui du KCl.

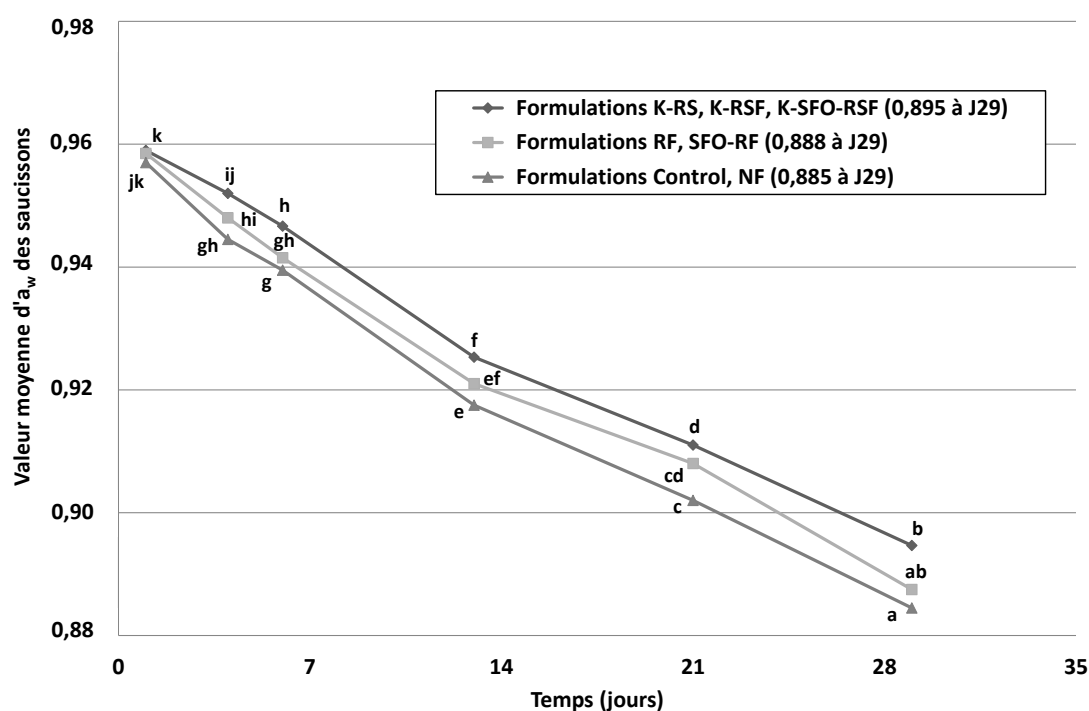


Figure 4.4 Cinétiques d' a_w mesurées dans les formulations de la seconde série de fabrications listées dans le tableau 3.5 (p 102).

Les formulations réduites en matière grasse animale conduisent à des valeurs d' a_w plus élevées. Cela peut être expliqué par le fait que dans ces formulations, une dilution du sel dans la partie maigre est survenue. Néanmoins, à la fin du séchage, toutes les valeurs moyennes d' a_w étaient inférieures à la valeur seuil de croissance de *Listeria monocytogenes* ($< 0,92$) (Ingham *et al.*, 2004). Les analyses statistiques effectuées (Tableau 3.6, p 108) ont révélé que l' a_w des saucissons était uniquement affectée de manière hautement significative que par le facteur substitution du sel ($p < 0.001$).

La figure 4.5 montre une comparaison des cinétiques d' a_w mesurées dans le cas des deux formulations 'contrôle', de la formulation 'S5' (1^{ère} série de fabrication) dans laquelle une forte réduction directe combinée en sel et en matière grasse animale a été faite, et de la formulation 'K-SFO-RSF' (2^{nde} série de fabrication) dans laquelle une forte substitution partielle combinée en sel et en matière grasse animale a été effectuée.

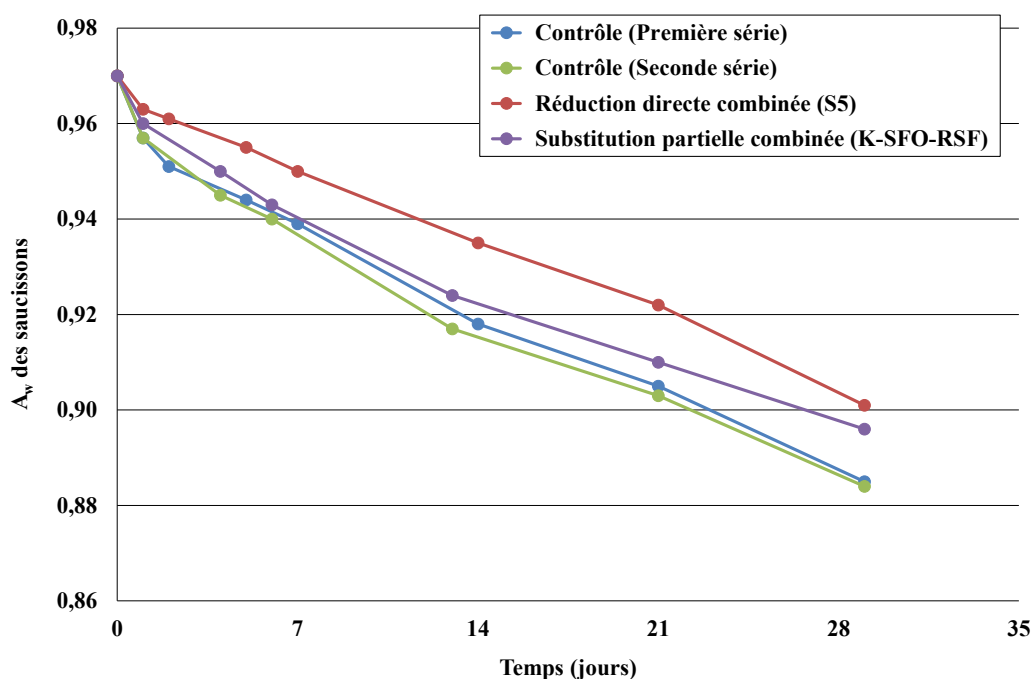


Figure 4.5 Cinétiques d' a_w mesurées dans les formulations 'contrôle' des deux séries de fabrication, dans la formulation combinant réduction directe en matière grasse animale et en sel (formulation 'S5') et dans celle combinant substitution partielle de la matière grasse animale et du sel par, respectivement, de l'huile de tournesol oléique et du chlorure de potassium (formulation 'K-SFO-RSF').

Cette comparaison met clairement en évidence une bonne reproductibilité des mesures d' a_w au niveau des formulations 'contrôle' des deux fabrications. Elle montre également qu'une substitution partielle combinée du NaCl par du KCl et de la matière grasse animale par de l'huile

de tournesol oléique permet d'obtenir des valeurs d' a_w proches de celles des formulations 'contrôle', notamment dans les toutes premières semaines du procédé, à la différence de la formulation 'S5' correspondant à la réduction directe combinée. La substitution partielle a donc, en quelques sortes, corrigé les défauts en termes d'évolution d' a_w générés par la réduction directe.

4.3.1.3. Le pH

Toutes les formulations de la seconde série de fabrication (à l'exception de la formulation 'NF') ont montré une évolution normale du pH, avec une diminution d'environ une unité pH au cours de la première semaine du procédé de fabrication (Figure 4.6), qui résulte de l'intense acidification due à l'action des bactéries lactiques ajoutées avec les sucres lors de la préparation des mêlées. Ce résultat montre que les substitutions partielles du NaCl par du KCl et de la matière grasse animale par de l'huile de tournesol oléique n'affectent pas les processus fermentaires.

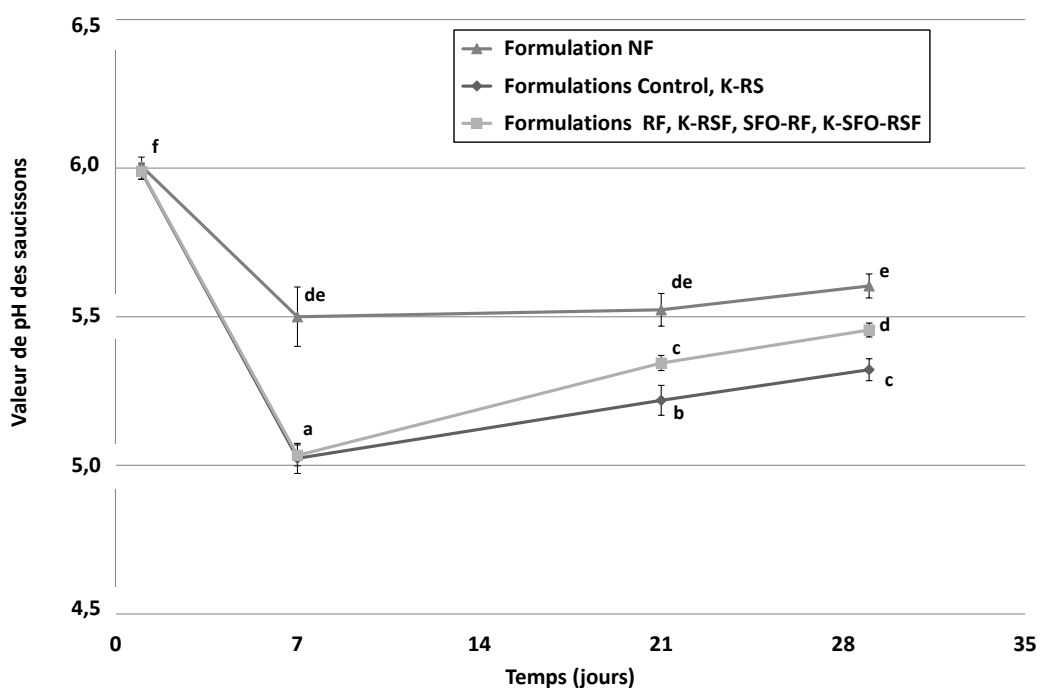


Figure 4.6 Cinétiques de pH mesurées dans les formulations de la seconde série de fabrications listées dans le tableau 3.5 (p. 102).

En revanche, l'évolution du pH de la formulation NF sans aromatisation ajoutée (ni ail, ni poivre) est totalement anormale pour des saucissons fermentés, avec une phase d'acidification insuffisante au cours de la première semaine (pH atteignant 5,5 au bout du 7^{ème} jour). Cette valeur de pH relativement élevée, à la fin de la phase de fermentation, peut être préjudiciable

quant à la conservation et la sécurité microbiologique du produit, puisque la fermentation et la chute du pH constituent des barrières contre la prolifération des microorganismes d'altération ou pathogènes indésirables. Il apparaît donc que l'action des bactéries lactiques a été gravement perturbée par le manque d'aromatisation. Ce résultat peut être expliqué par le fait que la cuticule des grains de poivre noir contient du manganèse, qui est connu pour être un activateur des enzymes produites par les bactéries lactiques et impliquées dans la fermentation (Coventry & Hickey, 1993).

Après la phase de fermentation et au-delà du 7^{ème} jour et jusqu'à la fin du séchage, une ré-augmentation du pH a été constatée (Figure 4.6), qui peut être expliquée par une série de phénomènes comme une forte diminution de l'acidification due à l'épuisement des sucres, la transformation de l'acide lactique en d'autres substances chimiques (Flores *et al.*, 2004) et/ou la production de molécules alcalines issues de la protéolyse (Ordóñez *et al.*, 1999). Au-delà du 7^{ème} jour, des différences ont été observées relativement aux différentes formulations, avec des valeurs de pH plus élevées dans le cas des formulations réduites en matière grasse, contenant ou non de l'huile de tournesol. Cela peut résulter de phénomènes protéolytiques plus forts et de processus lipolytiques plus faibles dans ces produits allégés en matière grasse. Les analyses statistiques ont révélé que les valeurs finales de pH étaient uniquement affectées de manière significative que par deux facteurs : l'aromatisation et la teneur en matière grasse animale (Tableau 3.6, p 108). En revanche, la substitution partielle du NaCl par le KCl, l'incorporation d'huile de tournesol oléique et les interactions teneur en sel-teneur en matière grasse animale et teneur en sel-teneur en huile de tournesol n'ont eu aucun effet significatif.

La figure 4.7, qui montre une comparaison des cinétiques de pH pour 5 formulations de saucissons secs (les deux formulations 'contrôle', la formulation 'S5', la formulation 'K-SFO-RSF' et aussi la formulation sans aromatisation 'NF'), met clairement en évidence les défauts d'acidification obtenus dans la formulation non aromatisée, ainsi que de légères différences entre les deux formulations 'contrôle'. Cette figure montre aussi qu'une substitution partielle combinée du NaCl par le KCl et de la matière grasse animale par l'huile de tournesol oléique aboutit à un niveau de fermentation acceptable, mais à des valeurs de pH finales relativement élevées par rapport à celles des deux formulations 'contrôle', à la différence d'une réduction directe combinée (formulation 'S5') qui conduit à des valeurs de pH légèrement plus faibles. Cependant, les valeurs finales de ces quatre formulations sont tout à fait acceptables car elles correspondent aux valeurs de pH classiquement mesurées dans des saucissons secs fermentés (Di Cagno *et al.*, 2008).

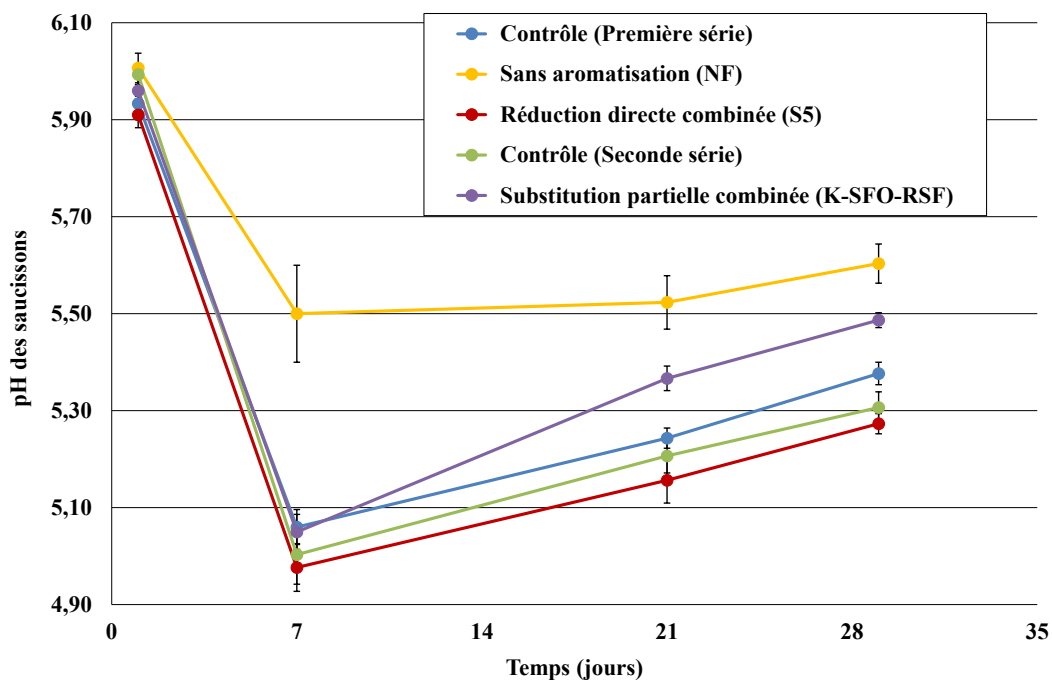


Figure 4.7 Cinétiques de pH mesurées dans les formulations ‘contrôle’ des deux séries de fabrication, dans la formulation combinant réduction directe en matière grasse animale et en sel (formulation ‘S5’), dans celle combinant substitution partielle de la matière grasse animale et du sel par, respectivement, de l’huile de tournesol oléique et du chlorure de potassium (formulation ‘K-SFO-RSF’) et dans celle sans aromatisation (‘NF’, sans ail ni poivre).

4.3.2. Effet sur les réactions biochimiques

4.3.2.1. Protéolyse

L’exploitation des résultats des dynamiques d’évolution de la protéolyse au cours de la fabrication des différentes formulations de la seconde série de saucissons secs a montré une évolution très similaire à celle qui a été observée pour la première série de fabrication (Figure 3.9, p 110), à savoir, une forte augmentation de l’IP dans les premiers jours, suivie par un ralentissement de l’activité protéolytique après la phase de fermentation et une légère ré-diminution des IP pendant la dernière semaine de séchage. L’analyse statistique des résultats de protéolyse obtenus dans cette seconde série (Tableau 3.6, p 108) a mis en évidence que les valeurs d’IP étaient fortement affectées par le temps et par la substitution partielle du NaCl par le KCl ($p < 0,001$), mais pas affectées par l’aromatisation, la teneur en matière grasse animale et par les interactions teneur en sel-teneur en matière grasse animale et teneur en sel-teneur en huile de tournesol oléique ($p > 0,05$). Les résultats obtenus sont tout à fait en accord avec ceux

de Corral *et al.* (2013), Ibañez *et al.* (1997) et Olivares *et al.* (2011) qui ont mis en évidence des activités protéolytiques accrues dans des saucissons ses allégés en sel et dans des produits carnés séchés, partiellement salés avec du chlorure de potassium.

La comparaison entre les cinétiques de protéolyse correspondant aux formulations ‘contrôle’, réduction directe combinée (‘S5’) et substitution partielle combinée (‘K-SFO-RSF’) présentées sur la figure 4.8 met clairement en évidence l’efficacité d’une substitution partielle combinée pour atteindre des niveaux de protéolyse équivalents à ceux des formulations ‘contrôle’, à la différence d’une réduction directe combinée qui intensifie le phénomène de protéolyse, ce qui peut conduire au final à des défauts de texture.

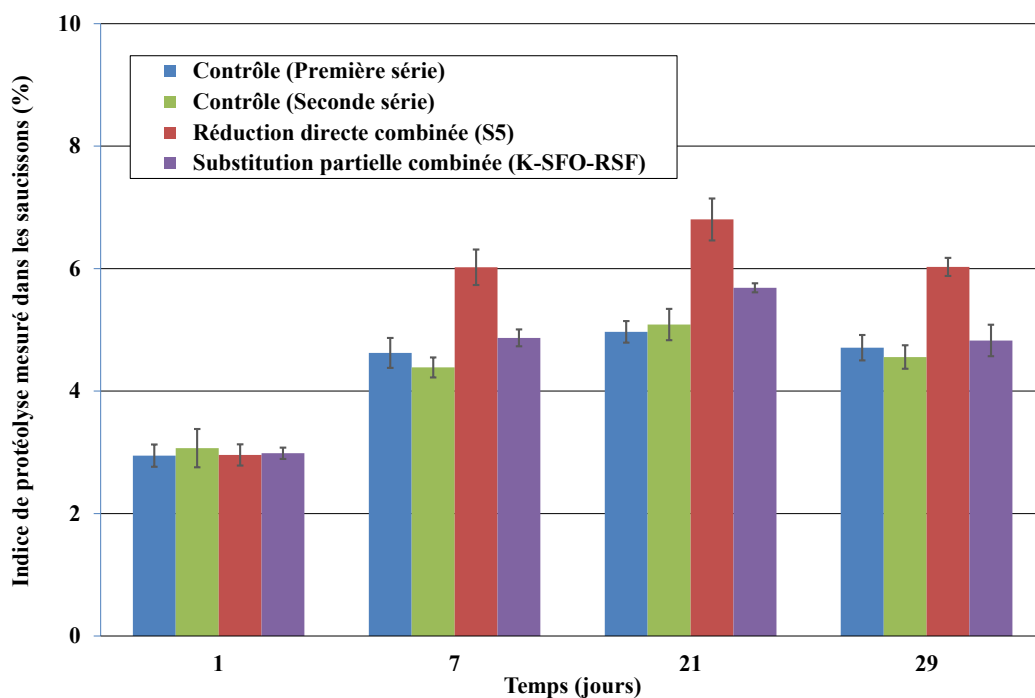


Figure 4.8 Cinétiques de protéolyse (indice de protéolyse, IP) mesurées dans les formulations ‘contrôle’ des deux séries de fabrication, dans la formulation combinant réduction directe en matière grasse animale et en sel (formulation ‘S5’) et dans celle combinant substitution partielle de la matière grasse animale et du sel par, respectivement, de l’huile de tournesol oléique et du chlorure de potassium (formulation ‘K-SFO-RSF’).

4.3.2.2. Lipolyse

L’effet de l’aromatisation et d’une substitution partielle combinée du sel par le chlorure de potassium et de la matière grasse animale par de l’huile de tournesol oléique sur la dégradation enzymatique des lipides a été étudié. Les résultats ont mis en évidence que le taux de lipolyse était très significativement affecté par la teneur en matière grasse animale et par la

substitution partielle du sel par le KCl ($p < 0.001$) (Figure 3.10, p 112 et Tableau 3.6, p 108) et non pas par l'aromatisation, l'ajout d'huile de tournesol et les deux interactions investiguées. Ces résultats concordent avec ceux rapportés par Olivares *et al.* (2011) et Soyer *et al.* (2005).

La comparaison entre les deux stratégies de réduction (réduction directe combinée et substitution partielle combinée) indique que, contrairement à la réduction directe combinée qui freine les processus lipolytiques, procéder à une substitution partielle combinée permet d'obtenir des niveaux de lipolyse identiques à ceux mesurés dans les formulations 'contrôle' (Figure 4.9).

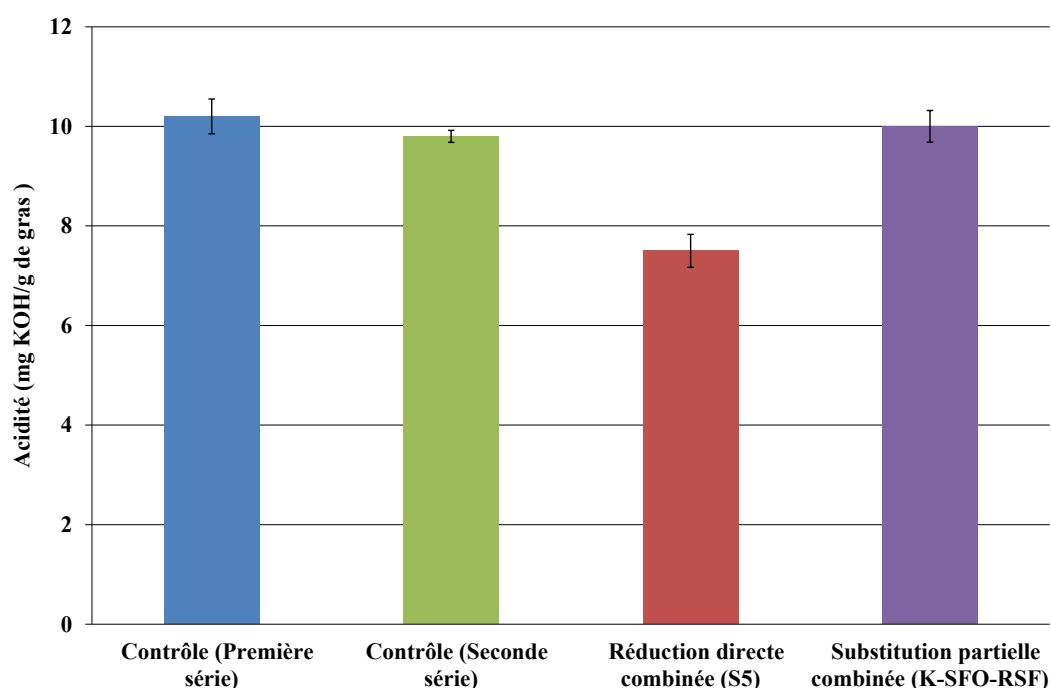


Figure 4.9 Taux de lipolyse mesurés dans les formulations 'contrôle' des deux séries de fabrication, dans la formulation combinant réduction directe en matière grasse animale et en sel (formulation 'S5') et dans celle combinant substitution partielle de la matière grasse animale et du sel par, respectivement, de l'huile de tournesol oléique et du chlorure de potassium (formulation 'K-SFO-RSF').

4.3.2.3. Oxydations lipidique et protéique

Les niveaux d'oxydations lipidique et protéique ont été également étudiés dans les différentes formulations de saucissons secs de cette seconde série de fabrication.

a. Oxydation lipidique

Les résultats obtenus ont montré globalement que le taux d'oxydation lipidique augmentait pour toutes les formulations au fur et à mesure du séchage (Figure 3.11, p 113). Cependant, des différences ont été observées entre les différentes formulations. Les taux d'oxydation lipidique les plus élevés ont été détectés dans les formulations riches en matière grasse animale, ainsi que dans les formulations contenant de l'huile de tournesol oléique. Ce résultat peut s'expliquer par la richesse de ces formulations en acides gras mono et polyinsaturés qui sont beaucoup plus sensibles aux phénomènes oxydatifs que les acides gras saturés. D'autre part, aucune différence n'a été observée entre la formulation 'contrôle' et la formulation sans aromatisation ('NF'), ce qui montre que l'aromatisation n'est pas impliquée dans les mécanismes oxydatifs. De la même manière, la substitution du NaCl par le KCl, à hauteur de 30%, n'a pas montré d'effet significatif sur les évolutions oxydatives, contrairement aux résultats de Corral *et al.* (2013), de Flores *et al.* (2005) et de Zanardi *et al.* (2010), qui ont observé une augmentation significative de l'oxydation des lipides dans des saucissons secs réduits en sodium.

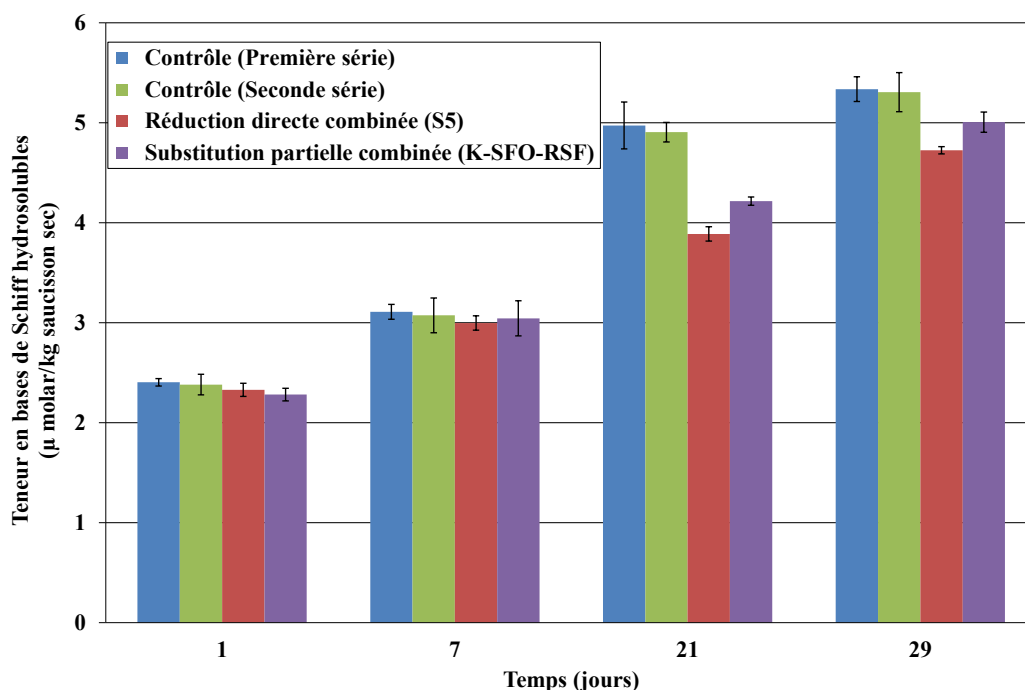


Figure 4.10 Cinétiques d'oxydation lipidique mesurées dans les formulations 'contrôle' des deux séries de fabrication, dans la formulation combinant réduction directe en matière grasse animale et en sel (formulation 'S5') et dans celle combinant substitution partielle de la matière grasse animale et du sel par, respectivement, de l'huile de tournesol oléique et du chlorure de potassium (formulation 'K-SFO-RSF').

L'incorporation de 3% d'huile de tournesol oléique lors de la fabrication de saucissons secs avait pour but d'enrichir le produit en acides gras mono-insaturés bénéfiques pour la santé humaine et de réduire son taux d'acides gras saturés néfastes pour la santé, tout en permettant une oxydation lipidique (et donc une production aromatique) suffisante. Selon la figure 4.10, cette stratégie de réduction partielle combinée semble être efficace puisque la comparaison des résultats avec la stratégie de réduction directe combinée montre clairement que, contrairement à la réduction directe, l'incorporation d'huile de tournesol oléique permet d'aboutir à des niveaux d'oxydation lipidique proches de ceux mesurés dans les saucissons conventionnels préparés avec de fortes teneurs en sodium et en matière grasse animale (formulations 'contrôle').

b. Oxydation protéique

L'interprétation des données mesurées d'oxydation protéique indique, comme lors de la première série de fabrication de saucissons secs, que l'oxydation des protéines semble se produire rapidement, dès la préparation des méléés et sans intensification ultérieure (Figure 3.12, p 115).

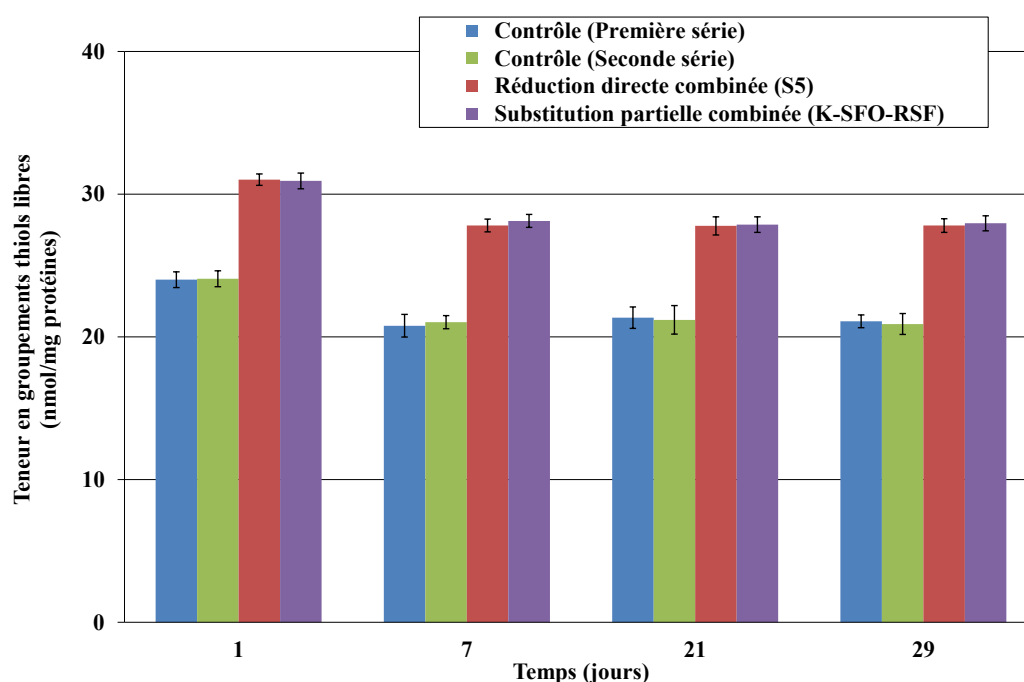


Figure 4.11 Cinétiques d'oxydation protéique mesurées dans les formulations 'contrôle' des deux séries de fabrication, dans la formulation combinant réduction directe en matière grasse animale et en sel (formulation 'S5') et dans celle combinant substitution partielle de la matière grasse animale et du sel par, respectivement, de l'huile de tournesol oléique et du chlorure de potassium (formulation 'K-SFO-RSF').

De plus, seules les teneurs en matière grasse animale et en huile de tournesol oléique affectent très significativement les modifications chimiques des protéines (Tableau 3.6, p 108).

Enfin, comme cela est clairement visible sur la figure 4.11, l'utilisation d'huile de tournesol oléique combinée à une substitution partielle du sel par le KCl n'a pas permis, contrairement à l'oxydation lipidique, d'atténuer les différences en termes de taux d'oxydation protéique observées entre les fabrications de saucissons à teneurs réduites en sodium et en matière grasse animale et les formulations 'contrôle'.

D'une manière générale, les résultats présentés dans les parties 4.3.1 et 4.3.2 ont montré que des saucissons secs aux qualités nutritionnelles améliorées pourraient être fabriqués en combinant l'utilisation de 3% d'huile de tournesol oléique à la place de la bardière de porc et celle du KCl comme substitut partiel du NaCl, sans que cela ne conduise à des évolutions inacceptables sur le plan physicochimique et biochimique. Ces deux technologies pourraient donc être mises en place pour la fabrication de saucissons secs à teneurs réduites en sodium et en acides gras saturés. Nous avons également montré le rôle crucial joué par l'aromatisation par le poivre noir sur le bon déroulement du processus de fermentation.

Globalement, les nouvelles formulations de saucissons secs se sont traduites par des pertes de poids, des valeurs a_w et des indices de protéolyse légèrement plus élevés, un niveau d'oxydation protéique inférieur, et par des taux similaires de lipolyse et d'oxydation lipidique. Toutefois, afin de vérifier si ces légères modifications n'ont pas généré de défauts rédhibitoires sur le plan sensoriel, il était très important de procéder à une analyse de la qualité de ces différentes formulations de saucissons secs au moyen de mesures instrumentales de texture et de couleur et aussi, par l'intermédiaire d'une dégustation de ces produits par un jury de consommateurs.

4.3.3. Effet sur les mesures instrumentales de qualité

4.3.3.1. Paramètres de texture

Quatre paramètres de texture ont été déterminés instrumentalement dans la présente étude par TPA, selon le protocole décrit dans la partie 2.5.1 (p 56-58), pour chaque formulation de saucissons secs de la seconde série de fabrication : la dureté, la fragilité, la cohésion et l'élasticité.

Les résultats de texture obtenus et présentés dans le tableau 3.7 (p 119) indiquent que :

- la dureté des échantillons était plus élevée dans les formulations réduites en matière grasse animale que dans les formulations préparées avec une forte teneur en matière grasse, mettant ainsi en évidence un effet très significatif de la teneur en matière grasse animale sur la texture finale des saucissons secs. Gregg, Claus, Hackney et Marriott (1993) ont constaté une forte corrélation ($r = 0,86$) entre la teneur en matière grasse et la dureté dans le cas de saucisses de Bologne, pour lesquelles la littérature rapporte également une forte corrélation négative ($r = -0,86$) entre la dureté et la teneur en eau (Gregg *et al.*, 1993 ; Claus, Hunt et Kastner, 1989).
- l'ajout d'huile végétale a conduit à des saucissons secs présentant une dureté accrue par rapport aux saucissons conventionnels correspondant à la formulation 'contrôle', probablement, soit en raison des fibres de blé utilisées lors de la préparation de l'émulsion contenant l'huile de tournesol oléique, soit en raison de pertes de poids plus élevées observées lors du séchage de ce type de saucissons. Dans la littérature, il a été montré que l'incorporation de céréales, de fruits ou de fibres alimentaires dans des saucissons secs réduits en matière grasse animale aboutissait à des produits présentant des valeurs de dureté et de cohésion, anormalement plus élevées (García *et al.*, 2002).
- la substitution du sel par le KCl n'a que très peu impacté la dureté des saucissons secs.
- ne pas procéder à une aromatisation par l'ail et le poivre a été très préjudiciable quant à la dureté des saucissons secs (dureté mesurée la plus faible), probablement en raison de la sous-acidification détectée à la fin de l'étape de fermentation. En effet, pendant la fermentation, l'acidification lactique et la chute du pH contribuent à la coagulation des protéines myofibrillaires, ce qui conduit à la formation d'un gel protéique qui influe sur le développement de la texture finale des saucissons.
- globalement, la dureté des saucissons a été affectée significativement par 3 facteurs : l'aromatisation, la teneur en matière grasse animale et l'ajout d'huile de tournesol ($p < 0.001$).
- les autres paramètres de texture étudiés, à savoir la cohésion, l'élasticité et la fragilité n'ont été significativement affectés que par un seul facteur, *i.e.* la teneur en matière grasse animale ($p < 0.001$). D'une manière générale, il a été constaté qu'une réduction en matière grasse animale aboutissait à des valeurs de cohésion, d'élasticité et de fragilité légèrement plus élevées. Enfin, la substitution du sel par le KCl et l'utilisation d'huile de tournesol se sont révélées être sans effet sur ces trois paramètres de texture.

4.3.3.2. Mesure de couleur

Les effets sur les paramètres de couleur (système CIE Lab : variation rouge/vert (a^*), variation jaune/bleu (b^*) et variation blanc/noir (L^*)) de l'aromatisation, de la teneur en matière grasse animale et de l'ajout d'huile de tournesol oléique lors de la fabrication de saucissons secs, ont été investigués (Tableau 4.1 et Figure 3.13, p 117). Les résultats obtenus montrent que la teneur en matière grasse animale et l'aromatisation ont des effets très importants sur les valeurs L^* ($p < 0.001$). Logiquement, les formulations riches en matière grasse animale ont conduit à des valeurs L^* relativement plus élevées que celles des formulations à teneur réduite en matière grasse animale. Cela peut être attribué, d'une part, à de plus faibles taux de nitroso-myoglobine (pigment responsable de la couleur de la viande rouge) dans les formulations riches en matière grasse animale, et d'autre part, au fait que les saucissons riches en matière grasse présentent de plus faibles teneurs en eau et ont subi de plus faibles pertes de poids. Toutefois, quelques différences dans les valeurs L^* des 3 formulations riches en matière grasse ont été trouvées, avec notamment une valeur L^* plus faible dans le cas de la formulation 'NF' sans aromatisation. En effet, les additifs et les produits d'aromatisation comme le poivre noir ou le paprika sont couramment ajoutés lors de la préparation des mēlées de viande pour renforcer le développement des attributs sensoriels tels que la couleur. Cette différence de valeur L^* peut être expliquée aussi par le fait que les épices utilisées pour l'aromatisation contiennent naturellement des activateurs de la fermentation qui « boostent » l'activité des ferments ; l'absence d'aromatisation, en limitant le processus d'acidification, peut donc impacter négativement la couleur du produit.

En ce qui concerne la variation rouge/vert (a^*), les valeurs les plus élevées mesurées correspondent aux formulations réduites en matière grasse animale. Cela peut résulter de concentrations en nitroso-myoglobine plus élevées dans les produits à faible teneur en matière grasse, car ces produits contiennent, proportionnellement, une plus grande quantité de viande maigre que les autres formulations. En outre, nous avons constaté que l'aromatisation affectait très significativement les valeurs a^* des saucissons secs ($p < 0,001$). En fait, à faible pH, le nitrite est connu pour se convertir en oxyde nitrique qui est impliqué dans la formation de nitroso-myoglobine. Par conséquent, les valeurs a^* relativement faibles dans la formulation sans aromatisation ('NF') peuvent être expliquées justement par l'absence d'aromatisation qui a limité le processus d'acidification et la chute de pH, et donc en retour la formation de nitroso-myoglobine. Les formulations contenant de l'huile de tournesol oléique ont montré également des valeurs de a^* légèrement plus faibles que celles des formulations réduites en matière grasse

animale et élaborées sans huile de tournesol oléique. Ces résultats sont en bon accord avec les résultats de Bloukas *et al.* (1997) sur l'effet de la substitution de la matière grasse animale par de l'huile d'olive et ceux de Mora-Gallego *et al.* (2014) portant sur le remplacement de bardière de porc par de l'huile de tournesol.

Tableau 4.1 (a) Mesures des paramètres de couleur : variation rouge/vert (a^*), variation jaune/bleu (b^*) et variation blanc/noir (L^*) effectuées sur les produits finis des 7 formulations de la seconde série de fabrication. Les valeurs mesurées correspondent aux moyennes \pm écarts-types déterminés à partir de 15 mesures indépendantes. Les valeurs ne portant exposants similaires diffèrent de façon significative ($p < 0,05$).
(b) Détails de l'analyse de variance. Les facteurs investigués : aromatisation, teneur en matière grasse animale, substitution du sel, teneur en huile de tournesol oléique, et les interactions teneur en matière grasse animale-substitution du sel et teneur en huile de tournesol oléique-substitution du sel. Le niveau de significativité est annoté comme suit : ns ($p > 0,05$), * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$).

(a) Mesure des paramètres de couleur			
Formulations	a^*	b^*	L^*
Contrôle	$9,8 \pm 0,8^a$	$9,7 \pm 1,0^b$	$45,8 \pm 2,5^{bc}$
NF	$9,2 \pm 1,4^a$	$9,6 \pm 0,8^{ab}$	$41,7 \pm 4,8^b$
K-RS	$9,9 \pm 1,1^a$	$9,7 \pm 1,7^b$	$47,2 \pm 1,9^c$
RF	$12,2 \pm 1,3^b$	$8,6 \pm 1,4^a$	$36,0 \pm 5,0^a$
K-RSF	$12,6 \pm 1,5^b$	$8,4 \pm 1,4^a$	$34,2 \pm 4,5^a$
SFO-RF	$11,5 \pm 1,0^{ab}$	$9,6 \pm 1,7^{ab}$	$35,3 \pm 2,3^a$
SFO-K-RSF	$11,9 \pm 1,3^{ab}$	$9,5 \pm 1,3^{ab}$	$34,4 \pm 4,0^a$

(b) Analyse de variance			
Facteurs investigués			
Aromatisation	ns	ns	***
Matière grasse animale	***	***	***
Substitution du sel	ns	ns	ns
Huile de tournesol oléique	***	***	ns
Matière grasse animale x Substitution du sel	ns	ns	ns
Huile de tournesol oléique x Substitution du sel	ns	ns	ns

Concernant la variation jaune/bleu (b^*), cette dernière a été significativement affectée par deux facteurs : la teneur en matière grasse animale et l'ajout d'huile de tournesol oléique. En effet, la couleur du gras de la bardière de porc étant naturellement de couleur blanc-jaunâtre, la

supprimer revient, par conséquent, à diminuer les valeurs b^* . Dans les formulations enrichies en huile de tournesol oléique, les valeurs b^* légèrement plus importantes qui ont été observées sont probablement dues à la richesse de ces formulations en acides gras insaturés, sensibles à l'oxydation, ce qui doit avoir des conséquences sur la couleur du produit.

D'une manière générale, les résultats obtenus dans ce travail ont montré que l'aromatisation, au travers de son effet sur les processus fermentaires et la formation de nitroso-myoglobine, joue un rôle déterminant dans l'établissement des paramètres de couleur au cours de la maturation des saucissons secs. Ces résultats ont aussi montré que la substitution du sel par le KCl, à hauteur de 30%, n'était pas un facteur limitant vis-à-vis de la couleur finale du produit. Par contre, procéder à une réduction de la matière grasse animale et ajouter 3% d'huile de tournesol oléique sont des facteurs qui peuvent légèrement modifier certains paramètres de couleur (*i.e.* les valeurs de a^* et b^*).

4.3.4. Effet de l'aromatisation et d'une substitution partielle combinée sur l'acceptabilité des produits fabriqués par les consommateurs

Afin de s'assurer de la sécurité microbiologique des produits de la seconde série de fabrication avant de procéder à une analyse sensorielle, une analyse microbiologique (recherche de *Listeria monocytogenes* et de *Salmonella spp.*) a été faite par le Laboratoire Vétérinaire et Biologique du Puy-de-Dôme. Toutes les analyses se sont révélées négatives et ont donc confirmé l'absence de dangers microbiologiques dans toutes les formulations de saucissons secs de cette seconde série.

Suite à ces analyses microbiologiques négatives, une analyse sensorielle a été faite par un jury de 29 personnes recrutées au sein du centre INRA de Theix parmi un panel de personnes consommant régulièrement du saucisson sec. Le but était de juger « objectivement » l'acceptabilité des différentes formulations de saucissons secs par ces personnes, sur la base de quatre critères : l'aspect, la texture en bouche, le goût et l'arôme des produits.

Tout d'abord, une classification des juges selon les quatre critères d'acceptabilité a permis de montrer l'existence de 3 types de comportement (Figure 4.12). Ainsi, les juges de la classe 1 ($n = 6/29$) ont noté plus sévèrement les fabrications expérimentales que les juges des classes 2 et 3, qui sont largement majoritaires ($n = 23/29$). Les notations plus faibles de la première classe de juges peuvent être expliquées par le fait qu'il s'agissait sûrement de consommateurs de charcuteries artisanales plutôt de haut de gamme, alors que les fabrications réalisées dans

l'étude correspondaient à des saucissons standards, de consommation courante. Toutefois, en l'absence d'interaction statistique « Juge x Formulation » sur les quatre critères évalués, les différences d'acceptabilité entre les trois classes de juges ont donc été principalement attribuées à une notation plus ou moins sévère de ces juges vis-à-vis des saucissons dégustés. L'absence d'interactions entre les juges a également permis de considérer l'ensemble des juges comme un groupe au comportement homogène et donc, d'analyser ensuite les réponses moyennes du panel de juges pour étudier l'effet des formulations sur les notes d'acceptabilité.

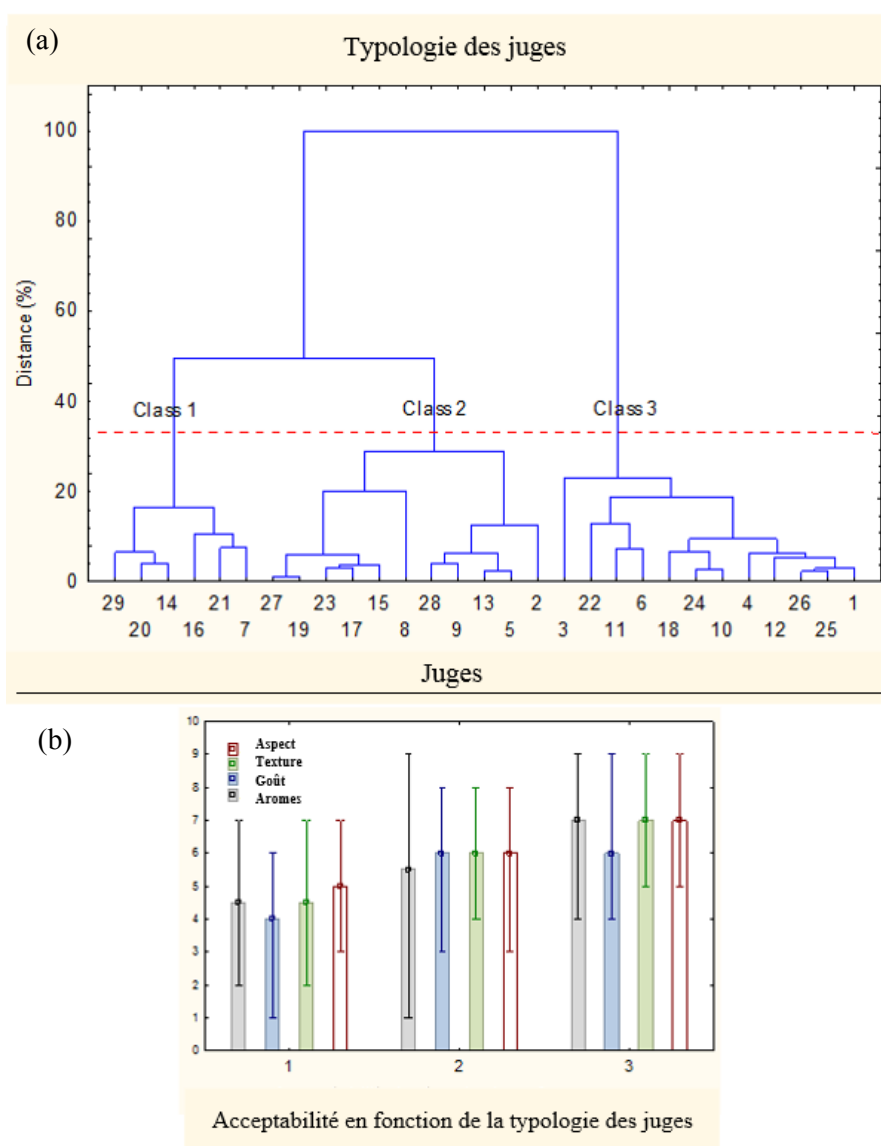


Figure 4.12 (a) Classification hiérarchique des juges en fonction des notes d'acceptabilité des 4 critères sensoriels investigués : l'apparence, la texture en bouche, le goût et l'arôme. Trois classes ont été identifiées au seuil choisi (ligne pointillée rouge). (b) Diagramme des notes d'acceptabilité des différents critères sensoriels en fonction des classes de juges.

La figure 3.14 (p 120) présente les résultats de l'analyse sensorielle en détaillant les notes moyennes données par les juges pour chacune des 7 formulations de saucissons secs de la seconde série de fabrication. L'acceptabilité des saucissons s'est uniquement avérée médiocre pour la formulation sans aromatisation 'NF' (notes d'aspect, de texture, de goût et d'arôme comprises entre 3,7 et 4,7 sur 10) et pour la formulation 'K-RSF', dont l'arôme a été mal noté (note inférieure à 5). Pour toutes les autres formulations, des notes d'acceptabilité moyennes comprises entre 5,5 et 6,5 sur 10, pour la majorité des critères, ont été obtenues. Ces notes d'acceptabilité ne sont pas extraordinaires, tout juste supérieures à la moyenne, sûrement à cause du fait que les produits fabriqués correspondaient à des saucissons dits de « ménage » qui sont des produits de consommation courante, embossés dans des boyaux artificiels et de taille standardisée, ce qui visuellement pré-positionnaient ces saucissons dans une gamme de qualité intermédiaire. Les fabrications les mieux notées sur l'ensemble des critères correspondaient aux formulations 'SFO-RF' et 'K-SFO-RSF', avec des scores d'acceptabilité légèrement supérieurs à la formulation 'Contrôle'.

L'important écart d'acceptabilité de la formulation sans aromatisation 'NF' a plusieurs origines. Concernant l'aspect, cette formulation est apparue moins « affinée » du fait d'une couleur de tranche plus mate et plus sombre que les autres formulations due à l'absence d'arômes. En effet, comme indiqué précédemment, les arômes qui sont souvent des épices contiennent naturellement des activateurs de la fermentation qui « boostent » l'activité des ferments microbiens. L'absence d'aromatisation a donc limité le processus d'acidification, ce qui a eu de graves conséquences sur la texture et l'arôme des saucissons de la formulation 'NF'. Par comparaison avec les autres formulations qui contenaient de l'ail et du poivre, il est à noter que l'aromatisation a permis de rehausser l'acceptabilité globale des saucissons de plus d'un point, et ce quelles que soient les formulations.

Si l'on se réfère aux commentaires émis par les juges lors de la dégustation (Table 4.2), les fabrications contenant 21% de matière grasse animale (formulations 'Contrôle', 'NF' et 'K-RS') ont toutes eu des notes aromatiques « animal, porc, gras » plus élevées, ainsi que des notes « grasses, beurrées » plus marquées que les fabrications allégées ou substituées. En l'absence d'aromatisation, la formulation 'NF' a été très souvent décrite sur le plan aromatique avec des termes du type « jambon sec » et « sans arôme », ce qui a très certainement fortement contribué à diminuer son acceptabilité dans un contexte de dégustation de saucisson sec. De plus, la présence d'un taux conventionnel de matière grasse animale dans cette formulation a

limité le séchage, ce qui, au final, s'est traduit par des problèmes de mauvaise cohésion entre les parties grasses et maigre, que les juges ont très bien perçus.

Tableau 4.2 Principaux commentaires formulés par les 29 juges sur les caractéristiques organoleptiques des 7 formulations de saucissons secs testées par analyse sensorielle.

Formulations	Texture	Goût	Arôme
Contrôle	Texture irrégulière, trop gras, faible cohésion, doux.	Trop gras, trop sale.	Animal, porc, noix, beurre.
NF	Pas assez sec, trop gras, faible cohésion, doux.	Trop gras, fade, trop salé.	Faible odeur, sans arôme, jambon sec, gras, beurre.
K-RS	Caoutchouteux, mauvaise cohésion.	Salé et épicé.	Saveur de porc, aromatisé, agréable.
RF	Trop mixé, pas ferme, jambon sec, texture agréable.	Bien salé et épicé (poivré).	Manque d'arôme de saucisson, trop épicé.
K-RSF	Texture agréable, pas trop gras.	Salé, épicé et goût métallique.	Faible odeur de saucisson, arôme végétal, off-flaveurs.
SFO-RF	Ferme mais agréable, bonne cohésion, caoutchouteux, sec.	Trop salé	Bon arôme, épicé, agréable.
K-SFO-RF	Mauvaise texture, caoutchouteux.	Trop salé et épicé.	Faible arôme de saucisson, fade.

Pour la majorité des fabrications aromatisées et allégées en matière grasse et en sel, les acceptabilités voisines pour les différents critères s'expliquent par une texture agréable, une bonne cohésion, malgré un aspect trop mixé, ferme et parfois un peu caoutchouteux. Malgré les réductions importantes des teneurs en chlorure de sodium, les saucissons sont toujours apparus suffisamment salés, voire même trop salés, même lorsque le NaCl a été partiellement remplacé par du KCl. Dans un contexte de réduction des teneurs en sel, il est probable que l'aromatisation ait joué un rôle d'exhausteur de la perception salée car de très fréquentes associations d'items tels que « trop salé et épicé » ont été faites par les juges dans le cas des formulations à teneur réduite en sel. L'interaction gras-sel est un sujet complexe et tout à fait d'actualité dans les produits alimentaires (Syarifuddin *et al.*, 2016) et il est très difficile de préjuger des qualités sensorielles finales d'un produit dans lequel leurs teneurs respectives auront été modifiées de manière combinée.

Dans le cas de la formulation 'K-RSF', des notes aromatiques « végétales » et des défauts d'arôme ou un arôme « fade » ont été signalés. Pour cette formulation, les résultats sont difficilement interprétables car il semble difficile d'incriminer le KCl, dans la mesure où ce

dernier a été utilisé dans deux autres formulations, pour lesquelles aucun défaut de ce type n'a été perçu par les juges.

D'une manière générale, les résultats de l'analyse sensorielle indiquent clairement que les teneurs en sel et en matière grasse peuvent être largement réduites sans nuire à l'acceptabilité globale du saucisson sec. La plupart des formulations allégées ou substituées dégustées dans cette étude ont présenté des acceptabilités voisines des saucissons de référence non allégés, même si leurs caractéristiques organoleptiques étaient parfois différentes, à condition, bien entendu, que ces formulations aient été aromatisées. Le rôle de l'aromatisation dans la perception sensorielle des saucissons secs est donc crucial car l'aromatisation agit, non seulement, en apportant des molécules aromatiques qui rehaussent l'acceptabilité de l'arôme (surtout grâce à l'ajout d'ail), mais également en activant les processus fermentaires (grâce à l'ajout de poivre) qui agissent également sur l'acceptabilité de la texture.

4.4. Etude des transferts de matière (eau, sel) lors de la fabrication d'un saucisson sec

Dans les produits alimentaires, l'eau existe sous diverses formes. Une petite partie de l'eau est associée à des molécules hydrophiles telles que les protéines et les éléments minéraux, tandis qu'une autre partie est présente sous forme libre et disponible pour les réactions d'altération et la croissance microbologique. Cette disponibilité de l'eau peut être évaluée, en mesurant l'activité de l'eau (a_w) qui est égale au rapport entre la pression partielle de la vapeur d'eau de l'aliment et la pression de la vapeur d'eau pure à la même température. La relation thermodynamique entre l'activité de l'eau et la teneur en eau, à température et pression constante, d'un produit alimentaire, se traduit par une isotherme de sorption. La connaissance, la prédiction et la compréhension de ces courbes de sorption sont très importantes en Génie des procédés alimentaires pour la conception et l'optimisation des équipements de séchage, la conception d'emballages, les prévisions de la qualité, de la stabilité, de la durée de conservation et pour calculer les variations d'humidité qui peuvent survenir pendant le stockage. L' a_w est un facteur essentiel dans la détermination des qualités organoleptiques et de la sécurité microbologique des produits alimentaires. La fabrication des produits de charcuterie de type saucisson sec implique toujours les opérations successives suivantes : hachage de la viande maigre et de la matière grasse animale, mélange avec les additifs, poussage dans des boyaux et séchage. Cette dernière étape est une opération unitaire qui a pour but d'éliminer l'eau par vaporisation et donc réduire l' a_w , ce qui permet d'allonger la durée de vie du produit. La stabilité

microbiologique et chimique du saucisson sec est aussi due à l'ajout d'une grande quantité de chlorure de sodium qui diminue l' a_w .

La maturation et le séchage des saucissons secs dépendent, en grande partie, de la formulation du produit et sont donc étroitement liés aux facteurs intrinsèques, tels que les teneurs en chlorure de sodium, en matière grasse animale, et en sucre, ainsi que le degré de broyage et la nature des ferments ajoutés. En outre, la température, l'humidité et la vitesse de l'air sont des facteurs extrinsèques qui déterminent l'évaporation de l'eau en surface. Le flux d'évaporation d'eau à la surface du produit doit équilibrer la migration d'eau interne jusqu'à la surface du saucisson. En conséquence, un gradient de concentration d'eau interne s'établit. En raison de la structure granulaire du saucisson sec, l'eau se déplace d'une manière complexe et trois mécanismes de transfert principaux sont généralement considérés : (i) un écoulement capillaire de l'eau libre ; (ii) un mouvement de l'eau liée aux molécules hydrophiles, et (iii) une diffusion en phase liquide. Ces mécanismes sont souvent compétitifs (Baldini *et al.*, 2001). Pendant la fabrication du saucisson sec, un faible taux de séchage peut aboutir à un développement excessif et indésirable de moisissures, du fait d'une a_w trop élevée. Inversement, un trop fort taux de séchage peut provoquer la formation d'une croûte sèche en surface qui empêche la perte d'eau, ce qui conduit au final à une texture et une saveur désagréables. Comme observé dans la présente étude, une réduction en sel et/ou en matière grasse animale affecte significativement la perte en poids lors de l'étuvage et du séchage des saucissons secs. Par conséquent, il s'est avéré très utile de caractériser les transferts de matière qui se produisent lors de la fabrication du saucisson sec et spécifiquement lors d'une réduction combinée ; l'objectif étant de trouver des solutions permettant d'éviter l'apparition d'une croûte sèche lors de la fabrication de saucissons secs à teneurs réduites en sel et en matière grasse animale. En complément, les mesures d' a_w , de teneur en eau, en sel et en lipides réalisées dans ce travail ont été mises à profit afin de développer un outil (isotherme de sorption) permettant de prédire l' a_w en fonction de ces teneurs en eau, en sel et en lipides.

4.4.1. Etude des profils de teneurs en eau et en sel lors de la fabrication d'un saucisson sec

Pour conduire cette étude spécifique, deux formulations « extrêmes » de saucissons secs ont été choisies à partir du plan d'expériences établi au début de la thèse, *i.e.* la formulation 'Contrôle' et la formulation 'S4' de la première série de fabrication, correspondant à une réduction directe combinée en matière grasse animale et en sel (8,4% de matière grasse et 2,4% de NaCl).

4.4.1.1. Perte de poids

La Figure 4.13 montre les cinétiques de perte en poids au cours de la fabrication de ces deux formulations de saucissons secs. Une forte réduction en matière grasse animale et en sel a conduit à une perte de poids plus importante. A la fin du séchage effectué *a priori* dans les mêmes conditions, le niveau de perte en poids était de 41,7%, pour la formulation 'Contrôle', et de 49,7%, pour la formulation réduite en matière grasse animale et en sel ('S4'). Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Corral *et al.* (2014) et Liaros *et al.* (2009) qui ont aussi constaté des pertes en poids relativement plus fortes dans le cas de saucissons à teneur réduite en matière grasse animale et/ou en sel.

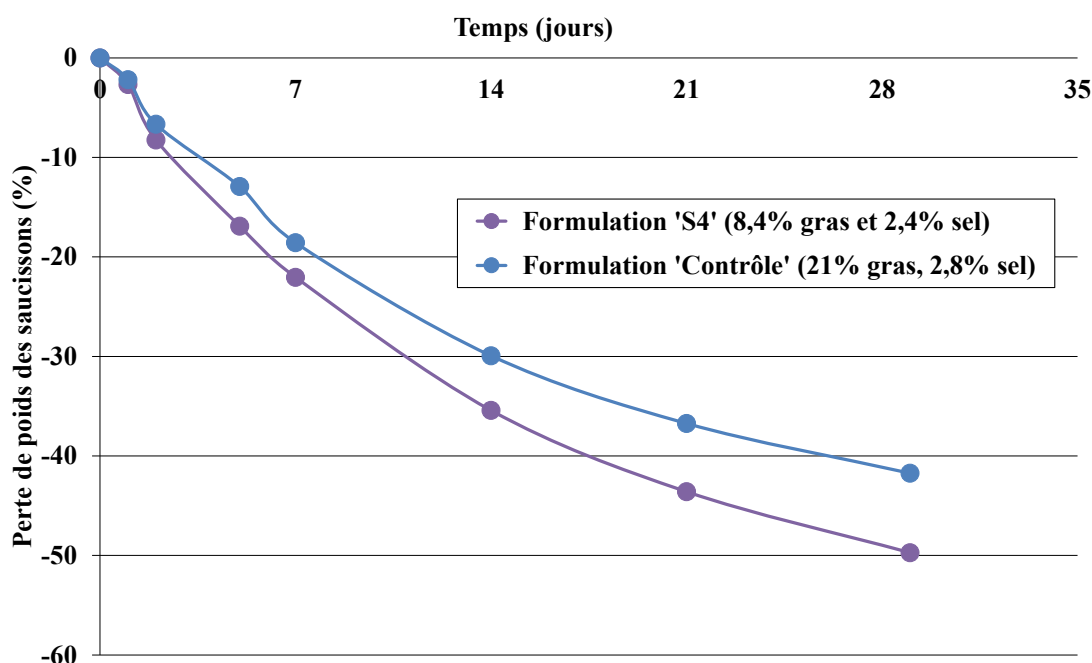


Figure 4.13 Cinétiques de perte en poids mesurées dans le cas de la formulation 'Contrôle' et de la formulation 'S4' à teneurs réduites en sel et en matière grasse animale.

Outre cette perte de poids globale, nous avons procédé à une étude des profils internes de teneurs en eau et en sel dans ces deux formulations de saucissons. Pour ce faire, trois saucissons de chaque formulation ont été prélevés à 4 temps de fabrication différents : J2, J5, J14 et J29. Ensuite, à partir de chaque saucisson, des tranches ont été découpées transversalement, puis chaque tranche a été redécoupée, selon le schéma indiqué sur la figure 4.14, de façon à former des anneaux concentriques correspondant à différentes profondeurs par rapport à la surface du

produit, *i.e.* 1 mm, 2 mm, 3 mm, 6 mm, 10 mm, 15 mm et > 15mm. Pour chaque anneau concentrique, les teneurs en eau et en sel, ainsi que l' a_w ont été mesurées.

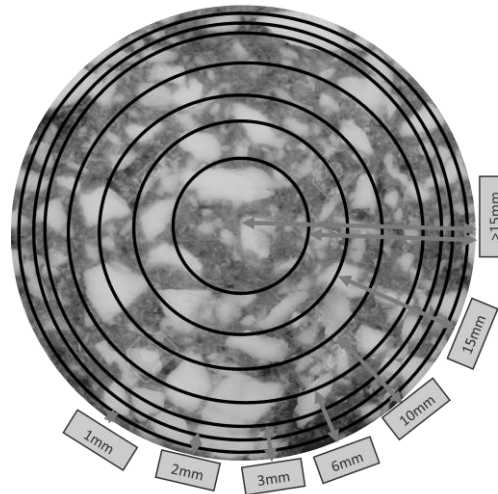


Figure 4.14 Positionnement des prélèvements des échantillons sur les tranches de saucissons pour les différentes mesures chimiques : teneurs en sel et en eau, et mesures d'activité de l'eau afin de tracer ensuite les profils.

Afin de tenir en compte de la position considérée et surtout afin de prendre en compte la rétraction du produit au cours du séchage, les distances (d_0 , d_i et d_n) à partir du cœur du produit ont été calculées selon les équations 4.1 à 4.3 indiquées ci-après, en fonction du rayon maximal et des différents rayons indiqués sur la figure 4.15.

Pour le cœur :
$$d_0 = R_{max} - R_{max} \quad (4.1)$$

Pour une distance intermédiaire :
$$d_i = (R_{max} - R_{i+1}) - (R_i - R_{i+1}) / 2 \quad (4.2)$$

Pour la distance la plus éloignée du cœur :
$$d_n = R_{max} - (R_n / 2) \quad (4.3)$$

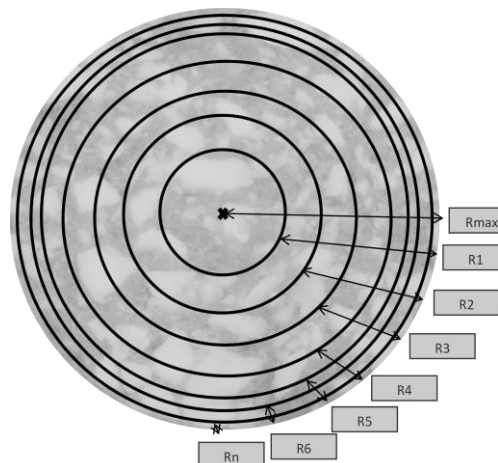


Figure 4.15 Définition des différents rayons sur une tranche de saucisson donnée qui ont servi au calcul des distances d_0 , d_i et d_n utilisées ensuite pour tracer les profils de teneurs en sel et en eau, et les profils d' a_w .

4.4.1.2. Profils de teneur en eau dans les saucissons

La Figure 4.16 montre les profils de teneur en eau mesurés suivant la position considérée dans les saucissons secs, au cours des temps de fabrication : (a) à J2, (b) à J5, (c) à J14 et (d) à J29 (fin du séchage). Les résultats sont exprimés en masse d'eau par kg de la matière sèche (kg eau/kg matière sèche). Afin de tenir compte de la position considérée et prendre en compte la rétraction du produit au cours du séchage, les profils ont été tracés en fonction des distances d_0 , d_i et d_n calculées comme indiqué dans la partie précédente.

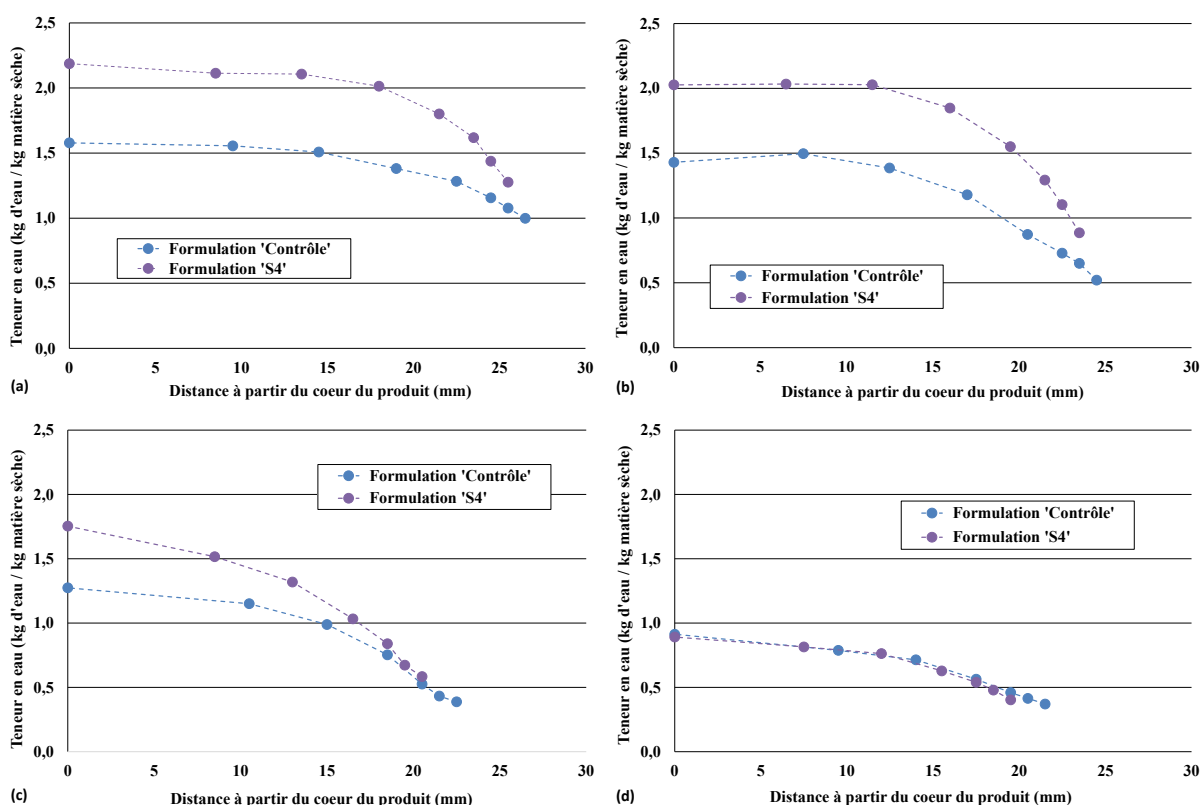


Figure 4.16 Evolution des profils de teneur en eau mesurés en fonction de la distance à partir du centre du produit, pour la formulation 'Contrôle' et la formulation 'S4' réduite en sel et en matière grasse animale, pour 4 temps de fabrication différents : (a) J2, (b) J7, (c) J14 et (d) J29.

D'une manière générale, la teneur en eau est très stable au centre du produit pendant la première semaine de fabrication, alors qu'elle baisse très rapidement dans les 5 premiers millimètres par rapport à la surface. Les profils sont ensuite de moins en moins marqués au fil

du temps, entre la surface et le cœur du produit. A la fin du séchage, il est intéressant de noter que les profils de teneur en eau sont confondus, quelle que soit la formulation initiale du produit (Figure 4.16). De plus, cette figure montre aussi que les teneurs en eau (exprimées en kg d'eau par kg de matière sèche) sont logiquement plus élevées dans la formulation réduite en matière grasse animale et que les profils de teneur en eau, dans les premiers millimètres, sont plus marqués dans le cas de la formulation 'S4' pendant la première semaine de séchage, ce qui conduit à la création d'un gradient fort de teneur en eau.

4.4.1.3. Profils de teneur en sel dans les saucissons

Les profils de teneur en sel ont été tracés en fonction du temps et selon la distance à partir de la surface du saucisson (Figure 4.17). Les résultats ont été exprimés en masse de sel pour 100 kg de matière sèche (kg sel / 100 kg matière sèche). L'analyse de la figure 4.17 permet de mettre en évidence une migration du sel de la surface vers le cœur du produit, au fil du séchage. Cela est expliqué par un phénomène de gradients de concentration qui fait que les corps dissous vont de la solution la plus concentrée vers celle qui est la moins concentrée. Par conséquent, avec le temps, le sel a globalement migré vers le centre du produit, d'où l'augmentation des teneurs en sel au cœur du produit. Ceci explique aussi la diminution de la teneur en sel dans les couches superficielles (1-3 et 3-6 mm) du saucisson sec, phénomène qui est observable notamment sur la figure 4.17b.

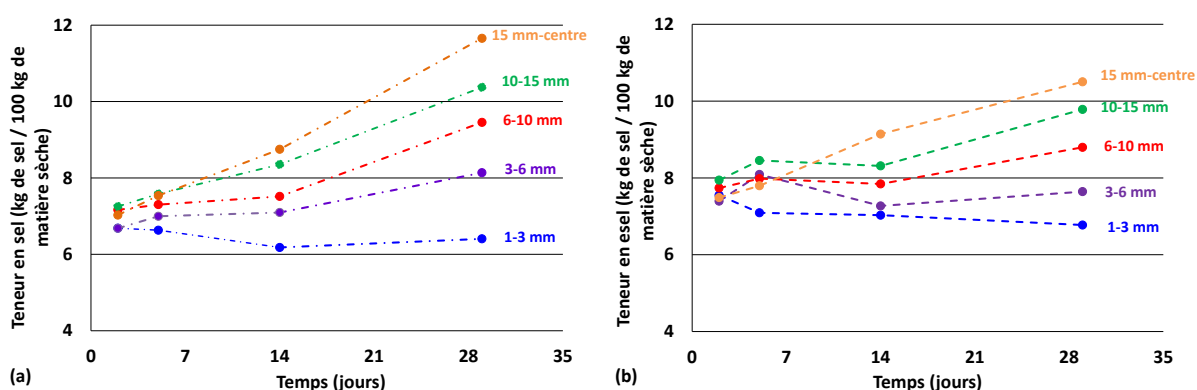


Figure 4.17 Evolution des teneurs en sel au cours du séchage en fonction de la distance à partir de la surface du saucisson, pour (a) : la formulation 'Contrôle' et (b) : la formulation 'S4' réduite en sel et en matière grasse animale.

En outre, ces résultats mettent clairement en évidence des taux de sel plus faibles dans les saucissons réduits en sel (formulation 'S4') où la teneur en sel finale ne dépasse pas les 7 kg/100 kg matière sèche en surface et les 10,5 kg/100 kg matière sèche au centre du produit

(Figure 4.17b). En revanche, dans la formulation ‘Contrôle’ élaborée initialement avec 2,8% MT de NaCl, la teneur en sel varie entre 7 kg/100 kg matière sèche en surface du produit et 12 kg/100 kg matière sèche au centre du saucisson (Figure 4.17a).

4.4.1.4. Profils d' a_w dans les saucissons

La figure 4.18 présente les profils d' a_w mesurés dans les saucissons à différents temps de fabrication, respectivement, dans le cas de la formulation ‘Contrôle’ (Figure 4.18a) et dans le cas de la formulation ‘S4’ à teneurs réduites en sel et en matière grasse (Figure 4.18b). Ces figures indiquent une chute d' a_w plus rapide à la périphérie qu’au centre du saucisson, qui s’explique logiquement par le fait que la déshydratation affecte en premier les couches superficielles du produit. La diminution des valeurs d' a_w au cours du temps au centre du produit s’explique par une diminution de la teneur en eau, mais aussi par l’augmentation de la teneur en sel, comme vu précédemment. En outre, les valeurs d' a_w sont plus élevées dans la formulation ‘S4’ à teneurs réduites en matière grasse et en sel, surtout dans les premiers jours du procédé de fabrication. Cela est dû, à la fois, à des teneurs en eau relativement plus fortes et des teneurs en sel plus faibles dans la formulation ‘S4’ par rapport au contrôle. A partir de J14, ces différences en termes de valeurs d' a_w entre les deux formulations s’atténuent. Enfin, à la fin du séchage, les teneurs en eau des deux formulations sont proches, mais les valeurs d' a_w de la formulation ‘S4’ restent légèrement plus élevées que celles de la formulation ‘Contrôle’, du fait de teneurs en sel légèrement plus faibles (cf. Figure 4.17).

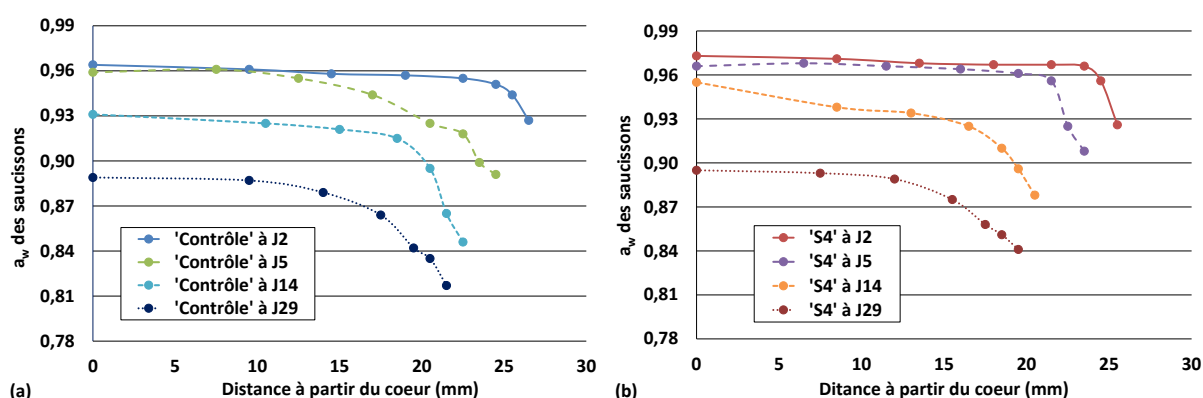


Figure 4.18 Evolution des profils d' a_w mesurés en fonction de la distance à partir du centre du produit, pour (a) la formulation ‘Contrôle’ et (b) la formulation ‘S4’ réduite en sel et en matière grasse animale, pour 4 temps de fabrication différents : J2, J7, J14 et J29.

4.4.2. Effet de la formulation sur la diffusivité de l'eau

Le croûtage qui est préjudiciable à la qualité des saucissons secs s'explique par le fait que le transfert d'eau interne est insuffisant pour compenser l'évaporation de l'eau en surface. La cause principale de ce phénomène est une diffusivité apparente de l'eau trop petite, ce qui peut être le cas pour certaines formulations. Nous avons donc évalué la diffusivité apparente de l'eau (D_{eau}) dans la couronne périphérique des saucissons correspondant aux deux formulations investiguées ('Contrôle' et 'S4'), en utilisant la première loi de Fick :

$$\phi_{eau} = -D_{eau} \times \nabla C_{eau} \quad (4.4)$$

où ϕ_{eau} est la densité du flux d'eau évaporé ($kg/m^2.s$) en surface ; D_{eau} est la diffusivité de l'eau (m^2/s) dans la couronne périphérique et ∇C_{eau} est le gradient de concentration d'eau (kg/m^3) en surface.

4.4.2.1. Estimation du flux d'eau évaporé en surface

Le flux d'eau ϕ_{eau} peut être calculé par la variation du poids du produit au cours du temps par la relation suivante :

$$\phi_{eau} = \frac{dP}{dt} \times \frac{1}{A_t} \quad (\text{où } A_t \text{ représente la surface du saucisson}) \quad (4.5)$$

L'évolution du poids mesurée en fonction du temps (s) a été lissée par un polynôme d'ordre 3, puis en dérivant ce polynôme, le flux d'eau (dP/dt) a pu être calculé à chaque pas de temps t. La surface du saucisson a été calculée à partir de la longueur, L, et du rayon maximal, R_{max} , de chaque saucisson. La figure 4.19 qui donne les cinétiques de densité du flux d'eau évaporé calculées indique que ce flux diminue au cours de l'étuvage et du séchage.

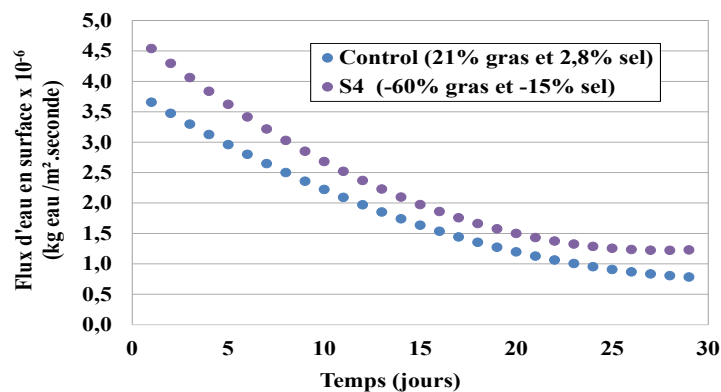


Figure 4.19 Cinétiques de densité flux d'eau évaporé calculées en surface des saucissons de la formulation 'Contrôle' et de la formulation 'E4' à teneurs réduites en sel et en matière grasse.

Cette figure montre également une évaporation d'eau plus importante à la surface du saucisson de la formulation 'S4' à teneurs réduites en sel et en matière grasse, surtout pendant les 5 premiers jours qui correspondent à la phase d'étuvage.

4.4.2.2. Estimation du gradient de concentration d'eau en surface

Le gradient de concentration d'eau en surface (∇C_{eau}) peut être exprimé par la variation de la concentration en eau en fonction de la position, par la relation suivante :

$$\nabla C_{eau} = dC_{eau}/dr \quad \text{Eq. (4.6)}$$

où C_{eau} représente la concentration en eau qui est exprimée en kg eau/m³ de saucisson sec. Cela implique donc de calculer la masse volumique du saucisson sec qui évolue en fonction du temps. Ce calcul est détaillé dans l'Annexe I.

A partir du calcul de la masse volumique du saucisson sec en fonction de la teneur en eau détaillé, on peut déduire C_{eau} de la relation suivante :

$$C_{eau} \text{ (kg eau/m}^3 \text{ produit)} = \rho \times X_{eau}^{MT} \text{ (kg d'eau/ kg matière sèche)} \quad \text{Eq. (4.7)}$$

Pour chaque pas de temps, le profil de teneur en eau a été lissé par un polynôme d'ordre 2 afin de déduire par dérivation le gradient d'eau à la surface (*i.e.* à R_{max}), ainsi que la teneur en eau en surface du produit.

Toutes les variables précédentes étant calculées, les valeurs de diffusivité apparente de l'eau ont été estimées en fonction de la teneur en eau pour les deux formulations 'Contrôle' et 'S4' (Figure 4.20). Les valeurs diminuent avec la réduction des teneurs en eau. Elles étaient respectivement comprises entre $0,21 \cdot 10^{-10}$ et $3,19 \cdot 10^{-10}$ m²/s pour la formulation 'Contrôle' et entre $0,50 \cdot 10^{-10}$ et $1,98 \cdot 10^{-10}$ m²/s quand les teneurs en matière grasse animale et en sel étaient réduites. Cette diminution de la diffusivité apparente de l'eau, conjointement à la diminution de la teneur en eau est en accord avec les résultats de Ruiz-Cabrera *et al.* (2004) dans le cas de muscles de porc non salés. Ces auteurs ont attribué la diminution de la diffusivité de l'eau à la rétraction de la matière sèche. Les valeurs correspondant à la formulation 'S4', dont la composition est la plus proche du tissu musculaire, sont plus faibles que celles trouvées par Ruiz-Cabrera *et al.* (2004), qui étaient comprises entre $0,4 \cdot 10^{-10}$ et $3 \cdot 10^{-10}$ m²/s. Cela peut être dû à la différence de structure entre le saucisson et la viande ; le saucisson étant constitué de grains de tissu musculaire juxtaposés à des grains de tissu gras. De plus, les premières valeurs de diffusivité apparente n'ont pu être estimées dans cette étude qu'après deux jours d'étuvage et à la surface du saucisson qui avait été déjà fortement déshydratée et donc fortement rétractée.

Les estimations relatives à la formulation 'S4' sont finalement en concordance avec les estimations de Harkouss (2014) dans le cas du jambon sec. Nos résultats montrent clairement que la teneur en matière grasse animale influe fortement sur la diffusion apparente de l'eau au cours du séchage. Comme dans le cas du salami (Muñoz et Comaposada, 2011), dont la teneur en matière grasse animale était approximativement égale à celle de la formulation 'Contrôle', la diffusivité apparente de l'eau estimée au 2^{ème} jour est nettement supérieure à celle de la formulation 'S4'. Dans la littérature, au contraire, divers auteurs, dont Rougier (2006) et Okos *et al.* (1992), ont montré que la teneur en lipides pouvait entraîner une diminution de la diffusivité apparente de l'eau. En réalité, la diminution de la diffusivité apparente de l'eau dans un produit peu gras peut être expliquée du fait de la rétraction de la matière protéique, alors que cet effet peut être très atténué quand le produit contient beaucoup de globules de matière grasse.

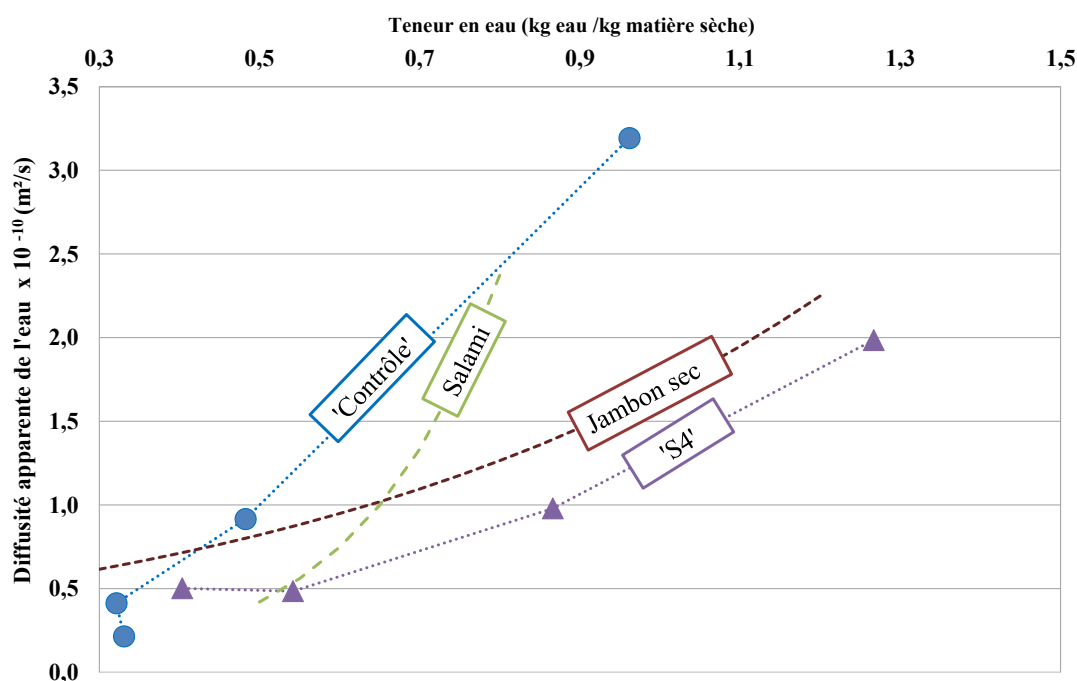


Figure 4.20 Evolution de la diffusivité apparente de l'eau en fonction de la teneur en eau (kg eau/kg matière sèche), respectivement, dans des saucissons correspondant à formulation 'Contrôle', à la formulation 'S4' à teneurs réduites en sel et en matière grasse animale, dans du salami (Muñoz et Comaposada, 2011) et dans du jambon sec (Harkouss, 2014).

La diminution des valeurs de diffusivité apparente de l'eau peut aboutir à la formation d'une croûte sèche empêchant la perte d'eau et aboutissant à une texture et une saveur désagréables. C'est pour cela qu'une réduction en matière grasse animale ou bien une réduction combinée en sel et en matière grasse animale semble critique et doit être accompagnée d'un

changement dans les paramètres du processus de séchage, en particulier dans les premières phases d'étuvage et de séchage.

4.4.3. Construction d'un modèle d'isotherme de sorption pour les saucissons secs

Classiquement, la prédiction de l' a_w dans les produits alimentaires est faite selon deux approches différentes : (1) la première concerne l'établissement de corrélations par régression linéaire simple ou multiple entre l' a_w et la concentration de certains constituants du produit, comme l'azote non protéique, l'azote soluble (Esteban et Marcos, 1989), et des agents dépresseurs de la pression de vapeur dans la phase aqueuse du produit, comme des agents chimiques du type NaCl ou physico-chimiques (Rüegg, 1985) ; (2) la seconde vise à modéliser des courbes de sorption expérimentales par l'estimation des paramètres de modèles théoriques ou empiriques préétablis. Cette dernière méthode conduit à la détermination d'équations mathématiques très bien adaptées au calcul des activités de l'eau.

Dans la présente étude, deux modèles empiriques, comprenant respectivement 3 ou 4 paramètres d'ajustement, ont été testés pour la prédiction de l' a_w dans les saucissons :

- Le modèle de Ferro-Fontan (1982), qui est une équation établie à partir de l'équation différentielle de Clausius-Claypeyron et de la relation empirique entre l'enthalpie isostérique de sorption et de la teneur en eau :

$$\ln\left(\frac{\gamma}{a_w}\right) = \alpha X^{-\beta} \quad \text{où } X \text{ est la teneur en eau} \quad \text{Eq. (4.8)}$$

- Le modèle de Peleg (1993) qui est un modèle linéaire à 4 paramètres, utilisé pour la prédiction des isothermes de sorption de forme sigmoïdale ou non :

$$X = Aa_w^B + Ca_w^D \quad \text{où } X \text{ est la teneur en eau} \quad \text{Eq. (4.9)}$$

Ces modèles correspondent aux isothermes de type III (isothermes de Florry-Huggins) (Figure 4.21).

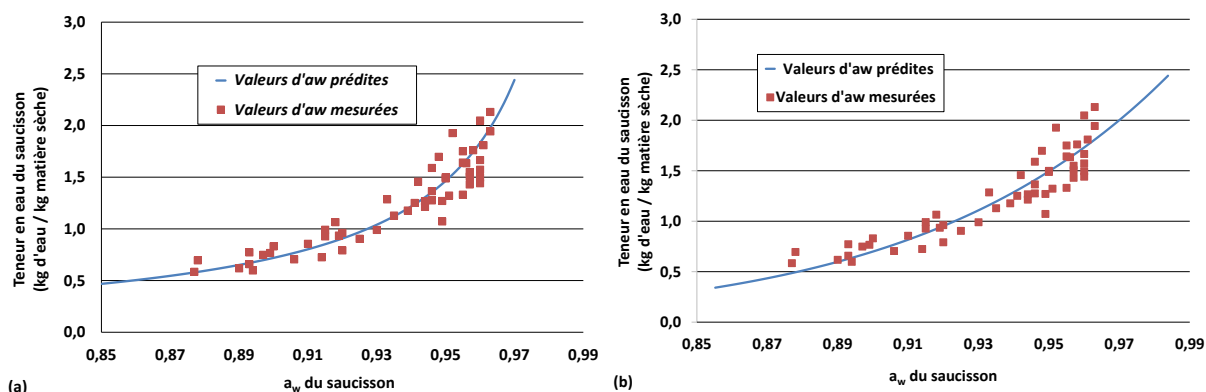


Figure 4.21 Prédiction d’une isotherme de sorption pour le saucisson sec selon un lissage par les modèles de (a) Ferro-Fontan et de (b) Peleg.

Les valeurs des paramètres de ces différents modèles ont été estimées en utilisant toutes les mesures expérimentales d’a_w et de teneurs en eau des saucissons secs et en minimisant l’écart quadratique entre les mesures et les calculs avec le solveur du logiciel Excel. Ainsi, l’a_w des saucissons représentée sur la figure 4.21 peut être prédite avec les paramètres des tableaux 4.3 (modèle de Ferro-Fontan) ou 4.4 (modèle de Peleg).

Tableau 4.3 Valeurs des paramètres des équations du modèle de Ferro-Fontan qui donne l’isotherme de sorption spécifique pour le saucisson sec.

Modèle	Equation	Paramètres	Valeurs des paramètres
Ferro-Fontan	$\ln\left(\frac{Y}{a_w}\right) = \alpha X^{-\beta}$	α	0,076
		β	-1,004
		γ	1,001

Tableau 4.4 Valeurs des paramètres des équations du modèle de Peleg qui donne l’isotherme de sorption spécifique pour le saucisson sec.

Modèle	Equation	Paramètres	Valeurs des paramètres
Peleg	$X = Aa_w^B + Ca_w^D$	A	0,502
		B	11,178
		C	2,567
		D	2,857

La distribution des résidus (Figure 4.22) permet d’évaluer l’adéquation des modèles à représenter les résultats expérimentaux.

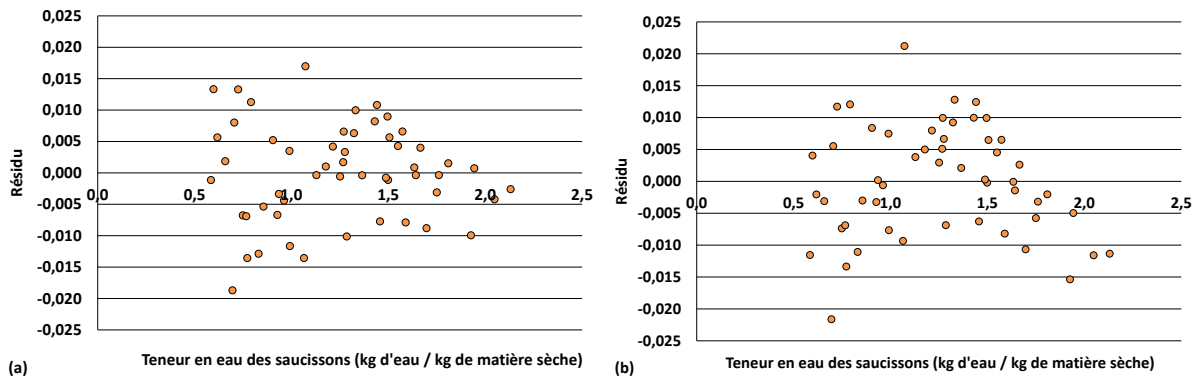


Figure 4.22 Valeurs des résidus ($a_{w,prédite} - a_{w,mesurée}$) calculés pour quantifier la qualité de la prédiction de l' a_w d'un saucisson, selon les modèles (a) de Ferro-Fontan et (b) de Peleg.

La Figure 4.22 montre que, pour les deux modèles testés, la distribution des résidus ne présente pas d'écart systématique (Soysal et Öztekin, 1999). Toutefois, pour une teneur en eau donnée, le résidu varie sur une plage d'environ -0,02 à 0,02, sûrement parce que les deux modèles utilisés ne tiennent pas compte de la teneur en sel, ni de la teneur en matière grasse animale, alors que ces deux composés sont connus pour moduler l' a_w .

Dans un cas similaire correspondant à des gélatines grasses salées, Rougier *et al.* (2006) ont utilisé un modèle de Ross pour prédire de façon satisfaisante les isothermes de sorption. Nous avons donc repris ce modèle et essayer de l'adapter au cas du saucisson sec. Le modèle de Ross pour la gélatine était représenté par l'équation suivante :

$$a_{w,mix} = [- 0,4553(X_{NaCl}^{eau})^2 - 0,5242(X_{NaCl}^{eau}) + 0,999] \cdot [\gamma \exp(-\alpha (X_{eau}^{protéine})^{-Rf})] \quad \text{Eq (4.10)}$$

En fait, l' a_w de la gélatine grasse salée ($a_{w,mix}$) correspond au produit de deux a_w :

- une activité de l'eau due à la présence d'une certaine quantité de NaCl dans l'eau de la gélatine, qui est donnée par la relation :

$$[- 0,4553(X_{NaCl}^{eau})^2 - 0,5242(X_{NaCl}^{eau}) + 0,999] \quad \text{Eq. (4.11)}$$

- et une activité de l'eau qui résulte de la présence de protéines dans la gélatine non salée, qui est donnée par :

$$[\gamma \exp (-\alpha (X_{eau}^{protéine})^{-Rf})] \quad \text{Eq. (4.12)}$$

Par conséquent, les teneurs en matières grasses, en sel et en eau mesurées dans les différentes formulations de saucissons secs des deux séries de fabrication, et ce, à différents temps de séchage, ont été utilisées pour calculer la teneur en NaCl en fonction de la teneur en eau (X_{NaCl}^{eau}) et la teneur en eau en fonction de la teneur en protéine ($X_{eau}^{protéine}$). En appliquant

directement le modèle Ross avec les paramètres de l'équation 4.10 identifiés pour un gel de gélatine salée, il a été constaté que les valeurs d' a_w calculées ne se superposaient pas parfaitement avec les valeurs d' a_w mesurées. Cela peut être expliqué par la présence d'additifs ou d'ingrédients autres que le NaCl, qui exerceraient également un effet dépresseur sur l' a_w . Il pourrait s'agir, notamment, des sucres utilisés lors de la fermentation lactique, du nitrite et du sel de nitrate utilisés ou/et du salpêtre ajouté. Les paramètres (α , γ et R_f) du modèle de Ross ont donc été ajustés en utilisant le solveur du logiciel Excel. Finalement, une légère réduction de γ , de 0,993 à 0,991 (Tableau 4.5), a permis d'obtenir une très bonne superposition entre les valeurs d' a_w mesurées et les valeurs d' a_w estimées, comme le montre la figure 4.23.

Tableau 4.5 Valeurs des paramètres calculés rentrant dans les équations des isothermes de désorption de la gélatine et des saucissons secs, selon le modèle de Ross.

	Paramètres	Valeurs des paramètres
Gélatine	α	0,02
	γ	0,993
	R_f	1,96
Saucissons	α	0,02
	γ	0,991
	R_f	1,96

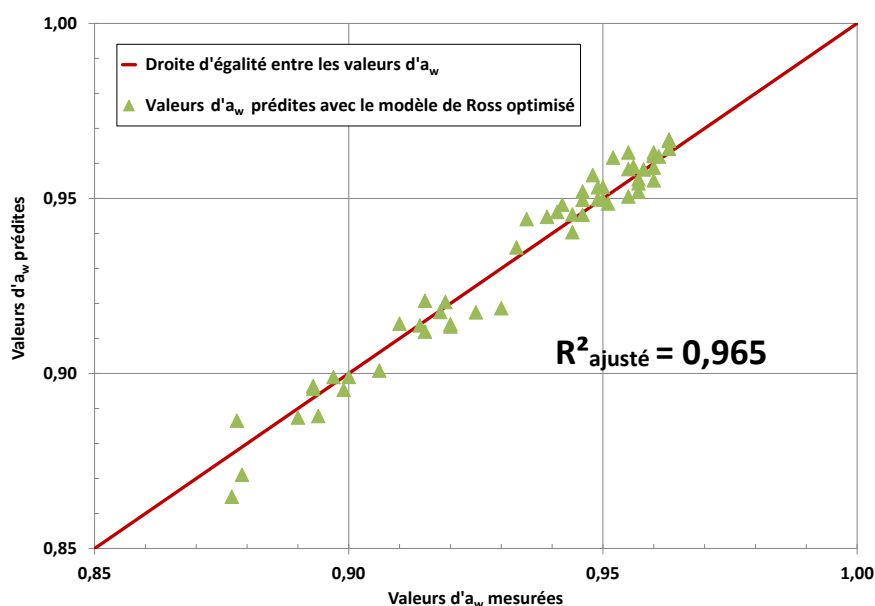


Figure 4.23 Comparaisons des valeurs d'activité de l'eau mesurées et prédites par le modèle de Ross dans le cas d'échantillons de saucissons secs, après ajustement du coefficient γ .

Outre la bonne adéquation entre les valeurs d' a_w prédites et mesurées indiquée sur la figure 4.23, la distribution des résidus ne présente pas de biais particulier en fonction de la teneur en eau. La valeur de la somme des carrés des écarts entre les valeurs d' a_w prédites et mesurées est de l'ordre de 0,2%, ce qui dénote d'une très bonne l'estimation de la valeur de l' a_w pour le saucisson sec au moyen du modèle de Ross modifié.

PRINCIPALES CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

Le saucisson sec est une charcuterie crue, fermentée, étuvée et séchée, dont les propriétés sensorielles (arôme, goût, couleur et texture) découlent de nombreux phénomènes physiques, physicochimiques et biochimiques. Deux paramètres physicochimiques clés que sont le pH et l' a_w gouvernent la fabrication d'un saucisson. En effet, à l'interface air/produit, le développement et l'activité de la flore de surface, et donc une partie de la flaveur du produit, sont conditionnés par l' a_w , dont la valeur dépend des phénomènes physiques de transferts (séchage). A l'intérieur du produit, du fait du séchage en surface, un profil d' a_w s'établit ; conjointement à ce profil, le pH évolue. Globalement, durant la phase d'étuvage, le pH baisse du fait de la fermentation, avant de remonter légèrement lors du séchage en raison d'un ensemble de phénomènes biochimiques. Il existe donc clairement une interaction entre les phénomènes physiques de transferts et certaines réactions biochimiques (fermentation, acidification, protéolyse, lipolyse et oxydations protéique et lipidique) qui conduisent à l'apparition de la flaveur et de l'arôme typique du saucisson sec. Ces réactions biochimiques dépendent fortement des teneurs en eau, en matière grasse animale et en sel, de la température, du pH, et leur déroulement conditionne, en grande partie, les propriétés sensorielles finales du saucisson sec, *i.e.* la texture, l'arôme et la flaveur. L'objectif de cette thèse était d'étudier les effets d'une réduction combinée en sodium et en matière grasse animale sur les évolutions physicochimiques et biochimiques en lien avec la production aromatique, tout au long de la chaîne de fabrication d'un saucisson sec.

Dans le but d'étudier l'effet de réductions directes en sel et/ou en matière grasse animale, huit formulations de saucissons secs avec différentes teneurs en matière grasse animale et en sel ont été fabriquées et préparées selon un plan d'expériences de type Doehlert. Les résultats ont montré que les proportions respectives de maigre et de gras de bardière de porc influençaient les valeurs des teneurs en eau, de telle façon que, pour un procédé de séchage identique, les valeurs de teneur en eau les plus élevées ont été obtenues pour les produits à faible teneur en matière grasse animale. Les résultats ont aussi montré que la perte en poids dépendait fortement des teneurs en sel et en matière grasse animale de chaque formulation de saucisson sec, avec une perte de poids plus élevée dans le cas de saucissons à teneurs réduites en sel et en matière grasse. Les traitements statistiques effectués ont confirmé le fort impact du temps, des teneurs en matière grasse et en sel sur la perte en poids. De la même façon, une diminution progressive de l' a_w a été constatée et a été attribuée à la perte d'eau et à la concentration du sel au cours du séchage. L'étude statistique a montré que les évolutions de l' a_w étaient gouvernées principalement par la teneur en sel, mais aussi par les proportions de viande maigre et de matière

grasse animale, mais pas par l'interaction teneur en sel-teneur en matière grasse animale. Ainsi, des réductions directes combinées en sel et en matière grasse animale lors de la fabrication de saucissons secs peuvent se révéler préjudiciables du point de vue de la sécurité microbiologique, si les produits ne sont pas suffisamment séchés. Concernant l'évolution du pH, les résultats ont montré une dynamique d'évolution de pH classique et indépendante de la formulation et des teneurs en sel et en matière grasse animale, à savoir une forte acidification au cours de la première semaine du procédé de fabrication, suivie d'une ré-augmentation progressive de la valeur du pH. En outre, il a été montré qu'au cours de la fabrication des saucissons, les fractions protéique et lipidique subissaient des dégradations enzymatiques (protéolyse et lipolyse) et des modifications chimiques (oxydations lipidique et protéique). Les réactions enzymatiques ont été significativement affectées par les teneurs en sel et en matière grasse animale et la protéolyse a été amplifiée dans le cas d'une réduction combinée en sel et en matière grasse. Quant aux modifications chimiques, elles sont principalement conditionnées par la teneur en matière grasse animale, dont la réduction limite les taux d'oxydations protéique et lipidique. D'une manière générale, les résultats obtenus pour la première série de fabrication de saucissons ont montré que les réductions directes et combinées en sel et en matière grasse animale, du fait de valeurs d' a_w plus élevées, pouvaient être préjudiciables pour la stabilité microbiologique du produit et le bon déroulement des réactions biochimiques, et par conséquent, pour les attributs sensoriels et l'acceptabilité du produit fini. Pour ces raisons, une réduction combinée des teneurs en sel et/ou en matière grasse animale doit être accompagnée d'une modification des autres ingrédients ou additifs entrant dans la formulation ou/et des paramètres de séchage.

L'identification des composés volatils odorants de saucissons secs de haut de gamme a permis d'identifier les structures de ces molécules et remonter à leurs origines les plus probables. Les résultats obtenus ont indiqué que les deux principales origines de l'arôme des saucissons sont attribuables (i) à la formation des molécules odorantes lors de la dégradation des tissus animaux au cours des processus fermentaires et de séchage et (ii) à l'aromatisation par des substances naturelles. Les résultats ont montré que l'aromatisation par l'ail jouait un rôle clé dans la construction des propriétés aromatiques finales du saucisson sec. Ce rôle important s'explique, à la fois, par les faibles seuils de détection des molécules soufrées et par leurs propriétés aromatiques individuelles intenses. En effet, ces dernières ont présenté des notes « aillées », mais également « de saucisson sec », qui ont fortement conditionné la note finale et l'arôme global des saucissons, très probablement en masquant une part importante des autres composés odorants lors de la dégustation ou du flairage des saucissons. Ce résultat

indique que l'aromatisation par l'ail peut être un levier technologique intéressant pour rehausser, de manière naturelle, l'arôme de saucissons allégés en sel et en matière grasse. L'ail et le poivre sont, d'ailleurs, deux ingrédients déjà très utilisés dans les fabrications françaises de saucissons secs traditionnels, notamment en Auvergne, et leur usage dans les produits allégés ne devrait pas surprendre les consommateurs.

Sur la base de l'ensemble des résultats précédents, sept nouvelles formulations de saucissons ont été fabriquées avec comme objectif d'étudier de manière plus approfondie l'impact de l'aromatisation et l'effet de substitutions partielles combinées sur les évolutions physicochimiques et biochimiques, ainsi que sur les qualités sensorielles du saucisson sec. Pour cela, dans certaines fabrications, le sel a été partiellement substitué par du KCl (à hauteur de 30%) et parfois combiné à un remplacement total de la bardière de porc par 3% d'huile de tournesol oléique préalablement mélangés à 1% de fibre de blé.

De manière similaire à la première série de fabrication, les résultats obtenus pour cette seconde série ont montré que, pour des conditions de séchage identiques, la perte en poids de chaque formulation de saucisson sec dépendait fortement de la composition et des teneurs en sel et en matière grasse. D'une manière générale, la réduction de la matière grasse animale a abouti à une perte en poids significativement plus élevée, surtout lorsque la totalité du gras de bardière de porc a été remplacée par l'huile de tournesol oléique, du fait d'une légère perte d'huile sous forme liquide pendant la phase d'étuvage. Cette perte peut s'expliquer par la présence d'un taux élevé d'acides gras insaturés dans l'huile qui a été utilisée, qui l'a rendu beaucoup moins visqueuse, notamment pendant l'étuvage où la température était relativement élevée (24°C). Nos résultats ont aussi montré que la perte de poids des saucissons était significativement affectée par la substitution partielle du NaCl par le KCl. Cependant, les différences observées dans ce cas ont été relativement faibles par rapport aux différences qui avaient été observées lors d'une réduction directe du NaCl. L'aromatisation et la substitution combinée n'ont pas engendré d'effets majeurs sur les transferts d'eau. En outre, les résultats ont mis en évidence une diminution progressive de l' a_w dès les premiers jours d'étuvage et jusqu'à la fin du séchage, ce qui a permis d'aboutir à des produits stables d'un point de vue microbiologique. Cependant, il a été montré que les formulations qui avaient été préparées avec de fortes teneurs en sodium et en matière grasse animale possédaient les valeurs d' a_w les plus faibles, confirmant, de nouveau, que le NaCl exerce un plus fort effet dépresseur sur l' a_w que le KCl. Toutefois, les résultats ont montré qu'une substitution partielle et combinée du NaCl par le KCl et de la matière grasse animale par l'huile de tournesol oléique pouvait atténuer les

différences d' a_w observées dans le cas d'une réduction directe des teneurs en sel et en matière grasse animale. Concernant l'évolution du pH, le rôle de l'aromatisation, particulièrement celui du poivre noir, s'est avéré crucial sur le bon déroulement de la fermentation et de l'acidification pendant la première semaine, du fait de la présence de manganèse dans la cuticule des grains de poivre noir qui « boosterait » l'activation des ferments lactiques, et par conséquent, l'intensité des processus fermentaires. Ainsi, l'aromatisation par le poivre noir est un levier technologique important pour la conservation et la sécurité microbiologique du produit, vu que la fermentation et la chute du pH constituent des barrières contre la prolifération des bactéries d'altération ou pathogènes. En revanche, la phase de fermentation n'a pas été influencée par les substitutions partielles du NaCl par le KCl et du gras animal par l'huile de tournesol. D'une manière générale, la substitution combinée du sel et du gras, respectivement, par le KCl et l'huile de tournesol oléique, ainsi que l'aromatisation (ajout d'ail et poivre noir), se sont révélées être des stratégies intéressantes pour améliorer et atténuer les défauts physicochimiques observés dans le cas d'une réduction combinée directe.

Concernant les évolutions biochimiques, des augmentations des taux de protéolyse, de lipolyse et d'oxydations lipidique et protéique ont été constatées, tout au long du procédé de fabrication des différentes formulations de saucissons. Les résultats ont montré que les réactions enzymatiques étaient significativement affectées, aussi bien par la substitution du sel que par la réduction ou la substitution de la matière grasse animale. En outre, les résultats ont montré que les phénomènes d'oxydations lipidique et protéique étaient globalement gouvernés par la teneur en matière grasse animale. De plus, le remplacement de la bardière de porc par l'huile de tournesol oléique s'est avéré être une bonne stratégie pour atteindre des taux d'oxydations lipidique et protéique proches de ceux obtenus dans le cas de saucissons conventionnels. Comme pour l'évolution des paramètres physicochimiques, les substitutions partielles combinées du NaCl et du gras animal par le KCl et l'huile de tournesol oléique ont permis globalement de corriger les différences biochimiques décelées lors d'une réduction directe.

La suite des travaux a consisté à évaluer les qualités sensorielles et à étudier l'acceptabilité des différentes formulations de saucissons secs, à la fois au travers de mesures instrumentales et au travers d'une dégustation par un panel de consommateurs. Sur ce point, les mesures instrumentales de texture ont confirmé que la dureté des échantillons de saucisson sec était inversement proportionnelle à la teneur en matière grasse, dépendait de la teneur en eau et de la perte en poids, et était légèrement influencée par le niveau de protéolyse et la substitution du sel. De plus, la réduction de la matière grasse animale et son remplacement par de l'huile de

tournesol oléique préalablement liée à des fibres de blé ont abouti à des valeurs de dureté plus élevées. Enfin, le rôle de l'aromatisation s'est avéré, une nouvelle fois, crucial, de par son action sur l'activation des processus fermentaires qui agissent également sur la dureté finale du saucisson sec au travers de la formation d'un gel protéique. Les autres paramètres de texture (cohésion, élasticité et fragilité) ont été principalement affectés par le niveau de matière grasse animale. Concernant la couleur, les mesures instrumentales des paramètres a^* , b^* et L^* ont logiquement mis en évidence que ces paramètres étaient très significativement affectés par les proportions de viande maigre et de gras de bardière dans les formulations, en raison de taux de nitroso-myoglobine différents. Les variations des paramètres a^* et b^* ont été également influencées par la substitution de la bardière de porc par l'huile de tournesol, probablement à cause de la couleur jaunâtre de l'huile de tournesol oléique. L'aromatisation s'est avérée également importante du fait qu'elle a conduit à un produit plus sombre et plus mat.

L'objectif initial et très ambitieux de ce travail de thèse et l'un des objectifs du projet TeRiFiQ étaient de développer des formulations de saucissons secs à teneurs réduites en sodium et en acides gras saturés, qui soient stables microbiologiquement et chimiquement, et acceptées par les consommateurs. Dans ce contexte, l'acceptabilité des saucissons par le jury de 29 consommateurs recrutés au sein du laboratoire s'est avérée médiocre uniquement pour la formulation non aromatisée et pour la formulation réduite en matière grasse animale avec substitution partielle du NaCl. A noter que l'analyse sensorielle a montré que la plupart des saucissons fabriqués a été considéré suffisamment, voire trop salé, même ceux correspondant aux formulations réduites en sodium, probablement à cause d'un effet exhausteur de la perception salée induit par l'aromatisation. L'aromatisation agit donc, non seulement, en introduisant des molécules aromatiques qui rehaussent l'acceptabilité de l'arôme, mais aussi en activant les processus fermentaires qui, à leur tour, ont une action sur l'acceptabilité de l'aspect et la texture finale du produit.

Enfin, une partie des mesures des teneurs en eau, en sel et en matière grasse, et d' a_w , obtenues pour deux formulations de la première série d'essais a été exploitée pour (1) faire une étude fine de l'évolution temporelle des profils internes de teneurs en eau, en sel et d' a_w , pendant les phases d'étuvage et de séchage, (2) déterminer des valeurs de diffusivité apparente de l'eau dans le cas d'un produit carné, salé et séché et (3) bâtir un modèle d'isotherme de sorption permettant de calculer l' a_w d'un saucisson en fonction de ses teneurs en eau, en sel et en matière grasse animale.

Bien que les nouvelles formulations développées dans ce travail aient montré une bonne évolution et une bonne acceptabilité pour la plupart des caractéristiques physicochimiques, organoleptiques et sensorielles, il serait intéressant d'améliorer encore ces formulations dans une perspective de poursuite de ce travail.

Les fabrications réalisées dans la présente étude correspondaient à des saucissons de moyenne gamme, de consommation courante. Cependant, pour des personnes habituées à consommer régulièrement des salaisons artisanales de haut de gamme, ces nouvelles formulations de saucissons secs peuvent être mal appréciées. Il serait donc utile de procéder à une identification exhaustive des composés volatils odorants-actifs dans ces nouvelles formulations et de les comparer à ceux qui ont été identifiés dans les saucissons de haut de gamme, en ayant comme objectif de trouver des solutions permettant encore de rehausser et d'améliorer l'arôme de ces nouvelles formulations de saucisson.

Dans la présente étude, la matière grasse animale a été remplacée par 3% d'huile de tournesol oléique. Cependant, de faibles défauts ont été constatés au cours de la fabrication, notamment en termes de perte de poids. Il serait donc important d'identifier quelle pourrait être la meilleure procédure de préparation et d'introduction de cette huile dans la mêlée lors de la fabrication, de façon à limiter au maximum cette perte ultérieure d'huile. En plus de réduire le taux d'acides gras saturés en éliminant la bardière de porc, il serait aussi nutritionnellement bon d'améliorer le profil en acides gras insaturés des saucissons, spécifiquement celui en acides gras polyinsaturés, en utilisant d'autres types d'huile végétale, comme l'huile de colza.

Dans la présente étude, le rôle crucial de l'aromatisation a été souligné à maintes reprises. L'aromatisation par l'ail et le poivre noir a donc été choisie comme levier technologique pour améliorer l'arôme et l'acceptabilité des formulations de saucissons secs à teneurs réduites en sel et en matière grasse animale. Toutefois, les produits d'aromatisation ajoutés devront être adaptés en fonction des habitudes alimentaires des pays ou des régions concernées, pour optimiser l'acceptabilité des nouvelles formulations de saucissons qui seront fabriquées ; l'ail n'est pas un produit qui sera accepté partout.

Enfin, il serait également intéressant d'adapter la « microbiologie » (fleur de surface, ferments) lors des phases d'étuvage et de séchage de ces produits à teneurs réduites en sel et en matière grasse animale afin de faciliter la conduite du procédé et rehausser l'arôme final des produits. La « microbiologie » du saucisson sec n'a pas du tout été étudiée dans ce travail de thèse alors que beaucoup de microorganismes œuvrent activement lors de la fabrication de ce produit ; cela pourrait même constituer un autre levier technologique sur lequel agir afin

d'améliorer les qualités et l'acceptabilité des saucissons secs à teneurs réduites en sodium et en AGS.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- A**mbrosiadis, J., Soultos, N., Abraham, A. and Bloukas, J. G. (2004). Physicochemical, microbiological and sensory attributes for the characterization of Greek traditional sausages. *Meat Sci.* 66(2): 279-287.
- A**ndres, A. I., Cava, R., Martin, D., Ventanas, J. and Ruiz, J. (2005). Lipolysis in dry-cured ham: Influence of salt content and processing conditions. *Food Chem.* 90(4): 523-533.
- A**nsorena, D. and Astiasaran, I. (2004a). Effect of storage and packaging on fatty acid composition and oxidation in dry fermented sausages made with added olive oil and antioxidants. *Meat Sci* 67(2): 237-244.
- A**nsorena, D. and Astiasarán, I. (2004b). The use of linseed oil improves nutritional quality of the lipid fraction of dry-fermented sausages. *Food Chem.* 87(1): 69-74.
- A**rmenteros, M., Aristoy, M. C., Barat, J. M. and Toldrá, F. (2012). Biochemical and sensory changes in dry-cured ham salted with partial replacements of NaCl by other chloride salts. *Meat Sci.* 90(2): 361-367.
- A**rmenteros, M., Aristoy, M. C., Barat, J. M. and Toldrá, F. (2009). Biochemical changes in dry-cured loins salted with partial replacements of NaCl by KCl. *Food Chem.* 117(4): 627-633.
- A**rnau, J., Gou, P. and Comaposada, J. (2003). Effect of the relative humidity of drying air during the resting period on the composition and appearance of dry-cured ham surface. *Meat Sci.* 65(4): 1275-1280.
- A**struc, T., Marinova, P., Labas, R., Gatellier, P., Sante-Lhoutellier, V., (2007). Detection and localization of oxidized proteins in muscle cells by fluorescence microscopy. *J. Agric. Food Chem.* 55(23): 9554-9558.
- A**yala, A. and Cutler, R. G. (1996). Comparison of 5-hydroxy-2-amino valeric acid with carbonyl group content as a marker of oxidized protein in human and mouse liver tissues. *Free Radical Biol. Med.* 21(4): 551-558.

B

- B**adr, H. M., & Mahmoud, K.A. (2011). Antioxidant activity of carrot juice in gamma irradiated beef sausage during refrigerated and frozen storage. *Food Chem.* 127(3): 1119-1130.

Baldini, P., Castellani, L., Diaferia, C., Miccio, M., Okasha, F., 2001, Issues and steps in modeling salami drying, Proc. of ICheaP-5, ICheaP5, Florence, Italy , May 20-23, 879-884.

Berdagué, J. L., Monteil, P., Montel, M. C., & Talon, R. (1993). Effects of starter cultures on the formation of flavour compounds in dry sausage. Meat Sci. 35(3): 275-287.

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

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. (2002). The “Video-Sniff” method, a new approach for the “Vocabulary-Intensity-Duration” study of “Elementary Odours” perceived by gas-chromatography-olfaction. In J. L. Le Quéré, & P. X. Étievant (Eds.), Flavour Research at the Dawn of the Twenty-First Century (pp. 514-517). Paris: Tec & Doc Lavoisier.

Beriain, M. J., Gomez, I., Petri, E., Insausti, K. and Sarries, M. V. (2011). The effects of olive oil emulsified alginate on the physico-chemical, sensory, microbial, and fatty acid profiles of low-salt, inulin-enriched sausages. Meat Sci. 88(1): 189-197.

Bloukas, J. G., Paneras, E. D. and Fournitzis, G. C. (1997). Effect of replacing pork backfat with olive oil on processing and quality characteristics of fermented sausages. Meat Sci. 45(2): 133-144.

Bolumar, T., Sanz, Y., Flores, M., Aristoy, M. C., Toldrá, F. and Flores, J. (2006). Sensory improvement of dry-fermented sausages by the addition of cell-free extracts from *Debaryomyces hansenii* and *Lactobacillus sakei*. Meat Sci. 72(3): 457-466.

Bombrun, L. (2013). Analyse des transferts de masse et de l’adhésion entre muscles lors de la fabrication de charcuteries cuites à faible teneur en sel—Effet du traitement thermique et modélisation des pertes de poids. PhD Thesis, Clermont-Ferrand Blaise Pascal University, France, 182 p.

Bombrun, L., Gatellier, P., Carlier, M. and Kondjoyan, A. (2014). The effects of low salt concentrations on the mechanism of adhesion between two pieces of pork semimembranosus muscle following tumbling and cooking. Meat Sci. 96(1): 5-13.

Bourne, M. C. (2002). Principles of objective texture measurement. In M. C. Bourne (Ed.), *Food texture and viscosity: Concept and measurement* (pp. 107-188). New York: Academic Press.

Bozkurt, H. and Bayram, M. (2006). Colour and textural attributes of sucuk during ripening. *Meat Sci.* 73(2): 344-350.

Buscailhon, S., Berdagué, J. L., Bousset, J., Cornet, M., Gandemer, G., Touraille, C. and Monin, G. (1994). Relations between compositional traits and sensory qualities of French dry-cured ham. *Meat Sci.* 37(2): 229-243.

Butterfield, D. A. and Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation processes in aging brain. In: *Advances in Cell Aging and Gerontology*, Vol. 2 pp 161-191. Paula, S. T., and E. E. Bittar, Eds., Elsevier, Amsterdam.

Brain. *Advances in Cell Aging and Gerontology*. S. T. Paula and E. E. Bittar, Elsevier. **Volume 2**: 161-191.

C

Cadwallader, K. R. and MacLeod, A. J. (1998). Instrumental methods for analyzing the flavor of muscle foods. In: *Flavor of Meat, Meat Products and Seafoods*, pp. 320–341. Shahidi, F., Ed., Blackie Academic & Professional, London.

Campagnol, P. C., B. A. dos Santos, R. Wagner, N. N. Terra and M. A. Rodrigues Pollonio (2012). Amorphous cellulose gel as a fat substitute in fermented sausages. *Meat Sci.* **90**(1): 36-42.

Campagnol, P. C., dos Santos, B. A., Wagner, R., Terra, N. N. and Pollonio, M. A. (2012b). Amorphous cellulose gel as a fat substitute in fermented sausages. *Meat Sci.* 90(1): 36-42.

Casaburi, A., Di Monaco, R., Cavella, S., Toldrá, F., Ercolini, D. and Villani, F. (2008). Proteolytic and lipolytic starter cultures and their effect on traditional fermented sausages ripening and sensory traits. *Food Microbiol.* 25(2): 335-347.

Chelh, I., Gatellier, P., Santé-Lhoutellier, V., (2007). Characterisation of fluorescent Schiff bases formed during oxidation of pig myofibrils. *Meat Sci.* 76(2): 210-215.

Chelh, I., Gatellier, P., Santé-Lhoutellier, V., (2006). Technical note: A simplified procedure for myofibril hydrophobicity determination. *Meat Sci.* 74(4): 681-683.

Chrétien, J. R., & Szymoniak, K. (1987). Hierarchical ascending classification of Kováts retention indices as a means of indicating siloxane stationary phase specificities towards lipatic carboxylic esters. *J. Chromatogr. A* 406: 95–104.

Cofrades, S., López-López, I., Solas, M. T., Bravo, L. and Jiménez-Colmenero, F. (2008). Influence of different types and proportions of added edible seaweeds on characteristics of low-salt gel/emulsion meat systems. *Meat Sci.* 79(4): 767-776.

Comaposada, J., Arnau, J. and Gou, P. (2007). Sorption isotherms of salted minced pork and of lean surface of dry-cured hams at the end of the resting period using KCl as substitute for NaCl. *Meat Sci.* 77(4): 643-648.

Comi, G., Urso, R., Iacumin, L., Rantsiou, K., Cattaneo, P., Cantoni, C. and Cocolin, L. (2005). Characterisation of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. *Meat Sci.* 69(3): 381-392.

Commission, E. S. (2008). Collated information on salt reduction in the EU. http://ec.europa.eu/health/ph_determinants/life_style/nutrition/documents/compilation_salt_en.pdf (accessed 16/09/2015).

Corral, S., Salvador, A., Belloch, C. and Flores, M. (2015). Improvement the aroma of reduced fat and salt fermented sausages by *Debaromyces hansenii* inoculation. *Food Control* 47(0): 526-535.

Corral, S., A. Salvador, C. Belloch and M. Flores (2014). Effect of fat and salt reduction on the sensory quality of slow fermented sausages inoculated with *Debaryomyces hansenii* yeast. *Food Control* 45(0): 1–7.

Corral, S., Salvador, A. and Flores, M. (2013). Salt reduction in slow fermented sausages affects the generation of aroma active compounds. *Meat Sci.* 93(3): 776-785.

Coutron-Gambotti, C. and Gandemer, G. (1999). Lipolysis and oxidation in subcutaneous adipose tissue during dry-cured ham processing. *Food Chem.* 64(1): 95-101.

Coventry, M. J. Hickey, M. W. (1993). The effect of spices and manganese on meat starter culture activity. *Meat Sci.* 33(3): 391-399.

Covington, M. B. (2004). Omega-3 fatty acids. *Am. Fam. Physician* 40: 133–140.

Delattre (2007). Radicaux libres et stress oxydant : Aspects biologiques et pathologiques. Technique Et Documentation, Lavoisier, France.

Cregg, L.L., Claus, J.R., Hackney, C.R., and Marriot, N.G. 1993. Low-fat, high added water bologna from massaged, minced batter. *J. Food Sci.* 58: 259–264.

D

Delattre, (2007) " Radicaux libres et stress oxydant : Aspects biologiques et pathologiques". Technique Et Documentation Lavoisier, 549 p.

Desmond, E. (2006). Reducing salt: A challenge for the meat industry. *Meat Sci.* 74(1): 188-196.

Devatkal, S.K., Naveena, B., (2010). Effect of salt, kinnow and pomegranate fruit by-product powders on color and oxidative stability of raw ground goat meat during refrigerated storage. *Meat Sci.* 85(2): 306-311.

Di Cagno, R., Lòpez, C. C., Tofalo, R., Gallo, G., De Angelis, M., Paparella, A., Hammes, W. P. and Gobbetti, M. (2008). Comparison of the compositional, microbiological, biochemical and volatile profile characteristics of three Italian PDO fermented sausages. *Meat Sci.* 79(2): 224-235.

Doehlert, D. H. (1970). Uniform shell designs. *Appl. Statistics*: 19,231–239.

Dominguez, M. C. (1988). Evolucion de determinados parametros proteoliticos y lipoliticos durante la maduracion del chorizo elaborado en la provincia de Leon; aportaciones a su caracterizacion. Ph. Doctoral thesis. University of Leon, Spain.

Dos Santos, B. A., Campagnol, P. C. B., Cavalcanti, R. N., Pacheco, M. T. B., Netto, F. M., Motta, E. M. P., Celeguini, R. M. S., Wagner, R. and Pollonio, M. A. R. (2015). Impact of sodium chloride replacement by salt substitutes on the proteolysis and rheological properties of dry fermented sausages. *J. Food Eng.* 151(0): 16-24.

Drosinos, E. H., Mataragas, M., Xiraphi, N., Moschonas, G., Gaitis, F. and Metaxopoulos, J. (2005). Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. *Meat Sci.* 69(2): 307-317.

Durá, M. A., Flores, M. and Toldrá, F. (2004). Effect of *Debaryomyces* spp. on the proteolysis of dry-fermented sausages. *Meat Sci.* 68(2): 319-328.

Dwivedi, B. K. and Brockmann, M. C. (1975). Meat flavor. *Crit. Rev. Food Sci.* 5(4): 487-535.

E

Edwards, R. A., Ordóñez, J. A., Dainty, R. H., Hierro, E. M. and de la Hoz, L. (1999). Characterization of the headspace volatile compounds of selected Spanish dry fermented sausages. *Food Chem.* 64(4): 461-465.

Enser, M., Richardson, R. I., Wood, J. D., Gill, B. P. and Sheard, P. R. (2000). Feeding linseed to increase the n-3 PUFA of pork: fatty acid composition of muscle, adipose tissue, liver and sausages. *Meat Sci.* 55(2): 201-212.

Ercoşkun, H. and Özkal, S. G. (2011). Kinetics of traditional Turkish sausage quality aspects during fermentation. *Food Control* 22(2): 165-172.

Esteban, M. A., Marcos, A. (1989). Chemical prediction of water activity in processed cheese, *J. Dairy Sci.* 56: 665-668.

Estévez, M. (2011). Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat Sci.* 89(3): 259-279.

Estévez, M., Ventanas, S. and Cava, R. (2007). Oxidation of lipids and proteins in frankfurters with different fatty acid compositions and tocopherol and phenolic contents. *Food Chem.* 100(1): 55-63.

F

Fanco, I., Prieto, B., Cruz, J. M., López, M. and Carballo, J. (2002). Study of the biochemical changes during the processing of Androlla, a Spanish dry-cured pork sausage. *Food Chem.* 78(3): 339-345.

Ferguson, L. R. (2010). Meat and cancer. *Meat Sci.* 84(2): 308-313.

Ferro-Fontan, C., Chirife, J., Sancho, E., Iglesias, H. A. (1982). Analysis of a model for water sorption phenomena in foods. *J. Food Sci. Technol.* 47: 1590-1594.

Flores, M., Nieto, P., Ferrer, J. M. and Flores, J. (2005). Effect of calcium chloride on the volatile pattern and sensory acceptance of dry-fermented sausages. *Eur. Food Res. Technol.* 221(5): 624-630.

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

Flores, M., Sanz, Y., Spanier, A. M., Aristoy, M. C. and Toldrá, F. (1998). Contribution of muscle and microbial aminopeptidases to flavor development in dry-cured meat products. In: *Developments in Food Science*, Vol. 40 pp. 547-557. Contis, E. T., Ho, C. T., Mussinan, C. J., Parliament, T. H., Shahidi, F., and Spanier A. M., Eds., Elsevier, Amsterdam.

Folch, J., Lees, M., & Sloane-Stanley, G. H. (1957). A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-508.

Fuentes, V., Estévez, M., Ventanas, J. and Ventanas, S. (2014). Impact of lipid content and composition on lipid oxidation and protein carbonylation in experimental fermented sausages. *Food Chem.* 147(0): 70-77.

G

Gandemer, G. (2002). Lipids in muscles and adipose tissues, changes during processing and sensory properties of meat products. *Meat Sci.* 62(3): 309-321.

García-Iniguez de Ciriano, M., Larequi, E., Rehecho, S., Calvo, M. I., Cavero, R. Y., Navarro-Blasco, I., Astiasaran, I. and Ansorena, D. (2010). Selenium, iodine, omega-3 PUFA and natural antioxidant from *Melissa officinalis* L.: a combination of components from healthier dry fermented sausages formulation. *Meat Sci.* 85(2): 274-279.

García-Garrido, J. A., Quiles-Zafra, R., Tapiador, J., & Luque de Castro, M. D. (2000). Activity of cathepsin B, D, H and L in Spanish drycured ham of normal and defective texture. *Meat Sci.* 56(1): 1– 6.

García, M. L., Dominguez, R., Galvez, M. D., Casas, C. and Selgas, M. D. (2002). Utilization of cereal and fruit fibres in low fat dry fermented sausages. *Meat Sci.* 60(3): 227-236.

Gatellier, P., Kondjoyan, A., Portanguen, S. and Santé-Lhoutellier, V. (2012). Effect of cooking on protein oxidation in n-3 polyunsaturated fatty acids enriched beef. Implication on nutritional quality. *Meat Sci.* 85(4): 645-650.

Gatellier, P., Kondjoyan, A., Portanguen, S. and Santé-Lhoutellier, V. (2010). Effect of cooking on protein oxidation in n-3 polyunsaturated fatty acids enriched beef. Implication on nutritional quality. *Meat Sci.* 85(4): 645-650.

Gatellier, P., Santé-Lhoutellier, V., Portanguen, S., & Kondjoyan, A. (2009). Use of meat fluorescence emission as a marker of oxidation promoted by cooking. *Meat Sci.* 83(4): 651–656.

Gelabert, J., Gou, P., Guerrero, L. and Arnau, J. (2003). Effect of sodium chloride replacement on some characteristics of fermented sausages. *Meat Sci.* 65(2): 833-839.

Gheisari, H.R., Motamedi, H., (2010). Chloride salt type/ionic strength and refrigeration effects on antioxidant enzymes and lipid oxidation in cattle, camel and chicken meat. *Meat Sci.* 86(2): 377-383.

Gianelli, P., Olivares, A., & Flores, M. (2011). Key aroma components of "Sobrassada of Mallorca from black pig" a dry cured sausage with high fat content. *Food Sci. Technol. Int.*, 17(1): 63-71.

Gil, M., Arnau, J., Sarraga, C., 1989. Proteinase activities in Spanish dry-cured ham manufactured with meat of different quality. *Proceedings of the 35th ICOMST, Copenhagen, Denmark*, 734-740.

Gimeno, O., Astiasarán, I., & Bello, J. (1998). A mixture of potassium, magnesium, and calcium chlorides as a partial replacement of sodium chloride in dry fermented sausages. *J. Agric. Food Chem.* 46(10): 4372-4375.

Gimeno, O., Ansorena, D., Astiasarán, I. and Bello, J. (2000). Characterization of chorizo de Pamplona: instrumental measurements of colour and texture. *Food Chem.* 69(2): 195-200.

Gimeno, O., Astiasarán, I. and Bello, J. (2001a). Calcium ascorbate as a potential partial substitute for NaCl in dry fermented sausages: effect on colour, texture and hygienic quality at different concentrations. *Meat Sci.* 57(1): 23-29.

- Gimeno, O., Astiasarán, I. and Bello, J. (2001b). Influence of partial replacement of NaCl with KCl and CaCl₂ on microbiological evolution of dry fermented sausages. *Food Microbiol.* 18(3): 329-334.
- Gómez, M. and Lorenzo, J. M. (2013). Effect of fat level on physicochemical, volatile compounds and sensory characteristics of dry-ripened “chorizo” from Celta pig breed. *Meat Sci.* 95(3): 658-666.
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J. & David, M.M., 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177 (2) : 751-766.
- Gros, J. B., Roquebert, M. F., Berdagué, J. L., Larroche, C., Fontanille, P., & Sirami, J. (2003). Selection of mould strains from the surface flora of French saucissons and study of their biocatalytic behavior. *Sciences des Aliments* 23(1): 150-153.
- Guardia, M. D., Guerrero, L., Gelabert, J., Gou, P. and Arnau, J. (2006). Consumer attitude towards sodium reduction in meat products and acceptability of fermented sausages with reduced sodium content. *Meat Sci.* 73(3): 484-490.
- Guardia, M. D., Guerrero, L., Gelabert, J., Gou, P., and Arnau, J. (2008). Sensory characterisation and consumer acceptability of small calibre fermented sausages with 50% substitution of NaCl by mixtures of KCl and potassium lactate. *Meat Sci.* 80(4): 1225-1230.

H

- Haak, L., Raes, K., Smet, K., Claeys, E., Paelinck, H., De Smet, S., (2006). Effect of dietary antioxidant and fatty acid supply on the oxidative stability of fresh and cooked pork. *Meat Sci.* 74(3): 476-486.
- Harkouss (2014). Effet du salage et du séchage sur la dynamique d'évolution de la protéolyse, de la structure et de la texture lors de la fabrication d'un jambon sec. Développement d'un modèle de « jambon numérique » couplant transferts d'eau, de sel et protéolyse. Ph-D Thesis, Université Blaise Pascal, Ecole Doctorale Sciences Pour l'Ingénieur, Clermont-Ferrand, France, 169 p.
- Harkouss, R., Mirade, P.-S. and Gatellier, P. (2012). Development of a rapid, specific and efficient procedure for the determination of proteolytic activity in dry-cured ham: Definition of a new proteolysis index. *Meat Sci.* 92(2): 84-88.

Harkouss, R., Safa, H., Gatellier, P., Lebert, A., & Mirade, P. S. (2014). Building phenomenological models that relate proteolysis in pork muscles to temperature, water and salt content. *Food Chem.* 151: 7–14.

He, F. J. and MacGregor, G. A. (2010). Reducing Population Salt Intake Worldwide: From Evidence to Implementation. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 52(5): 363-382.

Hernandez, P., Park, D., Rhee, K.S., (2002). Chloride salt type/ionic strength, muscle site and refrigeration effects on antioxidant enzymes and lipid oxidation in pork. *Meat Sci.* 61(4) : 405-410.

Herrero, A. M., Ordóñez, J. A., de Avila, R., Herranz, B., de la Hoz, L. and Cambero, M. I. (2007). Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) and physico-chemical characteristics. *Meat Sci.* 77(3): 331-338.

Hoz, L., D'Arrigo, M., Cambero, I. and Ordóñez, J. A. (2004). Development of an n-3 fatty acid and alpha-tocopherol enriched dry fermented sausage. *Meat Sci.* 67(3): 485-495.

Hughes, M. C., Kerry, J. P., Arendt, E. K., Kenneally, P. M., McSweeney, P. L. H. and O'Neill, E. E. (2002). Characterization of proteolysis during the ripening of semi-dry fermented sausages. *Meat Sci.* 62(2): 205-216.

I

Ibañez, C., Quintanilla, L., Irigoyen, A., Garcia-Jalón, I., Cid, C., Astiasarán, I. and Bello, J. (1995). Partial replacement of sodium chloride with potassium chloride in dry fermented sausages: Influence on carbohydrate fermentation and the nitrosation process. *Meat Sci.* 40(1): 45-53.

Ibañez, C., Quintanilla, L., Cid, C., Astiasarán, I. and Bello, J. (1997). Dry fermented sausages elaborated with *Lactobacillus plantarum*-*Staphylococcus carnosus*. Part II: Effect of partial replacement of NaCl with KCl on the proteolytic and insolubilization processes. *Meat Sci.* 46(3): 277-284.

Ikonić, P., Tasić, T., Petrović, L., Škaljac, S., Jokanović, M., Mandić, A. and Ikonić, B. (2013). Proteolysis and biogenic amines formation during the ripening of Petrovska klobasa, traditional dry-fermented sausage from Northern Serbia. *Food Control* 30(1): 69-75.

Ingham, S., Duerge, D., Dropp, B., & Losinski, J. (2004). Survival of *Listeria monocytogenes* during storage of ready-to-eat meat products processed by drying, fermentation, and/or smoking. *J. Food Prot.* 67(12): 2698–2702.

J

Jiménez-Colmenero, F., Carballo, J. and Cofrades, S. (2001). Healthier meat and meat products: their role as functional foods. *Meat Sci.* 59(1): 5-13.

Jiménez-Colmenero, F., Triki, M., Herrero, A. M., Rodríguez-Salas, L. and Ruiz-Capillas, C. (2013). Healthy oil combination stabilized in a konjac matrix as pork fat replacement in low-fat, PUFA-enriched, dry fermented sausages. *LWT-Food Sci. Technol.* 51(1): 158-163.

Jin, G., He, L., Yu, X., Zhang, J., & Ma, M. (2013). Antioxidant enzyme activities are affected by salt content and temperature and influence muscle lipid oxidation during dry-salted bacon processing. *Food Chem.* 141(3): 2751–2756.

Josquin, N. M., Linssen, J. P. and Houben, J. H. (2012). Quality characteristics of Dutch-style fermented sausages manufactured with partial replacement of pork back-fat with pure, pre-emulsified or encapsulated fish oil. *Meat Sci.* 90(1): 81-86.

K

Kabak, B. and Dobson, A. D. W. (2011). An Introduction to the Traditional Fermented Foods and Beverages of Turkey. *Crit. Rev. Food Sci.* 51(3): 248-260.

Kanner, J., Harel, S. and Jaffe, R. (1991). Lipid peroxidation of muscle food as affected by NaCl. *J. Agric. Food Chem.* 39: 1017–1021.

L

Leak, F. W., Kemp, J. D., Fox, J. D. and Langloid, B. E. (1987). Effects of boning time, mechanical tenderization and partial replacement of sodium chloride on the quality and microflora of boneless dry-cured ham. *J. Food Sci.* 52: 263-266.

Lee, S.K., Mei, L., Decker, E.A., (1997). Influence of sodium chloride on antioxidant enzyme activity and lipid oxidation in frozen ground pork. *Meat Sci.* 46(4): 349-355.

Leon Crespo F., Barranco Sanchez A., Penedo Padron J. C., Beltran de Heredia F., Mata Moreno C., Montero Perez-Barquero E. and M. C. (1985). "Proteolisis y lipolisis en la maduración del chorizo." *Alimentaria* 163: 51-53.

Levine, R. L. and Stadtman, E. R. (2001). Oxidative modification of proteins during aging. *Exp. Gerontol.* 36(9): 1495-1502.

Liaros, N. G., Katsanidis, E. and Bloukas, J. G. (2009). Effect of the ripening time under vacuum and packaging film permeability on processing and quality characteristics of low-fat fermented sausages. *Meat Sci.* 83(4): 589-598.

Lopez-Lopez, I., Cofrades, S. and Jimenez-Colmenero, F. (2009). Low-fat frankfurters enriched with n-3 PUFA and edible seaweed: Effects of olive oil and chilled storage on physicochemical, sensory and microbial characteristics. *Meat Sci.* 83(1): 148-154.

Lorenzo, J. M. (2014). Changes on physico-chemical, textural, lipolysis and volatile compounds during the manufacture of dry-cured foal "cecina". *Meat Sci.* 96(1): 256-263.

Lorenzo, J. M., Bedia, M. and Banon, S. (2013). Relationship between flavour deterioration and the volatile compound profile of semi-ripened sausage. *Meat Sci* 93(3): 614-620.

Lorenzo, J. M., Temperan, S., Bermudez, R., Cobas, N. and Purrinos, L. (2012). Changes in physico-chemical, microbiological, textural and sensory attributes during ripening of dry-cured foal salchichon. *Meat Sci.* 90(1): 194-198.

Luccia, A. D., Picariello, G., Cacace, G., Scaloni, A., Faccia, M., Liuzzi, V., Alviti, G. and Musso, S. S. (2005). Proteomic analysis of water soluble and myofibrillar protein changes occurring in dry-cured hams. *Meat Sci.* 69(3): 479-491.

Lund, M. N., Heinonen, M., Baron, C. P. and Estévez, M. (2011). Protein oxidation in muscle foods: A review. *Mol. Nutr. Food Res.* 55: 83–95.

Lund, M.N., Hviid, M.S., Skibsted, L.H., (2007). The combined effect of antioxidants and modified atmosphere packaging on protein and lipid oxidation in beef patties during chill storage. *Meat Sci.* 76(2): 226-233.

Lynch, S. M., Frei, B., 1993. Mechanisms of copper- and iron-dependent oxidative modification of human low-density lipoprotein. *J. Lipid Res.* 34 (10) : 1745–1751.

M

- Marco**, A., Navarro, J. L. and Flores, M. (2007). Quantitation of selected odor-active constituents in dry fermented sausages prepared with different curing salts. *J. Agric. Food Chem.* 55(8): 3058-3065.
- Martin-Sanchez**, A. M., Chaves-Lopez, C., Sendra, E., Sayas, E., Fenandez-Lopez, J. and Perez-Alvarez, J. A. (2011). Lipolysis, proteolysis and sensory characteristics of a Spanish fermented dry-cured meat product (salchichon) with oregano essential oil used as surface mold inhibitor. *Meat Sci.* 89(1): 35-44.
- Mauriello**, G., Casaburi, A., Blaiotta, G. and Villani, F. (2004). Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. *Meat Sci.* 67(1): 149-158.
- McAfee**, A. J., McSorley, E. M., Cuskelly, G. J., Moss, B. W., Wallace, J. M. W., Bonham, M. P. and Fearon, A. M. (2010). Red meat consumption: An overview of the risks and benefits. *Meat Sci.* 84(1): 1-13.
- Mendoza**, E., García, M. L., Casas, C. and Selgas, M. D. (2001). Inulin as fat substitute in low fat, dry fermented sausages. *Meat Sci.* 57(4): 387-393.
- Meynier**, A., Novelli, E., Chizzolini, R., Zanardi, E., & Gandemer, G. (1999). Volatile compounds of commercial Milano salami. *Meat Sci.* 51(2): 175-183.
- Mercier**, Y., Gatellier, P., Vincent, A. and Renerre, M. (2001). Lipid and protein oxidation in microsomal fraction from turkeys: influence of dietary fat and vitamin E supplementation. *Meat Sci.* 58(2): 125-134.
- Moghadasian**, M. H. (2008). Advances in Dietary Enrichment with N-3 Fatty Acids. *Crit. Rev. Food Sci.* 48(5): 402-410.
- Molly**, K., Demeyer, D., Civera, T. and Verplaetse, A. (1996). Lipolysis in a Belgian sausage: Relative importance of endogenous and bacterial enzymes. *Meat Sci.* 43(3-4): 235-244.
- Molly**, K., Demeyer, D., Johansson, G., Raemaekers, M., Ghistelinck, M. and Geenen, I. (1997). The importance of meat enzymes in ripening and flavour generation in dry fermented sausages. First results of a European project. *Food Chem.* 59(4): 539-545.

Monin, G., Marinova, P., Talmant, A., Martin, J. F., Cornet, M., Lanore, D. and Grasso, F. (1997). Chemical and structural changes in dry-cured hams (Bayonne hams) during processing and effects of the dehairing technique. *Meat Sci.* 47(1–2): 29-47.

Montel, M. C. (1999). Fermented meat products. In: *Encyclopedia of Food Microbiology*, pp. 744-753. Robinson, R. K., Ed., Elsevier, Oxford.

Montero, P., Giménez, B., Pérez-Mateos, M. and Gómez-Guillén, M. C. (2005). Oxidation stability of muscle with quercetin and rosemary during thermal and high-pressure gelation. *Food Chem.* 93(1): 17-23.

Mora-Gallego, H., Serra, X., Guàrdia, M. D. and Arnau, J. (2014). Effect of reducing and replacing pork fat on the physicochemical, instrumental and sensory characteristics throughout storage time of small caliber non-acid fermented sausages with reduced sodium content. *Meat Sci.* 97(1): 62-68.

Mora-Gallego, H., Serra, X., Guardia, M. D., Miklos, R., Lametsch, R. and Arnau, J. (2013). Effect of the type of fat on the physicochemical, instrumental and sensory characteristics of reduced fat non-acid fermented sausages. *Meat Sci.* 93(3): 668-674.

Moretti, V. M., Madonia, G., Diaferia, C., Mentasti, T., Paleari, M. A., Panseri, S., Pirone, G. and Gandini, G. (2004). Chemical and microbiological parameters and sensory attributes of a typical Sicilian salami ripened in different conditions. *Meat Sci.* 66(4): 845-854.

Morzel, M., Gatellier, P., Sayd, T., Renerre, M., & Laville, E. (2006). Chemical oxidation decreases proteolytic susceptibility of skeletal muscle myofibrillar proteins. *Meat Sci.* 73(3): 536-543.

Muguerza, E., Ansorena, D. and Astiasarán, I. (2003). Improvement of nutritional properties of Chorizo de Pamplona by replacement of pork backfat with soy oil. *Meat Sci.* 65(4): 1361-1367.

Muguerza, E., Fista, G., Ansorena, D., Astiasaran, I. and Bloukas, J. G. (2002). Effect of fat level and partial replacement of pork backfat with olive oil on processing and quality characteristics of fermented sausages. *Meat Sci.* 61(4): 397-404.

Muguerza, E., Gimeno, O., Ansorena, D. and Astiasarán, I. (2004). New formulations for healthier dry fermented sausages: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 15(9): 452-457.

Muguerza, E., Gimeno, O., Ansorena, D., Bloukas, J. G. and Astiasarán, I. (2001). Effect of replacing pork backfat with pre-emulsified olive oil on lipid fraction and sensory quality of Chorizo de Pamplona - a traditional Spanish fermented sausage. *Meat Sci.* 59(3): 251-258.

Muñoz, I. and Comaposada, J., 2011. Mass transfer coefficients determination from industrial processes of meat drying. In *11th International Congress on μ Engineering and Food, ICEF-11*, Athens, 22-26 May.

N

Navarro, J. L., Nadal, M. I., Izquierdo, L. and Flores, J. (1997). Lipolysis in dry cured sausages as affected by processing conditions. *Meat Sci.* 45(2): 161-168.

O

Okos M.R., Narsimhan G., Singh R.K. & Weitnauer A.C. 1992. Food dehydration. Handbook of Food Engineering D.H Heldman and D. B. Lund (eds). Marcel Dekker, Inc, New York.

Olesen, P. T., Meyer, A. S. and Stahnke, L. H. (2004). Generation of flavour compounds in fermented sausages—the influence of curing ingredients, *Staphylococcus* starter culture and ripening time. *Meat Sci.* 66(3): 675-687.

Olivares, A., Dryahina, K., Navarro, J. L., Flores, M., Smith, D. and Španěl, P. (2010b). Selected ion flow tube-mass spectrometry for absolute quantification of aroma compounds in the headspace of dry fermented sausages. *Anal. Chem.* 82(13): 5819-5829.

Olivares, A., Navarro, J. L. and Flores, M. (2011). Effect of fat content on aroma generation during processing of dry fermented sausages. *Meat Sci.* 87(3): 264-273.

Olivares, A., Navarro, J. L. and Flores, M. (2009). Distribution of volatile compounds in lean and subcutaneous fat tissues during processing of dry fermented sausages. *Food Res. Int.* 42(9): 1303-1308.

Olivares, A., Navarro, J. L., Salvador, A. and Flores, M. (2010a). Sensory acceptability of slow fermented sausages based on fat content and ripening time. *Meat Sci.* 86(2): 251-257.

Oliver, C. N., Ahn, B. W., Moerman, E. J., Goldstein, S., Stadtman, E. R. (1987): Age-related changes in oxidized proteins. *J. Biol. Chem.* 262 : 5488-5491

O'Neill, L.M., Galvin, K., Morrissey, P.A., Buckley, D.J., (1999). Effect of carnosine, salt and dietary vitamin E on the oxidative stability of chicken meat. *Meat Sci.* 52(1): 89-94.

Ordóñez, J. A., Hierro, E. M., Bruna, J. M. and de la Hoz, L. (1999). Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Crit. Rev. Food Sci.* 39(4): 329-367.

P

Papadima, S. N. and Bloukas, J. G. (1999). Effect of fat level and storage conditions on quality characteristics of traditional Greek sausages. *Meat Sci.* 51(2): 103-113.

Parreño, M., Cussó, R., Gil, M. and Sárraga, C. (1994). Development of cathepsin B, L and H activities and cystatin-like activity during two different manufacturing processes for Spanish dry-cured ham. *Food Chem.* 49(1): 15-21.

Peleg M. (1993). Assessment of a semi-empirical four parameter general model for sigmoid moisture sorption isotherms, *J. Food Process Eng.* 16: 21-37.

Pelser, W. M., Linssen, J. P., Legger, A. and Houben, J. H. (2007). Lipid oxidation in n-3 fatty acid enriched Dutch style fermented sausages. *Meat Sci.* 75(1): 1-11.

Pérez-Alvarez, J. A., Sayas-Barberá, M. A. E., Fernández-López, J. and Aranda-Catalá, V. (1999). Physicochemical characteristics of Spanish-type dry-cured sausage. *Food Res. Int.* 32(9): 599-607.

Pérez-Cacho, M. P., Galan-Soldevilla, H., Leon Crespo, F., & Molina Recio, G. (2005). Determination of the sensory attributes of a Spanish dry-cured sausage. *Meat Sci.* 71(4) : 620-633.

Promeyrat, A. (2013). "Analyse et modélisation des mécanismes à l'origine des modifications des protéines lors du chauffage du tissu musculaire". Ph-D Thesis, Université Blaise Pascal, Ecole Doctorale Sciences de la vie, Santé, Agronomie, Environnement, Clermont-Ferrand, France, 271 p.

Promeyrat, A., Bax, M.L., Traoré, S., Aubry, L., Sante-Lhoutellier, V., Gatellier, P. (2010a). Changed dynamics in myofibrillar protein aggregation as a consequence of heating time and temperature, *Meat Sci.* 85(4): 625-631.

Promeirat, A., Gatellier, P., Lebret, E., Kajac, K., Aubry, L., Santé-Lhoutellier, V. (2010b). Evaluation of protein aggregation in cooked meat. *Food Chem.* 121(2): 412-417.

Q

Quintanilla, L., Ibañez, C., Cid, C., Astiasarán, I. and Bello, J. (1996). Influence of partial replacement of NaCl with KCl on lipid fraction of dry fermented sausages inoculated with a mixture of *Lactobacillus plantarum* and *Staphylococcus carnosus*. *Meat Sci.* 43(3-4): 225-234.

R

Rantsiou, K., Drosinos, E. H., Gialitaki, M., Urso, R., Krommer, J., Gasparik-Reichardt, J., Tóth, S., Metaxopoulos, I., Comi, G. and Cocolin, L. (2005). Molecular characterization of *Lactobacillus* species isolated from naturally fermented sausages produced in Greece, Hungary and Italy. *Food Microbiol.* 22(1): 19-28.

Rason, J., Laguet, A., Berge, P., Dufour, E. and Lebecque, A. (2007). Investigation of the physicochemical and sensory homogeneity of traditional French dry sausages. *Meat Sci.* 75(3): 359-370.

Rhee, K. S., Smith, H. G. C., & Terrell, R. N. (1983). Effect of reduction and replacement of sodium chloride on rancidity development in raw and cooked ground pork. *Journal of Food Protection* 46(7): 578-581.

Rico, E., Toldrá, F., & Flores, J. (1990). Activity of cathepsin D as affected by chemical and physical dry-curing parameters. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 191: 20-23.

Ripollés, S., Campagnol, P. C. B., Armenteros, M., Aristoy, M. C. and Toldrá, F. (2011). Influence of partial replacement of NaCl with KCl, CaCl₂ and MgCl₂ on lipolysis and lipid oxidation in dry-cured ham. *Meat Sci.* 89(1): 58-64.

Roseiro, L. C., Gomes, A., Gonçalves, H., Sol, M., Cercas, R. and Santos, C. (2010). Effect of processing on proteolysis and biogenic amines formation in a Portuguese traditional dry-fermented ripened sausage “Chouriço Grosso de Estremoz e Borba PGI”. *Meat Sci.* 84(1): 172-179.

Roseiro, L. C., Santos, C., Sol, M., Borges, M. J., Anjos, M., Gonçalves, H. and Carvalho, A. S. (2008). Proteolysis in Painho de Portalegre dry fermented sausage in relation to ripening time and salt content. *Meat Sci.* 79(4): 784-794.

Rougier (2006). Caractérisation et modélisation des transferts d'eau et de solutés en vue d'une aide à la formulation des aliments composites. Cas des assemblages bases céréalières-fourrages humides protéiques. Ph-D Thesis, Ecole Nationale Supérieure des industries agricoles et alimentaires de Massy, Ecole doctorale ABIÉS, Massy, France, 271 p.

Rougier, T., Bonazzi, C., Daudin, J. D. (2006). Modeling incidence of lipid and sodium chloride contents on sorption curves of gelatin in the high humidity range. *J. Food Sci. Technol.* 40: 1798–1807.

Rüegg, M. (1985). Water in dairy products related to quality, with special reference to cheese. NATO Advanced Science Institutes Series, 90, 603-625.

Ruiz-Cabrera, M., Gou, P., Foucat, L., Renou, J.P., & Daudin, J.D. (2004). Water transfer analysis in pork meat supported by NMR imaging. *Meat Sci.* 67: 169-178.

Ruiz-Capillas, C., Jiménez Colmenero, F., Carrascosa, A. V. and Muñoz, R. (2007). Biogenic amine production in Spanish dry-cured “chorizo” sausage treated with high-pressure and kept in chilled storage. *Meat Sci.* 77(3): 365-371.

Ruiz-Capillas, C., Triki, M., Herrero, A. M., Rodriguez-Salas, L. and Jimenez-Colmenero, F. (2012). Konjac gel as pork backfat replacer in dry fermented sausages: processing and quality characteristics. *Meat Sci.* 92(2): 144-150.

Ruiz-Ramírez, J., Arnau, J., Serra, X. and Gou, P. (2006). Effect of pH24, NaCl content and proteolysis index on the relationship between water content and texture parameters in biceps femoris and semimembranosus muscles in dry-cured ham. *Meat Sci.* 72(2): 185-194.

Ruusunen, M. and Puolanne, E. (2005). Reducing sodium intake from meat products. *Meat Sci.* 70(3): 531-541.

Ruxton, C. H. S., Calder, P. C., Reed, S. C. and Simpson, M. J. A. (2005). The impact of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on human health. *Nutr. Res. Rev.* 18(1): 113–129.

S

- S**abio, E., Vidal-Aragón, M. C., Bernalte, M. J. and Gata, J. L. (1998). Volatile compounds present in six types of dry-cured ham from south European countries. *Food Chem.* 61(4): 493-503.
- S**afa, H., Gatellier, P., Lebert, A., Picgirard, L., & Mirade, P. S. (2015). Effect of combined salt and animal fat reductions on physicochemical and biochemical changes during the manufacture of dry-fermented sausages. *Food Bioprocess Technol.* 8: 2109-2122.
- S**agiroglu, A., Ozcan, H.M., Isbilir, S.S., Paluzar, H., Toprakkiran, N; M. Alkali Catalysis of Different Vegetable Oils for Comparisons of Their Biodiesel Productivity (2013). *J. Sustainable Bioenergy Syst.* 3(0): 79-85.
- S**algado, A., García Fontán, M. C., Franco, I., López, M. and Carballo, J. (2006). Effect of the type of manufacture (homemade or industrial) on the biochemical characteristics of “Chorizo de cebolla” (a Spanish traditional sausage). *Food Control* 17(3): 213-221.
- S**anchez-Zapata, E., Diaz-Vela, J., Perez-Chabela, M. L., Pérez-Alvarez, J. A., & Fernandez-Lopez, J. (2013). Evaluation of the effect of tiger nut fibre as a carrier of unsaturated fatty acids rich oil on the quality of dry-cured sausages. *Food Bioprocess Technol.* 6: 1181–1190.
- S**androu, D. K. and Arvanitoyannis, I. S. (2000). Low-fat/calorie foods: Current state and perspectives. *Crit. Rev. Food Sci.* 40(5): 427-447.
- S**anté-Lhoutellier, V., Astruc, T., Marinova, P., Greve, E., Gatellier, P., (2008a). Effect of Meat Cooking on Physicochemical State and in Vitro Digestibility of Myofibrillar Proteins. *J. Agric. Food Chem.* 56(4): 1488-1494.
- S**arraga, C., Carreras, I., Regueiro, J.A.G., (2002). Influence of meat quality and NaCl percentage on glutathione peroxidase activity and values for acid-reactive substances of raw and dry-cured *Longissimus dorsi*. *Meat Sci.* 62(4): 503-507.
- S**arraga, C., Garcia-Regueiro, J.A., (1998). Oxidation of microsomal fraction in the processing conditions of dry-cured ham. The in-vitro effect of brine. *Meat Sci.* 50(3): 295-302.
- S**chmidt, S. and Berger, R. G. (1998). Aroma Compounds in Fermented Sausages of Different Origins. *LWT-Food Sci. Technol.* 31(6): 559-567.

- Severini, C., De Pilli, T. and Baiano, A. (2003). Partial substitution of pork backfat with extra-virgin olive oil in 'salami' products: effects on chemical, physical and sensorial quality. *Meat Sci.* 64(3): 323-331.
- Soyer, A., Ertaş, A. H. and Üzümcüoğlu, Ü. (2005). Effect of processing conditions on the quality of naturally fermented Turkish sausages (sucuks). *Meat Sci.* 69(1): 135-141.
- Soysal, Y., Öztekin, S. (1999). Equilibrium moisture content equations for some medicinal and aromatic plants, *J. Agric. Eng. Res.* 74(3): 317-324.
- Spaziani, M., Torre, M. D. and Stecchini, M. L. (2009). Changes of physicochemical, microbiological, and textural properties during ripening of Italian low-acid sausages. Proteolysis, sensory and volatile profiles. *Meat Sci.* 81(1): 77-85.
- St. Angelo, A. J., Vercellotti, J., Jacks, T. and Legendre, M. (1996). Lipid oxidation in foods. *Crit. Rev. Food Sci.* 36(3): 175-224.
- Stadtman, E. R. and Levine, R. L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25: 207–218.
- Stahnke, L. H. (1995). Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredient levels — Part I. Chemical and bacteriological data. *Meat Sci.* 41(2): 179-191.
- Stahnke, L. H. (1994). Aroma components from dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus*. *Meat Sci.* 38(1): 39-53.
- Stollewerk, K., Jofré, A., Comaposada, J., Arnau, J. and Garriga, M. (2012). The impact of fast drying (QDS process®) and high pressure on food safety of NaCl-free processed dry fermented sausages. *Innov. Food Sci. Emerg.* 16: 89-95.
- Sun, W., Cui, C., Zhao, M., Zhao, Q. and Yang, B. (2011a). Effects of composition and oxidation of proteins on their solubility, aggregation and proteolytic susceptibility during processing of Cantonese sausage. *Food Chem.* 124(1): 336-341.
- Sun, W., Zhao, M., Yang, B., Zhao, H. and Cui, C. (2011b). Oxidation of sarcoplasmic proteins during processing of Cantonese sausage in relation to their aggregation behaviour and in vitro digestibility. *Meat Sci.* 88(3): 462-467.

Sun, W., Zhou, F., Zhao, M., Yang, B. and Cui, C. (2011c). Physicochemical changes of myofibrillar proteins during processing of Cantonese sausage in relation to their aggregation behaviour and in vitro digestibility. *Food Chem.* 129(2): 472-478.

Sunesen, L. O., Dorigoni, V., Zanardi, E., & Stahnke, L. (2001). Volatile compounds released during ripening in Italian dried sausage. *Meat Sci.* 58(1): 93-97.

Suzzi, G., Lanorte, M. T., Galgano, F., Andrighetto, C., Lombardi, A., Lanciotti, R. and Guerzoni, M. E. (2001). Proteolytic, lipolytic and molecular characterisation of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 69(1–2): 69-77.

Syarifuddin, A., Septier, C., Salles, C., Thomas-Danguin T. (2016). Reducing salt and fat while maintaining taste: An approach on a model food system. *Food Qual. Preference* 48(0): 59–69.

T

Tabanelli, G., Montanari, C., Grazia, L., Lanciotti, R. and Gardini, F. (2013). Effects of aw, packaging time and atmosphere composition on aroma profile, biogenic amine content and microbiological features of dry fermented sausages. *Meat Sci.* 94(2): 177-186.

Tan, F.-J., Liao, F.-Y., Jhan, Y.-J. and Liu, D.-C. (2007). Effect of replacing pork backfat with yams (*Dioscorea alata*) on quality characteristics of Chinese sausage. *J. Food Eng.* 79(3): 858-863

Taormina, P. J. (2010). Implications of salt and sodium reduction on microbial food safety. *Crit. Rev. Food Sci.* 50(3): 209-227.

Théron, L., Tournayre, P., Kondjoyan, N., Abouelkaram, S., Santé-Lhoutellier, V., & Berdagué, J. L. (2010). Analysis of the volatile profile and identification of odour-active compounds in Bayonne ham. *Meat Sci.* 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 Chem.* 139(1–4): 432-438.

Toldrá, F. (1998). Proteolysis and lipolysis in flavour development of dry-cured meat products. *Meat Sci.* 49 Supplement 1(0): S101-S110.

Toldrá, F. and Etherington, D. J. (1988). Examination of cathepsins B, D, H and L activities in dry-cured hams. *Meat Sci.* 23(1): 1-7.

Toldrá, F. and Flores, M. (2007). Processed pork meat flavors. In: Handbook of Food Products Manufacturing, pp. 281–301. Hui, Y.H., Ed., John Wiley, New York.

Toldrá, F. and Flores, M. (2000). The use of muscle enzymes as predictors of pork meat quality. Food Chem. 69(4): 387-395.

Toussaint, O., Capdevielle, P. and Maumy, M. (1987). Asymmetric synthesis by copper-catalyzed decarboxylation of phenylmalonic diacids and hemiesters. Tetrahedron Lett. 28(5): 539-542.

Tuomilehto, J., Jousilahti, P., Rastenyte, D., Moltchanov, V., Tanskanen, A., Pietinen, P. and Nissinen, A. (2001a). Urinary sodium excretion and cardiovascular mortality in Finland: a prospective study. Lancet 357(9259): 848-851.

Tuomilehto, J., P. Jousilahti, A. Tanskanen, P. Pietinen and A. Nissinen (2001b). Sodium excretion and cardiovascular mortality. Lancet 358(9282): 666.

U

US Department of Health and Human, s. (2005). Dietary guidelines for Americans <http://www.health.gov/dietaryguidelines/dga2005/document/>.

V

Valencia, I., Ansorena, D. and Astiasarán, I. (2007). Development of dry fermented sausages rich in docosahexaenoic acid with oil from the microalgae *Schizochytrium* sp.: Influence on nutritional properties, sensorial quality and oxidation stability. Food Chem. 104(3): 1087-1096.

Valencia, I., Ansorena, D., & Astiasaran, I. (2006). Nutritional and sensory properties of dry fermented sausages enriched with n-3 PUFAs. Meat Sci. 72(4): 727-733.

Verma, A. K. and Banerjee, R. (2011). Low-sodium meat products: Retaining salty taste for sweet health. Crit. Rev. Food Sci. 52(1): 72-84.

Vallon, C., Berdagué, J. L., Montel, M. C., Talon, R., Martin, J. F., Kondjoyan, N., & Denoyer, C. (1996). The effect of stage of ripening and packaging on volatile content and flavour of dry sausage. Food Res. Int. 29(7): 667-674

Visessanguan, W., Benjakul, S., Riebroy, S., Yarchai, M. and Tapingkae, W. (2006a). Changes in lipid composition and fatty acid profile of Nham, a Thai fermented pork sausage, during fermentation. *Food Chem.* 94(4): 580-588.

Visessanguan, W., Benjakul, S., Smitinont, T., Kittikun, C., Thepkasikul, P. and Panya, A. (2006b). Changes in microbiological, biochemical and physico-chemical properties of Nham inoculated with different inoculum levels of *Lactobacillus curvatus*. *LWT-Food Sci. Technol.* 39(7): 814-826.

W

Wishart, D. (1969). An algorithm for hierarchical classifications. *Biometrics* 25(1): 165–170.

Wood, J. D., Richardson, R. I., Nute, G. R., Fisher, A. V., Campo, M. M., Kasapidou, E., Sheard, P. R. and Enser, M. (2004). Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Sci.* 66(1): 21-32.

X

Xiong, Y.L. (2000) Protein oxidation and implications for muscle foods quality. In: *Antioxidants in Muscle Foods*, pp. 85-111. Decker, E.A., Faustman, C. and Lopez-Bote, C.J., Eds., John Wiley, New York.

Z

Zakrys, P.I., Hogan, S.A., O'Sullivan, M.G., Allen, P., Kerry, J.P., (2008). Effects of oxygen concentration on the sensory evaluation and quality indicators of beef muscle packed under modified atmosphere. *Meat Sci.* 79(4): 648-655.

Zanardi, E., Ghidini, S., Battaglia, A. and Chizzolini, R. (2004). Lipolysis and lipid oxidation in fermented sausages depending on different processing conditions and different antioxidants. *Meat Sci.* 66(2): 415-423.

Zanardi, E., Ghidini, S., Conter, M. and Ianieri, A. (2010). Mineral composition of Italian salami and effect of NaCl partial replacement on compositional, physico-chemical and sensory parameters. *Meat Sci.* 86(3): 742-747.

Zhao, G. M., Tian, W., Liu, Y. X., Zhou, G. H., Xu, X. L. and Li, M. Y. (2008). Proteolysis in biceps femoris during Jinhua ham processing. *Meat Sci.* 79(1): 39-45.

Zhao, G. M., Zhou, G. H., Wang, Y. L., Xu, X. L., Huan, Y. J. and Wu, J. Q. (2005). Time-related changes in cathepsin B and L activities during processing of Jinhua ham as a function of pH, salt and temperature. *Meat Sci.* 70(2): 381-388.

ANNEXE I

En se basant sur la loi d'additivité des volumes et la formule de la densité (ρ), la densité de la matière sèche du saucisson frais ($\rho^{\circ}MS$) peut être calculée.

En fait, un saucisson peut être considéré comme un mélange de protéines, de lipides, de sel et de plusieurs autres ingrédients (qui peuvent être négligés) :

$$\text{Saucisson} = \text{protéines} + \text{lipides} + \text{sel} + \text{autres ingrédients} \quad \text{Eq. (I.1)}$$

D'autre part, $\rho^{\circ}MS$ peut être exprimée par :

$$\rho^{\circ}MS = \frac{\text{masse (matière sèche)}}{\text{volume (matière sèche)}} \quad \text{Eq. (I.2)}$$

Ou bien

$$\rho^{\circ}MS = \frac{\text{masse (protéines)} + \text{masse (lipides)} + \text{masse sel}}{\text{volume (protéines)} + \text{volume (lipides)} + \text{volume (sel)}} \quad \text{Eq. (I.3)}$$

Or, pour chaque formulation, comme nous disposons des différentes proportions de maigre, de gras de bardière de porc et de sel, nous pouvons donc calculer la masse de la fraction protéique, lipidique et du sel.

Et connaissant les densités propres des protéines et des lipides ($\rho_{\text{protéines}} = 1380 \text{ kg/m}^3$ et $\rho_{\text{lipides}} = 930 \text{ kg/m}^3$), nous pouvons calculer les volumes respectifs des protéines et des lipides.

$$\text{Volume (protéines)}(m^3) = \frac{\text{masse (protéines)}(kg)}{1380} \quad \text{Eq. (I.4)}$$

$$\text{Volume (lipides)}(m^3) = \frac{\text{masse (lipides)}(kg)}{930} \quad \text{Eq. (I.5)}$$

Et par conséquent :

$$\rho^{\circ}MS = \frac{\text{masse (protéines)} + \text{masse (lipides)} + \text{masse (sel)}}{\frac{\text{masse (protéines)}}{1380} + \frac{\text{masse (lipides)}}{930}} \quad \text{Eq. (I.6)}$$

D'autre part, soit :

X_{eau}^{MT} (kg eau / matière totale) : la teneur en eau par rapport à la matière totale (viande).

X_{eau}^{MS} (kg eau / matière sèche) : la teneur en eau par rapport à la matière sèche.

C_{eau} (kg eau / m^3) : la concentration en eau.

$$X_{\text{eau}}^{MS} = X_{\text{eau}}^{MT} / (1 - X_{\text{eau}}^{MT}) \quad \text{Eq. (I.7)}$$

De plus, un produit est un mélange d'eau et de matière sèche :

Matière Sèche	Eau
----------------------	------------

On a donc :

- une masse de matière sèche,
- un volume de matière sèche, égal au rapport de cette masse de matière sèche sur $\rho^{\circ}MS$,
- un volume d'eau, égal au rapport de la masse d'eau sur la masse volumique de l'eau (ρ_{eau}),
- le volume total correspond à la somme du volume d'eau et du volume de matière sèche (volume du sel négligé).

Or :

$$X_{eau}^{MT} = \frac{Masse(eau)}{Masse(eau) + Masse(matière\ sèche)} \quad \text{Eq. (I.8)}$$

Ou bien :

$$X_{eau}^{MT} = \frac{\frac{Masse(eau)}{Volume\ total}}{\frac{Masse(eau)}{Volume\ total} + \frac{Masse(matière\ sèche)}{Volume\ total}} = \frac{C_{eau}}{C_{eau} + \frac{Masse(matière\ sèche)}{Volume\ total}} \quad \text{Eq. (I.9)}$$

Et :

$$\begin{aligned} \frac{Masse(matière\ sèche)}{Volume\ total} &= \frac{Masse(matière\ sèche)}{Volume(matière\ sèche)} \times \frac{Volume(matière\ sèche)}{Volume\ total} \\ &= \rho^{\circ}MS \times \frac{Volume\ total - Volume(eau)}{Volume\ total} \quad \text{Eq. (I.10)} \\ &= \rho^{\circ}MS \left(1 - \frac{Masse(eau)}{\rho_{eau} \times Volume\ total}\right) \\ &= \rho^{\circ}MS \left(1 - \frac{C_{eau}}{\rho_{eau}}\right) \end{aligned}$$

Alors :

$$X_{eau}^{MT} = \frac{C_{eau}}{C_{eau} + \rho^{\circ}MS - \frac{\rho^{\circ}MS}{\rho_{eau}} \times C_{eau}} = \frac{1}{1 + \frac{\rho^{\circ}MS}{C_{eau}} - \frac{\rho^{\circ}MS}{\rho_{eau}}} \quad \text{Eq. (I.11)}$$

Au final, il est donc possible de calculer la masse volumique d'un saucisson, à n'importe quel temps de fabrication, à partir de la valeur initiale de cette masse volumique ($\rho^{\circ}MS$) et de la teneur en eau, au moyen de la relation suivante :

$$\rho = \rho^{\circ}MS \left(\frac{1 + X_{eau}^{MS}}{1 + \rho^{\circ}MS \times \frac{X_{eau}^{MS}}{\rho_{eau}}} \right) = \frac{C_{eau}}{X_{eau}^{MT}} \quad \text{Eq. (I.12)}$$

ANNEXE II

Effect of Combined Salt and Animal Fat Reductions on Physicochemical and Biochemical Changes During the Manufacture of Dry-Fermented Sausages

Hassan Safa¹ · Philippe Gatellier¹ · André Lebert² · Laurent Picgirard³ · Pierre-Sylvain Mirade¹

Received: 13 April 2015 / Accepted: 13 July 2015 / Published online: 23 July 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract Reducing salt and fat contents in dry-fermented sausages could benefit consumer health. This study aimed to quantify, from an experimental design, the effects of salt and fat contents and combined salt and fat reductions on the time-course of several physicochemical (product weight loss, mean water activity and pH values) and biochemical (proteolysis, lipolysis and lipid and protein oxidations) parameters. Statistical analyses found that time, salt and fat contents had a very significant impact on weight loss and a_w and that time and salt content (not fat content) had a significant impact on pH. Biochemical results indicated that proteolysis was salt-content-dependent and amplified by combined salt and fat reductions. Intensity of lipolysis was mainly dependent on fat content. Lipid and protein oxidations were more intense in higher-fat formulations. Combined salt and fat reductions in dry-fermented sausages increased acidification, weight losses and a_w , leading to more proteolysis, less lipolysis and less oxidation. Sensory studies are now required to investigate consumer acceptability of these healthier sausages. However, the present results constitute a valuable set of data for helping professionals wishing to reduce salt and fat contents in dry-fermented sausages.

Keywords Dry-fermented sausage · Combined salt and fat reductions · Physicochemical properties · Proteolysis · Lipolysis · Lipid and protein oxidations

Introduction

Meat and meat products are very important elements in human diet as they are especially rich in proteins, vitamins and minerals (Josquin et al. 2012). Dry fermentation and dry curing are centuries-old techniques of meat preservation, and dry-processed meats have become typical, authentic and very popular products across Europe. To illustrate, Spain produces about 200,000 t of dry-fermented sausage per year (Martin-Sanchez et al. 2011) while France produces another 110,000 t (Hoz et al. 2004). Dry-fermented sausages are made to different recipes using different technologies in different countries and local regions, but all are generally prepared from raw meats consisting of about two-thirds lean meat and one-third fat. In general, the lean meat comes from different animal sources such as pork and beef, whereas the fat is almost always pig backfat. The term “dry-fermented sausage” corresponds to raw meats preserved under the effect of salting, lactic fermentation and drying. These products are manufactured by mincing raw meat and pork backfat added with 5 % of spices, curing agents—chiefly sodium chloride—additives and starter culture. The meat batter thus obtained is pushed into artificial or natural casings before undergoing fermentation, steaming and drying processes (Olivares et al. 2009).

Excessive consumption of salt, especially sodium chloride, in human diet is strongly related to increased blood pressure and consequently cardiovascular disease (Gelabert et al. 2003), and to certain cancers, including stomach cancer (Stollewerk et al. 2012). To limit the development of these

✉ Pierre-Sylvain Mirade
pierre-sylvain.mirade@clermont.inra.fr

¹ INRA, UR370 Qualité des Produits Animaux,
63122 Saint-Genès-Champagnelle, France

² Institut Pascal, UMR6602 UBP/CNRS/IFMA, 24 avenue des
Landais, BP80026, 63171 Aubière Cedex, France

³ ADIV, 10 rue Jacqueline Auriol, ZAC Les Gravanches,
63039 Clermont-Ferrand Cedex 2, France

human diseases, several health organizations in industrialized countries worldwide recommend limiting salt consumption to 6 g per day (e.g., US Department of Health and Human Services 2005). These organizations also prone reducing fat intake to less than 30 % of total calories to limit the development of serious health disorders like obesity, high blood cholesterol and coronary heart diseases which are highly related to excessive intake of fat-rich foods, especially saturated fatty acids (SFAs) and cholesterol (Ansorena and Astiasarán 2004; Ruiz-Capillas et al. 2012). Given that dry-fermented sausages contain high levels of sodium and SFA, from a health standpoint, it would be beneficial to reduce the salt and fat contents in this family of meat products. However, salt and fat play key functional ingredients in dry-fermented sausage manufacture. For instance, salt ensures microbiological safety by decreasing water activity (a_w), as well as acting on the drying process by decreasing weight losses. It has also been reported that salt affects biochemical reactions such as proteolysis, lipolysis, oxidation and fermentation that are involved in the development of the final sensory attributes of dry-fermented sausages, such as texture, flavour and appearance. On the other hand, fat in meat products is considered a valuable source of energy, fatty acids and vitamins, and biochemical reactions affecting the lipid fraction are also involved in the development of the final sensory attributes of dry-fermented sausages, such as flavour, juiciness and texture. Several studies have focussed on the effect of reducing salt or fat content on physicochemical properties (weight losses, a_w and pH) and biochemical reactions (proteolysis, lipolysis and lipid and protein oxidations). For instance, Mora-Gallego et al. (2013) recently reported that salt slows the drying process by affecting the binding water capacity of protein and that reducing fat content accelerates product weight losses. Furthermore, Roseiro et al. (2008) showed that salt-reduced dry-fermented sausages showed higher a_w values than control batches. Likewise, Olivares et al. (2010) showed that reducing fat content in dry-fermented sausages led to slightly higher end-of-process a_w . The literature on pH is far less consistent. Corral et al. (2013) did not find significant difference between pH values of salt-reduced and control dry-fermented sausages, whereas Roseiro et al. (2008) reported higher fermentation rates in salt-reduced dry-fermented sausages. With respect to fat content, Olivares et al. (2010) found a faster pH decline in low-fat sausages whereas Muguerza et al. (2002) did not find any effect of fat level on pH value. Other authors have focussed on the effect of salt content and fat content on the biochemical reactions in meat products. Harkouss et al. (2014), for example, reported higher proteolytic activity when salt is reduced in dry-cured ham. Several authors have found higher proteolysis rates in salt-reduced dry-fermented sausages (Armenteros et al. 2012). Likewise, the literature reports higher lipolysis rates in dried salted meat products (Armenteros et al. 2012; Quintanilla et al. 1996; Stahnke 1995). Several studies have reported that NaCl is able to accelerate the oxidation process (Jin et al. 2013), whereas other authors find that salt plays an antioxidant role. For example,

Rhee et al. (1983) reported that lipid oxidation is inhibited in ground pork meat prepared with high NaCl concentrations. Some authors also observed a significant increase of lipid oxidation in sodium-reduced dry-fermented sausage formulations compared to the traditional one, when using calcium chloride to partially replace sodium chloride (Flores et al. 2005; Zanardi et al. 2010). Reducing fat content logically reduces the extent of lipolysis and the production of lipid oxidation products. Sanchez-Zapata et al. (2013) highlighted a positive impact of adding tiger nut fibre as a source of fibre and walnut oil as a source of unsaturated fatty acids during the manufacture of a traditional Spanish dry-cured fermented sausage. However, all the above cited studies focussed on the impact of separate reductions in salt or fat content during dry-fermented sausage manufacture. To our knowledge, few studies have addressed a combined reduction in salt and fat.

Therefore, the objective of this study was to use an experimental design to quantify the effect of salt content, fat content and combined salt and fat reductions on the time-course of several physicochemical properties and on the biochemical reactions that occur during the manufacture of dry-fermented sausages.

Materials and Methods

Manufacture of Dry-Fermented Sausages

To investigate the effects of time, fat content, salt content and their interactions on physicochemical and biochemical changes during the processing of dry-fermented sausages, a Doehlert design (Doehlert 1970) was established on the basis of two factors: initial animal fat content in the range 8.4–21 % and initial salt content in the range 2.0–2.8 %. The first factor, i.e., fat content, was studied at five levels: 8.4, 11.6, 14.7, 17.9 and 21.0 %, while the second factor, i.e., salt content, was studied at three levels: 2.0, 2.4 and 2.8 %. In this study, setting up a Doehlert design leads to seven formulations of dry-fermented sausages with different amounts of salt and fat, as indicated in Table 1. We added a control fabrication numbered “eight” in which dry-fermented sausages were manufactured from a 2.8 % initial salt content and a 21 % initial fat content to be used as baseline reference for the other seven fabrications.

For each formulation in Table 1, about 30 dry-fermented sausages were manufactured as per the following procedure. Raw pork meat, i.e., pork shoulder and pork backfat, was purchased from a local distributor (DISTRIPORC, Clermont-Ferrand, France). On receipt of the pork meat, we verified the pH, moisture and water activity (a_w) of the pork lean as pH=5.98, moisture=73.5 % and a_w =0.97. Pork shoulders were defatted and cut into small parallelepipeds. For each formulation, the corresponding amount of defatted pork shoulder and backfat was weighed, ground to 6-mm diameter

Table 1 Details of experiments giving all the formulations of dry-fermented sausages performed in the present study

Experiments	Animal fat content (%)	Sodium chloride content (%)
S1	14.7	2.4
S2	21	2.4
S3	17.9	2.8
S4	8.4	2.4
S5	11.6	2.0
S6	17.9	2.0
S7	11.6	2.8
S8 control	21	2.8

This list was built from a Doehlert design on the basis of two factors: initial animal fat content in the range 8.4–21 % total matter and initial salt content in the range 2.0–2.8 % total matter

and mixed with the corresponding amount of salt, a set of additives and a starter culture corresponding to a mid-acidification kinetic starter. The starter culture (MF55, Biovitec, Lissieu, France) was prepared at 100 kg/L concentration and added to each formulation at 10 g/kg. In each meat batter, we added dextrose (5 g/kg), potassium nitrate (0.3 g/kg), potassium erythorbate (0.5 g/kg), black pepper (2 g/kg), garlic powder (0.5 g/kg) and finally a solution of starters (10 g/kg). The meat batter was then stuffed into 50-mm-diameter collagen casings. The raw sausages, weighing 450 g and about 20 cm in length, were then plunged in a *Penicillium nalgiovensis* solution to cover their surface during the drying stage. All products were steamed for 4 days at 24 °C and 70 % relative humidity (RH) and then dried for 25 days at 13 °C and 70 % RH in the same ripening room.

For the eight batches of Table 1, three sausages were taken at days 1, 2, 5, 7, 21 and 29 of drying to evaluate the time-course patterns of chemical composition, physicochemical parameters (a_w , weight loss, pH) and biochemical parameters (proteolysis, fermentation, protein oxidation, lipid oxidation). As the experiments were cumbersome to set up, the biochemical parameters were ultimately only assessed at four timepoints, i.e., days 1, 7, 21 and 29. In addition, for biochemical and basic chemical analyses, all the dried products were individually treated with liquid nitrogen, ground down into fine powder to minimize problems tied to heterogeneity of sampling in subsequent analysis and stored at -80 °C until analysis.

Chemical Composition of Dry-Fermented Sausages

Moisture

Moisture was determined by drying about 1.5 g of powdered-down sample at 80 ± 2 °C in a temperature-controlled chamber (Model FT127U, Firlabo, France) until constant weight, which took at least 48 h (adapted from Norm NF V 04401).

Moisture content was expressed on a total matter basis (kg H₂O/kg TM). All moisture measurements were performed in six replicates.

Salt Content

Salt content was measured using 2 g of powdered-down sample. The sample was homogenized (Ultra-Turrax system, Ika, Germany) with 20 mL of ultrapure water. After a 3-h rest period, the homogenate was centrifuged at 11,300g for 10 min at room temperature (MiniSpin Plus, Eppendorf, France). The supernatant was recovered, diluted in ultrapure water and run through an ion chromatography system (850 professional IC, Metrohm France SAS, France) to systematically measure chloride ion and sodium ion contents. The chloride ion or sodium ion values were then used to calculate an equivalent NaCl content (%). All the details on this measurement technique developed in the laboratory can be found in Bombrun (2013). All salt content measurements were performed in six replicates.

Fat Content

Fat content was determined on powdered-down samples based on the method of Folch et al. (1957) but using dichloromethane/ethanol (2:1) instead of chloroform/methanol (2:1) as solvent. Total lipids from 0.5 g of sample were extracted with 50 mL of solvent. The organic phase (dichloromethane) containing total lipids was separated using 10 mL of salt solution at 0.73 %, after centrifugation at 2000g for 5 min, at 4 °C. The extract obtained was evaporated in a vacuum evaporator and weighed to determine total lipid content. All fat content measurements were performed in six replicates.

Physicochemical Analysis of Dry-Fermented Sausages

Weight Loss

Throughout the dry-fermented sausage drying period, nine products from each batch arranged on the same bar were weighed together practically every day to determine the kinetics of weight loss. Weight loss was expressed as percentage of initial weight.

Water Activity (a_w)

Water activity (a_w) was measured at 20 °C with a laboratory a_w meter (a_w Sprint TH-500, Novasina, Switzerland). Preliminary tests performed to measure a_w individually on the three sausages of each formulation showed that there was no significant difference between the three values

(<0.001 a_w unit). Water activity values were therefore determined on a mixture of the three sausages for each formulation.

pH

pH was determined using 1 g of powdered-down sample homogenized (Ultra-Turrax system, Ika, Germany) with 10 mL of ultrapure water. pH was measured conventionally with a pH meter (InLab427, Mettler Toledo, France) calibrated with standard solutions of pH 4 and pH 7. All pH measurements were performed in nine replicates.

Biochemical Analysis of Dry-Fermented Sausages

Proteolysis

The proteolysis index (PI) of each powdered-down sample of dry-fermented sausages was determined using a fluorescence method based on the reaction of fluorescamine with N terminal α -amino groups of peptides in TCA soluble fractions (Harkouss et al. 2012). In this method, PI is defined as the percentage of the ratio of amino group content to total protein content. All PI measurements were performed in nine replicates.

Lipolysis

The degradation of fat into fatty acids was quantified by determining the acid value of fat (Norm NF T 60–204) in samples of dry-fermented sausages, at day 29. Briefly, total free fatty acids from 25 g of sample were solubilized in a solvent mix of ether/ethanol. Total free fatty acids were determined quantitatively by potassium hydroxide (0.1 N) in the presence of a colour indicator (phenolphthalein). Before neutralization, phenolphthalein (acid medium) is colourless. Under basic conditions (beyond neutralization), it colours pink. The number of equivalents of potassium hydroxide poured is equal to the number of equivalents of acid present in the sample, and acid value is the mass of potassium hydroxide, in milligrams, required to neutralize 1 g of fat. All these measurements were performed in three replicates.

Lipid Oxidation

Lipid oxidation was quantified in powdered-down samples of dry-fermented sausages by determining hydrosoluble Schiff bases (HSBs) using the procedure reported in Gatellier et al. (2009). For this purpose, the aqueous phase obtained to determine fat content was collected to quantify HSB levels. A standard curve of commercial Schiff bases (quinine) was prepared in parallel. Fluorescence of each point of the standard curve and fluorescence of each sample were measured with a spectrofluorometer (FP 8300, Jasco France, France) at a 370-

nm excitation wavelength (excitation slit, 10 nm), a 470-nm emission wavelength (emission slit, 10 nm) and a 3-s integration time. A linear standard curve of quinine was plotted, and sample HSB levels were expressed as micromoles per kilogram of meat versus quinine equivalent. All lipid oxidation measurements were performed in nine replicates.

Protein Oxidation

Protein oxidation was assessed in powdered-down samples of dry-fermented sausages by determining free thiol groups of cysteine residues from Ellman's assay using 2,2'-dithiobis(5-nitropyridine) (DTNP) as reagent (Morzel et al. 2006). In alkaline solution, DTNP binds to the anionic free thiol groups of cysteine residues to form a complex that absorbs at 386 nm. The results are expressed in nanomoles of bound DTNP per milligram of protein. All protein oxidation measurements were performed in nine replicates.

Statistical Analyses

To make the results easier to interpret and the figures easier to read, a specific statistical treatment called hierarchical cluster analysis (HCA) (Chrétien and Szymoniak 1987; Wishart 1969) was applied to all measured raw values. HCA consists in clustering samples that lead to similar results on a given parameter, thereby creating classes of dry-fermented sausages. HCA was calculated using Ward's method on STATISTICA 10-V2014 software. In addition, when a class of sausages is formed, the values of the parameter corresponding to the class are calculated, at each time point, by averaging the values of all the same-class sausages.

Statistical analyses of the results were completed by analysis of variance (ANOVA) using STATISTICA 10-V2014 software. The objective was to assess the effect of each factor (time, fat content, salt content and salt content \times fat content interaction) on each variable measured in this study. When ANOVA found a significant effect ($p < 0.05$), post hoc procedures were used: Multiple comparisons among means were examined by the Tukey test to determine the level of significance between groups.

Results and Discussion

Effects on Chemical Composition of Dry-Fermented Sausages

Drying dry-fermented sausages globally leads to a reduction in in-product water content due to water evaporation from the product surface and, in turn, to a fat and salt concentration that increases fat and salt contents, respectively. We therefore ran chemical analysis of moisture, salt content and fat content at

four timepoints, i.e., day 1, day 7, day 21 and day 29 (end of drying) to track and trend the time-course of these parameters. Table 2 shows the measured values of moisture, salt content and fat content in these dry-fermented sausages.

Moisture

Analysis of Table 2 confirms that in-product moisture decreases globally with drying, with mean values decreasing from initial values of 59.9–68.1 % at day 1 to final values of 36.9–43.6 % at day 29 (Table 2). The lowest final water content values were obtained for the two 21 % animal fat formulations (S2 and S8, i.e., the control) and for S6 corresponding to a high-fat but low-salt formulation (17.9 % fat and 2.0 % salt, respectively). Note that at day 1, in-product water content

values of all formulations were lower than the water content measured at reception of the fresh lean meat that was not dried (73.5 %), probably as a result of the pork backfat, curing agents (NaCl, nitrite) and additives added to the pork lean when preparing the meat batter. Indeed, at day 1, the higher moisture contents were measured on the three formulations containing less than 12 % animal fat, and the highest value (68.1 %) was even obtained for the lowest-fat formulation (S4).

It can be concluded that the respective proportions of lean meat and pork backfat logically influence moisture values during dry-fermented sausage manufacture (Table 2). For an identical drying process, the highest moisture values expressed as percentage of total matter are obtained for the low-fat products.

Salt Content

Analysis of Table 2 logically indicates a net increase in in-product salt content with drying. Note that fresh pork lean is known to naturally contain small amounts of sodium and chloride ions; here we measured a 0.17 % equivalent of NaCl content in the fresh pork lean. At day 1, measured salt content value ranged from 2.34 to 3.13 % depending on formulation (Table 2), whereas intended salt content corresponded to the levels of the Doehlert design: 2.0, 2.4 and 2.8 %. This implies that real salt content values are globally higher than intended values. Accurate analysis between real and intended salt content shows that discrepancies ranged from 0.18 % (S8) to 0.52 % (S2) depending on formulation, with a mean discrepancy of 0.37 %. This underlines just how difficult it is to add exactly the intended amount of NaCl to meat batters with varying proportions of lean meat and fat, even at pilot-scale level. At day 29, the final NaCl content values ranged from 6.26 to 7.64 % depending on experiment and on the weight loss experienced by the dry-fermented sausages. The highest final NaCl content value was measured for the control (S8) that initially contained about 2.98 % NaCl (day 1) and that counted one of the lowest final water contents measured (60.8 %, Table 2).

Regarding in-product salt content, it can be concluded that the measured salt content values at day 1 were still higher than the intended values, probably as a result of the natural presence of sodium and chloride ions in lean pork meat and very probably as a result of the real difficulty in perfectly adjusting the amount of salt added during the meat batter preparation. However, the formulations with the higher intended salt content values nevertheless contained more salt than the others once the meat batters were prepared, thus a priori lowering the impact of this observed discrepancy on the physicochemical and biochemical results subsequently obtained.

Table 2 Time-course evolution of chemical composition (moisture, sodium chloride and animal fat contents) measured in dry-fermented sausages for the eight formulations of Table 1

Experiments	Day 1	Day 7	Day 21	Day 29
Moisture content (% total matter)				
S1	62.5±0.8 ^c	57.7±0.7 ^c	46.1±0.6 ^{bc}	43.6±1.0 ^a
S2	61.1±0.7 ^b	54.8±0.6 ^{dc}	41.3±0.8 ^e	37.4±0.8 ^c
S3	59.9±0.5 ^a	55.6±0.8 ^d	43.4±1.2 ^{de}	41.1±0.6 ^b
S4	68.1±0.6 ^f	62.9±1.0 ^a	49.8±0.9 ^a	40.7±1.0 ^b
S5	66.0±0.5 ^e	59.8±1.2 ^b	48.1±0.3 ^{ab}	39.7±0.7 ^b
S6	61.7±0.5 ^{bc}	51.7±0.7 ^f	42.0±0.5 ^e	38.2±0.5 ^c
S7	64.8±0.3 ^d	59.3±0.6 ^b	45.4±0.3 ^{cd}	40.4±0.7 ^b
S8 control	60.8±0.6 ^{ab}	54.1±0.5 ^e	42.8±1.0 ^e	36.9±0.7 ^c
Sodium chloride content (% total matter)				
S1	2.86±0.50 ^{bcd}	3.76±0.30 ^c	5.77±0.41 ^{cd}	6.54±0.60 ^{bcd}
S2	2.92±0.25 ^{abc}	4.35±0.15 ^{ab}	5.93±0.12 ^c	6.56±0.23 ^{bcd}
S3	3.13±0.30 ^a	4.5±0.40 ^a	6.76±0.40 ^a	7.15±0.50 ^{ab}
S4	2.84±0.23 ^{cd}	3.77±0.29 ^c	6.27±0.20 ^b	6.86±0.20 ^{bc}
S5	2.34±0.17 ^{de}	3.62±0.13 ^d	5.61±0.18 ^d	6.26±0.13 ^d
S6	2.44±0.13 ^{cde}	3.64±0.14 ^d	5.66±0.14 ^d	6.39±0.20 ^{cd}
S7	3.08±0.14 ^{ab}	4.23±0.16 ^b	5.71±0.15 ^{cd}	6.34±0.16 ^{cd}
S8 control	2.98±0.16 ^{ab}	4.33±0.20 ^{ab}	6.57±0.17 ^{ab}	7.64±0.23 ^a
Animal fat content (% total matter)				
S1	14.3±0.2 ^c	17.7±1.3 ^b	22.8±1.0 ^c	25.6±0.4 ^d
S2	18.9±0.2 ^{ab}	23.3±0.6 ^a	31.1±1.6 ^a	34.0±1.4 ^{ab}
S3	17.1±0.4 ^b	19.8±1.0 ^b	25.7±1.6 ^b	29.5±1.6 ^c
S4	8.0±0.3 ^c	10.8±1.3 ^d	14.7±0.2 ^c	16.5±0.4 ^f
S5	11.2±0.2 ^d	14.2±1.1 ^c	19.7±0.2 ^d	20.8±0.4 ^c
S6	18.1±0.4 ^b	22.7±0.8 ^a	27.8±1.6 ^b	31.0±1.8 ^{bc}
S7	12.0±0.2 ^d	14.5±1.4 ^c	19.3±1.4 ^d	21.0±1.4 ^c
S8 control	20.6±0.5 ^a	25.2±1.1 ^a	31.9±1.3 ^a	35.0±1.3 ^a

Measured values were the means±standard deviation calculated from six independent determinations. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$)

Total Fat Content

Analysis of Table 2 confirms that animal fat concentrates with drying. Like for salt content, discrepancies emerged between measured in-product total lipid content and the intended fat content fixed by the Doehlert design, but the order is respected, meaning that the formulations with the highest intended fat contents have the highest measured total lipid contents, and vice versa (Table 2). For example, formulations corresponding to S2 and S8 for which intended fat content was 21 % really contained 18.9 and 20.6 % total lipids, respectively, at day 1. For the 17.9 % fat formulations (S3 and S6), the discrepancy in total lipid content was -0.8 and $+0.2$ %, respectively. Moreover, 8.0 % total lipid content was measured in the specific case of formulation S4 where 8.4 % fat content was planned. Finally, discrepancy in total lipid content ranged from -1.1 to $+0.2$ % depending on experiment investigated, again underlining the real difficulty in perfectly adjusting the amount of added fat during meat batter preparation. The formulations can be sorted as a function of their real total lipid content in the same order, from the beginning (day 1) until the end (day 29) of the drying process. However, fortunately, the formulations with the higher intended fat content values really contained more fat than the others, once the meat batters were prepared, thus a priori lowering the impact of this observed discrepancy on the results subsequently obtained.

Effect on Physicochemical Parameters in Dry-Fermented Sausages

Time-Course of Weight Loss

Figure 1a charts weight loss kinetics during the ripening process. First of all, from day 1, all the dry-fermented sausages lose weight corresponding to the water lost through evaporation during steaming and ripening. HCA applied to all weight loss values led to the formation of three classes of formulations, as shown in Fig. 1a. The first class, corresponding to the lowest weight loss (about 43 % at day 29), is composed of experiments S1, S2, S3, S6 and S8 (control). The two other classes strongly diverge from the first class from day 5, and they pool the three lowest-fat formulations that generate higher water losses from the sausages. These two classes stay very close up to day 14 and thus separate the three lowest-fat formulations as a function of their relative NaCl content; the highest-salt formulation (S7) led to lower weight loss (45.4 % at day 29) than the two other formulations (S4 and S5) which are less salty (2.4 and 2.0 %, respectively) for which water loss reached 49 % at the end of drying. Thus, Fig. 1a shows that lean dry-fermented sausages globally lose more water than the fattiest products.

Furthermore, these results were confirmed by the ANOVA and Tukey tests (Table 3) that highlighted very highly significant effects of time, backfat and salt content ($p < 0.001$) but no

significant effect of the interaction between salt and fat content ($p > 0.05$). These results are in line with several studies designed to assess the impact of reducing salt or fat content on the sensory qualities of these kinds of meat products (Corral et al. 2014; Liaros et al. 2009), but disagree with Corral et al. (2013) who did not find any differences in weight losses for slow-fermented dried sausages prepared with different levels of salt (2.7 and 2.26 %). However, the salt effect observed here was for a higher level of salt reduction (-30 %) combined with high fat reduction. Regarding the effect of fat content on product water loss, Olivares et al. (2010) failed to find differences in water loss between high and low-fat sausages, but they studied dried slow-fermented sausages slow-ripened for 63 days, whereas here where we applied high fermentation and faster drying.

Time-Course of Mean Water Activity Values

Figure 1b charts the kinetics of mean in-product a_w values measured for the eight formulations of Table 1. Generally speaking, the drying process led to a reduction in water content and to a concentration of salt into the matrix, and thus to a decrease in mean a_w value.

HCA applied to a_w values led to the formation of three classes of formulations (Fig. 1b). The class corresponding to the lowest mean values of a_w , with variations from 0.958 at day 1 to 0.886 at day 29, is formed by batches S3, S7 and S8, i.e., the three highest-salt formulations containing at least 11.6 % animal fat. The class corresponding to the highest in-product mean a_w values, with variations from 0.963 at day 1 to 0.901 at day 29, is formed by batches S4, S5 and S6, i.e., the two lowest-NaCl formulations (S5 and S6) and the lowest-fat formulation (containing just 8.4 % animal fat) (S4). The third class is formed by experiments S1 and S2 which contain a moderate NaCl content (2.4 %) and a fairly high (>14.7 %) animal fat content. This class presented an intermediate pattern in terms of time-course of mean in-product a_w , with values ranging from 0.960 at day 1 to 0.897 at day 29. Note that all the final mean in-product a_w values are below 0.92 and that a_w values below 0.92 are considered safe in terms of *Listeria monocytogenes* growth capacity (Ingham et al. 2004).

In a similar way to the time-course of weight loss, the statistical analyses performed on the mean a_w values, i.e., ANOVA and Tukey tests, showed very highly significant effects of time, salt content and fat content ($p < 0.001$) but no significant effect of the interaction between salt and fat content ($p > 0.05$) (Table 3). Literature data on the effect of fat content on a_w values is inconsistent. Some authors have reported that reducing fat content during dried sausage manufacture led to higher final a_w values (Corral et al. 2014; Gómez and Lorenzo 2013) or higher a_w values at the fermentation stage (Olivares et al. 2010) whereas others did not find any significant difference in a_w values between low and high-fat dried sausages

Fig. 1 Time-course of three physicochemical parameters investigated for the eight formulations of dry-fermented sausages given in Table 1: **a** weight losses, **b** mean water activity (a_w) values and **c** pH values. Hierarchical cluster analysis was performed on raw values in order to pool dry-fermented sausage formulations presenting similar patterns. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$)

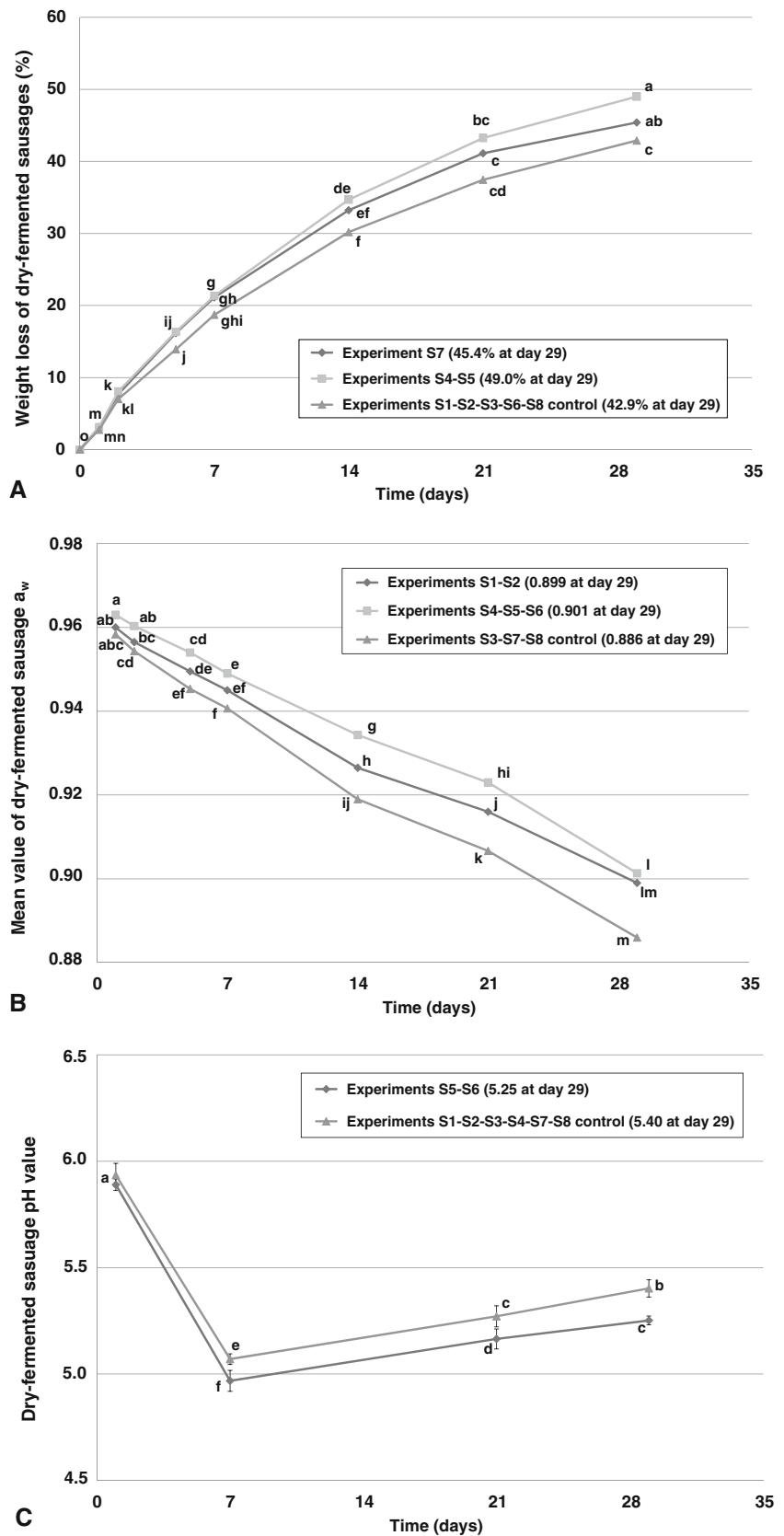


Table 3 Details of statistical analyses: A – Analysis of variance and B – Post hoc Tukey procedure, performed on the values of physicochemical (weight loss, a_w , pH) and biochemical (proteolysis, lipolysis and lipid and

protein oxidations) parameters measured in the dry-fermented sausages for all the formulations of Table 1

A – Analysis of variance (ANOVA)							
	Weight losses	a_w	pH	Proteolysis (proteolysis index)	Lipolysis (acidity value)	Lipid oxidation (HSB)	Protein oxidation (thiol group)
Time	***	***	***	***	(–)	***	***
Salt	***	***	ns	***	**	ns	ns
Fat	***	***	***	***	***	***	***
Salt*Fat	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns
B – Post hoc procedure (Tukey test)							
S1	19.0 ^a	0.940 ^{de}	5.45±0.34 ^a	4.80±1.25 ^b	8.1±0.33 ^{ab}	3.70±1.07 ^b	26.64±1.19 ^b
S2	18.9 ^a	0.939 ^{cd}	5.43±0.35 ^a	4.75±1.22 ^b	10.4±0.26 ^{cd}	3.87±1.11 ^{cd}	21.80±1.21 ^a
S3	18.7 ^a	0.935 ^{bc}	5.41±0.34 ^a	4.39±0.92 ^a	9.0±0.13 ^b	3.82±1.10 ^{bc}	26.67±0.83 ^b
S4	22.3 ^b	0.943 ^{de}	5.41±0.31 ^a	4.89±1.28 ^b	7.4±0.30 ^a	3.51±0.86 ^a	30.16±0.53 ^d
S5	21.6 ^b	0.944 ^c	5.33±0.37 ^b	5.45±1.51 ^d	7.9±0.25 ^{ab}	3.52±0.89 ^a	28.60±0.62 ^c
S6	20.5 ^{ab}	0.944 ^c	5.31±0.36 ^b	5.17±1.38 ^c	9.7±0.35 ^c	3.83±1.08 ^{bc}	26.32±0.6 ^b
S7	21.0 ^b	0.935 ^{bc}	5.41±0.33 ^a	4.34±0.96 ^a	7.5±0.45 ^a	3.50±0.94 ^a	28.72±1.46 ^c
S8 control	18.6 ^a	0.933 ^a	5.40±0.34 ^a	4.25±0.81 ^a	10.0±0.38 ^c	3.96±1.26 ^d	21.81±0.64 ^a

ANOVA was run to test the effects of time, salt content, fat content and the interaction salt content × fat content on all the parameters studied. Significance is noted as follows: ns ($p > 0.05$), * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$), and (–) corresponds to a factor not studied. A Tukey test was applied on the means ± standard deviation calculated from all independent determinations and for all timepoints. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$)

manufactured with cereal and fruit fibres (García et al. 2002). Concerning salt content, several studies have mentioned that reducing salt logically led to higher a_w values (Olesen et al. 2004; Roseiro et al. 2008). In contrast, other authors did not find any difference in final a_w values of dried sausages made with different levels of salt. For example, Corral et al. (2013) found significant differences in a_w values after 9 days but, surprisingly, not at the end of processing. However, Corral et al. (2014) reported that a combined reduction of salt and fat contents affected sausage quality by producing an increase in final a_w values.

Concerning the time-course of mean a_w values, the HCA-based results presented here logically showed a strong impact of salt content and also an effect of fat content. Indeed, modifying the fat content of the meat batter modifies the salt concentration in the lean part of the batter, and thus the water activity value. From a water activity perspective, reducing fat content in dry-fermented sausages provokes the same increase on a_w as reducing salt content. So, binary reductions in fat and salt contents may prove detrimental from a safety standpoint if the products are not sufficiently dried afterwards.

Time-Course of pH Values

Figure 1c charts the time-course of pH values. All formulations followed a normal time-course of pH values with a strong decrease in pH during the first week of process, from 5.91 to 5.93 at day 1 to a minimum of about 5.0 at day 7,

corresponding to intense acidification due to the action of the lactic acid bacteria (LAB) added during sausage manufacture. This period is characterized by an exponential growth phase of LAB that fermented sugar substrate into lactic acid. Beyond day 7, pH values increased progressively until the end of the drying process as a result of an array of phenomena including a strong decrease in LAB acidifying action due to the depletion of sugar substrate, the transformation of lactic acid into other chemical substances, consumption of lactic acid by moulds (Flores et al. 2004) and/or the production of alkaline molecules due to proteolytic mechanisms (Ordóñez et al. 1999).

HCA applied to the pH values of all the formulations led to the formation of two distinct classes differentiated according to NaCl content of the formulations (Fig. 1c). Lower pH values were obtained for the two lowest-salt formulations, i.e., S5 and S6 that contain only 2.0 % NaCl, probably due to more intense LAB activity. The second class pooled all the other formulations that contain at least 2.4 % NaCl. The difference between the two classes resided in the fact that a more intense acidification was observed for the two lowest-salt formulations during the first week of process (with 0.10 pH unit less at day 7); this discrepancy persisted as pH values increased over the next 2 weeks of process, before growing slightly stronger during the last week of process to peak at 0.15 pH units at day 29. However, all these pH values, especially the lowest and final values, are fully representative of what classically happens during French dry-fermented

sausage manufacture (Rason et al. 2007). Note that in the drying process, low a_w values and the pH values at fermentation stage (day 7) and at the end of ripening (day 29) obtained in this study are considered enough to ensure the microbial safety of dry-fermented sausages (Papadima and Bloukas 1999).

ANOVA and Tukey test (Table 3) showed very highly significant effects of time and fat content ($p < 0.001$). On the other hand, salt content and the interaction between salt and fat content appeared non-significant ($p > 0.05$). There is extensive research on the effect of reducing salt or fat content on pH values in dry-fermented sausages. For example, Olesen et al. (2004) and Stahnke (1995) reported lower pH values at fermentation stage in sausages made with lower amounts of NaCl. In contrast, Corral et al. (2013) did not find a significant effect on pH evolution nor on final pH value when NaCl was reduced by 16 % or substituted by 16 % KCl in slow-fermented sausages. The literature reports conflicting data on the effect of fat content on pH values. For instance, some studies did not find differences in pH values when comparing high- and low-fat dried sausages (García et al. 2002; Liaros et al. 2009; Papadima and Bloukas 1999). In contrast, Olivares et al. (2010) highlighted a faster pH decline in the case of fat-reduced dried sausages. Finally, Corral et al. (2014) did not find any significant difference in pH values between control sausages and sausages made with combined reduced-fat and reduced-salt formulations.

Our results (Fig 1c) show that combined salt and animal fat reductions during the manufacture of dry-fermented sausages led to a fully normal time-course of pH values, with strong acidification during the first week of process followed by a progressive increase in pH value.

Effect on Biochemical Parameters in Dry-Fermented Sausages

During dry-fermented sausage manufacture, and especially during the fermentation and ripening stages, the meat protein and lipid components undergo enzymatic and chemical modifications. The enzymatic modifications involved are chiefly proteolysis and lipolysis. These biochemical reactions are of high interest because they shape the development of sensory attributes of dry-fermented sausages, such as texture, juiciness and aroma.

Time-Course of Proteolysis

Figure 2 charts the time-course of proteolysis index. All eight formulations produced the same pattern of behaviour in terms of PI time-course. On the first day of process, proteolytic enzyme activity is already visible, which is quite logical because proteolytic enzymes are highly active at a temperature of about 24 °C (Harkouss et al. 2014). Proteolysis index (PI) ranged between 2.9 and 3 % at

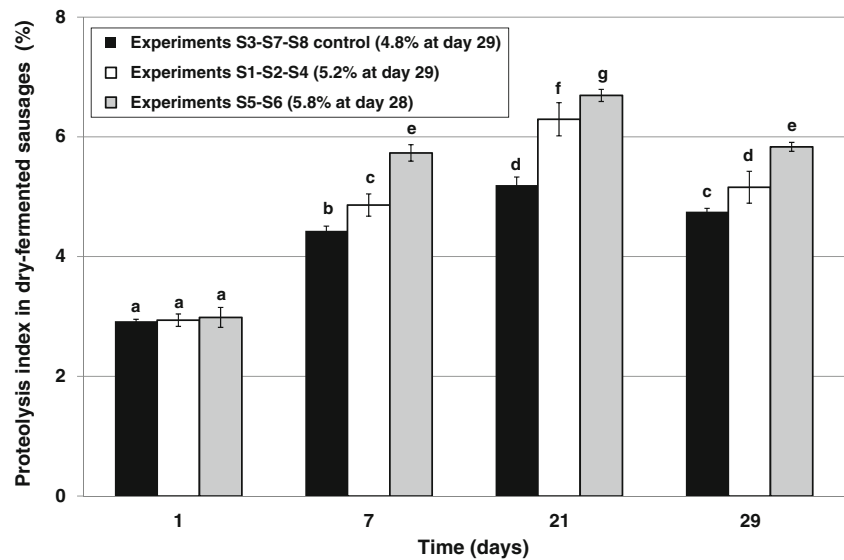
day 1 and reached 4.6–5.9 % at day 7 depending on formulation. From day 7, rate of proteolysis decreased noticeably, probably due to a non-optimal pH value for proteolytic enzyme activity (García-Garrido et al. 2000) due to the intense lactic acidification occurring at that point, as shown in Fig. 1c. Beyond day 21, very surprisingly, PI values decreased for all formulation classes (Fig. 2). To be sure that this decrease was not due to a problem with the fluorescent technique used, we measured PI in some samples with the classic Kjeldhal method consisting in calculating the percentage ratio of non-protein nitrogen content to total nitrogen content. This classical PI measurement method confirmed the decrease in PI values over the last week of the drying process (data not shown). This ultimately tends to prove that some end products of proteolysis had disappeared, likely consumed by microorganisms present in the dry-fermented sausages at that point in time, and so could not be detected by the measurement techniques used.

Figure 2 shows that HCA formed three classes of formulations. In-depth analysis of results highlighted that the formulations are perfectly classified as a function of their respective NaCl content, thus further confirming the inhibitory effect of salt content on proteolytic enzyme activity. Indeed, the first class that led to the lowest PI values is formed by the three 2.8 % NaCl formulations (S3, S7 and control S8), the second class by the 2.4 % NaCl formulations (S1, S2 and S4) and the third class by the 2.0 % NaCl formulations (S5 and S6). At day 21, PI values were 5.2, 6.3 and 6.7 %, respectively, according to class/salt content considered.

Moreover, ANOVA and Tukey test (Table 3) highlighted, for the first time, very highly significant effects of all the factors tested, i.e., time, salt content, fat content and also the interaction between salt and fat content ($p < 0.001$). However, no marked effect of fat content is visible in Fig. 2. Nevertheless, when comparing experiments S5 and S6 that belong to the same class, finer-grained analysis of the raw results revealed that proteolysis was slightly more intense in S5 than in S6, with day 21 PI values of 6.8 and 6.6 %, respectively. This probably resulted from a lower fat content (11.6 vs. 17.9 %) that provoked a more marked salt dilution and thus a lower salt concentration in the lean part of the meat batter that contained the greater quantity of lean pork meat (i.e., experiment S5). These results are in good agreement with Armenteros et al. (2009, 2012).

The present results (Fig. 2) confirmed that proteolysis in dry-fermented sausages was mainly governed by salt content but also highlighted that combined salt and animal fat reductions could amplify proteolytic enzyme activity. So, reducing the salt and fat content increases proteolysis; this can prove detrimental to the final texture of the end products.

Fig. 2 Time-course of proteolysis index investigated for the eight formulations of dry-fermented sausages given in Table 1. Hierarchical cluster analysis was performed on raw values in order to pool dry-fermented sausage formulations presenting similar patterns. For each class of dried sausages, values were means±standard deviation calculated from all the independent measurement values of each experiment constituting the class. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$)



Lipolysis of End Products

Applying HCA on the acidity values (lipolysis) determined at day 29 for all eight formulations led to the formation of two distinct classes as a function of animal fat content regardless of NaCl content. One class pooled the four formulations for which fat content was at most equal to 14.7 % and the other class pooled the 17.9 % animal fat and 21 % animal fat formulations. Mean acidity value was significantly higher for the formulations containing over 17 % animal fat, at 9.8 vs. 7.6 mg KOH per gram of product fat.

ANOVA showed that salt content significantly affected ($p < 0.01$) rate of lipolysis in dry-fermented sausages and that fat content was a highly significant factor strongly impacting rate of lipolysis ($p < 0.001$), unlike the interaction between salt and fat content ($p > 0.05$). Olivares et al. (2011) also cited a strong effect of fat content on lipolysis and on the generation of free fatty acids. These authors reported that slow-fermented sausages initially containing 30 % pork backfat showed higher rates of lipolysis than dried products made with lower pork backfat content (10 and 20 %). Furthermore, several authors have reported a more intense lipolysis in salt-reduced dried sausages (Stahnke 1995).

To conclude on lipolysis, our data suggests that the intensity of this biochemical phenomenon is strongly dependent on fat content and also influenced by salt content, but without significant interaction between these two factors, unlike for proteolysis.

Time-Course of Lipid and Protein Oxidations

Lipid and protein oxidations that occur throughout the manufacture of dry-fermented sausages are also involved in the

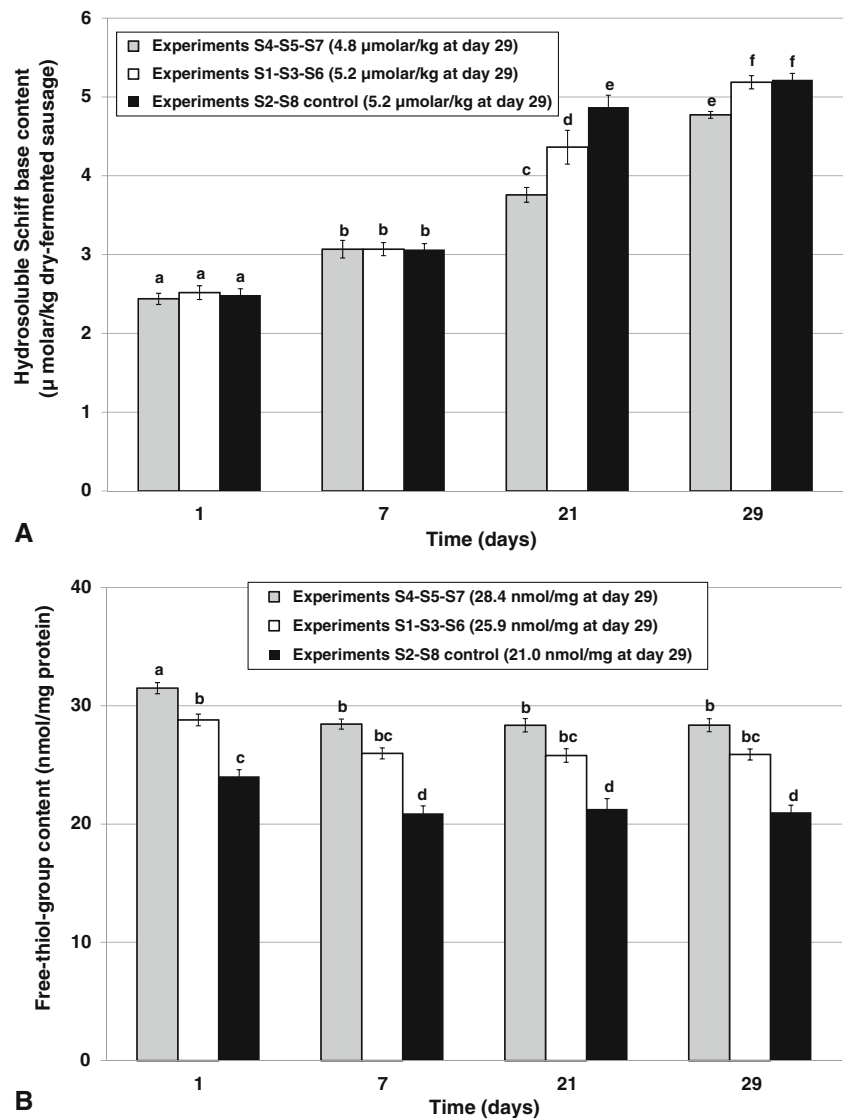
elaboration of the taste, flavour and odour of these kinds of dried cured products (Corral et al. 2013).

Lipid Oxidation

Figure 3a charts the time-course of lipid oxidation quantified by determining hydrosoluble Schiff base (HSB) values. However, lipid oxidation was first measured by the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) method (data not shown). A biphasic curve was obtained for all eight formulations, with TBARS value decreasing with time (mg MDA/kg of sample) beyond day 1, which is not a logical pattern and indicates that the TBARS quantification method was ill-suited to accurate assessment of lipid oxidation in the present study. This prompted us to assess lipid oxidation based on the fluorescence of HSB. Schiff bases are formed in meat during storage and cooking (Gatellier et al. 2009). They correspond to the binding of the aldehydic products of lipid peroxidation to free amino groups of proteins. The polarity of Schiff bases depends on their composition. It was observed in raw meat that the aqueous fluorophores were responsible for up to 72 % of total fluorescence intensity, whereas cooking reversed the percentages to reach 36 % in the polar phase and 64 % in the apolar phase (Gatellier et al. 2009).

Figure 3a shows the results of HCA applied to HSB values of all formulations. Contrary to the TBARS method (data not shown), HSB values increased observably as a function of time, meaning that lipid oxidation logically increased with time. Applying HCA led to classify the formulations into three distinct classes as a function of fat content; higher fat content means higher HSB values and thus higher lipid oxidation. The first class is formed of the three formulations containing at most 11.6 % animal fat (experiments S4, S5 and S7), the second class is formed of the three formulations containing

Fig. 3 Time-course of two oxidation reactions investigated for the eight formulations of dry-fermented sausages of Table 1: **a** lipid oxidation quantified by determining hydrosoluble Schiff base (HSB) content and **b** protein oxidation quantified by determining free thiol group content. Hierarchical cluster analysis was performed on raw values in order to pool dry-fermented sausage formulations presenting similar patterns. For each class of dried sausages, values were means±standard deviation calculated from all the independent measurement values of each experiment constituting the class. Values not bearing common superscripts differed significantly ($p < 0.05$)



between 14.7 and 17.9 % animal fat (experiments S1, S3 and S6), and the third class gathered the two 21 % animal fat formulations (experiments S2 and control S8). Figure 3a shows that these three classes differ in terms of lipid oxidation, especially at day 21 but less so at the end of product drying (day 29) and not really early on in the process (days 1 and 7)

ANOVA and Tukey tests (Table 3) indicated very highly significant effects of time and animal fat content ($p < 0.001$) on lipid oxidation but no significant effect of salt content, nor the interaction between salt and fat content ($p > 0.05$). These results are in line with Liaros et al. (2009) and Soyer et al. (2005) who reported that low-fat sausage presented lower lipid oxidation levels than control sausages. Olivares et al. (2011) also reported higher TBARS values in high-fat sausages compared to low-fat sausages. The literature is less clear on the effect of salt on lipid oxidation. For example, very recently, Corral et al. (2015) reported higher TBARS values and higher abundance of volatile compounds derived from lipid oxidation in salt-

reduced dried sausages, thus confirming their previous results (Corral et al. 2013). However, Jin et al. (2013) reported that high salt levels led to higher oxidation by decreasing antioxidant enzyme activity and releasing iron from heme-binding protein. Furthermore, Corral et al. (2015) recently reported higher lipid oxidation levels in salt-and-fat-reduced sausages.

Protein Oxidation

Protein oxidation was assessed by quantifying free-thiol-group content. Indeed, thiol groups of cysteine are very sensitive to the oxidative process and their oxidation leads to the formation of disulfide bridges. Note that protein oxidation is maximal when free thiol group content is minimal.

HCA-based results, shown in Fig. 3b, led to the formation of three classes of formulations, once again classified as a function of their respective fat content. Maximal protein oxidation was observed for the two 21 % animal fat formulations

(experiments S2 and S8). Minimal protein oxidation was found for the three formulations containing at most 11.6 % animal fat (experiments S4, S5 and S7). An intermediate class of experiments S1, S3 and S6 was formed from the formulations containing either 14.7 % animal fat or 17.9 % animal fat. However, since no clear change in protein oxidation appears with time, beyond day 1 (Fig. 3b), protein oxidation seems to occur rapidly, maybe directly during the meat batter preparation, without subsequent intensification.

Like for lipid oxidation, ANOVA and Tukey test (Table 3) showed very highly significant effects of time and fat content ($p < 0.001$) on protein oxidation, but without any significant effect of salt content, nor the interaction between salt and fat content ($p > 0.05$). Protein and lipid oxidations are linked by the fact that lipid oxidation produces free radicals that, in turn, drive protein oxidation. Therefore, maximal protein oxidation occurred in high-fat formulations. The present results are in good agreement with Fuentes et al. (2014) who recently reported a strong impact of fat level on protein oxidation. Regarding the effect of salt content on protein oxidation, Kanner et al. (1991) concluded that salt level increased the susceptibility of myofibril to carbonylation and the pro-oxidant activity of iron.

The present results indicate that lipid and protein oxidations in dry-fermented sausages are mainly affected by fat level but not by salt level in the range studied here (2.0–2.8 % NaCl) nor by the combined salt and animal fat reductions. The fact that reducing fat level decreases both these oxidative phenomena can potentially affect the final aroma of these products.

Conclusions

A series of eight fabrications of dry-fermented sausages was designed to investigate the effect of reducing salt and animal fat contents on the time-course of physicochemical parameters such as pH, weight loss and a_w and biochemical parameters such as proteolysis, lipolysis, lipid oxidation and protein oxidation. Analysis of the time-course of chemical composition in dry-fermented sausages confirmed that product drying globally leads to a reduction in in-product water content due to water evaporation from the product surface and, in turn, to a fat and salt concentration that increases fat and salt contents, respectively. Statistical analyses of the physicochemical parameters measured for dry-fermented sausages showed very highly significant impacts of time, salt and animal fat contents on weight loss and a_w values but only of time and salt content on pH values. Indeed, modifying the fat content of the meat batter modifies the salt concentration in the lean part of the batter, and thus the water activity value. Regarding a_w , reducing fat content in the products provokes the same increase in water activity as reducing salt content. So, binary reductions

in fat and salt content may prove detrimental from a safety standpoint if the products are not sufficiently dried. The results on proteolysis confirmed that this biochemical phenomenon in dry-fermented sausages was mainly governed by salt content and highlighted that it can be amplified by a combined reduction in fat and salt contents. Our experimental data also indicated that intensity of lipolysis was mainly dependent on fat content and that lipid and protein oxidations were more intense in high-fat formulations.

Combined salt and fat reductions during the manufacture of dry-fermented sausages globally affect end product quality by increasing acidification, weight losses and a_w values. These combined reductions also accelerate proteolysis and decelerate lipolysis and oxidative mechanisms, which can negatively affect the final sensory attributes of dry-fermented sausages. Additional, sensory studies are thus necessary to investigate the final product quality and consumer acceptability of low-salt and low-fat dry-fermented sausages. Furthermore, it will also be important from an industrial point of view to obtain accurate data on the potential application of new technologies in dried sausage production, such as partial substitution of NaCl by potassium chloride and adding vegetable oil rich in mono-unsaturated fatty acids, in an effort to reduce end product content of SFA by 60 % and salt content by 30 % in line with nutritional health recommendations.

Acknowledgments The research leading to these results received funding from the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement No. 289397 (TeRiFiQ project). This paper is part of the thesis of Hassan Safa, who works for this research program. The authors thank R. Favier, R. Agouninessouk, S. Portanguen, and the ADIV staff for their technical assistance, and ATT for proofreading the manuscript.

References

- Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2004). The use of linseed oil improves nutritional quality of the lipid fraction of dry-fermented sausages. *Food Chemistry*, *87*(1), 69–74.
- Armenteros, M., Aristoy, M. C., Barat, J. M., & Toldrá, F. (2009). Biochemical changes in dry-cured loins salted with partial replacements of NaCl by KCl. *Food Chemistry*, *117*(4), 627–633.
- Armenteros, M., Aristoy, M.-C., Barat, J. M., & Toldrá, F. (2012). Biochemical and sensory changes in dry-cured ham salted with partial replacements of NaCl by other chloride salts. *Meat Science*, *90*(2), 361–367.
- Bombrun, L. (2013). Analyse des transferts de masse et de l'adhésion entre muscles lors de la fabrication de charcuteries cuites à faible teneur en sel—Effet du traitement thermique et modélisation des pertes de poids. PhD Thesis, Clermont-Ferrand Blaise Pascal University, France, 182 p.
- Chrétien, J. R., & Szymoniak, K. (1987). Hierarchical ascending classification of Kováts retention indices as a means of indicating siloxane stationary phase specificities towards aliphatic carboxylic esters. *Journal of Chromatography A*, *406*, 95–104.

- Corral, S., Salvador, A., & Flores, M. (2013). Salt reduction in slow fermented sausages affects the generation of aroma active compounds. *Meat Science*, 93(3), 776–785.
- Corral, S., Salvador, A., Belloch, C., & Flores, M. (2014). Effect of fat and salt reduction on the sensory quality of slow fermented sausages inoculated with *Debaryomyces hansenii* yeast. *Food Control*, 45, 1–7.
- Corral, S., Salvador, A., Belloch, C., & Flores, M. (2015). Improvement the aroma of reduced fat and salt fermented sausages by *Debaromyces hansenii* inoculation. *Food Control*, 47, 526–535.
- Doehlert, D. H. (1970). Uniform shell designs. *Applied Statistics*, 19, 231–239.
- Flores, M., Durá, M. A., Marco, A., & Toldrá, F. (2004). Effect of *Debaryomyces* spp. on aroma formation and sensory quality of dry-fermented sausages. *Meat Science*, 68(3), 439–446.
- Flores, M., Nieto, P., Ferrer, J. M., & Flores, J. (2005). Effect of calcium chloride on the volatile pattern and sensory acceptance of dry-fermented sausages. *European Food Research and Technology*, 221, 624–630.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane-Stanley, G. H. (1957). A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497–508.
- Fuentes, V., Estévez, M., Ventanas, J., & Ventanas, S. (2014). Impact of lipid content and composition on lipid oxidation and protein carbonylation in experimental fermented sausages. *Food Chemistry*, 147, 70–77.
- García-Garrido, J. A., Quiles-Zafra, R., Tapiador, J., & Luque de Castro, M. D. (2000). Activity of cathepsin B, D, H and L in Spanish dry-cured ham of normal and defective texture. *Meat Science*, 56(1), 1–6.
- García, M. L., Dominguez, R., Galvez, M. D., Casas, C., & Selgas, M. D. (2002). Utilization of cereal and fruit fibres in low fat dry fermented sausages. *Meat Science*, 60(3), 227–236.
- Gatellier, P., Santé-Lhoutellier, V., Portanguen, S., & Kondjoyan, A. (2009). Use of meat fluorescence emission as a marker of oxidation promoted by cooking. *Meat Science*, 83(4), 651–656.
- Gelabert, J., Gou, P., Guerrero, L., & Arnau, J. (2003). Effect of sodium chloride replacement on some characteristics of fermented sausages. *Meat Science*, 65(2), 833–839.
- Gómez, M., & Lorenzo, J. M. (2013). Effect of fat level on physicochemical, volatile compounds and sensory characteristics of dry-ripened “chorizo” from Celta pig breed. *Meat Science*, 95(3), 658–666.
- Harkouss, R., Mirade, P. S., & Gatellier, P. (2012). Development of a rapid, specific and efficient procedure for the determination of proteolytic activity in dry-cured ham: definition of a new proteolysis index. *Meat Science*, 92(2), 84–88.
- Harkouss, R., Safa, H., Gatellier, P., Lebert, A., & Mirade, P. S. (2014). Building phenomenological models that relate proteolysis in pork muscles to temperature, water and salt content. *Food Chemistry*, 151, 7–14.
- Hoz, L., D'Arrigo, M., Cambero, I., & Ordonez, J. A. (2004). Development of an n-3 fatty acid and alpha-tocopherol enriched dry fermented sausage. *Meat Science*, 67(3), 485–495.
- Ingham, S., Duerge, D., Dropp, B., & Losinski, J. (2004). Survival of *Listeria monocytogenes* during storage of ready-to-eat meat products processed by drying, fermentation, and/or smoking. *Journal of Food Protection*, 67(12), 2698–2702.
- Jin, G., He, L., Yu, X., Zhang, J., & Ma, M. (2013). Antioxidant enzyme activities are affected by salt content and temperature and influence muscle lipid oxidation during dry-salted bacon processing. *Food Chemistry*, 141(3), 2751–2756.
- Josquin, N. M., Linssen, J. P., & Houben, J. H. (2012). Quality characteristics of Dutch-style fermented sausages manufactured with partial replacement of pork back-fat with pure, pre-emulsified or encapsulated fish oil. *Meat Science*, 90(1), 81–86.
- Kanner, J., Harel, S., & Jaffe, R. (1991). Lipid peroxidation of muscle food as affected by NaCl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1017–1021.
- Liaros, N. G., Katsanidis, E., & Bloukas, J. G. (2009). Effect of the ripening time under vacuum and packaging film permeability on processing and quality characteristics of low-fat fermented sausages. *Meat Science*, 83(4), 589–598.
- Martin-Sanchez, A. M., Chaves-Lopez, C., Sendra, E., Sayas, E., Fenandez-Lopez, J., & Perez-Alvarez, J. A. (2011). Lipolysis, proteolysis and sensory characteristics of a Spanish fermented dry-cured meat product (salchichon) with oregano essential oil used as surface mold inhibitor. *Meat Science*, 89(1), 35–44.
- Mora-Gallego, H., Serra, X., Guardia, M. D., Miklos, R., Lametsch, R., & Arnau, J. (2013). Effect of the type of fat on the physicochemical, instrumental and sensory characteristics of reduced fat non-acid fermented sausages. *Meat Science*, 93(3), 668–674.
- Morzel, M., Gatellier, P., Sayd, T., Renner, M., & Laville, E. (2006). Chemical oxidation decreases proteolytic susceptibility of skeletal muscle myofibrillar proteins. *Meat Science*, 73(3), 536–543.
- Muguerza, E., Fista, G., Ansorena, D., Astiasaran, I., & Bloukas, J. G. (2002). Effect of fat level and partial replacement of pork backfat with olive oil on processing and quality characteristics of fermented sausages. *Meat Science*, 61(4), 397–404.
- Olesen, P. T., Meyer, A. S., & Stahnke, L. H. (2004). Generation of flavour compounds in fermented sausages—the influence of curing ingredients, *Staphylococcus* starter culture and ripening time. *Meat Science*, 66(3), 675–687.
- Olivares, A., Navarro, J. L., & Flores, M. (2009). Distribution of volatile compounds in lean and subcutaneous fat tissues during processing of dry fermented sausages. *Food Research International*, 42(9), 1303–1308.
- Olivares, A., Navarro, J. L., & Flores, M. (2011). Effect of fat content on aroma generation during processing of dry fermented sausages. *Meat Science*, 87(3), 264–273.
- Olivares, A., Navarro, J. L., Salvador, A., & Flores, M. (2010). Sensory acceptability of slow fermented sausages based on fat content and ripening time. *Meat Science*, 86(2), 251–257.
- Ordóñez, J. A., Hierro, E. M., Bruna, J. M., & de la Hoz, L. (1999). Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39, 329–367.
- Papadima, S. N., & Bloukas, J. G. (1999). Effect of fat level and storage conditions on quality characteristics of traditional Greek sausages. *Meat Science*, 51(2), 103–113.
- Quintanilla, L., Ibañez, C., Cid, C., Astiasarán, I., & Bello, J. (1996). Influence of partial replacement of NaCl with KCl on lipid fraction of dry fermented sausages inoculated with a mixture of *Lactobacillus plantarum* and *Staphylococcus carnosus*. *Meat Science*, 43(3–4), 225–234.
- Rason, J., Laguet, A., Berge, P., Dufour, E., & Lebecque, A. (2007). Investigation of the physicochemical and sensory homogeneity of traditional French dry sausages. *Meat Science*, 75(3), 359–370.
- Rhee, K. S., Smith, H. G. C., & Terrell, R. N. (1983). Effect of reduction and replacement of sodium chloride on rancidity development in raw and cooked ground pork. *Journal of Food Protection*, 46(7), 578–581.
- Roseiro, L. C., Santos, C., Sol, M., Borges, M. J., Anjos, M., Goncalves, H., & Carvalho, A. S. (2008). Proteolysis in Painho de Portalegre dry fermented sausage in relation to ripening time and salt content. *Meat Science*, 79(4), 784–794.
- Ruiz-Capillas, C., Triki, M., Herrero, A. M., Rodriguez-Salas, L., & Jimenez-Colmenero, F. (2012). Konjac gel as pork backfat replacer in dry fermented sausages: processing and quality characteristics. *Meat Science*, 92(2), 144–150.
- Sanchez-Zapata, E., Diaz-Vela, J., Perez-Chabela, M. L., Pérez-Alvarez, J. A., & Fernandez-Lopez, J. (2013). Evaluation of the effect of tiger nut fibre as a carrier of unsaturated fatty acids rich oil on the quality

- of dry-cured sausages. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 1181–1190.
- Soyer, A., Ertas, A. H., & Üzümcüoğlu, Ü. (2005). Effect of processing conditions on the quality of naturally fermented Turkish sausages (sucuks). *Meat Science*, 69(1), 135–141.
- Stahnke, L. H. (1995). Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosum* at different temperatures and with different ingredient levels—Part I. Chemical and bacteriological data. *Meat Science*, 41(2), 179–191.
- Stollewerk, K., Jofré, A., Comaposada, J., Arnau, J., & Garriga, M. (2012). The impact of fast drying (QDS process[®]) and high pressure on food safety of NaCl-free processed dry fermented sausages. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 89–95.
- US Department of Health and Human services (2005). Dietary guidelines for Americans. <http://www.health.gov/dietaryguidelines/dga2005/document>. Accessed 29 Jan 2015.
- Wishart, D. (1969). An algorithm for hierarchical classifications. *Biometrics*, 25(1), 165–170.
- Zanardi, E., Ghidini, S., Conter, M., & Ianieri, A. (2010). Mineral composition of Italian salami and effect of NaCl partial replacement on compositional, physico-chemical and sensory parameters. *Meat Science*, 86, 742–747.

Title

Combined salt and animal fat reductions during dry-fermented sausage manufacture: effects on physical-chemical properties and biochemical reactions related to the aromatic compound production and sensory attributes.

Abstract

Because of public health problems, the food industry must lower sodium and animal fat contents in all food products, therefore in cured meat products. During dry-fermented sausage manufacture, a combined reduction both in salt and animal fat contents may induce microbial safety problems and textural and aroma defects due to physical-chemical and biochemical changes. On account of that, this work of thesis aims (1) to investigate the impact of a direct reduction on the salt and animal fat contents on the physical-chemical and biochemical evolutions in the products, (2) to identify the aromatic compounds responsible for the aroma of dry-fermented sausage, and their origins, (3) to develop new nutritionally-improved formulations of dry-fermented sausages with less sodium and saturated fatty acids, and (4) to study the impact of lipid and sodium chloride contents on water transfers in dry-fermented sausages and to build a specific sorption isotherm curve for dry sausages.

The study of the effect of a combined direct reduction highlighted the difficulty of manufacturing sodium-reduced fat-reduced dry sausages, without affecting the physical-chemical and biochemical evolutions. Identification of odorous volatile compounds of high quality dry sausages showed that flavouring, especially garlic and black pepper, could be a good solution for improving the aromatic quality of salt-reduced fat-reduced dry-fermented sausages. The impact of flavouring and of a combined salt and animal fat replacement by potassium chloride and oleic sunflower oil, respectively, on physical-chemical properties, biochemical reactions and sensory attributes of dry-fermented sausages was then studied. This specific study showed the crucial role played by flavouring which introduces aromatic molecules that enhance the product acceptability by consumers, which acts as an enhancer of the saltiness perception and which improves the product appearance and texture by boosting the fermentation process. Consequently, the combined partial substitution is an efficient solution to preserve at best the organoleptic quality of the products, allowing, on one hand, avoiding the textural and sensory defects related to physical-chemical, proteolytic and lipolytic modifications induced by a combined direct reduction, and on the other hand, enhancing the product aroma by increasing the levels of lipid and protein oxidations.

The study on water and salt transfers highlighted a salt diffusion towards the dry sausage core, and made it possible to determine values of apparent water diffusivity at the sausage surface. We demonstrated that a strong reduction in animal fat content significantly lowered the water diffusivity value at the product surface. A specific sorption isotherm curve based on a modified Ross model was built, allowing dry-fermented sausages water activity to be calculated as a function of water, fat and salt contents.

Keywords: dry-fermented sausage; salt; sodium; animal fat; direct reduction; partial substitution; physical-chemical and biochemical properties; odorous volatile compounds; flavouring; acceptability; water and salt transfers; water diffusivity; sorption isotherm curve.

Titre

Réduction combinée en chlorure de sodium et en matière grasse animale lors de la fabrication du saucisson sec : effets sur les propriétés physicochimiques et les réactions biochimiques en lien avec la production aromatique et les attributs sensoriels.

Résumé

Du fait de problèmes de santé publique, l'industrie agroalimentaire doit réduire la quantité de sel et de matière grasse dans les aliments, et donc dans les charcuteries. Lors de la fabrication des saucissons secs, une diminution combinée des taux de sel et de matière grasse animale peut se traduire par des problèmes de stabilité microbiologique, des défauts d'arôme et de texture dus à des modifications physicochimiques et biochimiques. Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse étaient : (1) d'étudier l'impact d'une réduction directe des teneurs en sel et en matière grasse animale sur les évolutions physicochimiques et biochimiques au sein des produits, (2) d'identifier les composés aromatiques responsables de l'arôme du saucisson sec, ainsi que leurs origines, (3) de développer de nouvelles formulations de saucissons secs à teneurs réduites en sodium et en acides gras saturés, et (4) d'étudier les transferts d'eau et sel et de développer une isotherme de sorption spécifique pour le saucisson sec.

L'étude de l'effet d'une réduction directe combinée a mis en évidence la difficulté de fabriquer des saucissons secs à teneurs réduites en sel et en matière grasse animale, sans modifier les évolutions physicochimiques et biochimiques. Une identification des composés volatils odorants de saucissons secs de haut de gamme a permis de montrer que l'aromatisation par l'ail et le poivre noir pouvait être un levier technologique permettant d'améliorer la qualité aromatique des saucissons secs allégés en sel et en matière grasse animale. L'impact de l'aromatisation et d'une substitution partielle combinée du sel par le chlorure de potassium et du gras de bardière de porc par l'huile de tournesol oléique sur les propriétés physicochimiques, les réactions biochimiques et les attributs sensoriels de saucissons secs, a été étudié. Cette étude a montré le rôle important de l'aromatisation qui agit en introduisant des molécules aromatiques qui rehaussent l'acceptabilité des produits par les consommateurs, en tant qu'exhausteur de la perception du goût salé et aussi, sur les processus fermentaires qui vont conditionner l'aspect et la texture finale du produit. La substitution partielle combinée est une solution efficace pour conserver au mieux la qualité organoleptique des saucissons, en permettant, d'une part, d'éviter les défauts texturaux et sensoriels liés aux modifications physicochimiques, protéolytiques et lipolytiques générés par une réduction directe combinée, et d'autre part, d'améliorer l'arôme du produit en rehaussant les niveaux d'oxydations lipidique et protéique.

L'étude des transferts d'eau et de sel a mis en évidence une migration du sel vers le cœur du saucisson, et a permis de déterminer des valeurs de diffusivité apparente de l'eau en surface de ces produits. Il a été montré qu'une forte réduction en matière grasse réduisait la diffusivité de l'eau à la surface du saucisson. Une isotherme de sorption spécifique permettant de prédire l' a_w en fonction des teneurs en eau, en lipides et en sel a été construite en adaptant un modèle de Ross établi pour la gélatine salée et grasse.

Mots clés : saucisson sec ; sel ; sodium ; matière grasse animale ; réduction directe ; substitution partielle ; propriétés physicochimiques et biochimiques ; composés volatils odorants ; aromatisation ; acceptabilité ; transferts d'eau et sel ; diffusivité de l'eau ; isotherme de sorption.